



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월16일
(11) 등록번호 10-2444180
(24) 등록일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0275 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7036226
(22) 출원일자(국제) 2019년06월14일
심사청구일자 2021년11월09일
(85) 번역문제출일자 2020년12월16일
(65) 공개번호 10-2021-0020031
(43) 공개일자 2021년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/037285
(87) 국제공개번호 WO 2019/241692
국제공개일자 2019년12월19일
(30) 우선권주장
62/685,203 2018년06월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Annu Rev Immunol., 24:541-570(2006.1.)
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리
버 로드 777
(72) 발명자
머피 앤드류 제이.
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
맥도날드 린
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 72 항

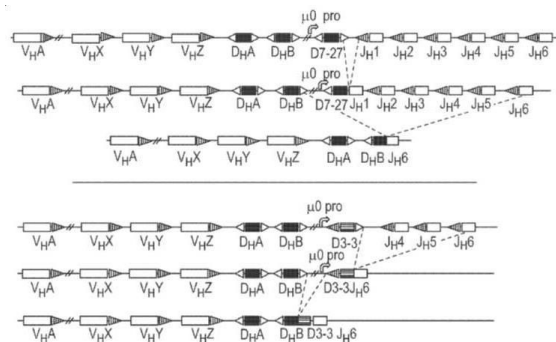
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 면역글로불린 중쇄 암호화 서열에서 DH-DH 재배열 가능한 비인간 동물

(57) 요약

비-인간 동물 및 그 동물을 만들고 이용하기 위한 방법과 조성물이 제공되며, 여기서 비-인간 동물은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내에 조작된 또는 재조합 다양성 클러스터를 포함하는 게놈을 가지며, 이때 조작된 또는 재조합 다양성 클러스터는 각각 23-량체 재조합 신호 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절의 삽입을 포함한다. 비-인간 동물로부터 항체를 생산하는 방법도 제공되며, 이때 항체는 선택적으로 인간 가변 영역과 예를 들어 설치류, 불변 영역을 함유한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/70503 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
C12N 2015/8518 (2013.01)
C12N 2015/8527 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)
C12N 2517/02 (2013.01)

(72) 발명자

귀 춘광

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

보로니나 베라

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

(56) 선행기술조사문헌

EMBO J., 7(11):3413-3422(1988.11.)
 Eur J Immunol., 30(10):2998-3005(2000.10.)
 J Exp Med., 170(1):39-57(1989.7.1.)
 Nucleic Acids
 Res., 20(23):6287-6295(1992.12.11.)

(30) 우선권주장

62/702,206 2018년07월23일 미국(US)
 62/812,580 2019년03월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

조작된 면역글로불린 중쇄 다양성 (D_H) 영역 ("조작된 D_H 영역")을 포함하는 뉴클레오티드 분자로서,

(i) 23-량체 RSS에 바로 인접한 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 유전자 분절 ("조작된 D_H 유전자 분절") 및

(ii) 5' 측부에 제1 12-량체 RSS가 있고 3' 측부에 제2 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 ("재배열되지 않은 D_H 유전자 분절")을 포함하며,

(i) 조작된 D_H 유전자 분절 및 (ii) 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 (i) 조작된 D_H 유전자 분절 및 (ii) 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절이 12/23 규칙에 따라 D_H - D_H 재조합 이벤트에 참여할 수 있도록 작동가능하게 연결되고,

뉴클레오티드 분자는 조작된 D_H 영역을 갖는 설치류를 수득하기 위한 것이고,

조작된 D_H 영역은 인간 D_H 유전자 분절만을 포함하는, 뉴클레오티드 분자.

청구항 2

제1 항에 있어서, 뉴클레오티드 분자는

(a) 조작된 D_H 영역의 상류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 유전자 분절 ("재배열되지 않은 V_H 유전자 분절");

(b) 조작된 D_H 영역의 하류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 연결 (J_H) 유전자 분절 ("재배열되지 않은 J_H 유전자 분절"); 또는

(c) (a)와 (b)의 조합

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 3

제2 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절을 포함하거나, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하거나, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 4

제2 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 5

제2 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하거나, 또는

적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 생식선 구성에 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 6

제2 항에 있어서,

- (i) 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 V_H1-6 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리 ("기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리")를 포함하거나,
- (ii) 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리는 생식선 구성으로 되거나, 또는
- (iii) 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 생식선 구성에 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 7

제1 항에 있어서,

- (i) 뉴클레오티드 분자는 하나 이상의 기능성 설치류 Adam6 유전자를 더 포함하거나, 또는
- (ii) 뉴클레오티드 분자는 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치하고 그리고/또는 인간 Adam6 유전자를 대체하는 하나 이상의 기능성 설치류 Adam6 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 8

제1 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절은 D_H 유전자 분절의 5' 말단에 바로 인접한 23-량체 RSS를 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 9

제1 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절은 D_H 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접한 23-량체 RSS를 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 10

제1 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절은

- (a) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H3-3 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_H3-3 유전자 분절의 5' 말단에 바로 인접하는, 분절,
 - (b) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-2 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_H2-2 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절,
 - (c) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-8 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_H2-8 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절
 - (d) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-15 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_H2-15 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절, 또는
 - (e) (a)-(d)의 임의의 조합
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 11

제1 항에 있어서, 서열번호 52로서 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 12

제1 항에 있어서, 서열번호 61로서 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 13

제1 항에 있어서, 서열번호 70로서 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 14

제1 항에 있어서, 서열번호 71로서 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 15

제1 항에 있어서, 서열번호 72로서 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 16

제1 항에 있어서, 5'에서 3'로 작동 가능한 연결로:

- (a) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절,
 - (b) 조작된 D_H 영역으로서, 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H3-3 유전자 분절을 포함하고, 23-량체 RSS는 인간 D_H3-3 유전자 분절의 5' 말단에 바로 인접한, 조작된 D_H 영역, 및
 - (c) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 17

제1 항에 있어서, 5'에서 3'로 작동 가능한 연결로:

- (a) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절,
 - (b) 조작된 D_H 영역으로서, 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접한 D_H2 유전자 분절을 포함하고, 23-량체 RSS는 인간 D_H2 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하며,
 - (i) 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-2 유전자 분절을 포함하거나;
 - (ii) 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-8 유전자 분절을 포함하거나;
 - (iii) 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_H2-15 유전자 분절을 포함하거나;
 - (iv) 이들의 임의의 조합을 포함하는, 조작된 D_H 영역, 및
 - (c) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 18

제16 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절은 5'에서 3'로 재배열되지 않은 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절을 포함하고, 뉴클레오티드는 재배열되지 않은 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 하나 이상의 기능성 설치류 Adam6 유전자를 더 포함하고, 재배열되지 않은 인간 V_H1-2 유전자 분절, 하나 이상의 기능성 설치류 Adam6 유전자, 및 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절은 인접하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 19

제16 항에 있어서,

- (i) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절은 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하거나, 또는
- (ii) 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절은 생식선 구성에 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 20

제16 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 21

제20 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 22

제21 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하거나, 또는

적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절은 생식선 구성에 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 23

제1 항에 있어서, 3' 말단에서 중쇄 면역글로불린 불변 (C_H) 영역 또는 이의 일부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 24

제23 항에 있어서, C_H 영역 또는 이의 일부는 설치류 C_H 영역 또는 이의 일부인 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 25

제24 항에 있어서, 설치류 C_H 영역 또는 이의 일부는 설치류 인트론 인핸서 영역 및 설치류 IgM 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 26

제1 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절의 상류에 위치한 약물 선별 카세트또는 하나 이상의 부위-특이적 재조합 부위가 측부에 위치하는 약물 선별 카세트를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 분자.

청구항 27

제1 항의 뉴클레오타이드 분자를 포함하는 표적화 벡터로서,

- (i) 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 좌위에서 면역글로불린 중쇄 서열, 또는
- (ii) 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 좌위에서 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 상동성 재조합을 허용하도록 구성된 5' 및 3' 상동 아암을 포함하는, 표적화 벡터.

청구항 28

D_H - D_H 재조합을 조작하기 위해 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 변형시키는 방법으로서, 방법은:

- (a) 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절의 각각이 5' 측부에 제1 12-량체 RSS가 있고 3' 측부에 제 12-량체 RSS가 있는 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하는 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 서열을 수득하는 단계, 및
- (b) 적어도 하나의 조작된 D_H 유전자 분절을 더 포함하도록 D_H 영역을 조작하는 단계로서, 조작된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 바로 인접하는 D_H 유전자 분절을 포함하는, 단계

를 포함하며,

결과적인 조작된 D_H 영역에서, 조작된 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나가 작동가능하게 연결되고 12/23 규칙에 따라 D_H - D_H 재조합 이벤트에 참여할 수 있는, 방법.

청구항 29

제28 항에 있어서, 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29 항에 있어서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 및 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절 사이에 걸쳐 있는 모든 기능성 인간 D_H 유전자 분절을 포함하거나,

적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절은 생식선 구성에 모든 기능성 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제28 항에 있어서, 제28 항의 (a)의 D_H 영역은 둘 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하며, 이것들의 각각은 5' 측부에 제1 12-량체 RSS가 있고 3' 측부에 제2 12-량체 RSS가 있고,

조작하는 단계는

- (a) 둘 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나를 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절로 대체하는 단계,
- (b) 둘 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나의 제1 12-량체 RSS 또는 제2 12-량체 RSS를 23-량체 RSS로 대체하는 단계, 또는
- (c) (a)와 (b)의 조합

을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제31 항에 있어서, 번역글로불린 중쇄 가변 서열은 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절을 포함하는 J_H 영역을 더 포함하고,

J_H 영역은 D_H 영역에 작동가능하게 연결되고,

둘 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나를 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절로 대체하는 단계는 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절을 결실시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제32 항에 있어서,

(I) J_H 영역은 재배열되지 않은 인간 J_{H1} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H2} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H3} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H4} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H5} 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_{H6} 유전자 분절을 포함하는 인간 생식선 J_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하거나, 또는

J_H 영역은 생식선 구성에 재배열되지 않은 인간 J_{H1} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H2} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H3} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H4} 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_{H5} 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_{H6} 유전자 분절을 포함하고, 및

(II) 적어도 하나의 생식선 J_H 유전자 분절을 결실시키는 단계는 재배열되지 않은 인간 J_{H1} 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_{H2} 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 J_{H3} 유전자 분절을 결실시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제28 항에 있어서, 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절은

(a) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_{H3-3} 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_{H3-3} 유전자 분절의 5' 말단에 바로 인접하는, 분절,

(b) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_{H2-2} 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_{H2-2} 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절

(c) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_{H2-8} 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_{H2-8} 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절,

(d) 23-량체 RSS에 바로 인접한 인간 D_{H2-15} 유전자 분절로써, 23-량체 RSS는 D_{H2-15} 유전자 분절의 3' 말단에 바로 인접하는, 분절, 또는

(e) (a)-(d)의 임의의 조합

을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제31 항에 있어서, 조작하는 단계는 제28 항의 (a)에서 정의된 D_H 영역의 가장 3'의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절로 대체하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제31 항에 있어서, 조작하는 단계는 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절에 상응하는 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나를 제28 항의 (b)에서 정의된 조작된 D_H 유전자 분절로 대체하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제1 항의 뉴클레오티드 분자, 제27 항의 표적화 벡터, 또는 제28 항의 방법에 따라 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 좌위.

청구항 38

제1 항의 뉴클레오티드 분자, 제27 항의 표적화 벡터, 제28 항의 방법에 따라 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 설치류 게놈.

청구항 39

제38 항에 있어서, 설치류 게놈은

(i) 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절,

(ii) 인간 D_H 유전자 분절만을 포함하는, 조작된 D_H 영역, 및

(iii) 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절

을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하며,

(i)-(iii)은 작동 가능한 연결로, 재조합 시, 면역글로불린 중쇄 가변 영역이 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하도록 하고, 재배열된 중쇄 가변 영역 서열은 $V_H(D_H-D_H)J_H$ 재조합 이벤트 후에 형성되는 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 40

제39 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절은 3' 23-량체 RSS에 바로 인접한 D_H 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 41

제39 항에 있어서, 조작된 D_H 유전자 분절은 5' 23-량체 RSS에 바로 인접한 D_H 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 42

제39 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 V_H 유전자 분절, 인간 D_H 유전자 분절, 및 인간 J_H 유전자 분절만을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역인 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 43

제42 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 C_H 영역에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 44

제43 항에 있어서, C_H 영역은 내인성 C_H 영역인 것을 특징으로 하는 설치류 게놈.

청구항 45

제39 항에 있어서,

(i) 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함

하거나, 또는

(ii) 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 생식선 구성에 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 46

제39 항에 있어서, 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 47

제39 항에 있어서, 설치류 계놈은 내인성 Adam6 유전자가 결여되어 있는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 48

제39 항에 있어서,

(i) 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자, 또는

(ii) 내인성 설치류 Adam6 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 49

제48 항에 있어서, 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자는 2개의 인간 V_H 유전자 분절 사이에 삽입되는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 50

제49 항에 있어서, 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자는 재배열되지 않은 인간 V_H1-2 유전자 분절과 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 삽입되는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 51

제48 항에 있어서, 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자는 인간 Adam6 위유전자의 위치에 삽입되는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 52

제48 항에 있어서, 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자는 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절과 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절 사이에 삽입되는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 53

제38 항에 있어서, 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 54

제38 항에 있어서, 조작된 D_H 영역에 대해 동형접합성인 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 55

제38 항에 있어서, 조작된 D_H 영역에 대해 이형접합성인 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 56

제38 항에 있어서, 설치류 계놈은 랫트 계놈 또는 마우스 계놈인 것을 특징으로 하는 설치류 계놈.

청구항 57

제38 항의 설치류 게놈을 포함하는 설치류 세포.

청구항 58

제57 항에 있어서, 설치류 세포는 랫트 세포, 또는 마우스 세포인 것을 특징으로 하는 설치류 세포.

청구항 59

제57 항에 있어서, 설치류 세포는 설치류 배아 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 설치류 세포.

청구항 60

제59 항의 설치류 배아 줄기 세포로부터 발생된 설치류.

청구항 61

제60 항에 있어서, 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 포함하는 체세포 게놈을 더 포함하며,

재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 유전자 분절은 IgM 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결되고/되거나, D_HA 또는 D_HB 는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절 또는 그의 일부로부터 유래되고, D_HA 또는 D_HB 의 적어도 9개의 염기쌍은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절 또는 그의 일부의 적어도 9개의 염기쌍과 동일한 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 62

제60 항에 있어서, 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 VDJ 코딩 서열의 적어도 95%는 적어도 10개의 아미노산의 CDR3 길이를 가지며, 또는 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 VDJ 유전자 서열의 적어도 70%는 적어도 11개의 아미노산의 CDR3 길이를 가지고, 또는 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 VDJ 코딩 서열의 적어도 15%는 적어도 14개의 아미노산의 CDR3 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 63

제60 항에 있어서, 설치류는 기준 설치류에서의 D_H-D_H 재조합의 빈도와 비교하여 적어도 3배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타내는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 64

조작된 D_H 영역을 포함하는 게놈을 가진 설치류를 제조하는 방법으로서, 제59 항의 배아 줄기 세포로부터 설치류를 발생시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 65

조작된 D_H 영역을 포함하는 게놈을 갖는 설치류를 제조하는 방법으로서, 방법은

(a) 하나 이상의 조작된 D_H 분절을 포함하는 DNA 단편을 포함하도록 설치류 배아 줄기 세포의 게놈을 변형시키고, 각각은 23-량체 RSS에 바로 인접한 D_H 게놈 분절을 포함하고, DNA 단편은 제1 항의 뉴클레오티드 분자, 제27 항의 표적화 벡터, 제28 항의 방법에 따라 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단계, 및

(b) (a)의 변형된 설치류 배아 줄기 세포를 사용하여 설치류를 발생시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 66

제60 항 또는 제61 항에 있어서, 설치류는 랫트 또는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

항체를 생산하거나 이를 암호화하는 핵산을 수득하는 방법으로서, 방법은

설치류를 항원으로 면역화시키는 단계로서, 설치류는 각각 23-량체 RSS에 바로 인접한 하나 이상의 조작된 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 생식선 계통을 포함하고, 설치류는 제65 항에 따라 제조된 설치류인, 단계 및

설치류가 항원에 결합하는 항체, 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 항원에 대한 면역 반응을 생성하게 하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 68

제67 항에 있어서, 설치류 또는 설치류 세포로부터 항체 또는 이를 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제67 항에 있어서, 설치류 세포가 B 세포 또는 하이브리도마인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

제67 항에 있어서, 각각 23-량체 RSS에 바로 인접한 하나 이상의 조작된 D_H 유전자 분절은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제67 항에 있어서, 각각 23-량체 RSS에 바로 인접한 하나 이상의 조작된 D_H 유전자 분절은 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제67 항 내지 제71 항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 랫트 또는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(3)에 의거하여 미국 특허 가출원 제62/685,203호(2018년 6월 14일 출원), 제 62/702,206호(2018년 7월 23일 출원), 및 제62/812,580호(2019년 3월 1일 출원)의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 원용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 서열 목록의 공식 사본은, 2019년 6월 13일자로 생성되고 "10347_ST25.txt"의 파일명을 가진 약 50 킬로바이트 크기의 ASCII 형식의 서열 목록으로서, EFS-Web을 통해 전자 방식으로 명세서와 함께 동시에 제출된다. 본 ASCII 형식의 문헌에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0005] 단일클론 항체 산물은 생물의약품 산업에 혁명을 일으켰으며 여러 질환 치료에서 상당한 발전을 이루었다. 이러한 단일클론 항체 산물 중 다수는 항체 분자의 자연적 특징을 이용하였으며(즉, 전통적인 면역글로불린 유전자 분절), 일부 경우에, 표지(예를 들어, 폐길화, 방사성 표지) 또는 다른 약물과의 접합과 같은 다른 특징을 통합

시켰다. 현재 승인 속도로 볼 때, 2020년까지 약 70개의 단일클론 항체 산물이 시판될 것으로 예상된다. 이러한 발전과 치료 용도로 단일클론 항체를 사용하여 얻은 지식에도 불구하고, 단일클론 항체가 결합 및/또는 접근하기 어려운 표적과 관련된 질병이 지속되고 있으며, 이는 효과적인 치료제 개발을 위한 다양한 접근법의 필요성을 강조한다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명은 새로운 항체 기반 치료제, 일부 구현예에서, 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있는, 항체 제제(예를 들어, 단일클론 항체 및/또는 이의 단편)를 확인하고 개발하기 위한 추가적인 생체 내 시스템을 확립하기 위해 비-인간 동물(예를 들어, 설치류(예를 들어, 랫트, 예를 들어 마우스))을 조작하는 것이 바람직하다는 인식을 포함한다. 또한, 본 발명은 또한 D_H -대- D_H 재배열을 허용하는 재조합 신호 서열에 작동가능하게 연결되도록 조작된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (예, 이중 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 예를 들어, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역) 내에 조작된 중쇄 다양성 (D_H) 클러스터(또는 조작된 D_H 영역)를 갖는 비-인간 동물의 바람직함을 포함하며, 이는 야생형 (또는 기준) CDR3에 비해 더 긴 아미노산 길이 및 일부 구현예에서, 특정 항원에 대한 결합을 지시하는 다양성을 특징으로 하는 상보적 결정 영역 3 (CDR3)을 함유하는 항체의 발현 증가로 이어질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 비-인간 동물은 인간에게 투여하기 위한 항체 및/또는 항체 기반 치료제의 개발을 위한 개선된 생체 내 시스템을 제공한다.
- [0007] 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 면역글로불린 중쇄 다양성 (D_H) 유전자 분절을 포함하는 뉴클레오티드 분자가 본원에 기술되며, 임의로 D_H 유전자 분절은 예를 들어 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역)의 조작된 D_H 영역 내에 위치될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 23-량체 (RSS)에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 면역글로불린 중쇄 다양성(D_H) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 (i) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절 및 (ii) 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하고, 여기서 (i) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절 및 (ii) 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 생식선(germline) D_H 유전자 분절은 (i) 및 (ii)가 12/23 규칙에 따라 ADD_H 재조합 이벤트에 참여할 수 있도록 작동가능하게 연결된다. 또한 표적화 벡터, 비-인간 동물(예를 들어, 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)) 및 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자를 포함하는 비-인간 동물 세포(예를 들어, 랫트 세포 또는 마우스 세포), 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자를 사용하는 방법 등이 제공된다.
- [0008] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 19개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 20개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 23개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 28개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 31개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 37개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, D_H2 유전자 분절은 적어도 30개의 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 2개의 시스테인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3 -3 유전자 분절, D_H3 -9 유전자 분절, D_H3 -10 유전자 분절, D_H3 -16 유전자 분절, D_H3 -22 유전자 분절, 인간 D_H2 -2 유전자 분절, 인간 D_H2 -8 유전자 분절, 또는 인간 D_H2 -15 유전자 분절로 이루어진 군으로부터 선택된 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3 -3 유전자

분절, 인간 D_H2-2 유전자 분절, 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 인간 D_H2-15 유전자 분절로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-3 유전자 분절, 인간 D_H2-2 유전자 분절, 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 인간 D_H2-15 유전자 분절로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-3 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-2 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-8 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-15 유전자 분절을 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은, (a) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H3-3 유전자 분절 -선택적으로, 상기 23-량체 RSS는 인간 D_H3-3 유전자 분절의 5' 말단에 인접함-, (b) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-2 유전자 분절 -선택적으로, 상기 23-량체 RSS는 인간 D_H2-2 유전자 분절의 3' 말단에 인접함-, (c) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절 -선택적으로, 상기 23-량체 RSS는 인간 D_H2-8 유전자 분절의 3' 말단에 인접함-, (d) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절 -선택적으로, 상기 23-량체 RSS는 인간 D_H2-15 유전자 분절의 3' 말단에 인접함-, 또는 (e) (a)-(d)의 임의의 조합을 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 번역글로불린 중쇄 가변 영역 등)는 서열번호 52로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 번역글로불린 중쇄 가변 영역 등)는 서열번호 61로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 번역글로불린 중쇄 가변 영역 등)는 서열번호 70로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 번역글로불린 중쇄 가변 영역 등)는 서열번호 71로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0014] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 번역글로불린 중쇄 가변 영역 등)는 서열번호 72로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5'에서 3'로 23-량체 RSS를 포함하고, D_H 유전자 분절은 예를 들어, 5'에서 3'로 23-량체 RSS, (인간) D_H 유전자 분절 및 12-량체 RSS를 포함하고, 예를 들어, 23-량체 RSS는 D_H 유전자 분절의 5' 말단에 인접하며, 예를 들어, D_H 유전자 분절은 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H3-3 유전자 분절을 포함하며, 예를 들어 뉴클레오타이드 분자는 5'에서 3'로 23-량체 RSS, 인간 D_H3-3 유전자 분절, 및 12-량체 RSS를 포함한다.

[0016] 5' 말단 23-량체 RSS와 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 추가로 포함할 수 있으며, (예를 들어, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유

전자 분절은 생식선 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 그 생식선 구성의 D_H 유전자 분절 등을 포함할 수 있다), 여기서 상기 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 5' 말단 23-량체에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절의 상류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5'에서 3'로 D_H 유전자 분절을 포함하고, 23-량체 RSS는, 예를 들어, 5'에서 3'로 12-량체 RSS, (인간) D_H 유전자 분절, 및 23-량체 RSS를 포함하며, 예를 들어, 23-량체 RSS는 D_H 유전자 분절의 3' 말단에 인접하며, 예를 들어, D_H 유전자 분절은 3' 말단 23-량체에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2 유전자 분절을 포함하고, 여기서 D_H2 유전자 분절은 인간 D_H2-2 유전자 분절, 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 인간 D_H2-15 유전자 분절로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5'에서 3'로: 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5'에서 3'로: 12-량체 RSS, 인간 D_H2-2 유전자 분절, 및 23-량체 RSS를 포함하는 제1 연속 뉴클레오티드 서열, 12-량체 RSS, 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 23-량체 RSS를 포함하는 제2 연속 뉴클레오티드 서열, 및 12-량체 RSS, 인간 D_H2-15 유전자 분절, 및 23-량체 RSS를 포함하는 제3 연속 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0018] 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 추가로 포함할 수 있으며, (예를 들어, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 생식선 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 그 생식선 구성 내의 D_H 유전자 분절 등을 포함할 수 있다), 여기서 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절의 하류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역은 (i) 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절, -여기서 인간 D_H 유전자 분절 중 하나 이상의 각각은 12-량체 RSS가 5' 및 3' 말단 측부에 있다-, 및 (ii) 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 5' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H3-3 유전자 분절)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역은 5'에서 3'로 (i) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 3' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H2 유전자 분절, -선택적으로 3' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H2 유전자 분절은 3' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다-, 및 (ii) 하나 또는 복수의 인간 D_H 유전자 분절, -여기서 상기 하나 또는 복수의 인간 D_H 유전자 분절 각각은 12-량체 RSS가 5' 및 3' 말단 측부에 있다-을 포함한다.

[0020] 일부 특정 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역은 인간 D_H 유전자 분절 만 포함한다.

- [0021] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자(예를 들어, 조작된 D_H 영역, 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 등)는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절 및 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하고, 여기서 상기 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절 및 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 (i) 다른 D_H 유전자 분절, (ii) V_H 유전자 분절, (iii) J_H 유전자 분절, 또는 (iv) 이들의 임의의 조합과 재조합을 거치지 않았다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 (i) 다른 D_H 유전자 분절, (ii) V_H 유전자 분절, (iii) J_H 유전자 분절, 또는 이들의 임의의 조합과 재조합한 하나 이상의 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 분자, 예를 들어, 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 암호화하는 재배열된 VDJ 또는 VDDJ 암호화 서열을 포함하는 뉴클레오티드 분자를 포함한다.
- [0022] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 작동가능한 연결로 다음을 더 포함한다: (a) 조작된 D_H 영역의 상류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 유전자 분절(예를 들어, 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절), (b) 조작된 D_H 영역의 하류에 있고 그것에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 연결 (J_H) 유전자 분절(예를 들어, 재배열되지 않은 인간 J_H6) 유전자 분절, 또는 (a)와 (b)의 조합.
- [0023] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 및 재배열되지 않은 인간 V_H1-6 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 생식선 구성으로 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 및 재배열되지 않은 인간 V_H1-6 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 생식선 구성으로 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 영역을 포함하며, 예를 들어, 5'에서 3'로 작동 가능한 연결로 다음을 포함한다:
- [0025] (a) 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 유전자 분절,
- [0026] (b) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역, 및
- [0027] (c) 적어도 하나의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 연결 (J_H) 유전자 분절.
- [0028] 일부 구현예에서,
- [0029] (a) 상기 적어도 하나의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절은 다음을 포함한다:
- [0030] (i) 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절,
- [0031] (ii) 재배열되지 않은 인간 V_H2-1 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 및/또는
- [0032] (iii) 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 내지 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이

들을 포함하는 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절, 예를 들어, 생식선 구성으로 된 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절, -선택적으로, 설치류 Adam6 유전자는 재배열되지 않은 인간 V_H2-1 및 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위유전자(pseudogene)를 대체한다-;

[0033] (b) 상기 조작된 D_H 영역은 5'에서 3'로 다음을 포함한다:

[0034] (i) 하나 이상, 예를 들어, 복수의, 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절, -여기서 상기 복수의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 각각은 5' 및 3' 말단 측부에 12-량체 RSS가 있다-, 및 5' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절, -선택적으로 여기서 상기 복수의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절은 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 D_H1-26 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함하고 및/또는 여기서 그의 5' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 유전자 분절은 인간 D_H3-3 유전자 분절이고, 예를 들어, 여기서 상기 조작된 D_H 는, 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 3-3 유전자 분절로 대체되는, 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절을 제외하고 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함한다-;

[0035] (ii) 3' 말단에서 23-량체 RSS와 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H 유전자 분절, 및 하나 이상, 예를 들어, 복수의, 인간 D_H 유전자 분절, -여기서 상기 하나 또는 복수의 인간 D_H 유전자 분절(들) 각각은, 5' 및 3' 말단 측부에 12-량체 RSS가 있으며, 선택적으로 여기서 3' 말단에서 23-량체 RSS와 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H 유전자 분절은 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절을 포함하고 및/또는 여기서 하나 또는 복수의 인간 D_H 유전자 분절(들)은 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 D_H 유전자 분절을 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 조작된 D_H 는, 재배열되지 않은 인간 D_H2-2 , D_H2-8 , 및 D_H2-15 유전자 분절은 각각 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절로 대체되는 것을 제외하고, 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함한다-;

[0036] (iii) 또는 (b)(i)와 (b)(ii)의 조합; 및

[0037] (c) 상기 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절은 다음을 포함한다:

[0038] (i) 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절,

[0039] (ii) 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절, 및/또는

[0040] (iii) 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절, -선택적으로 여기서 상기 재배열되지 않은 인간 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H5 , 및 J_H6 유전자 분절은 생식선 구성으로 있다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 V_H 영역(적어도 하나의 기능성 V_H 유전자 분절, 조작된 D_H 영역, 및 적어도 하나의 기능성 J_H 유전자 분절을 포함함)은 인간 면역글로불린 V_H 영역이며, 예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하여, 각각의 유전자 분절(예를 들어, 내부에 있는 각각의 V_H , D_H , 및 J_H 유전자 분절)는, 인간 (V_H , D_H , 또는 J_H) 유전자 분절이다.

- [0041] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 번역글로불린 V_H 영역을 포함하는 뉴클레오티드 분자는 작동 가능한 연결로 5'에서 3'로 다음을 포함한다:
- [0042] (a) 적어도 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 유전자 분절 내지 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 전부 또는 일부, 예를 들어, 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, -선택적으로 설치류 Adam6 유전자를 2개의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절 사이에 포함함-, 예를 들어, (예를 들어, 여기서 상기 설치류 Adam6 유전자는 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치함)
- [0043] (b) 5'에서 3'로 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 D_H1-26 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절 및 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 D_H3-3 유전자 분절, 예를 들어, 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 D_H3-3 유전자 분절로 대체되는, 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절을 제외한, 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 인간 조작된 D_H 영역, 및
- [0044] (c) 적어도 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절.
- [0045] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 번역글로불린 V_H 영역을 포함하는 뉴클레오티드 분자는 5'에서 3'로 작동 가능한 연결로 다음을 포함한다:
- [0046] (a) 적어도 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 유전자 분절 내지 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 전부 또는 일부, 예를 들어, 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, -선택적으로 설치류 Adam6 유전자를 2개의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절 사이에 포함함-, 예를 들어, (예를 들어, 여기서 상기 설치류 Adam6 유전자는 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치함)
- [0047] (b) 5'에서 3'로 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 D_H1-26 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절 및 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 D_H3-3 유전자 분절, 예를 들어, 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 D_H3-3 유전자 분절로 대체되는, 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절을 제외한, 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 인간 조작된 D_H 영역, 및
- [0048] (c) 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절.
- [0049] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 번역글로불린 V_H 영역을 포함하는 뉴클레오티드 분자는 5'에서 3'로 작동 가능한 연결로 다음을 포함한다:
- [0050] (a) 적어도 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 V_H3-74 유전자 분절 내지 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 전부 또는 일부, 예를 들어, 기능성 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, -선택적으로 설치류 Adam6 유전자를 2개의 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절 사이에 포함함-, 예를 들어, (예를 들어, 여기서 상기 설치류 Adam6 유전자는 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에

위치함)

- [0051] (b) 5'에서 3'로 재배열되지 않은 인간 D_H1-1 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 D_H3-16 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 인간 조작된 D_H 영역, -선택적으로 상기 조작된 D_H는, 재배열되지 않은 인간 D_H2-2, D_H2-8 및 D_H2-15 유전자 분절이 각각 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절로 대체되는 것을 제외하고, 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함한다-; 및
- [0052] (c) 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H2 인간 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H3 인간 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H4 인간 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H5 인간 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H6 인간 유전자 분절, -선택적으로 여기서 재배열되지 않은 인간 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5 및 J_H6 유전자 분절은 생식선 구성으로 있다.
- [0053] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 5' 내지 3'로 (a) 적어도 하나의 (인간) V_H 유전자 분절을 포함하는 (인간) 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 영역, 본원에 설명된 (인간) 조작된 D_H 영역, 및 (b) 중쇄 면역글로불린 불변 영역(C_H) 또는 그 부분에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 (인간) J_H 유전자 분절을 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 C_H는 설치류 인트론 인핸서 영역, 설치류 IgM 유전자, 설치류 IgD 유전자, 설치류 IgG 유전자, 설치류 IgA 유전자, 설치류 IgE 유전자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 설치류 C_H이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 5'에서 3'로 (a) 적어도 하나의 인간 V_H 유전자 분절을 포함하는 인간 V_H 영역, 본원에 설명된 인간 조작된 D_H 영역, 및 (b) 적어도 설치류 인트론 인핸서 영역, 및 선택적으로 설치류 IgM 유전자를 포함하는 설치류 C_H 영역에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 5'에서 3'로 (a) 적어도 하나의 인간 V_H 유전자 분절을 포함하는 인간 V_H 영역, 본원에 설명된 인간 조작된 D_H 영역, 및 (b) 적어도 설치류 인트론 인핸서 영역 및 설치류 IgM 유전자를 포함하는 설치류 C_H 영역에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 5'에서 3'로 (a) 적어도 하나의 인간 V_H 유전자 분절을 포함하는 인간 V_H 영역, 본원에 설명된 인간 조작된 D_H 영역, 및 예를 들어, 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 좌위에서 (b) 내인성 설치류 C_H 영역에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 설치류는 랫트일 수 있다. 일부 구현예에서, 설치류는 마우스일 수 있다.
- [0054] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 설치류 Adam6 유전자를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 설치류 Adam6 유전자는 인간 V_H2-1 및 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치하며, 예를 들어, 생식선 구성에서 인간 V_H2-1 및 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치한 인간 Adam6 유전자를 대체한다. 일부 구현예에서, 설치류는 랫트일 수 있다. 일부 구현예에서, 설치류는 마우스일 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자는 하나 이상의 약물 선별 카세트, 예를 들어 하나 이상의 부위-특이적 재조합 부위가 측부에 위치한 약물 내성 유전자, 예를 들어 *loxP* 부위-특이적 재조합 인식 부위가 측부에 위치한 네오마이신 약물 내성 유전자를 포함하고, 여기서 하나 이상의 약물 내성 카세트 중 적어도 하나는 선택적으로 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절의 바로 상류에 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 분자는 도 2에 예시된 서열을 포함한다.
- [0056] 또한, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하도록 비-인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류)의

게놈(예를 들어, 생식선 게놈)을 변형시키기 위한 표적화 벡터가 본원에 기술된다. 일반적으로, 본원에 설명된 표적화 벡터는 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자 중 임의의 것을 포함하고, 선택적으로 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내에서 상동성 재조합을 위한 5'- 및 3'- 상동 아암(homology arm)을 포함하고, 선택적으로 여기서 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 표적화 벡터는 재배열되지 않은 인간 유전자 분절, 예를 들어, V_H6-1 유전자 분절을 포함하는 5' 상동 아암 및/또는 설치류(예를 들어, 마우스) C_H 영역 또는 그의 부분, 예를 들어, 설치류(마우스) C_H 인트론 인핸서 영역 및/또는 설치류(마우스) IgM 유전자를 포함하는 3' 상동 아암을 포함한다.

[0057]

일부 구현예에서, 표적화 벡터는 본원에 설명된 뉴클레오타이드 분자, 및 면역글로불린 중쇄 서열과 상동성 재조합을 허용하도록 구성된 5'- 및 3'- 상동 아암을 포함하며, 여기에서 면역글로불린 중쇄 서열은 선택적으로 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 좌위에서 위치할 수 있고/있거나 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 유전자 분절(예를 들어, V_H6-1 유전자 분절), 인간 조작된 D_H 영역, 적어도 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절을 포함하는 5' 상동 아암, 및 설치류(마우스) C_H 인트론 인핸서 영역을 포함하는 3' 상동 아암을 포함하는 표적화 벡터 및/또는 설치류(마우스)가 인간화 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함하는 설치류, 예를 들어, 마우스 면역글로불린 가변 서열을 인간 면역글로불린 가변 서열로 대체하는 것을 포함하는 마우스, 예를 들어, VELOCIMMUNE® 마우스에서의 D_H 영역을 조작하는 데 유용할 수 있으며, 이는 선택적으로 그들의 수태능을 복원하는 기능성 ADAM6 유전자, 기능성 CH1 도메인이 결여된 역 키메라 비-IgM 항체의 생산을 위한 무손상 내인성 IgM 유전자 및 다른 내인성 변형된 불변 영역 유전자(예를 들어, IgG)를 포함하는 변형된 내인성 중쇄 불변 영역 유전자 서열, 역 키메라 인간화 공통 경쇄를 암호화하는 서열, 역 키메라 인간화 카파 경쇄를 암호화하는 서열, 역 키메라 인간화 람다 경쇄를 암호화하는 서열, 하이브리드 카파/람다 또는 카파/람다 경쇄를 암호화하는 서열, 재배열되지 않은 생식선 인간 중쇄 유전자 분절 및/또는 히스티딘 아미노산을 갖고 pH 민감성 항원 결합을 나타낼 수 있는 가변 도메인의 발현을 위해 히스티딘 코돈으로 변형된 재배열되지 않은 생식선 경쇄 유전자 분절, 및/또는 증가된 항원 수용체 다양성을 위한 말단 테옥시뉴클레오타이드 전이효소 (TdT)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,035,128; 9,066,502; 9,163,092; 9,150,662; 9,334,333; 9,850,462; 9,844,212; 9,029,628; 9,006,511; 9,394,373; 9,206,261; 9,206,262; 9,206,263; 9,226,484; 9,399,683; 9,540,452; 9,012,717; 9,796,788, 8,697,940; 8,754,287; 9,334,334; 9,801,362; 9,332,742; 9,969,814; 미국 특허 공개 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300, 2013/0185821, 2013/0302836, 2013/0045492 및 2018/0125043; PCT 공개번호 W02017210586 및 W02019/113065를 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0058]

이와 같이, 예를 들어 설치류에서 D_H-D_H 재조합을 위한 D_H 영역을 조작하는 방법이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하도록 하나 또는 복수의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하는 D_H 영역을 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, D_H-D_H 재조합을 조작하기 위해 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 변형시키는 방법은, 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절의 각각이 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 포함하는 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 수득하는 단계, 및 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 추가로 포함하도록 D_H 영역을 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, D_H 영역은 하나 또는 복수의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 인간 D_H 영역이며, 예를 들어, 여기서 상기 복수의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절은 선택적으로 예를 들어, 생식선 구성으로, D_H1-1 및 D_H7-27 유전자 분절 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 하나 또는 복수의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절의 하나 이상, 예를 들어, 기능성 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절로 대체하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, D_H 영역의 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 가장 3'의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절로 대체되고, 여기서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 5'에서 3'로 23-량

체 RSS, D_H 유전자 분절, 및 12-량체 RSS를 포함한다. 일부 구현예에서, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 상응하는 D_H 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, D_H 영역이 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절(예를 들어, 생식선 D_H7-27 유전자 분절)을 포함하는 경우, 재배열되지 않은 인간 D_H7-27 유전자 분절은 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절(예를 들어, 재배열되지 않은 인간 D_H3-3 유전자 분절)로 대체된다. 일부 구현예에서, D_H 영역이 재배열되지 않은 D_H2-2 유전자 분절, 재배열되지 않은 D_H2-8 유전자 분절, 및/또는 재배열되지 않은 D_H2-15 유전자 분절을 포함하는 경우 (예를 들어, 조작된 D_H 이 생식선 구성의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 경우) 재배열되지 않은 D_H2-2 유전자 분절, 재배열되지 않은 D_H2-8 유전자 분절, 및/또는 재배열되지 않은 D_H2-15 유전자 분절은 각각 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및/또는 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, 변형은 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절(예를 들어, 인간 생식선 D_H 유전자 분절)의 측부에 위치하는 2개의 12-량체 RSS 중 하나를 23-량체 RSS로 대체하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형될 면역글로불린 중쇄 가변 영역은, D_H 영역에 더하여, 상기 D_H 영역에 작동가능하게 연결된 J_H 영역 (선택적으로 인간 생식선 J_H1 유전자 분절, 인간 생식선 J_H2 유전자 분절, 인간 생식선 J_H3 유전자 분절, 인간 생식선 J_H4 유전자 분절, 인간 생식선 J_H 유전자 분절, 및 인간 생식선 J_H6 유전자 분절을 포함하는 인간 생식선 J_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하며, 선택적으로 여기서 상기 인간 생식선 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H5 , 및 J_H6 유전자 분절은 생식선 구성임)을 포함하고, 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 대체하는 것은 J_H 영역에 포함된 적어도 하나의 재배열되지 않은 J_H 유전자 분절을 결실시키는 것을 포함하며, 예를 들어, D_H 영역과 인접한 재배열되지 않은 인간 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , 및/또는 J_H5 유전자 분절의 결실을 초래한다. 일부 구현예에서, J_H 영역에 포함된 적어도 하나의 생식선 J_H 유전자 분절을 결실시키는 것은 재배열되지 않은 인간 J_H1 , J_H2 및 J_H3 유전자 분절을 결실시키는 것, 및 선택적으로 J_H4 및 J_H5 유전자 분절을 추가로 결실시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 모든 기능성 D_H 유전자 분절 중 하나 이상을 대체하는 것, 예를 들어, D_H7-27 유전자 분절을 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H3-3 유전자 분절로 대체하는 것은 D_H 영역과 인접하는 재배열되지 않은 인간 J_H1 , J_H2 , 및 J_H3 유전자 분절의 결실을 초래한다. 일부 구현예에서, 모든 기능성 D_H 유전자 분절 중 하나 이상을 대체하는 것, 예를 들어, D_H7-27 유전자 분절을 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 5' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H3-3 유전자 분절로 대체하는 것은 D_H 영역과 인접하는 재배열되지 않은 인간 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , 및 J_H5 유전자 분절의 결실을 초래한다. 일부 구현예에서, D_H 영역은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절을 포함하도록 변형되며, 여기서 상기 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절은 (a) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H3-3 유전자 분절, -선택적으로 여기서 23-량체 RSS는 D_H3-3 유전자 분절의 5' 말단에 인접한다-, (b) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-2 유전자 분절, -선택적으로 여기서 23-량체 RSS는 D_H2-2 유전자 분절의 3' 말단에 인접한다-, (c) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, -선택적으로 여기서 23-량체 RSS는 D_H2-8 유전자 분절의 3' 말단에 인접한다-, (d) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절, -선택적으로 여기서 23-량체 RSS는 D_H2-15 유전자 분절의 3' 말단에 인접한다-, 또는 (e) (a)-(d)의 임의의 조합을 포함한다.

[0059]

이러한 방법들은 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같은 (인간) 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 뉴클레오타이드 분자를 초래할 수 있다, 여기서 재배열되지 않은 (인간) 면역글로불린 중쇄 영역은 선택적으로 비-인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역 또는 그의 부분, 예를 들어, 예를 들어, 선택적으로 내인성 비-인간 면역글로불린 중쇄 좌위에서, 적어도 하나의 설치류 C_H 인트론 인

헨서 영역 및/또는 설치류 IgM 유전자를 포함하는 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 시, 이러한 면역글로불린 중쇄 좌위, 예를 들어, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위는, 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 코딩 서열을 포함하고, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인, 예를 들어, 20개 초과 아미노산의 상보성 결정 영역 3(CDR3) 아미노산 길이를 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하며, 이 길이는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$, $V_HD_HJ_H6$, 또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H6$ 재조합의 결과일 수 있다. 따라서, CDR3을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$, $V_H(D_H)J_H6$, 또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H6$ 서열을 포함하는 설치류, 설치류 세포, 좌위 및/또는 뉴클레오티드 분자가 본원에 제공되며, 여기서 CDR3의 길이는 적어도 20개 아미노산 길이이다.

[0060]

또한, 본 발명의 조작된 D_H 영역, 예를 들어, 그의 게놈, 예를 들어, 생식선 게놈 내에, 예를 들어, 본원에 설명된 핵산, 표적화 벡터 및/또는 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함하는 비-인간 동물, 예를 들어 설치류가 본원에 기술된다. 또한, 이러한 비-인간 동물 게놈, 예를 들어 설치류 게놈이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 그 생식선 게놈이 기술된 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 설치류, 또는 기술된 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 설치류 생식선 게놈이 본원에 기술되며, 여기서 상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역은, (i) 적어도 하나의 재배열되지 않은 중쇄 가변 (V_H) 유전자 분절, (ii) 조작된 중쇄 가변 영역 다양성 (D_H) 영역, -여기서 상기 조작된 D_H 영역은 각각 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 및 각각 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 유전자 분절을 포함한다-, 및 (iii) 적어도 하나의 재배열되지 않은 중쇄 연결 (J_H) 유전자 분절을 포함하고, 여기서 (i)-(iii)은 작동 가능한 연결로, 재조합 시, 상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역이 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하도록 하고, 선택적으로 여기서 상기 재배열된 중쇄 가변 영역 서열은 $V_H(D_H-D_H)J_H$ 재조합 이벤트 후에 형성되며, 선택적으로 여기서 상기 각각 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나는 상기 $V_H(D_H-D_H)$ 재조합 이벤트 동안 각각 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절 중 하나를 연결한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절은 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절 만을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역이다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 예를 들어, 내인성 비-인간 중쇄 좌위에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 게놈의 내인성 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 생식선 구성으로 V_H3-74 내지 V_H6-1 사이에 걸쳐 있는 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드(예를 들어, 설치류 Adam6 유전자)를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 분자를 포함하며, 이는 2개의 인간 V_H 유전자 분절 사이에 선택적으로 삽입될 수 있고 (예를 들어, 인간 V_H1-2 유전자 분절과 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 삽입됨) 그리고/또는 인간 Adam6 위유전자의 위치에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-인간 동물은 설치류다. 일부 구현예에서, 설치류 게놈은 조작된 D_H 영역에 대해 이형접합성이다. 일부 구현예에서, 설치류 게놈은 조작된 D_H 영역에 대해 동형접합체이다. 일부 구현예에서, 설치류는 랫트일 수 있다. 일부 구현예에서, 설치류는 마우스일 수 있다. 일부 구현예에서, 설치류, 설치류 게놈, 또는 설치류 세포는 랫트, 마우스, 랫트 게놈, 마우스 게놈, 랫트 세포, 또는 마우스 세포, 예를 들어, 설치류(랫트 또는 마우스) 배아 줄기 세포다.

[0061]

일부 구현예에서, 본원에 설명된 설치류, 설치류 게놈, 또는 설치류 세포는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 중쇄 VDJ 및/또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, (1) 생식선 게놈 내, 예를 들어, 생식 세포 내에, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 좌위, 및 (2) 체세포 게놈 내, 예를 들어, B 세포 내에, 재배열된 중

쇄 가변 영역 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 포함하는, 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스가 본원에 기술되며, 여기서 상기 제1 또는 제2 D_H 유전자 분절(D_HA 또는 D_HB , 각각)은 상기 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 또는 그의 일부로부터 유래한다(예를 들어, 상기 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절 적어도 일부와 동일한 서열, 이의 체세포 과돌연변이된 변이체 및/또는 이의 퇴화 변이체를 포함한다). 일부 구현예에서, 여기서 상기 B 세포는 미처리(naive) B 세포이고/이거나 상기 재배열된 중쇄 가변 영역 코딩 서열은 IgM 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결되고, D_HA 및 D_HB 유전자 분절 중 적어도 하나는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절에 의해 암호화된 뉴클레오티드 분자와 정렬되는 적어도 9개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, D_HA 및 D_HB 유전자 분절의 각각은 생식선 D_H 유전자 분절의 뉴클레오티드 분자와 정렬되는 적어도 5개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, B 세포가 플라즈마 또는 기억 B 세포이고/이거나 재배열된 중쇄 가변 영역 코딩 서열은 체세포 과돌연변이되고/되거나 비-IgM 불변 영역 서열(예를 들어, IgG, IgA, IgE 등)에 작동가능하게 연결되며, D_HA 및 D_HB 각각은 최대 1개의 뉴클레오티드 돌연변이를 가지고, 제1 또는 제2 생식선 D_H 유전자 분절에 대해 40%의 동일성을 각각 나타낸다. 일부 구현예에서, 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 $VD-J$ 및/또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 적어도 95%는 적어도 10개의 아미노산의 CDR3 길이를 가지며, 선택적으로 여기서 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 $VD-J$ 및/또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 적어도 70%는 적어도 11개의 아미노산의 CDR3 길이를 가지며, 선택적으로 여기서 설치류에서의 모든 재배열된 중쇄 $VD-J$ 및/또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 적어도 15%는 적어도 14개의 아미노산의 CDR3 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 설치류에서의 VDJ 및/또는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 집단은 적어도 15개의 아미노산, 선택적으로 적어도 16개의 아미노산, 선택적으로 적어도 17개의 아미노산, 및 선택적으로 적어도 18개의 아미노산의 CDR3 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 발현하는 설치류 또는 설치류 세포, 또는 이를 포함하는 핵산 또는 면역글로불린 좌위가 본원에 기술되며, 여기서 제2 생식선 D_H 유전자 분절은 D_H3-3 이고, 선택적으로 여기서 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열은 20개 초과 아미노산의 CDR3 길이를 암호화한다. 일부 구현예에서, 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 발현하는 설치류 또는 설치류 세포, 또는 이를 포함하는 핵산 또는 면역글로불린 좌위가 본원에 기술되며, 여기서 제1 생식선 D_H 유전자 분절은 D_H2-2 , D_H2-8 또는 D_H2-15 이고, 선택적으로 여기서 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열은 20개 초과 아미노산의 CDR3 길이를 암호화한다. 일부 구현예에서, 20개 초과 아미노산의 CDR3 길이를 암호화하는 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H6$ 코딩 서열을 발현하는 설치류 또는 설치류 세포가 본원에 기술된다.

[0062] 일부 구현예에서, 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 포함하는 설치류 게놈, 핵산 또는 면역글로불린 좌위가 제공된다. 일부 구현예에서, D_HB 유전자 분절은 인간 생식선 D_H3-3 유전자 분절로부터 유래된다. 일부 구현예에서, D_HA 유전자 분절은 인간 생식선 D_H2-2 , D_H2-8 또는 D_H2-15 유전자 분절로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 재배열된 중쇄는 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열인 것으로 결정되는데, D_HA 및 D_HB 의 각각이 각각 최대 1개의 뉴클레오티드 돌연변이를 가지고, 제1 및 제2 생식선 D_H 유전자 분절에 대한 40%의 동일성을 각각 나타내기 때문이다. 일부 구현예에서, 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열은 20개 초과 아미노산의 CDR3 길이를 암호화한다. 일부 구현예에서, J_H 유전자 분절은 인간 생식선 J_H6 유전자 분절로부터 유래된다. 일부 구현예에서, $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 포함하는 설치류 또는 설치류 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 설치류는 랫트 또는 마우스이거나, 설치류 세포는 랫트 세포 또는 마우스 세포이다. 한 구현예에서, 설치류 세포는 설치류 B 세포이다. 일부 구현예에서, 골수종 세포와 융합된 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 발현하는 설치류 B 세포를 포함하는 하이브리도마가 제공된다. 일부 구현예에서, $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 서열은 D_HA 및 D_HB 로 식별된 서열이 각각 최대 1개의 뉴클레오티드 돌연변이를 가지고, 제1 및 제2 생식선 D_H 유전자 분절에 대한 40%의 동일성을 각각 나타낼 때 D_H-D_H 재조합 이벤트의 결과인 것으로 확인된다.

[0063] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진, 비-인간 동물 또는 세포가 제공되며, 여기서 조작된 D_H 영역은 제1 및 제2 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된

적어도 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 RSS는 23-량체 RSS이고 제2 RSS는 12량체 RSS이다. 일부 실시예에서, 제1 RSS는 12-량체 RSS이고 제2 RSS는 23-량체 RSS이다.

[0064] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진, 비-인간 동물이 제공되며, 여기서 조작된 D_H 영역은 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 각각 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진, 비-인간 세포 또는 조직이 제공되며, 여기서 조작된 D_H 영역은 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 각각 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 림프구성 또는 골수성 계통에서 유래한다. 일부 구현예에서, 세포는 림프구이다. 일부 구현예에서, 세포는 B 세포, 수지상 세포, 대식 세포, 단핵구 및 T 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조직은 지방, 방광, 뇌, 유방, 골수, 눈, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 근육, 췌장, 혈장, 혈청, 피부, 비장, 위, 흉선, 고환, 난자, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0066] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 세포로부터 만들어진 불멸화 세포(immortalized cell), 예를 들어, 본원에 설명된 비-인간 동물로부터 단리된 B 세포를 골수종 세포와 융합시켜 만들어진 하이브리도마 세포가 제공된다.

[0067] 일부 구현예에서, 비-인간 세포는 비-인간 배아 줄기(ES) 세포이다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아 줄기 세포는 설치류 배아 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 설치류 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 129 계통, C57BL 계통 또는 이의 혼합체로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 설치류 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 129 계통 및 C57BL 계통의 혼합체이다.

[0068] 일부 구현예에서, 비-인간 동물을 만들기 위한, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 배아 줄기 세포의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고 본원에 설명된 바와 같은, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 마우스를 제조하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아 줄기 세포는 랫트 배아 줄기 세포이고 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 랫트를 제조하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 랫트를 제조하기 위한 비제한적이고 예시적인 방법은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 US20140309487에 개시된 방법을 포함할 수 있다.

[0069] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 배아 줄기 세포를 포함하거나, 이로부터 제조되거나, 이로부터 획득되거나, 이로부터 생성된 비-인간 배아가 제공된다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아는 설치류 배아이고; 일부 구현예에서는, 마우스 배아이며; 일부 구현예에서는, 랫트 배아이다.

[0070] 일부 구현예에서, 비-인간 동물을 만들기 위한 본원에 설명된 비-인간 배아의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아는 마우스 배아이고, 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 마우스를 제조하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 비-인간 배아는 랫트 배아이고, 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 랫트를 제조하기 위해 사용된다.

[0071] 조작된 D_H 영역을 포함하는 게놈을 갖는 설치류를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (a) 23-량체 RSS에 각각 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는 DNA 단편을 포함하도록 설치류 배아 줄기 세포의 게놈을 변형시키고, 예를 들어 상기 DNA 단편은 본원에 설명된 뉴클레오티드 분자, 표적화 벡터, 및/또는 조작된 D_H 영역을 포함하는, 단계, 및 (b) (a)의 변형된 설치류 배아 줄기 세포를 사용하여 설치류를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 분절을 포함하도록 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 재배열되지 않은 D_H 영역을 변형시키는 단계를 포함하고, 여기서 재배열되지 않은 D_H 영역은 각각 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는, 하나 이상의 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절을 추가로 포함하며, 이에 의해 상기 설치류를 제조하게 된다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 대체하는 단계, 및 선택적으로 하나 이상의

J_H 유전자 분절을 대체하거나 결실시키는 단계를 포함하되, 상기 적어도 하나의 D_H 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역이고, 예를 들어, 여기서 상기 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 적어도 하나의 V_H 유전자 분절을 포함하는 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 V_H 유전자 클러스터, 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절을 포함하는 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 D_H 영역, 및 하나의 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절을 포함하는 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 클러스터를 포함하고, 여기서 상기 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 D_H 영역은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 분절을 포함하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 상기 변형 단계는 (i) 기능성 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 예를 들어, V_H3-74 내지 V_H6-1 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 V_H 유전자 분절, (ii) 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절로 대체되는 D_H7-27 를 제외한 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 및 (iii) 적어도 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절, 및 선택적으로 적어도 재배열되지 않은 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 J_H6 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 생성한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 D_H 유전자 분절은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H3-3 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 변형 단계는 (i) 기능성 인간 V_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 예를 들어, V_H3-74 내지 V_H6-1 사이에 걸쳐 있고 이들을 포함하는 모든 기능성 V_H 유전자 분절, (ii) 재배열되지 않은 인간 D_H2-2 , D_H2-8 및 D_H2-15 유전자 분절이 각각 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동 가능하게 연결된 D_H2-2 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동 가능하게 연결된 인간 D_H2-8 유전자 분절, 3' 말단에서 23-량체 RSS에 작동 가능하게 연결된 인간 D_H2-15 유전자 분절로 대체되는 것을 제외하고, 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 및 (iii) 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 J_H1 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H2 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H3 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H4 유전자 분절, 재배열되지 않은 인간 J_H5 유전자 분절, 및 재배열되지 않은 인간 J_H6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 (a) 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자를 더 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 설치류 Adam6 유전자는 2개의 재배열되지 않은 V_H 유전자 분절 사이, 예를 들어, 재배열되지 않은 인간 V_H1-2 유전자 분절 및 재배열되지 않은 인간 V_H6-1 유전자 분절 사이에 위치하고, 그리고/또는 (b) 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결되고, 선택적으로 여기서 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위에서의 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다. 한 구현예에서, 설치류는 랫트 또는 마우스이다.

[0072] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 세포 또는 조직, 본원에 설명된 바와 같은 불멸화 세포, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 배아 줄기 세포, 또는 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 배아를 포함하는 키트가 제공된다.

[0073] 일부 구현예에서, 치료 또는 진단을 위한 약물(예, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)의 제조 및/또는 개발에 사용하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태의 치료, 예방 또는 완화를 위한 약물(예, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)의 제조 및/또는 개발에 사용하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 키트가 제공된다.

[0074] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 이식유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물 또는 표적화 벡터가 제공된다. 일부 구현예에서, 이식유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물 또는 표적화 벡터는 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 이식유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물, 또는 표적화 벡터는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는 DNA 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 이식유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물, 또는 표적화 벡터는 하나 이상의 선택 마커를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 이식 유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물, 또는 표적화 벡터는 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위(예를 들어, *loxP*, *Frt* 또는 이들의 조합)를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 이식 유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물 또는 표적화 벡터는 도 2에 예시된다.

- [0075] 일부 구현예에서, 비-인간 동물, 비-인간 세포, 비-인간 배아 줄기 세포 및/또는 비-인간 배아를 제조하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 이식유전자, 핵산 작제물, DNA 작제물, 또는 표적화 벡터의 용도가 제공된다.
- [0076] 일부 구현예에서, 하나 이상의 D_H 분절은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 D_H 분절은 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다.
- [0077] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 3' RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절을 포함한다. 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 하나의 D_H 분절은 합성 D_H 분절이고; 일부 구현예에서, 합성 인간 D_H 분절이고; 일부 구현예에서, 인간 D_H3-3 분절과 동일하거나 실질적으로 동일한 서열을 갖는 합성 인간 D_H 분절이다. 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 하나의 D_H 분절은 합성 D_H 분절이고; 일부 구현예에서, 합성 인간 D_H 분절이고; 일부 구현예에서, 인간 D_H3-3 분절과 동일하거나 실질적으로 동일한 서열을 갖는 합성 인간 D_H 분절이다.
- [0078] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절을 포함한다. 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 합성 D_H 분절이다. 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2 계열(family) 분절이다. 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 , 인간 D_H2-15 , 인간 D_H2-21 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 및 인간 D_H2-15 이다.
- [0079] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절을 포함한다. 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 합성 D_H 분절이다. 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2 계열 분절이다. 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 , 인간 D_H2-15 , 인간 D_H2-21 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 일부 구현예에서, 3개의 D_H 분절은 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 및 인간 D_H2-15 이다.
- [0080] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역은 복수의 인간 D_H 분절을 포함하되, 여기서 상기 복수의 인간 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나는 5' 또는 3' RSS에 작동가능하게 연결되고; 일부 구현예에서는 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역은 복수의 인간 D_H 분절을 포함하되, 여기서 상기 복수의 인간 D_H 유전자 분절 중 적어도 3개는 각각 5' 또는 3' RSS에 작동가능하게 연결되고; 일부 구현예에서는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다.
- [0081] 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 게놈은 하나 이상의 야생형 D_H 분절이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 게놈은 모든 또는 실질적으로 모든 야생형 D_H 분절이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 게놈은 인간 D_H 분절만을 함유한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 (예를 들어, 비-인간) 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다.
- [0083] 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 V_H3-74 내지 V_H6-1 유래의 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 적어도 인간 J_H 유전자 분절 J_H6 을 포함한다. 일부

구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 적어도 인간 J_H 유전자 분절 J_{H4} , J_{H5} 및 J_{H6} 을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 J_H 유전자 분절 J_{H1} , J_{H2} , J_{H3} , J_{H4} , J_{H5} 및 J_{H6} 을 포함한다.

[0084] 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 일부 구현예에서, 게놈은 내인성 Adam6 유전자가 결여되어 있다. 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 일부 구현예에서, 게놈은 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 더 포함하고; 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 인간 V_H 유전자 분절 사이에 삽입되고; 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 Adam6 위유전자의 자리에 삽입되고; 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 V_H 유전자 분절 및 인간 D_H 유전자 분절 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 제1 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H1-2} 이고 제2 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H6-1} 이다.

[0085] 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역에 대해 동형접합체, 이형접합체 또는 반접합체이다. 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역에 대해 유전자이식형이다.

[0086] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는, 비-인간 동물을 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (a) DNA 단편을 비-인간 배아 줄기 세포 내로 삽입하되, 상기 DNA 단편은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는, 단계; (b) (a)에서 생성된 비-인간 배아 줄기 세포를 얻는 단계; 그리고 (c) (b)의 비-인간 배아 줄기 세포를 이용하여 비-인간을 생성하는 단계를 포함한다.

[0087] 일부 구현예에서, DNA 단편은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 합성 인간 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 합성 인간 D_{H3-3} 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 인간 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 인간 D_H 분절을 포함하며, 인간 D_H 분절은 인간 D_{H2-2} , 인간 D_{H2-8} 및 인간 D_{H2-15} 이다.

[0088] 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 D_H 분절을 포함하며, 이들 각각은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 5' 23-량체에 작동가능하게 연결된 하나의 합성 인간 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 합성 인간 D_{H3-3} 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 합성 인간 D_{H3-3} 분절을 포함하며, 합성 인간 D_{H3-3} 분절은 인간 D_{H7-27} 분절을 대신하여 인간 D_H 영역에 위치된다.

[0089] 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 선택 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 포함한다.

[0090] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는, 비-인간 동물을 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포의 게놈을 변형해서 그것이 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하도록 하는 단계를 포함하며, 조작된 D_H 영역은 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하며, 이에 따라 상기 비-인간 동물을 제조하게 된다.

[0091] 비-인간 동물을 제조하는 일부 구현예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포의 게놈은 각각 5' 23-량체

RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하도록 변형된다. 비-인간 동물을 제조하는 일부 구현예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포의 게놈은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하도록 변형된다.

[0092] 일부 구현예에서, 비-인간 동물에서 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하거나 이를 암호화하는 핵산을 수득하는 방법은 비-인간 동물(예를 들어, 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스))를 항원으로 면역화시키되, 상기 설치류는 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 생식선 게놈을 가지는, 단계, 및 설치류가 항원에 결합하는, 항체 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 항원에 대한 면역 반응을 생성하게 하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어, B 세포 또는 하이브리도마인, 설치류 또는 설치류 세포로부터, 항체 또는 이를 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 D_H 분절은 각각 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 D_H 분절은 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다.

[0093] 일부 구현예에서, 상기 방법은 (a) 비-인간 동물을 항원으로 면역화시키되, 비-인간 동물은 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가지고, 여기서 조작된 D_H 영역은 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는, 단계; (b) 상기 비-인간 동물이 상기 항원에 대한 면역 반응을 생성하는 충분한 조건 하에서 설치류를 유지하는 단계; 그리고 (c) 상기 항원을 결합하는, 항체를 비-인간 동물, 또는 비-인간 동물 세포로부터 회수하는 단계를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 비-인간 동물 세포는 B 세포이다. 일부 특정 구현예에서, 비-인간 동물 세포는 하이브리도마이다.

[0094] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역, 및 적어도 하나의 인간 J_H 유전자 분절을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진 비-인간 동물이 제공되며, 여기서 상기 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 내인성 면역글로불린 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어서, 설치류가 항원으로 면역화될 때, 인간 D_H - D_H 재조합 및/또는 J_H 6 유전자 분절에 대한 향상된 재조합에 의해 생성된 CDR3 영역을 포함하는 인간 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 생성하는 것을 특징으로 하고, 여기서 상기 항체는 항원에 대한 특이적 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 인간 D_H 분절은 인간 D_H 7-27 분절을 대신하여 위치된다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 6개 전부 보다 적은 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 6개의 인간 J_H 유전자 분절 중 하나만을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 J_H 6 유전자 분절을 포함하고 기능성 J_H 1 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 2 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 3 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 4 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 5 유전자 분절이 결여된다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 6개의 인간 J_H 유전자 분절 중 3개만을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 J_H 4 유전자 분절, 인간 J_H 5 유전자 분절, 및 인간 J_H 6 유전자 분절만을 포함하고, 기능성 J_H 1 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 2 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 3 유전자 분절이 결여된다. 일부 구현예에서, 6개 전부 보다 적은 J_H 유전자 분절을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 예를 들어, 6개의 인간 J_H 유전자 분절 중 하나만을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 인간 J_H 6 유전자 분절을 포함하고 기능성 J_H 1 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 2 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 3 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 4 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H 5 유전자 분절이 결여된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역)을 포함하는 게놈을 갖는 비-인간 동물은, 6개의 인간 J_H 유전자 분절 모두를 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진 대조군 비-인간 동물과 비교하여 J_H 6 유전자 분절에 대한 향상된 재조합을 나타내며, 예를 들어, 상기 비-인간 동물은 상기 대조군 비-인간 동물보다 J_H 6 유전자 분절 서열 또는 이의 일부를 포함하고/하거나 적어도 20개 아미노산의 CDR3 길이를 암호화하는 재배열된 면역 글로불린 중쇄 서열의 더 큰 비율을 포함한다. 일부 구현예에서, 6개 전부 보다 적은 J_H 유전자 분절을 포함하는

인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 예를 들어, 6개의 인간 J_H 유전자 분절 중 3개만을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 인간 J_H4 유전자 분절, 인간 J_H5 유전자 분절, 및 인간 J_H6 유전자 분절을 포함하고, 기능성 J_H1 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H2 유전자 분절이 결여되고, 기능성 J_H3 유전자 분절이 결여된다)을 포함하는 계놈을 갖는 비-인간 동물은, 6개의 인간 J_H 유전자 분절 모두를 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 계놈을 가진 대조군 비-인간 동물과 비교하여 J_H6 유전자 분절에 대한 향상된 재조합을 나타내며, 예를 들어, 상기 비-인간 동물은 상기 대조군 비-인간 동물에 비해 J_H6 유전자 분절 서열 또는 이의 일부를 포함하고/하거나 적어도 20개 아미노산의 CDR3 길이를 암호화하는 재배열된 면역 글로불린 중쇄 서열의 더 큰 비율을 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 23-량체 RSS가 3' 측부에 있는 적어도 하나의 인간 D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역, 및 적어도 2개의 인간 J_H 유전자 분절을 포함하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 계놈을 가진 비-인간 동물이 제공되며, 여기서 상기 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 내인성 면역글로불린 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어서, 설치류가 항원으로 면역화될 때, 인간 D_H - D_H 재조합에 의해 생성된 CDR3 영역을 포함하는 인간 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 생성하는 것을 특징으로 하고, 여기서 상기 항체는 항원에 대한 특이적 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 각각 23-량체 RSS가 3' 측부에 있는 적어도 3개의 인간 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역은 각각 23-량체 RSS가 3' 측부에 있는 3개의 인간 D_H 분절을 포함하며, 3개의 인간 D_H 분절은 인간 D_H2 -2, 인간 D_H2 -8 및 인간 D_H2 -15이다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 V_H3 -74 내지 V_H6 -1의 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, 항원은 병원균, 예를 들어, 세균, 진균 또는 바이러스 병원균이다. 일부 구현예에서, 본원에서 비-인간 동물의 면역화는 병원균, 예를 들어, 세균, 진균 또는 바이러스 병원균으로 비-인간 동물을 감염시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에서 비-인간 동물의 면역화는 병원균, 예를 들어, 세균, 진균 또는 바이러스 병원체로부터 단리된 비-인간 동물 계놈 또는 단백질질 물질질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 수용체(예를 들어, 보체 수용체, 케모카인 수용체 등) 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 항원은 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산이다. 일부 구현예에서, 항원은 수용체 또는 이의 일부를 발현하는 세포이다. 일부 구현예에서, 항원은 이온 채널 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 항원은 이온 채널 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산이다. 일부 구현예에서, 항원은 이온 채널 또는 이의 일부를 발현하는 세포이다.

[0097] 일부 구현예에서, 제공되는 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 내인성 경쇄 좌위에 하나 이상의 인간 V_L 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_L 유전자 분절의 삽입을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 V_L 및 J_L 분절은 V_K 및 J_K 유전자 분절이며 내인성 K 경쇄 좌위에 삽입된다. 일부 구현예에서, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 C_K 유전자(예를 들어 마우스 또는 랫트 C_K 유전자)에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 인간 V_L 및 J_L 분절은 V_λ 및 J_λ 유전자 분절이며 내인성 λ 경쇄 좌위에 삽입된다. 일부 구현예에서, 인간 V_λ 및 J_λ 유전자 분절은 설치류 C_λ 유전자(예를 들어 마우스 또는 랫트 C_λ 유전자)에 작동가능하게 연결된다.

[0098] 일부 구현예에서, 의료용으로 사용하기 위한 약물 또는 백신의 제조 및/또는 개발에 있어서 본원에서 기술된 바와 같은 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 용도, 예컨대 약제로서의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 인간에 투여하기 위한 항체의 제조 및/또는 개발에 있어서 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태의 치료, 예방 또는 완화를 위한 약제(medicament)의 제조에 있어서 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직의 용도가 제공된다.

[0099] 일부 구현예에서, 치료 또는 진단을 위한 약물의 제조 및/또는 개발에 사용하기 위해 본원에서 기술된 바와 같은 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직이 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 질환, 장애 또는 병태의 치료, 예방 또는 완화를 위한 약제(medicament)의 제조에 사용되도록 제공한다.

[0100] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물은 설치류; 일부 구현예에서, 마우스; 일부 구현예에서, 랫트이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물 세포는 설치류 세포; 일부 구현예에서, 마우스 세포; 일부 구현예에서, 랫트 세포이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물 조직은 설치류 조직; 일부 구현예에서, 마우스 조직; 일부 구현예에서, 랫트 조직이다.

[0101] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS는 서열번호 151로서 제시된 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0102] 다음의 도면들로 구성된 본원에 포함된 도면은 단지 예시를 위한 것이며 한정하기 위한 것이 아니다.

도 1은 변형되지 않은 D_H 영역(상단 패널) 및 조작된 D_H 영역(하단 패널)을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 분절들에 대한 DJ 재조합 이벤트에서 유전자 분절들의 순서된 조립을 보여주는 본 발명의 구현예들의 일반적인 예시를 도시한다(축척에 비례하지 않음). 12-량체 재조합 신호 서열(RSS)은 채워지지 않은 삼각형으로 도시되어 있다. 23-량체 RSS는 수직 줄무늬를 갖는 삼각형으로 도시되어 있다. 예시적인 변형되지 않은 V_H 유전자 분절(채워지지 않은 박스) 및 D_H 유전자 분절(채워진 박스)은 각각 채워지지 않은 박스 및 채워진 박스로서 도시되며, 알파벳 문자를 사용하여 일반적인 명명법이 제공된다. 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D 유전자 분절(예를 들어, D_H3-3) 및 변형되지 않은 J_H 유전자 분절은 각각 수평 줄무늬로 채워진 박스 및 채워지지 않은 박스로서 도시되고, 적절한 명명법이 제공된다. 또한 $\mu 0$ 프로모터($\mu 0$ pro)가 도시되어 있다. V_H 유전자 분절을 재조합된 DJ 유전자 분절에 재조합한 것은 도시되지 않았다.

도 2는 실시예 1에 따라 제조된 표적화 벡터의 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 표적화 벡터에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 3은 전기천공(EP)을 통해 마우스 ES 세포의 계놈에서 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위에 23: D_H3-3 :12/ J_H6 표적화 벡터를 삽입하는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 4는 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같은 23: D_H3-3 :12/ J_H6 표적화 벡터의 전기천공 및 통합 후 인간화 면역글로불린 중쇄 좌위에서 선별 카세트를 Cre 매개 결실시키는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 5는 전기천공(EP)을 통해 마우스 ES 세포의 계놈에서 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위에 23: D_H3-3 :12/ J_H4-6 표적화 벡터를 삽입하는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 6은 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같은 23: D_H3-3 :12/ J_H4-6 표적화 벡터의 전기천공 및 통합 후 인간화 면역글로불린 중쇄 좌위에서 선별 카세트를 Cre 매개 결실시키는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 7은 전기천공(EP)을 통해 마우스 ES 세포의 계놈에서 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위에 12: D_H2-2 :23|12: D_H2-8 :23|12: D_H2-15 :23/ J_H1-6 표적화 벡터를 삽입하는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다. 채워진 삼각형은 위유전자를 나타낸다.

도 8은 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같은 12: D_H2-2 :23|12: D_H2-8 :23|12: D_H2-15 :23 표적화 벡터의 전기천공 및

통합 후 인간화 면역글로불린 중쇄 좌위에서 선별 카세트를 Cre 매개 결실시키는 비제한적인 예시적인 구현예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 해시 라인은 중쇄 가변 영역 좌위에 포함되지만 구체적으로 도시되지 않은 V_H 유전자 분절 또는 D_H 유전자 분절을 나타낸다.

도 9a는 12: $D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23$ 표적화 벡터로 변형된 동물로부터 단리된 특정 아미노산 길이(x 축)의 CDR3를 갖는 D_H-D_H 재조합 이벤트(하단 패널)로부터 생성된 모든 기능성 면역글로불린(Ig) 관독의 백분율(y 축)을 그래프로 나타낸, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. "S1", "S2" 및 "S3"은 각각 상이한 실험용 마우스를 나타낸다.

도 9b는 12: $D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23$ 표적화 벡터로 변형된 동물로부터 단리된 특정 아미노산 길이(x 축)의 CDR3를 갖는 D_H-D_H 재조합 이벤트(하단 패널)로부터 생성된 모든 Ig 관독의 백분율(y 축)을 그래프로 나타낸, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. "S1", "S2" 및 "S3"은 각각 상이한 실험용 마우스를 나타낸다.

도 10a는 12: $D_H22:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23$ 표적화 벡터로 변형된 동물로부터 단리된 특정 수의 시스템인 잔기(x 축)의 CDR3를 갖는 D_H-D_H 재조합 이벤트(하단 패널)로부터 생성된 모든 기능성 면역글로불린(Ig) 관독의 백분율(y 축)을 그래프로 나타낸, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. "S1", "S2" 및 "S3"은 각각 상이한 실험용 마우스를 나타낸다.

도 10b는 12: $D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23$ 표적화 벡터로 변형된 동물로부터 단리된 특정 수의 시스템인 잔기(x 축)의 CDR3를 갖는 D_H-D_H 재조합 이벤트(하단 패널)로부터 생성된 모든 Ig 관독의 백분율(y 축)을 그래프로 나타낸, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. "S1", "S2" 및 "S3"은 각각 상이한 실험용 마우스를 나타낸다.

도 11은 인간화 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 좌위를 가진 개별 마우스(VI; 예를 들어, 미국 특허 번호 8,697,940 및 8,642,835 참조; 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 및 본원에 설명된 23: $D_H33:12/J_H6$ 표적화 벡터로 변형된 마우스(V(DD)J)에서 대표적인 항체 역가(y 축)를 그래프로 나타낸, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시하며, 두 코호트 모두 G 단백질-결합 수용체(GPCR)를 암호화하는 DNA 면역원으로 면역화하였다. GPCR을 발현하도록 조작된 293 세포(GPCR; x 축) 및 GPCR을 발현하지 않는 세포(대조군; x 축)에서 MSD 세포 결합에 의해 항체 역가를 결정하였다.

도 12a는 23: $D_H33:12/J_H6$ 표적화 벡터로 변형되고 아미노산(AA) 길이가 5 내지 30개 아미노산(x 축)인 중쇄 CDR3(HCDR3)을 암호화하는 마우스의 골수(BM) 또는 비장으로부터 분리된 재배열된 면역글로불린 중쇄 $V_H D_H A-D_H B_H$ 유전자 서열 및 표 7에 제시된 엄격한 기준에 따라 $V_H D_H A-D_H B_H$ 재배열의 결과인 것으로 추정되는 유전자 서열의 백분율(%; y 축)을 보여주는, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. BM 및 비장 세포 수는 서로 정규화되지 않는다. n=1.

도 12b는 패널 도 12a에 도시된 그래프의 확대를 제공하는, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. BM 및 비장 세포 수는 서로 정규화되지 않는다. n=1.

도 12c는 23: $D_H33:12/J_H6$ 표적화 벡터로 변형된 마우스의 골수 또는 비장 모두에서 21개 아미노산보다 긴 CDR3를 갖는 관독의 백분율을 보여주는, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. BM 및 비장 세포 수는 서로 정규화되지 않는다. n=1.

도 13는 23: $D_H33:12/J_H6$ 표적화 벡터로 변형되고 전부의 길이가 20개 넘는 아미노산(AA) 길이를 갖는(x 축) 중쇄 CDR3(HCDR3)을 암호화하는 마우스의 골수(BM) 또는 비장으로부터 분리된(표 7에 제시된 엄격한 기준에 따른) 추정되는 재배열된 면역글로불린 중쇄 $V_H D_H A-D_H B_H$ 유전자 서열의 백분율(%; y 축)을 보여주는, 본 발명의 구현예와 관련된 결과를 도시한다. BM 및 비장 세포 수는 서로 정규화되지 않는다. n=1.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0103]

- [0104] 본 발명의 범주는 본원에 첨부된 청구범위에 의해 정의되고, 본원에 설명된 특정 구현예에 의해 한정되지 않으며; 본 개시를 읽는 당업자는 기술된 이러한 구현예와 동등할 수 있거나, 달리 청구범위의 범주에 속할 수 있는 다양한 변형예를 알 수 있을 것이다. 일반적으로, 용어는 달리 명시되지 않는 한, 당해 기술분야에서 이해되는 의미에 따른다. 특정 용어에 대한 명시적 정의가 여기에 그리고 아래에 제공된다; 본 명세서 전반에 걸친 특정 경우의 이들 및 다른 용어들의 의미는 문맥으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 하기 용어들 및 기타 용어들에 대한 추가 정의는 본 명세서 전반에 걸쳐 제시된다. 본 명세서, 또는 이의 관련 부분에 인용된 참고문헌들은 그들 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0105] 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 요소를 (서수 용어의 사용이 없었다면) 동일한 이름을 가진 다른 요소로부터 구분하기 위한 표지로서 사용된다.
- [0106] 본 명세서 및 청구범위 내에서 관사 "a" 및 "an"은 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상을 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, 마쿠쉬 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, 특정 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 본 발명의 구현예 또는 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.
- [0107] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약(about)" 및 "대략(approximately)"은 동등하게 사용된다. 본 출원에서 사용된 임의의 수치는 약/대략을 사용하거나 사용하지 않더라도 당업자에 의해 이해되는 임의의 정상적인 변동, 예를 들어, +/- 5%를 포함하는 것을 의미한다.
- [0108] **투여:** 조성물을 대상체 또는 시스템 (예를 들어, 세포, 기관, 조직, 유기체 또는 관련 성분 또는 그의 성분 세트)에 투여하는 것을 의미한다. 당업자라면 투여 경로가 예를 들어, 조성물이 투여되고 있는 대상 또는 시스템, 조성물의 성질, 투여 목적 등에 따라 달라질 수 있음을 이해해야 할 것이다.
- [0109] 예를 들어, 일부 구현예에서, 동물 대상체(예를 들어, 사람 또는 설치류)에 대한 투여는 기관지(기관지 점적을 포함함), 협측, 장내, 진피간, 동맥내, 진피내, 위내, 골수내, 근육내, 비강내, 복강내, 척수강내, 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 투여를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 적어도 선택된 기간 동안 연속 투약 (예, 관류)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체는 대상체(예를 들어, 인간 대상체 또는 설치류)에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 완충액, 희석제, 부형제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 보관 또는 투여를 위한 용기, 예를 들어 바이알, 주사기(예를 들어, IV 주사기), 또는 백(예를 들어, IV 백)에 포함될 수 있다.
- [0110] **생물학적 활성:** 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.
- [0111] 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 특정한 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의

생물학적 활성을 공여하는 단백질 또는 폴리펩티드의 부분은 통상적으로 "생물학적 활성"부분으로서 지칭된다.

- [0112] **필적할 만한:** 서로 동일하지 않을 수 있지만, 이들 사이의 비교가 가능할 만큼 충분히 유사하여, 관찰된 차이점 또는 유사점에 기초하여 합리적으로 결론을 도출할 수 있는 둘 이상의 제제, 엔티티, 상황, 조건의 집합 등을 지칭한다. 당업자는, 문맥 내에서 둘 이상의 이러한 제제, 엔티티, 상황, 조건의 집합 등에 대하여 임의의 주어진 상황에서 필적할 만한 것으로 간주되는데 어떠한 정도의 동일성이 필요한지를 이해할 것이다.
- [0113] **보존적:** 보존적 아미노산 치환, 즉 유사한 화학적 성질(예, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 지칭한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 관심 단백질의 기능성 성질, 예를 들어, 리간드에 결합하는 수용체의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: 지방족 측쇄, 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 지방족-하이드록실 측쇄, 예를 들어 세린 및 트레오닌; 아미드 함유 측쇄, 예를 들어, 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 측쇄, 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 염기성 측쇄, 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 산성 측쇄, 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산; 및, 황 함유 측쇄, 예를 들어, 시스테인 및 메티오닌. 보존적 아미노산 치환기는, 예를 들어, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/티로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르테이트, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다.
- [0114] 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, 그 전문이 참조로서 본원에 통합된 Gonnet, G. H. 외, 1992, Science 256:1443-1445에 개시된 PAM250 log 우도 매트릭스에서 양성 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 적당한 보존적 치환인데, 이러한 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가진다.
- [0115] **대조군:** 결과가 비교되는 표준인, 당업계에서 이해되는 "대조군"의 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"은 "대조군 동물"을 나타낼 수 있다. "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. 대조군은 양성 대조군 또는 음성 대조군일 수 있다.
- [0116] 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.
- [0117] **파괴:** (예를 들어, 유전자 또는 좌위와 같은 내인성 상동성 서열을 갖는) DNA 분자를 이용한 상동성 재조합 이벤트의 결과를 지칭한다.
- [0118] 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 전체 유전자, 유전자의 단편, 예를 들어, 내인성 서열(예를 들어, 이중 서열) 이외의 기원일 수 있는, 엑손, 또는 관심있는 특정 유전자로부터 유도되거나 단리된 코딩 서열의 삽입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물(예를 들어, 유전자에 의해 암호화된 단백질)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 유전자의 서열 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 변경시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 염색체의 서열 또는 게놈 내의 염색체 위치를 변경시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 절단하거나 단편화할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물을 확장할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 파괴는 융합 단백질의 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 활성에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 유의한 효과는, 예를 들어, 스튜던트 T-테스트에 의해 측정될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0119] **내인성 좌위 또는 내인성 유전자:** 본원에 설명된 변형, 파괴, 결실, 삽입, 변형, 치환 또는 대체의 도입 전에 부

모 또는 기준 유기체 (또는 세포)에서 발견되는 좌위를 지칭한다.

[0120] 일부 구현예에서, 내인성 좌위는 전체적으로 또는 부분적으로, 자연에서 발견되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 좌위는 야생형 좌위이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 야생형 유기체이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 조작된 유기체이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 (야생형이든 조작된 것이든) 실험실에서 교배된 유기체이다.

[0121] **내인성 프로모터:** 예를 들어, 야생형 유기체에서, 내인성 유전자 또는 좌위와 자연적으로 연관된 프로모터를 지칭한다.

[0122] **조작된:** 일반적으로, 사람의 손으로 조작된 측면을 지칭한다. 통상적인 관행이면서 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리뉴클레오타이드 또는 세포의 자손은 실제 조작이 이전 엔티티에 대해 수행되었더라도 일반적으로는 여전히 "조작된"것으로 지칭된다. 또한, 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 본원에서 기술된 바와 같은 "조작"이 달성될 수 있는 다양한 방법론이 이용 가능하다.

[0123] 예를 들어, 일부 구현예에서, 자연에서 그러한 순서로 함께 연결되지 않은 둘 이상의 서열이 조작된 폴리뉴클레오타이드에서 서로 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작될 때, 폴리뉴클레오타이드는 "조작된"것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 폴리뉴클레오타이드는 자연에서 발견되는 조절 서열로서 제1 코딩 서열과 작동적으로 연관되고, 제2 코딩 서열과는 작동적으로 연관되지 않는 조절 서열을 포함할 수 있는데, 상기 조절 서열은 제2 코딩 서열과 작동적으로 연관되도록 사람의 손에 의해 연결된다. 본원에서 조작된 D_H 유전자 분절 구현예에서, D_H 유전자 분절은 사람의 손에 의해 조작되어 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된다(예를 들어, 적어도 한 쪽 측부에 위치하거나, 인접하거나, 접경하거나, 바로 인접한다). 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 D_H 유전자 분절은 또 다른 D_H 유전자 분절로부터 유래되며, 예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 유전 암호의 축퇴성(degeneracy) 및/또는 12-량체 RSS를 23-량체 RSS로 대체하는 것으로 인한 차이를 제외하고 다른 D_H 유전자 분절과 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 다른 D_H 유전자 분절 및 그로부터 유래된 조작된 D_H 유전자 분절(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절)은 상응하는 유전자 분절로 간주될 수 있다. 예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H3-3 유전자 분절은 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 D_H3-3 유전자 분절에 상응하는 것으로 간주될 수 있고, 여기서 상기 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H3-3 유전자 분절 및 한쪽 측부에 12-량체 RSS가 있고 다른 쪽 측부에 다른 12-량체 RSS가 있는 D_H3-3 유전자 분절은 유전 암호의 축퇴성 및/또는 12-량체 RSS 중 하나를 23-량체 RSS로 대체하는 것으로 인한 차이를 제외하고 동일한 뉴클레오타이드 서열을 공유한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 자연에서 서로 연결되어 있지 않은 폴리펩티드 요소 또는 도메인을 각각 암호화하는 제1 및 제2 핵산 서열은 하나의 조작된 폴리펩티드에서 서로 연결될 수 있다. 이에 비해, 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체가 그의 유전 정보가 변경되도록 (예를 들어, 이전에 존재하지 않았던 새로운 유전 물질이 도입되거나, 이전에 존재하던 유전 물질이 변경되거나 제거되도록) 조작된 경우, 세포 또는 유기체는 "조작된"것으로 간주될 수 있다.

[0124] 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 시험관 내 화학 합성 방법론 및/또는 예를 들어, (중합효소 연쇄 반응을 통한) 핵산 증폭 하이브리드화, 돌연변이, 형질전환, 형질감염 등과 같은 재조합 핵산 기술, 및/또는 임의의 다양한 통제된 교배 방법론을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, (예를 들어, 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 및 조직 배양과 형질전환(예를 들어, 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 (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨) 참조.

[0125] **유전자:** 생성물(예를 들어, RNA 생성물 및/또는 폴리펩티드 생성물)을 위해 코딩하는 염색체 내의 DNA 서열을 지칭한다. 명료성을 위해, 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자"는 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 일부를 지칭하고; 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.

[0126] 일부 구현예에서, 유전자는 암호화 서열(즉, 특정 생성물을 암호화하는 서열)을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자는 비암호화 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 유전자는 암호화(예를 들어, 엑손) 서열과 비암호화(인트론) 서열 모두를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자는 하나 이상의 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등.) 및/또는, 예를 들어, 유전자 발현의 하나 이상의 양태(예를 들어, 세포 유형 특이적 발현, 유도 발현 등)를 조절하거나 이에 영향을 줄 수 있는 인트론 서열을 포함할 수 있다.

[0127] **이종:** 상이한 근원으로부터의 제제 또는 엔티티를 지칭한다. 예를 들어, 특정 세포 또는 유기체 내에 존재하는 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물을 참조하여 사용될 때, 이 용어는 관련 폴리펩티드 또는 그의 단편, 유전자 또는 그의 단편, 또는 유전자 산물 또는 그의 단편이: (1) 사람의 손에 의해 조작되었고; 2) 사람의 손에 의해(예를 들어 유전자 조작을 통해) 세포 또는 유기체 (또는 이의 전구체) 내로 도입되었고; 그리고/또는 (3) 관련 세포 또는 유기체(예를 들어, 관련 세포 유형 또는 유기체 유형)에 존재하거나 이에 의해 자연적으로 생성되지 않음을 분명히 한다. 또 다른 예시는 보통 특정 천연 세포 또는 유기체에 존재하지만, 예를 들어, 비-자연적으로 연관된 및 일부 구현예에서는, 비-내인성 조절 요소 (예를 들어, 프로모터)의 조절 하에 돌연변이 또는 배치에 의해, 변형된, 폴리펩티드 또는 그의 단편, 유전자 또는 그의 단편, 또는 유전자 산물 또는 그의 단편을 포함한다.

[0128] **숙주 세포:** 이종(예를 들어, 외인성) 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 일정한 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은, 사실, 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 여전히 포함된다.

[0129] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 세포이거나 이를 포함한다. 일반적으로, 숙주 세포는 해당 세포가 지정된 계(Kingdom of life)와 무관하게 이종 핵산 또는 단백질을 받고/받거나 생산하기에 적합한 임의의 세포이다. 예시적인 세포는 원핵세포 및 진핵세포(단세포 또는 다세포), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*), 고초균 종(*Bacillus spp.*), 스트렙토미세스 종(*Streptomyces spp.*) 등의 균주), 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예를 들어, 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 메타놀리카(*Pichia methanolica*) 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들어, SF-9, SF-21, 배콜로바이러스에 감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 세포 융합체, 예컨대 하이브리도마(hybridoma) 또는 쿼드로마(quadroma) 등을 포함한다.

[0130] 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.

[0131] **인간화:** 비-인간 기원이고 변형된(예를 들어, 인간화) 분자가 그의 생물학적 기능을 보유하고/하거나 보유된 생물학적 기능을 수행하는 구조를 유지하는 방식으로 그 일부가 상응하는 인간 분자의 상응하는 일부로 대체된 분자(예를 들어, 핵산, 단백질 등)를 지칭한다. 대조적으로, "인간"등은 인간 기원만을 갖는 분자, 예를 들어, 각각 인간 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열만을 포함하는 인간 뉴클레오타이드 또는 단백질을 포함한다. 용어 "인간(화)"는 인간(화) 분자가 (a) 인간 분자 또는 (b) 인간화 분자일 수 있음을 반영하기 위해 사용된다.

[0132] **동일성:** 서열의 비교와 관련하여, 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당해 분야에 알려진 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 지칭한다.

[0133] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 동일성은 10.0의 오픈 갭 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.

[0134] **시험관 내:** 다세포 유기체 내에서가 아니라, 인공적인 환경, 예를 들어 시험관이나 반응 용기, 세포 배양기 등에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.

[0135] **생체 내:** 인간 및 비-인간 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.

[0136] **단리된:** (1) (자연에서 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 엔티티를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 엔티티는 이들이 초기에 연관되었던 다른 성분 중 약 10개 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 적어도 약 80% 이상 순수하다. 실질적으로 다른 구성요소가 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.

[0137] 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 자연에서 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.

[0138] **비-인간 동물:** 인간이 아닌 임의의 척추 동물 유기체를 지칭한다.

[0139] 일부 구현예에서, 비-인간 동물은 원구류, 경골어, 연골 어류(예를 들어, 상어 또는 가오리), 양서류, 파충류, 포유동물, 및 새이다. 일부 구현예에서, 비-인간 포유류는 영장류, 염소, 양, 돼지, 개, 소, 또는 설치류이다. 일부 구현예에서, 비-인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.

[0140] **핵산:** 가장 넓은 의미에서, 올리고뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있고 일반적으로 핵산 분자, 핵산 서열, 뉴클레오티드 분자, 뉴클레오티드 분자와 상호 교환 가능한 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭하며, 이 용어들 또한 서로 상호 교환 가능하다.

[0141] 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합을 통해 올리고뉴클레오티드 사슬에 포함되거나 포함될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥으로부터 명백해지는 바와 같이, 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기(예를 들어, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭하고; 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 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 유사체가거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 핵산 유사체는 인산디에스테르 백본을 활용하지 않는다는 점에서 "핵산"과 다르다. 예를 들어, 일부 구현예에서, "핵산"은 당업계에 알려져 있고, 백본에서 인산디에스테르 결합(phosphodiester bonds) 대신 펩티드 결합을 가지며, 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주되는 하나 이상의 "펩티드 핵산(peptide nucleic acid)"이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5' 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, 피콜로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피

닐-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 단백질과 같은 기능성 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 폴리펩티드 단편 (예를 들어, 펩티드)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 엑손을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 코딩 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 자연 공급원 유래의 하나 이상의 단리체, 상보성 템플릿에 기반한 중합화에 의한 효소적 합성(생체 내 또는 시험관 내), 재조합 세포나 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성 중 하나 이상에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 적어도 3개 이상의 잔기 길이이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 단일 가닥이고; 일부 구현예에서, "핵산"은 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 폴리펩티드 또는 그의 단편을 암호화하는 서열에 상보적이거나, 이를 암호화하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 효소 활성을 가진다.

[0142] **작동가능하게 연결된**: 기술된 성분이 의도된 방식으로 기능하게 하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 지칭한다.

[0143] 일부 구현예에서, 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열은 서로 인접하고, 예를 들어, RSS에 작동가능하게 연결된 번역글로불린 유전자 분절을 포함하는 핵산 서열은 상기 RSS 뉴클레오티드 서열과 인접한 번역글로불린 유전자 분절 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 예를 들어, 상기 번역글로불린 유전자 분절은 상기 번역글로불린 유전자 분절이 상기 RSS 뉴클레오티드 서열에 바로 인접하게 되도록 하는 방식으로 적어도 한쪽 측부에 상기 RSS 뉴클레오티드 서열이 위치한다 (예를 들어, 접경한다).

[0144] 다른 구현예에서, 작동가능한 연결은 인접성을 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 서로에게 "작동가능하게 연결된" 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절은 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하도록 재배열될 수 있으며, 이는 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절이 반드시 서로 인접할 필요는 없다. 서로에게 그리고 인접한 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절은, 항원 결합 단백질의 폴리펩티드 사슬로서 불변 영역 유전자와 함께 발현되는 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하도록 재배열될 수 있다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 호환 가능한 조건 하에 달성되도록 연결된다. "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자에 인접한 발현 조절 서열 및 관심 유전자를 조절하기 위해 일정한 거리에서 또는 가로 질러(in trans) 작용하는 발현 조절 서열 둘 다를 포함한다.

[0145] 용어 "발현 조절 서열"은, 연결되는 코딩 서열의 발현 및 가공에 영향을 미치는 데 필요한, 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "발현 조절 서열"은 다음을 포함한다: 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 증강자 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닌화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진하는 서열; 단백질 안정성을 증진하는 서열(즉, 코작 공통(Kozak consensus) 서열); 및 원하는 경우, 단백질 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 존재하는 것이 발현 및 가공에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 의도되고, 존재하는 것이 유리한 추가적인 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다.

[0146] 일반적으로, 각각의 재배열되지 않은 번역글로불린 V 유전자 분절, D 유전자 분절, 또는 J 유전자 분절은, 12-량체 RSS 또는 23-량체 RSS일 수 있는, 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된다(예를 들어, 상기 RSS와 연관되거나, 한쪽 또는 양쪽 측부에 상기 RSS가 위치하거나, 상기 RSS와 인접함). RSS(23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함함)가 각 쪽의 측부에 위치하는 임의의 유전자 분절은 재조합을 거치지 않았으며, 따라서 "재배열되지 않은" 유전자 분절로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 재배열되지 않은 유전자 분절은 그의 생식선(예를 들어, 야생형) 구성의 유전자 분절을 포함할 수 있으며, 예를 들어 생식선 V_H 유전자 분절 및 생식선 J_H 유전자 분절이 양쪽 측부에 각각 23-량체 RSS가 위치한다. 대조적으로, 생식선 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 각각의 한쪽 측부 상에 12-량체 RSS가 위치한다. 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 예를 들어, 조작된 D_H 유전자 분절은 또한 재조합을 거치지 않았으며, 따라서 (i) 23-량체 RSS 및 (ii) 12-량체 RSS를 포함한다. 조작된 D_H 유전자 분절(예를 들어, 23-량체

RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절)은 12/23 재조합 규칙에 따라 12-량체 RSS와 작동가능하게 연결된 다른 D_H 유전자 분절과 재배열할 수 있다.

[0147] **생리학적 조건:** 세포 또는 유기체가 살고 그리고/또는 재생하는 조건을 참조하는 그 분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용어는 유기체 또는 세포 시스템을 위해 자연에서 발생할 수 있는 외부 또는 내부 환경의 조건을 지칭한다. 일부 구현예에서, 생리학적 조건은 인간 또는 비-인간 동물의 체내에 존재하는 이러한 조건, 특히 수술 부위 지점 및/또는 내부에 존재하는 조건이다. 생리학적 조건은 통상적으로, 예를 들어, 그것이 지상에서 마주치게 되는 20-40℃의 온도 범위, 1 대기압, pH 6-8, 1-20 mM의 포도당 농도, 대기 수준에서 산소 농도, 및 중력을 포함한다. 일부 구현예에서, 실험실에서의 조건은 생리학적 조건에서 조작되고 그리고/또는 유지된다. 일부 구현예에서, 생리학적 조건은 유기체 (예를 들면, 비-인간 동물)에서 마주하게 된다.

[0148] **폴리펩티드:** 아미노산의 임의의 고분자 사슬을 지칭한다.

[0149] 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, 이들 각각이 관심있는 폴리펩티드에서 발견되는 것보다 서로에 대해 다른 공간적 배열로 동일한 모체 폴리펩티드에서 발견되는, 복수의 단편을 포함하거나 이들로 구성될 수 있어서 (예를 들어, 모체에 직접 연결되는 단편은 관심있는 폴리펩티드에서 공간적으로 분리되거나 또는 그 반대일 수 있고, 그리고/또는 단편은 모체에서와 다른 관심있는 폴리펩티드 내에서의 순서로 존재할 수 있음), 관심있는 폴리펩티드는 그의 모체 폴리펩티드의 유도체가 된다.

[0150] **재조합:** 재조합 수단, 예컨대 숙주 세포에 형질 감염된 재조합 발현 벡터를 사용해 발현된 폴리펩티드, 재조합, 조합 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드(Hoogenboom H. R., 1997 TIB Tech. 15:62-70; Hoogenboom H., and Chames P., 2000, Immunology Today 21:371-378; Azzazy H., and Highsmith W. E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W., 2002, BioTechniques 29:128-145), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D., 외, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Little M. 외, 2000, Immunology Today 21:364-370; Kellermann S. A. and Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Murphy, A.J., 외, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111(14):5153-5158 참조; 이들 각각은 그 전문이 참조로 본원에 포함됨)에 의해 설계, 조작, 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드, 또는 선택된 서열 요소를 서로에게 스플라이싱시키는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제작, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭한다.

[0151] 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 관심있는 근원 유기체(예를 들어, 인간, 마우스 등)의 게놈 (예를 들어, 폴리펩티드)에서 발견되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 2가지의 상이한 유기체 (예, 인간 및 비-인간 유기체)에서 서로 (즉, 둘 이상의 상이한 유기체, 예를 들어, 인간 및 비-인간 부위로부터) 별개로 자연에서 발생하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 (예를 들어, 비-인간 동물 내에서, 예를 들어, *시험관 내* 또는 *생체 내*) 돌연변이 유발로부터 유래한 아미노산 서열을 가지므로, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열로부터 기원하고 이와 관련되지만 비-인간 동물의 *생체 내* 게놈 내에서는 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0152] **기준(reference):** 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. "기준"은 "기준 동물"을 지칭할 수 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, 개체군, 샘플, 서열 또는 값은 관심있는 제제, 동물(예를 들어, 포유동물), 코호트, 개체, 개체군, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 사용된 것에 필적할 만한 조건 하에 결정되거나 특성화된다.

[0153] 일부 구현예에서, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심있는 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값의 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험 및/또는 결정된다. 일부 구현예

서, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은, 선택적으로 유형 매체로 구현된, 역사적 기준이다. 일부 구현예에서, 기준은 대조군을 지칭할 수 있다.

[0154] **실질적으로:** 관심있는 특성 또는 성질의 전체 범위나 정도 또는 전체에 근사한 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.

[0155] **실질적 상동성:** 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 기능성 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 아래에 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
리신	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

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

[0156]

[0157] 당업계에서 공지된 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): 403-410; Altschul, S. F. 외, 1996, Methods in Enzymol. 266:460-80; Altschul, S. F. 외, 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.

[0158] 일부 구현예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도 95% 이상상이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 상동성인 경우 이들은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 9개 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 10개

이상의 잔기이다.

- [0159] **실질적 동일성:** 아미노산 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 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): 403-410; Altschul, S. F. 외, 1996, Methods in Enzymol. 266:460-80; Altschul, S. F. 외, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; 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, 전술된 프로그램은 일반적으로 동일성의 정도에 대한 지표를 제공한다.
- [0160] 일부 구현예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도 95% 이상이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 동일한 경우 이들은 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 10개 이상의 잔기이다.
- [0161] **표적화 벡터** 또는 **표적화 작제물:** 표적화 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 작제물의 통합을 제공하는 서열을 포함한다. 부위 특이적 재조합효소 인식 부위(예를 들어, *loxP* 또는 *Frt* 부위)를 이용하여 표적화하는 표적화 영역도 포함된다.
- [0162] 일부 구현예에서, 본원에서 설명되는 표적화 작제물은 특정 관심 핵산 서열 또는 유전자, 선택 가능한 마커, 제어 및/또는 조절 서열, 및 이러한 서열을 포함하는 재조합을 돕거나 촉진하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 매개되는 재조합을 가능하게 하는 다른 핵산 서열을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 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 설명된 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.
- [0163] **이식유전자** 또는 **이식유전자 작제물:** 사람의 손에 의해, 예컨대 본원에 설명된 방법에 의해 세포 내로 도입된 핵산 서열 (예를 들어, 전체적으로 또는 부분적으로, 관심 폴리펩티드를 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. 이식유전자는 이식유전자를 흡수한 자손(예를 들어, 세포)의 후속 선택을 허용하는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다.
- [0164] **유전자이식동물, 이식유전자 비-인간 동물** 또는 Tg^+ : 비-인간 동물의 세포 중 하나 이상이 관심있는 폴리펩티드를 암호화하는 이중 핵산 및/또는 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 임의의 비-자연발생 비-인간 동물과 상호교환적으로 사용되거나 이를 지칭할 수 있다.
- [0165] 일부 구현예에서, 이중 핵산 서열 및/또는 유전자는 미세주입이나 재조합 바이러스 감염에 의한 것과 같은, 고의적인 유전자 조작에 의해 전구체 세포에 도입됨으로써 세포 내에 직접 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.

- [0166] **벡터**: 연관된 다른 핵산을 이송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다.
- [0167] 일부 구현예에서, 벡터는, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포와 같은 숙주 세포에서 벡터가 연결된 핵산의 염색체와 복제 및/또는 발현을 할 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있는 벡터를 본원에서 "**발현 벡터**"로 지칭한다.
- [0168] **야생형**: (돌연변이, 질환, 변경 등과 대조적으로) "정상" 상태에서 자연에서 발견되는 구조 및/또는 활성을 갖는 엔티티를 지칭하는, 당업계에서 이해되는 의미를 갖는다. 당업자는 야생형 유전자 및 폴리펩티드가 흔히 다수의 상이한 형태(예를 들어, 대립유전자)로 존재한다는 것을 이해할 것이다.
- [0169] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 장점은 이어지는 특정한 구현예의 상세한 설명에서 명백해진다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 일부 구현예를 나타내지만, 단지 예시로서 제공될 뿐 제한하고자 함이 아닌 것으로 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내 다양한 변형예들 및 수정예들이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.
- [0170] **특정 구현예의 상세한 설명**
- [0171] 본 발명은, 무엇보다도, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 부분(기능성 단편, 결합 부분 등)을 암호화하는 이중 유전 물질을 갖는 유전자이식 또는 조작된 비-인간 동물을 제공하며, 이중 유전 물질은 중쇄 불변(C_H) 유전자와 작동가능하게 연결되도록 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위 내에 삽입된다. 이러한 비-인간 동물은 재배열된 V(DD)J 서열에 의해 암호화된 항체를 생성하는 능력을 입증하는 것으로 고려된다. 또한 이러한 비-인간 동물은 야생형 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위 (또는 자연에서 나타나는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위)에서 생성된 면역글로불린 중쇄 가변 CDR3 다양성을 갖는 항체 집단에 비해 CDR3 다양성이 증가된 중쇄 가변 영역을 특징으로 하는 항체 집단을 입증하는 것으로 고려된다. 따라서, 제공된 비-인간 동물은 특정 항원, 특히, 낮은 및/또는 불량한 면역원성과 연관된 항원 또는 전통적인 (또는 야생형) 항체에 의한 결합에 바람직하지 않은 하나 이상의 에피토프를 특징으로 하는 항원에 결합하는 항체 기반 치료제의 개발에 특히 유용하다. 특히, 본 발명은 VDJ 재조합 중 D_H -대- D_H 분절 재배열을 위한 능력을 초래하는, 면역글로불린 중쇄 가변 영역에서 D_H 영역의 하나 이상의 D_H 분절에 인접한 (예를 들어, 5' 또는 3') 23-량체 재조합 신호 서열의 도입, 및 중쇄 가변 영역 및 특히 CDR3 영역을 갖는 항체의 발현을 포함하며, 이는 단일 D_H 분절들이 관여하는 VDJ 재조합으로부터 생성된 항체에 비해 더 긴 아미노산 길이를 특징으로 할 수 있다. 이러한 유전자이식 비-인간 동물은 확립된 약물 발견 기술의 표적화 능력을 넘어 질환 표적을 결합하는 항체 및/또는 항체 기반 치료제를 식별하고 개발하기 위한 **생체 내** 시스템을 제공한다. 또한, 이러한 유전자이식 비-인간 동물은 인간에 영향을 미치는 다양한 질환 및/또는 질환 병리학의 중심인 단백질-단백질 상호작용을 방해하기 위해 고안되거나 그것에 집중된 항체 및/또는 항체 기반 치료제 개발을 위한 유용한 동물 모델 시스템을 제공한다.
- [0172] **도 1, 상단 패널**에 도시된 바와 같이, 면역글로불린 유전자 분절들 간의 재조합은 재조합 신호 서열(RSS)이 측부에 위치한 유전자 분절들이 순서가 정해진 과정에 의해 결합되는, 통상 12/23 규칙으로 지칭되는 규칙을 따른다. 각각의 RSS는 코딩 서열(예를 들어, V_H , D_H 또는 J_H 분절)과 인접하는 7개의 뉴클레오티드(7량체; 5'-CACAGTG-3'; 서열번호 144)의 보존된 블록에 이어지는 12bp 또는 23bp 길이인 스페이서로 알려진 비-보존된 영역, 및 9개의 뉴클레오티드(9량체; 5'-ACAAAAACC-3'; 서열번호 145)의 제2 보존된 블록으로 구성된다. 스페이서는 서열이 다양할 수 있지만, 그의 보존된 길이는 DNA 이중 나선의 1 또는 2 회전에 대응한다. 이는 7량체 및 9량체 서열을 DNA 나선의 동일한 측면으로 가져오며, 여기에서 재조합을 촉매하는 단백질 복합체에 의해 이들이 결합될 수 있다. 23bp 스페이서가 있는 RSS는 23-량체 RSS이고 12bp 스페이서가 있는 RSS는 12-량체 RSS이다. 재조합의 12/23 규칙은 일반적으로 12-량체 RSS와 23-량체 RSS 간의 재조합을 촉진하고, 23-량체 RSS와 또 다른 23-량체 RSS 간의 재조합을 금지하거나, 12-량체 RSS와 또 다른 12-량체 RSS 간의 재조합을 금지한다, 예를 들어, 예외가 보고되긴 했지만, 직접적인 생식선 V_H -대-생식선 J_H 재조합 (즉, 23-량체-대-23-량체 결합) 또는 생식선 D_H -대-생식선 D_H 재조합 (즉, 12-량체-대-12-량체 결합)을 금지한다.
- [0173] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은, 각각이 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되고 이에 따라 D_H - D_H 재조합이 가능한 하나 이상의 D_H 분절의 존재를 특징으로 하는 조작된 다양성 클러스터를 함유하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함한다(즉, 조작된 D_H 영역). 일부 구현예에서, 이러한 재조합으로부터 생성된 CDR3을 함유하는 항체는 특정 항원(예를 들어, 바이러스, 막 채널 등)에 대한 결합을 지시하기 위해 더 긴 아미노산 길이로부터 기인하는 증가된 다양성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물

은 조작된 D_H 영역과 작동가능하게 연결된 인간 중쇄 가변 (V_H) 및 연결 (J_H) 유전자 분절을 포함하고 있어서 VDJ 재조합이 상기 V_H , J_H 및 하나보다 많은 D_H 분절 사이에서 일어나 관심있는 항원에 결합하는 중쇄 가변 영역을 생성하게 된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역은 기준 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위와 비교하여 증가된 빈도로 D_H -대- D_H 재조합을 허용(또는 촉진)하도록 조작된 하나 이상의(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10개 이상) 인간 D_H 분절을 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 비-인간 동물의 게놈 내 면역글로불린 중쇄 가변 영역에서 각각 23-량체 재조합 신호 서열(RSS)에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절에 작동가능하게 연결된 복수의 V_H 및 J_H 유전자 분절을 포함한다. 다수의 구현예에서, V_H 및 J_H 분절은 인간 V_H 및 인간 J_H 유전자 분절이다.

[0174] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 좌위 (예, 및/또는)을 추가로 포함하고 있어서 비-인간 동물이 인간 가변 영역 (즉, 중쇄 및 경쇄) 및 비-인간 불변 영역을 포함하는 항체를 생산하게 된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 좌위는 설치류 경쇄 불변 영역 (예, 설치류 C_k 또는 C_λ)에 작동가능하게 연결된 V_L 및 J_L 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 미국 특허 번호 9,796,788; 9,969,814; 미국 특허 출원 공개 번호 2011/0195454 A1, 2012/0021409 A1, 2012/0192300 A1, 2013/0045492 A1, 2013/0185821 A1, 2013/0302836 A1, 2018/0125043; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/097603, WO 2012/148873, WO 2013/134263, WO 2013/184761, WO 2014/160179, WO 2014/160202; 및 WO2019/113065에 설명된 바와 같은 면역글로불린 경쇄 좌위를 추가로 포함하며; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다).

[0175] 본 발명의 다양한 측면은 다음의 섹션에서 상세히 설명된다. 섹션의 사용은 본원에 설명된 구현예로 제한하는 것을 의미하지 않는다. 각 섹션은 구체적으로 본원에 설명된 임의의 측면 또는 구현예에 적용될 수 있다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0176] VDJ 재조합

[0177] 면역글로불린 합성을 담당하는 유전자들은 동물의 모든 세포에서 발견되며, 염색체를 따라 순차적으로 위치한, 유전자 분절에 배열된다. 유전되는 인간 유전자 분절의 구성, 예를 들어, 인간 유전자 분절의 생식선 구성, 예를 들어, 인간의 생식선 게놈(예를 들어, 다음 세대로 내려가는 게놈) 내의 인간 유전자 분절의 순서는, Lefranc, M.-P., Exp. Clin. Immunogenet., 18, 100-116 (2001)에서 발견될 수 있으며, 이는 또한 생식선 구성에서 인간 면역글로불린 중쇄 좌위 내에서 발견되는 기능성 유전자 분절 및 위유전자를 보여준다. 여러 유전적 성분을 포함하는 일련의 재조합 이벤트는 유전자 분절 (예를 들면, V, D 및 J)의 정렬된 배열로부터 면역글로불린을 조립하는 역할을 한다. 이러한 유전자 분절 조립은 부정확한 것으로 알려져 있으며, 따라서, 면역글로불린 다양성은 다른 유전자 분절들의 조합과 부정확한 결합을 통한 고유한 집합의 형성 모두에 의해 달성된다. 또한, 다양성은 면역글로불린의 가변 영역 서열이 항원에 대한 친화도 및 특이성을 증가시키기 위해 변경되는 체세포 과돌연변이로 알려진 프로세스를 통해 생성된다. 면역글로불린은 두 개의 동일한 중쇄 및 두 개의 동일한 경쇄로 구성된 Y-자형 폴리펩티드이며, 이들 각각은 두 개의 구조적 성분: 하나의 가변 도메인과 하나의 불변 도메인을 가지고 있다. 유전자 분절의 조립에 의해 형성되는 것은 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인이지만, 불변 도메인들은 RNA 스플라이싱을 통해 가변 도메인에 융합된다. 유전자 분절을 조립 (또는 결합)하는 메커니즘은 중쇄 및 경쇄에 대해 유사하지만, 경쇄의 경우에는 단 하나의 결합 이벤트가 요구되지만 (즉, V에서 J로) 중쇄의 경우에는 두 개가 요구된다 (즉 D에서 J 및 V에서 DJ로).

[0178] (각각 VDJ 재조합 및 VJ 재조합으로 지칭되는) 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 유전자 분절의 조립은, 재조합 신호 서열 (RSS)이라고 불리는, 각각의 유전자 분절 측부에 있는 보존된 논코딩 DNA 서열에 의해 가이드되며, 이는 V, D 및 J 코딩 서열에 대하여 정확한 위치에서의 DNA 재배열을 보장한다 (예를 들어, Ramsden, D.A. 외, 1994, Nuc. Acids Res. 22(10):1785-96 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 당업자가 이해하는 중쇄 유전자 분절의 VDJ 재조합에 관여하는 서열의 대표적인 개략도가 도 1에 제시되어 있다. 각각의 RSS는 코딩 서열 (예를 들어, V, D 또는 J 분절)과 인접하는 7개 뉴클레오티드 (7량체)의 보존된 블록에 이어서, 보존된 스페이서 (12bp 또는 23bp) 및 9개 뉴클레오티드 (9량체)의 제2 보존된 블록으로 구성된다. 개체 간에 12bp 또는 23bp 스페이서에서 상당한 서열 다양성이 허용되지만, 일반적으로 이러한 서열들의 길이는 변하지 않는다. 면역글로불린 유전자 분절들 사이의 재조합은 일반적으로 12/23 규칙으로 지칭되는 규칙을 따르며, 12bp 스페이서 (또는 12-량체)가 있는 RSS가 측부에 있는 유전자 분절이 일반적으로 23bp 스페이서가 측부에 있는 유전자 분절에 결합된다 (또는 23-량체; 예를 들어, Hiom, K. 및 M. Gellert, 1998, Mol. Cell. 1(7):1011-9 참조; 그 전문이

본원에 참조로 포함됨). RSS의 서열은 특정 유전자 분절과의 재조합의 효율 및/또는 빈도에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (예를 들어, Ramsden, D.A 및 G.E. Wu, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:10721-5; Boubnov, N.V. 외, 1995, Nuc. Acids Res. 23:1060-7; Ezekiel, U.R. 외, 1995, Immunity 2:381-9; Sadofsky, M. 외, 1995, Genes Dev. 9:2193-9; Cuomo, C.A. 외, 1996, Mol. Cell Biol. 16:5683-90; Ramsden, D.A. 외, 1996, EMBO J 15:3197-3206 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 사실, 많은 보고는 개체들 사이에서, 유전자 분절, 특히 D_H 분절의 매우 편향되고 다양한 용법을 언급하고 있다. 달리 표시되지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것이라는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한, RSS에 대한 언급이 없는 재배열되지 않은 유전자 분절은, 유전자 분절이 자연적으로 연관되는, 예를 들어, 측부에 위치하거나, 작동가능하게 연결된, 등의 2개의 RSS를 포함하는 것으로 추정된다. 일부 구현예에서, 본원의 재배열되지 않은 유전자 분절은 그의 생식선(예를 들어, 야생형) 구성의 유전자 분절을 포함할 수 있다, 예를 들어 생식선 V_H 유전자 분절 및 생식선 J_H 유전자 분절이 양쪽 측부에 각각 23-량체 RSS가 위치한다. 대조적으로, 생식선 D_H 유전자 분절, 예를 들어 재배열되지 않은 D_H 유전자 분절은 각각의 측부에 12-량체 RSS가 위치한다.

[0179] 이와 같이, 재배열되지 않은 유전자 분절은 또한 이러한 생식선 구성과 연관된 임의의 RSS를 포함하는, 그의 생식선 구성의 유전자 분절을 지칭할 수 있다. 또한, 그 생식선 구성의 복수의 유전자 분절은 일반적으로 각각의 개별 유전자 분절이 그 생식선(예를 들어, 재배열되지 않은) 구성에 있을 뿐만 아니라, 기능성 유전자 분절의 순서 및/또는 위치도 지칭한다. 예를 들어, Lefranc, M.-P., Exp. Clin. Immunogenet., 18, 100-116 (2001) 참조; 인간 V, D 및 J 유전자 분절의 생식선 구성에 대해, 그 전문이 참조로서 본원에 통합된다.

[0180] 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 형성하기 위한 유전자 분절의 조립은 면역글로불린의 항원-결합 영역 (또는 부위)의 형성을 초래한다. 이러한 항원-결합 영역은 부분적으로, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 일반적으로 지칭되는, 초가변 영역의 존재를 특징으로 한다. 중쇄 및 경쇄 모두에 대해 (즉, 총 6개의 CDR에 대해) 3개의 CDR이 있으며, CDR1 및 CDR2 모두가 V 유전자 분절에 의해 완전히 암호화된다. 그러나, CDR3은 경쇄의 경우 V 및 J 분절, 그리고 중쇄의 경우 V, D 및 J 분절의 결합으로 인한 서열에 의해 암호화된다. 따라서, 중쇄 가변 영역 코딩 서열을 형성하기 위해 재조합 동안 사용되는 추가적인 유전자 분열은 중쇄의 항원-결합 부위의 다양성을 상당히 증가시킨다. 따라서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 함유하는 제공된 비-인간 동물은 D_H -대- D_H 재조합을 특징으로 하는 CDR3 다양성을 생성하며, 전통적인 VDJ 재조합에 의해 생성된 중쇄 가변 영역의 CDR3 영역과 비교하여 증가된 아미노산 길이를 갖는다.

[0181] 이론에 얽매이지 않고, 재배열된 중쇄 가변 영역 유전자 서열을 형성하는 접합부의 수를 증가시키고/시키거나 CDR3 영역의 길이를 증가시킴으로써 중쇄 CDR3 레퍼토리의 추가적인 다양성이 가능할 수 있다고 생각된다. 접합부의 수를 증가시키고/시키거나 CDR3 영역의 길이를 증가시키는 한 가지 메커니즘은, 후속 D_H - J_H 및 V - D_H 재조합 이벤트 이전에, D_H - D_H 재조합 이벤트에서 제1 D_H 분절(일반적으로 D_H "A"로 지칭될 수 있음)을 다른 D_H 분절(일반적으로 D_H "B"로 지칭될 수 있음)에 결합함으로써, $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 를 유도할 수 있다. 본질적으로 D_H - D_H 재조합 이벤트는 12/23 규칙(Alt, F.W. 등, 1984, EMBO J. 3(6):1209-19; 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨)에 의해 금지되는 것으로 오랫동안 여겨졌다. 그러나, D_H - D_H 재조합 이벤트는 12/23 규칙을 위반하여 인간에서 매우 낮은 빈도로 발생하는 것으로 보이며, (800 중 1 또는 ~0.125%의 미처리 B 세포; 예를 들어, Olier, P.J. 외, 1985, EMBO J. 4(13B):3681-88; Milner, E.C.B. 외, 1986, Immunol. Today 7 :36-40; Liu, Z. 등, 1987, Nucleic Acids Res. 15(11):4688; Liu, Z. 등, 1987, Nucleic Acids Res. 15(15):6296; Meek, K.D. 등, 1989, J. Exp. Med. 169(2):519-33; Meek, K.D. 등, 1989, J. Exp. Med. 170:39-57; Baskin, B. 등, 1998, Clin. Exp. Immunol. 112:44-7; Briney, B.S. 등, 2012 Immunol. 137: 56-64 참조; 이들 각각은 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨) 및 몇몇 중쇄에서 관찰된 비정상적으로 긴 CDR3을 생성하기 위한 주요 메커니즘인 것으로 여겨진다 (Janeway' Immunobiology. 9th Edition. Kenneth Murphy, Casey Weaver. Chapter 5, 2017; 그 전문이 참조로 통합됨). 그러나, 일부 잠재적 치료 표적(예를 들어, 바이러스, 세포 표면 수용체, GPCR과 같은 IV형 막관통 단백질, 이온 채널)은 정상 항체에 접근할 수 없지만 긴 HCDR3 서열을 갖는 항체에 의해 인식될 수 있는 마스킹되거나 함몰된 에피토프를 갖는다. 예를 들어, HCDR3이 매우 긴 항체는 만성 바이러스 감염 환자들에서 종종 발견되고, 일부의 경우 광범위하게 중화 활성을 보인다(예, HIV-1 또는 인플루엔자에 대한 광범위하게 중화 항체). 이러한 숨겨진 에피토프에 도달할 수 있는 항체를 선택하기 위해서는, 매우 긴 HCDR3을 갖는 중쇄의 빈도를 증가시키는 것이 유용할 것이다. 이론에 얽매이지 않고, 이를 달성하기 위한 한 가지 방법은 D_H 분절을 23-량체

RSS를 포함하도록 조작해서 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 재배열의 빈도를 증가시키고/시키거나 D_H 유전자 분절의 더 긴 J_H6 유전자 분절로의 재조합 빈도를 증가시키는 것이다. 마우스에서, D_H-J_H 결합은 두 가지 순서로 발생하는 것으로 여겨진다: (1) 근위 DQ52 분절(인간에서 D_H7-27 로 지칭됨)의 가장 가까운 J_H 분절 중 하나(J_H1 or J_H2)로의 일차 재배열. 그런 다음, DQ52 상류의 강력한 $\mu 0$ 프로모터는 나머지 J_H 분절(J_H3 및 J_H4)이 재조합 활성화 유전자(RAG)에 더 쉽게 접근 가능하게 할 수 있게 한다; (2) 원위 D_H 분절의 나머지 J_H 분절 중 하나(J_H3 또는 J_H4)로의 이차 재배열. 도 1, 상단 패널 참조. 이는 마우스(J_H3-J_H4)와 인간(J_H4-J_H6) 모두에서 관찰된 하류 J_H 분절들의 보다 빈번한 사용과 일치한다(Nitschke 등 2001 J. Immunol. 166:2540-52, 그 전문이 참조로서 본원에 포함됨). 이론에 얽매이지 않고, D_H7-27 및 J_H1-J_H3 (또는 J_H1-J_H5)을 5' 23-량체 RSS 및 3' 12-량체 RSS를 갖는 합성 D_H 유전자(예를 들어, 합성 D_H3-3 분절)로 대체하는 것이 높은 빈도의 $V_H(D_H-D_H)J_H$ 재조합을 초래할 것이라는 가설이 세워졌으며, 이는 3단계 메커니즘으로 발생할 수 있다: (1) J_H4 , J_H5 또는 J_H6 으로의 23- D_H-12 재배열로 23(D_H) J_H 수득, (2) 원위 D_H (D_H1-1 내지 D_H1-26)의 23(D_H) J_H 로의 재배열로 12(D_H-D_H) J_H 수득 (23(D_H) J_H 로의 V_H 재배열이 12/23 규칙에 의해 금지될 것임), (3) V_H 에서 12(D_H-D_H) J_H 로의 재배열로 면역 글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 VDDJ 코딩 서열 수득. 예를 들어, 도 1, 하단 패널을 참조한다. 또한 (긴 HCDR3 영역을 안정화하는 것으로 여겨지는 이황화 결합을 형성할 수 있는 2개의 시스테인을 암호화하는 31개 넘는 뉴클레오타이드를 포함하는) 긴 D_H 유전자 분절인 D_H2-2 , D_H2-8 및 D_H2-15 유전자 분절을 [예를 들어, Wang 등 2013 Cell 153:1379-93 참조; 본원에 그 전체가 참조로서 포함됨] 5' 말단 12-량체 RSS 및 3' 말단 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 유전자 분절로 각각 대체하면 3단계 메커니즘에 의해 발생할 수 있는 높은 빈도의 $V_H(D_H-D_H)J_H$ 재조합을 초래할 것이다: (1) J_H4 , J_H5 또는 J_H6 으로의 12: D_H-12 재배열로 12(D_H) J_H 수득, (2) 원위 12: $D_H2-2:23$, 12: $D_H2-8:23$ 또는 12: $D_H2-15:23$ 의 12(D_H) J_H 로의 재배열로 12(D_H-D_H) J_H 수득, (3) V_H 에서 12(D_H-D_H) J_H 로의 재배열로 면역 글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 VDDJ 코딩 서열 수득. 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역은 하나 이상의 D_H 분절에 인접한 5' 또는 3' 측부 위치에 23-량체 스페이서를 배치함으로써 구성되었고, 이에 의해 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위에서 D_H 내지 D_H 재조합이 가능하게 되었다.

[0182]

일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 기준 비-인간 동물과 비교하여 12/23 규칙을 따르지 않는 VDJ 재조합을 입증하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 야생형 D_H 분절과 비교하여 변형되는 하나 이상의 D_H 분절에 인접하거나 측부에 위치하는 하나 이상의 RSS를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 하나 이상의 D_H 유전자 분절은 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되어서 기준 비-인간 동물과 비교하여 비-인간 동물에서 D_H-D_H 재조합의 빈도가 증가된다. 재조합 효율 및/또는 빈도는, 일부 구현예에서, 항체 서열의 집단(예를 들어, 개체 또는 개체군 유래; 예를 들어 Arnaout, R. 외, 2011, PLoS One 6(8):e22365; Glanville, J. 외, 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108(50):20066-71 참조; 이들 각각은 그 전문이 참조로 본원에 포함됨)에서의 유전자 분절의 사용 빈도에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 본원에 설명된 비-인간 동물은, 일부 구현예에서, 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되거나 측부에 위치하는 하나 이상의 D_H 분절을 포함할 수 있어서 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 증가된 빈도로 D_H-D_H 재조합이 발생하도록 한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 3배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 4배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 5배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 10배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 20배 증가된 빈도의 D_H-D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H-D_H 재조합과 비교하여 적어도 30배 증

가된 빈도의 D_H - D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H - D_H 재조합과 비교하여 적어도 40배 증가된 빈도의 D_H - D_H 재조합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하는 설치류는 기준 비-인간 동물에서의 D_H - D_H 재조합과 비교하여 적어도 50배 증가된 빈도의 D_H - D_H 재조합을 나타낸다.

[0183] **제공된 생체 내 시스템**

[0184] 본 발명은 특정 항원이 낮은 그리고/또는 약한 면역원성과 연관되어 있으며, 따라서 항체 기반 치료제에 대해 약한 표적이라는 인식에 기초한다. 사실, 많은 질환 표적 (예를 들어, 바이러스, 채널 단백질)은 난치성이거나 약물로 다룰 수 없는 것으로 특징지어져 왔다. 따라서, 본 발명은 확립된 약물 발견 기술 및/또는 접근법과 연관된 결함을 극복하는 항체 및 항체 기반 치료제의 개발을 위한 **생체 내** 시스템의 형성을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 12량체- D_H -12량체 포맷에서 12량체- D_H -23량체 또는 23량체- D_H -12량체로 하나 이상의 D_H RSS가 변경, 변형 또는 조작되는 조작된 D_H 영역을 포함하는, 면역 글로불린 좌위, 특히 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위의 존재를 특징으로 하는 **생체 내** 시스템을 제공하며, 이에 의해 기준 **생체 내** 시스템에서 관찰된 D_H -대- D_H 재조합과 비교하여 증가된 빈도로 D_H -대- D_H 재조합을 가능하게 한다. 본 개시는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진 유전자이식 설치류의 구축을 구체적으로 입증하며, 조작된 D_H 영역은 증가된 빈도의 D_H - D_H 재조합을 허용하기 위해 하나 이상의 D_H 분절 각각에 대해 위치한 23-량체 RSS에 각각 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다. 본원에 설명된 방법은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 생성하기 위해 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 임의의 수의 D_H 분절 (예를 들어, 전통적 또는 합성)을 달성하기에 적합할 수 있다. 조작된 D_H 영역은, 일단 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 통합되면 (즉, V_H 및 J_H 유전자 분절 및/또는 하나 이상의 불변 영역과 작동가능하게 연결된 상태로 배치됨), 하나보다 많은 D_H 분절과 V_H 및 J_H 유전자 분절의 재조합을 제공해서, 예를 들어, 특정 항원에 결합을 지시하기 위해 다양성 (즉, 긴 CDR3, 예를 들어, 중쇄 CDR3 서열의 적어도 95%는 적어도 14개의 아미노산 길이임)이 추가된 중쇄를 특징으로 하는 항체를 생성하게 된다. 일부 구현예에서, 이러한 중쇄 가변 영역은 바이러스, 채널 단백질, GPCR 등에서 도달하기 어려운 에피토프에 접근할 수 있는 능력을 갖는다.

[0185] 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 본원에 제공된 데이터는, 일부 구현예에서, 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 분절의 포함을 특징으로 하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 좌위를 포함하는 게놈을 가진 설치류가 V(DD)J 재조합에 의해 생성된 항체를 효과적으로 생성한다는 것을 입증하는 것에 주목한다. 또한, 본원에 제공된 데이터는, 일부 구현예에서, 각각 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절의 포함을 특징으로 하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 좌위를 포함하는 게놈을 가진 설치류가 V(DD)J 재조합에 의해 생성된 항체를 효과적으로 생성한다는 것을 입증하는 것에 주목한다. 또한, 본원에서 주목하는 사실은 J_H6 유전자 분절의 상류에 있는 5개의 J_H 유전자 분절의 일부 또는 전부의 결실이 J_H6 유전자 분절에 우선적으로 재조합을 초래한다는 것이다. 특히, J_H6 유전자 분절은 각각 52, 53, 50, 40 및 51개의 뉴클레오티드를 포함하는, 63개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 다른 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 및 J_H5 유전자 분절보다 10개 더 많은 뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 본 개시내용은, 적어도 일부 구현예에서, 예를 들어, 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열, 예를 들어, $V_H D_H J_H$ 및 $V_H(D_H A-D_H B) J_H$, 예를 들어, $V_H(D_H A-D_H B) J_H6$, 적어도 20개 아미노산의 CDR3 길이, 예를 들어, 20-30개 아미노산 길이인 CDR3 길이를 갖는 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 서열을 생성하는 설치류를 제공함으로써, 난치성 질환 표적에 대한 항체 및/또는 항체 기반 치료제를 생성하기 위한 **생체 내** 시스템 개발을 포괄한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열, 예를 들어, $V_H D_H J_H$ 및 $V_H(D_H A-D_H B) J_H$ 유전자 서열의 적어도 8-10%는 적어도 21개 아미노산의 길이인 CDR3 영역을 암호화한다.

[0186] 일부 구현예에서, 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스가 본원에 기술되며, 이는 (1) 생식선 게놈 내, 예를 들어, 생식 세포 내에, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함하고, (2) 체세포 게놈 내, 예를 들어, B 세포 내에, 재배열된 중쇄 $V_H(D_H A-D_H B) J_H$ 코딩 서열을 포함하고, 여기서 상기 제1 또는 제2 D_H 유전자 분절(즉, 각각

$V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 D_HA 또는 D_HB)은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 또는 그 일부를 포함하고, 예를 들어, 여기서 상기 제1 또는 제2 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절과 정렬되는 적어도 9개의 연속 뉴클레오티드를 가지고, 여기서 상기 제1 및 제2 D_H 유전자 분절 각각은 임의의 중첩에 관계없이 상응하는 생식선 D_H 유전자 분절과 정렬되는 적어도 5개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.

[0187] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 생식선 구성으로 배열되고 비-인간 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 유전자, 인핸서 및 조절 영역에 작동가능하게 연결된 복수의 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 면역 글로불린 중쇄 좌위를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 비-인간 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 적어도 인간 V_H 유전자 분절 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 을 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 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_H5-18 , D_H6-19 , D_H1-20 , D_H2-21 , D_H3-22 , D_H6-25 및 D_H1-26 을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 D_H1-14 , D_H4-11 , D_H4-23 , D_H5-24 , 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 인간 D_H7-27 을 추가로 포함한다.

[0190] 일부 구현예에서, 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스가 본원에 기술되며, 이는 (1) 생식선 계능 내, 예를 들어, 생식 세포 내에, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함하고, (2) 체세포 계능 내, 예를 들어, B 세포 내에, 재배열된 중쇄 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열을 포함하고, 여기서 상기 제1 또는 제2 D_H 유전자 분절(즉, 각각 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 코딩 서열의 D_HA 또는 D_HB)은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절, 또는 그 일부를 포함하고, 예를 들어, 여기서 상기 제1 또는 제2 D_H 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절과 정렬되는 적어도 9개의 연속 뉴클레오티드를 가지고, 여기서 상기 제1 및 제2 D_H 유전자 분절 각각은 임의의 중첩에 관계없이 상응하는 생식선 D_H 유전자 분절과 정렬되는 적어도 5개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 2개의 시스테인 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 37개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 19개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 20개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 23개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 28개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 31개의 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 적어도 37개의 뉴클레오티드를 함유한다.

[0191] 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2 유전자 분절을 포함한다.

일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H4 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H5 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H7 유전자 분절을 포함한다.

[0192]

일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1-1 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-2 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-3 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H4-4 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H5-5 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H6-6 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1-7 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-8 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-9 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-10 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H5-12 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H6-13 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-15 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-16 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H4-17 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H5-18 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H6-19 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1-20 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H2-21 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H3-22 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H6-25 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1-26 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H1-14 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H4-11 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H4-23 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H5-24 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절은 인간 D_H7-27 유전자 분절을 포함한다.

[0193]

일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 재배열되지 않은 인간 게놈 가변 좌위에서 발견되는 순서로 일반적으로 배열된 인간 D_H 유전자 분절의 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리를 포함하고, 여기서 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 하나는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 D_H 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 하나는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 상응하는 D_H 유전자 분절로 대체되는데, 예를 들어, 야생형 D_H2-2 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 D_H2-2 유전자 분절로 대체된다. 일부

구현예에서, 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 하나는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 다른 D_H 유전자 분절로 대체되는데, 예를 들어, 야생형 D_H7-27 유전자 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 D_H3-3 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 게놈 가변 좌위에서 발견되는 순서로 일반적으로 배열된 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 D_H1-1 유전자 분절은 23-량체 RSS, 예를 들어, 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 상응하는 또는 다른 D_H 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 게놈 가변 좌위에서 발견되는 순서로 일반적으로 배열된 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 D_H1-1 , D_H2-2 , D_H2-8 , D_H2-15 , D_H2-21 유전자 분절(들) 또는 이들의 임의의 조합은 23-량체 RSS, 예를 들어 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 상응하는 또는 다른 D_H 유전자 분절로 대체된다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 게놈 가변 좌위에서 발견되는 순서로 일반적으로 배열된 전체 또는 실질적으로 전체 레퍼토리의 인간 D_H 유전자 분절 중 D_H2-2 , D_H2-8 및 D_H2-15 유전자 분절 각각은 23-량체 RSS, 예를 들어 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 조작된 상응하는 또는 다른 D_H 유전자 분절로 대체된다.

[0194] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 적어도 인간 J_H 유전자 분절 J_H6 을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 적어도 인간 J_H 유전자 분절 J_H4 , J_H5 및 J_H6 을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 인간 J_H 유전자 분절 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H5 및 J_H6 을 포함한다.

[0195] 일부 구현예에서, 비-인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역은, 예를 들어 면역글로불린 M (IgM), 면역글로불린 D (IgD), 면역글로불린 G (IgG), 면역글로불린 E (IgE) 및 면역글로불린 A (IgA)와 같은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 비-인간 면역글로불린 중쇄 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 비-인간 면역글로불린 중쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역)에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 중쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 중쇄 인헨서(또는 인헨서 서열) 및 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 중쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동가능하게 연결된다.

[0196] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 내인성 Adam6 유전자를 함유하지 않는다(또는 결여된다). 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 동일한 종의 야생형 비-인간 동물의 생식선 계놈에서 발견된 것과 동일한 생식선 계놈 위치에 내인성 Adam6 유전자(또는 Adam6 암호화 서열)를 함유하지 않거나 결여된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 인간 Adam6 위유전자를 함유하지 않거나 결여된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 비-인간(예를 들어, 설치류) Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 포함한다. 상기 삽입은 본원에 설명된 바와 같은 조작된 면역글로불린 중쇄 좌위의 외부(예를 들어, V_H 유전자 분절의 5' 최 상류)에 있거나, 조작된 면역글로불린 중쇄 좌위 내에 있거나, 비-인간 동물(예를 들어, 무작위로 도입된 비-인간 Adam6 암호화 서열), 세포 또는 조직의 생식선 계놈 내의 다른 곳에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 기능성 내인성 Adam6 위유전자를 함유하지 않거나 결여된다.

[0197] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_H 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 검출 가능하게 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_H 영역(예를 들어, V_H , D_H 및/또는 J_H)을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않거나(또는 결여되어 있거나, 이의 결실을 함유한다). 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 내인성 비-인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절의 전체적 또는 부분적 결실을 포함하는 생식선 계놈을 갖는다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 번식 능력이 있다.

[0198] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은, 생식선 구성으로 배열되고 비-인간 C_K 유전자의 상류에 삽입되고,

이에 작동가능하게 연결된 복수의 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 인간 면역글로불린 κ 경쇄 좌위의 근위 가변 클러스터(또는 근위 아암 또는 근위 복제)에서 나타나는 적어도 인간 V_K 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 적어도 인간 V_K 유전자 분절 V_{K2-40} , V_{K1-39} , V_{K1-33} , V_{K2-30} , V_{K2-8} , V_{K1-27} , V_{K2-24} , V_{K6-21} , V_{K3-20} , V_{K1-17} , V_{K1-16} , V_{K3-15} , V_{K1-12} , V_{K3-11} , V_{K1-9} , V_{K1-8} , V_{K1-6} , V_{K1-5} , V_{K5-2} 및 V_{K4-1} 을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 V_{K2-40} , V_{K1-39} , V_{K1-33} , V_{K2-30} , V_{K2-8} , V_{K1-27} , V_{K2-24} , V_{K6-21} , V_{K3-20} , V_{K1-17} , V_{K1-16} , V_{K3-15} , V_{K1-12} , V_{K3-11} , V_{K1-9} , V_{K1-8} , V_{K1-6} , V_{K1-5} , V_{K5-2} 및 V_{K4-1} 에서 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개 인간 V_K 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 인간 J_K 유전자 분절 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} 및 J_{K5} 를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} 및 J_{K5} 에서 선택된 적어도 1, 2, 3 또는 4개 인간 J_K 유전자 분절을 포함한다.

[0199] 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 κ 경쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역)에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 첫과 Ig_K 경쇄 인트론 인헨서 영역(Ig_K E_i 또는 E_{iK})에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 κ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 첫과 Ig_K 경쇄 3' 인헨서 영역(Ig_K 3' 또는 3'에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 첫과 E_{iK} 에 작동가능하게 연결되며 첫과 3'에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 κ 경쇄 인헨서(또는 인헨서 서열 또는 인헨서 영역) 및 하나 이상의 비-인간 면역글로불린 κ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 야생형 면역글로불린 κ 경쇄 좌위에서 나타나는 것과 동일한 비-인간 면역글로불린 κ 경쇄 인헨서 영역(또는 인헨서 서열)을 함유한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 상이한 종(예를 들어, 상이한 설치류 종)의 야생형 면역글로불린 κ 경쇄 좌위에서 나타나는 비-인간 Ig_K 경쇄 인헨서 영역(또는 인헨서 서열)을 함유한다.

[0200] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위는 인간 V_{preB} 유전자(또는 인간 V_{preB} 유전자 암호화 서열)를 함유하지 않는다(즉, 결여된다).

[0201] 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위의 비-인간 C_K 유전자는, 예를 들어 마우스 C_K 유전자 또는 랫트 C_K 유전자와 같은, 설치류 C_K 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 κ 경쇄 좌위의 비-인간 C_K 유전자는 129 계통, BALB/c 계통, C57BL/6 계통, 혼합된 129xC57BL/6 계통 또는 이들의 조합을 포함하는 유전적 배경 유래의 마우스 C_K 유전자이거나 이를 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_K 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 검출 가능하게 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_K 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않거나(또는 결여되어 있거나, 이의 결실을 함유한다). 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 전체적으로 또는 부분적으로 내인성 비-인간 V_K 및 J_K 유전자 분절의 결실을 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.

[0203] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 야생형 또는 불활성화된(예를 들어, 유전자 표적화에 의함) 면역글로불린 λ 경쇄 좌위를 추가로 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_λ 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 검출 가능하게 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비-인간 V_λ 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않거나(또는 결여되어 있거나, 이의 결실을 함유한다). 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 전체적으로 또는 부분적으로 내인성 비-인간 V_λ 및 J_λ 유전자 분절의 결실을 포함하는 생식선 계놈을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 제공된 비-인간 동물, 비-인간 세포 또는 비-인간 조직은 전체적으로 또는 부분적으로 내인성 비-인간 V_λ , J_λ 및 C_λ 유전자 분

질의 결실을 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.

[0205] 이러한 조작된 면역글로불린 좌위를 보유하는 표적화 벡터, 비-인간 세포 및 동물의 생성을 위한 지침은 미국 특허 제8,642,835호, 제8,697,940호, 제9,006,511호, 제9,012,717호, 제9,029,628호, 제9,035,128호, 제9,066,502호, 제9,150,662호 및 제9,163,092호에서 찾을 수 있으며, 이들은 그 전문이 본원에 참고로 인용된다. 당업자는 비-인간(예를 들어, 포유동물) 계놈의 이러한 유전자 공학 및/또는 조작을 달성하거나, 비-인간 동물의 생식선 계놈 내로의 도입을 위해 이러한 서열을 달리 제작하거나, 제공하거나, 제조하기 위한, 당업계에 공지된 다양한 기술을 알고 있다.

[0206] DNA 작제물

[0207] 전형적으로, 본원에 설명된 면역글로불린 유전자 분절, 특히 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 함유하는 폴리뉴클레오티드 분자는 적절한 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드 분자를 복제하기 위해 벡터, 바람직하게는 DNA 벡터 내로 삽입된다.

[0208] 그들의 크기로 인해, D_H 분절은 상업적 공급자로부터 입수 가능한 계놈 공급원으로부터 직접 클로닝되거나 GenBank로부터 이용 가능한 공개된 서열에 기초하여 *인 실리코(in silico)* 설계될 수 있다. 대안적으로, 박테리아 인공 염색체 (BAC) 라이브러리가 면역글로불린 서열을 제공할 수 있다. BAC 라이브러리는 100-150kb의 평균 삽입체 크기를 함유하고, 300kb 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, 인간 및 마우스 유전자 BAC 라이브러리가 구축되었고 상업적으로 이용 가능하다(예를 들어, Invitrogen, Carlsbad Calif.) 계놈 BAC 라이브러리는 면역글로불린 서열의 공급원으로서 뿐만 아니라 전사 조절 영역로서의 역할을 할 수도 있다.

[0209] 대안적으로, 면역글로불린 서열은 효모 인공 염색체(YAC)로부터 단리되고, 클로닝되고/되거나 전이될 수 있다. 전체 면역글로불린 좌위 또는 이의 실질적인 부분은 하나 또는 몇 개의 YAC 내에 클로닝되고 함유될 수 있다. 다수의 YAC가 사용되고 중첩된 상동성의 영역을 포함하는 경우, 이들은 효모 숙주 균주 내에서 재조합되어 전체 좌위를 나타내는 단일 작제물을 생성할 수 있다. 당 업계에 공지된 방법 및/또는 본원에 설명된 방법에 의해 작제물을 배아 줄기 세포 또는 배아에 도입하는 것을 돕기 위해, 레트로피팅(retrofitting)에 의해 포유류 선택 카세트에 YAC 아암을 추가로 변형시킬 수 있다.

[0210] DNA 작제물은 당업계에 공지된 방법을 사용해 제작될 수 있다. 예를 들어, DNA 작제물은 더 큰 플라스미드의 일부분으로서 제작될 수 있다. 이러한 제작을 통해 당업계에 공지된 바와 같은 효율적인 방식으로 정확한 작제물의 클로닝 및 선택이 가능하다. 본원에 설명된 바와 같은 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 함유하는 DNA 단편은, 원하는 동물로의 통합을 위해 이들이 잔여 플라스미드로부터 쉽게 단리될 수 있도록 플라스미드 상의 편리한 제한 부위(restriction sites) 사이에 위치될 수 있다.

[0211] 일부 구현예에서, 플라스미드의 제작과 숙주 유기체의 형질전환에 사용된 방법은 당업계에 공지되어 있다. 원핵 세포 및 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 일반적인 재조합 절차에 관해서는, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989을 참조한다; 그 전문은 본원에 참조로서 통합됨.

[0212] 비-인간 동물의 생산

[0213] 비-인간 동물의 계놈 내의 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내에 D_H-대-D_H 재조합을 허용하는 하나 이상의 D_H 분절에 인접한 23-량체 RSS의 통합으로부터 생성되는 긴 아미노산 길이를 특징으로 하는 중쇄 CDR3 다양성을 갖는 항체를 발현하는 비-인간 동물이 제공된다. 본원에 설명된 적절한 실시예들은 설치류, 특히, 마우스를 포함한다. 하나 이상의 D_H 분절은, 많은 구현예에서, 이중 D_H 분절(예를 들어, 인간 D_H 분절)을 포함한다. 야생형 또는 기준 비-인간 동물과 비교하여 증가된 빈도로 D_H-D_H 재조합이 가능한 상기 D_H 분절을 함유하는 비-인간 동물, 비-인간 배아, 및 세포를 제조하기 위한 비-인간 동물, 배아, 세포 및 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0214] 일부 구현예에서, 하나 이상의 D_H 분절은 비-인간 동물의 계놈 내의 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 다양성 클러스터(즉, D_H 영역) 내에서 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 인접하도록 (또는 작동가능하게 연결되도록) 변형된다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 D_H 영역(또는 그의 부분)은 결실되지 않는다 (즉, 온전하다).

일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 D_H 영역(또는 그의 부분)은 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절로 변경, 파괴, 결실, 조작 또는 대체된다. 일부 구현예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 D_H 영역은 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 합성 D_H 분절로 대체되며; 일부 특정 구현예에서, 하나 또는 이상의 종래의 D_H 유전자 분절은 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 D_H 영역에서 결실되거나 대체되지 않는다. 일부 구현예에서, D_H 영역은 전통적인 D_H 분절(각각 5' 12-량체 RSS 및 3' 12-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절) 및 조작된 D_H 유전자 분절(각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절) 모두를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 D_H 영역은 합성 D_H 영역이다. 일부 구현예에서, D_H 영역은 인간 D_H 영역이다. 일부 구현예에서, D_H 영역은 쥐와 D_H 영역이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 조작된 D_H 영역 (또는 그의 부분)은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내로 삽입되어서 상기 조작된 D_H 영역 (또는 그의 부분)은 하나 이상의 V_H 유전자 분절 및/또는 하나 이상의 J_H 유전자 분절과 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 D_H 영역은 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 2개의 사본 중 하나 내로 삽입되어서 상기 조작된 D_H 영역에 대해 이형접합성인 비-인간 동물을 생성한다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역에 대해 동형접합성인 비-인간 동물이 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역에 대해 이형접합성인 비-인간 동물이 제공된다.

[0215] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 게놈 내에서 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 함유하는 D_H 영역을 포함하는 무작위로 통합된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 함유한다. 따라서, 그러한 비-인간 동물은 조작된 D_H 영역을 함유하는 인간 면역글로불린 중쇄 이식유전자(transgene)를 갖는 것으로 기술될 수 있다. 조작된 D_H 영역은, 예를 들어, PCR, 웨스턴 블랏, 서던 블랏, 제한 단편 길이 다형성(RFLP), 또는 대립형질의 획득(GOA) 또는 대립형질의 소실(LOA) 검정을 포함하는 다양한 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역에 대하여 이형접합성이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역에 대하여 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역에 대하여 반접합성이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 본원에 설명된 조작된 D_H 영역의 하나 이상의 사본을 함유한다.

[0216] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 5' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 적어도 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 3' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 적어도 하나의 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 5' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 적어도 인간 D_H3-3 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 3' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 적어도 인간 D_H2 분절을 포함하고, 여기서 인간 D_H2 분절은 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 , 인간 D_H2-15 및 인간 D_H2-21 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0217] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 각각 5' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 하나보다 많은 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 각각 3' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 하나보다 많은 D_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물의 조작된 D_H 영역은 각각 3' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 인간 D_H2-2 , 인간 D_H2-8 , 및 인간 D_H2-15 분절을 포함한다.

[0218] 조작된 D_H 영역이 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS와 연관되는(또는 작동가능하게 연결된) 하나 이상의 D_H 분절을 포함하는, 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진 비-인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공되며, 이는 하나 이상의 비-인간 중쇄 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 V_H 및 J_H 유전자 분절을 함유하는 면역글로불린 중쇄 좌위로부터의 하나보다 많은 D_H 분절에 의해 암

호화된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 발현하는 비-인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 인헨서(들) 및/또는 내인성 조절 서열(들)의 제어 하에 이러한 항체(들)를 발현하는 비-인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 이중 인헨서(들) 및/또는 이중 조절 서열(들)의 제어 하에 이러한 항체(들)를 발현하는 비-인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 방법은 야생형 D_H 분절과 비교하여 증가된 빈도로 D_H - D_H 재조합을 허용하는 하나 이상의 D_H 분절 및 다른 서열을, 비-인간 동물의 게놈에 삽입하여, $V(DD)J$ 재조합으로부터 생성된 면역글로불린 중쇄를 포함하는 항체가 발현되도록 하는 단계를 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 J_H 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 5' 23-량체 RSS 및 3' 12-량체 RSS를 갖는 D_H 유전자 분절을 포함하는 DNA를 삽입하는 단계를 포함한다. 본원에 설명된 바와 같이, D_H 유전자 분절은 m0 프로모터 서열의 하류에 위치한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 동안 상기 J_H 유전자 분절이 RAG 유전자(예를 들어, RAG-1 및/또는 RAG-2)에 접근할 수 있도록 m0 프로모터 서열에 상대적인 위치에 5' 23-량체 RSS 및 3' 12-량체 RSS를 갖는 D_H 분절을 삽입하는 단계를 포함한다. 전술한 D_H 분절 및 측부 RSS를 포함하는 유전 물질은 비-인간 동물의 게놈 내로 삽입될 수 있고, 이에 의해 인접하는 D_H 유전자 분절 및 V_H 및 J_H 유전자 분절과의 재조합을 허용하기 위해 상기 D_H 분절 및 필요한 RSS를 함유하는 조작된 D_H 영역을 갖는 비-인간 동물을 생성할 수 있다.

[0220] 일부 구현예에서, 방법은 6개의 J_H 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 5' 12-량체 RSS 및 3' 23-량체 RSS와 각각 연관된 3개의 D_H 유전자 분절을 포함하는 DNA를 삽입하는 단계를 포함한다. 본원에 설명된 바와 같이, D_H 유전자 분절은 각각 5' 및 3' 12-량체 RSS와 연관된 복수의 D_H 유전자 분절 사이에 위치된다. 일부 구현예에서, 방법은 다양성 클러스터 내에 각각 5' 12-량체 RSS 및 3' 23-량체 RSS와 연관된 D_H 2-2, D_H 2-8 및 D_H 2-15 유전자 분절을 전통적인 또는 야생형 RSS와 각각 연관된 복수의 다른 D_H 유전자 분절과 함께 삽입하는 단계를 포함한다. 전술한 D_H 유전자 분절 및 측부 RSS를 포함하는 유전 물질은 비-인간 동물의 게놈 내로 삽입될 수 있고, 이에 의해 인접하는 D_H 유전자 분절 및 V_H 및 J_H 유전자 분절과의 재조합을 허용하기 위해 상기 D_H 분절 및 필요한 RSS를 함유하는 조작된 D_H 영역을 갖는 비-인간 동물을 생성할 수 있다.

[0221] 적절한 경우, D_H 분절에 상응하는(또는 암호화하는) 서열은 비-인간 동물에서의 발현에 최적화된 코돈을 포함하도록 변형될 수 있다(예를 들어, 미국특허 제5,670,356호 및 제5,874,304호 참조; 이들 각각은 그 전문이 참조로서 포함됨). 코돈 최적화된 서열은 합성 서열이고, 바람직하게는 코돈 최적화되지 않은 모 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 동일한 폴리펩티드(또는 전장 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 활성을 갖는 전장 폴리펩티드의 생물학적으로 활성인 단편)를 암호화한다. 일부 구현예에서, D_H 분절에 상응하는(또는 암호화하는) 서열은 특정 세포 유형(예를 들어, 설치류 세포)에 대한 코돈 사용을 최적화하도록 변경된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-인간 동물(예를 들어, 설치류)의 게놈 내에 삽입될 D_H 분절에 상응하는 서열의 코돈은 비-인간 동물의 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 이러한 서열은 코돈 최적화 서열로서 기술될 수 있다.

[0222] 상기 D_H 분절이 V_H 및 J_H 유전자 분절(예를 들어, 복수의 V_H 및 J_H 유전자 분절)에 작동가능하게 연결되도록 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 분절을 D_H 영역 내로 삽입하는 것은 게놈의 비교적 최소한의 변형을 이용하고 더 긴 아미노산 길이를 갖는 CDR3을 특징으로 하는 중쇄를 포함하는 항체의 발현을 초래한다.

[0223] 유전자이식 비-인간 동물을 생성하는 방법으로서, 녹아웃(knockouts)과 녹-인(knock-ins)을 포함하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000) 참조; 그 전문이 참조로서 포함됨). 예를 들어, 유전자이식 설치류를 생성하는 것은, 하나 이상의 내인성 설치류 유전자(또는 유전자 분절)의 유전자 좌위를 파괴하는 것 및 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 설치류 게놈 내에 도입하는 것, 일부 구현예에서, 내인성 설치류 유전자(또는 유전자 분절)와 동일한 위치에 도입하는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절은 설치류의 게놈에서 무작위로 삽입된 면역글로불린 중쇄 좌위의 D_H 영역 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절은

설치류의 게놈 내의 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위의 D_H 영역 내로 도입되고; 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위는, 하나 이상의 불변 영역 유전자 (예, 인간 또는 쥐과)에 작동가능하게 연결된 인간 유전자 분절(예를 들어, V 및/또는 J)을 함유하도록 변경, 변형 또는 조작된다.

[0224] 조작된 다양성 클러스터(즉, D_H 영역)를 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가진 설치류를 생성하기 위해, 조작된 D_H 영역을 구축하고 설치류 배아 줄기(ES) 세포 내로의 통합을 위한 대표적인 표적화 벡터의 개략도(축척에 비례하지 않음)가 도 2에 제공되며, 다양성 클러스터는 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다. 설치류 ES 세포의 게놈 내의 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 이러한 벡터를 삽입하기 위한 예시적인 전략 및 방법이 도 3 내지 도 8에 제공된다. 도 2 내지 도 8 각각에서, NOTI 제한 효소 인식 부위가 적절하다고 표시되며, 다양한 프라이머/프로브 세트(표 4 참조)의 명칭 및 대략적인 위치(작은 대시)가 도시된 다양한 대립유전자에 대해 표시되고(축척에 비례하지 않음), 달리 언급되지 않는 한, 개방 기호 및 선은 인간 서열을 나타내는 반면, 폐쇄 기호 및 어두운 선은 마우스 서열을 나타낸다. 다음 약어들이 각각의 도면에 대해 사용된다, spec: 스펙티노마이신 내성 유전자; neo: 네오마이신 내성 유전자; hyg: 히그로마이신 내성 유전자; lp: *loxP* 부위-특이적 재조합 인식 부위; Ei: 쥐과 중쇄 인트론 인핸서; IgM: 쥐과 면역글로불린 M 불변 영역 유전자; L: *loxP* 부위 서열; Frt: 플립파아제 인식 표적 서열; m0 pro: m0 프로모터 서열.

[0225] 도 2에 도시된 바와 같이, 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나의 D_H 분절(도 2, 상단 및 중간) 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절(도 2, 하단)을 갖는 복수의 D_H 분절을 함유하는 DNA 단편은 VELOCIGENE® 기술(예를 들어, 미국특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 등, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조; 그 전문이 참조로서 본원에 포함됨)을 이용하여 제조된다. **도 2에서**, 달리 언급되지 않는 한, 개방 기호 및 선은 인간 서열을 나타내는 반면, 폐쇄 기호 및 어두운 선은 마우스 서열을 나타낸다. 존재하는 경우, 인간 V_H61, D_H2-2, D_H2-8, D_H2-15, D_H3-3, and J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5 및 J_H6 유전자 분절들의 축척에 비례하지 않는 상대적 위치가 도시되고, 명명되지 않은 나머지 임의의 유전자 분절은 D_H 유전자 분절이다. 일반적으로, 해시 마크로 도시된 바와 같은 D_H 영역은 재배열되지 않은 인간 D_H 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하며 (참조, 예를 들어, www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGH; 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨), 다음과 같은 예외를 가지고 있다: 상단 2개의 표적화 벡터는 마지막 D_H7-27 유전자가 결여되어 있으며, 이는 5' 말단 23-량체 RSS 및 3' 말단 12-량체 RSS가 측부에 위치한 D_H3-3 유전자 분절을 포함하는 서열로 대체되고 (개방 화살표로 도시됨); 하단 표적화 벡터는 재배열되지 않은 인간 D_H2-2 유전자 분절, 인간 D_H2-8 유전자 분절, 및 D_H2-15 유전자 분절이 결여되어 있으며, 이는 각각 5' 말단 12-량체 RSS 및 3' 말단 23-량체 RSS가 측부에 위치한 D_H2-2 유전자 분절, 5' 말단 12-량체 RSS 및 3' 말단 23-량체 RSS가 측부에 위치한 D_H2-8 유전자 분절, 및 5' 말단 12-량체 RSS 및 3' 말단 23-량체 RSS가 측부에 위치한 D_H2-15 유전자 분절로 대체된다 (이들 각각의 조작된 D_H2-2, D_H2-8 및 D_H2-15 유전자 분절은 개방 화살표로서 도시되어 있다). 채워지지 않은 수직 직사각형은 12:D_H22:23|12:D_H28:23|12:D_H2-15:23 표적화 벡터에 배치된 서열 프라이머 및 프로브와 상동인 고유한 인공 40-량체의 위치들을 나타내어 표적화 벡터/ES 세포의 정확한 변형을 보장하는 데 도움을 준다. "1", "2", "10", "16", "8", 및 "18"로 표시된 고유한 인공 40-량체에 대한 서열은 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 및 서열번호 78로서 각각 제시된다.

[0226] DNA 단편들은 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위 내로의 정확한 표적화된 삽입을 위해 상동 아암과 조립된다(도 3, 도 5, 도 7). 부위 특이적 재조합 인식 부위(예를 들어, *loxP*)가 측부에 위치하는 선별 카세트(예를 들어, 네오마이신)는 ES 세포 클론에서 적절한 삽입의 스크리닝을 용이하게 하기 위해 표적화 벡터에 포함되며, 양성 ES 세포 클론에서 재조합효소(예를 들어, Cre)의 일시적 발현에 의해 제거될 수 있다(도 4, 도 6, 도 8). DNA 단편들은 면역글로불린 중쇄 좌위에 통합된 후 중쇄 가변 영역의 적절한 조립(즉, 재조합), 전사 및 발현에 필요한 서열을 포함한다. 표적화 벡터는 조작된 D_H 영역이 인간 V_H 게놈 DNA가 5' 측부에, 인간 J_H 게놈 DNA 그리고 비-인간 (예를 들면, 설치류) 게놈 중쇄 불변 영역 DNA (예를 들면, 인트론 인핸서 및 IgM 불변 영역 유전자)가 3' 측부에 있도록 설계된다. 비-인간 세포(예를 들면, 설치류 배아 줄기 세포)의 게놈에 통합하기 위한

최종 표적화 벡터는 V_H 게놈 DNA (예를 들어, 하나 이상의 V_H 유전자 분절 함유), 조작된 D_H 영역, 3' J_H 게놈 DNA, 비-인간 (예 : 설치류) 게놈 중쇄 불변 영역 DNA를 함유하고 있으며, 이들 모두는 일단 비-인간 동물의 게놈에 통합되었다면 V_H 유전자 분절들, 조작된 D_H 영역 및 J_H 유전자 분절 사이의 재조합을 허용하도록 작동가능하게 연결되어 있다. 일단 조립되면, 표적화 벡터는 선형화되고 설치류 ES 세포 내로 전기천공된다.

[0227] 표적화 벡터가 설치류 (예를 들어, 마우스) 배아 줄기 세포 내로 도입되어서 표적화 벡터에 포함된 서열(즉, 조작된 D_H 영역)은 비-인간 세포 또는 비-인간 동물(예를 들어, 마우스)로 하여금 삽입된 하나보다 많은 D_H 분절에 의해 암호화되는 아미노산을 갖는 CDR3를 포함하는 항체를 발현하는 능력을 야기한다.

[0228] 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역이 설치류 게놈의 면역글로불린 중쇄 좌위(예를 들어, 인간 가변 영역 유전자 분절을 포함하도록 조작된 면역글로불린 중쇄 좌위로서, 이는 그렇게 조작된 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위일 수 있음)에 도입된, 유전자이식 설치류가 생성된다.

[0229] 인간 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 좌위는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제5,633,425호; 제5,770,429호; 제5,814,318호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6,150,584호; 제6,998,514호; 제7,795,494호; 제7,910,798호; 제8,232,449호; 제8,502,018호; 제8,697,940호; 제8,703,485호; 제8,754,287호; 제8,791,323호; 제8,809,051호; 제8,907,157호; 제9,035,128호; 제9,145,588호; 제9,206,263호; 제9,447,177호; 제9,551,124호; 제9,580,491호 및 제9,475,559호(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 뿐만 아니라 미국 특허 공개 제20100146647호, 제20110195454호, 제20130167256호, 제20130219535호, 제20130326647호, 제20130096287호 및 제2015/0113668호(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 및 PCT 공개 번호 W02007117410, W02008151081, W02009157771, W02010039900, W02011004192, W02011123708 및 W02014093908(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에서 확인할 수 있다.

[0230] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 비-인간 동물은, 조작된 D_H 영역을 포함하는 외인적으로 도입된 완전한 인간 면역글로불린 이식유전자를 포함하는데, 상기 이식 유전자는 마우스 내의 전구체 B 세포에 재배열될 수 있다(Alt 등, 1985, Immunoglobulin genes in transgenic mice, Trends Genet 1:231-236 참조; 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 이들 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 완전한 인간 면역글로불린 이식유전자는 (무작위로) 삽입될 수 있고, 내인성 면역글로불린 유전자가 또한 녹아들 수도 있으며(Green 등, 1994, Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs, Nat Genet 7:13-21; Lonberg 등, 1994, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, Nature 368:856-859; Jakobovits 등, 2007, From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice, Nat Biotechnol 25:1134-1143 참조; 이들 간행물 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨), 예를 들어, 여기서 내인성 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 좌위는, 예를 들어, 각 내인성 좌위의 작지만 중요한 부분의 표적화 결실에 이어 무작위로 통합된 큰 이식유전자 또는 소염색체로서 인간 면역글로불린 좌위를 도입함으로써 불활성화된다(Tomizuka 등, 2000, Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, PNAS USA 97:722-727 참조; 그 전체가 참조로서 통합됨).

[0231] 일부 구현예에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위에 각각 위치한다. 자손을 생성하는 마우스의 능력을 유지하면서 마우스 생식선 면역글로불린 가변 좌위를 인간 생식선 면역글로불린 가변 좌위와 대규모로 인 시튜 유전자 치환하는 방법이 이전에 기술된 적이 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,596,541호 및 제8,697,940호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 구체적으로, 마우스 불변 영역은 온전하게 남기면서 마우스 중쇄 및 κ 경쇄 면역글로불린 가변 좌위 둘 다의 6메가염을 이의 인간 상대와 정밀하게 치환하는 것이 기술되어 있다. 그 결과, 마우스 불변 영역은 유지하면서, 동등한 인간 생식선 면역글로불린 가변 서열과 마우스의 전체 생식선 면역글로불린 가변 레퍼토리가 정확하게 치환된 마우스가 생성되었다. 인간 가변 영역은 마우스 불변 영역에 연결되어 생리학적으로 적절한 수준으로 재배열되고 발현되는 키메라 인간-마우스 면역글로불린 좌위를 형성한다. 발현된 항체는 "역 키메라"이고, 인간 가변 영역 서열 및 마우스 불변 영역 서열을 포함한다. 인간 또는 인간화 가변 영역을 갖는 항체를 발현하는 인간화 면역글로불린 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 이들 마우스는 VELOCIMMUNE® 마우스라 불린다.

- [0232] VELOCIMMUNE® 인간화 마우스는 야생형 마우스와는 본질적으로 구별 불가능한 완전한 기능성 체액 면역 시스템을 나타낸다. 이들은 B 세포 발달의 모든 단계에서 정상 세포 모집단을 나타낸다. 이들은 정상적인 림프 기관 형태를 나타낸다. VELOCIMMUNE® 마우스의 항체 서열은 정상적인 V(D)J 재배열 및 정상적인 체세포 과돌연변이 빈도를 나타낸다. 이러한 마우스의 항체 모집단은 정상 클래스 스위칭(예를 들어, 정상 이소형 시스-스위칭)으로 인한 이소형 분포를 반영한다. VELOCIMMUNE® 마우스를 면역화하면, 후보 치료제로서 사용하기에 적합한 인간 면역글로불린 가변 도메인을 갖는 크고 다양한 항체 레퍼토리를 생성하는 강력한 체액 면역 반응이 생성된다. 이러한 플랫폼은 약학적으로 허용 가능한 항체 및 다른 항원 결합 단백질을 제조하기 위한 자연적으로 친화도 성숙된 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 풍부한 공급원을 제공한다. 또한, 인간 V_H 유전자 분절과 단일 내인성 V_H 유전자 분절의 치환조차도 인간화 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 면역 반응을 생성할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, Tien 등 (2016) Cell 166:1471-84를 참조하며; 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 이는, VELOCIMMUNE® 마우스의 제조를 가능하게 하는 역 키메라 방식으로 내인성 비-인간 불변 영역 유전자 서열(들)과 인간 면역글로불린 가변 서열이 작동가능하게 연결되도록, 마우스 면역글로불린 가변 서열을 인간 면역글로불린 가변 서열과 정확하게 치환하는 것이다.
- [0233] 역 키메라 방식으로 변형된 마우스에는, 내인성 면역글로불린 좌위에서, 내인성 불변 영역에 작동가능하게 연결된 인간(화) 가변 영역(예를 들어, (D), J 및 하나 이상의 인간 V 유전자 분절을 포함함)을 포함하도록 변형된 마우스가 포함되며, 예를 들어,
- [0234] (a) 내인성 중쇄 좌위에서:
- [0235] (i) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (여기서, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 복수의 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 영역 V_H 유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간인 재배열되지 않은 인간 V_H 유전자 분절), 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절을 포함하고,
- [0236] 임의로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 D_H 유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간 D_H 유전자 분절) 및/또는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절임(예를 들어, 완전한 기능성 인간 J_H 유전자 분절임));
- [0237] (ii) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열된 인간(화) 중쇄 가변 영역 (여기서, 제한된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절과 작동가능하게 연결된 하나의 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 영역 V_H 유전자 분절로 이루어지고; 임의로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절은 각각 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 D_H 유전자 분절 및/또는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 분절임);
- [0238] (iii) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역 (여기서, 히스티딘 변형된 인간(화) 중쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열을 포함함); 또는
- [0239] (iv) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 단독 면역글로불린 암호화 서열 (여기서, 내인성 중쇄 불변 영역은 (1) 경쇄와 결합되는 IgM 이소형을 암호화하는 온전한 내인성 IgM 유전자 및 (2) 기능성 CH1 도메인을 암호화하는 서열이 결합된 비-IgM 유전자, 예를 들어, IgG 유전자를 포함하고; 비-IgM 유전자는 경쇄 불변 영역과 공유 결합될 수 있는 CH1 도메인이 결합된 비-IgM 이소형을 암호화함);
- [0240] 및/또는

- [0241] (b) 내인성 경쇄 좌위에서:
- [0242] (i) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (여기서, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 복수의 재배열되지 않은 인간 경쇄 가변 영역 V_L 유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간인 재배열되지 않은 인간 V_L 유전자 분절) 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 J_L 유전자 분절을 포함하고,
- [0243] 임의로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 J_L 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 경쇄 J_L 유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간 J_{HL} 유전자 분절)이고,
- [0244] 임의로, 내인성 면역글로불린 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 경쇄 카파 (κ) 좌위고, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 인간 가변 κ (V_κ) 및 결합 κ (J_κ) 유전자 분절이고, 내인성 경쇄 불변 영역은 내인성 κ 사슬 불변 영역 서열이고/이거나; 내인성 면역글로불린 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 경쇄 람다(λ)이고, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 인간 가변 λ (V_λ) 및 결합 λ (J_λ) 유전자 분절을 포함하고, 내인성 경쇄 불변 영역은 내인성 λ 사슬 불변 영역 서열이고; 임의로, 내인성 면역글로불린 경쇄 λ 좌위는 (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 면역글로불린 경쇄 불변 (C_λ) 유전자 분절에 작동가능하게 연결되며; 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 좌위는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E_λ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E_λ)를 포함하고, 임의로는 3개의 인간 E_λ 를 포함함);
- [0245] (ii) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 공통 경쇄 암호화 서열 (여기서, 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역 서열은 면역글로불린 경쇄 J_L 유전자 분절과 재배열된 인간 경쇄 가변 영역 V_L 을 포함함);
- [0246] (iii) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역 (여기서, 제한된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 결합(J_L) 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 2개 이하의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 경쇄 가변(V_L) 유전자 분절을 포함함);
- [0247] (iv) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역 (여기서, 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화) 경쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함함); 또는
- [0248] (v) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역 (여기서, 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열된 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함함)을 포함하는 마우스로서,
- [0249] 임의로, 마우스는
- [0250] (i) 마우스가 비-인간 동물의 야생형 생식능력을 나타내도록 기능성 ADAM6 좌위를 포함하는 인간(화) 면역글로불린 중쇄 좌위; 및/또는
- [0251] (ii) 임의로, 재배열된 가변 영역 유전자의 적어도 10%가 비템플릿 첨가를 포함하도록 항원 수용체의 다양성을 증가시키기 위해 외인성 말단 테옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라아제(TdT) 유전자를 추가로 포함하는 마우스가, 이전에 기술되었다. 예를 들어, 미국 특허 제8,697,940호; 제8,754,287호; 제9,204,624호; 제9,334,334호; 제9,801,362호; 제9,332,742호; 및 제9,516,868호; 미국 특허 공개 20110195454, 20120021409, 20120192300, 20130045492; 20150289489; 20180125043; 20180244804; PCT 공개 번호 W02019/113065, W02017210586 및 W02011163314; Lee 등 (2014) *Nature Biotechnology* 32:356을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0252] 일부 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 계놈, 예를 들어, 생식선 계놈을 갖는 유전적으로 변형된 비-인간 동물을 포함한다:

- [0253] 인간 V_H 유전자 분절, 본 발명의 인간 조작된 D_H 유전자 분절, 및 인간 J_H 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하되, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 불변 영역에 작동가능하게 연결되는, 내인성 면역글로불린 좌위, 및/또는
- [0254] 인간 V_L 유전자 분절 및 인간 J_L 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하되, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 불변 영역에 작동가능하게 연결되는, 내인성 사슬 좌위.
- [0255] 일부 구현예에서, 비-인간 동물, 예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류는, 인간 또는 인간화 MHC를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 추가하여 그의 게놈에서, 하나 이상의 인간 V_H , D_H , 및 J_H 분절과 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위에 있는 하나 이상의 내인성 V_H , D_H , 및 J_H 분절의 치환을 포함하되, 하나 이상의 인간 V_H , D_H , 및 J_H 분절은 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 인간 D_H 유전자 분절을 포함하고 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자에 작동가능하게 연결되고; 임의로, 재배열되지 않았거나 재배열된 인간 V_L 및 인간 J_L 분절은 예를 들어, 내인성 비-인간 경쇄 좌위에서, 비-인간(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류) 또는 인간 면역글로불린 경쇄 불변(C_L) 영역 유전자에 작동가능하게 연결된다.
- [0256] 특정 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 그의 게놈(예를 들어, 생식선 게놈)에서, 조작된 D_H 영역을 포함하는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역 및 면역글로불린 불변 영역 유전자를 포함하는 면역글로불린 불변 영역을 함유하는 (외인성 또는 내인성) 면역글로불린 좌위를 또한 포함하며, 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 면역글로불린 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된다.
- [0257] 일반적으로, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 면역글로불린 불변 영역에 작동가능하게 연결된 (면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는) 면역글로불린 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 중쇄 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된, 조작된 D_H 영역을 포함하는, 하나 이상의 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 κ 사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역 κ 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 κ 사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역 λ 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 λ 사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역 λ 유전자 분절을 포함한다.
- [0258] 특정 구현예에서, 비-인간 동물은 내인성 중쇄 좌위에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 조작된 D_H 영역을 포함하는 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하되, 면역글로불린 가변 영역은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 Ig 중쇄 가변 영역 유전자 분절을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 Ig 가변 영역 유전자 분절은 적어도 하나의 인간 면역글로불린 중쇄 가변 (V_H) 분절, 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 다양성 (D_H) 분절(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 D_H 분절), 및 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 결합 (J_H) 분절(임의로 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 J_H 분절)을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 Ig 가변 영역 유전자 분절은 복수의 재배열되지 않은 인간 V_H 분절, 하나 이상의 재배열되지 않은 (인간) D_H 분절(예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 재배열되지 않은 (인간) D_H 분절) 및 하나 이상의 재배열되지 않은 (인간) J_H 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 Ig 가변 영역 유전자 분절은 적어도 3개의 V_H 유전자 분절, 적어도 18개의 V_H 유전자 분절, 적어도 20개의 V_H 유전자 분절, 적어도 30개의 V_H 유전자 분절, 적어도 40개의 V_H 유전자 분절, 적어도 50개의 V_H 유전자 분절, 적어도 60개의 V_H 유전자 분절, 적어도 70개의 V_H 유전자 분절 또는 적어도 80개의 V_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 Ig 유전자 분절은 모든 기능성 인간 D_H 유전자 분절을 포함하고, 여기서 기능성 인간 D_H 유전자 분절 중 적어도 하나는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 변형된다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 Ig 유전자 분절은 모든 기능성 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. Ig 중쇄 유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, Macdonald 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 및 supplemental information에 제공되어 있으며, 상기 문헌은

그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0259] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물은 내인성 중쇄 좌위에서, 적어도 비-인간 IgM 유전자를 포함하는 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역을 포함하되, 제한된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역은 하나의 인간 V_H 유전자 분절, 복수의 D_H 유전자 분절 (예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 재배열되지 않은 (인간) D_H 분절을 포함하는, 인간 D_H 유전자 분절) 및 복수의 J_H 유전자 분절 (예를 들어, 인간 J_H 유전자 분절)을 특징으로 하며, 제한된 면역글로불린 중쇄 좌위는 재배열이 가능하고 복수의 구별되는 재배열을 형성할 수 있으며, 각각의 재배열은 하나의 인간 V_H 유전자 분절, D_H 분절 중 하나 및 J_H 분절 중 하나로부터 유래되고, 각각의 재배열은 상이한 중쇄 가변 도메인을 암호화한다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20130096287호에 기술된 바와 같고, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 하나의 인간 V_H 유전자 분절은 V_H1-2 또는 V_H1-69 이다.

[0260] 특정 구현예에서, 비-인간 동물은 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 내인성 경쇄 좌위에 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열되지 않은 인간 Ig κ 가변 영역 유전자 분절을 함유한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 가변 영역은 복수의 재배열되지 않은 인간 V_K 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 J_K 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간 J_K 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 4개의 기능성 V_K 분절 및 모든 인간 J_K 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 16개의 기능성 V_K 분절 및 모든 인간 J_K 분절(예를 들어, 모든 기능성 인간 V_K 분절 및 J_K 분절)을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간 V_K 분절 및 모든 인간 J_K 분절을 포함한다. Ig κ 유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, Macdonald 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 및 supplemental information에 제공되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0261] 일부 구현예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열되지 않은 인간(화) 경쇄 가변 영역은, 재배열되지 않은 인간(화) 경쇄 가변 영역이 2개 이하의 인간 V_L 유전자 분절 및 복수의 J_L 유전자 분절 (예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 제9,796,788호에 기술된 것과 같은 이중 경쇄 마우스, 또는 DLC)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, V_L 유전자 분절은 V_K 유전자 분절이다. 일부 구현예에서, V_L 유전자 분절은 V_λ 유전자 분절이다. 일부 구현예에서, V_K 유전자 분절은 IGKV3-20 및 IGKV1-39이다. 일부 구현예에서, 비-인간 동물은 마우스이 내인성 κ 경쇄 좌위에서 마우스 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 정확히 2개의 재배열되지 않은 인간 V_K 유전자 분절 및 5개의 재배열되지 않은 인간 J_K 유전자 분절을 포함하되, 임의로 2개의 재배열되지 않은 인간 V_K 유전자 분절은 인간 V_K1-39 유전자 분절 및 인간 V_K3-20 유전자 분절이고, 5개의 재배열되지 않은 인간 J_K 유전자 분절은 인간 J_K1 유전자 분절, 인간 J_K2 유전자 분절, 인간 J_K3 유전자 분절, 인간 J_K4 유전자 분절, 및 인간 J_K5 유전자 분절이고, 재배열되지 않은 인간 카파 경쇄 유전자 분절은 재배열되어 항체의 인간 가변 도메인을 암호화할 수 있으며, 추가로, 비-인간 동물은 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 형성하기 위해 재배열될 수 있는 내인성 내인성 V_K 유전자 분절을 포함하지 않는다.

[0262] 일부 구현예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열되지 않은 인간 Ig λ 가변 영역 유전자 분절을 함유한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 복수의 인간 V_λ 분절 및 하나 이상의 인간 J_λ 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 하나 이상의 인간 V_λ 분절 및 하나 이상의 인간 J_λ 분절 및 하나 이상의 인간 C_λ 불변 영역 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간 V_λ 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간 J_λ 분절을 포함한다. Ig λ 유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, 미국 특허 제9,035,128호 및 제6,998,514호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 (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 내인성 (예를 들어, 설치류) C_λ 유전자 분절에 작동가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 좌위는 하나 이상

의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함하고, 임의로는 3개의 인간 $E\lambda$ 를 포함한다.

[0263] 특정 구현예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은, 비-인간 동물이 내인성 κ 불변 도메인과 융합된 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절로부터 유래된 인간 λ 가변 도메인 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하도록, 내인성(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류) $C\kappa$ 유전자에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간 $Ig\lambda$ 가변 영역 유전자 분절을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제9,226,484호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨).

[0264] 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간 면역 글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자간 서열(intergenic sequence)을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 가변 영역은 비-인간(예를 들어, 설치류, 랫트, 마우스) Ig 가변 영역 유전자간 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자간 서열은 내인성 중 기원이다.

[0265] 일부 구현예에서, 면역글로불린 가변 영역은 재배열된 경쇄 가변 영역(범용 경쇄 가변 영역)이다. 일부 구현예에서, 재배열된 Ig 경쇄 가변 영역 유전자는 인간 재배열된 Ig 경쇄 가변 영역 유전자이다. 예시적인 재배열된 Ig 경쇄 가변 영역은, 예를 들어, 미국 특허 제9,969,814호; 제10,130,181호, 및 제10,143,186호 및 미국 특허 공개 제20120021409호, 제20120192300호, 제20130045492호, 제20130185821호, 제20130302836호, 및 제20150313193호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 범용 경쇄 가변 영역을 포함하는 비-인간 유기체("범용 경쇄"유기체)는 이중특이적 항체를 생산하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 공통 경쇄 암호화 서열은 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 하나의 재배열된 인간 면역 글로불린 경쇄 $V\kappa/J\kappa$ 서열을 포함하되, 하나의 재배열된 인간 면역 글로불린 경쇄 $V\kappa/J\kappa$ 서열은 (i) 인간 $J\kappa 5$ 유전자 분절에 융합된 인간 $V\kappa 1-39$ 유전자 분절을 포함하는 인간 $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ 서열이거나, (ii) 인간 $J\kappa 1$ 유전자 분절에 융합된 인간 $V\kappa 3-20$ 유전자 분절을 포함하는 인간 $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ 서열이다.

[0266] 일부 구현예에서, 면역글로불린 가변 영역은 이러한 비-인간 유기체에서 생성된 항체에 pH 의존적 결합 특성을 도입하도록 설계된 히스티딘 코돈의 삽입 및/또는 치환을 포함하는 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역이다. 일부 이러한 구현예에서, 히스티딘 코돈은 CDR3을 암호화하는 핵산 서열에 삽입되고/되거나 치환된다. 다양한 이러한 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 좌위는 미국 특허 제9,301,510호; 제 9,334,334호; 및 제 9,801,362호 및 미국 특허 출원 공개 제20140013456호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역은, 인간 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 분절 서열을 포함하는 하나의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하되, 임의로 $V\kappa$ 분절 서열은 인간 $V\kappa 1-39$ 또는 $V\kappa 3-20$ 유전자 분절로부터 유래되며, 임의로 하나의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 (IMGT 넘버링에 따른) 105, 106, 107, 108, 109, 111 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 발견되는 히스티딘 코돈과 $V\kappa$ 분절 서열의 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화) 중쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 (예를 들어, 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되도록 변형된 (인간) D_H 유전자 분절에) 포함하는, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 재배열되지 않은 인간(화) 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 재배열되지 않은 인간 V_H , 재배열되지 않은 인간 D_H 또는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절을 포함하는 합성 D_H , 및 재배열되지 않은 인간 J_H 유전자 분절을 포함하되, 임의로 재배열되지 않은 인간 D_H 또는 합성 D_H 유전자 분절 또는 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 D_H 유전자 분절은 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 대한 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화) 경쇄 가변 영역은 재배열되지 않은 V_L 및 재배열되지 않은 J_L 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화) 경쇄 가변 영역은 2개 이하의 재배열되지 않은 인간 V_L (예를 들어, 2개 이하의 $V\kappa$ 유전자 분절) 및 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 J_L (예를 들어, $J\kappa$) 유전자 분절(들)을 포함하되, 2개 이하의 인간 V_L 유전자 분절 각각은 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 및 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 CDR3 암호화 서열에 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이하의 인간 $V\kappa$ 유전자 분절은 인간 $V\kappa 1-39$ 및 $V\kappa 3-20$ 유전자 분절이고, 이들 각각은 히스티딘 코돈과 비히스티딘

코돈의 하나 이상의 치환을 포함하되, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 재배열될 수 있고, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 (IGMT 넘버링에 따른) 105, 106, 107, 108, 109, 111로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 하나 이상의 히스티딘을 포함하는 인간 경쇄 가변 도메인을 암호화하며, 하나 이상의 히스티딘은 하나 이상의 치환으로부터 유래된다.

[0267] 일부 구현예에서, 면역 글로불린 불변 영역은 중쇄 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 인간 중쇄 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 내인성 중 기원이다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 마우스 불변 영역 유전자이거나 랫트 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 불변 영역 유전자는 인간 서열과 비-인간 서열의 혼합물이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 불변 영역 유전자는 인간 CH1 영역 및 비-인간(예를 들어, 내인성 중 기원, 마우스, 랫트) CH2 및/또는 CH3 영역을 암호화한다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 C_μ , C_δ , C_γ ($C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 4}$), C_α 또는 C_ϵ 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 불변 영역 유전자는 내인성 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 불변 영역 유전자는, 비-인간 동물이 중쇄 단독 항체를 발현하도록 돌연변이된 CH1 영역을 암호화한다(예를 들어, 미국 특허 제8,754,287호, 미국 특허 출원 공개 제2015/0289489호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 예를 들어, (범용 또는 이중 경쇄 유기체에서) 이중 특이적 항체를 만들기 위한 중쇄를 생성하는 것이 목표인 일부 구현예에서, 중쇄의 Fc 도메인은 중쇄 이중이량체 형성을 용이하게 하고/하거나 중쇄 동중이량체 형성을 억제하기 위한 변형을 포함한다. 이러한 변형은, 예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호; 제5,807,706호; 제5,821,333호; 제7,642,228호 및 제8,679,785호, 및 미국 특허 공개 제2013/0195849호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본문에 통합된다.

[0268] 일부 구현예에서, 면역 글로불린 불변 영역은 경쇄 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 κ 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 λ 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 내인성 중 기원이다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 마우스 불변 영역 유전자이거나 랫트 불변 영역 유전자이다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 인간 서열과 비-인간 서열의 혼합물이다.

[0269] 일부 구현예에서, 가변 영역 유전자 분절이 작동가능하게 연결된 면역글로불린 불변 영역 유전자 및 인간 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역은 내인성 면역글로불린 좌위에 위치한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성 중쇄 좌위이다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성 κ 좌위이다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성 λ 좌위이다. 일부 구현예에서, 인간 가변 영역 유전자 분절이 작동가능하게 연결된 불변 영역 유전자는 내인성 불변 영역 유전자이다.

[0270] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물의 게놈 내의 하나 이상의 내인성 면역글로불린 좌위 또는 하나 이상의 내인성 좌위의 일부분(예를 들어, 가변 영역 및/또는 불변 영역)은 불활성화된다. 내인성 면역글로불린 가변 영역 좌위 및 이의 일부분은, 유기체의 게놈으로부터 좌위 또는 이의 일부분을 결실시키는 것, 상이한 핵산 서열과 좌위 또는 이의 일부분을 치환하는 것, 비-인간 유기체의 게놈 내 또 다른 위치로 유전자 또는 이의 일부분을 역위 또는 변위시키는 것을 포함하되 이들로 한정되지 않는, 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용해 불활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, 좌위의 불활성화는 단지 부분적 불활성화이다. 일부 구현예에서, 좌위의 가변 영역은 불활성화되지만 불변 영역은 (예를 들어, 불변 영역이 비내인성 가변 영역 유전자 분절에 작동가능하게 연결되어 있기 때문에) 기능적인 상태로 유지된다.

[0271] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위 또는 이의 일부는 내인성 중쇄 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 중쇄 좌위의 가변 영역의 적어도 일부는 가변 영역의 J 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위 또는 이의 일부는 내인성 중쇄 좌위의 내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 중쇄 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의 O_μ 유전자를 포함한다.

[0272] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린 κ 사슬 좌위를 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 κ 사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성 κ 사슬 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 κ 사슬 좌위의 가변 영역의 적어도 일부는 가변 영역의 J 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 κ 사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성 κ 사슬 좌위의

내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 κ 사슬 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의 C_{κ} 유전자를 포함한다.

[0273] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린 λ 사슬 좌위를 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성 λ 사슬 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 내인성 λ 사슬 좌위 내의 적어도 하나의 V-J-C 유전자 클러스터의 적어도 일부는 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위된다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성 λ 사슬 좌위의 내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 λ 사슬 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의 C 유전자를 포함한다.

[0274] 다양한 구현예에서, 면역글로불린 좌위의 변형은 비-인간 동물의 생식능력에 영향을 미치지 않는다. 일부 구현예에서, 중쇄 좌위는 기능성 유전자, 예를 들어, 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다를 포함하고, 유전적 변형은 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물의 게놈은 이소적으로(ectopically) 위치된 기능성 유전자, 예를 들어 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 외인성 ADAM6a 및/또는 ADAM6b를 발현하는 예시적인 비-인간 동물은 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0275] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 항원 수용체 다양성을 증가시키기 위해 외인성 말단 테옥시티뉴클레오티드 트랜스퍼라아제(TdT)를 추가로 포함하고 이를 발현한다. 외인성 TdT를 발현하는 예시적인 비-인간 동물은 PCT 공개 WO 2017210586에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0276] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물의 게놈은 하나 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄 유전자 (예를 들면, 미국특허 번호 8,502,018; 미국특허 번호 8,642,835; 미국특허 번호 8,697,940; 미국특허 번호 8,791,323; 및 미국특허출원 공개 번호 2013/0096287 A1 및 2018/0125043 A1; 및 PCT 공개 번호 WO2019/113065 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 대안적으로, 조작된 D_H 영역은 예를 들면, VELOCIMMUNE® 균주 같은 다른 변형된 균주의 배아 줄기 세포에 도입될 수 있다 (예를 들면, 미국특허 번호 8,502,018 또는 미국특허 번호 8,642,835 참조; 그 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터를 변형 균주로부터의 세포에 도입하여 제작될 수 있다. 일 실시예를 제공하기 위해, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터는 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에 기술된 바와 같이 비-인간 동물에 도입될 수 있으며; 상기 특허는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되며, 상기 비-인간 동물은 완전히 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 항체를 발현한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 인간 면역 글로불린 유전자(가변 및/또는 불변 영역 유전자)를 추가로 포함하도록 제작된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은, 본원에 설명된 바와 같은, 조작된 D_H 영역, 및 이중 중 (예, 인간) 유래의 유전 물질을 포함하고, 여기서 유전 물질은 전체적으로 또는 부분적으로, 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화한다.

[0277] 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 종종 비-인간 동물의 의도된 용도에 따라 추가적인 인간 또는 인간화 유전자를 포함하도록 전술한 바와 같이 또는 당업계에 공지된 방법을 사용해 제조될 수 있다. 이러한 추가적 인간 또는 인간화 유전자의 유전 물질은 전술한 바와 같이 유전자 변형된 세포(예를 들어, 배아 줄기 세포)의 게놈의 추가적 변형을 통해, 또는 원하는 대로 유전자 변형된 다른 계통을 이용한 당업계에 공지된 번식 기술을 통해 도입될 수 있다.

[0278] 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이, 조작된 D_H 영역을 포함하는 비-인간 동물의 게놈은 (예를 들면, 이중 교배 또는 다수 유전자 표적화 전략을 통해) 미국특허 출원공개 번호 2011-0195454 A1, 2012-0021409 A1, 2012-0192300 A1, 2013-0045492 A1, 2013-0185821 A1, 2013-0198880 A1, 2013-0302836 A1, 2015-0059009 A1; 국제 특허 출원공개 번호 WO 2011/097603, WO 2012/148873, WO 2013/134263, WO 2013/184761, WO 2014/160179, WO 2014/160202에 설명된 하나 이상의 변형을 더 포함하며; 이들 모두 그들 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0279] 유전자이식 파운더(transgenic founder) 비-인간 동물은 그의 게놈 내에 조작된 D_H 영역의 존재 및/또는 비-인간 동물의 조직이나 세포 내에서의 D_H - D_H 재조합에 기인하는 아미노산을 함유하는 CDR3 영역을 포함하는 항체의

발현에 기초하여 식별될 수 있다. 이어서, 유전자이식 파운더 비-인간 동물은 조작된 D_H 영역을 가진 추가 비-인간 동물을 교배시켜, 조작된 D_H 영역의 하나 이상의 카피를 각각 갖는 일련의 비-인간 동물을 생성하는데 사용될 수 있다. 또한, 조작된 D_H 영역을 갖는 유전자이식 비-인간 동물은 원하는대로 다른 이식 유전자(예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자)를 갖는 유전자이식 비-인간 동물과 추가로 교배시킬 수 있다.

[0280] 유전자이식 비-인간 동물은 이식유전자의 발현을 조절하거나 유도할 수 있는 선택된 시스템을 함유하도록 생산될 수도 있다. 예시적인 시스템은 박테리오파지 P1의 Cre/loxP 재조합효소 시스템(예를 들어, Lakso, M. 등의 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 및 S. 세레비시아의 FLT/Frt 재조합효소 시스템(O' S. 등의 1991, Science 251:1351-1355; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 포함한다. 이러한 동물은, 예를 들어, 두 마리의 유전자이식 동물, 즉 선택된 변형(예를 들어, 조작된 D_H 영역)을 포함하는 이식유전자를 함유하는 하나의 유전자이식 동물과 재조합효소(예를 들어, Cre 재조합효소)를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 다른 하나의 유전자이식 동물의 교배에 의해 "이중" 유전자이식 동물을 구성함으로써 제공될 수 있다.

[0281] 마우스 (즉, 전부 하나 이상의 쥐과 중쇄 불변 영역 유전자와 작동가능하게 연결되어 있는, 인간 V_H 및 J_H 유전자 분절과 작동가능하게 연결된 조작된 D_H 영역을 가진 마우스)에서 조작된 D_H 영역을 사용하는 구현예들이 본원에서 광범위하게 논의되었지만, 조작된 D_H 영역을 포함하는 다른 비-인간 동물 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 비-인간 동물은 내인성 V_H 및 J_H 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 조작된 D_H 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 비-인간 동물은 인간화 V_H 및 J_H 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 조작된 D_H 영역을 포함한다. 이러한 비-인간 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 야생형 면역글로불린 중쇄 좌위와 비교하여 증가된 빈도로 D_H - D_H 재조합에서 기인하는 아미노산을 포함하는 CDR3을 갖는 항체를 발현하도록 유전자 변형될 수 있는 임의의 동물을 포함한다. 예를 들어, 적합하게 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 구할 수 없는 비-인간 동물의 경우, 유전자 변형을 포함하여 비-인간 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.

[0282] 비-인간 동물 계능(예를 들어, 돼지, 젖소, 설치류, 닭 등)을 변형하는 방법은, 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성인자 유사 작동자 뉴클레아제(TALEN), 또는 Cas 단백질(즉, CRISPR/Cas 시스템)을 채용하여 본원에 설명된 조작된 D_H 영역을 포함하도록 계능을 변형시키는 단계를 포함한다. 비-인간 동물의 생식선 계능을 변형하는 방법에 대한 안내는, 예를 들어, 미국특허 출원공개 번호 2015-0376628 A1, US 2016-0145646 A1 및 US 2016-0177339 A1에서 찾을 수 있으며; 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0283] 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 예를 들어, 뛰는 쥐상과(Dipodoidea 또는 Muroidea) 아목의 작은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전적으로 개질된 동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 마우스, 랫트 및 햄스터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 쥐상과 아목으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전적으로 변형된 동물은 칼로미스쿠스과(Calomyscidae)(예를 들어, 마우스 유사 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예를 들어, 햄스터, 뉴 월드 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)(예를 들어, 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예를 들어, 두더쥐, 대나무쥐, 및 동북)로부터 선택된 과(family)로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 유전자 변형된 설치류는 진짜 마우스 또는 랫트(쥐상과), 사막쥐(gerbil), 가시쥐(spiny mouse), 갈기쥐(crested rat)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 쥐상과의 구성원으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 마우스와 랫트로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 마우스이다.

- [0284] 일부 구현예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/Ola로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 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 균주로 이루어진 균으로부터 선택되는 129 균주이다(예를 들어, Festing 등, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. 등, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조; 그 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 전술한 129 균주 및 전술한 C57BL/6 균주의 혼합체이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 전술한 129 균주들의 혼합체, 또는 전술한 BL/6 균주들의 혼합체이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 혼합체의 129 균주는 129S6(129/SvEvTac) 균주이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 BALB 균주, 예를 들어 BALB/c 균주이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 BALB 균주 및 전술한 다른 균주의 혼합체이다.
- [0285] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 랫트이다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 랫트는 위스타 랫트(Wistar rat), LEA 균주, 스프래그 다울리(Sprague Dawley) 균주, 피셔(Fischer) 균주, F344, F6, 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 랫트 균주는 위스타, LEA, 스프래그 다울리, 피셔, F344, F6, 및 아크 아구티로 이루어지는 균으로부터 선택된 2 가지 이상 균주의 혼합체이다.
- [0286] **방법**
- [0287] 항체-기반 치료제의 생산을 위한 여러가지 *시험관 내* 및 *생체 내* 기술이 개발되었다. 특히, *생체 내* 기술은 동물의 계놈에 무작위로 포함시키거나 (예를 들어, 미국특허 번호 5,569,825 참조, 그 전문이 본원에 참조로 인용됨) 동물의 내인성 면역글로불린 불변 영역과 작동가능하게 연결하여 내인성 면역글로불린 좌위에 정확히 위치시킨 (미국특허 번호 8,502,018; 8,642,835; 8,697,940; 및 8,791,323 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 인용됨) 인간 면역글로불린 유전자를 함유하는 유전자이식 동물 (즉, 설치류)의 생산을 특징으로 하고 있다. 두 가지 접근법 모두 인간에 사용하기 위한 유망한 항체 치료제 후보물질들을 생산하는데 생산성이 있었다. 또한, 두 가지 접근법 모두 *생체 내*에서 생성된 항체 레퍼토리에서 항체 후보물질들을 선택한다는 점에서 *시험관 내* 접근법에 비해 장점이 있으며, 숙주의 면역계의 내부 환경 내에서 항원에 대한 친화성 및 특이성을 선별하는 것을 포함한다. 이런 식으로, 항체는 *시험관 내* 기술을 동반할 수 있는 인공 환경 또는 *인 실리코* 예측보다는 (관련 생물학적 에피토프와 표면 내에서) 자연적으로 제시된 항원에 결합한다. *생체 내* 기술로부터 생산된 강력한 항체 레퍼토리에도 불구하고, 복합체 (예, 바이러스, 채널 폴리펩티드) 또는 세포질 항원에 대한 항체는 여전히 어려움이 있다. 또한, 종 (예, 인간 및 마우스) 간에 고도의 서열 동일성을 공유하는 폴리펩티드에 대한 항체를 생성하는 것은 면역 내성으로 인해 도전과제로 남아 있다.
- [0288] 따라서, 본 발명은, 무엇보다도, 비-전통적 유전자 분절 재배열(즉, D_H 내지 D_H 재조합)로부터 생성된, CDR, 특히 CDR3에서 다양성이 부가된 항체의 생산을 특징으로 하는 *생체 내* 시스템의 구축이 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 사용하여 이루어질 수 있다는 인식에 기초한다. 5' 또는 3' 23-량체 RSS를 가짐으로써, D_H 분절들 사이의 재조합은 이러한 조작된 D_H 유전자 분절이 결여된 면역글로불린 중쇄 좌위와 비교하여 증가된다. 이와 같은 부가된 다양성은 특정 항원 (예를 들어, 바이러스, 채널 폴리펩티드)에 대한 결합을 지시할 수 있다. V_H 유전자 분절, 적어도 2개의 D_H 유전자 분절, 및 J_H 유전자 분절의 재조합 시, D_H -대- D_H 재조합으로부터 생성된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 함유하는 중쇄 가변 영역 코딩 서열이 형성된다. 또한, D_H 에서 D_H 로의 재조합으로 인한 이러한 CDR3은 아미노산 길이 증가로 인한 부가된 다양성을 포함한다. 또한, 이러한 CDR3 영역은 전통적인 VDJ 재조합에 의해 생성된 항체에 의해 달리 결합될 수 없는 특정 항원(또는 에피토프)에 대한 결합을 지시하는 능력을 갖는다.
- [0289] 제공된 비-인간 동물은 인간 항체를 제작하기 위해 사용될 수 있으며, 이때 인간 항체는 본원에 설명된 비-인간 동물의 세포의 유전 물질에 의해 암호화된 하나 이상의 가변 영역 핵산 서열로부터 유래된 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 제공된 비-인간 동물은, 비-인간 동물이 상기 관심 항원에 대한 면역 반응을 나타내는 데 충분한 시간 및 조건 하에서, 관심 항원(예를 들어, 전체적으로 또는 부분적으로, 바이러스, 채널 폴리펩티드)으로 면역화된다. 항체는 비-인간 동물 (예를 들어, 하나 이상의 B 세포 같은, 하나 이상의 세포)로부터 단리되고, 예를 들어 친화성, 특이성, 에피토프 맵핑, 리간드-수용체 상호 작용을 차단하는 능력, 억제 수용체

활성화 등 같은, 다양한 분석 측정을 이용하여 특징지어진다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체는 비-인간 동물로부터 단리된 하나 이상의 인간 가변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 유래된 하나 이상의 인간 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-약물 항체 (예, 항-개별특이형(anti-idiotypic) 항체) 는 제공된 비-인간 동물에서 증가될 수 있다.

[0290] 본원에 설명된 비-인간 동물은 다양한 분석에 유용한 인간 항체를 생산하는 생물학적 물질(예, 세포)의 공급원 및 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 바이러스를 표적화하고 그리고/또는 다른 결합 파트너 (예, 세포 표면 수용체)와의 바이러스 상호작용을 조절하는 치료제를 개발하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 이온 채널을 표적화하고 그리고/또는 이온 채널 활성을 조절하고 그리고/또는 다른 결합 파트너와의 이온 채널 상호작용을 조절하는 치료제를 개발하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 바이러스, 채널 또는 G-단백질-결합 수용체(GPCR) 폴리펩티드에 결합하는 후보 치료제(예를 들어, 항체, siRNA 등)를 식별, 스크리닝 및/또는 개발하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 바이러스 폴리펩티드, 하나 이상의 인간 채널 폴리펩티드 또는 하나 이상의 인간 GPCR 폴리펩티드의 활성을 차단하는 후보 치료제(예를 들어, 항체, siRNA 등)를 스크리닝하고 개발하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 인간 GPCR의, 또는 하나 이상의 인간 채널 폴리펩티드의 길항제 및/또는 작용제의 결합 프로파일을 결정하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 인간 GPCR 폴리펩티드를 결합하거나 하나 이상의 인간 폴리펩티드를 결합하는 하나 이상의 후보 치료제 항체의 에피토프 또는 에피토프들을 결정하는데 사용된다.

[0291] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 항체의 약동학적 프로파일을 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제공된 비-인간 동물 및 하나 이상의 대조군 또는 기준 비-인간 동물은 하나 이상의 후보 치료제 항체에 다양한 용량에서(예를 들어, 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/kg, 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, 문맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척수내, 척추강내, 뇌실내, 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 예를 들어, 정맥내 수액 백을 사용하는, 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 단리된다. 총 IgG, 항치료 항체 반응, 응집 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 검정이 본원에 설명된 비-인간 동물로부터 수득한 샘플을 사용하여 투여된 후보 치료용 항체의 약동학적 프로파일을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0292] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 표적 항원의 활성을 차단하거나 조절하는 치료 효과 및 세포 변화의 결과로서 유전자 발현에 대한 효과를 측정하거나, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물의 세포의 (세포 표면 수용체의 경우) 표적 항원의 밀도를 측정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물 또는 이로부터 단리된 세포는 관심 항원에 결합하는 후보 치료제에 노출되고, 후속 기간 후에, 표적 항원-의존적 과정(또는 상호작용), 예를 들어, 리간드-수용체 상호작용 또는 항원 관련 신호전달에 대한 영향에 대해 분석된다.

[0293] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 채널 활성 (또는 채널 신호전달, 또는 채널-매개 상호작용, 또는 채널 활동 전위)의 차단 또는 조절에 대한 치료 효과 및 세포 변화의 결과로서의 유전자 발현 또는 본원에 설명된 비-인간 동물의 세포의 채널 밀도에 대한 효과를 측정하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물 또는 그로부터 단리된 세포는 인간 채널 폴리펩티드 (또는 이의 부분)를 결합하는 후보 치료제에 노출되고, 후속 기간 후에, 채널-의존적 과정 (또는 상호작용), 예를 들어, 리간드-수용체 상호작용 또는 채널 활동 전위에 대한 효과에 대해 분석된다.

[0294] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물이 항체를 발현하며, 이에 따라 세포, 세포주, 및 세포 배양물이 생성되어 결합 및 기능 검정, 특히 길항제 또는 작용제가 인간 폴리펩티드 서열 또는 에피토프에 대해 특이적이거나, 대안적으로, 리간드 수용체 상호작용(결합)에서 기능하는 인간 폴리펩티드 서열 또는 에피토프에 대해 특이적인 경우, 예를 들어, 길항제 또는 작용제의 결합 또는 기능에 대한 검정에 사용하기 위한 항체 공급원으로서의 역할을 한다. 일부 구현예에서, 후보 치료 항체 또는 siRNA에 결합된 에피토프는 제공된 비-인간 동물로부터 단리된 세포를 사용해 결정될 수 있다.

- [0295] 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물 유래의 세포는 필요에 따라 단리되어 사용될 수 있거나, 많은 세대 동안 배양물 내에 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물 유래의 세포는 (예를 들어, 바이러스의 사용을 통해) 불멸화되고, 배양물 내에서 (예를 들어, 계대 배양물 내에서) 무기한으로 유지된다.
- [0296] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 인간 표적 항원에 결합하는 항체 변이체의 생성을 위한 *생체 내* 시스템을 제공한다. 그러한 변이체는 2개 이상의 인간 표적 항원에 의해 공유되는 공통 에피토프에 대한 원하는 기능성, 특이성, 낮은 교차-반응성을 갖는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물은 원하는 또는 개선된 기능성에 대해 스크리닝되는 일련의 항체 변이체를 생성하기 위해 항체 패널을 생성하는데 사용된다.
- [0297] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 항체 라이브러리를 생성하기 위한 *생체 내* 시스템을 제공한다. 그러한 라이브러리는 원하는 작용기 기능에 기초하여 상이한 Fc 영역 상에 그래프트되고/되거나 당 기술분야에 공지된 기술 (예, 부위-특이적 돌연변이 유발, 에러 유발(error-prone) PCR 등)을 사용하여 가변 영역 서열의 진화도 성숙을 위한 소스로서 사용될 수 있는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에 대한 소스를 제공한다.
- [0298] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 약물 또는 백신의 분석 및 시험을 위한 *생체 내* 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 후보 약물 또는 백신이 하나 이상의 제공된 비-인간 동물에 전달된 다음, 약물 또는 백신에 대한 한 가지 이상의 면역 반응, 약물 또는 백신의 안전성 프로파일, 또는 질환 또는 병태에 대한 효과 및/또는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 알아내기 위해 비-인간 동물의 모니터링이 이어질 수 있다. 안전성 프로파일을 결정하기 위해 사용되는 예시적인 방법은 약물 또는 백신의 독성, 최적 용량 농도, 항체 (즉, 항-약물) 반응, 효능, 및 가능한 위험 인자의 측정을 포함한다. 이러한 약물 또는 백신은 이러한 비-인간 동물에서 개선되고/되거나 개발될 수 있다.
- [0299] 백신 효능은 여러 가지 방식으로 결정될 수 있다. 간단히 말하면, 본원에 설명된 비-인간 동물은 당 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 백신 접종이 실시된 다음, 백신으로 시험 접종하거나 이미 감염된 비-인간 동물에게 백신을 투여한다. 백신에 대한 비-인간 동물(들)의 반응은, 비-인간 동물(들) (또는 그로부터 단리된 세포)을 모니터링 하고/하거나 백신의 효능을 알아내기 위한 하나 이상의 검정을 수행함으로써 측정할 수 있다. 그리고 나서 백신에 대한 비-인간 동물(들)의 반응은 당 기술분야에 공지된 및/또는 본원에 설명된 하나 이상의 방법을 사용하여 대조군 동물과 비교된다.
- [0300] 백신 효능은 바이러스 중화 분석에 의해 추가로 알아낼 수 있다. 간단히 말하면, 본원에 설명된 비-인간 동물을 면역화하고, 면역화 이후의 다양한 일차에 혈청을 채집한다. 혈청의 순차 희석액을 바이러스와 함께 사전 배양하는데, 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 중화시키는 경우, 대조군과 비교해 플라크가 더 적거나 상대 루시퍼라제 단위가 더 낮다.
- [0301] 본원에 설명된 비-인간 동물은 암 및/또는 염증성 질환에 사용하기 위한 항체 기반 치료제의 개발 및 특징화를 위한 개선된 *생체 내* 시스템을 제공한다. 염증은 오랫동안 암과 관련되어 왔다 (예를 들어, Grivennikov, S.I. 외, 2010, Cell 140:883-99; Rakoff-Nahoum, S., 2006, Yale J. Biol. Med. 79:123-30에서 검토되며, 이들 각각은 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨). 사실, 개발중인 종양 환경은 부분적으로는, 다양한 염증 매개체의 침윤을 특징으로 한다. 또한 지속적인 염증은 암 발병 확률을 높일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 항암 및/또는 항염증 치료제의 개발 및/또는 동정을 위한 *생체 내* 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 제공된 비-인간 동물 또는 대조군 비-인간 동물 (예를 들어, 본원에 설명된 것과 다른 유전자 변형을 갖는 것, 또는 유전자 변형이 없는 것, 즉, 야생형)에 종양 (또는 종양 세포)을 이식한 다음, 하나 이상의 후보 치료제를 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 후보물질 치료제는 다중특이적 항체 (예, 이중특이적 항체) 또는 항체 카테일을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 후보물질 치료제는 예를 들어 순차적으로 또는 동시에 투약되는 2종 이상의 단일특이적 항체의 투여와 같은, 병용 요법을 포함한다. 종양은 하나 이상의 후보물질 치료제를 투여하기 전에 비-인간 동물 내에서 하나 이상의 위치에 확립되도록 충분한 시간이 허용될 수 있다. 종양 세포 증식, 성장, 생존 등은 후보 치료제(들)의 투여 전과 투여 후 모두 측정될 수 있다. 후보 치료제의 세포독성은 또한 원하는 대로 비-인간 동물에서도 측정될 수 있다.
- [0302] **키트**
- [0303] 본 발명은, 적어도 하나의 비-인간 동물, 비-인간 세포, DNA 단편, 및/또는 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터가 들어있는 하나 이상의 용기를 포함하는 팩 또는 키트를 추가로 제공한다. 키트는 임의의 적용 가능한 방법

(예를 들어, 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, 공지는 (a) 인간 투여용으로 제조, 사용 및 판매에 대한 기관의 승인 사항, (b) 사용 지침, 또는 둘 모두, 또는 둘 이상의 엔티티 간의 물질 및/또는 생물학적 제품 (예를 들어, 본원 설명된 비-인간 동물 또는 비-인간 세포)의 이전을 규율하는 계약이 반영된다.

[0304] 본 발명의 다른 특징은 예시적인 구현예에 대한 다음의 설명 과정에서 명백해질 것이며, 이들 구현예는 본 발명의 다른 특징의 예시를 위해 제공되고 이를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0305] 실시예

[0306] 다음의 실시예는 당업자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 어떻게 제조하고 사용하는지를 설명하기 위해 제공되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주한 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 달리 명시되지 않는 한, 온도는 섭씨로 표시되고, 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다.

[0307] 실시예 1. 표적화 벡터 설계 및 제작

[0308] 본 실시예는 설치류(예를 들어, 마우스)와 같은 비-인간 동물의 게놈 내에 삽입하기 위한 표적화 벡터를 제작하는 것을 예시한다. 특히, 본 실시예에 기술된 방법은 조작된 중쇄 다양성 (D_H) 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는 설치류를 생산하기 위해 설치류 (예컨대, 마우스) 배아 줄기 (ES) 세포의 게놈 내로의 삽입을 위한 표적화 벡터의 생산을 보여주며, 여기서, 조작된 D_H 영역은 각각이 5' 또는 3' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다. 이 예에서는 3개의 표적화 벡터가 기술된다: 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되고 하나의 인간 J_H 분절에 작동가능하게 연결된 근위(또는 3' D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 함유하는 제1 표적화 벡터, 5' 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결되고 3개의 인간 J_H 분절에 작동가능하게 연결된 근위(또는 3' D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 함유하는 제2 표적화 벡터, 및 각각 5' 23-량체 RSS와 연관되고 6개의 인간 J_H 분절에 작동가능하게 연결된 3개의 D_H 분절을 포함하는 조작된 D_H 영역을 함유하는 제3 표적화 벡터 (도 2). 이들 표적화 벡터의 각각을 발생시키고 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내에 별도로 삽입하였다(도 3, 도 5, 도 7). 후술하는 바와 같이, 조작된 D_H 영역을 중쇄 가변(V_H) 및 중쇄 결합(J_H) 분절과 작동가능하게 연결된 상태로 배치시켜, VDJ 재조합 시, D_H - D_H 재조합으로부터 생성된 CDR3을 갖는 항체를 발현시켰다.

[0309] 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내로의 삽입을 위한 각각 5' 또는 3' 23-량체 RSS와 연관된 하나 이상의 인간 D_H 분절을 함유하는 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술 (예컨대, 미국특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 외, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조; 이들 각각은 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨) 및 당업계에 공지된 분자 생물학적 기법을 사용하여 생성하였다. 본 실시예에서 설명된 방법은 임의의 D_H 분절, D_H 분절 세트, 또는 원하는 대로 D_H 분절들의 조합을 이용하기 위해 사용할 수 있다.

[0310] A. 23: D_H 3-3:12/ J_H 6 표적화 벡터 (도 2)

[0311] 간략하게, 복수의 인간 D_H 분절 및 인간 D_H 7-27 대신 위치한 합성 인간 D_H 3-3 분절을 함유하는 게놈 DNA 단편을 사용하여 제1 표적화 벡터를 제작하였다. 시험관 내 Cas9/GA 변형을 위한 공여자를 드 노보 합성(Blue Heron Bio)을 이용하여 만들었으며 5'에서 3로 다음을 포함하였다: (a) D_H 7-27의 5' 12-량체 RSS의 350 bp 상류에서 시작하는 100 bp 상동 아암 (b) 네오마이신 내성 카세트 삽입을 위한 AgeI 및 XhoI 부위, (c) D_H 7-27의 5' 말단 12 RSS의 상류에 있는 250bp 영역, (d) 5' 말단 23-량체 RSS (J_H 4) 및 3' 말단 12-량체 RSS (D_H 3-3)로 조작된 합성 인간 D_H 3-3 분절, 및 (3) J_H 5의 3bp 하류에서 시작하는 100 bp 상동 박스. loxp-UbC-Em7-Neo-loxp 카세트, 예를 들어 loxP 부위 특이적 재조합 인식 부위가 측부에 위치한 네오마이신 내성 유전자를, E. coli 및 마우스 ES 세포에서의 선별을 허용하기 위해 합성 D_H 분절의 ~250bp 상류와 AgeI 및 XhoI 부위로의 결합에 의해 하류에 위치시켰다. 네오마이신 카세트를 포함하는 이 23: D_H 3-3:12/ J_H 6 공여자(서열번호 61)를 사용하여 2개의 Cas9:gRNA 복합체를 사용한 시험관 내 Cas9/GA에 의해 BAC를 변형시켰다. 변형 전에, BAC는 VELOCIMUNE®마우스의 키메라 IgH 좌위와 서열이 동일하였다(참조, 예를 들어, 도 3 및 4, J_H 유전자 분절이 결여되고 내인성 마

우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 6394 대립유전자 및 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 1460 대립유전자에 대해 이형접합성인 VELOCIMMUNE® 마우스의 예시적인 비제한적인 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위를 보여주고 있음.). 구체적으로, BAC는 가장 근위의 인간 V_H 유전자(V_H6-1)로부터 시작하는 1460 대립유전자와 동일하였으며 모든 27개의 인간 D_H 유전자, 모든 6개의 인간 J_H 유전자, 마우스 IgH 인트론 인헨서(E_H), 마우스 IgM 전환 영역(S_H), 및 마우스 IgM 유전자의 첫 4개의 엑손을 포함하고 있었다. BAC는 또한 스펙티노마이신(spec)-내성 카세트 및 V_H6-1 유전자로부터 상류에 있는 ~29kb의 인간 유전자간 서열을 포함하였다. 인간-마우스 접합부는 인간 J_H6 유전자의 222bp 3' 및 마우스 E_H 인헨서의 490bp 5' 이다. GA를 통해 23:D3-3:12/ J_H6 공여자를 BAC 내로 삽입한 결과, D_H7-7 유전자 분절을 조작된 23:D3-3:12 분절로 대체하고 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 및 J_H5 유전자 분절을 결실시키는 것을 포함하는 최종 23:D3-3:12/ J_H6 표적화 벡터를 생성하였다(도 2). 표 1은 23: $D_H3-3:12$ / J_H6 표적화 벡터의 정확한 구성을 결정하는 데 사용된 gRNA, 프라이머 및 프로브의 서열을 제공한다.

표 1

[0312]

23: $D_H3-3:12$ / J_H6 표적화 벡터의 제작을 위한 프라이머 및 gRNA 서열

Cas9 부위 및 gRNA	서열 (프로토스페이서 인접 모티프)
DNA 인식 부위	TCAGAAAGCAAGTGGATGAG (AGG) 서열번호 62
5' D7.27 crRNA	UCAGAAAGCAAGUGGAUGAG GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; 서열번호 63
DNA 인식 부위	TTAGGGAGACTCAGCTTGCC (AGG); 서열번호 64
3' JH1-5 del crRNA	UUAGGGAGACUCAGCUGCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; 서열번호 65
PCR/시퀀싱 프라이머	서열
5' 상류 탐지 D7-27	GTGAACAGGTGGAACCAAC; 서열번호 66
3' ub pro-200	CCAGTGCCCTAGAGTCACCCA; 서열번호 67
5' neo 탐지	CTCCCACTCATGATCTATAGA; 서열번호 68
3' 하류 탐지 JH1-5 del	ACGCAATCATCAGACAGC; 서열번호 69

[0313]

23:D3-3:12/ J_H6 표적화 벡터를 NotI로 선형화하고 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역(즉, 설치류 면역 글로불린 중쇄 인헨서 및 조절 영역을 포함하는 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 복수의 인간 V_H , D_H , 및 J_H 분절을 함유하고, 하나 이상의 첫과 Adam6 유전자를 암호화하는 삽입된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 제1 중쇄 대립유전자(1460het) (예를 들어, 미국 특허 번호 8,642,835 및 8,697,940, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합됨); 및 복수의 인간 V_H 및 D_H 분절, J_H 영역 결실, 및 설치류 중쇄 인헨서 및 조절 영역을 포함하는 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 함유하고, 하나 이상의 첫과 동물 Adam6 유전자를 암호화하는 삽입된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 제2 중쇄 대립유전자(6394het) (예를 들어, 미국 특허 번호 8,642,835 및 8,697,940, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합됨))에 대해 이형접합성이고, 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 C_K 영역에 작동가능하게 연결된 인간 면역글로불린 경쇄 V_K 및 J_K 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 인간화 내인성 K 좌위에 대한 동형접합성(HO)인 (1293) 계통을 갖는 마우스 배아 줄기 세포로 전기전공시켰다 (도 3 참조). 6799 대립유전자는 전기전공 및 네오마이신 카세트를 포함하는 23:D3-3:12/ J_H6 표적화 벡터와 1460 대립유전자의 적절한 상동성 재조합 시 생성된다. (도 3). 6394 및 6799 대립유전자에 대해 이형접합성인 이러한 조작된 마우스 ES 세포는 양성 ES 클론의 효율적인 스크리닝(아래 참조) 및 약물 내성 카세트의 후속 cre-매개 제거를 용이하게 하기 위해 이용되었으며, 그 후 6394 및 6799 대립유전자의 결실은 각각 6643 및 6800으로 지칭된다(도 4).

[0314]

B. 23: $D_H3-3:12$ / J_H4-6 표적화 벡터(도 2)

[0315]

유사한 방식으로, 복수의 인간 D_H 분절 및 인간 D_H7-27 대신 위치한 합성 인간 D_H3-3 분절을 함유하는 동일한 계

놈 DNA 단편을 사용하여 다른 표적화 벡터(23:D_H3-3:12/J_H4-6)를 제작하였다. 그러나, 이러한 제2 표적화 벡터는 6개의 인간 J_H 분절 중 3개(즉, J_H4, J_H5, J_H6)를 포함하였다. 최종 23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터를 만들기 위해, 공여자를 사용하여 VELOCIMMUNE® 마우스의 키메라 IgH 좌위와 서열이 동일한 BAC를 변형시켰다(참조, 예를 들어, 도 3 및 4, J_H 유전자 분절이 결여되고 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 6394 대립유전자 및 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 1460 대립유전자에 대해 이형접합성인 VELOCIMMUNE® 마우스의 예시적인 비제한적인 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위를 보여주고 있음.). 공여자는 5' 에서 3' 으로 다음을 포함하였다: (a) D7-27의 5' 말단 12 RSS의 350bp 상류에서 시작하는 100bp 상동 박스, (b) 네오마이신 내성 카세트 삽입을 위한 AgeI 및 XhoI 부위, (c) D727의 5' 말단 12 RSS의 상류에 있는 250bp 영역, (d) 5' 이 23-량체 RSS (J_H4 유래)에 의해 및 3' 이 12-량체 RSS (D_H3-3 유래)에 의해 측부에 위치한 합성 인간 D_H3-3 분절, 및 (e) J_H3의 3bp 하류에서 시작하는 100bp 상동 박스. loxp-UbC-Em7-Neo-loxp 카세트, 예를 들어 loxP 부위 특이적 재조합 인식 부위가 측부에 위치한 네오마이신 내성 유전자를, E. coli 및 마우스 ES 세포에서의 선별을 허용하기 위해 AgeI 및 XhoI 부위로의 절찰에 의해 합성 D_H 분절의 ~250bp 상류에 위치시켰다. 네오마이신 카세트를 포함하는, 서열번호 52에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이 23:D33:12/J_H4-6 공여자를 사용하여 1460 대립유전자와 서열이 동일한 BAC를 변형시켰다 (도 3 및 도 4). 구체적으로, BAC는 가장 근위의 인간 V_H 유전자(V_H6-1)로부터 시작하는 1460 대립유전자와 동일하였으며 모든 27개의 인간 D_H 유전자, 모든 6개의 인간 J_H 유전자, 마우스 IgH 인트론 인핸서(E_μ), 마우스 IgM 전환 영역(S_μ), 및 마우스 IgM 유전자의 첫 4개의 엑손을 포함하고 있었다. BAC는 또한 스펙티노마이신 (spec)-내성 카세트 및 V_H6-1 유전자로부터 상류에 있는 ~29kb의 인간 유전자간 서열을 포함하였다. 인간-마우스 접합부는 인간 J_H6 유전자의 222bp 3' 및 마우스 E_μ 인핸서의 490bp 5' 이다. 2개의 Cas9:gRNA를 사용한 시험관 내 Cas9/GA를 통해 23:D3-3:12/J_H4-6 공여자를 BAC 내로 삽입한 결과, D_H7-7 유전자 분절을 조작된 23:D3-3:12 분절로 대체하고 J_H1, J_H2 및 J_H3 유전자 분절을 결실시키는 것을 포함하는 최종 23:D33:12/J_H4-6 표적화 벡터를 생성하였다(도 2). 표 2는 23:D_H3-3:12/J_H6 표적화 벡터의 정확한 구성을 결정하는 데 사용된 gRNA, 프라이머 및 프로브의 서열을 제공한다.

표 2

23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터의 제작을 위한 프라이머 및 gRNA 서열

Cas9 부위 및 gRNA	서열 (프로토스페이서 인접 모티프)
DNA 인식 부위	TCAGAAAGCAAGTGGATGAG(AGG); <u>서열번호 53</u>
5' D7.27 gRNA	UCAGAAAGCAAGUGGAG GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 54</u>
DNA 인식 부위	GCTCCAGGACAGAGGACGCT(GGG); <u>서열번호 55</u>
3' J _H 1-3 del gRNA	GCUCCAGGACAGAGGACGCU GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 56</u>
PCR/시퀀싱 프라이머	서열
5' 상류 탐지 D7-27	GTGAACAGGTGGAACCAAC; <u>서열번호 57</u>
3' ub pro-200	CCAGTGCCTAGAGTCACCA; <u>서열번호 58</u>
5' neo 탐지	CTCCCACTCATGATCTATAGA; <u>서열번호 59</u>
3' 하류 탐지 J _H 1-3 del	GTCCCACTTCCCAAGAAAG; <u>서열번호 60</u>

23:D33:12/J_H4-6 표적화 벡터를 NotI로 선형화하고 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역(즉, 설치류 면역 글로불린 중쇄 인핸서 및 조절 영역을 포함하는 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 복수의 인간 V_H, D_H, 및 J_H 분절을 함유하고, 하나 이상의 컷과 Adam6 유전자를 암호화하는 삽입된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 제1 중쇄 대립유전자(1460het) [예를 들어, 미국 특허 번호 8,642,835 및 8,697,940, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합됨]; 및 복수의 인간 V_H 및 D_H 분절, J_H 영역 결실, 및 설치류 중쇄 인핸서

및 조절 영역을 포함하는 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 함유하고, 하나 이상의 쥐과 동물 Adam6 유전자를 암호화하는 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 제2 중쇄 대립유전자(6394het) [예를 들어, 미국 특허 번호 8,642,835 및 8,697,940, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합됨]에 대해 이형접합성이고, 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 C_K 영역에 작동가능하게 연결된 인간 면역글로불린 경쇄 V_K 및 J_K 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 인간화 내인성 κ 좌위에 대한 동형접합성(H0)인 (1293) 계통을 갖는 마우스 배아 줄기 세포로 전기천공시켰다 (도 5 참조). 6797 대립유전자는 전기천공 및 네오마이신 카세트를 포함하는 23:D33:12/J_H4-6 표적화 벡터와 1460 대립유전자의 적절한 상동성 재조합 시 생성된다. (도 5). 6394 및 6797 대립유전자에 대해 이형접합성인 이러한 조작된 마우스 ES 세포는 양성 ES 클론의 효율적인 스크리닝(아래 참조) 및 약물 내성 카세트의 후속 cre-매개 제거를 용이하게 하기 위해 이용되었으며, 그 후 6394 및 6797 대립유전자의 결실은 각각 6643 및 6798으로 지칭된다(도 6).

[0318] C. 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 /J_H1-6 표적화 벡터 (도 2)

[0319] 간략하게, 각각 12-량체 5' RSS 및 23-량체 3' RSS를 갖는 3개의 D_H2 계열 유전자 분절 (D_H2-2, D_H2-8 및 D_H2-15)을 포함한 복수의 인간 D_H 분절을 함유하는 DNA 단편을 사용하여 제3 표적화 벡터를 제작하였다. 첫째, VELOCIMMUNE® 마우스의 키메라 IgH 좌위와 서열이 동일한 BAC (참조, 예를 들어, 도 3 및 4, J_H 유전자 분절이 결여되고 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 6394 대립유전자 및 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 인간화 가변 영역을 포함하는 1460 대립유전자에 대해 이형접합성인 VELOCIMMUNE® 마우스의 예시적인 비제한적인 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위를 보여주고 있음.). 구체적으로, BAC는 가장 근위의 인간 V_H 유전자(V_H6-1)로부터 시작하는 1460 대립유전자와 동일하였으며 모든 27개의 인간 D_H 유전자, 모든 6개의 인간 J_H 유전자, 마우스 IgH 인트론 인핸서(E_μ), 마우스 IgM 전환 영역(S_μ), 및 마우스 IgM 유전자의 첫 4개의 엑손을 포함하고 있었으며, 이를 loxp-UbC-Em7-Neo-loxp 카세트, 예를 들어 loxP 부위 특이적 재조합 인식 부위가 측부에 위치한 네오마이신 내성 유전자를, *E. coli* 및 마우스 ES 세포에서의 선별을 위해 첫번째 인간 D_H 분절(D_H1-1)의 512bp 상류에 삽입하기 위해 박테리아 상동성 재조합(BHR)을 사용하여 변형시켰다. 이 결과적인 BAC는 이후 시험관 내 Cas9/GA를 사용하여 3개의 공여자로 변형시켰다.

[0320] 1. D_H2-2의 변형을 위한 제1 공여자는 5' 에서 3' 로, D_H2-2의 5' 말단 12 RSS의 1419bp 상류에서 시작하는 50bp 상동 박스, 다중 클로닝 부위 (MreI-NsiI-EcoRI-KpnI-MreI), 인간 V_H1-69 유래 최적화된 3'-말단 23-량체 RSS로 대체된 3' 말단 12-량체 RSS를 사용하여 변형된 D2-2 유전자 (CACAGTGTGA AAACCCACAT CCTGAGAGTG ACACAAACC; T→A, G→C; 서열번호 151), 및 D2-2의 3' 말단 23-량체 RSS의 863bp 하류에서 끝나는 50bp 상동 박스를 함유했다. D_H2-2의 변형을 위한 이 제1 공여자의 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 70으로 제시된다. D_H 영역은 ~10kb의 4개 직접 반복체로 구성되기 때문에, 스크리닝을 위한 고유한 프라이머 및 프로브를 설계하는 것은 매우 어렵다. 이 문제를 극복하기 위해, 2개의 고유한 40bp 서열을 삽입하였다: 5' 상동 박스의 74bp 하류에 있는 한 개 및 3' 상동 박스의 40 bp 상류에 있는 한 개. 이들 고유한 40-량체를 PCR/시퀀싱 프라이머 및 Taqman 프로브에 대한 결합 부위로서 사용하였고, 도 2의 채워지지 않은 수직 직사각형 "1" 및 "2"로 표시하고, 서열번호 73 및 서열번호 74로서 각각 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0321] 2. D_H2-8의 변형을 위한 제2 공여자는 5' 에서 3' 로, D_H2-8의 5' 말단 12 RSS의 552bp 상류에서 시작하는 50bp 상동 박스, 다중 클로닝 부위 (MreI-NsiI-EcoRI-KpnI-MreI), 인간 V_H1-69 유래 최적화된 3'-말단 23-량체 RSS로 대체된 3' 말단 12-량체 RSS를 사용하여 변형된 D2-8 유전자 (CACAGTGTGA AAACCCACAT CCTGAGAGTG ACACAAACC; T→A, G→C 서열번호 151), 및 D2-8의 3' 말단 23-량체 RSS의 867bp 하류에서 끝나는 50bp 상동 박스를 함유했다. D_H2-8의 변형을 위한 이 제2 공여자의 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 71로서 제시된다. D_H 영역은 ~10kb의 4개 직접 반복체로 구성되기 때문에, 스크리닝을 위한 고유한 프라이머 및 프로브를 설계하는 것은 매우 어렵다. 이 문제를 극복하기 위해, 2개의 고유한 40bp 서열을 삽입하였다: 5' 상동 박스의 74bp 하류에 있는 한 개 및 3' 상동 박스의 40 bp 상류에 있는 한 개. 이들 고유한 40-량체를 PCR/시퀀싱 프라이머 및 Taqman 프로브에 대한 결합 부위로서 사용하였고, 도 2의 채워지지 않은 수직 직사각형 "10" 및 "16"로 표시하고, 서열번호 75 및 서열번호 76로서 각각 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0322] 3. D_H2-15의 변형을 위한 제3 공여자는 5' 에서 3' 로, D_H2-15의 5' 말단 12 RSS의 391bp 상류에서 시작하

는 50bp 상동 박스, 다중 클로닝 부위 (MreI-NsiI-EcoRI-KpnI-MreI), 인간 V_H1-69 유래 최적화된 3'-말단 23-량체 RSS로 대체된 3' 말단 12-량체 RSS를 사용하여 변형된 D2-15 유전자 (CACAGTGTGA AAACCCACAT CCTGAGAGTG ACACAAACC; T→A, G→C 서열번호 151), 및 D2-15의 3' 말단 23-량체 RSS의 867bp 하류에서 끝나는 50bp 상동 박스를 함유했다. D_H2-2의 변형을 위한 이 제3 공여자의 뉴클레오티드 서열이 서열번호 72로서 제시된다. D_H 영역은 ~10kb의 4개 직접 반복체로 구성되기 때문에, 스크리닝을 위한 고유한 프라이머 및 프로브를 설계하는 것은 매우 어렵다. 이 문제를 극복하기 위해, 2개의 고유한 40bp 서열을 삽입하였다: 5' 상동 박스의 74bp 하류에 있는 한 개 및 3' 상동 박스의 40 bp 상류에 있는 한 개. 이들 고유한 40-량체를 PCR/시퀀싱 프라이머 및 Taqman 프로브에 대한 결합 부위로서 사용하였고, 도 2의 채워지지 않은 수직 직사각형 "8" 및 "18"로 표시하고, 서열번호 77 및 서열번호 78로서 각각 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0323]

3개의 공여자를 이용한 시험관 내 Cas9/GA 변형 후, 최종 표적화 벡터는 5' 에서 3' 으로, 인간 가변 영역 DNA 를 함유하는 49kb 5' 상동 아암, 네오마이신 선별 카세트, 각각의 5' 이 12-량체 RSS에 의해 및 3' 이 23-량체 RSS에 의해 측부에 위치한 3개의 인간 DH 분절을 포함하는 인간 D_H 영역, 6개의 인간 J_H 분절, 및 마우스 중쇄 인트론 인헨서 (Ei) 및 마우스 IgM 불변 영역 유전자를 함유하는 24kb 3' 상동 아암을 함유했다. (도 2). 표 3 은 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 /J_H1-6 표적화 벡터의 정확한 구성을 결정하는 데 사용된 gRNA, 프라이머 및 프로브의 서열을 제공한다.

표 3

[0324]

12:DH2-2:23|12:DH2-8:23|12:DH2-15:23 /JH1-6의 제작을 위한 프라이머 및 gRNA 서열

단계	명칭	서열 (프로토스페이서 인접 모티프)
1. BHR: VI433-pLma0298=VI826	5' hIgHD HU2(h268)	GCAGTAACCCCTCAGGAAGCA; <u>서열번호 79</u>
	3' hIgHD HU2 AgeI(h269)	CTTCCACCGGTACAGCCACACCAAGGTCATC; <u>서열번호 80</u>
	5' hIgHD HD2 XhoI(h271)	CTTCCCTCGAGGAACACTGTCTCAGCTCCACA; <u>서열번호 81</u>
	3' hIgHD HD2(h272)	AGATCCTCCATGCGTGCTG; <u>서열번호 82</u>
Jxn PCR	5' hIgHD HU2 탐지(h270)	TCTCCTCTCGTCGCCTCTAC; <u>서열번호 83</u>
	3' ub pro-200	CCAGTGCCTAGAGTCACCA; <u>서열번호 84</u>
Jxn PCR	5' neo 탐지	CTCCCACTCATGATCTATAGA; <u>서열번호 85</u>
	3' hIgHD HD2 탐지(h273)	GGGTGCTTGGGTCTGTAG; <u>서열번호 86</u>
2. Cas9/GA: VI826-p51816=VI835		
	gRNAs	
	5' D2-2 Cas9 DNA 표적	AGGTCTGGAGCTACAAGCGG(TGG); <u>서열번호 87</u>
	5' D2-2 gRNA	AGGUCUGGAGCUACAAGCGG GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 88</u>
	3' D2-2 Cas9 DNA 표적	AGGACAACAGTGAGGGTTAC(AGG); <u>서열번호 89</u>
	3' D2-2 gRNA	AGGACAACAGUGAGGGUAC GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 90</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-2(h274)	GTCAAAGGTGGAGGCAGTG; <u>서열번호 91</u>
	3' cm 상류 탐지	TCCAGCTGAACGGTCTGGTTA; <u>서열번호 92</u>
Jxn PCR	D2-2seqF2	AGCGATTCAACAGCTAACC; <u>서열번호 93</u>
	3' 하류 탐지 D2-2(h275)	CCAGTAGAAGTAACGACCAC; <u>서열번호 94</u>
3. MreI/JO-1 GA: VI8352-delCM=VI841		

GA	J0-1	CTCCAGACCCCAAGACTGGGACCTGCCTTCCTGCCACCGCTTGTAGCTCCAGACCTCC GTGCCTCCCCGACCACTTAC; <u>서열번호 95</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-2(h274)	GTCAAAGGTGGAGGCAGTG; <u>서열번호 96</u>
	D2-2seqR1	CCCGTGCCTAGATCAATGC; <u>서열번호 97</u>
추가 D2-2 시 퀵싱 프라이 머	D2-2seqF1	AGGCATTGATCTAGGCAGC; <u>서열번호 98</u>
	D2-2seqR2	CTGTTGAATCGCTGCAAGC; <u>서열번호 99</u>
4. Cas9/GA: VI841-p53419 = VI853		
crRNAs	5' D2-8 Cas9 DNA 표적	ACCTGAAGACGCCAGTCAA(CGG) <u>서열번호 100</u>
	5' D2-8 crRNA	ACCUGAAGACGCCAGUCAA GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 101</u>
	3' D2-8 Cas9 DNA 표적	GCCACAAGCACAAAAGTACA(GGG); <u>서열번호 102</u>
	3' D2-8 crRNA	GCCACAAGCACAAAAGUACA GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 103</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-8(h276)	GCCTTACCCAAGTCTTTCC; <u>서열번호 104</u>
	3' cm 상류 탐지	TCCAGCTGAACGGTCTGGTTA; <u>서열번호 105</u>
Jxn PCR	D2-8seqF2	TCCAATAAGTCGGTTCGGC; <u>서열번호 106</u>
	3' 하류 탐지 D2-8(h277)	GCAGAAGTAACCACCACTG; <u>서열번호 107</u>
5. MreI/J0-2 GA= VI853-delCM= VI872		
GA	J0-2	TCACAGGCCTCTCTGGGAAGAGACCTGAAGACGCCAGTCAACGGAGTCTAACACCAA ACCTCCCTGGAGGCCGATGGG; <u>서열번호 108</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-8(h276)	GCCTTACCCAAGTCTTTCC; <u>서열번호 109</u>
	D2-8seqR1	GCCCTACTTGATGTACGTG; <u>서열번호 110</u>
추가 D2-8 시 퀵싱 프라이 머	D2-8seqF1	GCAAAATCCGACACGTAAC; <u>서열번호 111</u>
	D2-8seqR2	CGAACCGACTTATTGGATGC; <u>서열번호 112</u>
6. Cas9/GA: VI872-p51818 = VI886		
crRNAs	5' D2-8 Cas9 DNA 표적	GGTGGCCCCATAACACACCT(AGG); <u>서열번호 113</u>
	5' D2-8 crRNA	GGUGGCCCAUAACACACCU GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 114</u>
	3' D2-8 Cas9 DNA 표적	GGACAACAGTAGAGGGCTAC(AGG); <u>서열번호 115</u>
	3' D2-8 crRNA	GGACAACAGUAGAGGGCUAC GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG; <u>서열번호 116</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-15(h278)	GCACTCCCTCTAAAGACAAG; <u>서열번호 117</u>
	3' cm 상류 탐지	TCCAGCTGAACGGTCTGGTTA; <u>서열번호 118</u>
Jxn PCR	D2-15seqF2	GTAAAAATACCGCCGCTGG; <u>서열번호 119</u>
	3' 하류 탐지 D2-15(h279)	GCATTTTCTGTCTTGCG; <u>서열번호 120</u>

7. MreI/J0-2 GA= VI886-delCM= VI896/MAID20 187		
GA	J0-3	GCTGACATCCCGAGCTCCTCAATGGTGGCCCCATAACACACCTAGGAAACATAACACAC CCACAGCCCCACCTGGAACAG; <u>서열번호 121</u>
Jxn PCR	5' 상류 탐지 D2-15(h278)*	GCACTCCCTCTAAAGACAAG; <u>서열번호 122</u>
	D2-15seqR1	CTGGGAGATATTGGTGCATC; <u>서열번호 123</u>
추가 D2-15 시퀀싱 프라 이머	D2-15seqF1	TGCACCAATATCTCCCAGT; <u>서열번호 124</u>
	D2-15seqR2	CGGCGGTATTTTACTGACC; <u>서열번호 125</u>

명칭	순방향 프라이머; 프로브; 역방향 프라이머	프로브 유형	분석 유형	특이성
23:D33: 12/1	순방향 -TTTTTGTGCACCCCTTAATG G; <u>서열번호 126</u> 프로브 - ATGTGGTATTACGATTTTGT GA; <u>서열번호 127</u> 역방향- TCTGTGACACTGTGGGTATA ATAACC; <u>서열번호 128</u>	Taqman MGB	GOA	23:D3-3: 12 분절
23:D33: 12/2	순방향 -CCCACAGTGTCACAGAGTCC AT; <u>서열번호 129</u> 프로브 - CAAGATGGCTTTCTCTTGCC TCC; <u>서열번호 130</u> 역방향- TCCCAGCTCCAGGACAGAG; <u>서열번호 131</u>	BHQ1	GOA	MAID679 7 3' jxn
23:D3- 3:12/3	순방향 -TGTCACAGAGTCCATCAAAA ACCT; <u>서열번호 132</u> 프로브 - CACCACCCCTCTC; <u>서열번호 133</u> 역방향- CCTGAGACCCTGGCAAGCT; <u>서열번호 134</u>	Taqman MGB	GOA	MAID679 9 3' jxn

[0325]

명칭	순방향 프라이머, 프로브, 역방향 프라이머	프로브 유형	분석 유형	특이성
Jxn D _H 2-2	순방향 -ATGGCGCTTGCAGCGATTC; <u>서열번호 135</u> 프로브 - CCAATACTAACGAGGAAATGC AAACCCA; <u>서열번호 136</u> 역방향- ACCCTCACTGTTGTCCTTCTG; <u>서열번호 137</u>	BHQ1	GOA	D2-2 의 40bp-2 jxn
Jxn D _H 2-8	순방향 -GCAAACGTCCATCTGAAGGA GAA; <u>서열번호 138</u> 프로브 - CAAATAAACGATGGCAGGCTA CACCCG; <u>서열번호 139</u> 역방향- GAGTTGCCGAACCGACTTATT G; <u>서열번호 140</u>	BHQ1	GOA	D2-8 의 40bp-16 jxn
Jxn D _H 2-15	순방향 -GCAATGGTAGGTTTCATGTCC ATC; <u>서열번호 141</u> 프로브 - ACCGCCGCTGGTACTCCAAT; <u>서열번호 142</u> 역방향- CCCTGGCTGTCTGGGTTTG; <u>서열번호 143</u>	BHQ1	GOA	D2-15 의 40bp-18 jxn

[0326]

[0327]

12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23x3/J_H1-6 표적화 벡터를 NotI로 선형화하고 기능성 인간 V_H 유전자 분절, D_H7-27를 제외한 D_H 영역 결실, 및 기능성 인간 J_H 유전자 분절들의 완전한 레퍼토리를 함유하는 인간화 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 대해 동형접합성이고 (6011), 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 C_K 영역에 작동가능하게 연결된 인간 면역글로불린 경쇄 V_K 및 J_K 유전자 분절의 완전한 레퍼토리를 포함하는 인간화 내인성 K 좌위에 대한 동형접합성(HO)인 (1293) 게놈을 갖는 마우스 배아 줄기 세포로 전기천공시켰다 (도 7 참조). 20187 대립유전자는 전기천공 및 네오마이신 카세트를 포함하는 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 /J_H1-6 표적화 벡터와 6011 대립유전자의 적절한 상동성 재조합 시 생성된다. (도 7). 이러한 조작된 마우스 ES 세포는 양성 ES 클론의 효율적인 스크리닝(아래 참조) 및 네오마이신 약물 내성 카세트의 후속 cre-매개 제거를 용이하게 하기 위해 이용되었으며, 그 후 20187 대립유전자의 제거는 20188으로 지칭된다(도 8).

[0328]

실시예 2. ES 세포 스크리닝

[0329]

본 실시예는 게놈이 조작된 중쇄 다양성 (D_H) 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 비-인간 동물(예를 들어, 설치류)의 생산을 입증하며, 여기서 조작된 D_H 영역은 각각 23-량체 RSS에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 D_H 분절을 포함한다.

[0330]

실시예 1에 기술된 표적화 벡터의 올바른 조립 및 BAC DNA 클론이 함유된 인간화 면역글로불린 중쇄 좌위의 DNA 단편의 다양성 클러스터 내로의 삽입을 각각의 표적화 벡터를 구축하는 동안 시퀀싱 및 중합효소 연쇄 반응에 의해 확인하였다. 이어서, 중합효소 연쇄 반응에 의해 확인된 표적화된 BAC DNA를 전기천공을 통해 마우스 배아 줄기 (ES) 세포 내로 도입한 후 선택 배지에서 배양하였다. 각각의 표적화 벡터의 전기천공에 사용된 ES 세포의 게놈은 도 3, 도 5 및 도 7에 각각 도시되어 있다. 전기천공 후 10일차에 약물-내성 콜로니를 피킹 (picking)하고 이전에 기술된 바와 같이 (Valenzuela 외, 전술됨; Friendewey, D. 외, 2010, Methods Enzymol. 476:295-

307, 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨), 조작된 D_H 유전자 분절의 적절한 통합을 탐지하는 프라이머/프로브 세트를 사용하여 정확한 표적화를 위해 TAQMAN[®] 및 핵형분석에 의해 스크리닝하였다 (표 4; F: 순방향 프라이머, P: 프로브, R: 역방향 프라이머).

[0331] 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; 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨)을 사용하여, 표적화된 ES 세포를 미암축된 8-세포 단계의 Swiss Webster 배아 내로 주입하여 조작된 D_H 영역에 대해 이형접합성이며 D_H-D_H 재조합으로부터 생성된 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 함유하는 항체를 발현하는 건강하고 완전한 ES 세포-유래 F0 세대 마우스를 생산하였다. F0 세대 이형접합체 수컷을 C57B16/Ntac 암컷과 교배시켜 F2 세대 동형접합체 생산을 위해 교배시킬 F1 이형접합체 및 야생형 마우스를 생산하였다.

[0332] 예컨대, ES 세포 단계 또는 배아 단계에서 제거되지 않은 표적화 작제물에 의해 도입된 임의의 lox 선택된 카세트 제거하기 위해, 재조합 효소의 후속 첨가에 의해 (예컨대, Cre 처리에 의해) 또는 Cre deleter 마우스 군주 (예컨대, 국제 특허 출원 공개 제WO 2009/114400호 참조)과의 교배에 의해 약물 선별 카세트를 선택적으로 제거할 수 있다. 선택적으로, 선별 카세트를 마우스 내에 유지시킬 수 있다. 본원에 설명된 표적화 벡터로 조작된 선별 카세트를 Cre 재조합효소의 일시적 발현에 의해 양성 ES 세포에서 제거하였다(각각 도 4, 도 6 및 도 8 참조).

표 4

[0333] ES 세포 스크리닝을 위한 프라이머/프로브 세트

명칭		서열 (5'-3')	서열번호
hIgHJ2	F	GAGGCTGTGCTACTGGTACTTC	1
	P	CCGTGGCACCCCTGGTCACTGT	2
	R	TGGTGCCTGGACAGAGAAG	3
VI741-42h1	F	TTTTTGTGCACCCCTTAATGG	4
	P	ATGTGGTATTACGATTTTGGGA	5
	R	CTCTGTGACACTGTGGGTATAATAACC	6
VI742h2	F	TGTCACAGAGTCCATCAAAACCT	7
	P	CACCACCCCTCTC	8
	R	CCTGAGACCCTGGCAAGCT	9
Neo	F	GGTGGAGAGGCTATTCCGC	10
	P	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG	11
	R	GAACACGGCGGCATCAG	12
Jxn D _H 2-2	F	ATGGCGCTTGCGAGCGATTC	13
	P	CCAATACTAACGAGGAAATGCAAACCA	14
	R	ACCCTCACTGTTGTCCTTCTG	15
Jxn D _H 2-8	F	GCAAACGTCCATCTGAAGGAGAA	16
	P	CAAAATAACGATGGCAGGCTACACCCG	17
	R	GAGTTGCCGAACCGACTTATTG	18
Jxn D _H 2-15	F	GCAATGGTAGGTTTCATGTCCATC	19
	P	ACCGCCGCTGGTACTCCAAT	20
	R	CCCTGGCTGTCTGGGTTTG	21
hIgHJ6	F	CAGCAGAGGGTTCCATGAGAA	22
	P	CAGGACAGGGCCACGGACAGTC	23
	R	GCCACCCAGAGACCTTCTGT	24
hIgH31	F	ATCACACTCATCCCATCCCC	25

	P	CCCTTCCTAAGTACCACAGAGTGGGCTC	26
	R	CACAGGGAAGCAGGAAGTGC	27
mIgHp2	F	GCCATGCAAGGCCAAGC	28
	P	CCAGGAAAATGCTGCCAGAGCCTG	29
	R	AGTTCTTGAGCCTTAGGGTGCTAG	30
mADAM6-1	F	CTGAGCATGGTGTCCCATCT	31
	P	TGCAGATAAGTGTCTATCTGGGCAA	32
	R	CCAGAGTACTGTAGTGGCTCTAAG	33
hIgκ5	F	CCCCGTCCTCCTCTTTTC	34
	P	TCATGTCCATTAAACCCATTACCTTTGCCCA	35
	R	TGCAAGTGTCTGCCAGCAAG	36
hIgK21	F	CATTTGGCTACATATCAAAGCCG	37
	P	CCTGAGCCAGGGAACAGCCACTGATA	38
	R	ACATGGCTGAGGCAGACACC	39
mIgKd2	F	GCAAACAAAAACCACTGGCC	40
	P	CTGTTCTCTAAAACTGGACTCCACAGTAAATGGAA A	41
	R	GGCCACATTCCATGGGTTC	42
hyg	F	TGCGGCCGATCTTAGCC	43
	P	ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC	44
	R	TTGACCGATTCTTGCGG	45
hIgHD-J.1	F	TGGCAGCTGTTCAACCATGT	46
	P	ATCCACTGTCCCAGACAGCACC	47
	R	GGCGGTTTGTTGAGTTTCTCT	48
hIgHD-J.2	F	TGTTGCCTCCCTGCTTCTAG	49
	P	CCCAGACCTCCCTGTTCTCTGA	50
	R	GGCCACGCATTGTTCAG	51

[0334] 실시예 3. 23:D_H3-3:12/J_H6, 23:D_H33:12/J_H4-6, 또는 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 /J_H1-6 표적화 벡터로 변형된 마우스의 특성 분석

[0335] 면역표현형 분석

[0336] 23:D_H3-3:12/J_H6 또는 23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터로 변형된 동물의 면역표현형 분석을 각각의 6800 또는 6795 변형된 대립유전자에 대해 이형접합성인 마우스에 대해 수행하였다 (도 4 및 도 6 참조). 12:D_H22:23|12:D_H2-8:2-23| 12:D_H2-15:23/J_H1-6 표적화 벡터로 변형된 동물의 면역표현형 분석을 20188 변형된 대립유전자에 대해 동형접합성으로 교배된 마우스에 대해 수행하였다. B 세포 발생은 형광 활성화 세포 분류법 (FACS)으로 이들 동물들에서 분석했다. 요약하면, 비장 및 다리 뼈(대퇴골 및 경골)를 다음에서 채취했다:

[0337] VELOCIMMUNE® 마우스 (n=3, 26% C57BL/6 23% 129S6/SvEvTac 51% Balb/cAnNTac; 예를 들어, 미국 특허 제 8,502,018호 및 제8,642,835호 참조),

[0338] 6643het/6800het//1293ho 마우스 (23:D_H3-3:12/J_H6 표적화 벡터로 변형된 25% C57BL/6NTac 25% 129S6/SvEvTac 50% Balb/cAnNTac; 도 4 참조; n=3;

[0339] 6643het/6798het//1293ho 마우스 (23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터로 변형된 25% C57BL/6NTac 25% 129S6/SvEvTac 50% Balb/cAnNTac; 도 6 참조; n=3); 또는

[0340] 20188ho/1293ho 마우스 (12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2.1523/J_H1-6 표적화 벡터로 변형된 25% C57BL/6NTac

25% 129S6/SvFvTac 50% Balb/cAnNTac; n=3).

[0341] 원심분리에 의해 대퇴골로부터 골수를 수확하였다. 비장 및 골수 준비로부터의 적혈구 세포를 ACK 세포용해 완충액 (Gibco)으로 세포용해하고 2% FBS를 포함하는 1xPBS로 세척하였다. 단리된 세포 (1×10^6)를 선택된 항체 각 테일과 함께 $+4^\circ$ 에서 30분 동안 인큐베이션하였다: 염색 1: 랫트 항-마우스 CD43-FITC (Biolegend 121206, 클론 1B11), 랫트 항-마우스 c-kit-PE (Biolegend 105808, 클론 2B8), 랫트 항-마우스 IgM-PeCy (eBiosciences 25-5790-82, 클론 II/41), 랫트 항-마우스 IgD-PerCP-Cy5.5 (Biolegend 405710, 클론 11-26c.2a), 랫트 항-마우스 CD3-PB (Biolegend 100214, 클론 17-A2), 랫트 항-마우스 B220-APC (eBiosciences 17-0452-82, 클론 RA3-6B2), 및 랫트 항-마우스 CD19-APC-H7 (BD 560143 클론 1D3). 염색 2: 랫트 항-마우스 카파-FITC (BD 550003, 클론 187.1), 랫트 항-마우스 람다-PE (Biolegend 407308, 클론 RML-42), 랫트 항-마우스 IgM-PeCy (eBiosciences 25-5790-82, 클론 II/41), 랫트 항-마우스 IgD-PerCP-Cy5.5 (Biolegend 405710, 클론 11-26c.2a), 랫트 항-마우스 CD3-PB (Biolegend 100214, 클론 17-A2), 랫트 항-마우스 B220-APC (eBiosciences 17-0452-82, 클론 RA3-6B2), 및 랫트 항-마우스 CD19-APC-H7 (BD 560143 클론 1D3). 염색한 후에, 세포를 세척하고 2% 포름알데히드에 고정시켰다. BD LSRFORTESSA™ 유세포 분석기 (BD Biosciences) 상에서 데이터 수집을 수행하고 FLOWJO™ 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석하였다.

[0342] 6800 또는 6798 대립유전자에 대해 이형접합성인 마우스에서, 총 B세포 수는 비장 및 골수 모두에서 감소했으며, 대조군 VEOLCIMMUNE® 마우스와 비교하여 골수에서 pro-B세포의 증가가 관찰되었다(데이터는 표시되지 않음). 전반적으로, B 세포는 유사한 κ 및 λ 사용을 가졌다(데이터는 표시되지 않음). 20188 대립유전자에 대해 동형접합성인 마우스에서, 비장에서 약간 더 높은 수준의 λ^+ B 세포가 관찰되었다(데이터는 표시되지 않음). 대조군 VEOLCIMMUNE® 마우스와 비교하여 6800, 6798 또는 20188 대립유전자를 발현하는 마우스의 B 세포 집단에서 관찰된 차이 중 어느 것도 이들 동물의 B 세포 발생에 영향을 미치는 것으로 간주되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0343] D_H-D_H 재배열 및 특성의 빈도

[0344] 23: D_H 33:12/ J_H 6 표적화 벡터, 23: D_H 3-3:12/ J_H 4-6 표적화 벡터, 또는 12: D_H 2-2:23|12: D_H 28:23|12: D_H 2-15:23 표적화 벡터로 변형된 면역화되지 않은 미치리 마우스에서 유전자 재배열을 IgM 레퍼토리 시퀀싱에 의해 분석하였다. 마우스 불변 IgM에 특이적인 프라이머를 갖는 SMARTer™ RACE (cDNA 말단의 신속한 증폭) cDNA 증폭 키트(Clontech)를 사용하여 비장 B 세포로부터의 IgM 레퍼토리 라이브러리를 준비하였다 (표 5, "nnnnnn"은 시퀀싱을 위한 샘플의 멀티플렉싱을 가능하게 하는 6bp 인덱스 서열을 나타낸다). 그런 다음, 준비된 레퍼토리 라이브러리를 MiSeq 시퀀서(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다.

[0345] Illumina MiSeq 쌍-말단 서열 (2x300 사이클)을 중쇄 IgM 불변 영역 프라이머에 대한 품질과 완벽한 일치에 근거하여 병합하고 필터링했다. 재배열된 중쇄 서열을 생식선 V, D 및 J 기준 데이터베이스(IMGJ)에 정렬하였다. 후속 분석에는 개방 해독 프레임 및 프레임 내 VDJ 접합부 내에 정지 코돈이 없는 서열로 정의되는 생산적인 재배열만 포함되었다.

표 5

[0346] IgM 레퍼토리 시퀀싱을 위한 라이브러리 준비에 사용되는 프라이머

RT 프라이머	올리고-dT (서열번호)	서열
템플릿 스위칭 올리고	(서열번호 146)	5' -3'
1차 PCR 프라이머	IgM 상수 (서열번호 147)	5' - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGGAAGACATTTGGGAAGGAC - 3'
	PE2-PIIA (서열번호 148)	5' - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3'

2차 PCR 프라이머	순방향 (서열번호 149)	5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACnnnnnnACACTCTTCCCTACACGACGCTCTT CCGATCT- 3'
	역방향 (서열번호 150)	5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATnnnnnnGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA TCT- 3'

[0347] 23:D_H3-3:12/J_H6 표적화 벡터 또는 23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터로 변형된 면역화되지 않은 동물들에서, D_H7-27의 발현은 탐지되지 않았으며, 예상대로, J_H 사용은 J_H6, 또는 J_H4, J_H5, 및 J_H6로 제한되었다(데이터는 표시되지 않음). 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 표적화 벡터로 변형된 면역화되지 않은 동물들에서, 모든 J_H1-6 유전자 분절과의 재조합이 탐지되었지만, J_H4와의 재조합은 변형된 동물과 대조군 동물 모두에서 더 높은 빈도(약 50%)로 관찰되었다(데이터는 표시되지 않음). 모든 변형된 동물에서, 조작된 D_H 유전자 분절과 재조합된 다양한 V_H 유전자 분절(예를 들어, V_H4-39, V_H3-23 등과 같지만 이에 한정되지 않음) 및 다양한 D_H 유전자 분절(예를 들어, D_H1-7, D_H3-10, 및 D_H5-12과 같지만 이에 제한되지 않음)을 사용하였다. 흥미롭게도, 대조군 동물(2.57%, 3.44%; 3.58%; n=3)에 비해 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 표적화 벡터로 변형된 동물에서 D_H2-2, D_H2-8, D_H2-15 유전자 분절의 사용이 더 높은 경향을 보였다(2.41%; 6.34%; 6.91%; n=3). (표 6).

[0348] 접합 영역 내에서 식별된 최소 2개의 연속적인 D_H 분절을 갖는 기능성 서열은 다음 기준을 사용하여 D_H-D_H 재조합 이벤트의 결과로서 추가로 확인되었다. 23:D_H3-3:12/J_H6 표적화 벡터 또는 23:D_H3-3:12/J_H4-6 표적화 벡터로 변형된 마우스로부터 단리된 서열에서, D_H-D_H 재조합 이벤트는, 중첩 여부에 관계없이, (1) 상기 확인된 "연속적"또는 3' D_H 분절이 IGHD3-3 D_H 유전자 분절의 생식선 서열에 대해 최소 9개의 연속 염기쌍과 정렬된 경우 및 (2) 확인된 선행 5' 및 연속적 3' D_H 유전자 분절 모두 생식선 D_H 유전자 분절에 대해 최소 5개의 연속 염기쌍과 정렬되는 경우 확인되었다. 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 표적화 벡터로 변형된 마우스로부터 단리된 서열에서, D_H-D_H 재조합 이벤트는, 중첩 여부에 관계없이, (1) 상기 확인된 "선행"또는 5' D_H 분절이 IGHD2-2 D_H 유전자 분절, IGHD2-8 D_H 유전자 분절, IGHD2-15 D_H 유전자 분절의 생식선 서열에 대해 최소 9개의 연속 염기쌍과 정렬된 경우 및 (2) 확인된 선행 5' 및 연속적 3' D_H 유전자 분절 모두 생식선 D_H 유전자 분절에 대해 최소 5개의 연속 뉴클레오티드와 정렬되는 경우 확인되었다.

[0349] 표 6은 기능성 Ig 판독의 수를 절대량으로 제공하고 총 판독의 백분율, D_H2-2 유전자 분절, D_H2-8 유전자 분절 또는 D_H2-15 유전자 분절에서 유래된 모든 기능성 판독의 백분율, D_H-D_H 재조합 이벤트의 결과로 확인되는 기준을 충족하는 D_H2-2 유전자 분절, D_H2-8 유전자 분절, 또는 D_H2-15 유전자 분절에서 유래된 모든 판독의 백분율을 제공한다.

표 6

마우스	D2-2/D2-8/D2-15 사용 %	D _H -D _H 융합 %
대조군	3.44	0.20*
대조군	3.58	0.10*
대조군	2.57	0.08*
20188 S1	6.34	3.80
20188 S2	2.41	1.69
20188 S3	6.91	4.16

[0351] *이 대조군 동물 각각에서 D_H-D_H 융합은 12:D_H2-2:23|12:D_H2-8:23|12:D_H2-15:23 표적화 벡터로 변형된 동물에 대해 제시된 것과 동일한 기준을 사용하여 확인되었다.

- [0352] 표 6에 나타난 바와 같이, 모든 면역화되지 않은 변형된 동물은 대조군 동물과 비교하여 $D_H D_H$ 재조합 이벤트의 증가를 나타냈다. 예를 들어, 20188 대립유전자에 대해 동형접합성인, 조작된 2-2, 2-8 및 2-15 유전자 분절로 변형된 동물에서, D_H-D_H 재조합 이벤트는 3개의 조작된 2-2, 2-8, 2-15 D_H 유전자 분절 중 하나를 포함하는 모든 재배열의 1.69% 내지 4.16%에서 발생한다. 대조적으로, D_H-D_H 재조합은 대조군 동물에서 2-2, 2-8 또는 2-15 유전자 분절로부터 유래된 모든 재배열의 0.2% 미만에서 확인되었다. 별도의 실험에서, 마우스 6800마리에 대해 이형접합성인 마우스에서 (도 4) 조작된 D_H3-3 유전자 분절이 관여하는 확인된 D_H-D_H 재조합 이벤트의 빈도는 D_H3-3 유전자 분절로부터 유래된 모든 기능성 판독의 0.6 내지 1.2% 범위였다.
- [0353] 모든 변형된 동물에서, 재배열된 $V_H(D_HA-D_HB)J_H$ 재배열은 더 긴 CDR3 길이(예를 들어, 약 21개 아미노산의 CDR3 길이와 같지만 이에 제한되지 않음)를 암호화하고 더 많은 시스테인 잔기를 통합하였다(예, 도 9 및 도 10).
- [0354] 요약하면, 조작된 D_H 유전자 분절로 변형된 마우스는 조작된 D_H 유전자 분절의 이용으로 인해 D_H-D_H 재조합 이벤트의 빈도가 증가된 비교적 정상적인 B 세포 표현형을 나타낸다. 또한, D_H-D_H 재조합 서열은 길이가 더 길고 시스테인 혼입의 비율이 더 높은 CDR3에 대해 암호화하였다.
- [0355] **실시예 4. 항체 생산**
- [0356] 본 실시예는 본원에 설명된 바와 같이 조작된 D_H 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는 설치류에서의 항체 생산을 보여준다. 본 실시예에 기술된 방법, 및/또는 당업계에 널리 공지된 면역화 방법이 폴리펩티드 또는 이의 단편(예컨대, 원하는 에피토프로부터 유도된 펩티드), 또는 원하는 폴리펩티드 또는 이의 단편의 조합을 사용하여 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역을 함유하는 설치류를 면역화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0357] 예컨대, 본원에 설명된 바와 같은 조작된 D_H 영역을 포함하는 마우스의 코호트를 당업계에 공지된 면역화 방법을 사용하여 관심 항원으로 공격하였다. 항체 면역 반응 (즉, 혈청 역가)을 ELISA 면역분석법으로 및/또는 MSD에 의해 조작된 세포에서 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 분석 또는 MSD에 의해) 및 선택하여 항원-특이적 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 확인하였다. 하이브리도마를 원하는 상대적인 결합 친화도 및 이소형에 대해 추가로 특성분석할 수 있다. 이러한 기술을 사용하여, 몇몇 항원-특이적 키메라 항체 (즉, 인간 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 포함하는 항체)가 수득된다.
- [0358] 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 단리하여 완전한 인간 항체의 제조를 위해 중쇄 및 경쇄의 원하는 이소형 (불변 영역)에 연결할 수 있다. 이러한 항체는 CHO 세포와 같은 세포에서 생산될 수 있다. 완전한 인간 항체는 이어서 관심 항원의 상대적인 결합 친화도 및/또는 중화 활성에 대해 특성분석된다.
- [0359] 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA가 항원-특이적 림프구로부터 직접 단리될 수 있다. 초기에, 인간 가변 영역 및 설치류 불변 영역을 갖는 고친화성 키메라 항체가 단리되고 특성분석되고 친화도, 선택도, 에피토프 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 원하는 특성에 대해 선택된다. 설치류 (예를 들어, 랫트, 마우스 등과 같지만 이에 한정되지 않음) 불변 영역은 완전한 인간 항체를 생성하기 위해 원하는 인간 불변 영역으로 대체된다. 선택된 불변 영역은 특이적 용도에 따라 매우 다양할 수 있지만, 고친화도 항원 결합 특성 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 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.
- [0360] 한 실험에서, 대조군 마우스(예를 들어, 인간화 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 좌위를 갖는 VELOCIMMUNE® 마우스 (n= 4-6; 예를 들어, 미국 특허 번호 8,697,940 및 8,642,835 참조; 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)) 및 시험 마우스(예를 들어, 본원에 설명된 조작된 23: D_H3-3 :12/ J_H4-6 or 23: D_H3-3 :12/ J_H6 영역을 포함하도록 변형된 마우스 (n= 4-6))을 상이한 항원 및/또는 이를 암호화하는 핵산(G 단백질-결합 수용체(GPCR), 이온 채널, 케모카인 수용체, 또는 병원균)으로 면역화시켰다.

- [0361] 마우스는 낮은 역가에서 높은 특이적 역가에 이르는 반응으로, 시험된 각 항원에 대한 반응을 생성할 수 있었다 (데이터는 표시되지 않음). 본원에 설명된 조작된 23:D_H33:12/J_H6 영역을 갖는 마우스는 인간화 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 좌위를 갖는 대조군 마우스에 필적하는 GPCR 발현 세포주에 대한 역가를 보여주었다 (도 11; 채워진 원은 GPCR을 발현하는 조작된 세포주를 나타내고; 채워지지 않은 원은 GPCR을 발현하지 않는 대조군 세포이다).
- [0362] 또한, 조작된 D_H 영역을 포함하는 마우스에서 생성된 G 단백질-결합 수용체(GPCR)에 특이적인 23개의 시험된 항체의 100%는 10개 이상의 아미노산의 중쇄 CDR3 길이를 가졌고; 20%는 14개의 아미노산의 CDR3 길이를 가졌고, 1개의 항체는 18개의 아미노산의 CDR3 길이를 가졌다(데이터는 표시되지 않음). 대조적으로, 인간화 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 좌위를 갖지만 조작된 D_H 영역을 갖지 않은 마우스에서 생성된 GPCR에 특이적인 8개의 시험된 항체의 약 60%만이 10개 이상의 아미노산의 CDR3 길이를 가졌고, 이들 중 어느 것도 14개 이상의 CDR3 길이를 갖지 않았다(데이터는 표시되지 않음).
- [0363] 조작된 23:D_H3-3:12/J_H4-6 영역을 갖는 마우스로부터 복수의 항바이러스 항체를 단리하였으며, 적어도 하나는 대조자 분자의 중화 활성보다 우월한 중화 활성을 보여주었다(데이터는 표시되지 않음).
- [0364] 조작된 23:D_H3-3:12/J_H6을 갖고 이온 채널로 면역화된 마우스로부터의 항체는 (본 실시예에 대해 기술된 엄격한 기준에 의해 정해진 바와 같이) V_HD_HJ_H 및 V_HD_HA-D_HBJ_H 재배열 둘 다로부터 유래된 21개 아미노산보다 큰 HCDR3 길이를 갖는 항체의 집단을 포함하였고, 더 긴 HCDR3 길이를 암호화하는 서열은 비장에 비해 골수에서 더 많이 발견되었다(도 12). 본 실시예의 엄격한 기준에 따라 V_HD_HA-D_HBJ_H 재배열의 결과인 것으로 결정된 서열에 의해 암호화된 CDR3 길이의 분석 (본 실시예의 엄격한 기준을 사용할 때 검출된 각각의 D_H 유전자 분절은 생식선 D 유전자 분절에 대해 최소 40%의 동일성을 나타내야 하며, 3' D_H 유전자 분절은 D_H3-3 유전자 분절로부터 유래되어야 하고, 각각의 D_H 유전자 분절에서 최대 1개의 뉴클레오티드 돌연변이)가 도 13에 도시되어 있다. 아래 표 7은 본 실시예에 기술된 엄격한 기준, 또는 본 실시예의 비-엄격한 기준을 사용하여 골수 또는 비장에서 V_HD_HA-D_HBJ_H 재조합의 빈도에 대한 비교를 제공한다 (본 실시예의 비-엄격한 기준을 사용할 때, 검출된 각각의 D_H 유전자 분절은 생식선 D 유전자 분절에 대해 최소 5개의 뉴클레오티드 동일성을 나타내야 하며, 3' D_H 유전자 분절은 D_H3-3 유전자 분절로부터 유래되어야 한다).

표 7

[0365] V_HD_HA-D_HBJ_H 재조합 빈도

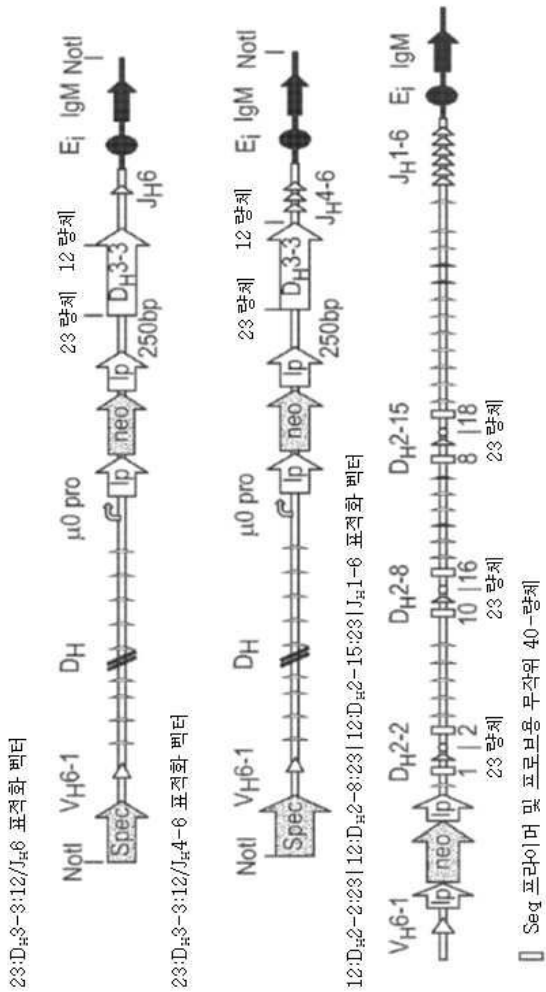
	비-엄격한 기준	엄격한 기준
골수	3.54	1.7
비장	0.38	0.04

[0366] 균등물

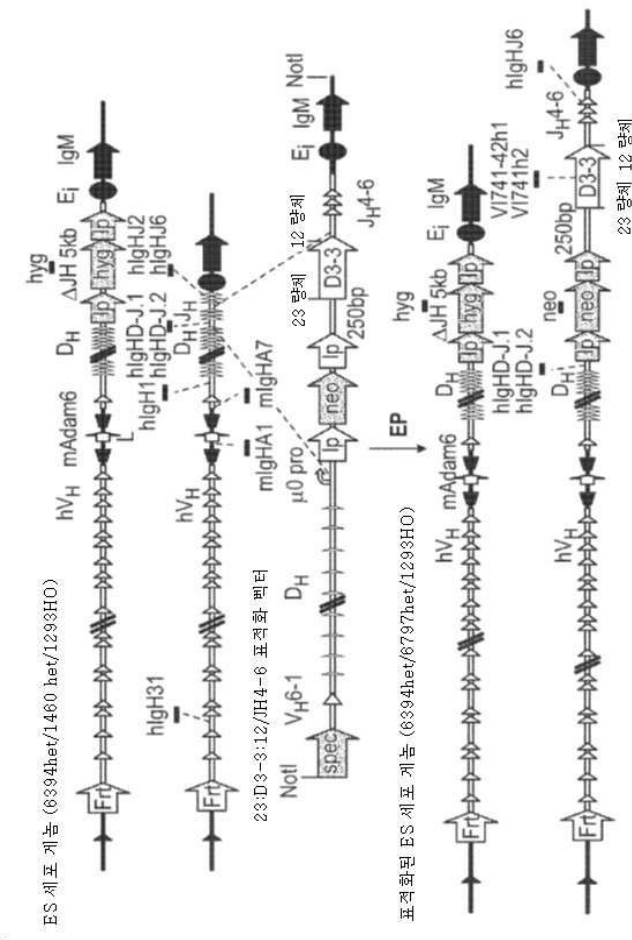
[0367] 본 발명의 적어도 하나의 구현예의 몇몇 측면이 설명되었는데, 다양한 변경, 변형 및 개선이 당업자에 의해 용이하게 이루어질 것임을 당업자는 이해할 것이다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시의 일부가 되도록 의도되고, 본 발명의 사상 및 범주 내에 있도록 의도된다. 따라서, 전술된 설명 및 도면은 단지 예시이며, 본 발명은 이어지는 청구범위에 의해 상세히 기술된다.

[0368] 당업자는 본원에 설명된 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.

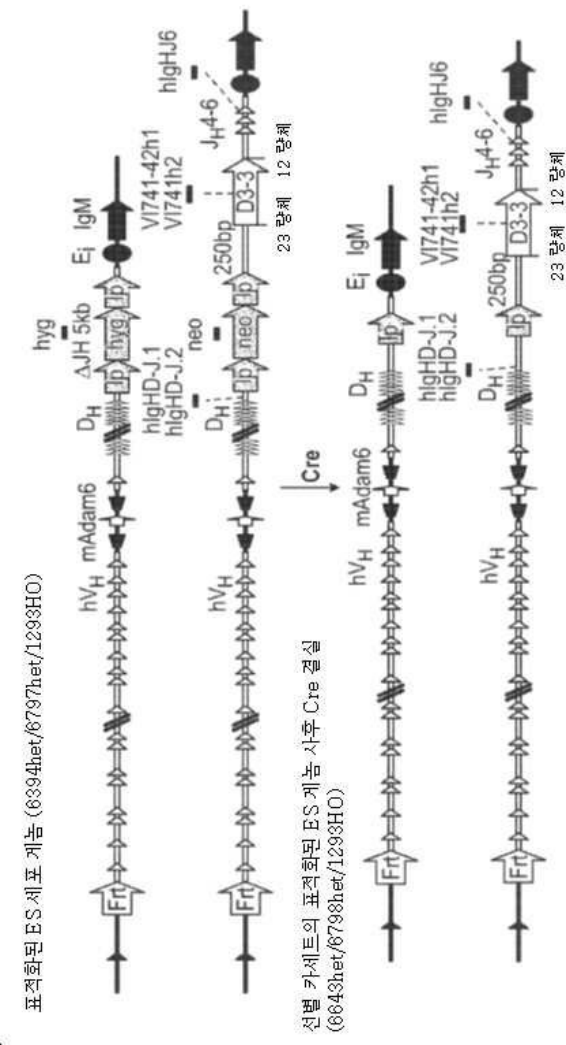
도면2



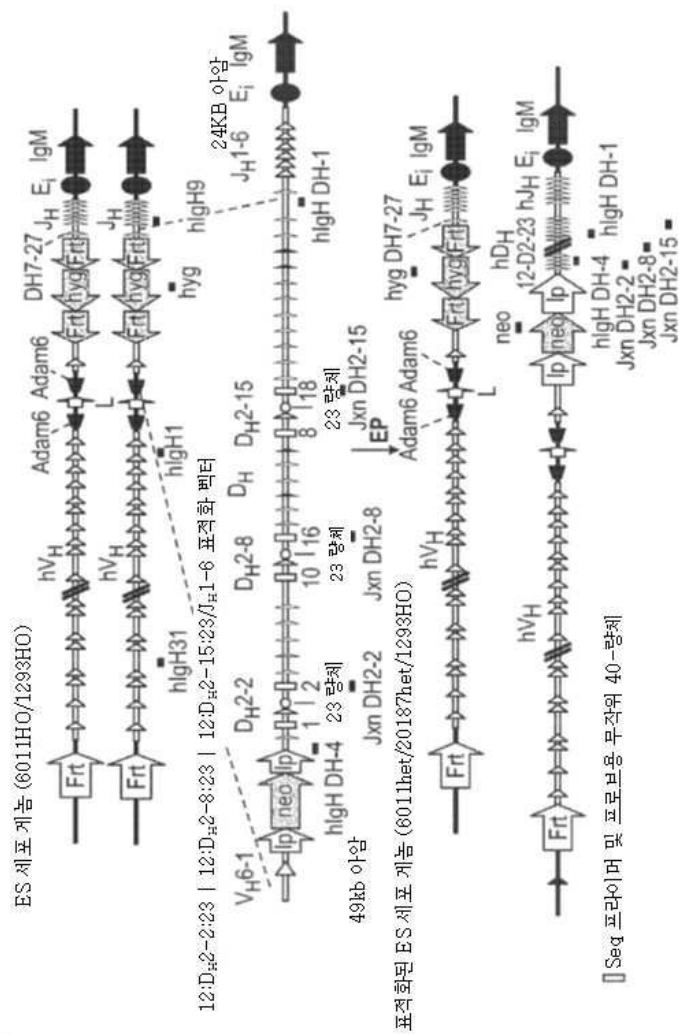
도면5



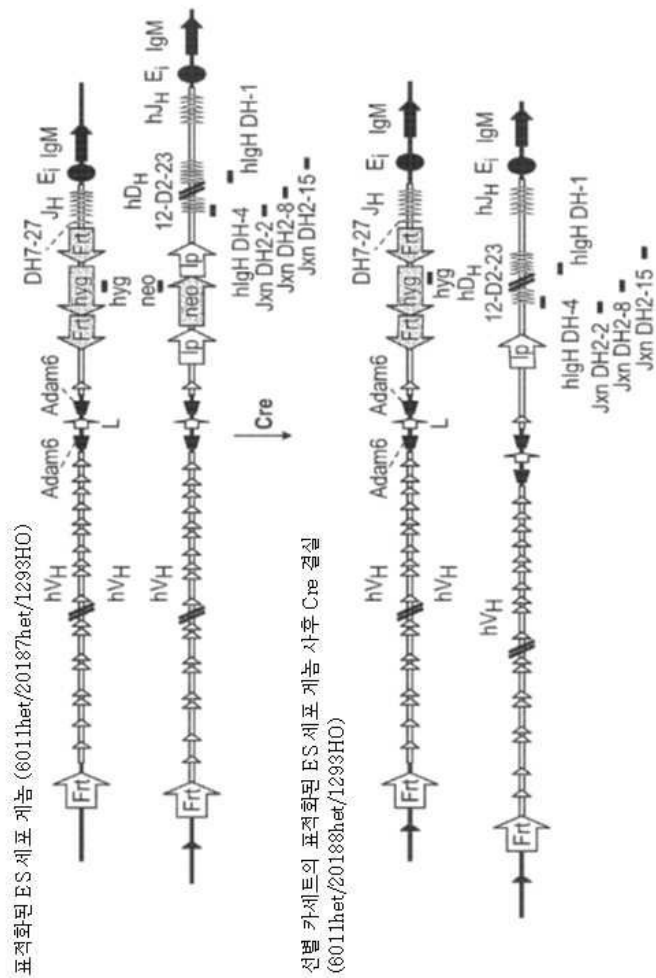
도면6



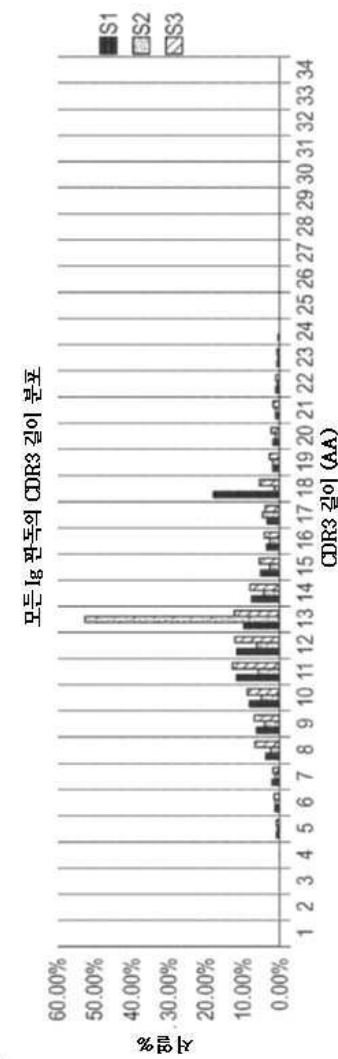
도면7



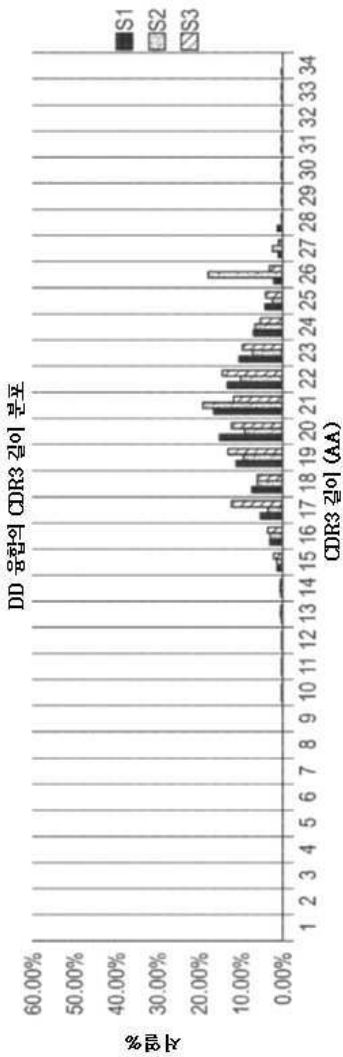
도면8



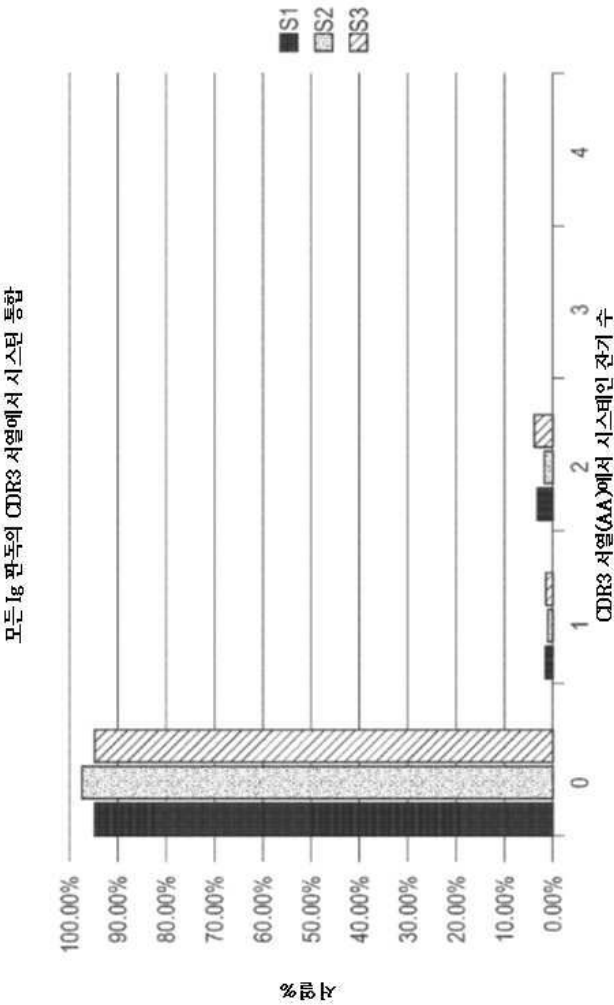
도면9a



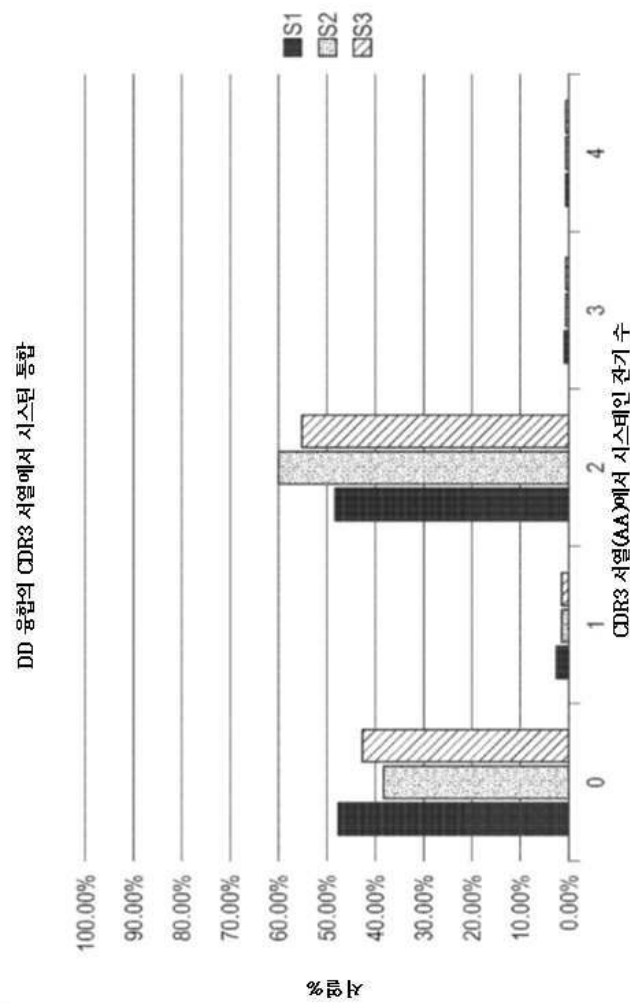
도면9b



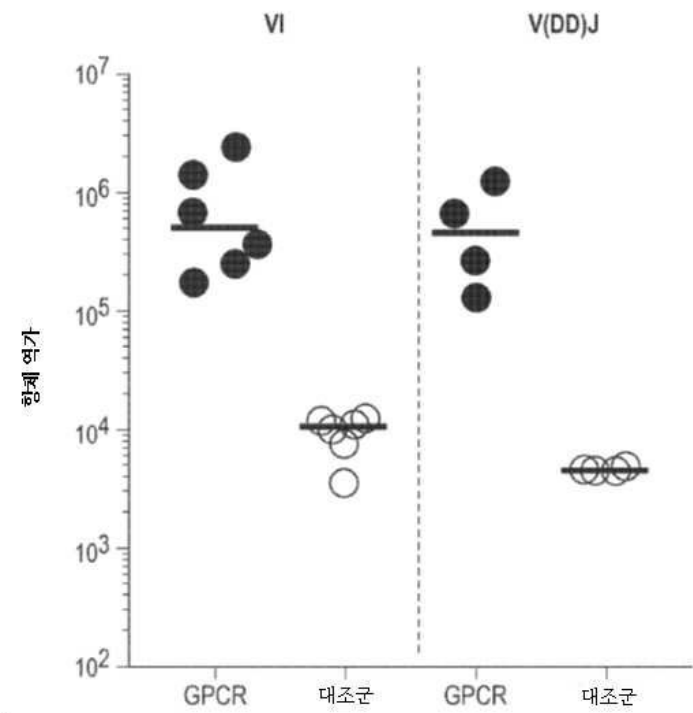
도면10a



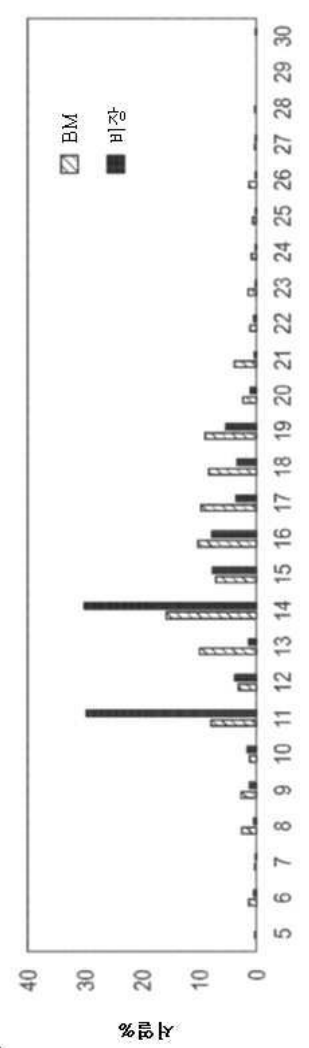
도면10b



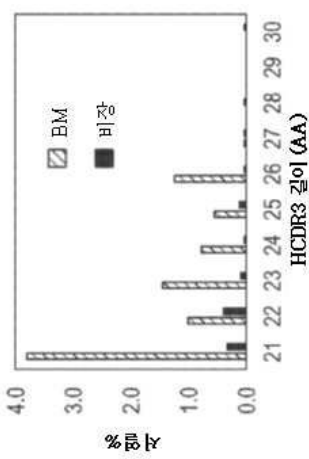
도면11



도면12a



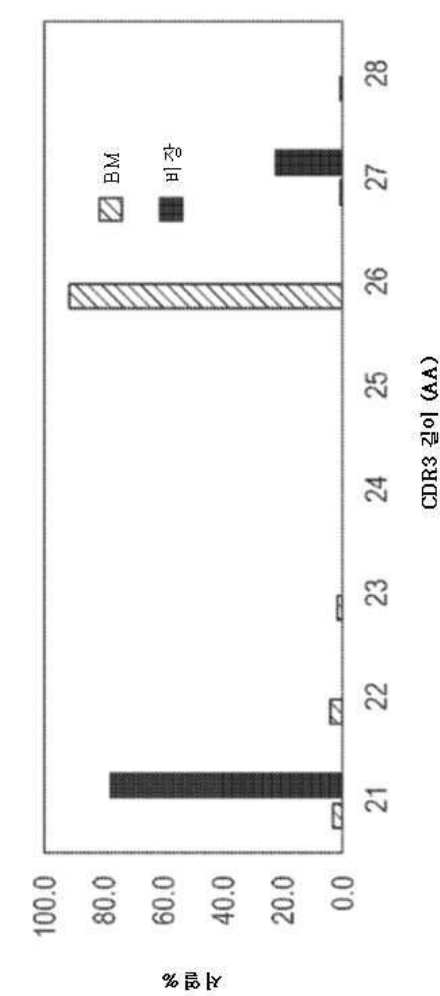
도면12b



도면12c

	HCDR3 > 21AA (%)
BM	8.8
비장	1.0

도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
MURPHY, Andrew J.

MACDONALD, Lynn

GUO, Chunguang

MCWHIRTER, John

VORONINA, Vera

<120> NON-HUMAN ANIMALS CAPABLE OF DH-DH REARRANGEMENT AND USES THEREOF

<130> 009108.347/10347

<150> 62685203

<151> 2018-06-14

<150> 62702206

<151> 2018-07-23

<150> 62812580

<151> 2019-03-01

<160> 151

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgHJ2

<400> 1

gaggctgtgc tactggtact tc 22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgHJ2

<400> 2

ccgtggcacc ctggtcactg t 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgHJ2

<400> 3

tggtgcctgg acagagaag	19
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VI741-42h1	
<400> 4	
tttttgtgca ccccttaatg g	21
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VI741-42h1	
<400> 5	
atgtggtatt acgatttttg ga	22
<210> 6	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VI741-42h1	
<400> 6	
ctctgtgaca ctgtgggtat aataacc	27
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VI742h2	
<400> 7	
tgtcacagag tccatcaaaa acct	24
<210> 8	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> VI742h2
 <400> 8
 caccaccccc tctc 14
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VI742h2
 <400> 9
 cctgagaccc tggcaagct 19
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Neo
 <400> 10
 ggtggagagg ctattcggc 19
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Neo
 <400> 11
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23
 <210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Neo
 <400> 12
 gaacacggcg gcatcag 17
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-2

<400> 13

atggcgcttg cagcgattc

19

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-2

<400> 14

ccaataactaa cgaggaaatg caaaccca

28

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-2

<400> 15

accctcactg ttgtccttct g

21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-8

<400> 16

gcaaacgtcc atctgaagga gaa

23

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-8

<400> 17

caaataaacg atggcaggct acaccg

27

<210> 18

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-8
 <400> 18
 gagttgccga accgacttat tg 22
 <210> 19
 <211> 23

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-15
 <400> 19
 gcaatggtag gttcatgtcc atc 23
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-15
 <400> 20
 accgccgctg gtactccaat 20
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-15
 <400> 21
 ccctggctgt ctgggttg 19

 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgHJ6
 <400> 22

cagcagaggg ttccatgaga a	21
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHJ6	
<400> 23	
caggacaggg ccacggacag tc	22
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHJ6	
<400> 24	
gccacccaga gaccttctgt	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgH31	
<400> 25	
atcacactca tcccatcccc	20
<210> 26	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgH31	
<400> 26	
cccttccta agtaccacag agtgggctc	29
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgH31	

<400> 27	
cacaggaag caggaactgc	20
<210> 28	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mIgHp2	
<400> 28	
gccatgcaag gccaaagc	17
<210> 29	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mIgHp2	
<400> 29	
ccaggaaaat gctgccagag cctg	24
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mIgHp2	
<400> 30	
agttcttgag ccttaggtg ctag	24
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mADAM6-1	
<400> 31	
ctgagcatgg tgtcccatct	20
<210> 32	
<211> 24	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> mADAM6-1
 <400> 32
 tgcagataag tgcacatctgg gcaa 24
 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mADAM6-1
 <400> 33
 ccagagtact gtagtggtc taag 24
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgk5
 <400> 34
 ccccgctctc ctctttttc 20
 <210> 35
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgk5
 <400> 35
 tcatgtccat taaccattt accttttgcc ca 32
 <210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgk5
 <400> 36
 tgcaagtgtc gccagcaag 19
 <210> 37

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgK21
 <400> 37
 catttgcta catatcaaag ccg 23
 <210> 38
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgK21
 <400> 38
 cctgagccag ggaacagccc actgata 27
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgK21
 <400> 39
 acatggctga ggcagacacc 20

 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mIgKd2
 <400> 40
 gcaaacaaaa accactggcc 20
 <210> 41
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mIgKd2
 <400> 41
 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mIgKd2
 <400> 42
 ggccacattc catgggttc 19

<210> 43
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hyg
 <400> 43
 tgcggccgat cttagcc 17

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hyg
 <400> 44
 acgagcgggt tcggccatt c 21

<210> 45
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hyg
 <400> 45
 ttgaccgatt ccttgcgg 18

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgHD-J.1

<400> 46	
tggcagctgt tcaacatgt	20
<210> 47	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHD-J.1	
<400> 47	
atccactgtc ccagacagca cc	22
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHD-J.1	
<400> 48	
ggcggtttgt ggagtttcct	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHD-J.2	
<400> 49	
tgttgccctcc ctgcttctag	20
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIgHD-J.2	
<400> 50	
cccagaccct cccttggtcc tga	23
<210> 51	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> hIgHD-J.2

<400> 51

ggcccacgca ttgttcag 18

<210> 52

<211> 3263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> >p46458 (23-D3-3-12_delJ1-3 donor]

<400> 52

tacgtaccct ggccaccgcc acccgggcct ctctgtctgt gggaaaacaa gtcagaaagc 60
aagtggatga gaggtggcgt gacagacca gcttcagatc tgctctaccg gtataacttc 120
gtataatgta tgctatacga agttatatgc atggcctccg cgccgggttt tggcgctcc 180
cgcgggcgcc cccctcctca cggcgagcgc tgccacgtca gacgaaggcg gcagcgagcg 240
tcctgatect tccgcccgga cgctcaggac agcggcccgc tgctcataag actcggcctt 300

agaaccccag tatcagcaga aggacatttt aggacgggac ttgggtgact ctagggcact 360
ggttttcttt ccagagagcg gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctcg gcgattctgc 420
ggagggatct ccgtggggcg gtgaacgccg atgattatat aaggacgcgc cgggtgtggc 480
acagctagtt ccgtcgagc cggtgatttg gtgcggttc ttgtttgtgg atcgctgtga 540
tcgtcacttg gtgagtagcg ggctgctggg ctggccgggg ctttcgtggc cgccgggccg 600
ctcggtggga cggaagcgtg tggagagacc gccaagggt gtagtctggg tccgcgagca 660
aggttgccct gaactggggg ttggggggag cgcagcaaaa tggcggctgt tcccagttct 720

tgaatggaag acgtttgtga ggccggctgt gaggtcgttg aaacaagggt gggggcatgg 780
tgggcggcaa gaacccaagg tcttgaggcc ttcgctaag cgggaaagct cttattcggg 840
tgagatgggc tggggcacca tctggggacc ctgacgtgaa gtttgcact gactggagaa 900
ctcggtttgt cgtctgttc gggggcggca gttatggcgg tgccgttggg cagtgcaccc 960
glacctttgg gagcgcgcg cctcgtcgtg tcgtgacgtc acccgttctg ttggcttata 1020
atgcagggtg gggccacctg ccggtagggt tgccgttaggc ttttctccgt cgcaggacgc 1080
agggttcggg cctagggtag gctctcctga atcgacaggc gccggacctc tggtaggggg 1140

agggataagt gaggcgtcag tttcttttgg cggttttatg tacctatctt cttaaagtagc 1200
tgaagctccg gttttgaact atgcgctcgg ggttggcgag tgtgttttga gaagtttttt 1260
aggcaccttt tgaaatgtaa tcatttgggt caatatgtaa ttttcagtgt tagactagta 1320

aattgtccgc taaattctgg ccgtttttgg cttttttgtt agacgtcgag ctagcctaga 1380
ttgggaaccc gggctctctcg aattgttgac aattaatcat cggcatagta tatcggcata 1440
gtataatacg acaaggtgag gaactaaacc atccaccatg attgaacaag atggattgca 1500
cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 1560

aatcggtgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 1620
tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 1680
gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 1740
aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctacattgc 1800
tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatcggg cggtgcata cgcttgatcc 1860
ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat 1920
ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 1980

cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgacca 2040
tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 2100
ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat 2160
tgctgaagag ctggcgccg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc 2220
tcccgattcg cagcgcatcg cttctatcg cttcttgac gatttcttct gaagatccgc 2280
tgtaagtctg cagaaattga tgatctatta aacaataaag atgtccacta aaatggaagt 2340
ttttctgtc atactttgtt aagaagggtg agaacagagt acctacattt tgaatggaag 2400

gattggagct acgggggtgg ggggtgggtg ggattagata aatgcctgct ctttactgaa 2460
ggctctttac tattgcttta tgataatgtt tcatagtggg atatcataat ttaaacaagc 2520
aaaaccaaat taagggccag ctacttctc ccactcatga tctatagatc tatagatctc 2580
tcgtgggac atgtttttc tcttgattcc cactttgtgg ttctaagtac tgtggtttcc 2640
aaatgtgtca gtttcatagc ctgaagaacg agatcagcag cctctgttcc acatacatt 2700
cattctcagt attgttttgc caagtcttaa ttccatcaga cctcgacctg cagccggcgc 2760
gccataactt cgtataatgt atgtatagc aagttatgtc gacctcgaga atttacaaaa 2820

gaaaaggaaa aacacacttg gcagccttca gactctaat gattcttaac agcagcaaat 2880
tattggcaca agactccaga gtgactggca gggttgaggg ctggggtctc ccacgtgttt 2940
tggggctaac agcggaaggg agagcactgg caaagggtgt gggggccctt ggacccgacc 3000
cgccctggag accgcagcca catcagcccc cagccccaca ggccccctac cagccgcagg 3060
gtttttgtgc accccttaat ggggcctccc acaatgtggt attacgattt ttggagtgg 3120
tattatacc acagtgtcac agagtccatc aaaaaccaag atggctttcc ttctgcctcc 3180

tttctctctggg cccagcgtcc tctgtcctgg agctgggaga taatgtccgg gggctccttg 3240

gtctgcgctg ggccatgtac gta 3263

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA recognition site

<400> 53

tcagaaagca agtggatgag agg 23

<210> 54

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' D7.27 gRNA

<400> 54

ucagaaagca aguggaugag guuuuagagc uaucguguuu ug 42

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA recognition site

<400> 55

gtccaggac agaggacgct ggg 23

<210> 56

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' JH1-3 del gRNA

<400> 56

gcuccaggac agaggacgcu guuuuagagc uaucguguuu ug 42

<210> 57

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' up detect D7-27

<400> 57

gtgaacaggt ggaaccaac 19

<210> 58

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' ub pro-200

<400> 58

ccagtgcct agagtcaccc a 21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' neo detect

<400> 59

ctccactca tgatctatag a 21

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' down detect JH1-3 del

<400> 60

gtcccagttc ccaaagaaag 20

<210> 61

<211> 3263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> >p46459 (23-D3-3-12_delJ1-5 donor)

<400> 61

tacgtaccct ggccaccgcc acccgggcct ctctgctgct gggaaaacaa gtcagaaagc 60

aagtggatga gaggtggcgt gacagacca gcttcagatc tgctctaccg gtataacttc 120

gtataatgta tgctatacga agttatatgc atggcctccg cgccgggttt tggcgctcc 180
cgccggcgcc cccctctca cggcgagcgc tggcacgtca gacgaaggcg gcagcgagcg 240
tcctgaccc tccgcccga cgctcaggac agcggcccg tgctcataag actcgccctt 300

agaacccag tatcagcaga aggacatttt aggacgggac ttgggtgact ctagggcact 360
ggttttcttt ccagagagcg gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctcg gcgattctgc 420
ggagggatct ccgtggggcg gtgaaccccg atgattatat aaggacgcgc cgggtgtggc 480
acagctagtt ccgtcgcagc cgggatttgg gtgcgcgttc ttgtttgtgg atcgctgtga 540
tcgtcacttg gtgagtagcg ggctgctggg ctggccgggg ctttcgtggc cgccggggcg 600
ctcggtggga cggaagcgtg tggagagacc gccaaaggct gtagtctggg tccgcgagca 660
aggttgccct gaactggggg ttggggggag cgagcaaaa tggcggctgt tcccagctct 720

tgaatggaag acgcttgtga ggcgggctgt gaggtcgttg aaacaagggtg gggggcatgg 780
tgggcggcaa gaacccaagg tcttgaggcc ttcgctaag cggaagagct cttattcggg 840
tgagatgggc tggggcacca tctggggacc ctgacgtgaa gtttgtcact gactggagaa 900
ctcggtttgt cgtctgttgc gggggcgga gttatggcgg tgccgttggg cagtgcaccc 960
glacctttgg gagcgcgcg cctcgtcgtg tcgtgacgtc acccgttctg ttggcttata 1020
atgcagggtg gggccacctg ccggtagggtg tgcggtaggc ttttctccgt cgcaggacgc 1080
aggttccgg cctagggtag gctctcctga atcgacagcg gccggacctc tgggtagggg 1140

agggataagt gaggcgtcag tttcttttgg cggttttatg tacctatctt cttaagtagc 1200
tgaagctccg gttttgaact atgcgctcgg ggttggcgag tgtgttttga gaagtttttt 1260
aggcaccttt tgaatgtaa tcatttgggt caatatgtaa ttttcagtgt tagactagta 1320
aattgtccgc taaattctcg ccgtttttgg cttttttgtt agacgtcgag ctacccatga 1380
ttgggaacct gggtctctcg aattgttgac aattaatcat cggcatagta tatcggcata 1440
gtataatag acaaggtag gaactaaacc atccacctg attgaacaag atggattgca 1500
cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 1560

aatcggtcgc tcgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 1620
tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 1680
gtggctggcc acgacggggt ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 1740
aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc 1800
tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 1860
ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcgat 1920

ggaagccggt ctgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 1980

cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca 2040

tggcgatgcc tgcctgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 2100

ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 2160

tgtctgaagag cttggcgccg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc 2220

tcccgattcg cagcgcacg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gaagatccgc 2280

tgtaatctcg cagaaattga tgatctatta aacaataaag atgtccacta aaatggaagt 2340

ttttcctgtc atactttgtt aagaagggtg agaacagagt acctacattt tgaatggaag 2400

gattggagct acgggggtgg ggggtgggtg ggattagata aatgcctgct ctttactgaa 2460

ggctctttac tattgcttta tgataatgtt tcatagtgg atatcataat ttaaacaagc 2520

aaaaccaaat taaggccagc ctcatctcct ccatcatga tctatagatc tatagatctc 2580

tcgtgggac atgtttttc tcttgattcc cactttgtgg ttctaagtac tgtggtttcc 2640

aaatgtgtca gtttcatagc ctgaagaacg agatcagcag cctctgttcc acatacactt 2700

cattctcagt attgttttgc caagttctaa ttccatcaga cctcgacctg cagccggcgc 2760

gccataactt cgtataatgt atgctatagc aagttatgtc gacctcgaga atttcaaaa 2820

gaaaaggaaa aacacacttg gcagccttca gcactctaata gattcttaac agcagcaaat 2880

tattggcaca agactccaga gtgactggca gggttgaggg ctgggggtctc ccacgtgttt 2940

tggggctaac agcgggaagg agagcactgg caaaggtgct gggggcccct ggacccgacc 3000

cgccctggag accgcagcca catcagcccc cagccccaca ggccccctac cagccgcagg 3060

gtttttgtgc accccttaat ggggcctccc acaatgtggt attacgattt ttggagtgg 3120

tattatacc acagtgtcac agagtccatc aaaaacctcc tcaccacccc ctctctgagt 3180

ccacttaggg agactcagct tgccagggtc tcagggtcag agtcttggag gcattttgga 3240

ggtcaggaaa gaaagcctac gta 3263

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA recognition site

<400> 62

tcagaaagca agtggatgag agg 23

<210> 63

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' D7.27 crRNA
 <400> 63
 ucagaaagca aguggaugag guuuuagagc uaugcuguuu ug 42
 <210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA recognition site
 <400> 64
 ttagggagac tcagcttgcc agg 23
 <210> 65
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' JH1-5 del crRNA
 <400> 65
 uuagggagac ucagcuugcc guuuuagagc uaugcuguuu ug 42
 <210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' up detect D7-27
 <400> 66
 gtgaacaggt ggaaccaac 19
 <210> 67
 <
 211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' ub pro-200
 <400> 67

ccagtgcct agagtcaccc a	21
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' neo detect	
<400> 68	
ctccactca tgatctatag a	21
<210> 69	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' down detect JH1-5 del	
<400> 69	
acgcaatcat cagcacagc	19
<210> 70	
<211> 3345	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> >p51816 (12-D2-2-23 donor)	
<400> 70	
actagtagaa gataagctcc agaccccaaa gactgggacc tgccttctg ccaccgcgc	60
ggcgaatgcat ccgggtagg gaggcgcttt tccaaggca gtctggagtt gacaattaat	120
catcggcata gtatatcggc atagtataat acgacaaggt gaggaactaa accatggaga	180
aaaaaatcac tggatatacc accgttgata tatcccaatg gcatcgtaaa gaacattttg	240
aggcatttca gtcagttgct caatgtacct ataaccagac cgttcagctg gatattacgg	300
cctttttaaa gaccgtaaag aaaaataagc acaagtttta tccggccttt attcacattc	360
ttgccgcct gatgaatgct catccggaat tccgtatggc aatgaaagac ggtgagctgg	420
tgatatggga tagtggtcac ccttggtaca ccgttttcca tgagcaaact gaaacgtttt	480
catcgctctg gagtgaatac cagcagatt tccggcagtt tctacacata tattcgcaag	540
atgtggcgtg ttacggtgaa aacctggcct atttcctaa agggtttatt gagaatatgt	600
ttttcgtctc agccaatccc tgggtgagtt tcaccagttt tgatttaaac gtggccaata	660
tggacaactt cttcgcccc gttttacca tgggcaaata ttatcgcaa ggcgacaagg	720

tgctgatgcc gctggcgatt caggttcatc atgccgtttg tgatggcttc catgtcggca	780
gaatgcttaa tgaattacaa cagtactgcg atgagtggca gggcggggcg taaggatcct	840
gccatttcat tacctctttc tccgcaccgc acatagataa agcttatcga taccgtcgac	900
ctcgaggggg ggcccggtag ccgccggcgc ttgtagctcc agacctccgt gcctcccccg	960
accacttact gttagatagg cattgatcta ggacaggggc gcgatgttga cacgggccag	1020
ggagctgttc cacaagatc aaccccaaac cgggaccgcc tggcactcgc gccgtgcca	1080
cttcctctc catttgttcc cagcacctct gtgctccctc cctcctccct cttcagggg	1140
aacagcctgt gcagcccctc cctgcacccc acacctggg gaggcccaac cctgcctcca	1200
gccctttctc ccccgctgct ctctctgccc atccagacaa cctggggctc ccatccctgc	1260
agcctacacc ctggtctcca cccagacccc tgtctctccc tccagacacc cctcccaggc	1320
caacctgca cacgcaggcc ctcccccttt ctgctcccag agcctaccc tctacctct	1380
gtgcctaccc ctgcctcct cctgcccaca actcgagctc ttctctcct ggggcccctg	1440
agccatggca ctgacctgc actcccacc ccacactgcc catgccctca cttctctct	1500
ggacactctg accccgtcc cctcttgga cagccctgg tatttccagg acaaaggctc	1560
acccaagtct tccccatgca ggcccttgcc ctactgccc ggttacacgg cagcctcctg	1620
tgcacagaag caggagctc agcccttcca caggcagaag gcactgaaag aaatcggcct	1680
ccagcacctt gatgcacgtc cgctgtgtc tctcactgcc cgcacctgca gggaggctcg	1740
gcactccctg taaagacgag ggatccaggc agcaacatca tgggagaatg cagggtccc	1800
agacagccca gccctctgc aggcctctcc tgggaagaga cctgcagcca cactgaaca	1860
gccacggagc ccgttgata gtaactgagt cagtgaccga cctggagggc aggggagcag	1920
tgaaccggag cccagaccat agggacagag accagccgt gacatcccga gccctcact	1980
ggcggcccca gaacaccgcg tggaaacaga acagaccac attcccact ggaaaagggc	2040
agacactgct gagccccag caccagccct gagaaacacc aggcaacggc atcagagggg	2100
gctctgaga aagaaaggag gggaggtctc cttcaccagc aagtacttcc cttgacaaa	2160
aacagggtcc acgcaactcc cccaggacaa aggaggagcc cctgtacag cactgggctc	2220
agagtctct cccacacacc ctgagtttca gacaaaaacc ccctggaaat catagtatca	2280
gcaggagaac tagccagaga cagcaaggag ggactcagt actcccgcg ggacaggagg	2340
atthtggg ggctcgtgtc actgtgagga tattgtagta gtaccagctg ctataccac	2400
agtgtgaaaa cccacatcct gagagtgaca caaacccctg ctgtaaacgc ttccattct	2460

ggagctgagg ggctgggggg agcgtctggg aagtagggcc taggggtggc catcaatgcc 2520
 caaaacgcac cagactcccc cccagacatc accccactgg ccagtgagca gagtaaacag 2580
 aaaatgagaa gcagctggga agcttgcaca ggccccaagg aaagagcttt ggcgggtgtg 2640
 caagagggga tgcgggcaga gcctgagcag ggccttttgc tgtttctgct ttcctgtgca 2700
 gatagtcca taaactgggtg ttcaagatcg atggctggga gtgagcccag gaggacagtg 2760
 tgggaagggc acagggaagg agaagcagcc gctatcctac actgtcatct ttcaagagtt 2820
 tgcctgtgac ccacaatgct gcatcatggg atgcttaaca gctgatgtag acacagctaa 2880

 agagagaatc agtgaatgg atttcagca cagatctgaa taaattctcc agaattgtga 2940
 gccacacaga agcaagcaca aggaaagtgc ctgatgcaag ggcaaagtac agtgtgtacc 3000
 ttcaggctgg gcacagacac tctgaaaagc cttggcagga actccctgca acaaagcaga 3060
 gccctgcagg caatgccagc tccagagccc tccctgagag cctcatgggc aaagatgtgc 3120
 acaacagggtg tttctcatag ccccaaactg agaatgaagc aaacagccat ctgaaggaaa 3180
 acaggcaaat aaacgatggc aggttcatgg cgcttgacgc gattcaacag ctaaccaata 3240
 ctaacagga aatgcaaacc cagacagcca gaaggacaac agtgagggtt acagggtgact 3300

 ctgtggttga gttcatgaca atgctgagta attggagtaa ctagt 3345
 <210> 71
 <211> 2484
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> >p53419 (12-D2-8-23 donor)
 <400> 71
 actagtccca gtcctctcac aggcctctcc tgggaagaga cctgaagacg cccagtgcgc 60
 ggcatgcat ccgggtaggg gaggcgcttt tcccaaggca gtcaggagt gacaattaat 120
 catcggcata gtatatcgcc atagtataat acgacaaggt gaggaactaa accatggaga 180
 aaaaaatcac tggatatacc accgttgata tatcccaatg gcatcgtaaa gaacattttg 240
 aggcatttca gtcagttgct caatgtacct ataaccagac cgttcagctg gatattacgg 300

 cttttttaa gaccgtaaag aaaaataagc acaagtttta tccggccttt attcacattc 360
 ttgccgcct gatgaatgct catccggaat tccgtatggc aatgaaagac ggtgagctgg 420
 tgatatggga tagtggtcac cttgtttaca ccgttttcca tgagcaaact gaaacgtttt 480
 catcgtctg gagtgaatac cagcagatt tccggcagtt tctacacata tattcgcaag 540
 atgtggcgtg ttacggtgaa aacctggcct atttcctaa agggtttatt gagaatatgt 600
 tttctgtctc agccaatccc tgggtgagtt tcaccagttt tgatttaaac gtggccaata 660

tggacaactt cticgcccc gttttcacca tgggcaaata ttatacgcaa ggcgacaagg	720
tgctgatgcc gctggcgatt caggttcatc atgccgtttg tgatggcttc catgtcggca	780
gaatgcttaa tgaattacaa cagtactgcg atgagtggca gggcggggcg taaggatcct	840
gccatttcat tacctctttc tccgcacccg acatagataa agcttatcga taccgtcgac	900
ctcgaggggg ggcccgttac ccgcccggcg aacggagtct aacaccaaac ctccctggag	960
gccgatgggc gagcaaaatc cgacacgtaa ctacaagtag ggctgatct agtaacggag	1020
tcattgccag acctggaggc aggggagcag tgagcccgag cccacaccat agggccagag	1080
ggcacagcaa ctgacatccc aagccactca ctggtggtcc cacaacaccc catggaaaga	1140
ggacagaccc acagtccac ctggaccagg gcagagactg ctgagacca gcaccagaac	1200
caaccaagaa acaccaggca acagcatcag agggggctct ggcaaacag aggaggggag	1260
gtctcttca ccagcaggcg ctctccttga ccgaagacag gatccatgca actccccag	1320
gacaaaggag gagccccctg ttcagcactg ggctcagagt cctctccaag acaccagag	1380
tttcagacaa aaaccccctg gaatgcacag tctcagcagg agagccagcc agagccagca	1440
agatggggct cagtgcaccc cgcagggaca ggaggatttt gtgggggctc gtgtcactgt	1500
gaggatattg tactaatggt gtatgtata cccacagtgt gaaaaccac atcctgagag	1560
tgacacaaac cctactgca aacgcattcc acttctgggg ctgaggggct gggggagcgt	1620
ctgggaaata gggctcaggg gtgtccatca atgccccaaa cgcaccagac tcccctccat	1680
acatcacacc caccagccag cgagcagagt aaacagaaaa tgagaagcaa gctggggaag	1740
cttgcacagg cccaaggaa agagctttgg cgggtgtgta agaggggatg cgggcagagc	1800
ctgagcaggg ctttttgctg tttctgcttt cctgtgcaga gattccata aactggtgtt	1860
cgagatcaat ggctgggagt gagcccagga ggacagcgtg ggaagagcac agggaaggag	1920
gagcagccgc taccctacac tgtcatcttt caaaagtctt ccttgtgccc acattgctgc	1980
atcatgggat gcttaagagc tgatgtagac acagctaaag agagaatcag tgagatggat	2040
ttgcagcaca gatctgaata aattctccag aatgtggagc agcacagaag caagcacaca	2100
gaaagtgcct gatgcaagga caaagttcag tgggcacctt caggcattgc tgctgggcac	2160
agacattctg aaaagccctg gcaggaactc cctgtgacaa agcagaaccc tcaggcaatg	2220
ccagccccag agccctccct gagagcctca tgggcaaaga tgtgcacaac aggtgtttct	2280
catagcccca aactgagagc aaagcaaacg tccatctgaa ggagaacagg caaataaacg	2340
atggcaggct acaccgtgc atccaataag tcggttcggc aactcaactt catgaaatgc	2400

aaaccagac agccacaagc acaaaagtac agggttataa gcgactctgg ttgagttcat 2460
gacaatgctg agtaattgac tagt 2484
<210> 72
<211> 2321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> >p51818 (12-D2-15-23 donor)
<400> 72
actagtgaga ccagccgctg acatcccagag ctcttcaatg gtggcccat aacacacgcc 60
ggcgaatgcat ccgggtaggg gaggcgcttt tccaaggca gtcaggagt gacaattaat 120
catcggcata gtatatcggc atagtataat acgacaaggt gaggaactaa accatggaga 180
aaaaaatcac tggatatacc accgttgata tatcccaatg gcatcgtaaa gaacattttg 240

aggcatttca gtcagttgct caatgtacct ataaccagac cgttcagctg gatattacgg 300
ccttttttaa gaccgtaaag aaaaataagc acaagtttta tccggccttt attcacattc 360
ttgccgcct gaigaatgct catccggaat tccgtatggc aatgaaagac ggtgagctgg 420
tgatatggga tagtggtcac cttgtttaca cgtttttcca tgagcaaact gaaacgtttt 480
catcgctctg gagtgaatc cagcagcatt tccggcagtt tctacacata tattcgcaag 540
atgtggcgtg ttacggtgaa aacctggcct atttcctaa agggtttatt gagaatatgt 600
ttttcgtctc agccaatccc tgggtgagtt tcaccagttt tgatttaaac gtggccaata 660

tggacaactt cttcgcccc gttttcacca tgggcaaata ttatcgcaa ggcgacaagg 720
tgctgatgcc gtcggcgatt caggttcac atgccgtttg tgatggcttc catgtcgga 780
gaatgcttaa tgaattacaa cagtactcg atgagtggca gggcggggcg taaggatcct 840
gccatttcat tactctttt tccgcacccg acatagataa agcttatcga taccgtcgac 900
ctcgaggggg ggcccgtac ccgcccggcg ctaggaacaa taacacaccc acagccccac 960
ctggaacaga tagatgcacc aatatctccc agtaagctca agctcgcggg gcagagactg 1020
ctgagcccc agcaccagcc ccaagaaaca ccaggcaaca gtatcagagg gggtccccga 1080

gaaagagagg aggggagatc tcttcacca tcaaatgctt ccttgacca aaaacagggt 1140
ccacgaact cccccaggac aaaggaggag cccctatac agcactgggc tcagagtcct 1200
ctctgagaca cctgagttt cagacaacaa cccgctggaa tgcacagtct cagcaggaga 1260
acagacaaaa gccagaaaa gggacctcgg tgacaccagt agggacagga ggattttgtg 1320
ggggctcgtg tcaactgtgag gatattgtag tgggtgtagc tgctactccc acagtgtgaa 1380
aaccacatc ctgagagtga cacaacccc tactgcaaac acccccactc ctggggctga 1440

ggggctaggg gagcgtctgg gaagtagggt ccagggtgt ctatcaatgt ccaaaatgca 1500

 ccagactccc cgccaaacac caccacacca gccagcgagc agggtaaaca gaaaatgaga 1560
 ggctctggga agcttgaca ggccccaagg aaagagcttt ggcggtgtg caagagggga 1620
 tgcaggcaga gcctgagcag ggccttttgc tgtttctgct ttcctgtgca gagagtcca 1680
 taaactggtg ttcaagatca gtggctggga atgagcccag gagggcagtc tgtgggaaga 1740
 gcacaggga ggaggagcag ccgctatcct aactgtcat cttcaaaag ttgccttgt 1800
 gaccacacta ttgcatcatg ggatgcttaa gagctgatgt agacacagct aaagagagaa 1860
 tcagtगत gaatttgag catagatctg aataaactct ccagaatgtg ggcagtaca 1920

 gaagcaaaca cacagaaagt gcctgatgca aggacaaagt tcagtgggca ccttcaggca 1980
 ttgtctgtgg gcacagacac tctgaaaagc cctggcagga tctcctgag acaaagcaga 2040
 accctcaggc aatgccagc ccagagccct cctgagagc gtcagtggga aagatgtgca 2100
 gaacagctga ttatcataga ctcaactga gaacagagca aacgtccatc tgaagaacag 2160
 tcaaataagc aatggtaggt tcatgtccat ctcatcggtc agtaaaaata ccgccgttg 2220
 tactccaatg caaacccaga cagccagggg acaacagtag agggctacag gcggctttgc 2280
 ggttgagttc atgacaatgc tgagtaattg gagtaactag t 2321

 <210> 73
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1 P51816(D2-2)
 <400> 73
 tgttagatag gcattgatct aggcacgggg cgcgatgttg 40
 <210> 74
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2 P51816(D2-2)
 <400> 74
 gcgcttgag cgattcaaca gctaaccaat actaacgagg 40
 <210> 75
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> 10 P53419(D2-8)
 <400> 75
 cgagcaaaat ccgacacgta actacaagta gggcctgatac 40

<210> 76
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16 P53419(D2-8)
 <400> 76
 ctacacccgt gcatccaata agtcgggttcg gcaactcaac 40

<210> 77
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 8 P51818(D2-15)
 <400> 77
 atagatgcac caatatctcc cagtaagctc aagctcgcgg 40

<210> 78
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18 P51818(D2-15)
 <400> 78
 tccatctcat cggtcagtaa aaataccgcc gctggtactc 40

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' hIgHD HU2(h268)
 <400> 79
 gcagtaaccc tcaggaagca 20

<210> 80

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' hIghD HU2 AgeI(h269)
 <400> 80
 cttccaccgg tacagccaca ccaaggatc c 31
 <210> 81
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' hIghD HD2 XhoI(h271)
 <400> 81
 cttccctcga ggaacactgt cagctccac a 31
 <210> 82
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' hIghD HD2(h272)
 <400> 82
 agatcctcca tgcgtgctg 19
 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' hIghD HU2 detect(h270)
 <400> 83
 tctcctctcg tcgcctctac 20
 <210> 84
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' ub pro-200
 <400> 84

ccagtgccct agagtcaccc a	21
<210> 85	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' neo detect	
<400> 85	
ctccactca tgatctatag a	21
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' hIgHD HD2 detect(h273)	
<400> 86	
gggtgcttgg gtcctgtag	20
<210> 87	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' D2-2 Cas9 DNA target	
<400> 87	
aggtctggag ctacaagcgg tgg	23
<210> 88	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' D2-2 gRNA	
<400> 88	
aggucuggag cuacaagcgg guuuuagagc uaucguguuu ug	42
<210> 89	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 3' D2-2 Cas9 DNA target
 <400> 89
 aggacaacag tgagggttac agg 23
 <210> 90
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' D2-2 gRNA
 <400> 90
 aggacaacag ugaggguuac guuuuagagc uaugcuguuu ug 42
 <210> 91
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' up detect D2-2(h274)
 <400> 91
 gtcaaaggtg gaggcagtg 19
 <210> 92
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' cm up detect
 <400> 92
 tccagctgaa cggctctggtt a 21
 <210> 93
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> D2-2seqF2
 <400> 93
 agcgattcaa cagctaacc 19
 <210> 94
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' down detect D2-2(h275)
 <400> 94
 ccagtagaag taacgaccac 20
 <210> 95
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> J0-1
 <400> 95
 ctccagaccc ccaagaactgg gacctgcctt cctgccaccg cttgtagctc cagacctcgc 60
 tgcctccccc gaccattac 80
 <210> 96
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <
 <220><223> 5' up detect D2-2(h274)
 <400> 96
 gtcaaaggtg gaggcagtg 19
 <210> 97
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> D2-2seqR1
 <400> 97
 cccgtgccta gatcaatgc 19
 <210> 98
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> D2-2seqF1
 <400> 98
 aggcatatgat ctaggcacg 19

<210> 99
 <211> 19
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> D2-2seqR2
 <400> 99
 ctgttgaatc gctgcaagc 19
 <210> 100
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' D2-8 Cas9 DNA target
 <400> 100
 acctgaagac gccagtcaa cgg 23
 <210> 101
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' D2-8 crRNA
 <400> 101
 accugaagac gccagucua guuuuagagc uaugcuguuu ug 42
 <210> 102
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' D2-8 Cas9 DNA target
 <400> 102
 gccacaagca caaaagtaca ggg 23
 <210> 103
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3' D2-8 crRNA

<400> 103
gccacaagca caaaaguaca guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 104
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5' up detect D2-8(h276)
<400> 104
gccttaccca agtctttcc 19

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3' cm up detect
<400> 105
tccagctgaa cggctctggtt a 21

<210> 106
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> D2-8seqF2
<400> 106
tccaataagt cgggtcggc 19

<210> 107
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3' down detect D2-8(h277)
<400> 107
gcagaagtaa ccaccactg 19

<210> 108
<211> 80
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> J0-2

<400> 108

tcacaggcct ctctgggaa gagacctgaa gacgccagtc caacggagtc taacaccaaa 60

cctccctgga ggccgatggg 80

<210> 109

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' up detect D2-8(h276)

<400> 109

gccttaccca agtctttcc 19

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-8seqR1

<400> 110

gccctacttg tagttacgtg 20

<210> 111

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-8seqF1

<400> 111

gcaaaatccg acacgtaac 19

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-8seqR2

<400> 112

cgaaccgact tattggatgc 20

<210> 113

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' D2-8 Cas9 DNA target

<400> 113

ggtggcccca taacacacct agg 23

<210> 114

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' D2-8 crRNA

<400> 114

gguggcccca uaacacaccu guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 115

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' D2-8 Cas9 DNA target

<400> 115

ggacaacagt agagggtac agg 23

<210> 116

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' D2-8 crRNA

<400> 116

ggacaacagu agaggguac guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' up detect D2-15(h278)

<400> 117

gcactccctc taaagacaag	20
<210> 118	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' cm up detect	
<400> 118	
tccagctgaa cggctctggtt a	21
<210> 119	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> D2-15seqF2	
<400> 119	
gtaaaaatac cgccgctgg	19
<210> 120	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' down detect D2-15(h279)	
<400> 120	
gcattttcct gttcttgcg	19
<210> 121	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> J0-3	
<400> 121	
gtgacatcc cgagctcctc aatggtggcc ccataacaca cctaggaaac ataacacacc	60
cacagcccca cctggaacag	80
<210> 122	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' up detect D2-15(h278)*

<400> 122

gcactccctc taaagacaag

20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-15seqR1

<400> 123

ctgggagata ttggtgcatc

20

<210> 124

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-15seqF1

<400> 124

tgcaccaata tctcccagt

19

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> D2-15seqR2

<400> 125

cggcgggtatt ttactgacc

20

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-1

<400> 126

tttttgtgca ccccttaatg g

21

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-1

<400> 127

atgtggtatt acgatttttg ga 22

<210> 128

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-1

<400> 128

tctgtgacac tggggtata ataacc 26

<210> 129

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-2

<400> 129

cccacagtgt cacagagtc at 22

<210>

130

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-2

<400> 130

caagatggct ttccttctgc ctcc 24

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23D3.312-2

<400> 131

tcccagctcc aggacagag 19

<210> 132
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 23D3.312-3
 <400> 132
 tgtcacagag tccatcaaaa acct 24

<210> 133
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 23D3.312-3
 <400> 133
 caccaccccc tctc 14

<210> 134
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 23D3.312-3
 <400> 134
 cctgagaccc tggcaagct 19

<210> 135
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-2
 <400> 135
 atggcgcttg cagcgattc 19

<210> 136
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-2

<400> 136
ccaataactaa cgaggaaatg caaaccca 28
<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Jxn DH2-2
<400> 137
accctcactg ttgtccttct g 21
<210> 138
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Jxn DH2-8
<400> 138
gcaaacgtcc atctgaagga gaa 23

<210> 139
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Jxn DH2-8
<400> 139
caaataaacg atggcaggct acacccg 27
<210> 140
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Jxn DH2-8
<400> 140
gagttgccga accgacttat tg 22
<210> 141
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Jxn DH2-15
 <400> 141
 gcaatgtag gttcatgtcc atc 23

<210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-15
 <400> 142
 accgccgctg gtactccaat 20
 <210> 143
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Jxn DH2-15
 <400> 143
 ccctggctgt ctgggtttg 19
 <210> 144
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 144
 cacagtg 7

<210> 145
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 145
 acaaaaacc 9
 <210> 146
 <211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Template switching oligo

<400> 146

agcagtggta tcaacgcaga gtacatggg 29

<210> 147

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1st round PCR primers IgM Constant

<400> 147

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgggaaga catttgggaa ggac 54

<210> 148

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1st round PCR primers PE2-PIIA

<400> 148

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctaagcag tggtatcaac gcagagt 57

<210> 149

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2nd round PCR Primers

<220><221> misc_feature

<222> (30)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 149

aatgatacgg cgaccaccga gatctacaen nnnnnacact ctttcctac acgacgtct 60

tccgatct 68

<210> 150

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2nd round PCR Primers

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 150

caagcagaag acggcatacg agatnnnnnn gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg 60

atct 64

<210> 151

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23-mer RSS from VH1-69

<400> 151

cacagtgtga aaaccacat cctgagagtg acacaaacc 39