(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월05일
(11) 등록번호 10-2211911
(24) 등록일자 2021년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/85* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7037332(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년06월22일
심사청구일자 2020년01월15일
(85) 번역문제출일자 2019년12월17일
(65) 공개번호 10-2019-0142436
(43) 공개일자 2019년12월26일
(62) 원출원 특허 10-2019-7017074
원출원일자(국제) 2011년06월22일
심사청구일자 2019년07월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/041366
(87) 국제공개번호 WO 2011/163311
국제공개일자 2011년12월29일
(30) 우선권주장
61/357,314 2010년06월22일 미국(US)
61/357,317 2010년06월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010039900 A1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 32 항

(73) 특허권자
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
맥도날드 린
미국 뉴욕주 10605 화이트 플레인즈 게드니 웨이 16
스티븐스 션
미국 캘리포니아주 94158 샌프란시스코 #413 베리 스트리트 355
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

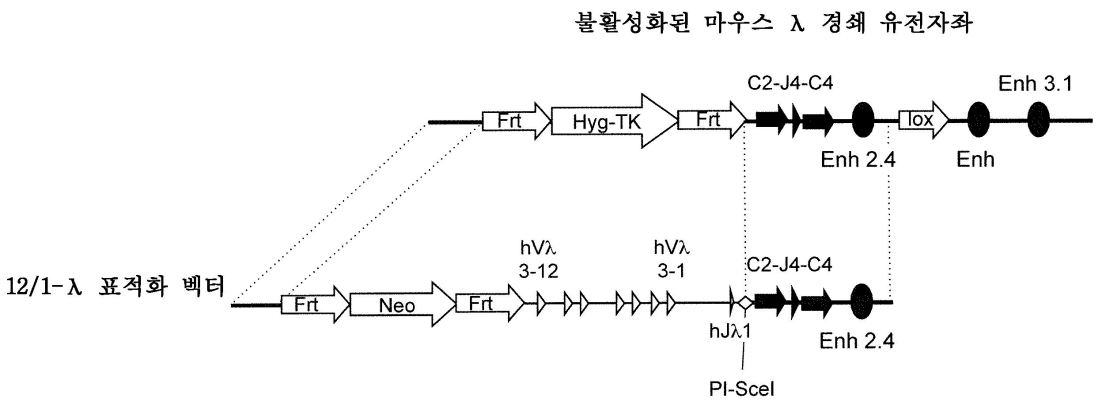
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **사람 람다 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 경쇄를 발현하는 마우스**

(57) 요 약

사람 λ 가변(hVλ) 서열을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스, 및 전이유전자 또는 에피솜으로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스(여기서, 상기 hVλ 서열은 마우스 불변 서열과 연결되어 있다)를 포함한다. 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 유용한 체세포적으로 돌연변이된 사람 λ 가변 서열의 공급원인 마우스가 제공된다. 사람 항체를 포함하여, 사람 λ 가변 서열을 포함하는 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
A01K 2217/07 (2013.01)
A01K 2267/0325 (2013.01)
(72) 발명자
규레르 케이건
미국 뉴욕주 10595 발할라 파멜라 레인 8
머피 앤드류 제이.
미국 뉴욕주 10520 크로톤-온-허드슨 뉴턴 코트 10
호시아와 캐롤리나 에이.
미국 뉴욕주 10591 태리타운 세컨드 플로어 처치 스트리트 14

(56) 선행기술조사문헌
WO2011004192 A1
JP2005510253 A
WO2000026373 A1
The Journal of Experimental Medicine, vol. 189(10) pp.1611-1619(1999.05.17.)
WO2009143472 A2
JP04500911 A
KR1020050042792 A
KR1019930702999 A
KR1020030074634 A
A.J. MURPHY: "BAC-based modifications of the mouse genome: the big and the backward.", PRESENTATION DONE AT WELLCOME TRUST ADVANCE COURSE: GENETIC MANIPULATION OF ES CELLS.(2011.01.13)
KR1020110125208 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

사람 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법이:

(a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계로서, 여기서 상기 유전적으로 변형된 마우스가:

(i) 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들을 포함하는 제1 경쇄 대립유전자; 및

(ii) 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 Vκ 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 Jκ 유전자 분절들을 포함하는 제2 경쇄 대립유전자

를 포함하는 생식선(germline) 게놈을 가지는, 단계;

(b) 상기 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대한 면역반응을 일으키도록 하는 단계; 및

(c) 상기 유전적으로 변형된 마우스로부터 상기 항원에 특이적인 항체를 분리시키는 단계로서, 상기 항체가:

(i) 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들의 사람 Vλ 유전자 분절 및 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들의 사람 Jλ 유전자 분절, 또는

(ii) 상기 하나 이상의 사람 Vκ 유전자 분절들의 사람 Vκ 유전자 분절 및 상기 하나 이상의 사람 Jκ 유전자 분절들의 사람 Jκ 유전자 분절

로부터 유래된 사람 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 단계를 포함하는, 사람 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 내인성 카파 경쇄 유전자좌(locus)에 있는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 경쇄 대립유전자가 내인성 카파 경쇄 유전자좌에 있는, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 업스트림을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 업스트림이 카파 인트론 인핸서(Eκi)인, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 다운스트림을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 다운스트림이 3' 카파 인핸서(Eκ3')인, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 12개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 28개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 40개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들이 사람 Jλ1, 사람 Jλ2, 사람 Jλ3, 사람 Jλ7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들이 사람 Jλ1 유전자 분절을 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 마우스는 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들 및 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들 사이에 위치한 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열은 서열번호: 100을 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 마우스가 내인성 마우스 중쇄 불변 영역 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 V_H 유전자 분절들, 하나 이상의 사람 D_H 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 J_H 유전자 분절들을 포함하는 면역글로불린 중쇄 대립유전자를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 마우스가 λ 불변 도메인을 포함하는 경쇄를 발현하지 않는, 방법.

청구항 17

항체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법이:

(a) 숙주 세포에서 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열을 발현시키는 단계로서, 상기 제1 뉴클레오타이드 서열이 사람 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 단계;

(b) 숙주 세포에서 면역글로불린 λ 경쇄를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 발현시키는 단계로서, 상기 제2 뉴클레오타이드 서열이 유전적으로 변형된 설치류로부터 동정된 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 유전적으로 변형된 설치류의 생식선 게놈이:

(i) 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들을 포함하는 제1 경쇄 대립유전자; 및

(ii) 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 Vκ 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 Jκ 유전자 분절들을 포함하는 제2 경쇄 대립유전자

를 포함하는, 단계;

(c) 면역글로불린 경쇄 및 면역글로불린 중쇄가 발현되어 항체를 형성하도록 상기 숙주 세포를 배양시키는 단계; 및

(d) 상기 항체를 상기 숙주 세포 또는 상기 숙주 세포 배양물로부터 수득하는 단계를 포함하는, 항체를 제조하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 내인성 카파 경쇄 유전자좌에 있는, 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 제2 경쇄 대립유전자가 내인성 카파 경쇄 유전자좌에 있는, 방법.

청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 업스트림을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 업스트림이 카파 인트론 인핸서(Eκi)인, 방법.

청구항 22

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 제1 경쇄 대립유전자가 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 다운스트림을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 내인성 마우스 Cκ 유전자의 인핸서 다운스트림이 3' 카파 인핸서(Eκ3')인, 방법.

청구항 24

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 12개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 25

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 28개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 26

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들이 적어도 40개의 사람 Vλ 유전자 분절들을 포함하는, 방법.

청구항 27

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들이 사람 Jλ1, 사람 Jλ2, 사람 Jλ3, 사람 Jλ7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 28

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들이 사람 Jλ1 유전자 분절을 포함하는, 방법.

청구항 29

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 마우스는 상기 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절들 및 상기 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절들 사이에 위치한 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열은 서열번호: 100을 포함하는, 방법.

청구항 31

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 마우스가 내인성 마우스 중쇄 불변 영역 유전자에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 사람 V_H 유전자 분절들, 하나 이상의 사람 D_H 유전자 분절들 및 하나 이상의 사람 J_H 유전자 분절들을 포함하는 면역글로불린 중쇄 대립유전자를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 마우스가 λ 불변 도메인을 포함하는 경쇄를 발현하지 않는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유전적으로 변형된 마우스는, 마우스 또는 사람 경쇄 불변 영역(λ 또는 카파(κ))과 작동적으로 연결된 마우스 또는 사람 람다 가변(Vλ) 경쇄 서열을 포함한다. 유전적으로 변형된 마우스는 사람 람다 가변(hVλ) 유전자 분절 및 사람 람다 J(hJλ) 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인, 및 마우스 경쇄 불변(C_L) 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 에피토프-결합 단백질을 발현한다. 유전적으로 변형된 마우스는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 재배열되지 않은 면역글로불린 람다(λ) 경쇄 가변 핵산 서열을 포함한다. 마우스는 내인성 마우스 경쇄 가변 영역 유전자 분절이 모두 하나 이상의 hVλ 유전자 분절 및 하나 이상의 hJλ 유전자 분절로 대체됨을 포함하는 내인성 경쇄 유전자좌 기원의 키메라 사람 λ/마우스 C_L 경쇄를 재배열하고 발현할 수 있다. 체세포적으로 돌연변이된 항체는 hVλ 도메인 및 마우스 C_L 도메인을 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 완전히 사람, 또는 부분적으로 사람 및 부분적으로 마우스인 항체를 발현하는 마우스는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 사람 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 가변 영역 유전자를 함유하는 전이유전자로부터 완전한 사람 항체를 발현하는 형질전환 마우스가 보고되었다. 내인성 마우스 중쇄 가변 영역(HCVR) 유전자 분절 및 카파(κ) 경쇄 가변 영역(LCVR) 유전자 분절이 사람 HCVR 및 LCVR 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 키메라 사람/마우스 카파 쇄를 갖는 키메라 항체를 생성하는 유전적으로 변형된 마우스가 널리 공지되어 있다.

[0003] 항체 경쇄는 2개의 별개의 유전자좌: 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나에 의해 암호화된다. 마우스 항체 경쇄는 주로 κ형으로 되어 있다. 사람에서 κ 대 λ 경쇄 사용 비율은 약 60:40인 반면 마우스에서는 약 95:5이다. 마우스에서 κ 경쇄의 편중된 사용은 완전 또는 부분적 사람 항체를 발현할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스에서 유지되는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 완전하거나 부분적인 사람 항체를 발현하는 마우스는 람다 가변 사용에 제한되어 있는 것으로 나타난다.

[0004] 당업계에서는 마우스든 사람이든 에피토프-결합 단백질을 생성시키는데 사용하기 위해서는 람다 가변 영역을 생성할 필요가 있다. 당업계에서는 증가된 람다 가변(Vλ) 사용을 나타내면서, 완전하거나 부분적인 사람 항체를 발현하는 마우스가 요구된다.

[0005] 당업계에서는 마우스가 증가된 λ 가변(Vλ) 사용을 나타내는, 완전 또는 부분적 사람 항체를 발현하는 마우스가 요구된다.

발명의 내용

[0006] 요약

[0007] 유전적으로 변형된 마우스, 배아, 세포, 조직, 및 마우스를 변형시키기 위한 핵산 작제물, 이들을 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 카파(κ) 경쇄와 관련된 람다(λ) 가변 영역(사람 또는 비사람)을 생성하는 마우스 및 세포가 제공된다. 예를 들어, 내인성 마우스 경쇄 유전자좌 기원의 κ 또는 λ 경쇄와 관련된 사람 λ 가변 영역을 생성하는 마우스 및 세포가 또한 제공된다. 또한, 람다 가변 영역을 포함하는 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 동족 람다 가변 영역과 함께 발현하는 중쇄를 선별하는 방법이 또한 제공된다.

[0008] 키메라 및 사람 항원-결합 단백질(예를 들어, 항체) 및 이들을 암호화하는 핵산이 제공되고, 이들은 체세포적으로 돌연변이된 가변 영역을 포함하고, 상기 항체는 마우스 경쇄 불변 도메인과 융합된 사람 Vλ 및 사람 Jλ로

부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 갖는 항체를 포함한다.

[0009] 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역을 포함하는 경쇄 상에 사람 λ 가변 영역 서열을 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, κ 불변 영역을 포함하는 경쇄상에 사람 λ 가변 영역 서열을 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 내인성 마우스 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역 서열과 연결된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 마우스가 제공되고, 하나의 실시형태에서, 마우스 불변 영역 서열은 λ 불변 서열이고, 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 서열은 κ 불변 서열이다.

[0010] 하나의 양상에서, 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 가변 유전자 분절(hVλ) 및 사람 λ 연결 유전자 분절(hJλ)을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ는 마우스 경쇄 유전자좌에 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ는 전이유전자 상에 있고, 사람 또는 마우스 불변 영역 서열에 작동적으로 연결되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ는 에피솜 상에 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 재배열되지 않은 hVλ 서열 및 hJλ 서열 및 마우스 경쇄 불변 영역(C_L) 핵산 서열로부터 유도된 경쇄를 포함하는 면역글로불린을 제조할 수 있다. 유전적으로 변형된 마우스를 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 또한 제공된다. (a) 마우스 중쇄 불변 영역과 융합된 사람 중쇄 가변 도메인(hV_H), 및 (b) 마우스 C_L 도메인과 융합된 사람 Vλ를 포함하는 항체가 제공되고; 여기서, 하나 이상의 상기 가변 도메인이, 예를 들어, 본 발명의 마우스에서 항체 또는 면역 세포 선별 동안에 체세포적으로 돌연변이됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ는 사람 또는 마우스 κ 불변 영역(Cκ)과 작동적으로 연결되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ는 사람 또는 마우스 λ 불변 영역(Cλ)과 작동적으로 연결되어 있다.

[0011] 하나의 양상에서, 생식선에서 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 사람 람다 가변 영역 서열은 마우스 면역글로불린 불변 영역 유전자 서열을 포함하는 경쇄에서 발현된다.

[0012] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 λ 유전자좌이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다.

[0013] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 내인성 경쇄 가변 서열이 결여되어 있다.

[0014] 하나의 실시형태에서, 모두 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 경쇄 가변 영역 유전자 분절은 하나 이상의 사람 λ 가변 영역 유전자 분절로 대체된다.

[0015] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 사람 Jλ 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 Jλ 서열은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0016] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 상기 사람 경쇄 유전자좌의 클러스터 A의 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 A의 단편은 hVλ3-27로부터 hVλ3-1을 통해 연장되어 있다.

[0017] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 상기 사람 경쇄 유전자좌의 클러스터 B의 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 B의 단편은 hVλ5-52로부터 hVλ1-40을 통해 연장되어 있다.

[0018] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 클러스터 A의 게놈 단편 및 클러스터 B의 게놈 단편을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 클러스터 A의 하나 이상의 유전자 분절 및 클러스터 B의 하나 이상의 유전자 분절을 포함한다.

[0019] 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수(naive) 레퍼토리의 10% 이상은 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, 및 9-49로부터 선택되는 2개 이상의 hVλ 유전자 분절로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수 레퍼토리의 20% 이상은 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, 및 9-49로부터 선택되는 3개 이상의 hVλ 유전자 분절로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수 레퍼토리의 30% 이상은 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, 및 9-49로부터 선택되는 4개 이상의 hVλ 유전자 분절로부터 유도된다.

[0020] 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역과 융합된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.

[0021] 하나의 실시형태에서, 상기 면역글로불린 경쇄는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌로부터 발현된다.

[0022] 하나의 양상에서, 마우스 κ 경쇄 불변 영역 서열과 연속성인 λ 경쇄 가변 영역 서열(Vλ) 및 하나 이상의 J 서열(J)을 포함하는 마우스가 제공된다.

[0023] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 기능성 마우스 Vκ 및/또는 마우스 Jκ 유전자 분절이 결여되어 있다.

[0024] 하나의 실시형태에서, 상기 Vλ는 사람 Vλ(hVλ)이고, 상기 J는 사람 Jλ(hJλ)이다. 하나의 실시형태에서, 상기 hVλ 및 상기 hJλ는 재배열되지 않은 유전자 분절이다.

[0025] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 다수의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절 및 하나 이상의 hJλ 유전자 분절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 다수의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절은 12개 이상의 유전자 분절, 28개 이상의 유전자 분절 또는 40개 이상의 유전자 분절이다.

[0026] 하나의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 hJλ 유전자 분절은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0027] 하나의 실시형태에서, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 전체적으로 또는 부분적으로 결실되어 있다.

[0028] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 κ 경쇄 불변 영역 서열은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 있다.

[0029] 하나의 실시형태에서, 마우스의 B 세포의 약 10% 내지 약 45%는 사람 λ 경쇄 가변(Vλ) 도메인 및 마우스 κ 경쇄 불변(Cκ) 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다.

[0030] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 가변 도메인은 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 및 1-51/1로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 재배열된 hVλ/hJλ 서열로부터 유도된다.

[0031] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 κ 경쇄 유전자좌 기원의 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 Vλ 서열 및 J 서열과 연속성이다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 Vλ 서열과 J 서열 사이에 위치한다.

[0032] 하나의 양상에서, (a) 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 12개 이상 내지 40개 이상의 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 하나 이상의 사람 Jλ 유전자 분절; (b) 상기 12개 이상 내지 40개 이상의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 분절과 상기 하나 이상의 사람 Jλ 서열 사이에 위치된 사람 Vκ-Jκ 유전자간 서열을 포함하는 마우스가 제공되고; 여기서, 상기 마우스는 사람 Vλ 도메인 및 마우스 Cκ 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다.

[0033] 하나의 양상에서, λ 가변 서열 및 κ 불변 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 제공된다.

[0034] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.

[0035] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수로부터 수득된 미성숙 B 세포 집단은 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.

[0036] 하나의 양상에서, 마우스 C_L 유전자를 포함하는 마우스 경쇄 유전자좌에 연결된 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.

[0037] 하나의 실시형태에서, Vλ 및/또는 Jλ 유전자 분절은 사람 유전자 분절이다. 하나의 실시형태에서, 상기 Vλ 및/또는 Jλ 유전자 분절은 마우스 유전자 분절이고, 상기 C_L은 마우스 Cκ이다.

[0038] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 λ 경쇄 유전자좌이다.

[0039] 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 있다.

[0040] 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 전이유전자 상에 있다.

[0041] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 중쇄 면역글로불린 유전자좌에서 하나 이상의 중쇄 V, D 및/또는 J 유전자 분절이 하나 이상의 사람 V, D 및/또는 J 유전자 분절로 대체됨을 추가로 포함한다.

[0042] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 을 포함한다.

[0043] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 λ 경쇄 가변 유전자 분절(Vλ) 및 λ 연결 유전자 분절(Jλ)을 포함한다.

[0044] 하나의 실시형태에서, 상기 경쇄 가변 유전자좌("V_L 유전자좌")는 하나 이상의 사람 Vλ(hVλ) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 사람 Jλ(hJλ) 유전자 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, V_L 유전자좌는 4개 이하의 hJλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 사람 λ 및 사람 κ 게놈 서열을 포함하는 연속 서열을 포함한다.

[0045] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 가변 유전자좌("κ 유전자좌")는 하나 이상의 사람 Vλ(hVλ) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 하나 이상의 사람 Jλ(hJλ) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 4개 이하의 hJλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 하나 이상의 hVλ 및 하나 이상의 hJλ를 포함하고, 기능성 Vκ 영역 유전자 분절이 결여되어 있거나 실질적으로 결여되어 있고, 기능성 Jκ 영역 유전자 분절이 결여되어 있거나 실질적으로 결여되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 어떠한 기능성 Vκ 영역 유전자 분절도 포함하지 않는다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 어떠한 기능성 Jκ 영역 유전자 분절도 포함하지 않는다.

[0046] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 가변 유전자좌("λ 유전자좌")는 하나 이상의 hVλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 유전자좌는 하나 이상의 사람 Jλ(hJλ) 유전자 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 λ 유전자좌는 4개 이하의 hJλ 유전자 분절을 포함한다.

[0047] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 다수의 hVλ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 다수의 hVλ는 사람에서 관찰되는 Vλ 사용의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 이상을 반영하는 λ 경쇄 가변 영역 레퍼토리의 발현이 수득되도록 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 유전자 분절 hVλ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0048] 하나의 실시형태에서, 상기 hVλ는 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 및 3-12를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 Vλ3-12 내지 Vλ3-1에 걸친 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 이상의 hVλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 hVλ는 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 및 3-12를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 Vλ3-12 내지 Vλ3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0049] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 13개 내지 28개 이상의 hVλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 hVλ는 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 및 3-27을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 Vλ3-27 내지 Vλ3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있고 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 λ 유전자좌에 있고 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0050] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 29개 내지 40개의 hVλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 유

전자좌는 Vλ3-29 내지 Vλ3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열 및 Vλ5-52 내지 Vλ1-40에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 유전적으로 변형된 마우스에서 hVλ1-40과 hVλ3-29 사이의 모든 또는 실질적으로 모든 서열은 본질적으로 hVλ1-40 유전자 분절의 다운스트림(3' 비번역된 부분의 다운스트림)에서 천연적으로(예를 들어, 사람 집단에서) 발견되는 대략 959bp의 사람 λ 서열, 제한 효소 부위(예를 들어, PI-SceI)에 이어서 천연적으로 발견되는 hVλ3-29 유전자 분절의 업스트림에서 대략 3,431 bp의 사람 λ 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 마우스 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 마우스 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 마우스 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 마우스 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 마우스 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0051] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 hJλ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 다수의 hJλ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 이상의 hJλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 4개의 hJλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 4개의 hJλ는 hJλ1, hJλ2, hJλ3, 및 hJλ7이다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 κ 유전자좌에 있고 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나의 hJλ를 포함한다. 특정 실시형태에서, 하나의 hJλ는 hJλ1이다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0052] 하나의 실시형태에서, V_L 유전자좌는 하나 이상의 hVλ, 하나 이상의 hJλ, 및 마우스 Cκ 유전자를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 hVλ, 하나 이상의 hJλ 및 마우스 Cλ 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일하다.

[0053] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 Vκ 유전자 분절의 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 하나 이상의 hVλ 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 여기서 상기 hVλ 유전자 분절은 내인성 마우스 Cκ 영역 유전자에 작동적으로 연결되어 상기 마우스는 사람 Vλ 유전자 분절을 재배열하고 사람 Vλ 도메인 및 마우스 Cκ를 포함하는 역 키메라 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 재배열되지 않은 마우스 Vκ 유전자 분절의 90 내지 100%는 하나 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된다. 특정 실시형태에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 $V_κ$ 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 12개 이상, 28개 이상 또는 40개 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된 것이다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 7개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절, 16개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절 또는 27개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된 것이다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 모든 마우스 Jκ 유전자 분절이 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 hVλ 유전자 분절은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 hVλ 유전자 분절 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0054] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 λ 유전자좌에서의 내인성 마우스 Vλ 유전자 분절이 내인성 마우스 λ 유전자좌에서의 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 여기서, 상기 hVλ 유전자 분절은 마우스 Cλ영역 유전자에 작동적으로 연결되어 상기 마우스는 hVλ 유전자 분절을 재배열하고, hVλ

도메인 및 마우스 Cλ를 포함하는 역 키메라 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상 동일하다. 하나의 실시형태에서, 재배열되지 않은 마우스 Vλ 유전자 분절의 90 내지 100%는 하나 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된다. 특정 실시형태에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 Vλ 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로 대체된다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 12개 이상, 28개 이상, 또는 40개 이상의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로의 대체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 7개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절, 16개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절 또는 27개 이상의 기능성 재배열되지 않은 hVλ 유전자 분절로의 대체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 모든 마우스 Jλ 유전자 분절이 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 hVλ 유전자 분절은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1 -51, 5-52 hVλ 유전자 분절 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 hJλ 유전자 분절은 Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0055] 하나의 양상에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 위치한 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.

[0056] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열은 hVλ 및 hJλ 유전자 분절을 포함하는 마우스의 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 있고, 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열은 hVλ와 hJλ 유전자 분절 사이에 배치된다. 특정 실시형태에서, 상기 hVλ 및 hJλ 유전자 분절은 재조합하여 마우스에서 기능성 사람 λ 경쇄 가변 도메인을 형성할 수 있다.

[0057] 하나의 실시형태에서, 다수의 hVλ 및 하나 이상의 hJλ를 포함하고 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열이 전사와 관련하여 근접하거나 3' 대부분의 hVλ 서열의 다운스트림 및 제1 hJλ 서열의 업스트림 또는 5'에 배치된 마우스가 제공된다.

[0058] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 사람 Vκ4-1 유전자 분절의 다운스트림 또는 3'의 약 130bp, 사람 Vκ4-1 유전자 분절의 3' 비번역 영역의 다운스트림 약 130bp에 위치한 영역이고, 사람 Jκ1 유전자 분절의 업스트림 또는 5'의 약 600bp에 걸쳐 있다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 크기가 약 22.8 kb이다. 하나의 실시형태에서, 상기 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 사람 Vκ 4-1 유전자 분절의 3' 비번역 영역의 말단으로부터 사람 Jκ1 유전자 분절의 업스트림 약 600bp까지 연장되어 있는 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역과 약 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 약 95% 이상 동일하다. 하나의 실시형태에서, Vκ-Jκ 유전자간 영역은 서열번호 100을 포함한다. 특정 실시형태에서, Vκ-Jκ 유전자간 영역은 서열번호 100의 기능성 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 Vκ-Jκ 유전자간 영역은 서열번호 100이다.

[0059] 하나의 양상에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 포함하는 마우스, 마우스 세포(예를 들어, 마우스 배아 줄기 세포), 마우스 배아, 및 마우스 조직이 제공되고, 여기서, 상기 유전자간 영역 서열은 이소성이다. 특정 실시형태에서, 상기 이소성 서열은 사람화된 내인성 마우스 면역글로불린 유전자좌에 위치한다.

[0060] 하나의 양상에서, 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 포함하는 분리된 핵산 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산 작제물은 표적화 암(arm)을 포함하여 마우스 경쇄 유전자좌에 대한 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역 서열을 표적화한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 표적화 암은 변형된 내인성 마우스 κ 유전자좌에 대한 상기 사람 Vκ-Jκ 유전자간 영역을 표적화하고, 여기서, 상기 표적화는 hVλ 서열과 hJλ 서열 사이의 위치에 대한 것이다.

[0061] 하나의 양상에서, 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 2개 이하의 경쇄 대립 유전자를 포함하고, 상기 경쇄 대립 유전자는 (a) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절; 및 (b) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 V_L 및 J_L 유전자 분절을 포함한다.

[0062] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 다른 실시형태에서, 상기 내인성

마우스 경쇄 유전자좌는 λ 유전자좌이다.

[0063] 하나의 실시형태에서, 상기 2개 이하의 경쇄 대립 유전자는 κ 대립 유전자 및 λ 대립 유전자, 2개의 κ 대립 유전자 및 2개의 λ 대립 유전자로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 2개의 경쇄 대립 유전자 중 하나는 Cλ2 유전자를 포함하는 λ 대립 유전자이다.

[0064] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나의 기능성 면역글로불린 경쇄 유전자좌 및 하나의 비기능성 경쇄 유전자좌를 포함하고, 여기서, 상기 기능성 경쇄 유전자좌는 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함한다.

[0065] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나의 기능성 면역글로불린 경쇄 유전자좌 및 하나의 비기능성 경쇄 유전자좌를 포함하고, 여기서, 상기 기능성 경쇄 유전자좌는 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일하다.

[0066] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자를 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자는 사람/마우스 중쇄를 발현하는 사람 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 사람 V_H 유전자 분절, 사람 D_H 유전자 분절 및 사람 J_H 유전자 분절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스는 2개의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자를 포함하고 상기 마우스는 사람/마우스 중쇄를 발현한다.

[0067] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 hVκ 및 재배열되지 않은 hJκ를 포함하는 제1 경쇄 대립 유전자; 및 내인성 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ를 포함하는 제2 경쇄 대립 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 경쇄 대립 유전자는 상기 유전적으로 변형된 마우스의 유일한 기능성 경쇄 대립 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 λ 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 λ 불변 영역을 포함하는 경쇄를 발현하지 않는다.

[0068] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 hVκ 및 재배열되지 않은 hJκ를 포함하는 제1 경쇄 대립 유전자; 및 내인성 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 유전자좌에서 재배열되지 않은 hVλ 및 재배열되지 않은 hJλ를 포함하는 제2 경쇄 대립 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 경쇄 대립 유전자는 상기 유전적으로 변형된 마우스의 유일한 기능성 경쇄 대립 유전자이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일하다.

[0069] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 6개의 면역글로불린 대립 유전자를 포함하고, 여기서, 제1 대립 유전자는 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하고, 제2 대립 유전자는 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vκ 및 Jκ 유전자 분절을 포함하고, 제3 대립 유전자는 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하고, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 마우스 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절을 포함하고, 제6 대립 유전자는 (a) 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자 분절, (b) 비기능성인 λ 유전자좌, 또는 (c) 완전히 또는 부분적으로 결실된 λ 유전자좌를 포함한다.

[0070] 하나의 실시형태에서, 상기 제1 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제2 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVκ및 hJκ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제3 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 재배열되지 않은 hV_H, hD_H 및 hJ_H를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제6 대립 유전자는 완전히 또는 부분적으로 결실된 내인성 마우스 λ 유전자좌를 포함한다.

[0071] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 6개의 면역글로불린 대립 유전자를 포함하고, 여기서, 상기 제1 대립 유전자는 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및

Jλ 유전자 분절을 포함하고, 제2 대립 유전자는 마우스 Cλ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vλ 및 Jλ 유전자를 분절을 포함하고, 제3 대립 유전자는 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vκ 및 Jκ 유전자 분절을 포함하고, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 마우스 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절을 포함하고, 제6 대립 유전자는 (a) 마우스 Cκ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 Vκ 및 Jκ 유전자 분절, (b) 비기능성인 κ 유전자좌, 또는 (c) 하나 이상의 요소가 결실된 κ 유전자좌를 포함한다.

[0072] 하나의 실시형태에서, 제1 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제2 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제3 대립 유전자는 재배열되지 않은 hVκ 및 hJκ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 재배열되지 않는 hV_H, hD_H 및 hJ_H 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제6 대립 유전자는 기능적으로 침묵된(functionally silenced) 내인성 마우스 κ 유전자좌를 포함한다.

[0073] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 마우스 C_L 도메인에 작동적으로 연결된 재배열된 hVλ 도메인을 포함하는 재배열된 항체 유전자를 포함하는 B 세포를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 마우스 Cκ 및 마우스 Cλ 도메인으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 도메인은 Cλ2 유전자로부터 유도된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 도메인은 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 도메인으로부터 유도된다.

[0074] 하나의 양상에서, Cκ인 C_L 상의 Vλ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 사람 Cκ, 사람 Cλ 또는 마우스 Cκ로부터 선택된 C_L 상의 hVλ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 마우스 Cκ 상의 hVλ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.

[0075] 하나의 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 10 내지 50%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 28%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0076] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 23 내지 34%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 11%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0077] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 19 내지 31%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 17%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0078] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 21 내지 38%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 24 내지 27%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0079] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포 약 10 내지 14%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 13%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0080] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장 세포의 약 31 내지 48%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 15 내지 21%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 30 내지 38%는 B 세포(즉 CD19-양성)이거나, 약 33 내지 48%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0081] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수의 약 52 내지 70%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 미성숙 B 세포(즉, CD19-양성/B220-중간 양성/IgM-양성)의 약 31 내지 47%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0082] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수의 약 60%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 미성숙 B 세포(즉, CD19-양성/B220-중간 양성/IgM-양성)의 약 38.3%는 마우스 Cκ 도메인과 융합된 hVλ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0083] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 V 및 사람 J 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인, 및 마우스 불변 영역 유전자로부터 유도된 불변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 유전자는 Cκ 유전자이다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 유전자는 Cλ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 Cλ 영역은 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스

Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 유전자로부터 유도된다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 사람 V, 사람 D 및 사람 J 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 중쇄, 및 마우스 중쇄 불변 영역 유전자로부터 유도된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 힌지-CH_2-CH_3 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH_1-힌지-CH_2-CH_3 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH_1-CH_2-CH_3-CH_4 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH_2-CH_3-CH_4 서열을 포함한다.

[0084] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 재배열된 사람 Vλ-Jλ 서열 및 마우스 Cκ서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 Vλ-Jλ 서열은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49, 및 1-51 유전자 분절로부터 선택된 hVλ 유전자 분절의 재배열로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 Vλ-Jλ 서열은 Jλ1 , Jλ2, Jλ3, 및 Jλ7 유전자 분절로부터 선택된 hJλ 유전자 분절의 재배열로부터 유도된다.

[0085] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 3-1/1 , 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1 -40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 및 1-51/1로부터 선택된 사람 Vλ/Jλ 서열을 포함하는 재배열된 면역글로불린 λ 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 B 세포는 마우스 중쇄 불변 도메인과 융합된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인, 및 마우스 κ 경쇄 불변 도메인과 융합된 사람 면역글로불린 λ 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현한다.

[0086] 하나의 양상에서, (a) 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 유전자 분절로부터 유도된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 중쇄(여기서, 상기 중쇄 가변 도메인은 마우스 중쇄 불변(C_H) 영역과 융합된다); 및 (b) 재배열되지 않은 hVλ 및 hJλ로부터 유도된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 경쇄(여기서, 상기 경쇄 가변 도메인은 마우스 C_L 영역과 융합된다)를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 제공된다.

[0087] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 (i) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V, D 및 J 유전자 분절이 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 V, D 및 J 유전자 분절, 및 마우스 C_H 유전자로 대체됨을 포함하는 중쇄 유전자좌, (ii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hVλ 및 hJλ 유전자 분절 및 마우스 Cκ 유전자로 대체됨을 포함하는 제1 κ 경쇄 유전자좌, (iii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hVκ 및 hJκ 유전자 분절 및 마우스 Cκ 유전자로 대체됨을 포함하는 제2 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 Cλ 영역을 포함하는 항체를 발현하지 않는다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 Cλ 유전자 및/또는 Vλ 및/또는 Jλ 유전자 분절의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 전체적으로 부분적으로 결실되어 있다.

[0088] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 (i) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V, D 및 J 유전자 분절이 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 V, D 및 J 유전자 분절 및 마우스 C_H 유전자로 대체됨을 포함하는 중쇄 유전자좌, (ii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 Vλ 및 Jλ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hVλ 및 hJλ 유전자 분절, 및 마우스 Cλ 유전자로 대체됨을 포함하는 제1 λ 경쇄 유전자좌, (iii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 Vλ 및 Jλ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hVλ 및 hJλ 유전자 분절, 및 마우스 Cλ 유전자로 대체됨을 포함하는 제2 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 유전자로부터 유도된다.

[0089] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 Cκ 유전자 및/또는 Vκ 및/또는 Jκ 유전자 분절의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0090] 하나의 양상에서, 항체를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 마우스에 의해 생성된 총 IgG 항체 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 25% 초과, 30% 초과, 35% 초과, 40% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과가 λ-유도된 가변 도메인을 포함하고, 상기 마우스는 마우스 Cκ 영역과 융합된 κ-유

도된 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스에 의해 생성된 전체 항체 중 약 15 내지 40%, 20 내지 40%, 25 내지 40%, 30 내지 40%, 또는 35 내지 40%가 λ-유도된 가변 도메인을 포함한다.

[0091] 하나의 실시형태에서, λ-유도된 가변 도메인은 hVλ및 hJλ로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ-유도된 가변 도메인은 마우스 Cκ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 λ-유도된 가변 영역은 마우스 Cλ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 Cλ 영역은 Cλ2 영역이다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ-유도된 가변 도메인은 hVκ 및 hJκ로부터 유도되고, 특정 실시형태에서는 마우스 Cκ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다.

[0092] 하나의 양상에서, 업스트림 상동성 암(arm) 및 다운스트림 상동성 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공되고, 상기 업스트림 및 다운스트림 상동성 암은 마우스 κ 유전자좌에 대한 작제물을 표적화하고, 상기 작제물은 기능성의 재배열되지 않은 hVλ 분절 및 기능성의 재배열되지 않은 hJλ 분절, 및 선별 또는 마커 서열을 포함한다.

[0093] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 마우스 Vλ2의 업스트림의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위를 갖는 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트 및 마우스 Jλ2의 3'의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed Hyg-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 Cλ2, Jλ4, Cλ4 및 마우스 인핸서 2.4를 포함한다.

[0094] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 Vλ1에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 마우스 Cλ1에 대해 3'의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 록스트(loxed) 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 λ 3' 인핸서 및 마우스 λ 3' 인핸서 3.1을 포함한다.

[0095] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 Vλ2에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 마우스 Jλ2에 대해 3'이고 마우스 Cλ2에 대해 5'인 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 하이그로마이신-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 3' 표적화 암은 마우스 Cλ2-Jλ4-Cλ4 유전자 분절 및 마우스 λ 인핸서 2.4를 포함한다.

[0096] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 Vλ2에 대해 5'의 마우스 λ유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, hVλ3-12 다운스트림으로부터 hJλ1의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 사람 게놈 단편, 및 마우스 Jλ2에 대해 3'인 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 Cλ2-Jλ4-Cλ4 유전자 분절 및 마우스 λ 인핸서 2.4를 포함한다.

[0097] 하나의 양상에서, hVλ3-12 다운스트림으로부터 hJλ1의 말단까지의 사람 λ경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0098] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 Vλ2에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 hVλ3-27 다운스트림에서 hVλ2-8의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 사람 게놈 단편을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 하이그로마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 게놈 단편은 3' 표적화 암을 포함한다. 특정 실시형태에서, 3' 표적화 암은 hVλ3-12 다운스트림에서 hVλ2-8의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 약 53kb를 포함한다.

[0099] 하나의 양상에서, hVλ3-27 다운스트림에서 hVλ3-12의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0100] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 Vλ2에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, hVλ5-52 다운스트림에서 hVλ1-40의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 제1 사람 게놈 단편, 제한 효소 부위, 및 사람 hVλ3-29 다운스트림으로부터 hVλ82K의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 제2 사람 게놈 단

편을 포함하는 분리된 DNA 단편이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 제한 효소 부위는 호밍 엔도뉴클레아제에 대한 부위이다. 특정 실시형태에서, 상기 호밍 엔도뉴클레아제는 PI-SceI이다. 하나의 실시형태에서, 상기 제2 사람 게놈 단편은 3' 표적화 암이다. 특정 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 hVλ3-29 다운스트림에서 hVλ82K의 말단까지 약 27kb의 사람 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0101] 하나의 양상에서, hVλ5-52 다운스트림에서 hVλ1-40의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0102] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 내인성 Vκ 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 2개의 병치된(juxtaposed) 리컴비나제 인식 부위, 병치된 리컴비나제 인식 부위에 대해 3'의 선별 카세트, 및 κ 경쇄 가변 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 병치된 리컴비나제 인식 부위는 서로에 대해 반대 배향으로 존재한다. 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 상이하다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 loxP 부위 및 lox511 부위이다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 네오마이신 카세트이다.

[0103] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 마우스 Jκ 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 선별 카세트, 선별 카세트에 대해 3'의 리컴비나제 인식 부위, 및 마우스 Jκ 유전자 분절에 대해 3' 및 마우스 κ 인트론 인핸서에 대해 5'의 마우스 κ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 하이그로마이신-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 상기 선별 카세트로서 전사와 동일한 방향으로 존재한다. 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 loxP 부위이다.

[0104] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 내인성 마우스 Vκ 유전자 분절의 5' 서열을 포함하는 제1 마우스 게놈 단편, 제1 리컴비나제 인식 부위, 제2 리컴비나제 인식 부위, 및 내인성 마우스 Jκ 유전자 분절의 3' 및 마우스 κ 인트론 인핸서의 5'의 서열을 포함하는 제2 마우스 게놈 단편을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0105] 하나의 양상에서, 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 유전적 변형은 상기 또는 본원에 기재된 하나 이상의 DNA 작제물을 이용한 변형을 포함한다.

[0106] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 분리된 DNA 작제물의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하는 방법에서 본원에 기재된 바와 같은 분리된 DNA 작제물의 용도가 제공된다.

[0107] 하나의 양상에서, 상기 및 본원에 기재된 바와 같은 DNA 작제물을 포함하는 표적화 벡터를 포함하는 비-사람 줄기 세포가 제공된다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 마우스로부터 유도된 비-사람 줄기 세포가 제공된다.

[0108] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 줄기 세포는 배아 줄기(ES) 세포이다. 특정 실시형태에서, 상기 ES 세포는 마우스 ES 세포이다.

[0109] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 줄기 세포의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 줄기 세포의 용도가 제공된다.

[0110] 하나의 양상에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적 변형을 포함하는 마우스 배아가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 공여체 ES 세포를 포함하는 숙주 마우스 배아가 제공되고, 여기서 상기 공여체 ES 세포는 본원에 기재된 바와 같은 유전적 변형을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 배아는 상실배 이전 단계의 배아이다. 특정 실시형태에서, 상실배 이전 단계의 배아는 4-세포 단계 배아 또는 8-세포 단계 배아이다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 마우스 배아는 배반포이다.

[0111] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 마우스 배아의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 마우스 배아의 용도가 제공된다.

[0112] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적으로 변형된 마우스로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자 서열을 포함하는 비-사람 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 B 세포이다. 하나의

실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 체세포적으로 돌연변이된, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화한다.

[0113] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적으로 변형된 마우스로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자 서열을 포함하는 비-사람 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 B 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 체세포적으로 돌연변이된, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화한다.

[0114] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 세포의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 세포의 용도가 제공된다.

[0115] 하나의 양상에서, (a) hVλ 유전자 분절 및 hJλ 유전자 분절로부터 유도된 가변 영역; 및 (b) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스 B 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 유전자는 Cκ 및 Cλ 유전자로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 유전자로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 B 세포는 (c) hV_H, hD_H 및 (d) hJ_H 분절로부터 유도된 가변 영역을 포함하는 동족 중쇄를 추가로 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 B 세포는 재배열된 λ 유전자를 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 상기 B 세포는 재배열된 κ 유전자를 포함하지 않는다.

[0116] 하나의 양상에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 내인성 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 hVλ 및 하나 이상의 hJλ를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 마우스 C_L 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포를 분리하는 단계(여기서, 상기 항체는 hVλ, hJλ 및 마우스 C_L 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 유전자는 마우스 Cκ 유전자이다.

[0117] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 내인성 κ 유전자좌에서 하나 이상의 hVλ 및 상기 κ 유전자좌에서 하나 이상의 hJλ를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 κ 유전자좌는 마우스 Cκ 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나, 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포를 분리하는 단계(여기서, 상기 항체는 hVλ, hJλ 및 마우스 Cκ 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0118] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 불변 유전자는 사람 Cκ 유전자 및 마우스 Cκ 유전자로부터 선택된다.

[0119] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 λ 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 hVλ 및 상기 λ 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 Jλ를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 Cλ 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나, 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포를 분리하거나, 상기 (b)의 마우스에서 항원에 결합하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 hVλ, hJλ 및 마우스 Cλ 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0120] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 사람 Cλ 유전자 및 마우스 Cλ 유전자로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 사람 Cλ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 Cλ 유전자는 Cλ1, Cλ2, Cλ3 및 Cλ7로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 마우스 Cλ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 마우스 Cλ 유전자는 Cλ1, Cλ2 및 Cλ3으로부터 선택된다. 보다 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 Cλ2이다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 유전자는 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 유전자로부터 유도된다.

[0121] 하나의 양상에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 내인성 경쇄 유전자좌에서 hVλ 및 hJλ를 포함하고, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 마우스 C_L 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 C_L 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0122] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스로부터 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 Vλ 및 마우스 C_L을 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0123] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 C_L 유전자 및 마우스 C_L 유전자 또는 이들의 기능성 단편으로부터 선택된다.

[0124] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 κ 경쇄 유전자좌에서 hVλ 및 hJλ를 포함하고, 상기 κ 경쇄 유전자좌는 마우스 Cκ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 Cκ 유전자 또는 이들의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0125] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 불변 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 Cκ 유전자 및 마우스 Cκ 유전자 또는 이의 기능성 단편으로부터 선택된다.

[0126] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스로부터 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 Vλ 및 마우스 Cκ를 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0127] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 hVλ 및 hJλ를 포함하고, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 Cλ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 Cλ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하는 방법이 제공된다.

[0128] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 Cλ 유전자 및 마우스 Cλ 유전자 또는 이들의 기능성 단편으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 마우스 Cλ 유전자 또는 이의 기능성 단편이다.

[0129] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스 유래의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 Vλ 및 마우스 Cλ를 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0130] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄를 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 불변 도메인과 융합된 상기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 핵산 서열을 사용하여 목적하는 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 목적하는 항체는 C_L 도메인과 융합된 Vλ 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 Vλ 도메인은 사람 도메인이고, 상기 C_L 도메인은 사람 또는 마우스 Cλ 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 상기 Vλ 도메인은 마우스 도메인이고, 상기 C_L 도메인은 사람 또는 마우스 Cκ 도메인이다.

[0131] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는, 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄를 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 불변 도메인의 핵산 서열과

융합된 상기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 핵산 서열을 사용하여 목적하는 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 목적하는 항체는 Cκ 도메인과 융합된 Vλ 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0132] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄 가변 도메인을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 중쇄 불변 도메인 및 사람 경쇄 불변 도메인을 암호화하는 핵산 서열에 융합된 핵산 서열을 사용하여 사람 서열로부터 유도된 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 마우스 Cλ 영역과 융합된 사람 Vλ 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0133] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 영역은 Cλ1, Cλ2 및 Cλ3으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 영역은 Cλ2이다.

[0134] 하나의 양상에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 C_L 도메인과 융합된 재배열된 사람 Vλ 도메인 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 상기 세포로부터, 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 상기 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계; 및 (e) 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다.

[0135] 하나의 실시형태에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 Cκ 도메인을 암호화하는 핵산 서열과 함께 동일한 핵산 분자상에 연속인 재배열된 사람 Vλ 도메인 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 세포로부터 클로닝하는 단계; 및 (e) 상기 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 상기 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다.

[0136] 하나의 실시형태에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 상기 항원에 대한 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 Cλ 도메인과 융합된 재배열된 사람 Vλ 도메인 서열을 암호화하는 DNA를 포함하는, 상기 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 상기 세포로부터, 재배열된 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계; 및 (e) 사람 Vλ 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 도메인은 마우스 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 도메인은 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 Cλ 유전자로부터 유도된다.

[0137] 하나의 양상에서, 내인성 경쇄 불변 영역(C_L)에 융합된 사람 λ-유도된 경쇄를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 항원으로의 면역화시에, 마우스 C_L 도메인과 융합된 사람 Vλ 도메인을 포함하는 항체를 제조한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 Cκ 도메인 및 Cλ 도메인으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 Cκ 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 Cλ 도메인이다. 특정 실시형태에서, 상기 Cλ 도메인은 Cλ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 Cλ 도메인은 마우스 Cλ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 C

λ 유전자로부터 유도된다.

[0138] 하나의 양상에서, 다수의 면역글로불린 중쇄와 연합된 다수의 면역글로불린 λ 경쇄를 발현하는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 중쇄는 사람 서열을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 상기 사람 서열은 가변 서열 C_H1, 힌지, C_H2, C_H3, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 다수의 면역글로불린 λ 경쇄는 사람 서열을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 상기 사람 서열은 가변 서열, 불변 서열 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 손상된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 포함하고 전이유전자 또는 염색체외 에피솜으로부터 중쇄 및/또는 λ 경쇄를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 일부 또는 모든 내인성 마우스 중쇄 유전자 분절(즉, V, D, J) 및/또는 일부 또는 모든 내인성 마우스 중쇄 불변 서열(예를 들어, C_H1, 힌지, C_H2, C_H3 또는 이들의 조합), 및/또는 일부 또는 모든 내인성 마우스 경쇄 서열(예를 들어, V, J, 상수, 또는 이들의 조합)이 내인성 마우스 유전자좌에서 하나 이상의 사람 면역글로불린 서열로 대체됨을 포함한다.

[0139] 하나의 양상에서, 사람 λ-유도된 경쇄를 갖는 항체를 제조하기에 적합한 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스에서 모든 또는 실질적으로 모든 항체는 사람 λ-유도된 경쇄와 함께 발현된다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ-유도된 경쇄는 내인성 경쇄 유전자좌로부터 발현된다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 경쇄 유전자좌이다.

[0140] 하나의 양상에서, 사람 항체에 대한 λ-유도된 경쇄를 제조하기 위한 방법이 제공되고, 본원에 기재된 마우스로부터 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 수득하고, 사람 항체를 제조하는데 상기 경쇄 서열 및 상기 중쇄 서열을 사용함을 포함한다.

[0141] 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 방법이 제공되고, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키고; 상기 마우스가 면역 반응을 나타내도록 하고; 상기 마우스로부터 항원에 결합하는 항원-결합 단백질을 수득하거나, 항원에 결합하는 항원-결합 단백질을 제조하는데 사용될 서열을 상기 마우스로부터 수득함을 포함한다.

[0142] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스로부터 유도된 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 배아 줄기 세포, 만능 세포, 유도된 만능 세포, B 세포 및 하이브리도마로부터 선택된다.

[0143] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적 변형을 포함하는 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 마우스 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마 및 쿼드로마(quadroma)로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 마우스 불변 서열과 융합된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 불변 서열은 마우스 κ 불변 서열이다.

[0144] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스로부터 유도된 조직이 제공된다.

[0145] 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 마우스 또는 세포의 용도가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 항원-결합 단백질은 사람 단백질이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 단백질은 사람 항체이다.

[0146] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스, 세포, 조직 또는 방법에 의해 제조된 항원-결합 단백질이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 항원-결합 단백질은 사람 단백질이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 단백질은 사람 항체이다.

[0147] 본원에 기재된 임의의 실시형태 및 양상은 달리 언급되지 않거나 상기로부터 명백하지 않은 경우 서로 연계하여 사용될 수 있다. 다른 실시형태는 계속되는 기재의 검토로부터 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0148] 도 1은 규모화하기 위한 것이 아니고, Vλ 유전자 분절(A, B 및 C), 및 Jλ 및 Cλ 영역 쌍(J-C 쌍)의 클러스터를 포함하는 사람 λ 경쇄 유전자좌의 상세한 도해를 나타낸다.

도 2는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 사용되는 표적화 전략에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 3은 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 사용되는 표적화

전략에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 4a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 12개의 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절(12/1-λ 표적화 벡터)를 포함하는 사람 λ 경쇄 서열로 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 표적화하기 위한 초기 표적화 벡터의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 4b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 12개의 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절(12/1-κ 표적화 벡터), 12개의 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절(12/4-κ 표적화 벡터), 12개의 hVλ 유전자 분절, 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열 및 hJλ1 유전자 분절(12(κ)1-κ 표적화 벡터) 및 12개의 hVλ 유전자 분절, 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절(12(κ)4-κ 표적화 벡터)를 포함하는 사람 λ 경쇄 서열로 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 표적화하기 위한 4개의 초기 표적화 벡터의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 5a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 40개의 hVλ 유전자 분절 및 단일 hJλ 유전자 분절을 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위한 표적화 전략의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 5b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 40개의 hVλ 유전자 분절 및 단일 hJλ 유전자 분절을 상기 마우스 κ 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위한 표적화 전략의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 6은 규모화하기 위한 것이 아니고, 사람 κ 유전자간 서열, 다중 hJλ 유전자 분절 또는 둘 다를 함유하는 하이브리드 경쇄 유전자좌의 작제용의 특유한 사람 λ-κ하이브리드 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 표적화 및 분자 엔진니어링 단계의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 7a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 Cλ2 유전자에 작동적으로 연결된 40개의 hVλ 유전자 분절 및 단일 hJλ 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 유전자좌 구조에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 7b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 연속 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열의 존재 또는 부재하에 40개의 hVλ 유전자 분절 및 1개 또는 4개의 hJλ 유전자 분절을 함유하는 4개의 독립적인 변형된 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 유전자좌 구조에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 8a는 야생형 마우스(WT), 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 12개의 hVλ 및 4개의 hJλ 유전자 분절(12hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 및 40개의 hVλ 및 1개의 hJλ 유전자 분절(40hVλ-1hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 $CD19^+$에 대해 게이팅된 $Ig\lambda^+$ 및 $Ig\kappa^+$ 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 8b는 야생형(WT), 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 12개의 hVλ 및 4개의 hJλ 유전자 분절(12hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 및 40개의 hVλ 및 1개의 hJλ 유전자 분절(40hVλ-1hJλ)에 대한 마우스 동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$ B 세포의 총수를 나타낸다.

도 9a는 상부 패널에서, 단일선(singlet)상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT), 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 B 및 T 세포(각각 $CD19^+$ 및 $CD3^+$)에 대해 염색된 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다. 하부 패널은 $CD19^+$ 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 $Ig\lambda^+$ 및 $Ig\kappa^+$ 발현에 대해 염색된 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 9b는 야생형 마우스(WT), 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$, $CD19^+Ig\kappa^+$ 및 $CD19^+Ig\lambda^+$ B 세포의 총수를 나타낸다.

도 9c는 $CD19^+$ 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 면역글로불린 D(IgD) 및 면역글로불린 M(IgM)에 대해 염색된 비장세포의 윤곽 플롯을 나타낸다. 성숙(WT에 대해 72개, 40hVλ-VκJκ-4hJλ에 대해 51개) 및 전이(WT에 대해 13개, 40hVλ-VκJκ-4hJλ에 대해 22개) B 세포는 윤곽 플롯 각각에 나타낸다.

도 9d는 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$ B 세포, 전이 B 세포

(CD19^{+}IgM^{hi}IgD^{lo}) 및 성숙 B 세포(CD19^{+}IgM^{lo}IgD^{hi})의 총수를 나타낸다.

도 10a는 상부 패널에서, 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 B 및 T 세포(각각 CD19^{+} 및 CD3^{+})에 대해 염색된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 하부 패널은 CD19^{+} 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 ckit^{+} 및 CD43^{+}에 대해 염색된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 프로(Pro) 및 프리(Pre) B 세포는 하부 패널의 윤곽 플롯 상에 나타낸다.

도 10b는 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 수거된 골수에서 프로(CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}) 및 프리(CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}) B 세포의 수를 나타낸다.

도 10c는 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 면역글로불린 M(IgM) 및 B220에 대해 염색된 단일선상에 게이팅된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 미성숙, 성숙 및 프로/프리 B 세포는 상기 윤곽 플롯의 각각에 나타낸다.

도 10d는 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 분리된 골수에서 미성숙(B220^{int}IgM^{+}) 및 성숙(B220^{hi}IgM^{+}) B 세포의 총수를 나타낸다.

도 10e는 야생형 마우스(WT) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개의 hVλ 및 4개의 Jλ 유전자 분절(40hVλ-VκJκ-4hJλ)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 분리된 Igλ 및 Igκ 발현에 대해 염색된 미성숙(B220^{int}IgM^{+}) 및 성숙(B220^{hi}IgM^{+}) B 세포에 대해 게이팅된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 11은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장세포 RNA로부터 증폭된 18개의 독립적인 RT-PCR 클론의 Vλ-Jλ-Cκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. A6 = 서열번호 57; B6 = 서열번호 58; F6 = 서열번호 59; B7 = 서열번호 60; E7 = 서열번호 61; F7 = 서열번호 62; C8 = 서열번호 63; E12 = 서열번호 64; 1-4 = 서열번호 65; 1-20 = 서열번호 66; 3B43 = 서열번호 67; 5-8 = 서열번호 68; 5-19 = 서열번호 69; 1010 = 서열번호 70; 11A1 = 서열번호 71; 7A8 = 서열번호 72; 3A3 = 서열번호 73; 2-7 = 서열번호 74. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. hJλ1 및 마우스 Cκ의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

도 12는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 연속 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장 세포 RNA로부터 증폭된 12개의 독립적인 RT-PCR 클론의 Vλ-Jλ-Cκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. 5-2 = 서열번호 87; 2-5 = 서열번호 88; 1-3 = 서열번호 89; 4B-1 = 서열번호 90; 3B-5 = 서열번호 91; 7A-1 = 서열번호 92; 5-1 = 서열번호 93; 4A-1 = 서열번호 94; 11A-1 = 서열번호 95; 5-7 = 서열번호 96; 5-4 = 서열번호 97; 2-3 = 서열번호 98. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. 사람 Jλ 및 마우스 Cκ 각각의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

도 13은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장 세포 RNA로부터 증폭된 3개의 독립적인 RT-PCR 클론의 Vλ-Jλ-Cλ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. 2D1 = 서열번호 101; 2D9 = 서열번호 102; 3E15 = 서열번호 103. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. hJλ1 및 마우스 Cλ2의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0149] 다양한 실시형태의 구체적인 특징이 상세히 논의되었지만, 특정 양상, 실시형태 및 실시예의 기재는 청구항의 주요 요지를 제한하지 않고 청구항이 본 발명의 범위를 기재한다. 본원에 사용된 모든 용어 및 어구는 당업자에

게 통상적으로 통용되는 의미를 포함한다.

[0150] 상기 용어 "연속"은 동일한 핵산 분자상에 발생함을 언급하고, 예를 들어, 2개의 핵산 서열이 동일한 핵산 분자상에 발생하지만 다른 핵산 서열에 의해 방해되는 경우 상기 핵산 서열은 "연속"이다. 예를 들어, 재배열된 V(D)J 서열은 불변 영역 유전자 서열과 "연속"이지만 V(D)J 서열의 최종 코돈은 상기 불변 영역 서열의 첫번째 코돈이 바로 이어지는 것은 아니다. 다른 예에서, 2개의 V 유전자 분절 서열은 이들이 동일한 게놈 단편상에 존재하는 경우 "연속"이지만 이들은 상기 V 영역의 코돈을 암호화하지 않는 서열에 의해 분리될 수 있고, 예를 들어, 이들은 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 또는 다른 비암호화 서열에 의해 분리될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 연속 서열은 야생형 게놈에서 발견되는 바와 같이 배열된 게놈 서열을 함유하는 게놈 단편을 포함한다.

[0151] 언급된 유전자 또는 유전자 분절"로부터 유도된" 가변 영역에 대하여 사용되는 경우, 어구 "로부터 유도된"은 특정 재배열되지 않은 유전자 분절 또는 가변 도메인을 발현하는 유전자를 형성하기 위해 재배열되는 유전자 분절로 서열을 역추적하는 능력을 포함한다(경우에 따라, 스플라이스 차이 및 체세포적 돌연변이를 해명함).

[0152] 가변 영역 유전자 분절 또는 연결 유전자 분절에 관하여 사용되는 경우, 어구 "기능성"은 발현된 항체 레퍼토리에서의 사용을 언급하고; 예를 들어, 사람 Vλ 유전자 분절에서 3-1, 4-3, 2-8 등은 기능성인 반면 Vλ 유전자 분절 3-2, 3-4, 2-5 등은 비기능성이다.

[0153] "중쇄 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, 중쇄 가변성(V_H), 중쇄 다양성(D_H), 중쇄 연결성(J_H) 및 중쇄 불변성(C_H) 영역 DNA 서열이 발견된다.

[0154] "κ 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, κ 가변성(Vκ), κ 연결성(Jκ), 및 κ 불변성(Cκ) 영역 DNA 서열이 발견된다.

[0155] "λ 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, λ 가변성(Vλ), λ 연결성(Jλ), 및 λ 불변성(Cλ) 영역 DNA 서열이 발견된다.

[0156] 상기 용어 "재배열되지 않은"은, V 유전자 분절 및 J 유전자 분절(중쇄에 대한, 또한 D 유전자 분절)이 별도로 유지되지만 V(D)J 레퍼토리의 단일 V, (D), J 를 포함하는 재배열된 V(D)J 유전자를 형성하기 위해 연결될 수 있는 면역글로불린 유전자좌의 상태를 포함한다.

[0157] 사람 λ 가변 도메인을 발현하는 마우스

[0158] 완전히 사람, 또는 부분적으로 사람이고 부분적으로 마우스인 항체를 발현하는 마우스가 이전에 보고되었다. VELOCIMMUNE®의 유전자 조작된 마우스는 내인성 마우스 유전자좌에서 재배열되지 않은 V(D)J 유전자 분절이 사람 V(D)J 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. VELOCIMMUNE®의 마우스는 사람 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 갖는 키메라 항체를 발현한다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제7,605,237호). 대부분의 다른 보고는 손상된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 갖는 마우스에서 완전한 사람 전이유전자 유래의 완전한 사람 항체를 발현하는 마우스에 관한 것이다.

[0159] 항체 경쇄는 2개의 별도의 유전자좌: 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나에 의해 암호화된다. 마우스 항체 경쇄는 주로 κ형이다. 마우스 항체를 제조하는 마우스 및 완전한 사람 또는 키메라 사람-마우스 항체를 제조하는 변형된 마우스는 경쇄 사용에 있어서 편중된 것으로 나타난다. 사람은 또한 마우스에서와 같이 뚜렷하지는 않지만 경쇄 편중을 나타내고, 마우스에서 κ 경쇄 대 λ 경쇄의 비율은 약 95:5인 반면, 사람에서, 상기 비율은 약 60:40이다. 마우스에서 보다 뚜렷하게 편중된 것은 항체 다양성에 큰 영향을 줄 것으로 사료되지는 않지만, 그 이유는 우선 마우스에서 λ 가변 유전자좌가 다양하지 않기 때문이다. 이것은 사람에서는 그렇지 않다. 사람 λ 경쇄 유전자좌는 매우 다양하다.

[0160] 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌는 1,000kb 이상으로 연장되어 있고, 가변(V) 또는 연결(J) 분절을 암호화하는 80개 이상의 유전자를 함유한다(도 1). 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌 내에, 관찰된 모든 Vλ 도메인의 절반 이상이 유전자 분절 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 및 3-21에 의해 암호화된다. 전반적으로 사람 Vλ 유전자 분절의 약 30개 정도가 기능성인 것으로 생각된다. 7개의 Jλ 유전자 분절이 있고, 이들 중 4개만이 일반적으로 기능성인 Jλ 유전자 분절-Jλ1, Jλ2, Jλ3, 및 Jλ7로서 간주된다.

[0161] 사람에서 상기 λ 경쇄 유전자좌는 사람 λ 경쇄 유전자좌가 기능성 경쇄 단백질을 형성하기 위해 재조합할 수 있는 수개의 가변성 영역 유전자 분절을 갖는다는 점에서 마우스 및 사람 둘 다의 κ 유전자좌의 구조와 유사하

다. 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌는 대략 70개의 V 유전자 분절 및 7개의 Jλ-Cλ 유전자 분절 쌍을 함유한다. 이들 Jλ-Cλ 유전자 분절 쌍 중 4개만이 기능성인 것으로 나타난다. 일부 대립 유전자에서, 5번째 Jλ-Cλ 유전자 분절 쌍이 의사(pseudo) 유전자(Cλ6)인 것으로 보고되었다. 상기 70개의 Vλ 유전자 분절은 38개의 기능성의 유전자 분절을 함유하는 것으로 나타난다. 상기 70개의 Vλ 서열은 3개의 클러스터로 배열되어 있고, 상기 클러스터 모두는 독특한 V 유전자 계열 그룹의 상이한 구성원(클러스터 A, B 및 C; 도 1)을 함유한다. 이것은 잠재적으로 비-사람 동물에서 사람 V 영역과 함께 항체를 생성하기 위해 비교적 가용한 다양성의 잠재적 풍부한 공급원이다.

[0162] 대조적으로, 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 단지 2개 또는 3개(종에 따라 상이함)의 마우스 Vλ 영역 유전자 분절을 함유한다(도 2). 적어도 상기 이유 때문에, 마우스에서 심한 κ 편중이 특히 전체 항체 다양성에 치명적인 것으로 사료되지 않는다.

[0163] 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 공개된 맵에 따르면, 상기 유전자좌는 필수적으로 대략 200kb의 범위내에서 2개 클러스터의 유전자 분절로 이루어진다(도 2). 상기 2개의 클러스터는 독립적으로 재배열될 수 있는 2개 세트의 V, J 및 C 유전자를 함유한다: Vλ2-Jλ2-Cλ2-Jλ4-Cλ4 및 Vλ1-Jλ3-Cλ3-Jλ1-Cλ1. Vλ2가 모든 Jλ 유전자 분절과 재조합하는 것으로 밝혀졌지만, Vλ1이 전적으로 Cλ1과 재조합하는 것으로 나타난다. Cλ4는 결함 스플라이스 부위를 갖는 의사 유전자인 것으로 사료된다.

[0164] 상기 마우스 κ 경쇄 유전자좌는 현저히 상이하다. 재조합 반응에 관여하여 마우스 κ 유전자좌로부터 기능성 경쇄 단백질을 유도하는 유전자 분절의 구조 및 수는 보다 더 복잡하다(도 3). 따라서, 마우스 λ 경쇄는 전형적인 마우스에서 항체 집단의 다양성에 크게 기여하지 않는다.

[0165] 마우스에서 사람 λ 경쇄 유전자좌의 풍부한 다양성을 이용하여 무엇보다 경쇄 V 도메인의 보다 완전한 사람 레퍼토리에 대한 공급원을 수득할 가능성이 높다. 상기 다양성을 이용하기 위한 이전의 시도는 무작위로 마우스 게놈에 도입된 사람 λ 경쇄 유전자좌의 무리를 함유하는 사람 전이유전자를 사용하였다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,998,514호 및 미국 특허 제7,435,871호). 이들 무작위로 통합된 전이유전자를 함유하는 마우스는 완전한 사람 λ 경쇄를 발현하지만 일부 경우에, 하나 또는 2개의 내인성 경쇄 유전자좌는 온전한 상태로 유지되는 것으로 보고되었다. 상기 상황은 마우스의 발현된 항체 레퍼토리에서 사람 λ 경쇄 서열이 마우스 경쇄(κ 또는 λ)와 경쟁하기 때문에 바람직할 수 없다.

[0166] 대조적으로, 본 발명자들은 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 대체하는 것으로 포함하여, 마우스 경쇄 유전자좌로부터 직접 하나 이상의 λ 경쇄 핵산 서열을 발현할 수 있는, 유전적으로 변형된 마우스를 기재한다. 내인성 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄 서열을 발현할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스는 사람 중쇄 유전자좌를 포함함으로써 완전히 사람인 V 영역(중쇄 및 경쇄)을 포함하는 항체를 발현하기 위해 사용되는 마우스와 추가로 교배할 수 있다. 다양한 실시형태에서. 상기 V 영역은 마우스 불변 영역과 함께 발현한다. 다양한 실시형태에서, 어떠한 내인성 마우스 면역글로불린 유전자 분절도 존재하지 않고 V 영역은 사람 불변 영역과 함께 발현한다. 이들 항체는 다수의 응용, 치료학적 뿐만 아니라 진단학적으로 유용한 것으로 입증된다.

[0167] 마우스에서 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절로부터 유도되는 결합 단백질을 발현하는 다양한 실시형태에 대한 많은 이점이 실현될 수 있다. 내인성 경쇄 유전자좌, 예를 들어, 마우스 κ 또는 λ 유전자좌에 사람 λ 서열을 위치시킴에 의해 이점이 실현될 수 있다. 상기 마우스로부터 제조된 항체는 마우스 C_L 영역, 특히 마우스 Cκ 또는 Cλ 영역과 융합된 사람 Vλ 도메인을 포함하는 경쇄를 가질 수 있다. 상기 마우스는 또한 사람 C_L 영역, 특히, Cκ 및/또는 Cλ 영역을 사용하여 동정하고 클로닝하기 위해 적합한 사람 Vλ 도메인을 발현할 것이다. 다른 한편 이러한 마우스에서 B 세포 개발은 통상적인 것이지만, Cλ 또는 Cκ 영역과 관련하여 호환성인 Vλ 도메인(체세포적으로 돌연변이된 Vλ 도메인을 포함함)을 제조할 수 있다.

[0168] 면역글로불린 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 Vλ 유전자 분절을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 기재된다. Cκ 및/또는 Cλ 영역과 융합된 사람 Vλ 도메인을 갖는 경쇄를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 기재된다.

[0169] 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 멸균 전사체

[0170] 마우스에서 사람 면역글로불린 λ 서열을 발현하는 테마에 대한 다양성은 상기 발현을 수행할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스의 다양한 실시형태로 반영된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 사람 유전자좌 유래의 비-암호화 서열(들)을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우

스는 내인성 κ 경쇄 유전자좌에서 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하고 사람 κ 경쇄 게놈 단편을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 κ 경쇄 게놈 단편은 사람 Vκ 유전자 분절과 사람 Jκ 유전자 분절 사이에서 천연적으로 발견되는 비-암호화 서열이다.

[0171] 상기 사람 및 마우스 κ 경쇄 유전자좌는 개시 코돈 또는 개방 판독 프레임이 결여된 멸균성 전사체를 암호화하고 κ 경쇄 유전자좌의 전사를 조절하는 요소로서 간주되는 서열을 포함한다. 이들 멸균성 전사체는 최외곽 Vκ 유전자 분절의 다운스트림 또는 3', 및 κ 경쇄 불변 영역 유전자(Cκ)의 업스트림인 κ 경쇄 인트론 인핸서(Eκi)의 업스트림 또는 5'에 위치한 유전자간 서열로부터 생성된다. 상기 멸균성 전사체는 Cκ와 융합된 VκJκ1 분절을 형성하기 위해 유전자간 서열의 재배열로부터 생성된다.

[0172] Cκ 유전자의 κ 경쇄 유전자좌 업스트림의 대체는 멸균성 전사체를 암호화하는 유전자간 영역을 제거한다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 마우스 Cκ 유전자의 마우스 κ 경쇄 서열 업스트림의 사람 λ 경쇄 유전자 분절로의 대체는 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 함유하지만 멸균성 전사체를 암호화하는 κ 경쇄 유전자간 영역을 함유하지 않는 사람화된 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 생성시킨다.

[0173] 본원에 기재된 바와 같이, 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 사용한 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 사람화(여기서, 상기 사람화는 유전자간 영역을 제거한다)는 κ 경쇄 유전자좌의 사용을 급격히 저하시키고, 이는 λ 경쇄 사용의 현저한 증가와 연관된다. 따라서, 유전자간 영역이 결여된 사람화된 마우스가 이것이 사람 경쇄 가변 도메인(예를 들어, 사람 λ 또는 κ 도메인)을 갖는 항체를 제조할 수 있다는 점에서 유용하지만 상기 유전자좌로부터의 사용은 감소한다.

[0174] 전사와 관련하여 최종 사람 Vλ 유전자 분절과 제1 사람 Jλ 유전자 분절 사이에, κ 유전자간 영역을 함유하는 Vλ 유전자좌를 생성하기 위해 사람 κ 유전자간 영역의 삽입과 연합된 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 갖는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 사람화가 또한 기재되고, 이는 κ 유전자간 영역이 결여된 유전자좌 보다 높은 발현을 갖는 B 세포 집단을 나타낸다. 상기 관찰은 상기 유전자간 영역이 직접적으로 멸균성 전사체를 통해 또는 간접적으로 내인성 λ 경쇄 유전자좌 유래의 사용을 억제하는 가설과 일치한다. 상기 가설하에, 유전자간 영역을 포함시키는 것은 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 사용을 감소시키고 마우스에게 제한적인 선택을 부여하여 변형된(λ를 κ로) 유전자좌를 사용하여 항체를 생성할 수 밖에 없다.

[0175] 다양한 실시형태에서, 마우스 Cκ 유전자의 업스트림에 있는 마우스 κ 경쇄 서열의 사람 λ 경쇄 서열로의 대체는 전사와 관련하여 3' 대부분의 Vλ 유전자 분절의 3' 비번역 영역과 제1 사람 Jλ 유전자 분절에 대한 5' 사이에 배치된 사람 κ 경쇄 유전자간 영역을 추가로 포함한다. 대안으로, 상기 유전자간 영역은 내인성 λ 경쇄 유전자좌 내에서 결실시킴에 의해 대체된 내인성 κ 경쇄 유전자좌(마우스 Cκ 유전자의 업스트림)로부터 제거될 수 있다. 또한, 상기 실시형태하에, 상기 마우스는 사람 λ 경쇄 서열을 함유하는 내인성 κ 경쇄 유전자좌로부터 항체를 생성한다.

[0176] 사람 Vλ 도메인을 발현하도록 마우스를 조작하는 방법

[0177] 내인성 C_L(예를 들어, Cκ 또는 Cλ) 영역과 융합된 사람 Vλ 도메인을 갖는 경쇄를 함유하는 항체를 제조하는 유전적으로 변형된 마우스를 제조하는 다양한 접근법이 기재되어 있다. 다양한 실시형태에서, 하나 또는 2개의 내인성 경쇄 유전자좌의 결실을 포함하는 유전적 변형이 기재되어 있다. 예를 들어, 내인성 항체 레퍼토리로부터 마우스 λ 경쇄를 제거하기 위해, 제1 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터의 결실시킬 수 있고 제2 유전자 클러스터의 Vλ-Jλ 유전자 분절을 전체적으로 또는 부분적으로 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절로 대체할 수 있다. 유전적으로 변형된 마우스 배아, 세포, 및 마우스, 마우스 배아 및 세포를 제조하기 위한 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0178] 하나의 내인성 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터의 결실 및 Vλ-Jλ 유전자 분절의 다른 내인성 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터로의 대체는 다양한 실시형태에서 동물에서 천연 항체 불변 영역 연합 및 기능을 비교적 최소로 파괴하는데, 이는 내인성 Cλ 유전자가 온전하게 남아있고 따라서 내인성 중쇄의 불변 영역과 연합하는 정상적인 기능 및 능력을 유지하고 있기 때문이다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 상기 변형은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 함유하는 기능성 항체 분자의 어셈블리를 위한 기능성 경쇄 불변 영역에 의존하여 다른 내인성 중쇄 불변 영역에 영향을 주지 않는다. 추가로, 다양한 실시형태에서, 상기 변형은 내인성 중쇄 및 경쇄, 예를 들어, 마우스 Cλ 영역에 연결된 hVλ 도메인을 포함하는 기능성 막-결합된 항체 분자의 어셈블리에 영향을 주지 않는다. 하나 이상의 기능성 Cλ 유전자는 내인성 유전자좌에 유지되어 있기 때문에, 내인성 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터의 Vλ-Jλ 유전자 분절이 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절로 대체됨을 포함하는 동물은 동물의 발현된 항체 레퍼토리에

존재하는 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절을 통해, 면역 반응 동안에 항원과 결합할 수 있는 정상적인 λ 경쇄를 제조할 수 있어야만 한다.

[0179] 결실된 내인성 마우스 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터의 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 2에 제공된다. 도시된 바와 같이, 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 유전자 클러스터로 구성되어 있고 상기 클러스터 둘 다는 재조합하여 기능성 마우스 λ 경쇄를 형성할 수 있는 기능성 유전자 분절을 함유한다. 상기 내인성 마우스 Vλ1-Jλ3-Cλ3-Jλ1-Cλ1 유전자 클러스터는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 갖는 표적화 작제물(표적화 벡터 1)에 의해 결실된다. 다른 내인성 유전자 클러스터(Vλ2-Vλ3-Jλ2-Cλ2-Jλ4-Cλ4)는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 하이그로마이신-티미딘 키나제 카세트를 갖는 표적화 작제물(표적화 벡터 2)에 의해 부분적으로 결실된다. 상기 제2 표적화 반응에서, Cλ2-Jλ4-Cλ4 내인성 유전자 분절은 유지된다. 상기 제2 표적화 작제물(표적화 벡터 2)은 제1 표적화 작제물(표적화 벡터 1)내 부위들과 상이한 재조합 부위를 사용하여 성공적인 표적화가 성취된 후 선별 카세트를 선택적으로 결실시킴에 의해 작제된다. 수득한 이중-표적화된 유전자좌는 어떠한 내인성 λ 경쇄가 제조될 수 없다는 점에서 기능적으로 침묵된다. 상기 변형된 유전자좌는 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 λ 유전자좌를 제조하기 위한 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절의 삽입을 위해 사용될 수 있고, 이로써 상기 변형된 유전자좌에서 재조합시 상기 동물은 내인성 마우스 Cλ 유전자 분절과 연결된 재배열된 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄를 생성한다.

[0180] 다양한 실시형태에서, 내인성 λ 유전자 분절을 비기능성이도록 하는 마우스의 유전적 변형은 이의 항체 레퍼토리에서 전적으로 κ 경쇄를 나타나는 마우스를 유도하여, 상기 마우스는 면역 반응에서 λ 경쇄의 역할을 평가하는데 유용하게 하고 Vκ 도메인을 포함하지만 Vλ 도메인을 포함하지 않는 항체 레퍼토리를 제조하는데 유용하게 된다.

[0181] 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재조합된 마우스 Cλ 유전자에 연결된 hVλ를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 사람 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 사용하여 내인성 마우스 Vλ2-Vλ3-Jλ2 유전자 분절을 대체하는 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 4a에 제공된다. 도시된 바와 같이, 비기능성이 부여된 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 포함하는 표적화 작제물(12/1-λ 표적화 벡터)에 의해 대체된다. 상기 Vλ2-Vλ3-Jλ2 유전자 분절은 12hVλ 유전자 분절 및 단일 hJλ 유전자 분절을 포함하는 사람 λ 서열을 함유하는 게놈 단편으로 대체된다.

[0182] 따라서, 상기 제1 접근법은 단일 hJλ 유전자 분절과 연속성인 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 하나 이상의 hVλ 유전자 분절을 위치시킨다(도 4a).

[0183] 상기 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 대한 추가의 변형은 보다 많은 hVλ 유전자 절편을 삽입하는 유사한 기술을 사용하여 성취될 수 있다. 예를 들어, 부가적 사람 hVλ 유전자 분절의 점진적 삽입을 위해 사용되는 2개의 부가적 표적화 작제물(+16-λ 및 +12-λ 표적화 벡터)의 도식적 도해는 도 5a에 제공된다. 도시된 바와 같이, 특정 사람 hVλ 유전자 분절을 함유하는 부가적 게놈 단편은 사람 λ 경쇄 서열의 이전의 삽입에 의해 제공된 상동성을 사용하는 성공적인 단계로 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 삽입된다. 도시된 각각의 표적화 작제물과의 재조합시, 연속된 방식으로 28개의 부가적 hVλ 유전자 분절이 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 삽입된다. 이것은 마우스 Cλ 유전자에 연결된 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄 단백질을 생성하는 키메라 유전자좌를 생성시킨다.

[0184] 상기 마우스 λ 유전자좌에 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 삽입하기 위한 상기 접근법은 Cλ2-Jλ4-Cλ4 유전자 분절의 다운스트림에 위치한 인핸서(Enh 2.4, Enh 및 Enh 3.1로 지정됨, 도 4a 및 도 5a)를 유지한다. 상기 접근법은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에 단일 변형된 대립 유전자를 생성시킨다(도 7a).

[0185] 마우스 Cλ 유전자 분절에 작동적으로 연결된 hVλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 경쇄를 발현하는 마우스를 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공되고, 이는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌로부터 상기 유전자를 발현하는 마우스를 제조하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 상기 방법은 하나의 내인성 마우스 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터가 선택적으로(예를 들어, 표적화된 결실에 의해) 비기능성이 되도록 하고 마우스에서 hVλ 도메인을 발현하기 위해 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 hVλ 및 Jλ 유전자 분절을 사용함을 포함한다.

[0186] 대안으로, 제2 접근법에서, 사람 λ 경쇄 유전자 분절은 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 위치할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 상기 유전적 변형은 내인성 κ 경쇄 유전자좌의 결실을 포함한다. 예를 들어, 내인성 항체 레퍼토리로부터 마우스 κ 경쇄를 제거하기 위해, 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절을 결실시킬 수 있다. 유전적으로 변

형된 마우스 배아, 세포, 및 상기 마우스, 마우스 배아 및 세포를 제조하기 위한 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0187] 상기 진술된 이유때문에, 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절의 결실은 비교적 최소의 파괴를 사용한다. 결실된 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절의 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 3에 제공된다. 상기 내인성 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절은 각각 부위-특이적 재조합 부위를 사용하는 2개의 정확하게 위치된 표적화 벡터 사이의 마우스 서열 위치를 리컴비나제-매개 결실을 통해 결실시킨다. 제1 표적화 벡터(Jκ 표적화 벡터)는 마우스 Jκ 유전자 분절을 결실시키기 위한 제1 표적화 반응에 사용된다. 제2 표적화 벡터(Vκ 표적화 벡터)는 최외곽 마우스 Vκ 유전자 분절의 5'에 위치한 서열을 결실시키기 위한 제2 연속 표적화 반응에 사용된다. 2개의 표적화 벡터는 부위-특이적 재조합 부위를 함유하여 이로써 성공적인 표적화가 성취된 후 선별 카세트 및 모든 간섭 마우스 κ 경쇄 서열 둘 다가 선택적으로 결실된다. 상기 수득한 결실된 유전자좌는 어떠한 내인성 κ 경쇄도 제조될 수 없다는 점에서 기능적으로 침묵된다. 상기 변형된 유전자좌는 hVλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌를 제조하기 위한 hVλ 및 Jλ 유전자 분절의 삽입을 위해 사용될 수 있고, 이로써 상기 변형된 유전자좌에서 재조합시, 상기 동물은 내인성 마우스 Cκ 유전자 분절에 작동적으로 연결된 재배열된 hVλ 및 Jλ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄를 생성한다. 사람 λ 경쇄 서열을 포함하는 다양한 표적화 벡터는 마우스 Cκ 영역과 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 함유하는 하이브리드 경쇄 유전자좌를 제조하기 위해 상기 결실된 마우스 κ 유전자좌와 연계하여 사용될 수 있다.

[0188] 따라서, 제2 접근법은 하나 이상의 사람 Vλ 유전자 분절을 단일 사람 Jλ 유전자 분절과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12/1-κ 표적화 벡터, 도 4b)에 위치시키는 것이다.

[0189] 다양한 실시형태에서, 상기 접근법에 대한 변형은 유전자 분절 및/또는 조절 서열을 부가하여 마우스 항체 레퍼토리내 마우스 κ 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄 서열의 사용을 최적화하도록 수행될 수 있다.

[0190] 제3 접근법에서, 하나 이상의 hVλ 유전자 분절은 4개의 hJλ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12/4-κ 표적화 벡터 도 4b)에 위치한다.

[0191] 제3 접근법에서, 하나 이상의 hVλ 유전자 분절은 사람 κ 유전자간 서열 및 단일 hJλ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12(κ)1-κ 표적화 벡터, 도 4b)에 위치한다.

[0192] 제4 접근법에서, 하나 이상의 hVλ 유전자 분절은 사람 κ 유전자간 서열 및 4개의 hJλ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12(κ)4-κ 표적화 벡터 도 4b)에 위치한다.

[0193] 마우스 κ 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 삽입하기 위한 상기 모든 접근법은 Cκ 유전자의 업스트림에 κ 인트론 인핸서 요소(Eκi로 지정됨, 도 4b 및 도 5b) 및 Cκ 유전자의 다운스트림에 3' κ 인핸서(Eκ3'으로 지정됨, 도 4b 및 도 5b)를 유지한다. 상기 접근법은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 4개의 분리된 변형된 대립 유전자를 생성시킨다(도 7b).

[0194] 다양한 실시형태에서, 유전적으로 변형된 마우스는 상기 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 녹아웃을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 Vλ2 내지 Jλ2에 걸친 영역 및 Vλ1 내지 Cλ1에 걸친 영역을 결실시키는 전략에 의해 녹아웃된다(도 2). 내인성 λ 도메인을 발현하는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 능력을 감소시키거나 제거하는 임의의 전략은 상기된 실시형태를 사용하기 위해 적합하다.

[0195] 유전적으로 변형된 마우스 유래의 람다 도메인 항체

[0196] 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 서열을 포함하는 마우스는 마우스 C_L(Cκ 또는 Cλ) 영역과 융합된 hVλ 영역을 포함하는 경쇄를 발현할 것이다. 이들은 (a) 기능적으로 침묵된 경쇄 유전자좌(예를 들어, 내인성 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌의 녹아웃)를 포함하고; (b) 내인성 마우스 Cλ 유전자에 작동적으로 연결된 hV 및 hJ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 포함하고; (c) 내인성 마우스 Cκ 유전자와 작동적으로 연결된 hVκ 및 hJκ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 포함하고; (d) 하나의 κ 대립 유전자가 hVκ 및 hJκ를 포함하고, 다른 하나의 κ 대립 유전자가 hVλ 및 hJλ를 포함하고; 하나의 λ 대립 유전자가 hVλ 및 hJλ를 포함하고 하나의 λ 대립 유전자가 침묵되거나 녹아웃되거나, λ 대립 유전자 둘 다가 hVλ 및 hJλ를 포함하고; 2개의 중쇄 대립 유전자가 각각 hV_H, hD_H, 및 hJ_H를 포함하는 마우스에 유리하게 접종된다.

[0197] Cκ 또는 Cλ로 발현되는 hVλ 도메인을 포함하는 항체는 hVλ 도메인을 암호화하는 핵산을, 사람 Cλ를 암호화하는 유전자를 함유하는 발현 작제물에 클로닝함에 의해 완전한 사람 항체를 제조하기 위해 사용하였다. 수득

한 발현 작제물은 hCλ와 융합된 완전한 hVλ 도메인을 나타내는 항체를 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포로 전달된다.

[0198] 실시예

[0199] 다음 실시예는 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 위해 제공되고 본 발명자가 이들의 발명으로서 간주되는 것의 범위를 제한하려 하는 것이 아니다. 달리 특정되지 않는 경우, 온도는 섭씨로 나타내고 압력은 대기압 근처이다.

[0200] 실시예 I

[0201] 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌의 결실

[0202] 다양한 표적화 작제물은 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 마우스 게놈 세균 인조 염색체(BAC) 라이브러리를 변형시키기 위한 VELOCIGENE® 기술(문헌참조: 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela et al.(2003)), 고상도 발현 분석과 커플링된 마우스 게놈의 고속 처리 엔지니어링(문헌참조: Nature Biotech. 21(6):652-659)을 사용하여 제조하였다.

[0203] 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 결실. 마우스 BAC 클론 RP23-135k15 (Invitrogen) 유래의 DNA는 상기 Vλ-Jλ-Cλ 유전자 클러스터의 표적화된 결실을 통해 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화시키기 위한 상동성 재조합으로 변형시켰다(도 2).

[0204] 간략하게, Vλ1-Jλ3-Cλ3-Jλ1-Cλ1 유전자 분절을 포함하는 전체 인접한 클러스터는 Vλ1 유전자 분절의 5' 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암 및 Cλ1 유전자 분절의 3' 서열을 함유하는 3' 마우스 상동성 암과 함께 loxP 부위로 플랭킹된 네오마이신 카세트를 포함하는 표적화 벡터(도 2, 표적화 벡터 1)를 사용한 단일 표적화 반응에서 결실시켰다.

[0205] 제2 표적화 작제물은 Vλ2-Jλ2-Cλ2-Jλ4-Cλ4를 함유하는 원거리 내인성 마우스 λ 유전자 클러스터를 정확하게 결실시켜 제조하였고, 단 상기 표적화 작제물은 Vλ2 유전자 분절의 5' 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암 및 내인성 Cλ2 유전자 분절에 대한 5' 서열을 함유하는 3' 마우스 상동성 암을 함유한다(도 2, 표적화 벡터 2). 따라서, 상기 제2 표적화 작제물은 Vλ2-Jλ2가 정확하게 결실된 반면 내인성 마우스 λ 유전자좌에서 Cλ2-Jλ4-Cλ4는 온전하게 잔류한다. 불활성화된 내인성 λ 유전자좌(상기된 바와 같음)를 함유하는 ES 세포는 당업계에 공지된 핵형분석 및 스크리닝 방법(예를 들어, TAQMAN®)에 의해 확인하였다. 이어서, DNA는 변형된 ES 세포로부터 분리하고 CRE 리컴비나제로 처리하여 네오마이신 마커 유전자를 함유하는 인접한 표적화 카세트의 결실을 매개하고 결실 부위에서 단일의 loxP 부위가 잔류하도록 한다(도 2, 하부).

[0206] 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 결실. 수개의 표적화 작제물은 상기된 유사한 방법을 사용하여 제조하여 2단계 공정으로 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 불활성화시키기 위한 상동성 재조합에 의해 마우스 BAC 클론 RP23-302g12 및 RP23-254m04(Invitrogen) 유래의 DNA를 변형시킨다(도 3).

[0207] 간략하게, 상기 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 Jκ 유전자 분절(1-5)을 hyg-TK 카세트에 대한 3'에 단일 loxP 부위를 함유하는 하이그로마이신-티미딘 키나제(hyg-TK) 카세트를 포함하는 표적화 벡터(도 3, Jκ 표적화 벡터)를 사용하여 단일 표적화 반응으로 결실시켰다. 상기 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 상동성 암은 내인성 마우스 Jκ 유전자 분절의 5' 및 3'에 마우스 게놈 서열을 함유g하였다. 제2 표적화 반응에서, 제2 표적화 벡터는 가장 원거리의 내인성 마우스 Vκ 유전자 분절에 대해 5' 업스트림에 있는 마우스 게놈 서열 일부 결실시켜 제조하였다 (도 3, Vκ 표적화 벡터). 상기 표적화 벡터는 역위된 lox511 부위, loxP 부위 및 네오마이신 카세트를 함유하였다. 상기 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 상동성 암은 가장 원거리의 마우스 Vκ 유전자 분절의 업스트림에 마우스 게놈 서열을 함유하였다. 상기 표적화 벡터는 ES 세포내에서 DNA를 표적화하기 위해 연속적인 방식(즉, Jκ에 이어서 Vκ)으로 사용하였다. 이중-표적화된 염색체(즉, 2개의 표적화 벡터로 표적화된 단일 내인성 마우스 κ 유전자좌)를 함유하는 ES는 당업계에 공지된 핵형분석 및 스크리닝 방법(예를 들어, Taqman™)에 의해 확인하였다. 이어서, DNA는 변형된 ES 세포로부터 분리하고 Cre 리컴비나제로 처리하여 내인성 마우스 Vκ 유전자 분절 및 선별 카세트 둘 다의 결실을 매개하고 서로 반대 배향인 2개의 병치된 lox 부위를 유지시킨다(도 3, 하부; 서열번호 1).

[0208] 따라서, 온전한 인핸서 및 불변 영역을 함유하는 2개의 변형된 내인성 경쇄 유전자좌(κ 및 λ)는 하기된 표적화 벡터를 사용한 정확한 방식으로 재배열되지 않은 사람 λ 생식선 유전자 분절을 점진적으로 삽입하기 위해 제조하였다.

[0209] 실시예 II

[0210] 마우스 경쇄 유전자좌의 사람 λ 경쇄 소형-유전자좌로의 대체

[0211] 다중 표적화 벡터는 상기된 유사한 방법을 사용하여 사람 λ 유전자 분절을 내인성 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위해 조작하였다. 다수의 독립적인 초기 변형은 내인성 경쇄 유전자좌에 가하여 각각 마우스 경쇄 불변 유전자 및 인핸서에 작동적으로 연결된 hVλ 및 Jλ 유전자 분절을 함유하는 키메라 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0212] 12개의 사람 Vλ 및 1개의 사람 Jλ 유전자 분절을 함유하는 사람 λ 소형-유전자좌. 일련의 초기 표적화 벡터는 RP11-729g4(Invitrogen)로 호칭되는 사람 BAC 클론을 사용하여 클러스터 A 기원의 제1의 12개의 연속 사람 Vλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절 또는 4개의 hJλ 유전자 분절을 함유하도록 조작하였다. 도 4a 및 4b는 각각 마우스 λ 및 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 초기 삽입체를 제조하기 위해 작제된 표적화 벡터를 보여준다.

[0213] 초기 표적화 벡터의 제1 세트에 대해, 12개 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절을 함유하는 729g4 BAC 클론 유래의 124,125 bp DNA 단편은 3' 마우스 상동성 암의 연결을 위해 hJλ1 유전자 분절 다운스트림(3')에 PI-SceI 부위 996bp를 함유하도록 조작하였다. 2개의 상이한 세트의 상동성 암은 상기 사람 단편으로의 연결을 위해 사용하였고; 상동성 암의 하나의 세트는 135k15 BAC 클론 유래의 내인성 마우스 λ 서열을 함유하고(도 4a) 또 다른 세트는 각각 마우스 BAC 클론 RP23-302g12 및 RP23-254m04 기원의 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 분절의 5' 및 3'에 내인성 κ 서열을 함유하였다(도 4b).

[0214] 12/1-λ 표적화 벡터에 대해(도 4a), PI-SceI 부위는 마우스 Cλ2-Jλ4-Cλ4 및 실시예 1에 기재된 변형된 마우스 λ 유전자좌의 인핸서 2.4를 함유하는 27,847 bp DNA 단편의 5' 말단에서 조작하였다. 상기 약 28 kb 마우스 단편은 5'에서 3'로, hJλ1 유전자 분절, hJλ1 유전자 분절의 3'에 996 bp의 사람 λ 서열, 마우스 Cλ2 유전자에 대해 5'의 1229bp의 마우스 λ 서열, 마우스 Cλ2 유전자 및 약 28kb의 마우스 단편의 나머지 부분을 함유하는 3' 접합부를 생성시키는, 약 124kb 사람 λ 단편으로부터의 연결에 의해 3' 상동성 암으로서 사용하였다. 사람 Vλ3-12 유전자 분절 기원의 업스트림(5')은 내인성 마우스 λ 유전자좌의 5' 서열에 상응하는 23,792bp의 마우스 게놈 DNA를 함유하는, 5' 마우스 상동성 암의 개시부 전에 부가적인 1456 bp의 사람 λ 서열이다. 사람 λ 서열의 5' 상동성 암 및 개시부 사이에 Frt 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트가 있다.

[0215] 따라서, 상기 12/1-λ 표적화 벡터는 5'에서 3'로 내인성 λ 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 λ 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 연속 hVλ 유전자 분절 및 hJλ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb의 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위, 및 내인성 Cλ2-Jλ4-Cλ4 유전자 분절을 포함하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열, 마우스 인핸서 2.4 서열 및 인핸서 2.4의 다운스트림(3')에 추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4a).

[0216] 유사한 방식으로, 상기 12/1-κ 표적화 벡터(도 4b)는 동일한 약 124 사람 λ 단편을 사용하고 단, 마우스 κ 서열을 함유하는 마우스 상동성 암은 내인성 κ 유전자좌로의 표적화가 상동성 재조합에 의해 성취될 수 있도록 사용된다. 따라서, 12/1-κ 표적화 벡터는 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 연속 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절을 함유하는 약 124kb의 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위 및 내인성 Cκ 유전자, Eκi 및 Eκ3'을 함유하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열 및 Eκ3'의 다운스트림(3')에 추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4b, 12/1-κ 표적화 벡터).

[0217] 이들 2개의 초기 표적화 벡터 중 하나를 사용한 상동성 재조합으로 재조합 즉시 키메라 λ 경쇄의 형성을 유도하는 상기 내인성 마우스 경쇄 불변 유전자 및 인핸서(Cκ 또는 Cλ2 및 Eκi/Eκ3' 또는 Enh2.4/Enh3.1)에 작동적으로 연결된 12hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 경쇄 유전자좌(κ 또는 λ)를 제조하였다.

[0218] 12개 사람 Vλ 및 4개 사람 Jλ 유전자 분절을 갖는 사람 λ 소형-유전자좌. 키메라 λ 경쇄 유전자좌에 다양성을 부가하기 위한 또 다른 방법에서, 제3 초기 표적화 벡터는 클러스터 A로부터의 제1의 12개 연속 사람 Vλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 마우스 κ 경쇄 유전자좌로 삽입하도록 조작한다(도 4b, 12/4-κ 표적화 벡터). hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 Jλ7 유전자 분절을 함유하는 DNA 분절은 드 노보 DNA 합성 (Integrated DNA Technologies)에 의해 제조하고, 이는 각각 Jλ 유전자 분절 및 각각 Jλ 유전자 분절의 5' 및 3'에 바로인접한 영역 둘 다 기원의 약 100bp의 사람 게놈 서열을 함유한다. PI-SceI 부위는 상기 약 1kb의 DNA 단편의 3'

말단내로 조작하고 클로로람페니콜 카세트에 연결한다. 상동성 암은 사람 BAC 클론 729g4의 hJλ1 유전자 분절에 대한 5' 및 3' 위치에서 사람 λ 서열로부터 PCR 증폭시켰다. 상기 인터메디에이트 표적화 벡터를 사용한 상동성 재조합은, 5' Frt 부위에 대해 5'에 I-CeuI 부위를 또한 함유하는 Frt 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 갖는 사람 Vλ3-12 유전자 분절의 업스트림(5')에서 표적화된 변형된 729g4 BAC 클론에 대해 수행하였다. 상기 이중-표적화된 729g4 BAC 클론은 5'에서 3'로 I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb의 단편, 사람 Jλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하는 약 1 kb 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 포함한다. 상기 인터메디에이트 표적화 벡터는 I-CeuI 및 PI-SceI와 함께 분해하고 후속적으로 변형된 마우스 BAC 클론(상기된 바와 같은)에 연결하여 제3 표적화 벡터를 제조한다.

[0219] 상기 연결로 사람 λ 서열을 상기 내인성 κ 경쇄 유전자좌로 삽입하기 위한 제3 표적화 벡터를 수득하였고, 상기 벡터는 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb 단편 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하는 약 1kb의 단편, 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위 및 내인성 마우스 Cκ 유전자, Eκi 및 Eκ3'을 함유하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열 및 Eκ3'의 다운스트림(3')에 추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4b, 12/1-κ 표적화 벡터)를 함유한다. 상기 제3의 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 재조합 즉시, 키메라 사람 λ/마우스 κ 경쇄의 형성을 유도하는, 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된, 12개 hVλ 유전자 분절 및 4개의 hJλ 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0220] 통합된 사람 κ 경쇄 서열을 갖는 사람 λ 소형-유전자좌.

[0221] 유사한 양상으로, 사람 λ 유전자 분절의 내인성 κ 경쇄 유전자좌로의 초기 삽입체(도 4b, 12/1-λ 및 12/4-κ 표적화 벡터)를 제조하기 위해 조작된 것들과 유사한 2개의 추가의 표적화 벡터는 연속 사람 λ 및 κ 게놈 서열을 함유하는 고유 작제된 표적화 벡터를 사용하여 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 점진적으로 삽입하기 위해 조작하였다. 이들 표적화 벡터는 사람 Vκ4-1 및 Jκ1 유전자 분절 사이에 천연적으로 위치된 약 23kb의 사람 κ 게놈 서열을 함유하도록 작제하였다. 상기 사람 κ 게놈 서열은 사람 Vλ 및 사람 Jλ 유전자 분절 사이에 이들 2개의 추가의 삽입 벡터(도 4b, 12(κ)-κ 및 12(κ)4-κ 표적화 벡터) 내에 특이적으로 위치시켰다.

[0222] 사람 κ 게놈 서열을 함유하는 2개의 표적화 벡터는 상기된 변형된 RP11-729g4 BAC 클론을 사용하여 제조하였다(도 6). 상기 변형된 BAC 클론은 NotI 및 AsiSI 제한 부위로 플랭킹된 스펙티노마이신 선별 카세트로 표적화하였다(도 6, 상부 좌측). 스펙티노마이신 카세트와의 상동성 재조합으로 5'에서 3'로 I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123 kb 단편, hVλ3-1 유전자 분절의 노나머 서열에 대해 약 200bp 다운스트림(3')에 있는 NotI 부위, 스펙티노마이신 카세트 및 AsiSI 부위를 함유하는 이중-표적화된 729g4 BAC 클론을 수득하였다. 사람 κ 서열을 함유하는 분리된 사람 BAC 클론(CTD-2366j12)은 2회 별도의 시점에 hVκ4-1 및 hJκ1 유전자 분절 사이의 위치에서 제한 부위를 조작하여 이중 표적화된 변형된 729g4 BAC 클론내 함유된 hVλ 유전자 분절과의 연결을 위한 약 23kb 단편의 후속적 클로닝이 가능하도록 표적화하였다(도 6, 상부 우측).

[0223] 간략하게, 상기 2366j12 BAC 클론은 크기가 약 132 kb이고 hVκ 유전자 분절1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, Vκ 유전자 분절의 다운스트림에 있는 사람 κ 게놈 서열, hJκ 유전자 분절 1-5, hCκ 및 사람 κ 유전자좌의 약 20kb의 추가 게놈 서열을 함유한다. 상기 클론은 먼저 Frt 부위로 플랭킹된 하이그로마이신 카세트 및 상기 3' Frt 부위의 다운스트림(3')에 있는 NotI 부위를 함유하는 표적화 벡터로 표적화하였다. 상기 표적화 벡터에 대한 상동성 암은 BAC 클론내에 Vκ 유전자 분절의 5' 및 3'에 사람 게놈 서열을 함유하여 상기 표적화 벡터와 상동성 재조합하여 상기 Vκ 유전자 분절은 결실되고 NotI 부위는 hVκ 4-1 유전자 분절의 약 133bp의 다운스트림에서 조작된다(도 6, 상부 우측). 상기 변형된 2366j12 BAC 클론은 3' 말단에서 2개의 표적화 벡터로 독립적으로 표적화하여 hJλ1 유전자 분절, PI-SceI 부위 및 AsiSI 부위 또는 4개의 hJλ 유전자 분절(상기 참조), PI-SceI 부위 및 AsiSI 부위를 함유하는 사람 λ 게놈 단편을 또한 함유하는 클로로람페니콜 카세트를 갖는 hJκ 유전자 분절을 결실시킨다(도 6, 상부 우측). 이들 2개의 유사한 표적화 벡터에 대한 상동성 암은 hJκ 유전자 분절의 5' 및 3'에 서열을 함유한다. 이들 제2 표적화 벡터 및 상기 변형된 2366J12 BAC 클론과의 상동성 재조합으로 5'에서 3'로, 5' Frt 부위, 하이그로마이신 카세트, 3' Frt 부위, NotI 부위, Vκ4-1과 Jκ1 유전자 분절 사이에 유전자간 영역을 함유하는 사람 κ 유전자좌의 22,800 bp 게놈 단편, hJλ1 유전자 분절 또는 hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 Jλ7을 함유하는 사람 λ 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 이중 표적화된 2366j12 클론을 수득하였다(도 6, 상부 우측). 2개의 추가의 변형을 만들기 위한 2개의 최종 표적

화 벡터는 이중-표적화된 729g4 및 2366j12 클론을 사용하는 2개의 연결 단계에 의해 성취하였다.

[0224] 이중 표적화된 729g4 및 2366j12 클론은 NotI 및 AsiSI로 분해하여 각각 네오마이신 카세트 및 hVλ 유전자 분절을 함유하는 하나의 단편 및 Vκ4-1과 Jκ1 유전자 분절 사이의 유전자간 영역을 함유하는 사람 κ 유전자좌의 약 23kb의 게놈 단편, hJλ1 유전자 분절 또는 hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 Jλ7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 또 다른 단편을 수득한다. 이들 단편들의 연결은 5'에서 3'로 hVλ 유전자 분절, Vκ4-1과 Jκ1 유전자 분절 사이에 사람 κ 게놈 서열, hJλ1 유전자 분절 또는 hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 Jλ7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 2개의 독특한 BAC 클론을 생성시켰다(도 6, 하부). 이들 새로운 BAC 클론은 이어서 I-CeuI 및 PI-SceI로 분해하여 업스트림 네오마이신 카세트 및 연속 사람 λ 및 κ 서열을 함유하는 독특한 단편들을 방출시키고 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 마우스 게놈 서열, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, hVλ 유전자 분절(3-12 내지 3-1), Vλ3-1의 약 200bp 다운스트림에 NotI 부위, 사람 Vκ4-1 및 Jκ1 유전자 분절 사이에서 천연적으로 발견되는 약 23kb의 사람 κ 서열, hJλ1 유전자 분절 또는 hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 hJλ7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, 마우스 Eκi, 마우스 Cκ 유전자 및 Eκ3'를 함유하는 변형된 마우스 BAC 클론 302g12에 연결시켰다(도 4, 12hVλ-VκJκ-hJλ1 및 12hVλ-VκJκ-4hJλ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터 둘 다와의 상동정 재조합으로 12hVλ 유전자 분절, 사람 κ 게놈 서열 및 내인성 마우스 Cκ 유전자와 작동적으로 연결된 하나 또는 4개의 hJλ 유전자 분절을 제조하여 이는 재조합 즉시 키메라 사람 λ/마우스 κ 경쇄의 형성을 유도한다.

[0225] 실시예 III

[0226] 사람 λ 경쇄 소형-유전자좌로 추가의 사람 Vλ 유전자 분절의 조작

[0227] 추가의 hVλ 유전자 분절은 유사한 표적화 벡터 및 방법을 사용하여 실시예 2에 기재된 초기 변형 각각에 독립적으로 부가하였다(도 5a, +16-λ 표적화 벡터 및 도 5b, +16-κ 표적화 벡터).

[0228] 16개 추가의 사람 Vλ 유전자 분절의 도입. 16개 추가의 hVλ 유전자 분절을 실시예 2에 기재된 변형된 경쇄 유전자좌로 첨가하기 위한 표적화 벡터를 제조하는데 사용되는 업스트림(5') 상동성 암은 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 마우스 게놈 서열을 함유한다. 상기 3' 상동성 암은 모든 표적화 벡터에 대해 동일하고 실시예 2에 기재된 바와 같이 변형의 사람 λ 서열의 5' 말단과 중첩하는 사람 게놈 서열을 함유한다.

[0229] 간략하게, 2개의 표적화 벡터는 실시예 2에 기재된 변형된 마우스 경쇄 유전자좌에 16개 추가의 hVλ 유전자 분절의 도입을 위해 조작하였다(도 5a 및 도 5b, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터). 클러스터 A 기원의 21개 연속 hVλ 유전자 분절을 함유하는 사람 BAC 클론 RP11-761113 (Invitrogen) 기원의 약 172kb의 DNA 단편을 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에 대해 5'에 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암 및 사람 게놈 λ 서열을 함유하는 3' 상동성 암과 함께 조작한다. 이들 표적화 작제물에 사용되는 5' 마우스 κ 또는 λ 상동성 암은 실시예 2에 기재된 것과 동일한 5' 상동성 암이다(도 5a 및 5b). 상기 3' 상동성 암은 실시예 2에 기재된 약 123kb 단편의 사람 게놈 λ 서열의 동등한 5' 말단에 상응하는 사람 게놈 λ 서열의 53,057 bp 중첩을 함유한다. 이들 2개의 표적화 벡터는 5'에서 3'로, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 23kb의 게놈 서열 또는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 게놈 서열, 5' Frt 부위, 하이그로마이신 카세트, 3' Fit 부위, 및 실시예 3에 기재된 사람 λ 서열의 5' 말단과 약 53kb가 중첩하고 표적화 작제물에 대해 3' 상동성 암으로서 작용하는 21개 연속 hVλ 유전자 분절을 함유하는 171, 457 bp의 사람 게놈 λ 서열을 함유한다(도 5a 및 5b, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 각각 28 hVλ 유전자 분절 및 내인성 마우스 불변 유전자 (Cκ 또는 Cλ2)에 작동적으로 연결된 hJλ1 유전자 분절을 함유하고 재조합 즉시 키메라 경쇄를 형성하는 독립적으로 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0230] 유사한 양상으로, 상기 +16-κ 표적화 벡터를 또한 사용하여 16개의 추가의 hVλ 유전자 분절을, 통합된 사람 κ 서열의 존재 및 부재하에 다중 hJλ 유전자 분절을 혼입시키는 실시예 2에 기재된 다른 초기 변형에 도입하였다(도 4b). 다른 초기 변형을 함유하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 상기 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열의 존재 또는 부재하에 28 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하여 재조합 즉시 키메라 λ-κ 경쇄를 형성하는 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0231] 12개 추가의 사람 Vλ 유전자 분절의 도입. 추가의 hVλ 유전자 분절은 독립적으로 유사한 표적화 벡터 및 방법을 사용하여 상기된 변형 각각에 부가하였다. 추가의 hVλ 유전자 분절을 함유하는 표적화 벡터와의 상동성 재

조합으로부터 수득된 최종 유전자좌 구조는 도 7a 및 7b에 나타낸다.

[0232] 간략하게, 표적화 벡터는 상기된 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌로 12개 추가의 hVλ 유전자 분절의 도입을 위해 조작하였다(도 5a 및 5b, +12-λ 또는 12-κ 표적화 벡터). 클러스터 B 기원의 12개의 연속 hVλ 유전자 분절을 함유하는 사람 BAC 클론 RP11-22I18 (Invitrogen) 기원의 93,674 bp의 DNA 단편은 내인성 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에 대해 5' 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암 및 사람 게놈 λ 서열을 함유하는 3' 상동성 암으로 조작하였다. 상기 표적화 작제물에 사용되는 5' 상동성 암은 상기된 16개 hVλ 유전자 분절의 첨가를 위해 사용되는 동일한 5' 상동성 암이다(도 5a 및 5b). 상기 3' 상동성 암은 BAC 클론 RP11-761I13으로부터 사람 λ 서열의 27,468 bp 게놈 단편에 함유된 사람 Vλ3 -29P 유전자 분절에 대해 약 3431 bp 5'에 있는 PI-SceI 부위을 조작함에 의해 제조하였다. 상기 PI-SceI 부위는 약 94kb의 추가의 사람 λ 서열 단편을, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터(도 5a 및 5b)를 사용하는 이전의 변형에서 사람 λ 서열의 5' 말단과 중첩하는 약 27kb의 사람 λ 서열 단편으로 연결하기 위한 연결점으로서 작용한다. 이들 2개의 표적화 벡터는 5'에서 3'로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열, 또는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위 및 16개 추가의 hVλ 유전자 분절의 삽입 기원의 사람 5' 말단과 약 27kb과 중첩하고 상기 표적화 작제물에 대해 3' 상동성 암으로서 작용하는, 16 hVλ 유전자 분절 및 PI-SceI 부위를 함유하는 121, 188bp의 사람 게놈 λ 서열을 함유한다(도 5a 및 5b, +12-λ 또는 12-κ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 독립적으로 내인성 마우스 불변 영역(Cκ 또는 Cλ2)와 작동적으로 연결된 40 hVλ 유전자 분절 및 사람 Jλ1을 함유하여, 이의 재조합 즉시 키메라 경쇄를 형성하는 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 제조하였다(도 5a 및 5b의 하부).

[0233] 유사한 방식으로, +12-κ 표적화 벡터를 또한 사용하여 12개 추가의 hVλ 유전자 분절을, 통합된 사람 κ 서열의 존재 또는 부재하에 다중 hJλ 유전자 분절을 혼입시킨 다른 초기 변형에 도입하였다(도 4b). 다른 변형을 함유하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 상기 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 내인성 마우스 Cκ 유전자와 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열의 존재 및 부재하에 40 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 및 7 유전자 분절을 함유하여 이의 재조합 즉시 키메라 λ-κ 경쇄를 형성하는 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0234] 실시예 IV

[0235] 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 표적화된 ES 세포의 동정

[0236] 이전의 실시예에 따라 제조된 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 전기영동하여 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 발현하는 키메라 마우스를 생성하기 위해 변형된 ES 세포를 제조하였다. 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 삽입체를 함유하는 ES 세포는 정량적 TAQMAN® 분석으로 동정하였다. 특이적 프라이머 세트 및 프로브는 사람 λ 서열 및 연합된 선별 카세트의 삽입(대립 유전자의 수득, GOA), 내인성 마우스 서열 및 임의의 선별 카세트의 상실(대립 유전자의 상실, LOA) 및 플랭킹 마우스 서열의 보유(대립 유전자 보유, AR)를 위해 디자인하였다. 사람 λ 서열의 각각의 추가의 삽입을 위해, 추가의 프라이머 세트 및 프로브를 사용하여 이전에 표적화된 사람 서열의 보유를 확인하기 위해 사용된 이전의 프라이머 세트 및 프로브 뿐만 아니라 추가의 사람 λ 서열의 존재를 확인하였다. 표 1은 정량적 PCR 분석에 사용되는 프라이머 및 연합된 프로브를 제시한다. 표 2는 ES 세포 클론에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절 각각의 섹션에 대한 삽입을 확인하기 위해 사용되는 조합을 제시한다.

[0237] 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 ES 세포는 임의로 FLP를 발현하는 작제물로 형질감염시켜 사람 Vλ5-52-Vλ1-40 유전자 분절을 함유하는 표적화 작제물의 삽입에 의해 도입된 Frt'ed 네오마이신 카세트를 제거하였다(도 5a 및 5b). 네오마이신 카세트는 임의로 FLP 리컴비나제를 발현하는 마우스에 접종함에 의해 제거될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 제6,774,279호). 임의로 상기 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

표 1

프라이머	서열번호	프로브	서열번호
hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	—	—
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

[0238]

표 2

변형	검정	정방향/역방향 프라이머 세트	프로브	서열 위치
12hVλ & hJλ1의 삽입	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	hJλ 서열
		NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
	LOA	MK20F/MKP4R	—	불활성화된 κ 유전자좌의 lox511/loxP 서열
		HygF/HygR	HygP	불활성화된 λ 유전자좌로부터의 하이그로마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 Vλ1-Cλ1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 Vλ2-Cλ2 클러스터
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열
16hVλ의 삽입	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 – hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	하이그로마이신 카세트
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 Vλ1-Cλ1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 Vλ2-Cλ2 클러스터
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열

[0239]

12hVλ의 삽입	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 – hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
	LOA	HygF/HygR	HygP	하이그로마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 Vλ1-Cλ1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 Vλ2-Cλ2 클러스터
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 – hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' Vκ 유전자좌에서의 마우스 서열

[0240]

[0241] 실시예 V

[0242] 내인성 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스의 제조

[0243] 상기된 표적화된 ES 세포는 공여체 ES 세포로서 사용하고 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아

에 도입하였다(문헌참조: 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou et al. (2007). F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). 사람 λ유전자 분절을 독립적으로 함유하는 VELOCIMICE® (공여체 ES 세포로부터 완전히 유래된 F0 마우스)은 고유 사람 λ 유전자 분절의 존재를 검출하는 변형된 대립 유전자 분석(Valenzuela et al., supra)을 사용한 유전자분류에 의해 동정하였다(상기 참조).

[0244] 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스의 κ:λ 경쇄 사용. 단일 hJλ 유전자 분절을 갖는 hVλ 유전자 분절의 3개의 연속적 삽입 각각에 대한 마우스 동종접합체(도 5b) 및 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 단일 hJλ 유전자 분절 또는 4개의 사람 Jλ 유전자 분절을 갖는 hVλ 유전자 분절의 제1 삽입에 대한 마우스 동종접합체(도 4b)는 유동 세포측정기를 사용하여 비장세포에서 κ 및 λ 경쇄 발현에 대해 분석하였다.

[0245] 간략하게, 비장은 마우스 그룹(그룹당 3마리 내지 7마리 동물)으로부터 수거하고 유리 슬라이드를 사용하여 분쇄하였다. ACK 용해 완충액으로 적혈구 세포(RBC)를 용해시킨 후(Lonza Walkersville), 비장세포는 마우스 CD19 (클론 1D3; BD Biosciences), 마우스 CD3 (17A2; Biolegend), 마우스 Igκ (187.1 ; BD Biosciences) 및 마우스 Igλ (RML-42; Biolegend)에 특이적인 형광성 염료 접합된 항체로 염색시켰다. BD™ LSR II 유동 세포측정기(BD Biosciences)를 사용하여 데이타를 획득하고 FLOWJO™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 표 3은 각각의 유전자 변형을 갖는 동물 그룹 기원의 비장세포에서 관찰된 B 세포($CD19^+$), κ 경쇄 ($CD19^+Ig\kappa^+Ig\lambda^-$) 및 λ 경쇄($CD19^+Ig\kappa^-Ig\lambda^+$) 발현에 대한 평균 % 값을 제시한다.

[0246] 유사한 실험에서, 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 12개 hVλ 및 4개 hJλ 유전자 분절의 제1 삽입을 위한 동종접합성 마우스(도 4b의 하부) 및 40개 hVλ 및 하나의 hJλ 유전자 분절에 대해 동종접합성 마우스(도 5b의 하부 또는 도 7b의 상부) 기원의 비장 구획의 B 세포 함량을 유동 세포측정기(상기된 바와 같은)을 사용하여 Igκ 및 Igλ 발현에 대해 분석하였다. 도 8a는 각각의 그룹 기원의 대표적인 마우스에 대한 $CD19^+$ B 세포에서 Igλ 및 Igκ 발현을 보여준다. 비장 당 $CD19^+$ B 세포의 수는 또한 각각의 마우스에 대해 기록하였다(도 8b).

[0247] 또 다른 실시형태에서, 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40hVλ 및 4개의 hJλ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스 기원의 비장 및 골수 구획의 B 세포 함량(도 7b의 하부)은 다양한 세포 표면 마커의 유동 세포측정기를 사용하여 B 세포 발육을 통한 진행에 대해 분석하였다.

[0248] 간략하게, 야생형, 및 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40hVλ 및 4개의 hJλ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스의 2개의 그룹(각각 N=3, 9-12주령, 수컷 및 암컷)을 희생시키고 비장 및 골수를 수거하였다. 골수는 완전 RPMI 배지(태아 소 혈청), 나트륨 피루베이트, 헤페스, 2-머캅토에탄올, 비필수 아미노산 및 젠타마이신이 보충된 RPI 배지)로 세정함에 의해 대퇴부로부터 수거하였다. 비장 및 골수 집단 기원의 RBC는 ACK 용해 완충액 (Lonza Walkersville)으로 용해시킴에 이어서 완전 RPMI 배지로 세척하였다. 1×10^6 세포는 10분 동안 빙상에서 항-마우스 CD16/CD32 (2.4G2, BD Biosciences)로 항온처리함에 이어서 빙상에서 30분 동안 선별된 항체 패널을 사용하여 표지시켰다.

[0249] 골수 패널: 항마우스 FITC-CD43 (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-B220(RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD) 및 Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend).

[0250] 골수 및 비장 패널: 항마우스 FITC-Igκ (187.1, BD), PE-Igλ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, ebioscience), PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

[0251] 염색 후, 세포를 세척하고 2% 포름알데하이드에 고정시킨다. 데이타 획득은 FACSCANTOII™ 유동 세포측정기(BD Biosciences)로 수행하고 FLOWJO™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 도 9a 내지 도 9d는 각각의 그룹 기원의 하나의 대표적인 마우스의 비장 구획에 대한 결과를 보여준다. 도 10a 내지 도 10e는 각각의 그룹 기원의 하나의 대표적인 마우스의 골수 구획에 대한 결과를 보여준다. 표 4는 다양한 유전적 변형을 갖는 동물 그룹 기원의 비장세포에서 관찰된 B 세포($CD19^+$), κ 경쇄 ($CD19^+Ig\kappa^+Ig\lambda^-$), 및 λ 경쇄($CD19^+Ig\kappa^-Ig\lambda^+$) 발현에 대한 평균 % 값을 제시한다. 표 5는 야생형, 및 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40hVλ 및 4개의 hJλ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스의 골수에서 관찰

되는 B 세포(CD19^{+}), 성숙한 B 세포(B220^{hi}IgM^{+}), 미성숙한 B 세포(B220^{int}IgM^{+}), κ 경쇄(B220^{int}IgM^{+}Igκ^{+})를 발현하는 미성숙한 B 세포 및 λ 경쇄(B220^{int}IgM^{+}Igλ^{+})를 발현하는 미성숙 B 세포에 대한 평균 % 값을 제시한다. 상기 실험은 상기된 마우스의 추가 그룹으로 반복하고 유사한 결과를 입증하였다(데이타는 나타내지 않음).

표 3

[0252]

유전자형	B 세포 %	Igκ^{+} %	Igλ^{+} %
야생형	46.2	91.0	3.6
12 hVλ+hJλ1	28.3	10.4	62.5
12 hVλ-VκJκ-hJλ1	12.0	11.0	67.5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ	41.8	17.2	68.4
28 hVλ+hJλ1	22.0	13.3	51.1
40 hVλ+hJλ1	28.2	24.3	53.0

표 4

[0253]

유전자형	B 세포 %	Igκ^{+} %	Igλ^{+} %
야생형	49.8	91.2	3.5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33.3	41.6	43.1

표 5

[0254]

유전자형	B 세포 %	성숙 B 세포 %	미성숙 B 세포 %	미성숙 Igκ^{+} B 세포 %	미성숙 Igλ^{+} B 세포 %
야생형	62.2	9.2	12.0	79.0	8.84
40hVλ-VκJκ-4hJλ	60.43	2.59	7.69	38.29	43.29

[0255] 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스에서 사람 Vλ 유전자 사용. 사람 λ 서열(hVλ3-12 -hVλ3-1 및 hJλ1, 도 5b)의 제1 삽입에 대해 이종접합성인 마우스 및 사람 λ 서열(hVλ5-52-hVλ3-1 및 hJλ1, 도 5b)의 제3 삽입을 위해 동종접합성인 마우스는 비장으로부터 분리된 RNA를 사용하는 역전사효소 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)에 의한 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였다.

[0256] 간략하게 비장을 수거하고 멸균 1회용 백중에서 5% HI-FBS를 갖는 10ml의 RPMI-1640(Sigma)로 관장하였다. 이어서 단일 비장을 함유하는 각각의 백을 STOMACHER™ (Seward)에 위치시키고 30초 동안 배지 세팅에서 파쇄하였다. 파쇄된 비장은 0.7㎛ 세포 스트레이너를 사용하여 여과하고 이어서 원심분리(10분 동안 1000rpm)로 펠렛화하고 RBC는 3분 동안 BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences)에서 용해시켰다. 비장 세포는 RPMI-1640으로 희석하고 다시 원심분리하며 이어서 1mL의 PBS PBS (Irvine Scientific)중에 재현탁시켰다. RNA는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 펠렛화된 비장 세포로부터 분리하였다.

[0257] RT-PCR은 사람 hVλ 유전자 분절 및 마우스 Cκ 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 비장세포 RNA에 대해 수행하였다(표 6). PCR 생성물은 겔 정제하고 pCR2.1-TOPO TA 벡터(Invitrogen)로 클로닝하고 클로닝 부위를 플랭킹하는 위치에서 벡터내에 위치하는 프라이머 M13 정배향(GTAAAACGAC GGCCAG; 서열번호 55) 및 M13 역배향(CAGGAAACAG CTATGAC; 서열번호 56)을 사용하여 서열분석하였다. 사람 λ 서열의 제1 및 제3 삽입으로부터 유래하는 84개 총 클론을 서열 분석하여 hVλ 유전자 사용을 측정하였다(표 7). 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ1-mCκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 도 11에 나타낸다.

[0258] 유사한 양상으로, 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 경쇄 유전자 서열의 제3 삽입(즉, 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40hVλ 유전자 분절 및 4개의 hJλ 유전자 분절, 도 7b의 하부)에 동종접합성인 마우스는 비장세포로부터 분리된 RNA를 사용하는 RT-PCR에 의해 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였

다(상기된 바와 같이). 26개의 선택된 RT-PCR 클론에 대한 상기 사람 λ 경쇄 유전자 분절 사용은 표 8에 나타낸다. 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ-mCκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 도 12에 나타낸다.

[0259] 유사한 양상으로, 내인성 마우스 Cλ2 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 제1 삽입(12hV λ 유전자 분절 및 hJλ1, 도 4a 및 도 5a)에 대해 동종접합성인 마우스는 비장세포로부터 분리된 RNA를 사용하는 RT-PCR에 의해 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였다(상기된 바와 같이). hVλ 유전자 분절에 특이적인 프라이머(표 6)는 마우스 Cλ2 유전자에 특이적인 2개의 프라이머; Cλ2-1 (서열번호 104) 또는 Cλ 2-2 (서열번호 105)중 하나와 쌍을 형성한다.

[0260] hλ1로 재배열된 다중 hVλ 유전자 분절은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스 기원의 RT-PCR 클론으로부터 관찰하였다. 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ-mCλ2 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 도 13에 나타낸다.

표 6

[0261]

5' hVλ 프라이머	서열 (5'-3')	서열 번호 :
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53

3' 마우스 Cκ 프라이머	서열 (5'-3')	서열 번호 :
mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

표 7

[0262]

hVλ	측정된 클론의 번호
3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

표 8

클론	hVλ	hJλ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

[0263]

[0264] 도 11은 단일 hJλ 유전자 분절과 함께 hVλ 유전자 분절의 제1 및 제3 삽입을 함유하는 마우스 기원의 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ1-mCκ 접합부의 서열을 나타낸다. 도 11에 나타낸 상기 서열은 마우스 Cκ 유전자와 재조합된 hJλ1을 갖는 상이한 hVλ 유전자 분절을 포함하는 고유 재배열을 도시한다. 12개 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1을 함유하는 단일의 변형된 내인성 κ 유전자좌를 함유하는 이종접합성 마우스 및 40hVλ 유전자 분절 및 hJλ1을 함유하는 2개의 변형된 내인성 κ 유전자좌를 함유하는 동종 접합성 마우스는 둘 다 마우스 Cκ 유전자와 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 사람 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성한다. 이들 재배열은 키메라 유전자좌가 이들 마우스내 다중의 독립적인 B 세포에서 독립적으로 사람 λ 유전자 분절을 재배열할 수 있음을 입증한다. 추가로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 대한 이들 변형은 hVλ 유전자 분절 중 어느 것이 작동 불가능하게 하지 않았거나 hJλ1과 재배열하는 것으로 관찰된 16개의 상이한 hVλ 유전자 분절에 의해 입증된 바와 같이 B 세포 발육 동안에 다중 hVλ 및 hJλ(Jλ1) 유전자 분절과 키메라 유전자좌가 재조합하는 것을 방해하지 않았다(표 7). 추가로, 이들 마우스는 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 재배열된 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 제조하였다.

[0265] 도 12는 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40개 hVλ 및 4개 hJλ 유전자 분절에 대해 동종접합성 마우스 기원의 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ-mCκ접합부의 서열을 나타낸다. 도 12에 나타낸 서열은 다수의 상이한 hVλ 유전자 분절이 재배열되고 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된, 전체 키메라 유전자좌에 걸쳐 있는 다수의 상이한 hVλ 유전자 분절을 포함하는 추가의 고유 재배열을 도시한다. 40 hVλ 및 4개 hJλ 유전자 분절을 함유하는 변형된 내인성 κ 유전자좌를 포함하는 동형접합성 마우스는 또한 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 사람 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성할 수 있다. 이들 재배열은 추가로 모든 단계의 키메라 유전자좌가 이들 마우스내 다수의 독립적인 B 세포에서 사람 λ 유전자 분절을 독립적으로 재배열할 수 있음을 입증한다. 추가로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 대한 상기 추가의 변형은 사람 λ 유전자 분절의 각각의 삽입이 hVλ 및/또는 Jλ 유전자 분절중 어느 것도 작동될 수 없도록 하지 않거나 26개 선택된 RT-PCR 클론으로부터 모든 4개의 hJλ 유전자 분절(표 8)과 재배열하는 것으로 관찰된 12개 상이한 hVλ 유전자 분절에 의해 입증된 바와 같이 B 세포 발육동안에 키메라 유전자좌가 hVλ과 Jλ 유전자 분절과 재조합하

는 것을 방해하지 않음을 입증한다. 추가로, 이들 마우스는 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 Cκ 영역에 작동적으로 연결된 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 생성하였다.

[0266] 도 13은 12 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1에 대해 동종접합성 마우스 기원의 3개의 개별 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ-mCλ2 접합부의 서열을 보여준다. 도 13에 나타낸 서열은 hJλ1이 재배열되고 마우스 Cλ2 유전자에 작동적으로 연결된 제1 삽입의 길이에 걸쳐있는, 상이한 hVλ 유전자 분절을 포함하는 추가의 고유 재배열을 도시한다(2D1 = Vλ2-8Jλ1 ; 2D9 = Vλ3-10Jλ1 ; 3E15 = Vλ3-1Jλ1). 하나의 클론은 hVλ-hJλ 접합부에서 N 첨가로 인한 비생산적인 재배열을 입증하였다(2D1, 도 13). 이것은, 재조합 동안에 유전자 분절의 연결이 부정확한 것으로 나타남으로써 V(D)J 재조합에서 범상하지 않은 경우 아니다. 상기 클론은 이들 마우스의 경쇄 레퍼토리에 존재하는 비생성적 재조합체를 나타내지만 이것은 항체 유전자간에 접합 다양성에 기여하는 유전적 기작이 이들 마우스에서 정상적으로 작동하여 보다 큰 다양성을 갖는, 경쇄를 함유하는 항체 레퍼토리를 형성함을 입증한다.

[0267] 12hVλ 유전자 분절 및 hJλ1을 함유하는 변형된 내인성 λ 유전자좌를 함유하는 동종접합성 마우스는 또한 내인성 마우스 Cλ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 마우스 Cλ 영역에 연결된 hVλ 영역을 함유하는 역 키메라 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성할수 있다. 이들 재배열은 추가로, 다른 경쇄 유전자좌(즉, λ 유전자좌)에 위치한 사람 λ 경쇄 유전자 분절이 이들 마우스에서 다수의 독립적인 B 세포에서 사람 λ 유전자 분절을 독립적으로 재배열할 수 있음을 입증한다. 추가로, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 대한 변형은 사람 λ 유전자 분절의 삽입이 hVλ 및/또는 hJλ1 유전자 분절의 어느 것도 비작동성이도록 하지 않거나 B 세포 발육 동안에 상기 키메라 유전자좌가 hVλ 및 hJλ1 유전자 분절을 재조합하는 것을 방해하지 않음을 입증한다. 추가로, 이들 마우스는 또한 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 Cλ 영역에 작동적으로 연결된 사람 Vλ-Jλ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 생성하였다.

[0268] 상기 실시예에 나타낸 바와 같이, 내인성 κ 및 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스는 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 재배열할 수 있고, 기능성 경쇄가 비장 및 골수 둘 다에서 B 세포 발육의 다양한 시점에서 요구되기 때문에, 마우스의 정상적인 항체 레퍼토리의 일부로서 마우스 Cκ 및/또는 Cλ 영역의 구조로 이들을 발현할 수 있다. 추가로, B 세포의 조기 서브세트(예를 들어, 프레-, 프로- 및 전이 B 세포)는 야생형 한배새끼와 비교하여 이들 마우스에서 정상적인 표현형을 입증한다(도 9d, 10a 및 10b). 골수 및 말초 B 세포 집단에서의 작은 결점이 관찰되고 이는 자가-반응성 미성숙 B 세포의 결실 및/또는 마우스 중쇄와 사람 λ 경쇄의 준최적 연합에 기여할 수 있다. 그러나, 상기 마우스에서 관찰된 Igκ/lgλ 사용은 마우스에서 관찰되는 것 보다 사람 경쇄를 더 발현하는 상황임을 입증한다.

[0269] 실시예 VI

[0270] 내인성 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스의 교배

[0271] 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 유전자 분절의 사용을 최적화하기 위해, 재배열되지 않은 사람 λ 유전자 분절을 함유하는 마우스를, 반대 내인성 경쇄 유전자좌(κ 또는 λ)에서 결실을 포함하는 또 다른 마우스와 교배한다. 예를 들어, 내인성 κ 유전자좌에 위치한 사람 λ 유전자 분절은, 내인성 λ 경쇄 유전자좌에서 또한 결실을 포함하는 마우스에 존재하는 유일한 기능성 경쇄 유전자 분절이다. 상기 방식으로, 수득된 후손은 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 사람 λ 경쇄만을 발현한다. 교배는 당업계에 인지된 표준 기술 및 대안으로 상업적 회사(예를 들어, Jackson Laboratory)에 의해 수행한다. 내인성 κ 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절 및 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 결실을 함유하는 마우스 종은 고유 역-키메라(사람-마우스) λ 경쇄의 존재 및 내인성 마우스 λ 경쇄의 부재에 대해 스크리닝한다.

[0272] 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 마우스는 또한 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자좌가 사람 중쇄 가변 유전자좌로 대체됨을 포함하는 마우스와 교배한다(문헌참조: 미국 특허 제6,596,541호, Regeneron Pharmaceuticals, the VELOCIMMUNE® genetically engineered mouse). VELOCIMMUNE® 마우스는 부분적으로 내인성 마우스 불변 영역 유전자좌에 작동적으로 연결된 사람 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가짐을 포함하여 항원 자극에 응답하여 사람 중쇄 가변 영역 및 마우스 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 생성한다. 항체의 중쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA는 분리될 수 있고 사람 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA에 작동적으로 연결된다. 따라서, 상기 DNA는 항체의 완전한 사람 중쇄를 발현할 수 있는 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 교배 스케줄에 따라, 내인성 마우스 중쇄 유전자좌가 내인성 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 중쇄 유전자좌 및 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌로 대체된 것을 함유하는 마우스를 수득한다. 체세포적으로 돌연변이된 사람 중쇄 가변 영역 및 사람 λ 경쇄 가변 영역을 함유하는 항체는 목적하는 항원과의 면역화즉시 분리될 수 있다.

[0273] 실시예 VII

[0274] 사람 중쇄 및 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스로부터 항체의 제조

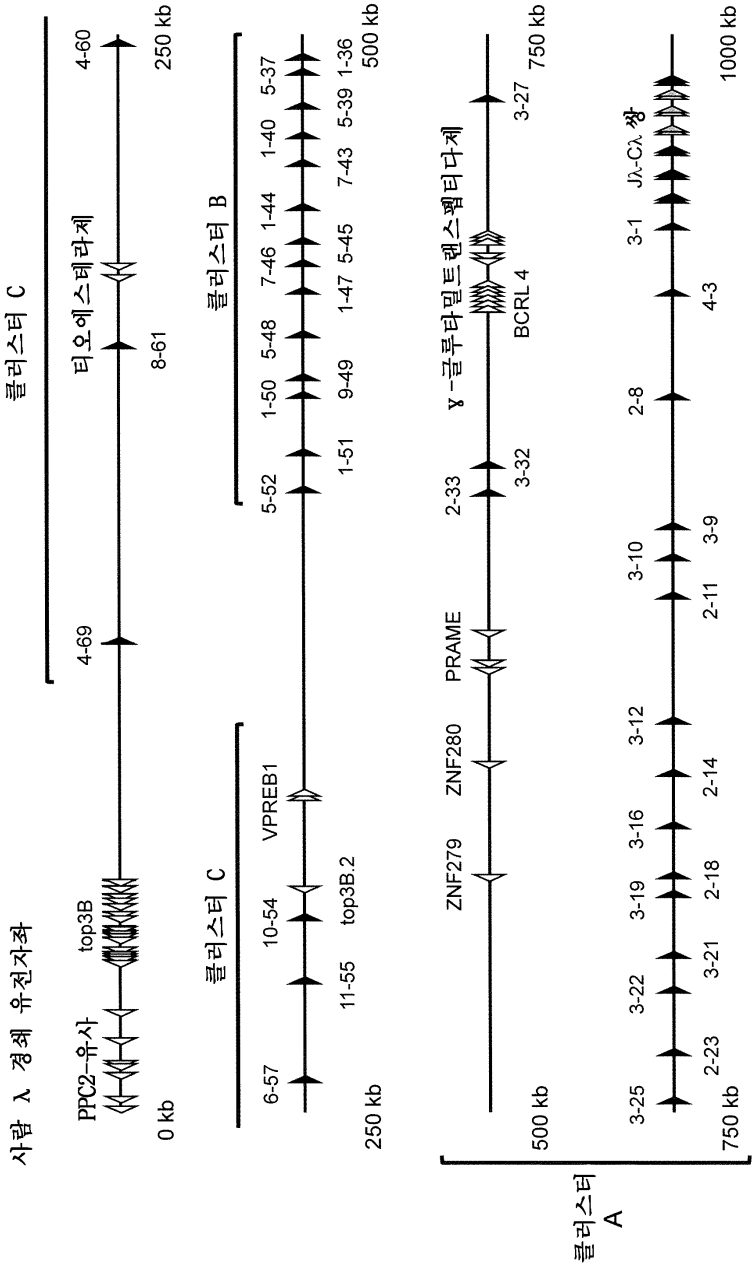
[0275] 다른 내인성 Ig 유전자좌(상기된 바와 같이)의 변형 및 결실을 함유하는 다양한 목적하는 종에 대한 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 마우스를 육종시킨 후(상기된 바와 같이), 선택된 마우스는 목적하는 항원과 면역화시킨다.

[0276] 일반적으로, 단일의 재배열되지 않은 사람 생식선 경쇄 영역 중 하나를 함유하는 VELOCIMMUNE® 마우스를 항원으로 기회감염시키고, 림프구 세포(예를 들어, B 세포)를 동물의 혈청으로부터 회수한다. 상기 림프구 세포는 골수종 세포주와 융합하여 불멸의 하이브리도마 세포주를 제조할 수 있고 상기 하이브리도마 세포주는 스크리닝하고 선별하여 면역화를 위해 사용되는 항원에 특이적인 사람 중쇄 및 사람 λ 경쇄를 함유하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 동정한다. 중쇄 및 λ 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA를 분리하고 중쇄 및 경쇄의 목적하는 이소형 불변 영역에 연결시킬 수 있다. 내인성 마우스 λ 유전자좌와 비교하여 추가의 hVλ 유전자 분절의 존재로 인해, 경쇄 레퍼토리의 다양성이 급격히 증가하고 면역화즉시 항원-특이적 레퍼토리에 대해 보다 높은 다양성을 부여한다. 상기 수득한 클로닝된 항체 서열이 후속적으로 CHO 세포와 같은 세포에서 제조될 수 있다. 또한, 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA는 항원-특이적 림프구(예를 들어, B 세포)로부터 직접 분리할 수 있다.

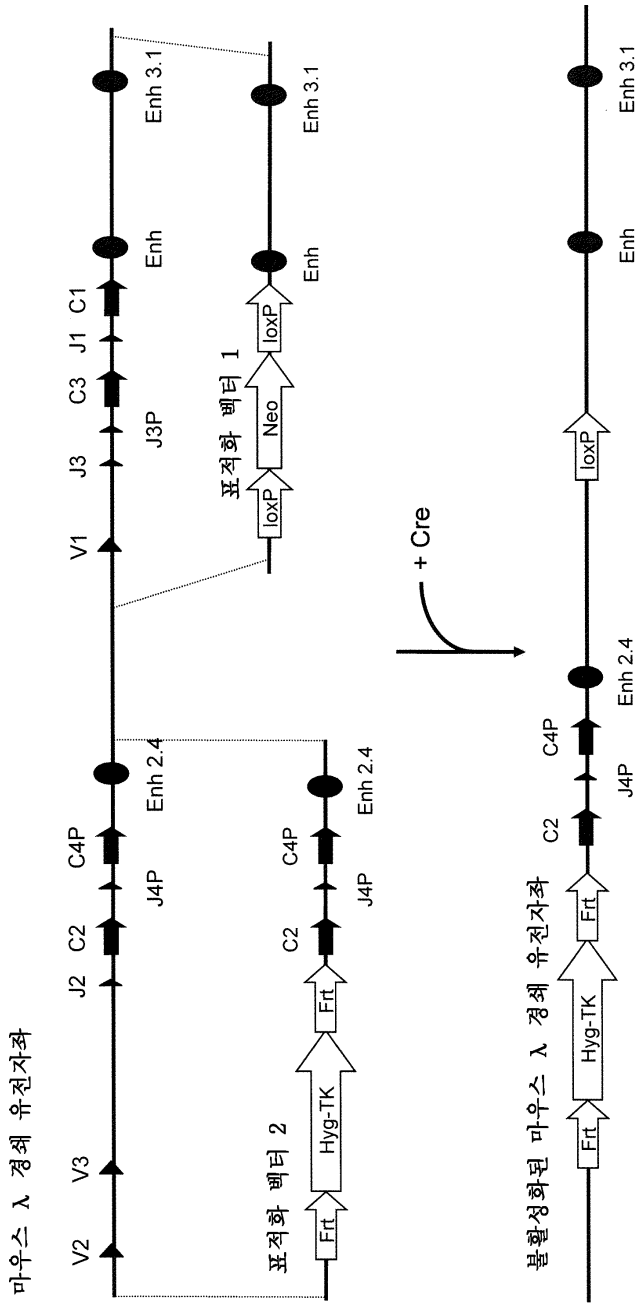
[0277] 처음에, 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 높은 친화성의 키메라 항체를 분리한다. 상기된 바와 같이, 상기 항체의 특성을 분석하고 친화성, 선택성, 에피토프 등을 포함하는, 목적하는 특성에 대해 선택한다. 상기 마우스 불변 영역은 목적하는 사람 불변 영역으로 대체하여 체세포적으로 돌연변이된 중쇄 및 본 발명의 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌로부터 유래된 사람 λ 경쇄를 제조한다. 적합한 사람 불변 영역은 예를 들어, 야생형 또는 변형된 IgG1, lgG2, IgG3, 또는 IgG4를 포함한다.

도면

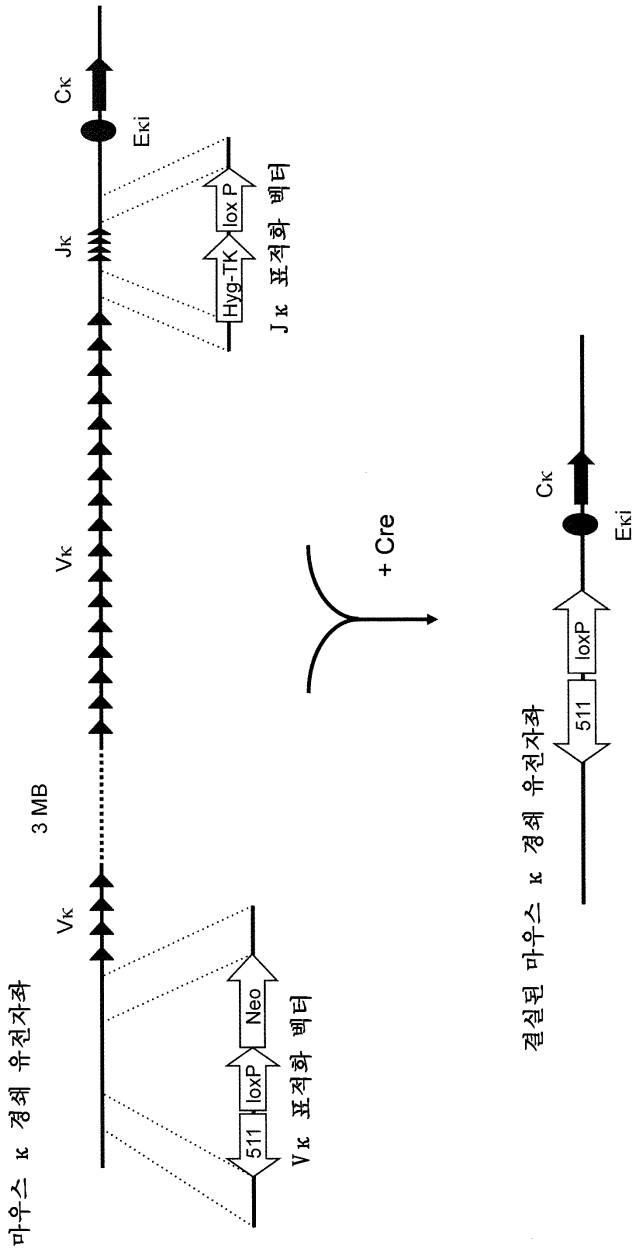
도면1


사람 λ 경쇄 유전자좌
클러스터 C
PPC2-유사
top3B
티오에스테라제
4-69
4-60
8-61
0 kb
250 kb
클러스터 C
클러스터 B
6-57
10-54
VPREB1
5-52
1-50
5-48
7-46
1-44
1-40
5-37
11-55
top3B.2
1-51
9-49
1-47
5-45
7-43
5-39
1-36
250 kb
500 kb
ZNF279
ZNF280
PRAME
2-33
γ-글루타밀트랜스펩티다제
3-32
BCRL 4
3-27
500 kb
750 kb
클러스터 A
3-25
3-22
3-19
3-16
3-12
3-10
2-8
3-1
Jλ-Cλ 쌍
2-23
3-21
2-18
2-14
2-11
3-9
4-3
750 kb
1000 kb

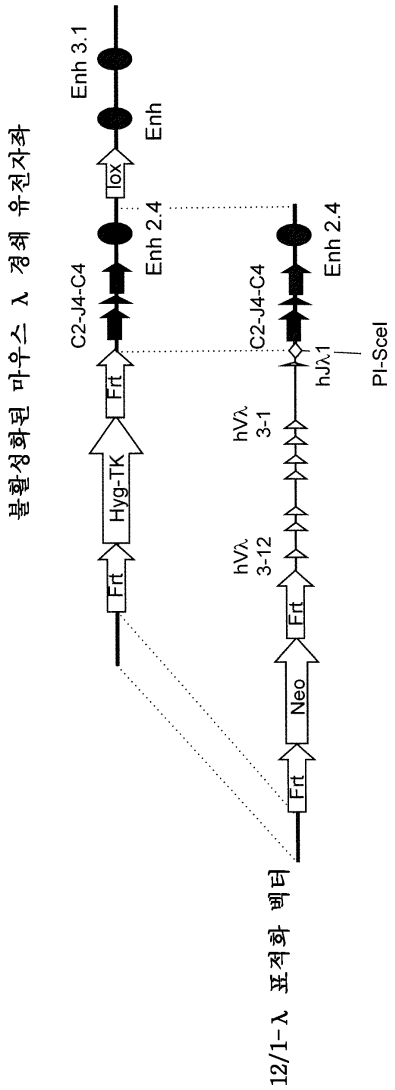
도면2


마우스 λ 경쇄 유전자좌
V2
V3
J2
C2
J4P
C4P
Enh 2.4
표적화 벡터 2
Frt
Hyg-TK
Frt
C2
J4P
C4P
Enh 2.4
V1
J3
C3
J1
C1
J3P
Enh
Enh 3.1
표적화 벡터 1
loxP
Neo
loxP
Enh
Enh 3.1
+ Cre
불활성화된 마우스 λ 경쇄 유전자좌
Frt
Hyg-TK
Frt
C2
J4P
C4P
Enh 2.4
loxP
Enh
Enh 3.1

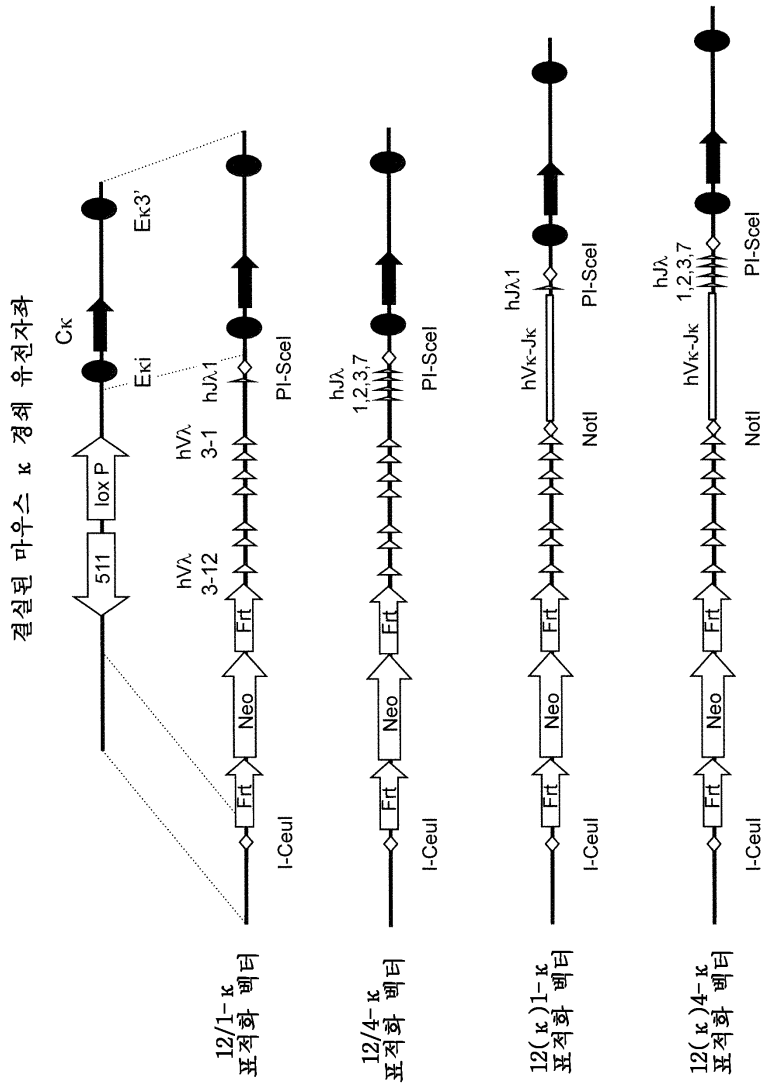
도면3


마우스 κ 경쇄 유전자좌
Vκ
3 MB
Vκ
Jκ
Eκi
Cκ
Vκ 표적화 벡터
511
loxP
Neo
Jκ 표적화 벡터
Hyg-TK
lox P
+ Cre
결실된 마우스 κ 경쇄 유전자좌
Cκ
Eκi
loxP
511

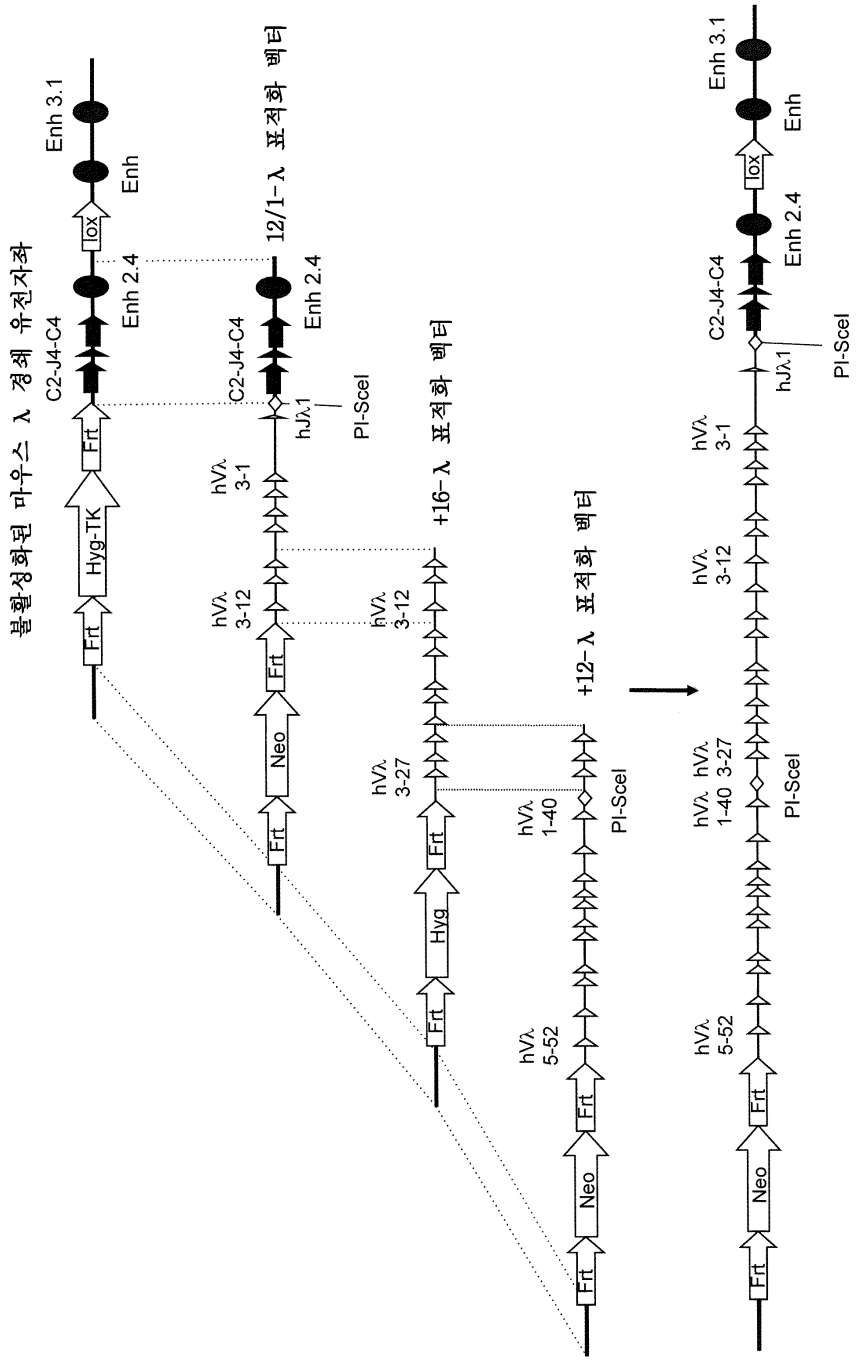
도면4a


불활성화된 마우스 λ 경쇄 유전자좌
Enh 3.1
Enh
lox
Enh 2.4
C2-J4-C4
Frt
Hyg-TK
Frt
hVλ
3-12
Frt
Neo
Frt
12/1-λ 표적화 벡터
C2-J4-C4
Enh 2.4
hJλ1
PI-SceI
hVλ
3-1

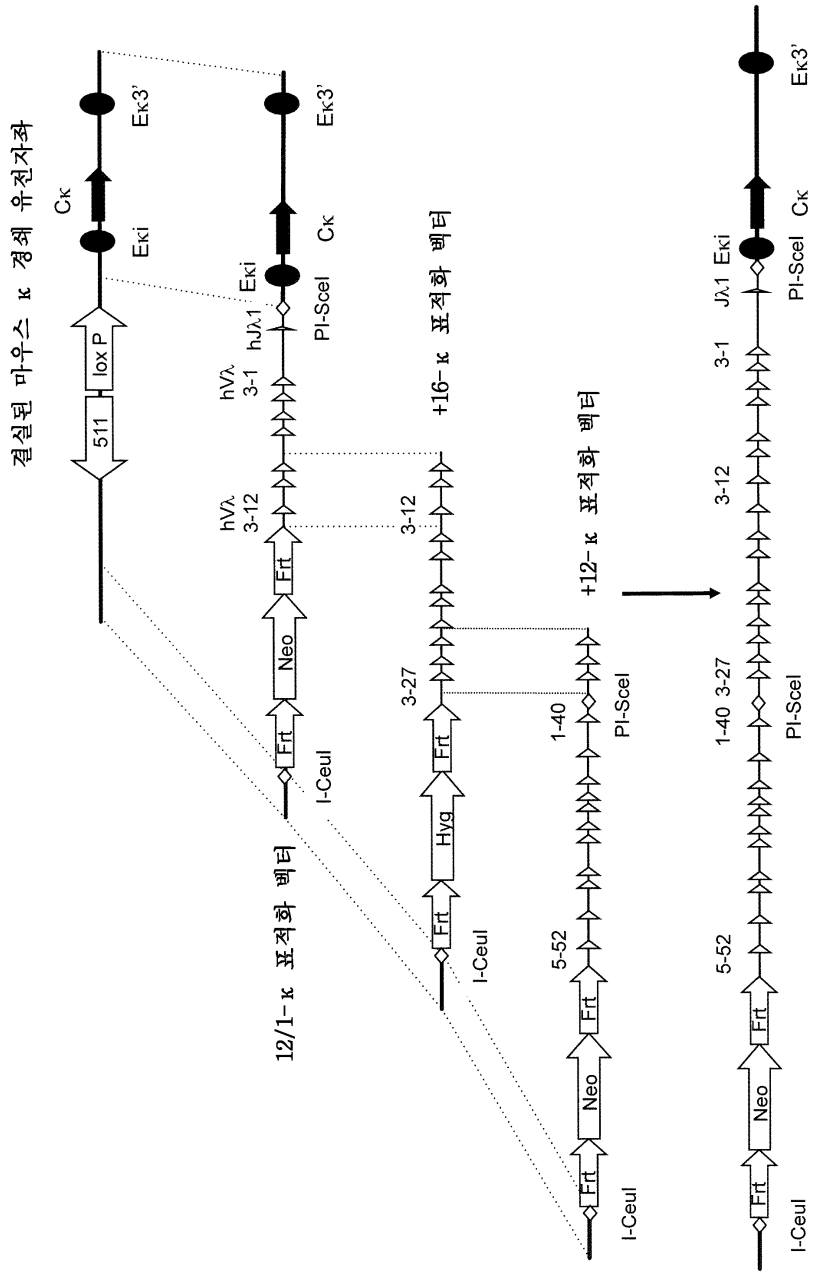
도면4b


결실된 마우스 κ 경쇄 유전자좌
Cκ
Eκ3'
Eκi
lox P
511
hVλ 3-12
hVλ 3-1
hJλ1
PI-SceI
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
12/1-κ 표적화 벡터
hJλ 1,2,3,7
12/4-κ 표적화 벡터
hVκ-Jκ
NotI
12(κ)1-κ 표적화 벡터
12(κ)4-κ 표적화 벡터

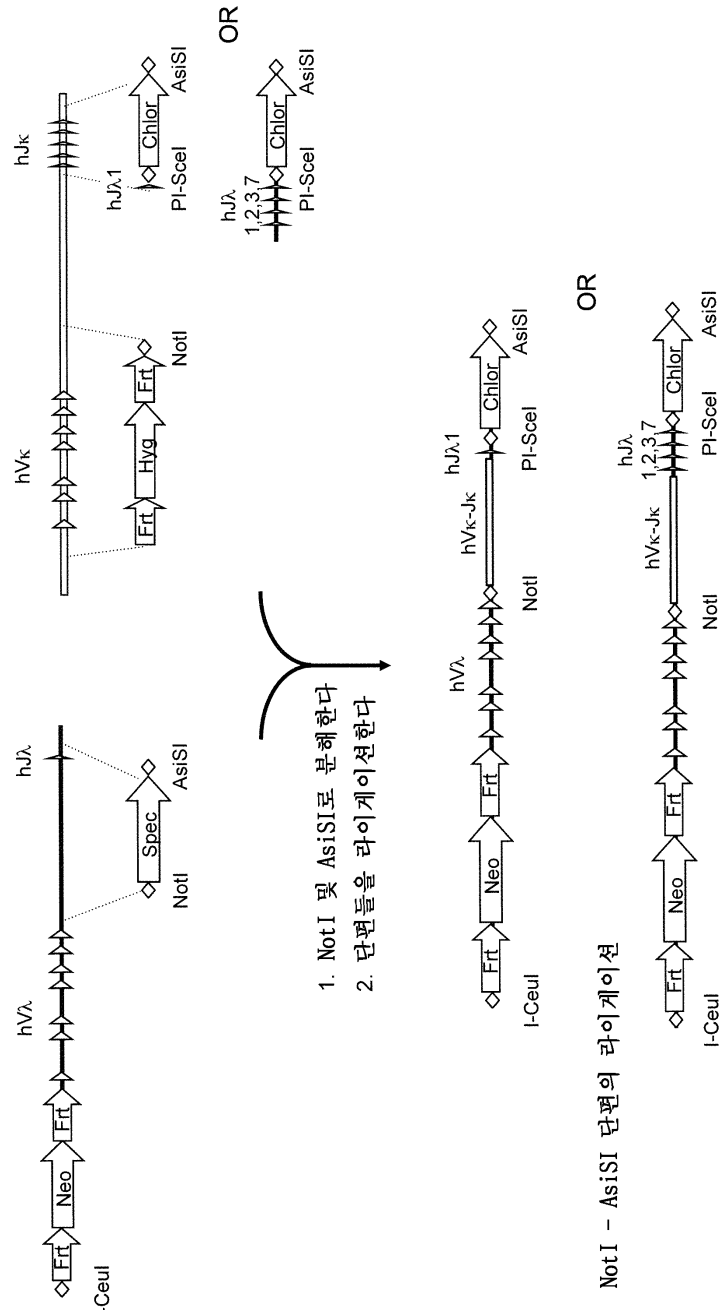
도면5a


불활성화된 마우스 λ 경쇄 유전자좌
C2-J4-C4
Enh 3.1
Enh
Enh 2.4
lox
Frt
Hyg-TK
Neo
Hyg
hVλ 3-1
hVλ 3-12
hVλ 3-27
hVλ 1-40
hVλ 5-52
hJλ1
PI-SceI
12/1-λ 표적화 벡터
+16-λ 표적화 벡터
+12-λ 표적화 벡터

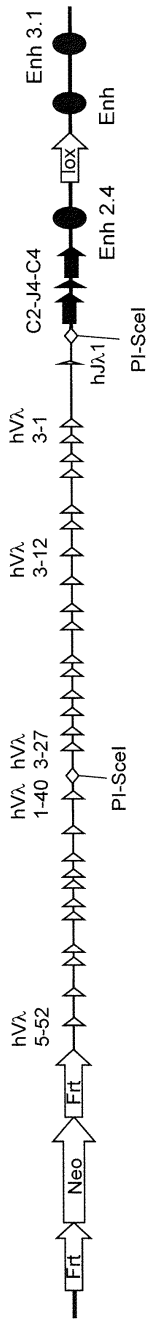
도면5b


결실된 마우스 κ 경쇄 유전자좌
Cκ
Eκi
Eκ3'
511
lox P
12/1-κ 표적화 벡터
hVλ 3-12
hVλ 3-1
hJλ1
Eκi
Cκ
PI-SceI
Eκ3'
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
+16-κ 표적화 벡터
3-12
3-27
Frt
Hyg
Frt
I-CeuI
+12-κ 표적화 벡터
5-52
1-40
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
PI-SceI
5-52
1-40 3-27
3-12
3-1
Jλ1 Eκi
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
PI-SceI
Cκ
Eκ3'

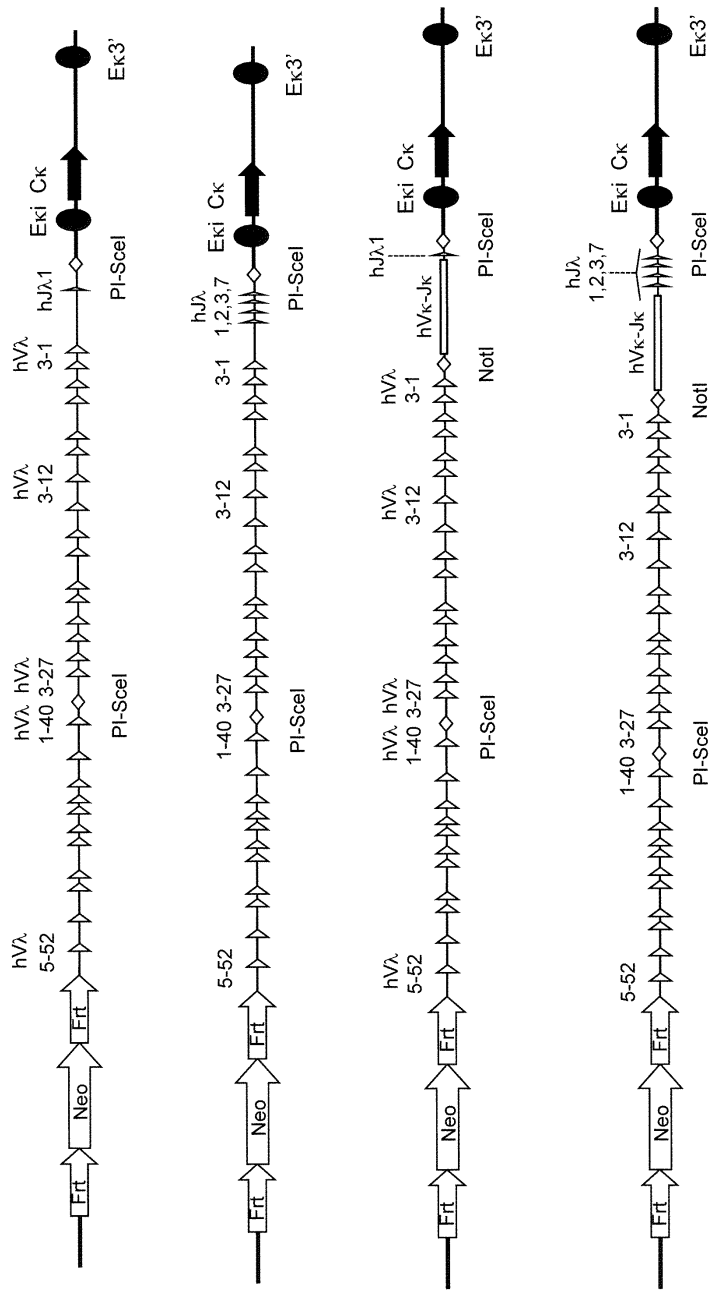
도면6


hVλ
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
hJλ
Spec
NotI
AsiSI
hVκ
Frt
Hyg
Frt
NotI
hJκ
hJλ1
Chlor
PI-SceI
AsiSI
OR
hJλ
1,2,3,7
Chlor
PI-SceI
AsiSI
1. NotI 및 AsiSI로 분해한다
2. 단편들을 라이게이션한다
hVλ
Frt
Neo
Frt
I-CeuI
hVκ-Jκ
hJλ1
NotI
Chlor
PI-SceI
AsiSI
OR
hVκ-Jκ
hJλ
1,2,3,7
NotI
Chlor
PI-SceI
AsiSI
NotI - AsiSI 단편의 라이게이션
Frt
Neo
Frt
I-CeuI

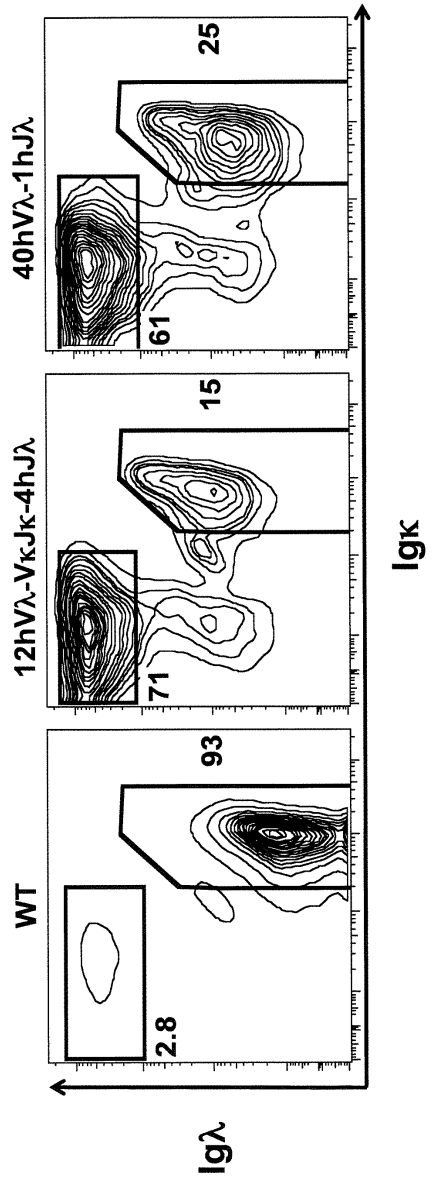
도면7a


Enh 3.1
Enh
lox
Enh 2.4
C2-J4-C4
hJλ1
PI-SceI
hVλ 3-1
hVλ 3-12
hVλ 3-27
hVλ 1-40
PI-SceI
hVλ 5-52
Frt
Neo
Frt

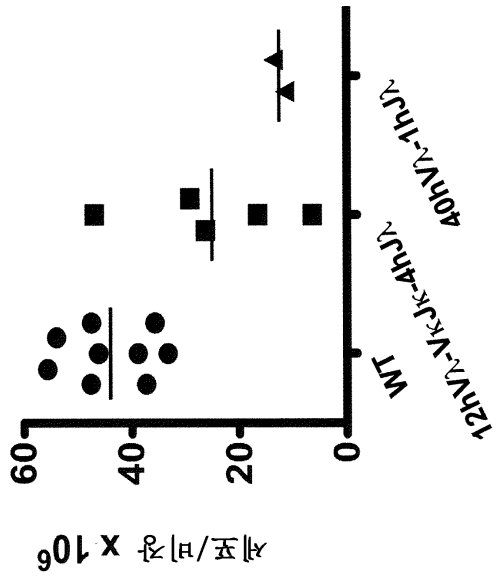
도면7b


Frt
Neo
Frt
hVλ
5-52
hVλ
1-40
hVλ
3-27
hVλ
3-12
hVλ
3-1
hJλ1
Eκi
Cκ
PI-SceI
Eκ3'
hJλ
1,2,3,7
NotI
hVκ-Jκ

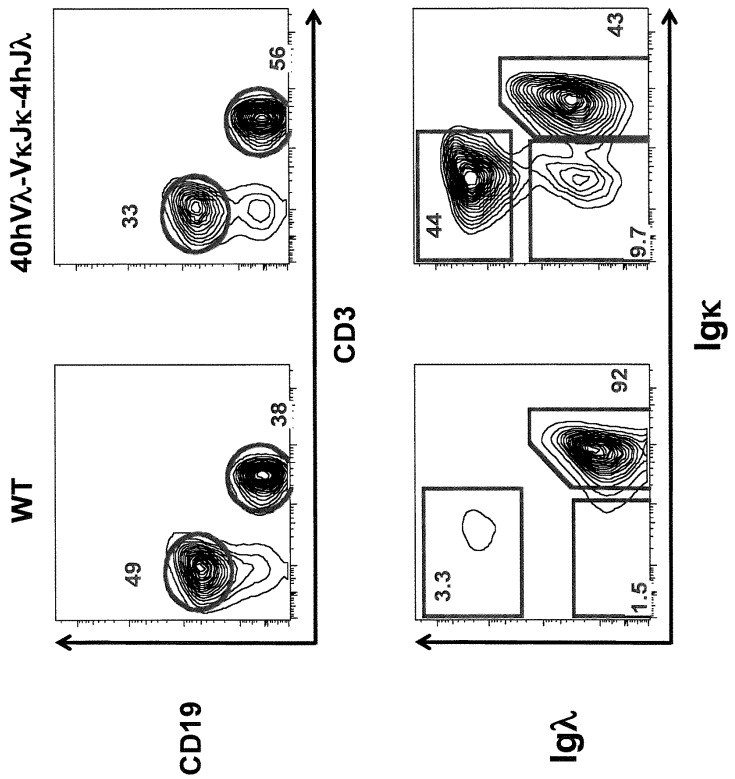
도면8a



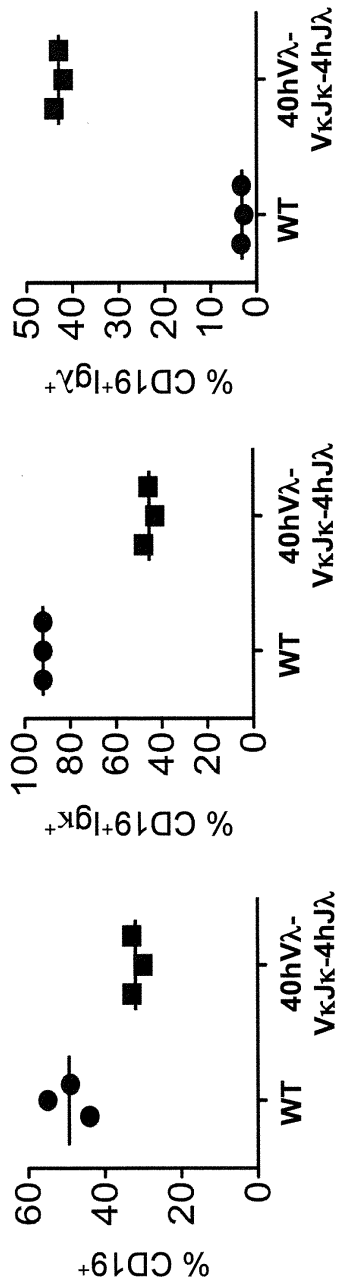
도면8b


세포/비장 x 10⁶
60
40
20
0
WT
12hVλ-VκJκ-4hJλ
40hVλ-VκJκ-4hJλ

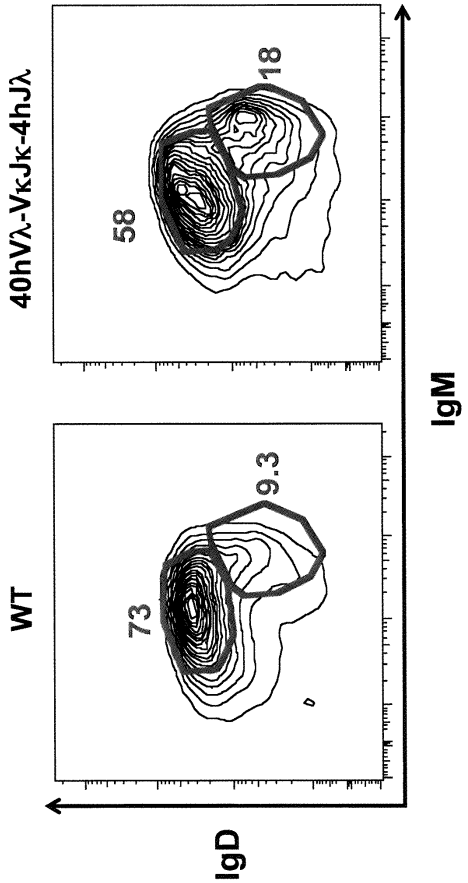
도면9a


WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
CD19
CD3
Igλ
Igκ
49
38
33
56
3.3
92
1.5
44
43
9.7

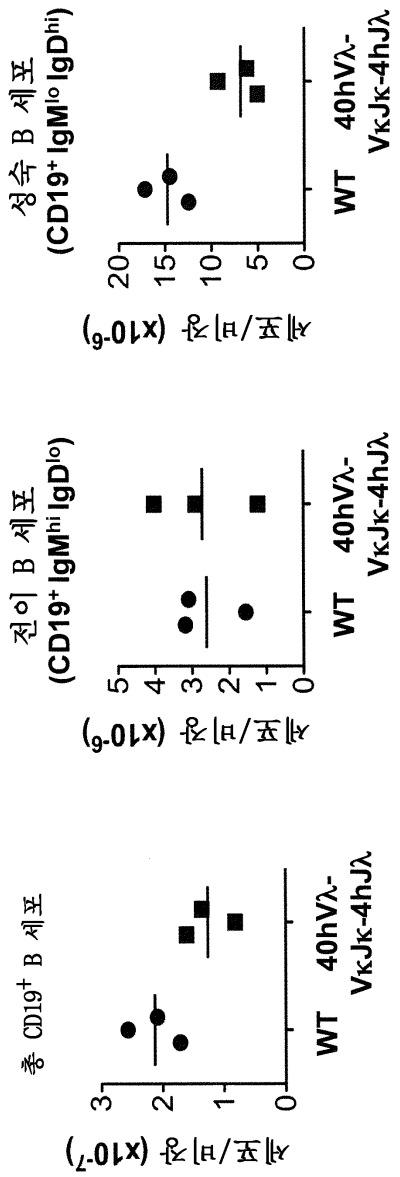
도면9b


% CD19+
60
40
20
0
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
% CD19+IgK+
100
80
60
40
20
0
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
% CD19+Igλ+
50
40
30
20
10
0
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ

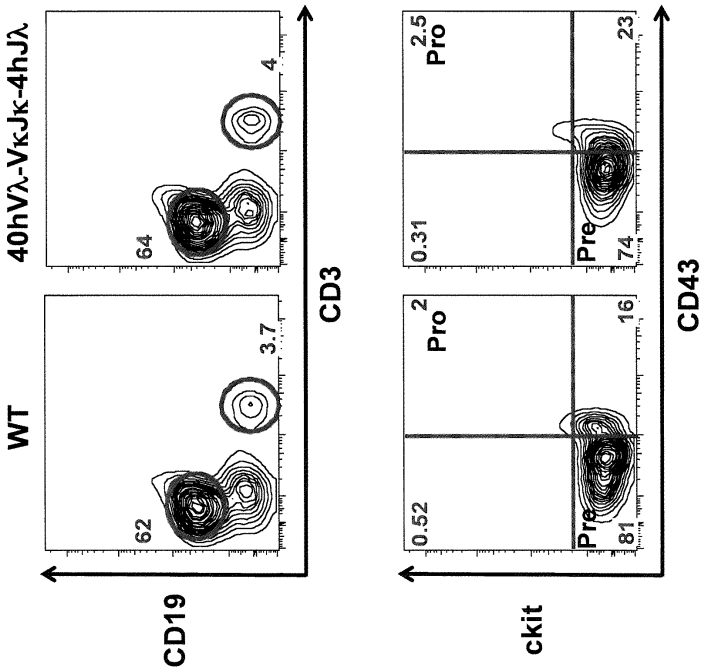
도면9c



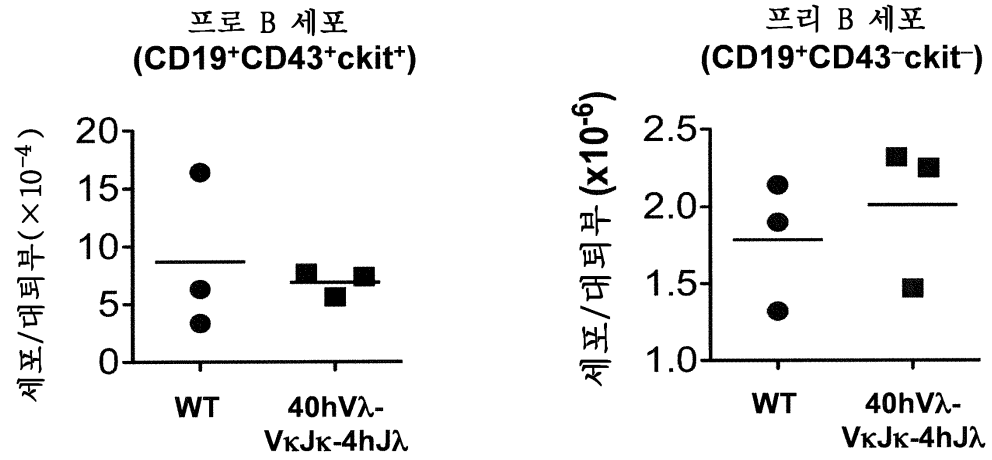
도면9d


총 CD19+ B 세포
세포/비장 (x10-7)
0
1
2
3
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
전이 B 세포
(CD19+ IgMhi IgDlo)
세포/비장 (x10-6)
0
1
2
3
4
5
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
성숙 B 세포
(CD19+ IgMlo IgDhi)
세포/비장 (x10-6)
0
5
10
15
20
WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ

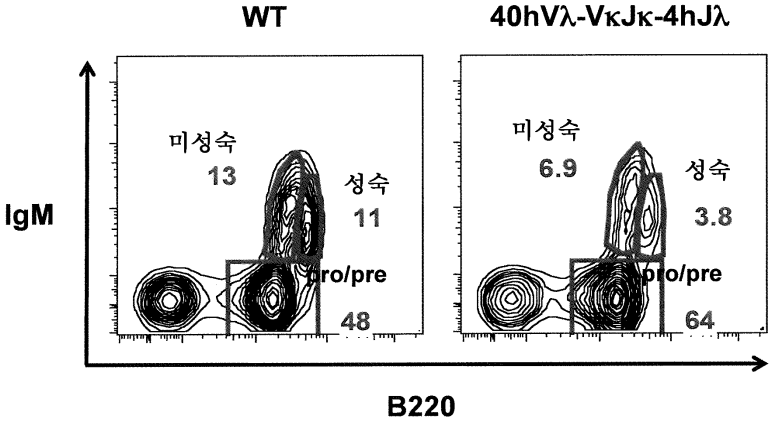
도면10a



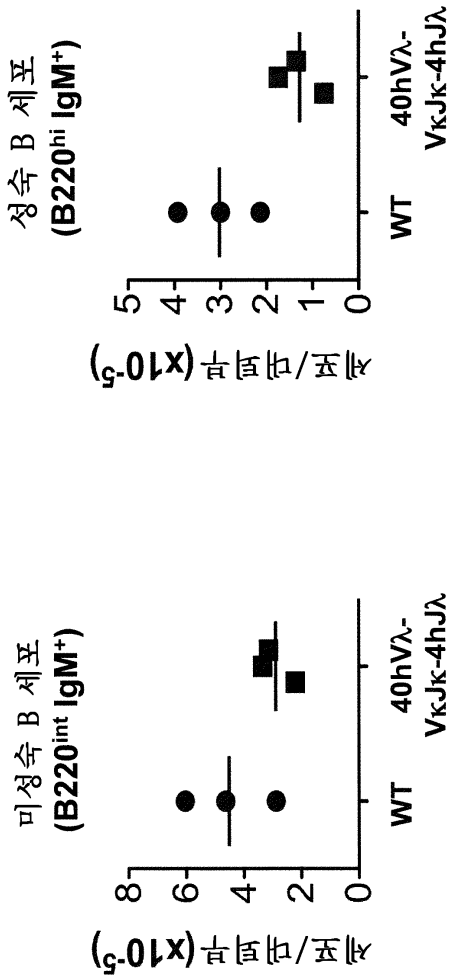
도면10b



도면10c

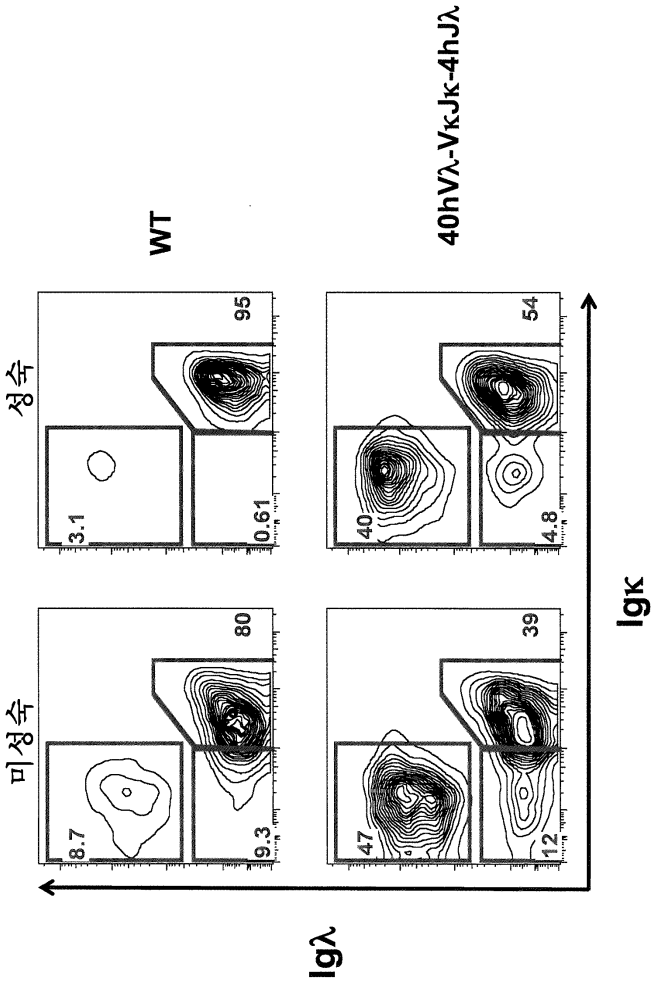


도면10d


성숙 B 세포
(B220hi IgM+)
세포/대퇴부 (x10-5)
0
1
2
3
4
5
WT
40hVλ-
VκJκ-4hJλ

미성숙 B 세포
(B220int IgM+)
세포/대퇴부 (x10-5)
0
2
4
6
8
WT
40hVλ-
VκJκ-4hJλ

도면10e


WT
40hVλ-VκJκ-4hJλ
성숙
미성숙
95
3.1
0.61
80
8.7
9.3
54
40
4.8
39
47
12
Igλ
Igκ

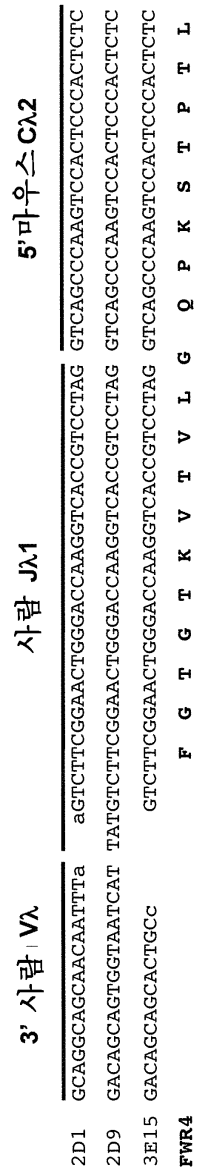
	3' 사람 Vλ	사람 Jλ1	5'마우스 Cκ
A6	GCAACAATT	tcGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E7	GCAACAAT	GTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
C8	GCAACAATTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E12	CAAGTCGGTT	gTGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-4	TGAGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-20	TGAGTGCg	gcttttTTtGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3B43	CTGAATGGT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-8	AGTGGTAAT	cATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-19	AGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1010	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
11A1	AGCAGCGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTA
7A8	GGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
3A3	AGTAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-7	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGgCCTgG	GGGCTGATGCTGCACCA
FWR4		**F G T G T K V T V L G**	**A D A A P T V S I F**

등록특허 10-2211911

도면12

	3' 사람 Vλ	사람 Jλ	5'마우스 Cκ
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCGGAGGAGGCACCCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGCTC	GGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGCTCGa	GTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		**F G G G T K L T V L G**	**A D A A P T V S I**

도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MICE EXPRESSING A LIGHT CHAIN WITH HUMAN LAMBDA VARIABLE AND MOUSE CONSTANT REGIONS

<130> 796A-WO

<150> 61/357,314

<151> 2010-06-22

<150> 61/357,317

<151> 2010-06-22

<160> 105

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 219

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 1

actttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60

atagtataca ttatacgaag ttattctaga ccccccgggct cgataactat aacggtccta 120

aggtagcgac tcgagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggtaagc 180

ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 2

agctgaatgg aaacaaggca a 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 3

ggagacaatg ccccagtga 19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 4

tcccataggg ctaggatttc c 21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 5

tcccctcaca ctgttcccc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 6

ggtggagagg ctattcggc 19

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 7

gaacacggcg gcatcag 17

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 8

tcaacctttc ccagcctgtc t 21

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 9

ccccagagag agaaaacaga tttt 24

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 10

ccctggtgaa gcatgtttgc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 11

tgtggcctgt ctgccttacg 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 12

cacacctaga ccccggaagt c 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 13

tcgctttgcc agttgattct c 21

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 14

tgcggccgat cttagcc 17

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 15

ttgaccgatt ccttgcgg 18

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 16

gcaaacaaaa accactggcc 20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 17

ggccacattc catgggttc 19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 18

ccatgactgg gcctctgtag ac 22

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 19

caagtcaggg tgctaatgct gtatc 25

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 20

cacagcttgt gcagcctcc 19

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 21

gggcactgga tacgatgtat gg 22

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 22

tcataggtag gtctcagttt g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 23

tgatctgcgc tgtttcatcc t 21

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 24

tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a 31

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 25

agagacgctc cgaggtcaag gtgctctag 29

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 26

tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 27

accctctgct gtccct 16

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 28

ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 29

tccacactgt cggctgggag ctca 24

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 30

acgagcgggt tcggcccatt c 21

<210> 31

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 31

ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 32

tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 33

agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca 37

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 34

gggctacttg aggaccttgc t 21

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 35

gacagccctt acagagtttg gaa 23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 36

aagaccagga gctctgccta agt 23

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 37

cccatcacga actgaagttg ag 22

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 38

cagggcctcc atcccaggca 20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 39

ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc 28

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 40

cctctcctcc tcaccctcct 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (4)...(4)

<223> r=a or g

<220>

<221> variation

<222> (9)...(9)

<223> s=c or g

<220>

<221> variation

<222> 11, 12, 13

<223> y=c or t

<400> 41

atgrccdgst yyyctctcct 20

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 42

ctcctcactc agggcaca 18

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (18)...(18)

<223> s=c or g

<400> 43

atggcctggg ctctgctsct 20

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (11)...(11)

<223> y=c or t

<220>

<221> variation

<222> (13)...(13)

<223>

s=c or g

<400> 44

atggcctgga ycsctctcc 19

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> 11, 16, 18, 21

<223> y=c or t

<220>

<221> variation

<222> (15)...(15)

<223> r=a or g

<220>

<221> variation

<222> (20)...(20)

<223> m=a or c

<400> 45

tcaccatggc ytggrycycm ytc 23

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 46

tcaccatggc ctgggtctcc tt 22

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (16)...(16)

<223> m=a or c

<220>

<221> variation

<222> (19)...(19)

<223> y=c or t

<400> 47

tcaccatggc ctggamtcyt ct 22

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 48

tcaccatggc ctgggctcca ctactt 26

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 49

tcaccatggc ctggactcct 20

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 50

tcaccatggc ctggatgatg ctt 23

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 51

taaatatggc ctgggctcct ct 22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 52

tcaccatgcc ctgggctctg ct 22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 53

tcaccatggc cctgactcct ct 22

<210> 54

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 54

cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 55

gtaaaacgac ggccag 16

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 56

caggaaacag ctatgac 17

<210> 57

<211> 440

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 57

gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tcactcaggg cacagggtcc tgggcccagt 60

ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120

gcactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctcctggtac caacagcacc 180

caggcaaagc ccccaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240

atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300

ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360

gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420

caccatccag taagcttggg 440

<210> 58

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 58

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 59

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 59

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 60

<211> 438

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 60

atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggtcctg ggcccagtct 60

gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120

actggaacca gcagtgacgt tggtggttat aactatgtct cctggtacca acagcaccca 180

ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240

cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gctccaggct 300

gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420

ccatccagta agcttggg 438

<210> 61

<211> 438

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 61

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420

ccatccagta agcttggg 438

<210> 62

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 62

atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 63

<211> 442

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 63

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tttatgtctt 360

cggaactggg accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420

cccaccatcc agtaagcttg gg 442

<210> 64

<211> 428

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 64

ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgcctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60

ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120

acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180

agagtgatgg cagccacagc aaggggggacg ggatccccga tcgcttcatg ggctccagtt 240

ctggggctga ccgctacctc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300

actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360

aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420

agcttggg 428

<210> 65

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 65

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120

tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180

ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240

cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300

ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtgagcagtt a 441

<210> 66

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 66

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120

tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180

ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240

cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300

ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ggctttttt 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtgagcagtt a 441

<210> 67

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 67

cccgggcaga gggtcaccat ctcttgttct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60

gtaaactggt accagcagct cccaggaacg gcccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120

cagcggccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180

ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatgggat 240

gacagcctga atggttatgt cttcggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300

gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc agtta 345

<210> 68

<211> 432

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 68

atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60

tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120

tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggt accagcagaa gtcaggccag 180

gcccctgtgc tggtcatcta tgaggacagc aaacgaccct ccgggatccc tgagagattc 240

tctggctcca gctcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300

gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaactggg 360

accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420

agtgagcagt ta 432

<210> 69

<211> 426

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 69

atggcctgga ctcctctctt tctgttcctc ctcacttgct gcccagggtc caattcccag 60

gctgtggtga ctcaggagcc ctcactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120

tgtggctcca gcactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactggtt ccagcagaag 180

cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240

gcccggttct caggctccct ccttgggggc aaagctgccc tgacccttтc gggtgcgcag 300

cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctcctata gtggtgctta tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420

ccatcc 426

<210> 70

<211> 331

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 70

agtggtcctg ggacagacgg ccaggattac ctgtgggggа aacaacattg gaagtaaaaa 60

tgtgcactgg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg ctggtcatct atagggataa 120

caaccggccc tctgggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggga acacggccac 180

cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240

cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc 300

accaactgta tccatcttcc caccatccag t 331

<210> 71

<211> 417

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 71

actcctctcc tcctcctgtt cctctctcac tgcacaggtt ccctctcgca ggctgtgctg 60

actcagccgt cttccctctc tgcatctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120

cgcagtggca tcaatgttgg tacctacagg atatactggt accagcagaa gccagggagt 180

cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240

cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300

gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360

gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 72

<211> 393

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 72

tttctgttcc tcctcacttg ctgcccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60

ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120

gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcacccagg 180

gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcctggaccc ctgcccggtt ctcaggctcc 240

ctccttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcaggtgtgc agcctgagga cgaggctgag 300

tattactgcc tgctctacta tggtggtgct tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360

gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393

<210> 73

<211> 417

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 73

atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctcactcagg acacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagtcgat caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240

aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300

gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

<210> 74

<211> 348

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 74

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120

cacccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180

tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300

ttcggaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 75

aacaaccgag ctccaggtgt 20

<210> 76

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 76

agggcagcct tgtctccaa 19

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 77

cctgccagat tctcaggctc 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 78

catcacaggg gcacagactg 20

<210> 79

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 79

gatttgctga gggcagggt 19

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 80

ccccaagtct gatccttcct t 21

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 81

gctgaccaac gatcgcctaa 20

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 82

taagcgccac actgcacct 19

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 83

cctgccagat tctcaggctc cctg 24

<210> 84

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 84

ctgattggag acaaggctgc cct 23

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 85

ccttcatact cttgcatcct cccttctcca 30

<210> 86

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 86

ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35

<210> 87

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 87

tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg cacccggctg 120

accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 88

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 88

tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120

accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 89

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 89

tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60

tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg cacccagctg 120

accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 90

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 90

tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60

tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120

accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 91

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 91

tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccggggatga ggctgactat 60

tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcaccca gctgaccgcc 120

ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 92

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 92

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60

tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc 120

gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc 156

<210> 93

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 93

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60

tactgttact caacagacag cagtggtaat catagggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120

accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 94

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 94

tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120

accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 95

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 95

gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc atctctgggc tccagtctga ggatgaggct 60

gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggtat tcggcggagg gaccaagctg 120

accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 96

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 96

cttgggggca aagctgccct gacactgtca ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagtat 60

tactgcctgc tctactatgg tggtgctcgg gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120

ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 97

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 97

cttgggggca aagctgccct gacccttttcg ggtgcgcagc ctgaggatga ggctgagtat 60

tactgcttgc tctcctatag tggtgctcga gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120

ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 98

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 98

tcaggcctga atcggtacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gagtgactac 60

cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120

cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccatc 165

<210> 99

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 99

tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60

tactgcggaa catgggatag cagcctgagt gctggccccg ggtgttcggc ggagggacca 120

agctgaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catc 164

<210> 100

<211> 22800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 100

aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca 60

taggggcata aatgtgaaac gccttgtgca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120

ccaatttctt aactgccttt tacctatatt aatcagtaat atactggctt ttacctctgt 180

taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca 240

acattttccg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tcctattgca 300

gcattctttg ggatttaacc agtttcccaa gactcttttc acaatgttaa gatgttagaa 360

atagatccaa aactaggtga tatatcccct agtaaaactg tgaggtcaaa cttgtctggc 420

taatgcttcc atttaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc 480

aggggaaaac tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540

cacacacaaa aaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600

cctgttctaa gatcattgtt gcatgaccat atgtattcca ggtctaatct aaactgtgga 660

taaatcccag caggacatta gagatttttg tgagagtaag catataggat tcagggttta 720

tgagctttag atttttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780

agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840

cttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaatatta gaaaaatcag 900

ttaataaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa 960

attatcactt aaatgtcaat acatttataa actatggtac ataaatagga tattgaatag 1020

ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtgataaa tgataaatat gaagcacatg 1080

tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaat ggtgataatg acacaaaatg 1140

tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaaa tatttatctt 1200

agagacatta ttactttgta tatgttccat ttgctcacct atatgtccca gtctccttac 1260

aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaaa 1320

gatcttacgg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380

ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggct 1440

gcatggagca gagcaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500

atttgttgga gctaggccat gagatttggg gcagtggtat aacctaccct attatggaaa 1560

atataaatac acaaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620

atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680

ccttctggtg atcaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgctcgc ctaacgtctc 1740

cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaattatc tattgcattc 1800

tttgatgtaa ggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaaccc aggtcactta 1860

gttcgtggca gagctgaggc taaaaccagg ccttttgact cctaattttg tgctctttac 1920

accttctcac atcacttctc caacccaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980

gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttcctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040

atggttcaca ataagcagca gagggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgctat 2100

ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaatc atgttttctt ctcgtagtaa atactacaac 2160

ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220

aaatggacac tccaaaaaga tgttcaataa ggttacatgg cttcacattg ccccctctac 2280

accatcttgt ggagctacac attcacctca cccaaatttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340

gactctcact agcagtgaga ccaagtccat aagcactaat gtcatcagtg cacactgcag 2400

cctcatgctg ccaagcatgt tttgggcgta tccctggact ggtttggtga catgatcaaa 2460

ggtacatttt ccacctgcat agccccatcc tggatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520

aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagtttattt 2580

tcccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtcctgatat atgtgcccaa 2640

gggggtcggg gcacagcttg gtgttataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700

tgtagaagat gtgcatcgct ttggtctgga aaggtgtgac aactcaaggc agggaagggg 2760

gcttcctgct ggggttgcat tgttttgagt ctctgatcag cctttcacat gtgaaaggca 2820

ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagtagg gcagaagaag 2880

cattgcatat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtcctttctt 2940

tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgagggag gtatgtagct tttttttctt 3000

tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcaggttt gcctgatgca attcccagct 3060

tgactttccc ttttggctta gtgatttttg gggtcctgag gtttattttt tctttcacat 3120

tagtataact acttttcttt ttctaattcc ttttctactt gtatgtgtta cagctgactt 3180

atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240

gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300

ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360

gagctctctt ttatctattc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420

gacactggtt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggcccacc acaccatacc 3480

ctcctgacat ctggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540

tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600

acaatatcca ttatattatt cttggccttt gagatacctt acaaaacaaa tacaaaaaaa 3660

gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720

atagtcaaga ggctcagtgg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780

aggtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840

caaggtggtt gcaagtgttt aacctgagca actagagaat ttggaaggac attttctgag 3900

atggggaagg caggcgggaa tcagggatta gagttgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960

tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgcg tgattctgga 4020

gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa cagggcgagg ttactagcaa 4080

tgagttaaat caatgaaggc aggctgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggtcga 4140

agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagttga 4200

accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tcttttctgt ttacaaatgt 4260

aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaagtggt 4320

ccaaacactg tctcctattt gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttggaa 4380

agttactttt taaaaggtgt gtgcactgct gccctttgct ggtcaagttt atgcactgca 4440

aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcctttaaa atagctcagg ctgtacaagc 4500

tagaaagaac ctcgcaagat attccttcca acatttgcat ttgacttatg ggaagtgcag 4560

gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg tttatgtaag tttatcagac ctgattctta 4620

cggctcttcc cattgtttcg agcctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680

tataggacag gagtagttat tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740

ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800

ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gagtctctgg tctgaaagct ccggggtatc 4860

atttcttcaa agtcttgagc ttgtttttgt ttgtatttat ttatttattt gttttagaga 4920

caaggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980

gtgaataaag agatatcagt aatgactgtt ttatattgtg gctgtagcgc attcgaggga 5040

taattcgatt ctgttctgct ttcgaatgca tggctcactg taacctccaa ctcccgggct 5100

caagcgatcc tcctacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160

taaaattttg gcatttcttt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220

atcacaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caacccaaga 5280

aagcagaaca gactcaaatt atcccttaaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagtcc 5340

gtgactgggc gtgttggctt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400

gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460

ttaaaaatac aaaattattc aggagttgtg gcaggcagtt gtaatcccag ctacttggga 5520

ggctgaggca ggagaatcac ttgaacccag gaggtggagg ttgtagtgag ccaagattgt 5580

gccagtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaaa aaaaaattaa 5640

gtaaataaaa tataaaaaaa taaagcagtc cctattgata tctctttatt cactaaatca 5700

acctggaatt gacctgaatt ctgatttttt tttcatcatg gatttttgc attaattttg 5760

attgtttaaa tattgcatta aaatattatt tatcttgact actgagtttg cgggacctcc 5820

ttaaaattta tgaccaaggc aatgcctcac tcactcgcct taccataatc tgggccacat 5880

atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac ttttgaacag ctaagacttc tctcttcact 5940

gtgaagacca gatgggccct gcaaacagtg taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000

aactacaacc aggcacaaaa gactctgatg gtgaagtccc agccctccaa gtcccaactt 6060

cctgaaggga aagagcaccc caagttctga ccagaggcca gagtcataac gaagatggaa 6120

tgtgagcttg acatagaagg ggtggtagca cctggctcag taatgaagag gctttcggtc 6180

ctgaaggaag agctcagcac attcaaagat tagaagggag gtcccagtca taggagcagg 6240

gaaggagaga aggcccaata agaaacacag acaggaggga ggggtcaggg caagatcata 6300

ctggaaacaa ctagagagct aataaaagtc acagtgccca gtccccacat ggaccagact 6360

cttcggaatc tctaggcatc aatttgggca ccagtagttt tcaaagttct ccagaagatt 6420

ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggtgttggc ctagggatca tgacaatgag 6480

tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag gggaataatt tgatttgttt 6540

cttgtttgtg atttttaaag atcagtctgg ttactgtgtg taagacaata atccagaaaa 6600

tctgttgctc atgaaccaca tatctgtaaa tttgcttccc ctgtaactgg atctaaccaa 6660

caaaaattag tacttactaa gaaattacat gcccagggac tatgctaagt aattcataaa 6720

cactatttta tttactcctc acagcaagtt tataagagaa acgttattat ttccacattt 6780

cggatgagaa atttgaggct tggggaaagt taagtaattt acctaatgtc acacccagtt 6840

cataagatgc agagttaaga ttctaattct gtgtctaagt tgatgctcca tcaaacacac 6900

cacgcctcca actaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960

tggttagatt tctaggcaca gatgaataaa tcaacatgtt ggtttgcaat agaatgaatc 7020

tatccagctc tgaatttgca tccaagggtt tgtgagcaca caagtctaaa agtgtggcct 7080

cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140

ggacagtcca ccatctgttt acagatggta aagccacata ccagctttgc catctgatgt 7200

tctctattca cattcaacat ttatacaaga aatagtcata tggatccttt tcaatagaca 7260

gtactgggga aattgaattg ccatatgcag aagaatggaa ctagacctct atctctcacc 7320

aaatacaaaa gttaactcaa gacagattaa agacttacat ataagacctg taactacaaa 7380

aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgct tctggaatta atctaggtga agaactcagg 7440

actaagatat caaaagcaca agcaccaaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500

tagaacgctt ctgaacagca agagaaataa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560

gggtgaaaat atttgcaaac tatgcatcct acagggaaat aatgtccaga atttagaagg 7620

aactcaaaca attcaacaac aacagcaaaa taaccccacc aaaaaagtgg gcaaaggaca 7680

tgaatagaca tttttcaaaa gaaggtatat gatatggttt ggctctgtgt ctccacccag 7740

atctcacctt aaattgtaat aatccccaca tatcatggga gagacccggt gggaggtaat 7800

tgaatcatgg gggcaggttt gtcccatgct gttctcatga tactgaataa gtcctatgag 7860

atctgatgat tttataaagg ggagttcccc tgcacacact ctcttgcctg cctccatgta 7920

atatgtgcct ttgcttctcc tttgccttct gccatgattg tgaggcctct ccagccatat 7980

ggaactgagt caattaaacc actttttctt tgtaaattac ccaatcttgg gtatgtcttt 8040

attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg tacaaaaaac 8100

aaaatgctca aatcactaat cactagagaa tcgcaagtta aaaccacaat gagatattat 8160

cttacagcag tcagaatgcc tattattaaa acaccaaaaa ataacatgtt ggcaaggatg 8220

cagagaaaag ggaatactta cacattatta gtgggaatgt aaactagtac agcttctgtg 8280

gaaaacacta tggagatttc tcaaagaact agaaatagaa ctaccatgtg gttcagcaat 8340

accacaactg ggtatctacc caaagggaaa taaattatta tataaaaaag atatctgcac 8400

tcacttgttt attgcagcac tattcacaat agcaaagata tggaatcaac ccaagtgtcc 8460

atcaacagat gattggataa agaaaacgtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 8520

acacatacca caatgaaata ctattcagct ataaagaaaa gaatgaaatc atgtcttttg 8580

cagcaatgtg gttggaactg gaggccatta tcttaagtgg ataattcaaa aacagaaggt 8640

caaatgtcac atgttctcac ttataagtgg gagctaaatg atgtgtacac atggacatag 8700

agtgtggtat gataaacact ggagattgag atgggtggaa gggtggaagg aggttgagtg 8760

atgagaaaat actaaatgga tacaatatac atgattcagg cgatagatac actaaaagcc 8820

cagacttcac cactacacag tatagctatg tagcaaaatt gcacctgtat tgcttaaatt 8880

tatacaagta aaaaaaagat cgtacgaatt ctgtttttta ttctctatga aattactact 8940

gagagtatta tccaatgccg tttctatgca gtgcccccaa tattatccat ttagcagctc 9000

ctatgcaatg ccccaagata gaaattgtct tcaactttta tcccaggaaa accttcagtc 9060

acacgtagaa actagaaatt tttcccctag atgaaagtta tgtaacataa cacattatct 9120

tcatttagtc ggtttccaag aagctcagaa ccagatttta tgttcaatca aaaactgctt 9180

attttaagtg aggtttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240

tctataagtt ttggcaaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300

agtccctcat cctttaaagt tcctttatgc cccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360

ctggtttttg tctgatccaa tcgtttgcct cttcctgaat gtcatgtaaa tagagccatg 9420

caatgtgaag ccttttgagt ctggctttgt tcacttgttc acttaggaga atgcatttga 9480

gattcatctt tgctgtttcg tgtagcacta gttcactgtc tattgttgag tagtattcca 9540

ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600

ctaatttttа gctgctaaga ataaagttgc tgtaagcttt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660

aactcaggat ttcatttcgc ttgggtaaat tcctagcttt gggactgctg agtcatctgg 9720

taggtgtatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactgtt ttccaaagtt gctgtgctct 9780

tttgcactcc catcagcagt gaatgagggt tccacttgct cgagcctagt attttaactt 9840

cactatatac cttctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggtcaagtt tttattgggg 9900

tgttgttact atggactgtg agagttcttt gtatattctg catatgattt ttttctcaca 9960

tttgtgtttt atgaatatgt tctcccaatg tgtggcgcct tttattttct taacgtgcca 10020

tgtgaagagc agaagtttaa ttttatgatg tccaaattat ctttttttct tttctttttt 10080

agatcaaaat aggggtctat tttgattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140

tttttatttt tatttttcta atttcattgt aaatttttaa ttaaacccaa atattctagg 10200

ggaaagaggc aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260

gccgagaaag gaaactagct ctcttacatt gattgtttaa tttcagacgt cactacttta 10320

tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatatatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380

taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagtttgc ccagtgacag 10440

ggtctatatt attttctata tatcaaattc tacaactggt tcttaaagct actgtacata 10500

acctaagtta aaatattagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560

ctgttgtcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta ttttcataga ttaaactatg 10620

ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaaggtt 10680

ttaaagcaaa ctccaagtca ttttcatcaa tgaaatcaat aaggttttgc aaatatatat 10740

gtatgaaaat actgatttaa aatgcaaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800

aaatgatttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt acttttctac 10860

ccaacttgtc tataagactt taatgaatca cttagaattt ttaaaataat ttattattac 10920

tctgtacctg ttctttactc tgcaaatctt accttgccct tttgtctaaa agcaataaaa 10980

tctgacctgg tttatatcgt atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040

ggcctatgta ggctcatggt ttatacaaca ctgccatctg ctgacagagt gtgacagtca 11100

cagtcagcaa cacgagacca ctttattttc atttttagtg tttatagaaa tatgaatata 11160

cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgctaat cttgtttcaa 11220

ctaccgcctc ccccctcatc caattactct gttctctcac ctcctcacac acagacactg 11280

gcagtatttt tcagccaatc attaatacgt tgccaactga taaggacttt taaaaaacaa 11340

ccaccattcc attatgattc ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataccca 11400

ttttctattc caatttcctt gattgtcttt aaactgtttt taccctaagt ttgcttaaat 11460

caaagtccag gtcctgttaa acatatggtt aagttttacc caaacccaaa taaataaata 11520

aataaataaa taaataacct atttttttcca attccaggga atagtgaaag agggtaaatg 11580

ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaattga 11640

agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaaacttc aatgcagaac 11700

tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatta ttcagtattc atcagtattc 11760

actcagctat atgtagttga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820

tttctcacca aggcggactc tggaggcagg tggttcagag ctagacagct gctgcaggac 11880

ccaggtcctt tccctgcctg ctcctccact ctagcttgtg actttcatcc tgcaagatgg 11940

gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtggt 12000

gcctctgtcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060

aacagtccta actgcaaaga agctgaggaa ttagattttt ggctgggaca ctgttgccct 12120

gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaaactc 12180

ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240

gcaattcaca acagatgaga ccccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300

gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatttt aaaccaaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360

atttgagtgg aaaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420

gaggaaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480

ttgaggccaa tttgtaaatt gaaaaatgcg cacaccctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540

atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cctttatact 12600

cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac tatttttttt 12660

ttaatttttt ttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720

tcataactct ctctagcagc ctcgaactcc tgggctcaag catcctcctg cctcagcctc 12780

ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840

ttagagacat ggtctcacta tgttgcctac gctggtctca aactcctagg tcaagcgatt 12900

ctcccacctc tacttcacaa agtgctgtag gtatgtaggt atggattgta ggtatgaacc 12960

accgtgccca actcactact ttttattact aattattcca tgggatggat gtaccgcagt 13020

ttgttttacc attaatctat tgtaggacat tttgactgat tccagttttt ttttaataca 13080

aataaaacca ctatgaatag ttgtgtattg tatacgtttt tgtgctaagt tttcattttt 13140

ctgggataag ttttcatttc tttgggcttt tactgtatcc ttgatattat aatatgttac 13200

atcttcagtt ttattctatt caatatataa tcttttattt tccttgaaat ctcccatgga 13260

ttgtttagaa gtgtgttgtt ttgtttccaa gggtttggca tttttcccat tatttttcta 13320

ttatcgattt ccagtttgat tccaggtggt cagagaacac acttcatgtg atttcagttc 13380

tattaaattt gttgaggttt gttacatggc ccagtatatg gcaattttgg tatatgttcc 13440

atgagcactt gaaaagaatg cgaattctgc tggtgctggt tggagttttc cagcaatgtt 13500

gatttatgat cttactcatt gatggtggtg ttgagtttga tgtgttctta cgatggcagc 13560

tttaacattc ttgtcaggta attctaacgt ctctgtcatg tcagtattag cgcctcttaa 13620

ctgtctcatc aaagctgaga ttttcctggt tcccctggtt cctgttggga tgtgtggttt 13680

tcatttgaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgaggc tttggatctc atttaaactc 13740

atctcagcga atttcctctc ttgccactca ggaaggagaa gttgggtgtt tgaatggagc 13800
agagccgtta ctgcctaaga attgttttac tgggcttccc ctttctttct cctttgacta 13860
gagagagcca gctttttatt agggctttat gtttttctgg gcctgttggt gtttctgggt 13920
tgacaaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgaggc aaaaagaaac cccgtggaat 13980
gcactgctgg gtcgctcctt gggtcccaat gttcctaact ggtctgcctt cttctctcca 14040
gcttccagag tcttcataag tttgctttac gtacaatgtc cggggttttt actttacttg 14100
agagaaatag gtaaaagtaa ttctactcca tctttcagga agcaaaagcc cccttgtgta 14160

ttttttaaa ctttcaaaaa caaaacaaaa ggcagctgca acagtaaaga agctagtaac 14220
acccttggtg ggaaattcaa gtccaaatac acattttaag tttggctagc cagtgagaac 14280
atcagaatag ttcaggtttt aaacaaattt atatttatga ttatgcatat actaaaagct 14340
gaaggcatct tatatttact aagcacctat tttgttcttg ttaaaaagac agaattccat 14400
tccctaggaa atttgacctg gcagctggag ctgatccacc tggccactag agcacagagc 14460
agggagagta gtagccctgc cccagccacc cctcaagaca ggattctttc tctgggaact 14520
gtaggtaaca ctaaatcgtt ctggaacaca acaacgaaag aagaaaggaa agagaaagaa 14580

agaaaggaag aaagagagag agaaggaagg aagggaggga gggaaggaag gaaggggaag 14640
ggaagggaat ggaagggaag gaaggaagga aaaggaagga agggagggag agagggagga 14700
aggaaggaaa ggaaaggaag gaaggaagaa ggaaagaaaa aaagaaagaa agaagaaaga 14760
aagaaagaca agaaagaaag aaagaaagaa agaaagggga aagaaaagaa agaggaaaga 14820
aagagaaaga aagaaaagaa agaaaggaaa gaaagagaaa gaaagaaaaa gaaagagaaa 14880
gaaagagaaa gacaagaaag aaaaaggaaa gaaaagaaag agaaagaaaa gaaagaaagg 14940
aaagaaagag aaagaaagaa aaagaaagaa agaaaagaag aaagagaaag aaagaaagaa 15000

aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaaaag aaaaagaaag gagaaaatga cagcaattac 15060
ttttgcaaca acctaatata agtttttaa aagttaaata ttctgttcca tgcattgctg 15120
gataccttat aaataacagg gcatcctatg acctgaattt cccaaattat gagttgaggg 15180
tttgaactag ttttaaaaaa caaggaggcc aggcgcactg gctcatgcct gtaatcccag 15240
cactttggga ggctgaggca ggtggatcac gaggtcagga gctcgagacc agccttacca 15300
acatagtgaa acaccgcctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcgtg atggtgcgca 15360
cctgtaatct cagctactca gcaggctgag gcaggagaat cgcttgaacc cagaaggcgg 15420

aggttgcagt gagccaagat cacagcattg cactccagcc tgggcgacag agggagactc 15480

cgtcttcaaa aaaaaaaaaa aagacaagga atctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540

acttttattt tcattctatg ctatccgatg cctactgcta tttcccttca tatttaacct 15600

ccaacagctg cattttgctc cctccagacc acctgattgg agctcacgtg ctcccacaca 15660

gtacctccaa ccagagagag tcgagtccca cagaaaggcg taacaatcac cagtaatttt 15720

gcacttattt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctctt tgaatcatat 15780

ttaataaata tgtgtatttg ggattgtagc atattgcagc tacctggata tataatttaa 15840

ttagaaaaaa aattttgtgt ggctcaatca acaaacgact tttctctctc tctctttctc 15900

tttctccctc tctctctctt tcttctcagt tgatgttgct ggagttcagt gttgtgcaga 15960

tggcagtgac aaatgccatg ggcacatgag atatgataaa aggtccctga agaaggtgga 16020

gaaccagtta tcttatgaaa ttttccagag tgggtactgg atctctcctg tctggcacca 16080

tgctggcctc agcccaaggg gaatttcctt ccagagacag agggcagtga ttgaggtggg 16140

gagacagatc gtaacactga gacttacatg aggacaccaa acagaaaaaa ggtggcaagt 16200

atagaaaatt ctttcttctg gacagtcttc tctgttctaa cttcagcaaa attctccccc 16260

cagtggatgc tattgcacaa ccctacatat gctatgtttt ttcctataca cacttaccta 16320

tgataaaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaaata 16380

gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatatca tgacagtcaa 16440

tctgatgacc aagagggcta ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500

gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctggtatg gagcggaagg gcatgatatg 16560

tcatcacgct actaaggcac acaatttaaa atgagtaaat tcttatttct agaaatttct 16620

ttttaatatt ttcagactac agttgcctac aggtaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680

ttgataagga ggtactactg tacatcgtcc tttgaaccaa ctttatcatt tgctagtata 16740

tacatatata cctacataca tacatataca catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800

cacacacaca cacgcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860

ataagatgca caacttgtta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920

cttttctact agataaaaat ccattatcat tttcataaag ttttctttac attaacatct 16980

aacttttgca atctagtttt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040

tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcatcttttt ggtttatttt tatttttaga 17100

taaattattt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtgact gtatattttg 17160

acttggtcct tcaaacttaa tttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca atttttatt 17220

cacttttcct aaactttgct ggattggttt attatttttg tctatttctt ttccttctag 17280

tggtttggga gggtttttta aatcccatta ctattgaatg cctattaact tgcccccttt 17340

ttctttcaat ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccagca 17400

gagagatgac ccaggtgtta ttccactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460

atagctctga agtacggctt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520

aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580

tcaatgacat ggtttaaatc tctgtggtgt tcttcaaagt tttttcttct aataggacct 17640

ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatttct tctgtcattg 17700

caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaatgaac tcaaaaatcc acactattcc 17760

ttgtttccat ctgttgttca ttcattgttt ccattggcct gtccgcctcc tatcctcctt 17820

cttagacttg gagctctagc ctcagccagg atagggaaaa gagagatcag actgttactt 17880

tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940

ttttgccttg agatgctgtt aatctgtaac tttagcccca accttgtgct cacagaaaca 18000

tgtgttgtat ggaatcaaga tttaagggat ctagggctgt gcagaatgtg ccttgttaac 18060

aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctcgattaac 18120

taggggcaca gtgcactgcg gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180

tccaaggttt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcgggatg ggaaagatct 18240

gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgcgctg aggaggatta gtaaaagagg 18300

aaggcctctt gcggttgaga taagaggaag ccctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360

gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttcgttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420

ctctgtggct ggaggcgaga tatgctggcg gcaatgctgc tctgttgttc tttactacac 18480

tgagatgttt gggtgagaga agcataaatc tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540

ttcccttgaa tttacttgtg acacagattc ctttgctcac atgttttctt gctgaccttc 18600

tccccactat caccctgttc tcctgccgca ttccccttgc tgaggtagtg aaaatagtaa 18660

tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggtcctccg tatgctgagt 18720

gacggtccct tgggcccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780

ctcagtctct cgtcccacct gacgagaaat acccacaggt gtggaggggc tggacacccc 18840

ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagcccca actcatcgat 18900

ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960

acgagaagag aacatagggg ctgggtgcca agtaggtaga cagggagggc agggaactct 19020

aagacagagc ttgaggggct cattcctctt gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080

tatgtaaatc tcggtggctg aacccctcct aggatagtaa gccctgacac aattgctgct 19140

atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgcag ccttactgtc cccttggaaa 19200

caagatgaac atctacattt tctaaagtgg gacaagaatc tctgttcata tttatgtccc 19260
atgcatttgc acgtggccgg acaaaggact ttgcttctgc cagcacatct gtcttcagat 19320
atgagaggaa acagacacaa cctggaggcg gcaaagaagc agctctttct caagtgacct 19380
cctctatctc cctacttcct ggctaatggg gcagccttga tccttgggaa tccaggacag 19440
atatccactc gtgacaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttcc aagcaccact 19500
ggatgtgaac cacagaattt cctcctctcc ttgtggaatg tcagcttacg tctgacaaaa 19560
aatgtaaaac tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtca agctaaagca gaaagaatca 19620

cctactctgg actccagcat gactgctgag ctcaaatata tatagagaga gaaagaacca 19680
caaacttgaa gatggatatc agctacagac tttcctgagt caggtaggga aatggccatc 19740
cctcaaacct tgcaaaaggc aaacttatgc cattgtgtcc tctgacatac tgggtgatgt 19800
actgtatgtt actgatgtga ggggaacttc ctaaattggc tagtaaatta tgccaaataa 19860
aaagcaaaaa tgatatttct tgaaatgtta catctgagga acattgctaa aataatttat 19920
cagtagtttt caggatgatt tatagatgtg cattgaagtg tgtacttgtg ctctctctct 19980
cctctctctc tctctttctc tcctctctct cgctctttct ctccttgccc ccctccctcc 20040

ctgactttcc ttcctgtccc ctccacagca gtttatattt tttttctgat aatctaactt 20100
tgctgagggt tcaatgtaaa gcaccttcag tgatgagtta gttggaatgt tccccaagaa 20160
attctatttc cagcactctt ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220
accttgcctt tcctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280
ggtggatcct ggcagagtct cacagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340
accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccatgttt cattttgtgt tacagcaaac 20400
atcacaacaa tcattcctac agatcaccac tgcatgtgat caataaaata gtttttgcaa 20460

caatggtact tatgataatc atcttttatt gtttacaaat actgctttac aatagttatt 20520
cggttgcact gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtccctcgaa 20580
cagctcagtc atctttttca ttcctgtttc tatcccctac atctctttcc tttgcagacg 20640
actatctcct acactgaaac aggaaagctt ttacctttt ggcatgcttg atttaaagat 20700
tatagaaaag tatttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760
atgtttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820
ttttcaaaat tagtacagtt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 20880

accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tgttcctcct ctgcaatccc 20940

aggagataac taccaagcac aatttatgtc ttttaaaatt cagcccgtat ttatatacat 21000

atatattcaa tgtagatggg atcatgatat ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060

ttttcacaaa caccttccac gtaactatat agaagtctac gtcttcccct taatgtctgc 21120

tttgtgctac attgtaaagc tctagcacag tttaaccaaa ctcctattaa tgaggatttt 21180

agttatttttt cactctttaa acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240

cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttccccca tcccagcatt ccctgtcacg 21300

cttgttgctt ccgttgagtg actttactcc tggagtataa tctgcgtata gttcagttaa 21360

aaacatggga tctgagttta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccagttcctt 21420

gacctctctg ccctcaagtt tttgcaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480

catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctgg cacttagtaa 21540

gtgctcaata aatgtcaccc tttatgattg gtattgcgtg tatgtctgca gagaaaatca 21600

ctttgtgtcc cctttaaaaa aggactatgc ccttggtcag ctattttgca cattaaattt 21660

cacttgccaa tattaactct ccacctctaa cttgatccct ctccttcctc atcttctggt 21720

gagaccaaat gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780

aataaaccta cccctaatct ttagaattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840

tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagcatct ctgatctatt attgaytttc 21900

aattakgtat tttttttttat ttattctgaa aatgtttgtt aagcatttgc taagtaaaga 21960

tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataatttaga 22020

agggtagaag agaatctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggctg ggcgcggtgg 22080

ctcacgcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg gcggatcacg aggtcaggag 22140

atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgtctct actaaaaata caaaaaatta 22200

gcgaggcgtg gtggcgggcg cctttagtcc cagctagtcg ggaggctgag gcaggagaat 22260

ggtgtgaacc cgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320

tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataaata aataaaataa aaaataatta 22380

ggtactctag gcccagtgac ctgtctctgt actctgtaaa ttcaggtcac ctgctcaggg 22440

ctaatctgag agaaggtctc tcttcagttg aattttgaaa gacaattagc agttcacaag 22500

ctaacccagg tggacaaaga tgttcccaag cagagggagt gcttgtgaaa gctggaggcc 22560

atagaaaaac tctaaggagt gtagggaggt gggagtaatg tatggaaggg gtggagatgg 22620

aaggttaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680

aggtcttcag tgttgttgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740

ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttcctgtg 22800

<210> 101

<211> 154

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 101

tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaaggtcac 120

cgtcctaggt cagcccaagt ccactcccac tctc 154

<210> 102

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 102

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60

tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120

accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156

<210> 103

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 103

tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60

tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120

ctaggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 104

aggtggaaac acggtgagag t 21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 105

ccactcgggg aaaagttgga a 21