



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0057093
(43) 공개일자 2020년05월25일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
A01K 67/0276 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7013671(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2009년06월29일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2019-7006239
원출원일자(국제) 2009년06월29일
심사청구일자 2019년03월29일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년05월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/NL2009/050381</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/157771
국제공개일자 2009년12월30일</p> <p>(30) 우선권주장
PCT/NL2008/050430 2008년06월27일
네덜란드(NL)</p> | <p>(71) 출원인
메뤼스 엔.페.
네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 에일르랜 62</p> <p>(72) 발명자
아우차게르, 에뮌
네덜란드 엔엘-3702 에스씨 자이스트 판 레넨베흐 37
핀토, 뤼 다니엘
네덜란드 엔엘-3581 제이에스 위트레흐트 프린젠 스트라트 12
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|---|--|

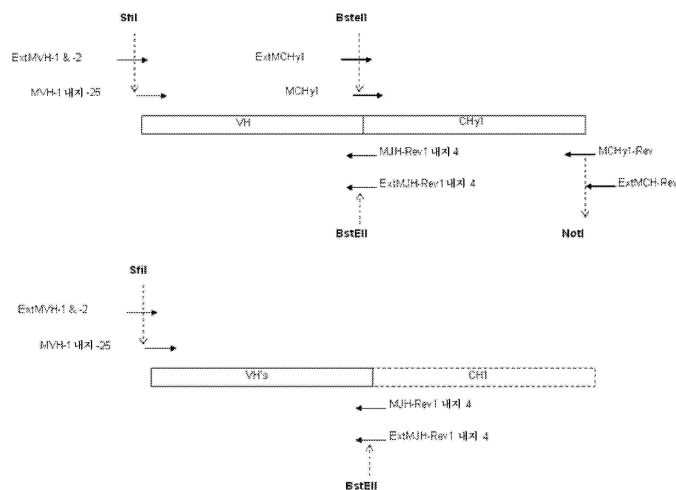
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 항체 생산 비-인간 포유동물

(57) 요약

본 발명은 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스제닉 (transgenic) 비-인간 동물을 제공하고, 여기서 면역글로불린 경쇄는 인간, 인간-유사, 또는 인간화 경쇄이다. 핵산에는 그들 DNA 체배열 및/또는 체세포 과다돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단이 제공된다. 한 실시태양에서, 핵산은 성숙 B 세포로 발달하는 세포 내에서 특정 발달 단계 동안 세포 내에서 목적하는 분자를 발현하기 위한 발현 카세트 포함한다. 본 발명은 트랜스제닉 비-인간 동물로부터 면역글로불린을 생산하기 위한 방법을 추가로 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/00 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 2217/052 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C12N 2800/30 (2013.01)

(72) 발명자

로흐텐베르흐, 톤

네덜란드 엔엘-3972 이엑스 드리베르헨 코닝힌 빌
헬미날란 22

트로스비, 마크

네덜란드 엔엘-3581 알비 위트레흐트 케르크스트라
트 37

크라메르, 로버트, 아르엔

네덜란드 엔엘-3524 케이브이 위트레흐트 롬바르디
에 15

데 크뤼프, 코넬리스, 아드리안

네덜란드 엔엘-3731 이엘 데 빌트 베스터란 40

명세서

청구범위

청구항 1

인간 VL 경쇄를 갖는 면역글로불린을 생산하는 B 세포를 생산하기 위한, 트랜스제닉 (transgenic) 쥐과 포유동물의 용도.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 적어도 부분적으로 외인성 핵산 (트랜스젠 (transgene))으로부터 발현되는, 항체 또는 그의 유도체를 생산할 수 있는 비-인간 동물의 생산 및 사용에 관한 것이다. 그러한 트랜스제닉 (transgenic) 동물을 생산하기 위한 트랜스젠 및 그러한 이중 항체를 생산하기 위한 방법; 그러한 트랜스제닉 동물을 생산하기 위한 방법 및 벡터를 개시한다.

배경기술

[0002] B 세포는 특이적 항체를 생산함으로써 체액성 면역을 매개한다. 항체 (Ab)의 기본 구조적 하위단위는 면역글로불린 (Ig) 분자이다. Ig 분자는 2개의 동일한 중쇄 (H) 및 2개의 동일한 경쇄 (L) 폴리펩티드 사슬의 복합체로 구성된다. 각각의 H쇄 및 L쇄의 아미노 말단에 가변 (V) 구역으로 불리는 아미노산 서열이 변하는 구역이 있다. H쇄 및 L쇄의 나머지 부분은 아미노산 서열이 비교적 변하지 않고, 불변 (C) 구역으로 불린다. Ig 분자에서, H쇄 및 L쇄 V 구역 (VH 및 VL)은 병치하여 잠재적인 항원 결합 부위를 형성한다. H쇄 및 L쇄 V 구역을 코딩하는 유전자는 전구체 B (프리-B (pre-B)) 세포 분화 동안 생식계열 (germline) DNA의 세그먼트로부터 체세포성으로 조립된다: H쇄에 대해 V, D 및 J 유전자 세그먼트 및 L쇄에 대해 V 및 J 유전자 세그먼트. Ig 내에서, V 구역은 상호작용하여 항원-인식 부위를 형성하는 최대 아미노산 서열 가변성의 3개의 구역이고, 따라서 상보성 결정 구역 (CDR)으로서 칭해진다.

[0003] V 유전자 세그먼트는 CDR1 및 CDR2를 포함한 V 구역 도메인의 부피를 코딩한다. CDR1 및 CDR2 내의 다양성은 다수의 상이한 생식계열-코딩된 V 세그먼트 사이의 서열 비균질성으로부터 유래한다. CDR3은 H쇄 V, D, 및 J 유전자 세그먼트 및 L쇄 V 및 J 세그먼트의 연결에 의해 및 이들 세그먼트가 조합되는 곳에서 뉴클레오티드 서열 비균질성을 생성시키는 메커니즘에 의해 형성되는 서열에 의해 코딩된다. 추가의 다양성은 상이한 H쇄 및 L쇄 V 구역들의 페어링 (pairing)으로부터 유래될 수 있다. 종합하면, 이들 과정은 생식계열 유전자 세그먼트에 의해 코딩되고 새로 형성된 B 세포에 의해 발현되는 항체의 1차 레퍼토리 (repertoire)를 생성시킨다.

[0004] 항체 다양성의 추가의 공급원은 Ig 유전자 세그먼트의 재조합에 의해 생성된 다양성의 상단에 부과된다. B 세포는 그들이 발현하는 항체 V 구역 내로 돌연변이를 도입할 수 있다 (체세포 과다돌연변이 (somatic hypermutation)로 불리는 과정). 따라서, 동물이 항원에 처음 마주칠 때, 항원은 항원에 결합하는 V 도메인을 갖는 항체를 보유하게 되는 특이적 B 세포에 결합한다. 상기 1차 반응은 상기 B 세포를 활성화시켜 동족 (cognate) 항체를 분비하도록 할 수 있다. 이들 활성화된 B 세포는 또한 이제 체세포 돌연변이 과정을 그들의 재배열된 항체 유전자 세그먼트를 표적으로 하여, 1차 반응의 항체의 변이체를 만드는 딸 세포의 생산을 허용할 수 있다. 선택 과정은 항원의 개선된 친화도의 항체를 만드는 변이체 B 세포 자손을 증폭시킨다. B 세포에서, 체세포 과다돌연변이는 재배열된 VH 및 VL 유전자를 모두 포함하는 제한된 게놈 구역에 표적화된다. 따라서, 체세포 돌연변이는 친화도 성숙 (maturation) (고친화도 항체의 생산 및 선택)을 허용한다. 따라서, 체세포 돌연변이는 고친화도 항체의 생성을 위해 중요하다.

[0005] 정교한 특이성 및 고친화도의 항체, 및 모노클로날 항체 (mAb)의 생성을 허용하는 하이브리도마 기술의 발견이 인간 질병에 대한 표적화된 치료제로서 그들의 활용에 대해 큰 기대를 불러일으켰다. MAb는 단일 B 세포 및 그의 자손체에 의해 생산되므로 동일하였다. MAb는 목적하는 항원으로 면역화시킨 마우스로부터의 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켜 불멸화 하이브리도마를 생성함으로써 제조된다. 인간에서 mAb에 대한 체내 용도의 개발에서 만나는 주요 장애 중 하나는 비-인간 Ig의 고유한 면역원성이다. 환자는 마우스 Ig 서열에 대한 항체 (인간 항 마우스 항체; HAMA)를 만듦으로써 치료 용량의 마우스 mAb에 반응하여, 급성 독성을 일으키고, 그들의

생체분포를 변경시키고 청소를 가속화시키고, 따라서 후속적인 투여의 효능을 감소시킨다 (Mirick, et al., (2004) Q. Nucl. Med. Mol. Imaging 48, 251-257).

- [0006] HAMA의 생성을 피하기 위해, 인간에 투여될 때 면역원성이 감소된 mAb를 생산하려는 시도에서 항체 인간화 방법이 개발되었다. 이들 노력으로 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 mAb에서 인간 아미노산 서열의 함량을 증가시키는 것을 목표로 하는 다양한 제조법 DNA-기반 방법이 생성되었다. 인간화는 마우스-인간 키메릭 (chimeric) mAb의 제작으로 시작하였고 (Morrison, S. L., et al., (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 6851-5), 여기서 쥐 mAb 내의 Ig C 구역은 인간 C 구역에 의해 교체되었다. 키메릭 mAb는 60-70%의 인간 아미노산 서열을 함유하고, 인간 항-키메릭 항체 반응이 여전히 관찰되었지만 인간에 주입될 때 그들의 쥐 대응물보다 면역원성이 상당히 더 적다 (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3-10).
- [0007] 쥐 mAb를 추가로 인간화하기 위해, CDR 그래프팅 (grafting)이 개발되었다. CDR 그래프팅에서, 쥐 항체는 특이성 및 친화도를 위해 필수적인 것으로 보이는 쥐 프레임워크 잔기를 보유하면서 그들의 CDR을 인간 Ig 분자의 VL 및 VH 프레임워크 내로 그래프팅함으로써 인간화된다 (Jones, P.T., et al., (1986). Nature, 321, 522). 종합하면, CDR-그래프팅된 항체는 80% 초과인 인간 아미노산 서열로 구성된다 ([Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 10029]; [Carter, P. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 4285]). 이들 노력에도 불구하고, CDR-그래프팅된 인간화된 항체는 여전히 그래프팅된 V 구역에 대한 항체 반응을 일으키는 것으로 나타났다 (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3).
- [0008] CDR 그래프팅에 후속적으로, 재표면화 (resurfacing) (Padlan, E. A., et al., (1991). Mol. Immunol., 28, 489), 초인간화 (Tan, P., D. A., et al., (2002) J. Immunol., 169, 1119), 인간 스트링 함량 (string content) 최적화 (Lazar, G. A., et al., (2007). Mol. Immunol., 44, 1986) 및 휴머니어링 (humaneering)과 같은 상이한 방식에 기반한 인간화 방법이 치료적 mAb에서 비-인간 서열의 함량을 추가로 감소시키기 위해 개발되었다 (Almagro, J. C, et al., (2008). Frontiers in Bioscience 13, 1619). CDR 그래프팅 방법에서와 같이, 이들 방법은 최종 생성물의 면역원성에 대한 인간화 과정의 영향을 평가하기 위해 항체 구조의 분석 및 비-인간 및 인간 mAb의 서열 비교에 의존한다. 키메릭 및 인간화된 항체의 면역원성을 비교할 때, 가변 구역의 인간화는 면역원성을 추가로 감소시키는 것으로 보인다 (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3-10).
- [0009] 탈-면역화는 키메릭 또는 마우스 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 개발된 다른 방법이다. 이 방법은 생물정보학을 이용한 관심있는 항체에서 선형 T-세포 에피토프의 확인, 및 부위 지정 돌연변이 유발에 의한 인간 또는 비-면역원성 서열로의 그들의 후속적인 교체를 수반한다 (W009852976A1). 탈-면역화시킨 항체는 그들의 키메릭 대응물에 비해 영양류에서 감소된 면역원성을 보였지만, 결합 친화도의 일부 손실이 관찰되었다 (Jain, M., et al., (2007). Trends in Biotechnol. 25, 307).
- [0010] 파지 디스플레이 기술의 개발은 인간에서 치료를 위한 면역원성이 보다 적은 mAb를 얻기 위해 인간화 방법을 보완하고 확장시켰다. 파지 디스플레이에서, 인간 항체 VH 및 VL 구역의 큰 컬렉션 (collection) ('라이브러리')이 섬유상 박테리오파지 입자의 표면 상에 발현된다. 상기 라이브러리로부터, 희귀한 (rare) 파지를 항원과의 결합 상호작용을 통해 선택하고; 가용형 항체 단편을 감염된 세균으로부터 발현시키고, 선택된 항체의 결합 친화도를 돌연변이에 의해 개선시킨다 (Winter, G., et al. (1994). Annu. Rev. Immunol. 12, 433). 과정은 면역 선택을 모방하고, 많은 상이한 결합 특이성을 갖는 항체가 상기 방법을 이용하여 단리되었다 (Hoogenboom, H. R., et al. (2005). Nat. Biotechnol., 23, 1105). H쇄 및 L쇄 V 구역의 다양한 공급원이 비-면역 또는 면역 공역체로부터 단리된 것을 포함한 파지 디스플레이 라이브러리를 제작하기 위해 사용되었다. 또한, 추가의 다양성을 생성하기 위해 인공적으로 무작위화된 합성 CDR 구역을 함유하는 V 구역의 파지 디스플레이 라이브러리가 제작되었다. 종종, 파지 디스플레이 라이브러리로부터 얻어진 항체는 고친화도 항체를 얻기 위해 시험관내 친화도 성숙으로 처리된다 (Hoogenboom, H. R., et al. (2005). Nat. Biotechnol., 23, 1105).
- [0011] 마우스 항체의 부재 하에 인간 항체를 생산하는 트랜스제닉 마우스 주의 생성은 인간에 적용을 위한 특이적인 고친화도 인간 mAb의 생성을 위한 또다른 기술 플랫폼 (platform)을 제공하였다. 이들 트랜스제닉 동물에서, 내인성 마우스 항체 기구는 불활성화되고, 마우스에서 인간 체액성 면역계를 실질적으로 재현하기 위해 인간 Ig 로커스로 교체된다 ([Jakobovits, A., et al. (2007). Nat. Biotechnol. 25, 1134]; [Lonberg, N. (2005). Nat. Biotechnol. 23, 1117]). B 세포 발달, 및 유전자 세그먼트의 재조합에 의한 Ig 다양화가 이들 마우스에서 충실하게 재현되어, 인간 Ig를 발현하는 쥐 B 세포의 다양한 레퍼토리를 생성시킨다. 이들 마우스를 항원으로 면역화시킴으로써, 이들 트랜스제닉 동물은 고-친화도 인간 mAb의 광범위한 다양성을 생산하기 위해 중쇄 및 경쇄 모두의 V 구역에서 체세포 돌연변이를 추적하였음이 추가로 입증되었다 (Lonberg, N. (2005). Nat.

Biotechnol. 23, 1117).

[0012] 단지 2개의 인간 mAb에 대한 완전한 면역원성 데이터가 이용가능하므로, 파지 디스플레이 라이브러리 또는 트랜스제닉 마우스로부터 유래된 것과 같은 "완전 인간" mAb가 인간화 mAb보다 면역원성이 더 적은지의 질문에 대한 해답은 아직 구하지 못한 상태이다. 파지-디스플레이된 인간 라이브러리로부터 발달된 항-종양 괴사 인자 mAb는 12%의 환자에서 항체 반응을 유도하였다 (인간화 항체의 항-항체 반응의 보다 높은 말단에서) (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3-10).

[0013] 트랜스제닉 방법에 의해 생성된 처음 등록된 인간 mAb의 면역원성의 평가에서는 mAb 처리가 대략 5.5%의 처리된 암 환자에서 항체 생성을 일으켰음을 입증하였다 ([Jakobovits, A., et al. (2007). Nat. Biotechnol. 25, 1134], [Lofgren, J. A., et al. (2007). J. Immunol. 178, 7467]).

[0014] 따라서, 그들의 표적에 특이적이지만 면역원성이 보다 적은 항체를 생산하기 위한 방법 및 수단이 필요하다. 본 발명에 따르면, 면역원성의 감소는 적어도 부분적으로는, 적어도 그의 B 세포 계열 내에 적어도 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 제공함으로써 달성되고, 여기서 중쇄 또는 경쇄 코딩 서열에는 그를 DNA 재배열 및/또는 체세포 과다돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단이 제공되고, 바람직하게는 상기 비-인간 동물은 설치류, 보다 구체적으로 마우스이다. 핵산은 바람직하게는 인간, 인간-유사 또는 인간화 면역글로불린 사슬을 코딩한다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1
 마우스 특이적 VH 프라이머의 어닐링 (annealing) 위치, 및 프라이머의 3' 말단에서 서열들을 오버행잉 (overhanging)함으로써 도입되는 요구되는 제한 부위의 위치의 토폴로지 (topology) 맵.

도 2
 PCR 증폭 단계 (증폭, 중간 및 부위 도입). 마우스 VH 증폭 프라이머 (및 프라이머의 혼합물)의 위치 및 명칭을 단계마다 나타낸다.

도 3
 MV1043 벡터의 토폴로지. 상기 벡터는 인간 또는 쥐 VH 단편의 클로닝을 위해 사용된다. O12 (IGKV1-39)가 VL 유전자로서 표시된다. 이. 콜라이 세포 내에서 헬퍼 파지와 조합으로 상기 벡터의 생성물은 g3 단백질에 대한 융합 생성물으로서 파지 입자의 표면 상에 Fab 단편을 디스플레이하는 파지의 생성 및 유전자 내용물로서 파지 내에 벡터의 존재를 허용한다 (F1 ORI).

도 4
 J-세그먼트의 하류의 마우스 C카파 로커스의 토폴로지. 인헨서 및 C카파 구역 모두를 나타낸다. 하부 화살표는 로커스를 사일런싱시키기 위해 제거되는 구역을 나타낸다.

도 5
 마우스 C-람다 로커스의 토폴로지. 3개의 모든 활성 V-구역을 나타내고 (Igl-V1, V2 및 V3), J-세그먼트 (Igl-J1, Igl-J2, Igl-J3, Igl-J4 및 슈도 세그먼트 Igl-J3p) 및 불변 구역 (Igl-C1, Igl-C2, Igl-C3 및 Igl-C4)도 또한 나타낸다. 로커스를 사일런싱시키기 위해 결실되는 구역은 결실 마커로 표시된다. 이들 결실은 모든 활성 V 유전자 (1, 2 및 3), 및 V2 및 V3 사이의 유전자간 세그먼트를 포함한다.

도 6
 인트론이 리더 개방 해독 프레임 (ORF) 내에 위치하는 IGKV1-39/J-Ck의 구성체 토폴로지.

도 7
 인트론이 리더 개방 해독 프레임 (ORF) 내에 위치하는 IGLV2-14/J-Ck의 구성체 토폴로지.

도 8

VkP-IGKV1-39/J-Ck (VkP-012)의 구성체 토폴로지. 프로모터는 IGKV1-39 유전자로부터 기원하고, 효율적인 전사 및 번역을 위한 요구되는 요소의 바로 앞에 놓인다. 유전자간 서열 (인헨서 포함)은 마우스로부터 유래하고, BAC 클론으로부터 얻는다. C-카파 서열은 래트의 카파 불변 구역을 코딩한다.

도 9

VkP-IGLV2-14/J-Ck (VkP-2a2)의 구성체 토폴로지. 프로모터는 IGKV1-39 유전자로부터 기원하고, 효율적인 전사 및 번역을 위한 요구되는 요소의 바로 앞에 놓인다. 유전자간 서열 (인헨서 포함)은 마우스로부터 유래하고, BAC 클론으로부터 얻는다. C-카파 서열은 래트의 카파 불변 구역을 코딩한다.

도 10

VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1 (VkP-012-de11)의 구성체 토폴로지는 인트론 인헨서 구역이 제거된 것을 제외하고는 도 9의 VkP-IGKV1-39/J-Ck와 동일하다.

도 11

VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 2 (VkP-012-de12)의 구성체 토폴로지는 Ck 유전자 및 3' 인헨서 사이의 유전자간 구역의 큰 부분이 결실되는 것을 제외하고는 도 10의 VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1과 동일하다. 또한, 3' 인헨서는 크기가 809 bp에서 125 bp로 감소된다.

도 12

본원에서 사용되고 언급되는 서열의 개요.

도 13

Rosa26-IgVkl-39 KI 대립유전자의 생성. (a) pCAGGS-IgVK1-39 표적화 벡터의 개략도. (b) pCAGGS-IgVK1-39 표적화 벡터의 뉴클레오티드 서열. (c) 표적화 계획.

도 14

(a) pCAGGS-IgVK1-39 표적화 벡터의 삽입을 포함하는 ES 클론의 게놈 DNA의 서던 블롯 분석. 4개의 독립적인 클론의 게놈 DNA를 AseI로 소화시키고, 표적화 벡터의 5'-경계를 나타내는 5e1로 프로빙하였다. 모든 클론은 5' 말단에서 표적화 벡터의 정확한 삽입을 포함한다.

(b) pCAGGS-IgVK1-39 표적화 벡터의 삽입을 포함하는 ES 클론의 게놈 DNA의 서던 블롯 분석. 4개의 독립적인 클론의 게놈 DNA를 MscI로 소화시키고, 표적화 벡터의 3'-경계를 나타내는 3e1로 프로빙하였다. 모든 클론은 3' 말단에서 표적화 벡터의 정확한 삽입을 포함한다.

(c) pCAGGS-IgVK1-39 표적화 벡터의 삽입을 포함하는 ES 클론의 게놈 DNA의 서던 블롯 분석. 4개의 독립적인 클론의 게놈 DNA를 BamHI로 소화시키고, 표적화 벡터의 5'-경계를 나타내는 내부 Neo 프로브로 프로빙하였다. 모든 클론은 표적화 벡터의 정확한 단일 삽입을 포함한다.

도 15

Rosa26-IgVl2-14 KI 대립유전자의 생성. (a) pCAGGS-IgVL2-14 표적화 벡터의 개략도. (b) 재배열된 생식계열 IGLV2-14/J V 랍다 구역 (IGLV2-14/J-Ck)에 기반한 CAGGS 발현 삽입물을 함유하는 pCAGGS-IgVL2-14 표적화 벡터의 뉴클레오티드 서열. (c) 표적화 계획.

도 16

IGKV1-39 잔기 1-107의 에피베이스(Epibase)® 프로파일. 하위-도 a는 DRB1 동종이형 (allotype)에 대한 결합 강도를 나타내는 한편, C는 DRB3/4/5, DQ 및 DP 동종이형에 대한 결합 강도를 나타낸다. 도면 내의 값은 해리 상수 (Kd)를 나타내고, 0.01 μ M - 0.1 μ M 범위에서 로그 눈금 (logarithmic scale) 상에 플로팅된다 (매우 강한 결합물질 (binder)은 플롯을 벗어날 수 있다). 중간 결합 펩티드에 대해, 정성적 값만이 제시되고, 약한 및 비-결합물질은 제시되지 않는다. 값은 표적 서열 내의 펩티드의 제1 잔기에 대해 플로팅된다 (펩티드 자체는 추가의 9개의 잔기에 의해 연장한다). 중요하게는, 각각의 펩티드에 대해 가장 강한 결합 수용체만이 제시되고: 보다 낮은 친화도의 교차-반응하는 동종이형은 상기 플롯에서 보이지 않는다. 가장 강한 결합 수용체는 그의 혈청형 명칭으로 표시된다. 마지막으로, 임의의 생식계열-여과된 펩티드를 에피토프 맵에서 보다 밝은 색 상으로 플로팅한다 (본 경우에, 비-자가 에피토프가 발견되지 않았다). 하위-도 b는 모든 10량체 펩티드에 대

한 HLA 결합 불규칙성 (promiscuity)을 보여준다 (Y-축: X-축에 제시된 표시된 잔기에서 시작하는 각각의 펩티드 내의 중요한 에피토프를 인식하는 HLA 동종이형의 수). 불규칙성은 그에 대해 펩티드가 중요한 결합물질인 총 47 종의 동종이형의 수로서 측정된다. 백색 컬럼은 자가-펩티드를 나타내고, 흑색 컬럼 (여기에는 없음)은 비-자가 펩티드를 나타낸다.

도 17

15량체 형식에서 혈청형에 의해 IGKV1-39의 서열에서 예측된 펩티드 결합물질의 존재를 보여주는 IGKV1-39의 에피토프 맵. 각각의 15량체는 도면의 상단에 지시된 바와 같이 넘버링된다. 상응하는 15량체의 전체 서열은 표 7에 나열된다. 흑색 상자는 좌측에 나열된 혈청형에 대한 15량체 내의 하나 이상의 중요한 자가-에피토프의 존재를 나타낸다. 중요한 에피토프는 강한 또는 중간 DRB1 결합물질 및 강한 DRB3/4/5 또는 DP 또는 DQ 결합물질로서 작동 측면에서 규정된다.

도 18

Ig 카파 로커스의 구성적 낙아웃 (knock-out; KO). (a) 표적화 계획. (b) pIg카파 표적화 벡터의 개략도.

도 19

Ig 람다 로커스의 구성적 KO. (a) 표적화 계획의 제1 단계. (b) 표적화 계획의 제2 단계.

도 20

표적화 벡터의 개략도의 개략도. (a) pVkP-012 (VkP-IGKV1-39/J-Ck); (b) pVkP-012-de11 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1); (c) pVkP-012-de12 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 2).

도 21

RMCE를 이용하는 표적화된 트랜스제네시스에 의해 Rosa26 로커스 내로 트랜스젠의 삽입을 위한 표적화 계획. (a) VkP-012 (VkP-IGKV1-39/J-Ck); (b) VkP-012-de11 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1); (c) VkP-012-de12 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 2).

도 22

MV1057 벡터의 토폴로지. 지시된 스템퍼 (stuffer) 단편을 VH 단편으로 교체하면, 012 (IGKV1-39) VL 유전자를 함유하는 경쇄를 갖는 IgG1 항체의 생산을 위해 진핵 세포에 형질감염될 수 있는 발현 벡터를 수득한다.

도 23

비장의 비-B 세포 집단에서 트랜스제닉 인간 Vk1 경쇄 발현의 결핍.

도 24

트랜스제닉 인간 Vk1 경쇄는 비장의 모든 B 세포 집단에서 발현된다.

도 25

트랜스제닉 인간 Vk1 경쇄는 복강의 B1 세포에서 발현된다.

도 26

트랜스제닉 인간 Vk1 경쇄는 프로-B 세포 (pro-B cell) 및 프리-B 세포에서 발현되지 않지만, 골수 내의 미성숙 및 재순환 집단 B 세포에서 발현된다. (a) 골수 세포의 게이팅 (gating). (b) 하나의 WT 대조군으로부터 오버레이 (overlay)를 갖는 트랜스젠 발현의 막대그래프.

도 27

트랜스제닉 인간 Vk1 경쇄는 혈액 내의 순환하는 B 세포 내의 내인성 경쇄 및 IgM 발현과 직접적으로 상호관련된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

명세서의 나머지 부분에서, 마우스가 비-인간 포유동물의 예로서 일반적으로 사용된다. 트랜스제닉 비-인간 포유동물 숙주는 항원에 대한 면역 반응을 착수할 수 있고, 여기서 반응은 영장류, 특히 인간, 가변 구역을 갖는

[0016]

항체를 생산한다. 다양한 트랜스제닉 숙주, 특히 쥐, 토끼, 양, 소, 돼지, 말, 개, 고양이 등이 사용될 수 있다. 항체 생산을 위한 불멸화를 위한 B-림프구 생산을 위해 마우스가 사용되었다. 마우스는 취급하기 쉽고, 다수로 사육될 수 있고, 광범한 면역 레퍼토리를 갖는 것으로 알려져 있으므로, 마우스가 대체로 선택 동물일 것이다. 따라서, 아래의 논의에서, 논의는 마우스를 언급할 것이지만, 다른 동물, 특히 비-영장류 포유동물이 동일한 절차에 따라 마우스를 쉽게 대체할 수 있음을 이해해야 한다.

[0017] 재배열 및 과다돌연변이를 방지하는 이유는 상기 방식에서 폴리펩티드 사슬이 비-면역원성으로 유지될 것임을 미리 알면서 비-면역원성 폴리펩티드가 선택될 수 있다는 점이다. 따라서, 생성되는 면역글로불린의 적어도 하나의 사슬은 면역원성이 보다 낮다. 생성되는 항체는 (대체로) 경쇄 및 중쇄를 모두 가질 필요가 있다. 따라서, 비-면역원성 사슬은 다른 사슬과 페어링할 수 있어야 한다. 다른 사슬은 내인성 사슬, 외인성 사슬 또는 둘 모두의 하이브리드 (hybrid)일 수 있다. 인간 치료법을 위해, 비-면역원성 사슬은 가능한 한 인간에 가까워야 한다.

[0018] 면역글로불린 사슬(들)을 코딩하는 유전자를 DNA 재배열 및/또는 돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단은 물론 상기 재배열 및/또는 돌연변이를 담당하는 모든 유전적 요소의 제거이다. 그의 단점은 2개의 사슬의 가변성이 제거되는 것인 반면, 본 발명은 바람직하게는 하나의 사슬 (바람직하게는 중쇄)의 가변성을 보유하고, 다른 사슬 (바람직하게는 경쇄)의 재배열-돌연변이를 억제 및/또는 방지한다.

[0019] 지금까지 특성 결정된 재배열 및/또는 과다돌연변이를 위한 요소는 면역글로불린에 대한 로커스 내에 위치한다. 따라서, 면역글로불린 코딩 서열을 DNA 재배열 및/또는 돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단은 면역글로불린 로커스 외부의 로커스에 유전자를 삽입하는 것이다.

[0020] 따라서, 본 발명에 따르면, 경쇄/중쇄 코딩 서열이 면역글로불린 로커스 외부의 로커스에서 비-인간 포유동물의 게놈 내에 통합되는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 제공한다. 바람직하게는, 삽입은 유전자 사일런싱 (silencing)에 저항성인 로커스 내에 있다. 본 발명에 따르면, 통합은 Rosa-로커스 또는 대등한 로커스에 있다.

[0021] Rosa 로커스 또는 대등한 로커스에 삽입될 수 있는 발현 카세트 (cassette)에, B 세포 계열의 세포로 본질적으로 제한된 면역글로불린 사슬(들)의 발현을 허용하는 수단, 바람직하게는 B 세포의 특정 발달 단계 동안 경쇄 코딩 핵산의 발현을 허용하는 수단을 제공하는 것이 바람직하다. 용어 "본질적으로 제한된 발현"은 발현이 B-세포 계열의 세포 내에 우세하지만, B-세포 내의 발현 수준에 비해 다른 세포 내에서 더 낮은 수준의 발현이 가능함을 나타낸다. 바람직한 실시태양에서, 용어 "본질적으로 제한된 발현"은 발현이 독점적으로 B-세포 계열의 세포 내에 존재함을 나타낸다. 그러한 수단은 일반적으로 및 바람직하게는 B 세포 (발달 단계) 특이적 프로모터, 예를 들어 CD19, CD20, μ HC (모든 V-유전자), VpreB1, VpreB2, VpreB3, λ 5, Ig α , Ig β , κ LC (모든 유전자), λ LC (모든 유전자), BSAP (Pax5)를 포함한다. 그러한 프로모터에 의해 DNA 재배열 및/또는 돌연변이 저항성 사슬의 발현을 유도하는 것이 가능하지만, 이들은 비교적 약하다. B 세포 수용체 (막 부착형 Ig H쇄 및 L쇄로 구성된)의 적당한 표면 발현을 보장하기 위해 및 대립유전자 배제를 통해 내인성 사슬 (존재하는 경우)의 발현 및 페어링과 경쟁하기 위해 강한 프로모터가 대개 요구될 것이다. 그러나, 그러한 프로모터는 대체로 조직 특이적이지 않다. 조직 특이성을 부여하기 위해, Cre/lox 등을 사용한 간접적 시스템이 바람직하다. 목적하는 사슬을 목적하는 면역글로불린 코딩 유전자의 활성화를 일으키는, Cre-단백질의 작용에 의해 제거될 수 있는 요소에 의해 억제되는 강한 프로모터의 제어 하에 놓는다. 상기 시스템은 문헌 [Wunderlich F. T. (2004), "Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice", Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln; http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=97557230x.pdf]에 상세히 설명되어 있다.

[0022] 바람직하게는, 재배열 및 과다돌연변이에 저항성인 방식으로 생산된 면역글로불린 사슬은 비-인간 포유동물에 의해 코딩되는 상이한 중쇄와 페어링할 수 있는 경쇄이다. 따라서, 경쇄는 모든 항체에서 동일할 (및 덜 면역원성) 것이지만, 특이성에서의 다양성은 중쇄에서 재배열 및 과다돌연변이를 통해 보유된다. 이 경우에 경쇄를 코딩하는 적어도 하나의 내인성 로커스를 사일런싱시키는 것이 바람직할 수 있지만, 대립유전자 배제가 이를 불필요하게 만들 수 있다.

[0023] 상기 실시태양에 따르면, 바람직하게는 내인성 카파 (κ) 경쇄 로커스가 기능적으로 사일런싱된다.

[0024] 내인성 κ 경쇄 로커스가 사일런싱되는 경우에 또한 다른 이유로 인해, 저항성 경쇄가 κ 경쇄, 바람직하게는

생식계열-유사 서열을 갖는 경쇄인 것이 바람직하다. 본 발명에 따르면, 그러한 경쇄는 감소된 면역원성을 갖는 항체를 생성시킬 것이다. 바람직한 생식계열 서열은 인간 IGKV1-39 (012)에 기반하고, 이는 상기 경쇄가 인간 레퍼토리에서 매우 빈번하게 관찰되고 (de Wildt et al. 1999. J. Mol. Biol. 285(3):895), 뛰어난 열역학적 안정성, 수율 및 용해도를 갖기 때문이다 (Ewert et al. 2003. J. Mol. Biol. 325(3):531).

[0025] 다음은 그를 사용하여 비-인간 동물이 본 발명에 따라 제공될 수 있는 발현 카세트의 보다 특정한 실시태양을 제공한다. 이것이 면역글로불린에 대해 일반적으로 유리하지만, 다른 관심있는 유전자가 또한 고려된다.

[0026] 따라서, 본 발명은 특정 실시태양에서, 경쇄 코딩 핵산이 5'-3' 방향으로 B 세포 특이적 프로모터, 리더 (leader), 재배열된 인간 V 유전자, 임의로 MoE κ i 인핸서, 불변 구역 (κ) 및 임의로 (말단절단된 (truncated)) MoE κ 3' 인핸서를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 제공한다. 노이베르거 (Neuberger)는 카파 불변 구역의 하류에 위치하는 신규한 B-세포 특이적 인핸서를 확인하고 검사하였다 (EP004690251). 808 bp 인핸서의 제거는 발현을 강하게 감소시키므로, 상기 인핸서는 카파 유전자의 발현에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 3' 카파 인핸서의 결실이 또한 체세포 과다돌연변이 (SHM)의 수준을 강하게 감소시켰다. 트랜스제닉 및 세포 발현 연구에서, 감소된, 돌연변이된 또는 결실된 3' 카파 인핸서는 발현 수준을 저하시킬 뿐만 아니라, 또한 체세포 과다돌연변이의 수준을 감소시킨 것으로 밝혀졌다. 현재, 3' 카파 인핸서가 SHM 과정, 발현 조절 또는 둘 모두에 관여하는지는 결정될 수 없었다 ([Odegard, V. H., et al. (2006). Nat. Rev. Immunol. 6, 573]; [Inlay, M., et al. (2002). Nat. Immunol. 3, 463] 검토).

[0027] 3' 카파 인핸서의 공학처리된 변이체를 사용하는 상세한 발현 연구에서는 50개 뉴클레오티드의 구역이 발현을 유도하기에 충분함을 나타냈다. 그러나, 적합한 발현을 위해, 145개 뉴클레오티드의 감소된 서열이 바람직하다 (EP04690251; [Meyer, K. B., et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18(19):5609-15]).

[0028] 따라서, 본 발명은 한 측면에서, 특정 발달 단계 동안 성숙 B 세포로 발달하는 세포 내에서 목적하는 단백질성 분자를 발현하기 위한 발현 카세트인 비-인간 동물의 게놈 내로 삽입을 위한 핵산을 제공하고, 상기 카세트는 숙주 세포 내로 도입된 후 목적하는 단백질성 분자의 발현의 사일런싱을 방지하기 위한 수단, 및 목적하는 단백질성 분자의 발현을 숙주 세포의 목적하는 발달 단계와 시기를 맞추기 위한 수단을 포함한다.

[0029] 발현 카세트는 게놈 내의 특정 부위에서 상동성 재조합을 허용하는 서열과 같은, 숙주 세포의 게놈 내로 도입하기 위한 수단이 제공된 핵산으로서 정의된다. 대체로 핵산은 DNA, 대개 이중 가닥 DNA일 것이다. 일반적으로, 발현 카세트는 그로부터 세포의 게놈으로 전달되는 벡터 내에서 세포로 제공될 것이다. 발현 카세트는 숙주 세포 내에서 유전자의 발현을 위해 필요한 모든 요소를 추가로 포함하지만, 특정 실시태양에서 그러한 요소 중 일부는 도입시킬 제2 핵산 상에 존재할 수 있어서, 그에 의해 이들 요소는 인 트랜스 (in trans)로 작용한다. 숙주 세포 내에서 발현을 위해 필요한 요소는 프로모터, 인핸서 및 다른 조절 요소를 포함한다. 숙주 세포에 의해 제공되지 않는 요소만이 필요하다.

[0030] 본 발명에 따르면, 관심있는 유전자의 발현이 숙주 세포의 게놈에서 사일런싱되지 않는 것이, 특히 발현이 요구되는 발달 단계에서 사일런싱되지 않는 것이 중요하다. 이것은 다양한 수단, 예를 들어 내인성 로커스 내로 삽입에 의해 또는 카세트에 사일런싱을 방지하는 핵산 요소를 제공함으로써 이루어질 수 있다 ([Kwaks et al. (2006) Trends Biotechnol. 24(3), p.137-142]; 본원에 참고로 포함됨). 발현 카세트가 숙주 세포에서 사일런싱되지 않는 로커스 내에 삽입되는 것이 바람직하다 (EP 01439234; 본원에 참고로 포함됨).

[0031] 상기 사일런싱 방지 수단은 안정화 항-억압-서열 (STAR®-서열) 및 매트릭스 부착 구역 (MAR)을 포함한다. STAR 서열은 인 시스 (in cis)로 유전자의 전사에 영향을 미치는 능력을 포함하는 핵산 서열이다. 반드시 아니지만 일반적으로, STAR 서열은 홀로 기능적 단백질 요소를 코딩하지 않는다. 한 실시태양에서, 하나의 STAR 요소가 사용된다. 그러나, 바람직하게는, 하나 초과와 STAR 요소가 사용된다. 특히 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 따른 발현 카세트에는 2개의 STAR 서열이 제공된다; 면역글로불린 유전자의 코딩 서열의 5' 측면에서 하나의 STAR 서열, 및 면역글로불린 유전자의 코딩 서열의 3' 측면에서 하나의 STAR 서열. MAR은 DNA/염색질을 핵 매트릭스에 고정시키는데 관여하는 DNA 서열이고, 이들은 포유동물 및 식물 종 모두에서 설명되었다. MAR는 진정염색질 (euchromatin)의 개방 및 유지를 용이하게 하는 많은 특징을 갖는다. MAR은 트랜스젠 발현을 증가시키고, 위치-효과를 제한할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따르면, 카세트로부터의 발현이 세포의 발달에서, 특히 발달하는 B 세포, 보다 특히 트랜스제닉 비-인간 동물, 특히 마우스 내의 B 세포에서 특정 기간 동안에만 일어나는 것이 중요하다. 상기 특정 경우에, 발달 기간은 카세트로부터 유전자의 발현 (대개 경쇄 또는 중쇄-유사 폴리펩티드)이 세포의 정상적인 분화 및/또

는 성숙을 유의하게 저해하지 않고, 적용가능한 경우에, 생산된 폴리펩티드 사슬과 그의 상대물과의 페어링을 허용하도록 선택된다.

- [0033] 본 발명에 따르면, 한 실시태양에서, 이것은 본 발명에 따른 핵산을 제공함으로써 달성할 수 있고, 여기서 발현 시기를 맞추기 위한 상기 수단은 그 활성이 특정 발달 단계에 본질적으로 제한되는 프로모터이다. 예를 들어, 번역화 후에 성숙하고/하거나 분화하는 발달하는 B 세포에서, 번역글로불린의 폴리펩티드 사슬 중 하나일 때 관심있는 유전자의 발현은 상기 성숙 및/또는 분화를 (유의하게) 저해하지 않아야 하고, 생성되는 폴리펩티드가 그의 상대물과 페어링할 수 있도록 시기를 맞추는 필요가 있다. 따라서, 본 발명은 상기 특정 단계가 성숙 B 세포의 특정 발달 단계에서 상기 세포에 의한 경쇄 분자의 발현의 개시 바로 전의 또는 개시와 동시의 단계에서 시작하는 본 발명에 따른 핵산을 제공한다.
- [0034] 이것은 상기 적합한 기간 동안에만 활성인 프로모터를 선택함으로써 달성할 수 있다. 상기 프로모터는 CD19 프로모터, Ig- α 프로모터, Ig- β 프로모터, μ hc (모든 유전자) 프로모터, V κ 프로모터 또는 그의 유사체 또는 상동체일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 특정 실시태양에서, 상기 개시된 바와 같이 프로모터는 관심있는 유전자의 발현을 직접 유도하지 않는다. 대신에, 이는 그의 생성물이 관심있는 유전자의 인 트랜스 발현을 활성화시키는 유전자의 발현을 유도한다. 그러한 활성화 유전자는 소위 Cre 재조합효소 또는 Cre-유사 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다. 관심있는 유전자에 대한 발현 카세트에는 예를 들어 관심있는 유전자의 발현을 억제하는 서열이 제공될 수 있다. 상기 서열은 목적하는 프로모터 (적합한 발달 단계 동안 활성인)의 제어 하에 있는 Cre 재조합효소의 작용에 의해 제거될 수 있다. 상기 실시태양에서, 발현 카세트의 세트가 요구된다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 발현 카세트인 핵산의 세트를 제공하고, 여기서 하나의 핵산은 숙주 세포의 목적하는 발달 단계 동안 활성인 프로모터의 제어 하에 Cre-유사 단백질을 코딩하는 발현 카세트를 포함하고 제2 핵산은 Cre-유사 단백질의 작용에 의해 활성화될 수 있는 구성적 프로모터의 제어 하에 목적하는 단백질성 분자를 코딩하는 서열을 포함한다. 상기 활성화는 바람직하게는 loxP 부위가 측면에 접하는 중지 서열의 제거에 의해 달성된다. Cre/lox 시스템은 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Rajewsky et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, p.600-603]에 상세히 설명된다. 그러한 시스템은 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Wunderlich F. T. (2004), "Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice", Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln; http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=97557230x.pdf]에서 검토된다.
- [0037] 본 발명은 본 발명에 따른 발현 카세트가 제공된 트랜스제닉 비-인간 동물을 추가로 제공하고, 여기서 목적하는 단백질성 분자는 번역글로불린의 폴리펩티드 사슬이다. 바람직한 폴리펩티드 사슬은 경쇄이다. 보다 바람직한 폴리펩티드는 생식계열 또는 생식계열-유사 경쇄이다. 가장 바람직한 폴리펩티드는 O12, 바람직하게는 재배열된 생식계열 카파 경쇄 IGKV1-39*01/IGKJ1*01 (IMGT 데이터베이스에 따른 명명법, <http://www.imgt.org>)이다.
- [0038] 폴리펩티드 사슬이 본질적으로 재배열할 수 없고/없거나 B 세포 친화도 성숙의 과정 동안 Ig에 대해 정상적으로 작동하는 것과 같은 임의의 서열 변형이 배제되도록 되는 것이 추가로 바람직하다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 카세트가 제공된 트랜스제닉 비-인간 동물을 제공하고, 여기서 상기 재배열 및/또는 서열 변형은 적어도 부분적으로 체세포 과다돌연변이를 담당하는 요소, 예를 들어, MoE κ i 인헨서의 부재에 의해 방지된다.
- [0039] 본 발명에 따른 바람직한 발현 카세트는 사일런싱의 방지 수단을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 사일런싱 방지 수단은 사일런싱에 저항성인 숙주 세포의 게놈 내의 로커스 내로의 삽입을 위한 수단이다. 상기 삽입 수단은 바람직하게는 사일런싱에 저항성인 상기 부위 내로의 상동성 재조합을 위한 수단이다. 비-인간 동물이 마우스일 때 바람직한 로커스는 rosa-로커스이다.
- [0040] 본 발명에 따른 추가의 바람직한 발현 카세트는 5'-3' 방향으로 V κ 프로모터, 마우스 리더, 인간 V 유전자, 임의로 MoE κ i 인헨서, 래트 불변 구역 (C κ) 및 임의로 (말단절단된) MoE κ 3' 인헨서를 포함한다.
- [0041] 본 발명에 따른 또다른 추가의 바람직한 발현 카세트는 5'-3' 방향으로 V κ 프로모터, 인간 리더, 인간 V 유전자, 임의로 MoE κ i 인헨서, 래트 불변 구역 (C κ) 및 임의로 (말단절단된) MoE κ 3' 인헨서를 포함한다.
- [0042] 물론, 본 발명의 궁극적인 목표는 인간 치료제에서 사용할 항체를 생산하는 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 비-인간 포유동물을 항원에 노출시켜 항체 반응을 유도하고, 항원에 특이적인 항체를 단리하는 것을

포함하는, 목적하는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.

- [0043] 별도의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 비-인간 포유동물을 항원에 노출시켜 항체 반응을 유도하고, 상기 항체를 생산하는 세포를 단리하고, 상기 세포를 배양하고 임의로 불멸화시키고, 상기 항체를 수거하는 것을 포함하는, 목적하는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0044] 추가의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 비-인간 포유동물을 항원에 노출시켜 항체 반응을 유도하고, 그러한 항체의 적어도 일부를 코딩하는 핵산을 단리하고, 상기 핵산 또는 그의 카피 또는 유도체를 발현 카세트 내에 삽입하고, 상기 상체를 숙주 세포 내에서 발현시키는 것을 포함하는, 목적하는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0045] 트랜스제닉 마우스로부터 항체를 생산하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 하나의 세포로부터 항체의 혼합물의 생산 방법이 특히 바람직하고, 그에 의해 상기 항체를 코딩하는 핵산은 본 발명에 따른 마우스로부터 유래되었다.
- [0046] 이들 소위 올리고클로닉 (oligoclonic)은 본원에 참고로 포함되는 W004106375 및 W005068622에 개시되어 있다.
- [0047] 본 발명은 바람직하게는 생식계열 입체형상 (configuration)으로 또는 그에 가까운 인간 면역글로불린 경쇄 가변 (VL) 구역 및 바람직하게는 항원-유도된 친화도 성숙의 과정 동안 축적된 체세포 돌연변이를 가질 수 있는 쥐 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 구역을 갖는 특이적인 고친화도 하이브리드 마우스-인간 항체를 생성할 수 있는, 트랜스제닉 비-인간 포유동물, 바람직하게는 마우스를 제공한다. 하이브리드 항체의 쥐 VH 구역은 생식계열 또는 거의-생식계열 VL 구역 및 인간화된 쥐 VH 구역에 기초하여 인간에 적용될 때 면역원성이 감소된 mAb를 얻도록 인간화 절차로 처리될 수 있음이 예상된다.
- [0048] 특히, 본 발명에서, B 세포 발달 동안 유의한 비율의 B 세포 상에 트랜스젠의 시기적절하고 조절된 발현을 제공하지만, 트랜스젠에 대한 체세포 과다돌연변이 기구를 유도하는 요소가 결핍되는 시스-작용 유전자 요소의 제어 하에 재배열된 인간 VL 구역을 코딩하는 DNA 발현 구성체를 보유하는 트랜스제닉 마우스는 본질적으로 비돌연변이된 L쇄를 갖는 특이적인 고친화도 마우스-인간 하이브리드 항체를 생성할 수 있는 것으로 나타났다. 재배열된 인간 트랜스젠은 다양한 내인성 쥐 면역글로불린 H쇄와 페어링하여, B 세포의 표면 상에서 발현된 마우스-인간 하이브리드 면역글로불린을 형성할 수 있고, 쥐 B 세포 발달을 충분히 용이하게 하여 많고 다양한 말초 B 세포 컴파트먼트 (compartment)를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.
- [0049] 바람직한 실시태양에서, 트랜스젠 발현 구성체는 B-세포 특이적 발현을 유도하는 인간 VL 프로모터의 제어 하에 인간 재배열된 L쇄 V 구역의 코딩 서열을 보유한다. 또한, 구성체는 트랜스젠의 B 세포 특이적이고 유도가능한 고수준 발현을 위한 쥐 3' Ck 인핸서 서열을 보유한다. 추가로, 구성체는 트랜스젠에 대한 체세포 과다돌연변이 기구의 동원을 용이하게 하는 조절 요소, 예를 들어 인트론 인핸서 및 3' C-카파 인핸서가 결핍되도록 설계된다.
- [0050] 관련 실시태양에서, 재배열된 인간 VL 유전자는 부위 특이적 통합에 의해 쥐 Rosa26 로커스 내에 삽입된다. 예측가능한 트랜스젠 발현 패턴을 갖는 트랜스제닉 유기체 (예를 들어, 마우스)의 효율적인 생성을 위한 "표적화된 트랜스제네시스 (transgenesis)" 방법의 문맥에서 Rosa26 로커스가 유용하다.
- [0051] 바람직한 실시태양에서, 재배열된 인간 VL 구역은 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 갖는 B 세포의 집단의 생성을 보장하도록 많은 상이한 쥐 VH 유전자와 페어링하는 그의 능력에 대해 선택된다. 그러한 VL 구역을 얻는 방법은 마우스의 B 세포로부터 재배열된 VH 유전자의 레퍼토리 및 인간의 B 세포로부터 인간 재배열된 생식계열 VL 구역의 레퍼토리를 증폭시키고, 이들을 파지미드 디스플레이 벡터 내로 클로닝하여 세균 내에서 하이브리드 면역글로불린의 다양한 라이브러리를 제조하는 것을 포함한다. 비선택된 및 항원-선택된 VH/VL 쌍의 컬렉션의 뉴클레오티드 서열 분석에 의해, 많은 상이한 쥐 VH 유전자와 페어링하는 인간 생식계열 VL 유전자가 확인된다. 상기 능력을 가진 인간 생식계열 VL 유전자의 컬렉션이 설명된다.
- [0052] 한 실시태양에서, 항원으로 면역화시킬 때, B 세포는 면역 반응을 착수하여, 높은 특이성 및 친화도를 갖는 하이브리드 항체를 분비하는 B 세포의 생성을 일으킬 수 있는 것으로 나타난다. 이들 항체를 코딩하는 V 구역은 돌연변이를 보유하지 않거나 매우 적게 보유하는 인간 트랜스제닉 경쇄 및 체세포 과다돌연변이 기구에 의해 도입된 가변적인 수의 돌연변이를 보유하는 쥐 중쇄를 특징으로 한다.
- [0053] 관련 실시태양에서, 하이브리도마 및 디스플레이 기술에 의해 트랜스제닉 마우스로부터 고친화도 하이브리드 모노클로날 항체를 얻는 계획, 및 인간에 적용하기 위해 면역원성이 더 적은 항체를 얻기 위해 쥐 VH 구역을 인간

화하는 절차가 고려된다.

- [0054] 한 실시태양에서, 본 발명은 동물 면역글로불린 단백질의 경쇄 불변 구역 (CL)과 조합되어 인간 면역글로불린 VL 구역을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 면역글로불린 L쇄 트랜스젠 구성체를 제공하고, 여기서 서열은 비-인간 트랜스제닉 동물에 통합될 때, 체세포 과다돌연변이되지 않거나 근소하게 체세포 과다돌연변이된 인간 VL 구역을 갖는 Ig VL-CL 폴리펩티드를 생산하는 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. Ig VL은 비-인간 트랜스제닉 동물에서 B 세포 발달 동안 생성된 재배열된 VH-CH 폴리펩티드와 페어링할 수 있고, 여기서 상기 VH-CH 폴리펩티드는 자극 시에 체세포 과다돌연변이하는 능력을 보유한다. CL 구역은 임의의 동물 종의 것일 수 있고, 일반적으로 비-인간 트랜스제닉 동물의 CH 구역과 페어링할 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또한 VL 구역이 인간 기원의 것이고 CL, VH 및 CH는 인간을 포함한 임의의 동물 종의 것일 수 있는 VL-CL 폴리펩티드 및 VH-CH 폴리펩티드로 구성되는 하이브리드 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 비-인간 동물을 생산하는데 있어서 상기한 트랜스젠 구성체의 용도를 포함한다. 면역화 시에, 이들 트랜스제닉 동물은 체세포 과다돌연변이된 VH 유전자에 의해 코딩되는 고친화도 항체, 및 트랜스젠에 의해 코딩되는 본질적으로 비-돌연변이된 VL 유전자를 생성할 수 있다.
- [0056] 다른 측면에서, 본 발명은 내인성 면역글로불린 경쇄 로커스를 기능적으로 파괴하고, 동물 계놈 내로 본 발명의 트랜스젠 구성체를 삽입하는 것을 포함하는, 항원 접종에 반응하여 하이브리드 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 비-인간 동물의 생산 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명은 인간 VL 경쇄를 갖는 면역글로불린을 생산하는 B 세포의 생산에 있어서 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 동물의 용도를 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 상기한 방법에 의해 수득가능한 동물에게 상기 항원을 접종하고, 상기 항원에 결합하는 상기 동물로부터 B 세포를 스크리닝하는 것을 포함하는 인간 VL을 갖고 선택된 항원에 결합하는 면역글로불린을 생산하는 B 세포의 생산 방법을 제공한다. 본 발명은 상기 방법에 의해 수득가능한 B 세포, 및 그러한 B 세포를 불멸화시킴으로써 수득가능한 하이브리도마, 예를 들어 상기한 바와 같은 B 세포를 골수종 세포와 융합시킴으로써 수득된 하이브리도마를 추가로 포함한다. 본 발명은 또한 상기 하이브리도마를 배양하는 것을 포함하는, 모노클로날 항체의 생산 방법을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 하이브리도마 또는 상응하는 모노클로날 항체를 생산하는데 있어서 상기 B 세포의 용도를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 또다른 추가의 측면은 상기한 바와 같이 수득가능한 동물에게 상기 항원을 접종하고, 그로부터 면역글로불린을 수득하는 것을 포함하는, 인간 VL쇄를 갖고 선택된 항원에 결합하는 면역글로불린의 생산 방법이다.
- [0059] 하나의 계획에서, 개발 단계로서, 인간 생식계열 V 및 J 유전자 세그먼트에 의해 코딩되는 재배열된 VL 구역 및 임의의 동물 종의 경쇄 불변 구역, 그러나 바람직하게는 쥐 불변 구역을 마우스 생식계열 내로 도입시킨다. 트랜스젠 DNA는 배아 줄기 세포 또는 수정된 난자의 전핵 (pronucleus) 내로 도입될 수 있다. 통합은 사용할 특정 계획에 따라 무작위 또는 상동성일 수 있다. 예를 들어, VL 트랜스젠은 무작위 삽입에 의해 도입되어, 계놈 내에 하나 또는 다수 카피의 트랜스젠을 갖는 마우스를 생성할 수 있다. 별법으로, 인간 VL 트랜스젠은 당업계에 설명된 바와 같이 부위-특이적 재조합을 사용하여 특이적 계놈 로커스에 표적화될 수 있다.
- [0060] 하나의 바람직한 실시태양에서, VL 트랜스젠은 삽입된 트랜스젠의 강하고 예측가능한 발현을 허용하는 적합한 통합 부위인 쥐 ROSA26 로커스에 표적화된다 (EP 1439234). 표적화 벡터는 단일 카피의 유전자 발현 카세트의 삽입을 허용하여, 다수 카피의 배열에 의한 트랜스젠 발현의 조정을 방지한다. 삽입 부위로서 상염색체 Rosa26 로커스를 선택함으로써, 비-인간 동물에서 삽입된 트랜스젠의 발현 패턴을 예측가능하다. 추가로, 무작위 X 불활성화 및/또는 염색체 위치 효과에 의한 조정이 피해진다. 이것은 또한 임의의 제시된 트랜스젠에 대해 다수의 트랜스제닉 주를 생성하고 분석할 필요를 없앤다. 마지막으로, 부위-특이적 통합을 위한 Rosa26 표적화 벡터를 다수의 유전자 발현 카세트를 위해 사용할 수 있다. 따라서, 2개 이상의 상이한 재배열된 생식계열 인간 VL 구역이 하이브리드 또는 인간 항체의 레퍼토리의 다양성을 추가로 증가시키기 위해 Rosa26 로커스 내로 삽입되는 것을 예상할 수 있다.
- [0061] 다른 실시태양에서, 재배열된 인간 VL 구역은 내인성 로커스를 기능적으로 불활성화시키도록 쥐 Ig 카파 또는 람다 경쇄 로커스에 표적화될 수 있거나, 재배열된 인간 VL 구역을 함유하는 마우스를 기능적 카파 또는 람다 Ig 로커스 또는 둘 모두가 결핍되는 마우스와 교배할 수 있다. 따라서, 형질전환을 이용하거나, 반복적 단계를 이용하거나, 교배와 조합함으로써, 내인성 숙주 면역글로불린 경쇄가 실질적으로 부재하는 인간 VL 트랜스젠을 보유하는 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물은 얻을 수 있다.
- [0062] 한 실시태양에서, 인간 VL 트랜스젠은 B 세포의 표면에서 발현된 기능적 마우스-인간 하이브리드 항체의 다양한

레퍼토리를 형성하도록 쥐 VH 구역의 실질적인 부분과 페어링하는 그의 능력에 대해 선택된다. 쥐 VH 구역의 실질적인 부분은 인간 VL이 B 세포 발달 동안 생성된 쥐 VH 구역의 적어도 0.1%, 보다 바람직하게는 적어도 1%, 가장 바람직하게는 적어도 10%와 페어링하는 것을 의미한다. 상기 특징을 갖는 인간 VL 유전자를 확인하는 방법은 인간 VL 구역의 레퍼토리를 쥐 VH 구역의 레퍼토리와 무작위로 페어링시키고, 적절한 진핵 또는 원핵 발현 벡터 내에서 VH 및 VL 구역을 동시-발현시키고, 쥐 VH 구역의 실질적인 부분과 페어링하는 인간 VL 구역에 대해 스크리닝하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 파지미드 벡터는 세균 세포 내에서 또는 섬유상 파지의 표면에 마우스-인간 항체 단편의 발현을 유도하기 위해 및 당업계에 공지된 방법에 의한 항체 단편의 결합 능력의 분석에 사용될 수 있다.

[0063] 다른 실시태양에서, 인간 VL 트랜스젠은 B 세포의 표면에서 발현된 인간 항체의 다양한 레퍼토리를 형성하도록 인간 VH 구역의 실질적인 부분과 페어링하는 그의 능력에 대해 선택된다. 인간 VH 구역의 실질적인 부분은 인간 VL이 B 세포 발달 동안 생성된 인간 VH 구역의 적어도 0.1%, 보다 바람직하게는 적어도 1%, 가장 바람직하게는 적어도 10%와 페어링하는 것을 의미한다.

[0064] 후자의 실시태양에서, 인간 VL 트랜스제닉 마우스를 기능적 재배열된 또는 비-재배열된 인간 H쇄 면역글로불린 로커스 및 당업계에 설명된 바와 같은 기능적으로 불활성화된 내인성 H쇄 Ig 로커스를 보유하는 마우스와 교배한다. 숙주가 인간 IgH 및 재배열된 인간 VL 트랜스젠을 함유하는, 각각의 3개의 숙주 Ig 로커스 (중쇄, 카파 및 람다 경쇄)의 2개의 카피의 기능적 불활성화는 숙주 또는 숙주 인간 키메라 항체의 생산 없이 순수한 인간 항체 분자의 생산을 허용한다. 특이적 항원을 사용한 면역화에 의해 그러한 숙주 동물주는 특이적 인간 항체를 생산하는 마우스 B-세포의 생산에 의해 반응할 것이고, 여기서 B-세포는 후속적으로 마우스 골수종 세포와 융합되거나 인간 모노클로날 항체의 연속적인 안정한 생산을 위해 임의의 다른 방식으로 불멸화된다. 별법으로, 상기 B 세포 집단은 cDNA 라이브러리를 제조함으로써 또는 당업계에 공지된 바와 같이 인간 VH 구역에 대한 프라이머를 사용하는 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있는 VH 구역의 공급원으로서 사용된다.

[0065] 인간 재배열된 VL 유전자는 적절한 진핵 또는 원핵 미생물 내에서 재구성되고, 생성되는 DNA 단편은 배아 줄기 세포 또는 수정된 마우스 난자의 전핵 내로 도입될 수 있다. VL 트랜스젠의 B 세포 특이적 발현을 유도하는 다양한 구성체가 당업계에서 설명되었고, 다음과 같은 일반적인 형식을 갖는다: 트랜스젠의 B 세포 특이적 발현을 유도하는 리더 서열 및 관련 상류 서열, 인간 VL 트랜스젠의 코딩 서열, 트랜스젠의 B 세포 특이적인 고수준 발현을 유도하는 인핸서 서열, 및 쥐 불변 구역 유전자. 바람직한 형식에서, 인핸서는 C-카파 3' 인핸서이고, 이는 B-계열 세포에서 고수준 발현을 유도하지만, 트랜스젠 구성체에서 사용될 때 체세포 과다돌연변이를 동원하지 않기 때문이다.

[0066] 한 실시태양에서, 계놈 내에 하나 또는 다수 카피의 트랜스젠을 포함하는 동물, 바람직하게는 마우스를 단리하고, 안정한 발현을 위해 분석한다. 바람직하게는 B-세포 내에서, 장기간에 걸쳐 트랜스젠의 안정한 발현을 보이는 동물을 선택한다. 요구되는 경우에, 바람직하게는 상이한 염색체 상에, 하나 또는 다수 카피의 트랜스젠의 독립적인 삽입을 포함하는 상이한 동물주를 교배하여, 바람직하게는 B-세포 내에서 동물에서 트랜스젠의 발현을 증가시키기 위해 하나 또는 다수 카피의 트랜스젠의 상이한 삽입을 갖는 동물을 얻는다.

[0067] 본 발명은 본 발명에 따른 트랜스제닉 비-인간 동물의 자손체를 추가로 제공하고, 상기 자손체는 적어도 그의 B-세포 계열 내에, 서열을 DNA 재배열 및/또는 체세포 과다돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단과 함께 중쇄 또는 경쇄 코딩 서열을 포함한다.

[0068] 본 발명은 본 발명에 따른 트랜스제닉 비-인간 동물의 자손체를 추가로 제공하고, 상기 자손체는 성숙 B 세포로 발달하는 세포 내에서 특정 발달 단계 동안 세포 내에서 목적하는 단백질성 분자를 발현하기 위한 발현 카세트들을 포함한다.

[0069] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 트랜스제닉 비-인간 동물로부터 단리된 세포를 제공하고, 상기 세포는 서열을 DNA 재배열 및/또는 체세포 과다돌연변이에 저항성이 되도록 만드는 수단과 함께 중쇄 또는 경쇄 코딩 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 트랜스제닉 비-인간 동물로부터 단리된 세포를 제공하고, 상기 세포는 성숙 B 세포로 발달하는 세포 내에서 특정 발달 단계 동안 세포 내에서 목적하는 단백질성 분자를 발현하기 위한 발현 카세트를 포함한다. 본 발명에 따른 세포, 바람직하게는 항체-생산 B-세포 또는 항체-생산 B-세포로 분화하거나 성숙할 수 있는 세포는 예를 들어 문헌 [Gascan et al. 1991. J. Exp. Med. 173: 747-750]으로부터 당업자에게 공지된 바와 같이 항체의 시험관내 생산을 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포의 불멸화 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 골수종 세포와의 융합에 의한 하이브리도마의 생성, Epstein Barr (Epstein Barr) 바이러스를 사용한 형질전환; 활성화 및 전사의 신호 변환인자 (STAT)의 발현, CD40 및 IL4 수

용체 신호전달을 통한 활성화, 및/또는 Bcl6의 발현을 포함한다 (Shvarts et al. 2002. Genes Dev 16: 681-686).

[0070] 별개의 단계에서, 마우스 내인성 카파 및 람다 경쇄 로커스는 트랜스제닉 마우스 내의 적어도 대다수의 B 세포가 트랜스제닉 인간 VL 구역을 함유하는 Ig 수용체를 보유하도록 본질적으로 비-기능적으로 된다. 내인성 마우스 면역글로불린 로커스의 불활성화는 마우스 배아 줄기 세포에서 상동성 재조합에 의한 적절한 로커스의 표적화된 파괴에 의해 달성된다. 상기 표적화된 파괴는 기능적 내인성 마우스 면역글로불린 카파 및/또는 람다 경쇄가 실질적으로 생산되지 않도록 게놈 서열의 변경을 포함한다. 용어 "기능적 내인성 마우스 면역글로불린이 실질적으로 없는"은 내인성 카파 및/또는 람다 경쇄 로커스, 바람직하게는 내인성 카파 경쇄 로커스의 기능적 단백질 발현의 수준이 참조 마우스에서의 발현 수준의 약 20%, 보다 바람직하게는 약 10%, 보다 바람직하게는 약 5%, 보다 바람직하게는 약 2%, 보다 바람직하게는 약 1%로 감소하도록 내인성 카파 및/또는 람다 경쇄 로커스가 기능적으로 사일렌싱되는 것을 나타낸다. 가장 바람직한 실시태양에서, 내인성 카파 및/또는 람다 경쇄 로커스의 기능적 단백질 발현의 수준은 0%로 감소한다. 기능적 단백질 발현의 수준은 웨스턴 블로팅 및 마우스 중쇄와의 페어링을 포함한, 당업자에게 공지된 수단에 의해 결정될 수 있다. 상기 참조 마우스는 내인성 카파 및/또는 람다 경쇄 로커스가 파괴되지 않은 마우스이다. 상기 변경은 내인성 면역글로불린 유전자의 기능적 발현을 위해 요구되는 유전자 서열의 돌연변이 및/또는 결실을 포함한다. 방법으로, 상기 변경은 내인성 면역글로불린 유전자의 기능적 발현이 감소되도록 내인성 마우스 면역글로불린 카파 및/또는 람다 경쇄 로커스 내로 핵산의 삽입을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 핵산은 내인성 면역글로불린 유전자의 전사 사일렌싱을 일으키는 사일렌싱 요소를 포함한다. 추가의 실시태양에서 또는 추가로, 상기 핵산은 예를 들어 코딩 서열 내에서 프레임 이동을 일으키는 엑손을 도입함으로써 내인성 면역글로불린 유전자의 스플라이싱 및/또는 번역을 파괴하는 서열, 또는 조기 중지 코돈을 포함하는 서열을 포함한다. 각각의 경우에, 변형된 배아 줄기 세포로부터 부분적으로 유래되고 생식계열을 통해 유전자 변형을 전달할 수 있는 키메라 동물이 생성된다. 인간 면역글로불린 로커스를 갖는 마우스 동물주를 불활성화된 마우스 로커스를 갖는 동물주와 교배시키면 본질적으로 인간 경쇄만을 포함하는 항체를 생산하는 동물을 얻는다.

[0071] 상동성 재조합을 위한 구성체는 당업계에 공지된 수단에 의해 제조되고, 임의의 바람직하지 않은 서열, 예를 들어, 원핵생물 서열은 제거된다. 상동성 재조합을 위한 구성체를 표적 세포 내로 도입하기 위한 임의의 편리한 기술을 사용할 수 있다. 이들 기술은 스페로플라스트 (spheroplast) 융합, 리포펙션 (lipofection), 전기천공, 인산칼슘-매개된 DNA 전달 또는 직접 미세주사를 포함한다. 표적 세포의 형질전환 또는 형질감염 후에, 양성 및/또는 음성 마커에 의해, 예를 들어 마이신 내성 및/또는 아시클로버 및/또는 겐시클로버 내성에 의해 표적 세포를 선택한다. 이어서, 목적하는 표현형을 보이는 세포를 제한 분석, 전기영동, 서던 (Southern) 분석, PCR 등에 의해 더욱 분석할 수 있다. 표적 로커스에서 병변(들)의 존재를 보이는 단편을 확인함으로써, 표적 로커스의 카피를 불활성화시키기 위해 상동성 재조합이 일어난 세포가 확인된다.

[0072] 추가로, 면역화 시에, 상기 언급된 트랜스제닉 마우스 내의 쥐 및 인간 VH 구역은 고친화도 항체를 생성하도록 체세포 과다돌연변이를 거칠 수 있지만 VL 구역은 그렇지 않은 것으로 나타났다. 유리하게는, 생식계열 VL 구역에 의해 코딩되는 이들 항체는 인간에 적용될 때 보다 낮은 면역원성에 기여하는 것으로 예측되고, 응집하는 경향이 더 적고 따라서 인간에서 치료 용도를 위해 더 안전한 보다 안전한 항체를 생성한다.

[0073] 상기 언급된 비-인간 트랜스제닉 동물 또는 세포로부터 유래된 mAb는 모두 동일한 인간 VL 구역을 공유한다. 동일한 VL 구역을 공유하는 mAb는 기능적 결합 부위를 갖는 재조합 항체의 혼합물의 생산을 위해 단일 클로날 세포 내에서 동시-발현될 수 있는 것으로 설명되었다 (W004106375 및 W005068622 참조). 따라서, 본 발명은 클로날 세포에 의해 생산된 mAb의 혼합물에 대한 기초를 구성하는 특이적인 고친화도 mAb의 생성을 위한 플랫폼을 제공한다.

[0074] 상기 언급된 비-인간 트랜스제닉 동물 또는 세포로부터 유래된 mAb는 세포 표적에 대해 생성되는 것이 바람직하다. 바람직한 표적은 인간 표면-발현된 또는 가용형 단백질 또는 탄수화물 분자이다. 더욱 바람직한 표적은 특히 인간의, 세균, 바이러스 및 다른 병원체의 표면에서 발현된 표면-발현된 단백질 또는 탄수화물 분자이다.

[0075] 보다 구체적으로, 바람직한 표적은 시토킨 및 케모킨, 예를 들어 비제한적으로 인터루킨 1베타 (IL1베타), IL2, IL4, IL5, IL7, IL8, IL12, IL13, IL15, IL18, IL21, IL23 및 케모킨, 예를 들어, CXCL 케모킨, CC 케모킨, C 케모킨 (또는 γ 케모킨), 예를 들어 XCL1 (림포타틴- α) 및 XCL2 (림포타틴- β), 및 CX3C 케모킨을 포함한다. 바람직한 표적으로서 시토킨 및 케모킨의 수용체 분자, 예를 들어 타입 I 시토킨 수용체, 예를 들어, IL-2 수용체, 타입 II 시토킨 수용체, 예를 들어 인터페론 수용체, 면역글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리 (superfamily) 수용체,

종양 괴사 인자 수용체 패밀리를, 예를 들어 CD40, CD27 및 CD30에 대한 수용체, 세린/트레오닌-단백질 키나제 수용체, 예를 들어 TGF 베타 수용체, G-단백질 결합 수용체, 예를 들어 CXCR1-CXCR7, 및 티로신 키나제 수용체, 예를 들어 섬유모세포 성장 인자 수용체 (FGFR) 패밀리를, EGF 수용체 패밀리를, 예를 들어 erbB1 (EGFR; HER1), erbB2, (HER2), erbB3 (HER3) 및 erbB4 (HER4), 인슐린 수용체 패밀리를, 예를 들어 IGF-R1 및 IGF-R2, PDGF 수용체 패밀리를, 간세포 성장 인자 수용체 패밀리를, 예를 들어 c-Met (HGF-R), Trk 수용체 패밀리를, AXL 수용체 패밀리를, LTK 수용체 패밀리를, TIE 수용체 패밀리를, ROR 수용체 패밀리를, DDR 수용체 패밀리를, KLG 수용체 패밀리를, RYK 수용체 패밀리를, MuSK 수용체 패밀리를, 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR) 패밀리를 추가로 포함한다.

[0076] 추가로 바람직한 표적은 종양에서 과다-발현되거나 선택적으로 발현되는 표적, 예를 들어, VEGF, CD20, CD38, CD33, CEA, EpCAM, PSMA, CD54, 루이스 (Lewis) Y, CD52, CD40, CD22, CD51/CD61, CD74, MUC-1, CD38, CD19, CD262 (TRAIL-R2), RANKL, CTLA4, 및 CD30; 만성 염증에 관여하는 표적, 예를 들어, CD25, CD11a, TNF, CD4, CD80, CD23, CD3, CD14, IFN감마, CD40L, CD50, CD122, TGF베타 및 TGF알파이다.

[0077] 특히 인간의, 세균, 바이러스 및 다른 기생충 병원체의 표면에서 발현되는 바람직한 표면-발현된 단백질 또는 탄수화물 분자는 인플루엔자 A 및 B 바이러스의 표면 마커, 예를 들어 헤마글루티닌 (HA) 및 뉴라미니다제 (NA), 필로바이러스, 예를 들어 에볼라 바이러스, 광견병, 홍역, 풍진, 유행성 이하선염, 플라비바이러스, 예를 들어 뎅기 바이러스 타입 1-4, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 황열병 바이러스, 파리믹소바이러스, 예를 들어 파리믹소바이러스, 예를 들어 파라인플루엔자 1, 3, 루블라바이러스, 예를 들어 뎀프스바이러스 및 파라인플루엔자 2, 4, 모르빌리바이러스, 및 뉴모바이러스, 예를 들어 호흡기 합포체 바이러스, 우두, 천연두, 코로나바이러스, 예를 들어 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 바이러스, A, B 및 C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 포진 바이러스, 예를 들어 사이토메갈로바이러스, 엡스타인 바아 바이러스, 단순 포진 바이러스, 및 수두 대상포진 바이러스, 파르보바이러스, 예를 들어, B19; 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*); 리스테리아 모노사이토키네스 (*Listeria monocytogenes*); 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*); 스태피로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*); 이. 콜라이 (*E. coli*) O157:H7; 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*); 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*); 에를리키아 샤펜시스 (*Ehrlichia chaffeensis*); 클로스트리듐 디피실레 (*Clostridium difficile*); 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholera*); 살모넬라 엔테리카 혈청형 티피무리움 (*Salmonella enterica* Serotype Typhimurium); 바르토넬라 헨셀라에 (*Bartonella henselae*); 스트렙토코커스 피오케네스 (*Streptococcus pyogenes*) (그룹 A 스트렙토코커스); 스트렙토코커스 아갈락티아에 (*Streptococcus agalactiae*) (그룹 B 스트렙토코커스); 다제 약물 내성 에스. 아우레우스 (*S. aureus*) (예를 들어 MRSA); 클라미디아 뉴모니아에 (*Chlamydia pneumoniae*); 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*); 비브리오 볼리피쿠스 (*Vibrio vulnificus*); 파라클라미디아 뉴모니아 (*Parachlamydia pneumoniae*); 코리네박테리움 아미콜라툼 (*Corynebacterium amycolatum*); 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*); 리네졸리드 (Linezolid)-내성 장구균 (이. 파에칼리스 (*E. faecalis*) 및 이. 파에시움 (*E. faecium*)); 및 다제 약물 내성 아시네토박터 바우마니 (*Acinetobacter baumannii*)를 포함한다.

[0078] 가장 바람직한 표적은 IL-6 및 그의 수용체, IL-6R알파, 당단백질-표시된 gp130, RSV, 특히 표면 단백질 F, G 및 SH, 및 비-구조 단백질, 예를 들어 N 및 M, 및 수용체 티로신 키나제, 특히 erbB1 (EGFR; HER1), erbB2 (HER2), erbB3 (HER3), erbB4 (HER4), IGF-R1 및 IGF-R2, c-Met (HGF-R)이다.

[0079] 따라서, 본 발명은 클로날 세포에 의해 생산된 mAb의 혼합물에 대한 기초를 구성하는 상기 언급된 표적에 대해 생성된 특이적인 고친화도 mAb의 생성을 위한 플랫폼을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 특이적인 고친화도 mAb는 적어도 하나의 표적 상의 상이한 에피토프에 대해 생성되는 mAb를 포함한다. 추가의 바람직한 실시태양에서, 상기 특이적인 고친화도 mAb는 상이한 표적, 예를 들어, EGF-수용체 패밀리의 하나 이상의 멤버, 예를 들어 erbB1 (EGFR; HER1), erbB2 (HER2), erbB3 (HER3) 및 erbB4 (HER4)에 대해 생성되는 mAb를 포함한다.

[0080] 달리 정의하지 않으면, 본 발명과 관련하여 사용되는 학술 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해되는 것과 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥에서 달리 요구되지 않으면, 단수형 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재되는 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 그의 기술은 당업계에 잘 공지되고 일반적으로 사용되는 것이다. 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환 (예를 들어, 전기천공, 리포펙션)을 위한 표준 기술이 사용된다. 효소에 의한 반응 및 정제 기술은 제조사의 명세서에 따라 또는 당업계에서 일반적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 상기한 기

술 및 절차는 일반적으로 당업계에 잘 공지된 통상적인 방법에 따라 및 본 명세서 전체에서 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 및 보다 구체적인 참조문에 설명된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001))]을 참조한다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학 및 제약 화학과 관련하여 사용되는 명명법 및 그의 실험실 절차 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 제약 제제, 제형화, 및 전달, 및 환자의 치료를 위한 표준 기술이 사용된다.

- [0081] 실시예
- [0082] 실시예 1
- [0083] 인간 경쇄 V-유전자 클론
- [0084] 본 실시예는 경쇄 발현 트랜스제닉 마우스라는 개념에 대한 증거로서 사용되는 2개의 인간 경쇄 V-유전자 (카파형의 하나의 유전자 및 람다형의 하나의 유전자)의 선택에 대한 원리를 설명한다. De Wildt 등 (1990)의 문헌 ([de Wildt et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 285(3):895])에서는 말초 IgG-양성 B-세포에서 인간 경쇄의 발현을 분석하였다. 상기 데이터를 기초로 하여, B-세포 레퍼토리아에서 잘 제시되기 때문에 IGKV1-39 (O12) 및 IGLV2-14 (2a2)를 경쇄로 선택하였다. 경쇄의 J-세그먼트 서열은 IGKV1-39에 대해 GenBank ABA26122에서 제시되는 서열 (Rabquer, B.J., Smithson, S.L., Shriner, A.K. and Westerink, M.A.J.) 및 IGLV2-14에 대해 GenBank AAF20450에서 제시되는 서열 (Ignatovich, O., Tomlinson, I.M., Popov, A.V., Bruggemann, M. and Winter, G. *J. Mol. Biol.* 294 (2), 457-465 (1999))을 기초로 하여 선택하였다.
- [0085] 모든 프레임워크 세그먼트는 잠재적인 임상 용도에서 가능한 가장 낮은 면역원성을 제공하도록 생식계열 아미노산 서열로 전환된다.
- [0086] 실시예 2
- [0087] 인간 IGKV1-39 유전자 세그먼트와 페어링하여 기능적 항체 결합 부위를 형성하는 마우스 중쇄 V-유전자의 획득
- [0088] 본 실시예는 단일의 재배열된 인간 생식계열 IGKV1-39/J 구역과 페어링할 수 있는 마우스 중쇄 V-유전자의 확인에 대해 설명한다. 과상풍 특소이드로 면역화시킨 마우스로부터의 비장 VH 레퍼토리를 단일 인간 IGKV1-39-C 카파 경쇄와 함께 파지 디스플레이 Fab 벡터에 클로닝하고, 과상풍 특소이드에 대해 페닝 (panning)하였다. 1라운드의 페닝 후에 얻은 클론을 그들의 결합 특이성에 대해 분석하였다. 특유한 클론을 확인하고 VH, DH 및 JH 이용을 지정하기 위해서 과상풍 특소이드-특이적 Fab 단편을 코딩하는 쥐 VH 유전자의 서열을 분석하였다.
- [0089] 본원에서 설명되는 많은 프로토콜은 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 및 관심있는 항원에 대한 결합을 위한 파지의 페닝을 위한 표준 프로토콜이고, 문헌 [Antibody Phage Display: Methods and Protocols (editor(s): Philippa M. O'Brien, Robert Aitken)]에 기재되어 있다.
- [0090] 면역화
- [0091] BALB/c 마우스를 과상풍 특소이드로 1회 면역화시키고, 6주 후에 과상풍 특소이드로 부스터 (booster) 처리하였다.
- [0092] 비장세포 단리
- [0093] 비장 세포 현탁액의 제조. 절개 후에, 비장을 PBS로 세척하고, 20 ml PBS가 존재하는 60 mm 페트리디쉬에 옮겼다. 20 ml PBS 및 G20 바늘이 있는 주사기를 사용하여 비장을 반복적으로 씻어내렸다. 씻어내린 세포를 PBS로 세척한 후, 20 ml PBS를 사용하여 세포를 조심스럽게 현탁액으로 만들고, 비장세포를 과쇄물 및 세포 클러스터로부터 분리하기 위해 5분 동안 벤치에 정치시켰다. 비장세포 현탁액을 Ficoll- Paque™ PLUS-충전 튜브의 상부에 옮기고, 림프구 단리를 위한 제조사의 절차에 따라 처리하였다 (아머삼 바이오사이언시스 (Amersham Biosciences)).
- [0094] RNA 단리 및 cDNA 합성
- [0095] 림프구의 단리 및 펠렛화 후에, 세포를 총 RNA의 단리를 위해 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol LS 시약 (인비트로젠 (Invitrogen))에 현탁시키고, 제조사의 절차 (인비트로젠)에 따라 dT20과 조합하여 1 µg의 RNA, Superscript III RT를 사용하여 역전사 반응에 적용하였다.

- [0096] cDNA의 PCR 증폭
- [0097] cDNA는 15개의 VH 패밀리에 속하는 대략 110개의 상이한 쥐 V-유전자의 증폭을 허용하는 프라이머 조합물을 사용하여 PCR 반응으로 증폭하였다 (표 1; RefSeq NG_005838; Thiebe et al., 1999. European Journal of Immunology 29: 2072 - 2081). 제1 라운드에서, V-유전자의 5' 말단 및 J 구역의 3' 말단에 결합하는 프라이머 조합물을 사용하였다. 제2 라운드에서, MJH-Rev2 프라이머로 생성시킨 PCR 생성물은 생성물의 효율적인 클로닝을 가능하도록 3' 구역에 변형을 도입하기 위해 증폭하였다. 마지막 증폭 라운드에서, 모든 PCR 생성물은 5' 말단에 SfiI 제한 부위를, 3' 말단에 BstEII 제한 부위를 도입하는 프라이머를 사용하여 증폭하였다 (도 1 및 2, 및 표 1 참조).
- [0098] 제1 라운드 PCR의 반응 조건: 반응당 모든 25개의 전방향 프라이머 (MVH1 내지 MVH25, 표 1 및 도 2) 및 1개의 역방향 프라이머를 조합한 4개의 상이한 반응 (MJH-Rev1, MJH-Rev2, MJH-Rev3 또는 MJH-Rev4; 표 1 및 도 2 참조). 50 μ l PCR 부피는 2 μ l cDNA (RT 반응으로부터의), 10 μ l 5^{*} Phusion 중합효소 HF 버퍼, 40 nM의 각각의 25개의 전방향 프라이머 (총 농도 1 마이크로몰), 1 마이크로몰 역방향 프라이머, 1 μ l 10 mM dNTP 원액, 1.25 단위 Phusion 중합효소 및 MQ 멸균수로 구성되었다. 열순환기 프로그램은 다음과 같은 터치 다운 (touch down) 프로그램으로 구성되었다: 1 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 30초, 30 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 10초, 58 $^{\circ}$ C (사이클당 0.2 $^{\circ}$ C씩 감온) 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초 및 1 사이클 - 72 $^{\circ}$ C 3분. 제2 라운드 PCR 프로그램은 MJH-Rev2 프라이머: 역방향 프라이머 ExtMJH-Rev2int (표 1 및 도 2)와 함께 ExtMVH-1 또는 ExtMVH-2 프라이머 (표 1 및 도 2)를 조합한 2개의 상이한 반응을 함유하는 제1 PCR 생성물에 대해서만 설정되었다. 50 μ l PCR 부피는 50 ng PCR 생성물 (제1 PCR 라운드로부터의), 10 μ l 5^{*} Phusion 중합효소 HF 버퍼, 500 nM의 각각의 전방향 프라이머, 1 마이크로몰 역방향 프라이머, 1 μ l 10 mM dNTP 원액, 1.25 단위 Phusion 중합효소 및 MQ 멸균수로 구성되었다. 열순환기 프로그램은 터치 다운 프로그램, 이어서 통상적인 증폭 단계로 구성되었다: 1 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 30초, 10 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 10초, 65 $^{\circ}$ C (사이클당 1.5 $^{\circ}$ C씩 감온) 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초, 10 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 10초, 55 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초 및 1 사이클 - 72 $^{\circ}$ C 3분. 제3 라운드 PCR 프로그램은 도 2에 제시된 바와 같이 설정하였다. 50 μ l PCR 부피는 50 ng PCR 생성물 (이전 PCR 라운드로부터의, 도 2), 10 μ l 5^{*} Phusion 중합효소 HF 버퍼, 1 마이크로몰 전방향 프라이머 (표 1 및 도 2), 1 마이크로몰 역방향 프라이머, 1 μ l 10 mM dNTP 원액, 1.25 단위 Phusion 중합효소 및 MQ 멸균수로 구성되었다. 프로그램은 터치 다운 프로그램, 이어서 통상적인 증폭 단계로 구성되었다: 1 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 30초, 10 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 10초, 65 $^{\circ}$ C (사이클당 1.5 $^{\circ}$ C씩 감온) 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초, 10 사이클 - 98 $^{\circ}$ C 10초, 55 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초 및 1 사이클 - 72 $^{\circ}$ C 3분. PCR 증폭 후에, 모든 PCR 생성물은 제조사의 프로토콜에 따라 Qiaex II를 사용하여 겔 정제하였다.
- [0099] 제한효소 소화
- [0100] 정제된 생성물을 2 단계로 BstEII 및 SfiI로 소화시켰다. 먼저, 1 μ g의 DNA를 스토브 내에서 10 μ l의 10^{*} NEB 버퍼 3 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs)), 1 μ l 100^{*} BSA, 12.5 단위 BstEII 및 멸균수로 구성된 100 μ l 반응물에서 6시간 동안 60 $^{\circ}$ C에서 소화시켰다. 생성물을 취급설명서의 지시에 따라 퀴아젠 (Qiagen)의 Qiaquick PCR 정제 키트를 사용하여 정제하고, 40 μ l 물에 용출시켰다. 이어서, 모든 생성물을 스토브 내에서 10 μ l의 10^{*} NEB 버퍼 2 (뉴 잉글랜드 바이오랩스), 1 μ l 100^{*} BSA, 12.5 단위 SfiI 및 멸균수로 구성된 100 μ l 반응물 중에서 12시간 동안 50 $^{\circ}$ C에서 SfiI로 추가로 소화시켰다. 소화된 단편을 80 V에서 20 cm 1.5% 아가로스 TBE + 에티뉼 브로마이드 겔 상에서의 겔 분리 후에 Qiaquick 겔 추출 키트에 의해 정제하였다. 100 μ g의 수용 벡터 (MV1043, 도 3 및 12)를 표준 조건 (Tango 버퍼) 하에 600 μ l 내에서 50 단위 Eco91I로 소화시킨 후, 0.9% 아가로스 겔 상에서 정제하였다. 12시간 동안 500 μ l 내에서 400 단위 SfiI를 사용한 규정된 조건 하의 제2 소화 단계 후에, 100 단위 BsrGI를 3시간 동안 50 $^{\circ}$ C에서 첨가하였다.
- [0101] 라이게이션
- [0102] 각각의 PCR 생성물을 다음 방식에 따라 별개로 라이게이션시켰다: 30 μ l 중의 70 ng 소화된 PCR 생성물, 300 ng 소화된 수용 벡터, 100 단위 T4 리가제 (NEB), 1^{*} 리가제 버퍼, 12 $^{\circ}$ C에서 16시간. 라이게이션 반응물을 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜 추출, 이어서 제조사의 프로토콜에 따른 글리코젠 침전 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich) #G1767)으로 정제한 후, 25 μ l 멸균수에 용해시켰다.
- [0103] 형질전환 및 라이브러리 보관

- [0104] 정제된 라이게이션 생성물을 라이게이션 배지당 1200 μ l TG1 전기수용성 (electrocompetent) 세균 (스트라타젠 (Stratagene) #200123)을 사용하여 전기천공에 의해 형질전환시키고, 4% 글루코스를 함유하는 LB 카르베니실린 플레이트에 도말하였다. 50 ml LB 카르베니실린에 세균을 긁어내어 라이브러리를 수거하였다. 4°C에서 20분 동안 2000g에서 원심분리한 후, 세균 펠렛을 빙수 상의 2 ml 빙냉 2^{*}TY/30% 글리세롤에 조심스럽게 재현탁시키고, -80°C에서 보관하기 전에 드라이아이스/에탄올 상에서 동결시켰다.
- [0105] 라이브러리 증폭
- [0106] 라이브러리를 성장시키고, 헬퍼 파지 균주로서 VCSM13 (스트라타젠)을 사용하여 문헌 [Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59]에 기재된 절차에 따라 수거하였다.
- [0107] 코팅된 면역시험관에서 파지의 선택
- [0108] 과상품 독소이드를 PBS에 2 μ g/ml의 농도로 용해시키고, MaxiSorp Nunc-Immuno Tube (Nunc 444474)에 4°C에서 철야 코팅하였다. 코팅 용액을 버리고, 시험관을 PBS (차단 버퍼) 중의 2% 탈지유 (ELK)로 1시간 동안 RT에서 차단하였다. 이와 함께, 0.5 ml의 파지 라이브러리를 1 ml 차단 버퍼와 혼합하고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 파지의 차단 후에, 파지 용액을 과상품 독소이드 코팅된 시험관에 첨가하고, 결합시키기 위해 서서히 회전하는 플랫폼 상에서 2시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 이어서, 시험관을 PBS/0.05% Tween-20으로 10회 세척한 후, 회전 휠 상에서 1 ml 50 mM 글라이신-HCl (pH 2.2)과 10분 동안 RT에서 인큐베이션하는 파지 용출, 바로 이어서 수거된 용리액의 0.5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)을 사용한 중화를 수행하였다.
- [0109] 파지 클론의 수거
- [0110] O.D. 0.4의 5 ml XL1-Blue MRF (스트라타젠) 배양액을 수거된 파지 용액에 첨가하고, 파지를 감염시키기 위해서 진탕하지 않으면서 30분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세균을 카르베니실린/테트라사이클린 4% 글루코스 2^{*}TY 플레이트에 도말하고, 37°C에서 철야 성장시켰다.
- [0111] 파지 생산
- [0112] 파지를 성장시키고, 헬퍼 파지 균주로서 VCSM13을 사용하여 문헌 [Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59]에 기재된 바와 같이 처리하였다.
- [0113] 파지 ELISA
- [0114] ELISA 플레이트를 PBS 중의 2 μ g/ml의 농도로 웰당 100 μ l 과상품 독소이드로 4°C에서 철야 코팅하였다. PBS 중의 2 μ g/ml의 농도로 100 μ l 갑상선글로불린으로 코팅된 플레이트를 음성 대조군으로 사용하였다. 웰을 비우고, 종이 타월에 가볍게 두드려 건조시키고, PBS-4% 탈지유 (ELK)로 완전히 채우고, 웰을 차단하기 위해서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 차단 용액을 버린 후, 50 μ l 차단 용액과 미리 혼합한 파지 미니프렙 (miniprep)을 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, PBS-0.05% Tween-20으로 5회 세척하여 미결합된 파지를 제거하였다. 결합된 파지는 웰을 100 μ l 항-M13-HRP 항체 접합체 (차단 버퍼에 1/5000로 희석)와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션함으로써 검출하였다. 유리 항체는 상기한 바와 같은 세척 단계를 반복하여 제거하고, 발색이 가시화될 때까지 TMB 기질 인큐베이션을 수행하였다. 웰당 100 μ l의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시키고, 450 nm 방출 파장에서 ELISA 판독기로 분석하였다 (표 2). 보다 높은 수는 신호가 더 강함을 나타내고, 따라서 파지-Fab 복합체의 특이적 결합의 발생률이 더 높음을 나타낸다.
- [0115] 서열결정
- [0116] 배경 신호보다 적어도 3배의 신호를 생성시킨 클론 (표 2)을 증식시키고, DNA 미니프렙 절차 (절차는 퀴아겐 미니프렙 취급설명서 참조)에 사용하고, 뉴클레오티드 서열 분석을 수행하였다. 서열결정은 인간 IgG1 중쇄의 CH1 구역의 5' 서열 (Fab 디스플레이 벡터 MV1043에 존재, 도 3 및 12)을 인식하는 역방향 프라이머 (CH1_Rev1, 표 1)를 사용하여 빅 다이 (Big Dye) 1.1 키트 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems))에 동봉된 취급설명서에 따라 수행하였다. 28개의 과상품 독소이드 결합 클론의 마우스 VH 서열을 표 3에 제시한다. 그 결과는 선택된 쥐 VH 유전자가 상이한 유전자 패밀리에 속하고, 상기 유전자 패밀리의 상이한 개별적인 멤버가 인간 IGKV1-39/J VH 구역과 페어링하여 기능적 과상품 독소이드-특이적 항체 결합 부위를 형성할 수 있음을 보여준다. 서열 분석으로부터, 쥐 VH 구역이 다양한 DH 및 JH 유전자 세그먼트를 이용한다고 결론내렸다.

- [0117] 실시예 3
- [0118] 마우스 카파 경쇄 로커스의 사일런싱
- [0119] 본 실시예는 마우스 내인성 카파 경쇄 로커스의 사일런싱을 설명한다. 내인성 카파 로커스는 ES 세포에서 상동성 재조합에 의해 변형된 후, 유전적으로 변형된 자손을 얻기 위해 유전적으로 변형된 ES 세포를 마우스 배아에 도입하였다.
- [0120] 3' CK 인헨서의 3'에서 끝나는 서열에 융합된 J5 유전자 세그먼트의 338 bp 하류에 J-구역을 포함하는 부분으로 구성되는 조립된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터가 ES 세포에서 상동성 재조합을 위해 사용되었다. 조립된 서열은 JK 구역의 3'으로부터 3' CK 인헨서의 3'까지 이어지는 게놈 DNA 단편을 삭제하기 위해 사용되었다. 상기 절차에 의해, CK 불변 유전자, 3' 인헨서 및 몇몇 유전자간 구역이 삭제되었다 (도 4 및 18 참조).
- [0121] 표적화 벡터의 제조
- [0122] 결실 세그먼트에 융합된 3' 및 5' 말단 상에 4.5-8 kb의 측면에 접하는 아암 (arm)을 수용하는 벡터를 ES 세포주에서 표적화된 상동성 재조합을 위해 사용하였다. 두 아암은 최대 상동성을 보장하는 PCR 수단에 의해 얻었다. 표적화 전략은 구성적 KO 대립유전자의 생성을 허용한다. Igk 인트론 인헨서, Igk 불변 구역 및 Igk 3' 인헨서를 포함하는 마우스 게놈 서열을, F3 부위가 측면에 접하고 Jk 요소의 하류에 삽입된 PuroR 카세트로 대체하였다. 선택 마커의 F1p-매개 제거를 통해 구성적 KO 대립유전자를 얻었다. Igk MiEk-Igk C-Igk 3'E 게놈 구역 (약 10 kb)을 F3-Puro 카세트 (약 3 kb)로 대체하면, 상동성 재조합의 효율이 감소할 가능성이 있었다. 따라서, 상동성의 아암을 연장하고, 상동성 재조합 클론을 확인하기 위해 보다 많은 ES 세포 콜로니를 형질감염 후에 분석하였다.
- [0123] 결실된 카파 단편을 보유하는 ES 세포의 생성
- [0124] 유전적으로 변형된 ES 세포의 생성은 본질적으로 문헌 [Seibler et al. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15;31(4):e12]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 또한, 상세한 설명에 대해서는 실시예 14를 참조한다.
- [0125] 사배체 배아 보완 (complementation)에 의한 ES 마우스의 생성
- [0126] 유전적으로 변형된 ES 세포를 사용한 사배체 배아 보완에 의한 마우스의 생산은 본질적으로 문헌 [Eggan et al., PNAS 98, 6209-6214]; [Seibler J, et al. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15;31(4):e12]; [Hogan et al., (Summary of mouse development. Manipulating the Mouse Embryo, (1994) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.), pp. 253-289]에 기재된 바와 같이 수행하였다.
- [0127] 실시예 4
- [0128] 마우스 람다 경쇄 로커스의 사일런싱
- [0129] 본 실시예는 마우스 내인성 람다 경쇄 로커스의 사일런싱을 설명한다. 내인성 람다 로커스는 ES 세포에서 상동성 재조합에 의해 변형된 후, 유전적으로 변형된 자손을 얻기 위해 유전적으로 변형된 ES 세포를 마우스 배아에 도입하였다.
- [0130] 함께 모든 기능적 람다 V 구역을 포함하는 쥐 람다 로커스의 2개의 구역을 제거하였다.
- [0131] 상동성 재조합-기반 제거를 위해 표적화된 제1 구역은 IGLV2 유전자 세그먼트의 출발 부위의 408 bp 상류에 위치하고 IGLV3 유전자 세그먼트의 215 bp 하류에서 끝나는, 상기 IGLV 유전자 세그먼트 사이의 유전자간 서열 스트레치 (stretch)를 포함하는 구역이다. 제거가 수행되는 제2 구역은 IGLV1 유전자 세그먼트의 392 bp 상류로부터 171 bp 하류까지 이어지는 단편으로 구성된 IGLV1 유전자 세그먼트를 포함한다. 상기 2개의 삭제 단계에 의해, 모든 기능적 V-람다 유전자 세그먼트가 삭제되어, 로커스를 기능적으로 불활성화되도록 만들었다 (도 5 및 19).
- [0132] 표적화 벡터의 제조
- [0133] 결실 세그먼트에 융합된 3' 및 5' 말단 상에 3-9.6 kb의 측면에 접하는 아암을 수용하는 벡터를 ES 세포주에서 표적화된 상동성 재조합을 위해 사용하였다. 두 아암은 최대 상동성을 보장하는 PCR 수단에 의해 얻었다. 제1 단계에서, Igl V2-V3 구역을 포함하는 마우스 게놈 서열을, F3 부위가 측면에 접하는 PuroR 카세트로 대체하여, 선택 마커의 F1p-매개 제거 후에 구성적 KO 대립유전자를 얻었다 (도 19a 참조). 제2 단계에서, Igl V1 구역을 포함하는 마우스 게놈 서열을, Igl V2-V3 구역이 이미 삭제된 ES 세포 클론에서 Neo 카세트로 교체하였다 (도

- [0144] 실시예 6
- [0145] 재배열된 생식계열 IGLV2-14/J V 램다 구역 (IGLV2-14/J-Ck)를 기초로 한 CAGGS 발현 삽입물
- [0146] 본 실시예는 재배열된 생식계열 IGLV2-14/J V 램다 구역을 포함하는 발현 카세트의 서열 및 삽입에 대해 설명한다. 상기 삽입물은 클로닝 부위, Kozak 서열, 인트론을 포함하는 리더 서열, 재배열된 IGLV2-14/J 구역의 개방해독 프레임, 대립유전자 a로부터의 래트 CK 불변 구역 및 번역 중지 서열을 포함한다 (IGLV2-14/J-Ck; 도 7). 1차 구성체는 천연 생성 서열로 구성되고, 분석되고, 바람직하지 않은 시스 작용 요소, 예를 들어 내부 TATA-박스, 폴리아데닐화 신호, 카이 부위, 리보솜 도입 부위, AT-풍부 또는 GC-풍부 서열 스트레치, ARE-, INS- 및 CRS 서열 요소, 반복 서열, RNA 2차 구조, (잠재) 스플라이스 공여자 및 수용자 부위 및 스플라이스 분지점 (진아트 게엠베하)을 제거함으로써 최적화되었다. 또한, 개방해독 프레임 구역 내의 코돈 사용 빈도는 마우스에서의 발현을 위해 최적화된다. 인트론 서열은 변하지 않고, 따라서 인간 IGKV1-39 리더 인트론에 동일한 서열을 나타낸다.
- [0147] 발현 카세트의 5' 말단에 NotI 부위를 도입하고, 3' 부위에는 NheI 부위를 도입하였다. 두 부위는 타코닉아르테미스 (TaconicArtemis)에 의해 설명된 바와 같이 CAGGS 발현 모듈에서 클로닝을 위해 사용된다. 진아트에 의해 사용된 방법에 따른 유전자 조립 후에, 삽입물을 NotI-NheI로 소화시키고, CAGGS 프로모터, LoxP 부위가 측면에 접하는 중지 서열 ('floxed'), 폴리아데닐화 신호 서열, 및, 5' 및 3' 말단에 마우스 ES 세포주의 Rosa26 로커스 내로의 상동성 재조합을 용이하게 하는 서열을 포함하는 발현 모듈 내로 클로닝하였다. 최종 ROSA26 RMCE 표적화 벡터를 제조하기 위해서, 프로모터 및/또는 cDNA 단편을 PCR에 의해 증폭하였다. 증폭 생성물을 서열결정에 의해 확인하고/하거나 전달된 플라스미드로부터 표시된 특징을 갖는 RMCE 교환 벡터 내로 직접 클로닝하였다. 최종 표적화 벡터 pCAGGS-IgVL2-14의 개략도 및 확인된 서열을 도 15a 및 15b에 제시한다. 표적화 전략은 도 15c에 도시한다.
- [0148] 실시예 7
- [0149] HEK293 세포주에서 IGKV1-39/J-Ck의 발현 (pSELECT-IGKV1-39/J-Ck)
- [0150] 본 실시예는 실시예 5에서 설명된 IGKV1-39/J-Ck 구성체가 HEK293 세포에서 IGKV1-39/J-Ck L쇄를 발현 및 검출할 수 있는지를 확인하는 방법에 대해 설명한다. IGKV1-39/J 삽입물 (도 6)을, NotI 부위를 SalI 부위로 변경함으로써 5' 말단에서 변형하였다. 상기 변경은 생성물을 발현 카세트 플라스미드 pSELECT-hygro (인비보젠 (InvivoGen)) 내로 클로닝하기 위해 필요하다. CAGGS 발현 삽입물 IGKV1-39/J-Ck 및 pSELECT-hygro를 SalI 및 NheI으로 소화하고, 라이게이션시키고, 표준 기술을 사용하여 전능성 XL1-Blue 세포의 형질전환을 위해 사용하였다. 콜로니를 수거하고, 제조사의 절차에 따라 퀴아겐 Midi-prep 컬럼을 사용하여 DNA를 정제하였다. 생성되는 경쇄 (LC) 발현 벡터, 즉 0817676_pSELECT_0815426을 제조사의 프로토콜에 따라 Fugene6 (로슈 (Roche))를 사용하여 HEK293 세포를 형질감염시키기 위해 사용하였다. 상등액을 항-래트-Ck 항체 (벡톤 디킨슨 (Beckton Dickinson) #550336 및 553871)를 사용한 ELISA 및 웨스턴 블롯 및 당업계에서 사용되는 프로토콜에 의해 IGKV1-39/J-Ck 경쇄의 존재에 대해 스크리닝하였다.
- [0151] 항-과상풍 특소이드 (TT) IgG MG1494의 VH를 제한 부위 SfiI 및 BstEII를 사용하여 IgG 발현 벡터 MV1056 내로 클로닝하였다. 생성되는 클론의 서열을 확인하였다. HEK293T 세포를 표 4에 제시된 5개의 상이한 벡터 조합물로 형질감염시켰다 (벡터 0817678_pSELECT_0815427의 상세한 내용에 대해서는 실시예 8 참조). 상등액을 수거하고, IgG 농도를 결정하였다 (표 4 참조). 예상되는 바와 같이 경쇄만을 함유하는 상등액 A 및 B에 대해 어떠한 IgG도 검출될 수 없었다 (검출 항체는 IgG의 Fc 부분을 인식하였다). 상등액 C 및 D 내의 IgG 농도는 양성 대조군 상등액 E의 농도와 대등하였고, 이것은 경쇄 구성체의 적절한 발현을 나타낸다.
- [0152] TT에 대한 결합은 음성 대조군 항원으로서 헤모글로빈을 사용하여 생산된 항체의 기능성을 조사하기 위해 ELISA로 분석하였다. 예상되는 바와 같이 경쇄만을 함유하는 상등액 A 및 B에 대해 어떠한 TT-특이적 결합도 검출될 수 없었다. 상등액 C 및 D에 대한 TT-특이적 결합은 적어도 양성 대조군 상등액 E에 대해서만큼 양호하였고, 이를 통해 경쇄 구성체의 적절한 발현 및 중쇄와의 기능적 조립을 확인할 수 있다. 항체는 항-인간 IgG 2차 항체뿐만 아니라 항-래트 C카과 경쇄 2차 항체를 사용하여 검출되었다. 이 결과를 통해, 항-래트 C카과 항체 (비디 파밍겐 (BD Pharmingen) #553871, 클론 MRK-1)가 pSELECT 벡터에 의해 발현된 경쇄를 인식한다는 것을 확인하였다.
- [0153] 상등액은 비-환원성 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 (제시되지 않음)에 의해 분석하였다. 항-인간 IgG 중쇄 항체를 사용한 검출은 예상되는 바와 같이 경쇄만을 함유하는 상등액 A 및 B에 대한 밴드를 보이지 않았다. 상등액 C

및 D에 대한 결과는 양성 대조군 상등액 E와 대등하였고, 한 밴드는 무손상 IgG에 대해 예상되는 170 kD 마커와 근접하였다. 추가의 더 낮은 분자량 밴드가 상등액 C, D 및 E에 대해서도 관찰되었고, 이것은 분해 생성물, (부분적인) 환원에 의한 IgG 단편 및/또는 검출 항체의 비-특이적 결합에 의한 무관한 단백질 밴드를 나타낼 수 있다.

[0154] 항-랫트 C카과 경쇄 항체를 사용한 검출은 단지 경쇄에 대해 예상되는 바와 같이 상등액 A 및 B에 대한 26 kD 마커에 근접한 밴드를 보였다. 상기 밴드는 B보다 A에 대해 훨씬 더 강하였고, 이것은 유리 IGKV1-39 경쇄가 유리 IGLV2-14 경쇄보다 더 우수하게 발현되고/되거나 더 안정할 수 있음을 나타낸다. 예상되는 바와 같이 대조군 상등액 E에 대해 어떠한 밴드도 검출되지 않았고, 이것은 발현된 IgG가 인간 C카과 경쇄를 함유하기 때문이다. 상등액 C 및 D에 대해, 170 kD 마커에 근접한 예상된 밴드가 관찰되었고; 보다 낮은 분자량 밴드도 관찰되었지만, 항-인간 IgG 항체 사용시보다 더 낮은 수준이었다.

[0155] 결론적으로, 항-과상풍 특소이드 (TT) IgG MG1494의 중쇄와 조합된 경쇄 발현 구성체의 형질감염은 pSELECT 카과 및 랫다 경쇄 구성체 모두에 대해 양성 대조군 구성체에 대등한 IgG 생산을 유발하였다. 두 IgG 생산은 TT ELISA에서 대조군 IgG보다 우수하거나 대등한 ELISA 신호를 생성하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 무손상 IgG의 존재를 확인하였다. 시험된 항-랫트 C카과 항체는 ELISA 및 웨스턴 블롯 모두에서 효율적으로 작용하였다. 경쇄 구성체만으로 형질감염된 세포로부터의 배양 상등액은 검출가능한 IgG 생산 또는 검출가능한 TT-특이적 결합을 보이지 않은 반면, 유리 경쇄는 웨스턴 블롯에서 검출되었다.

[0156] 실시예 8

[0157] HEK293 세포주에서 IGLV2-14/J-Ck의 발현 (pSELECT-IGLV2-14/J-Ck)

[0158] 본 실시예는 실시예 6에서 설명된 IGLV2-14/J 구성체가 HEK293 세포에서 IGLV2-14/J-Ck L쇄를 발현 및 검출할 수 있는지를 확인하는 방법에 대해 설명한다. IGLV2-14/J-Ck 삽입물 (도 7)을, NotI 부위를 SalI 부위로 변경함으로써 5' 말단에서 변형하였다. 상기 변경은 생성물을 발현 카세트 플라스미드 pSELECT-hygro (인비보겐) 내로 클로닝하기 위해 필요하다. CAGGS 발현 삽입물 IGLV2-14/J-Ck 및 pSELECT-hygro를 SalI 및 NheI으로 소화하고, 라이게이션시키고, 표준 기술을 사용하여 전능성 XL1-Blue 세포의 형질전환을 위해 사용하였다. 콜로니를 수거하고, 제조사의 절차에 따라 퀴아젠 Midi-prep 컬럼을 사용하여 DNA를 정제하였다. 생성되는 경쇄 (LC) 발현 벡터, 즉 0817678_pSELECT_0815427을 제조사의 프로토콜에 따라 Fugene6 (로슈)를 사용하여 HEK293 세포를 형질감염시키기 위해 사용하였다. 상등액을 항-랫트-Ck 항체 (벡톤 디킨슨 #550336 및 553871)를 사용한 ELISA 및 웨스턴 블롯 및 당업계에서 사용되는 프로토콜에 의해 IGLV2-14/J-Ck 경쇄의 존재에 대해 스크리닝하였다. 상세한 설명 및 결과에 대해서는 실시예 7을 참조한다.

[0159] 실시예 9

[0160] IGKV1-39/J 삽입물 및 쥐 CK 로커스로부터 유도된 다수의 인핸서 요소를 함유하는 VK 프로모터-유도 발현 구성체 (VkP-IGKV1-39/J-Ck; VkP-012)의 제조

[0161] 본 실시예는 IGKV1-39 VK 프로모터 구역, 인트론을 포함하는 리더, 생식계열 V-유전자, CDR3, IGKJ 세그먼트, Jk와 CK 사이에 위치하는 마우스 유전자간 구역, 랫트 Ck 대립유전자 a 개방 해독 프레임, 및 마우스 CK 유전자의 3' 말단으로부터 3'CK 인핸서의 3'에서 끝나는 마우스 유전자간 단편을 기초로 하는, 재배열된 인간 IGKV1-39 VK 구역의 B-세포 및 발달/분화 단계-특이적 발현을 가능하게 하는 관련 요소를 포함하는 발현 카세트의 제조에 대해 설명한다.

[0162] 실시예 5에서 설명한 바와 같이 리더, IGKV1-39 재배열된 유전자, 및 랫트 CK 대립유전자 a 유전자의 최적화된 개방 해독 프레임을 발현 카세트의 제조에 사용하였다. VK 프로모터 구역은 유전자 합성 절차 (진아트 게엠베하)에 의해 얻었고, 유전자의 -500 bp와 ATG (출발 부위) 사이의 인간 IGKV1-39 구역의 서열과 거의 동일하다. 천연 서열과의 유일한 차이는 번역을 촉진하기 위해 ATG (출발) 부위에 GCCACCATGG Kozak 서열을 도입한 것이다. 마우스 BAC 클론 (타코닉아르테미스)로부터의 게놈 단편이 개개의 요소의 도입을 위한 기초로서 사용된다. 상기 단편은 JK5 구역의 3'에 바로 위치하는 인트론 공여자 부위에서 시작하여 3'CK 인핸서의 3'에서 끝나는 마우스 VK 로커스의 서열과 동일하고, 대략 12.5 kb에 해당한다.

[0163] 최종 구성체는 5' 단부로부터 3' 단부의 방향으로 다음 요소를 포함한다: 인간 게놈 IGKV1-39 프로모터 (500 bp), Kozak 서열, 인간 IGKV1-39 리더 부분 1 (최적화됨), 인간 IGKV1-39 리더 부분 2 (최적화됨), 인간 IGKV1-39 생식계열 유전자 (최적화됨), 인간 J-구역 (최적화됨), 인트론 인핸서 요소를 포함하는 마우스 유전자간 구역, 랫트 (라투스 노르베기쿠스 (Rattus norvegicus)) 카과 불변 구역 (최적화됨),

및 3' 카파 인헨서를 포함하는 마우스 유전자간 구역. 상기 발현 카세트의 요소를 도 8에 제시하고, VkP-IGKV1-39/J-Ck (VkP-012)로 명명한다. pVkP-012 벡터 및 표적화 계획에 대한 개요를 도 20a 및 21a에 도시한다. 벡터는 표준 절차에 따라 ES 세포 내로 도입하였다 (실시예 14 참조).

- [0164] 실시예 10
- [0165] IGLV2-14/J 클론 및 다수의 CK 로커스-유도 인헨서 요소를 함유하는 VK 프로모터-유도 발현 구성체 (VkP-IGLV2-14/J-Ck; VkP-2a2)의 제조
- [0166] 본 실시예는 IGKV1-39 유전자 및 J-구역이 특유한 V-J 구역을 포함하는 최적화된 인간 IGLV2-14 생식계열 유전자로 교체된 것을 제외하고는 실시예 9에서 설명된 바와 동일한 구성체 (VkP-IGLV2-14/J-Ck; VkP-2a2; 도 9)에 대해 설명한다.
- [0167] 실시예 11
- [0168] CK 인트론 인헨서 요소가 결합된 IGKV1-39 클론을 포함하는 VK 프로모터-유도 발현 구성체 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1; VkP-012-de11)의 제조
- [0169] 실시예 9에서 설명된 구성체를, 표준 PCR 변형 및 DNA 클로닝 방법 (진아트 게임베하)에 의해 인간 J 구역과 래트 CK 구역 사이의 유전자간 구역에 위치한 CK 인트론 인헨서 요소를 제거함으로써 변형하였다. 생성되는 발현 카세트를 도 10에 도시하고, VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 1 (VkP-012-de11)로 명명한다.
- [0170] pVkP-012-de11 벡터 및 표적화 계획에 대한 개요를 도 20b 및 21b에 도시한다. 벡터는 표준 절차에 따라 ES 세포 내로 도입하였다 (실시예 14 참조).
- [0171] 실시예 12
- [0172] CK 인트론 인헨서 요소 및 말단절단된 3' CK 인헨서 요소가 결합된 IGKV1-39 클론을 포함하는 VK 프로모터-유도 발현 구성체 (VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 2; VkP-012-de12)의 제조
- [0173] 실시예 11에서 설명된 구성체를, 3' CK 인헨서 요소를 말단절단하고 잠재적인 억제 요소를 제거하기 위해서 래트 Ck 유전자의 3'에 위치하는 유전자간 구역의 일부를 제거함으로써 변형하였다. 이것은 표준 방법을 사용하여 EcoRV 부위 (래트 Ck 유전자의 3'에 위치함)와 3' 인헨서 (5993 bp) 내에 존재하는 NcoI 부위 사이의 유전자간 서열을 제거하고 3' 인헨서 BstXI 부위와 3' 인헨서 (474 bp)의 3'에 위치하는 BstXI 부위 사이의 서열을 추가로 제거함으로써 수행하였다. 생성되는 발현 카세트를 도 11에 제시하고, VkP-IGKV1-39/J-Ck- Δ 2 (VkP-012-de12)로 명명한다.
- [0174] pVkP-012-de12 벡터 및 표적화 계획에 대한 개요를 도 20c 및 21c에 도시한다. 벡터는 표준 절차에 따라 ES 세포 내로 도입하였다 (실시예 14 참조).
- [0175] 실시예 13
- [0176] 세포주에서 Vk 구성체의 발현
- [0177] 실시예 9-12에서 설명된 구성체를 골수종 세포주 MPC11 (ATCC CCL167), B-세포 림프종 WEHI231 (ATCC CRL-1702), T-세포 림프종 EL4 (ATCC TIB-39) 및 HEK293 (ATCC CRL1573)에서 경쇄 단백질을 생산하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 구성체 내의 인헨서 및 프로모터 요소는 다른 조직으로부터 유도된 세포주가 아니라 B-세포주에서의 발현을 가능하게 한다. 정제된 선형화된 DNA 및 Fugene6 (로슈)을 사용한 세포주의 형질감염 후에 세포를 일시 발현을 위해 배양하였다. 세포 및 상등액을 수거하고, SDS-PAGE 분석에 적용한 후, 특이적 항-래트-C-카파 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 상등액을 항-래트 CK 항체 (백톤 디킨슨 #550336)를 사용하여 분비된 L쇄에 대해 ELISA로 분석하였다.
- [0178] 실시예 14
- [0179] 트랜스제닉 ES 주의 생성
- [0180] 실시예 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 및 12에서 설명된 모든 구성체를 사용하여 상동성 재조합에 의해 개개의 안정한 트랜스제닉 ES 주를 생성시켰다. 상동성 재조합을 통한 트랜스제닉 ES 주의 생성을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Eggan et al., PNAS 98, 6209-6214]; [Seibler J, Zevnik B, Kueter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kuehn R, Schwenk F. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15;31(4):e12]; [Hogan et al. (Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.), pp. 253-289]).

- [0181] 실시예 5-6, 및 실시예 9-12에서 설명된 모든 구성체에 대해, RMCE ES 세포주 (마우스 주 129S6B6F1-Gt(Rosa)26Sortm10Arte로부터 유도됨)를 15% FBS를 함유하는 DMEM 고 글루코스 배지 (PAN 1302-P220821) 내에서 마우스 배아 섬유모세포 (MEF)로 이루어진 유사분열 불활성화된 영양세포층 상에서 성장시켰다. 백혈병 억제 인자 (케미콘 (Chemicon) ESG 1107)를 900 U/mL의 농도로 배지에 첨가하였다. 조작을 위해, 2×10^5 개의 ES-세포를 3.5 cm 접시의 2 ml 배지에 도말하였다. 형질감염 직전에, 2 ml의 신선 배지를 세포에 첨가하였다. 3 μ l Fugene6 시약 (로슈; 카탈로그 번호 1 814 443)을 100 μ l 혈청 미함유 배지 (Glutamax I가 존재하는 OptiMEM I; 인비트로젠; 카탈로그 번호 51985-035)와 혼합하고, 5분 동안 인큐베이팅하였다. 100 μ l의 Fugene/OptiMEM 용액을 2 μ g 환상 벡터 및 2 μ g CAGGS-Flp에 첨가하고, 20분 동안 인큐베이팅하였다. 상기 형질감염 복합체를 세포에 적가하고, 혼합하였다. 신선 배지를 다음날 세포에 첨가하였다. 제2일 이후에, 배지를 매일 250 μ g/mL G418 (제네티신; 인비트로젠; 카탈로그 번호 10131-019)을 함유하는 배지로 교체하였다. 형질감염 7일 후에, 단일 클론을 단리하고, 팽창시키고, 분자를 표준 절차에 따라 서던 블로팅으로 분석하였다.
- [0182] 각각의 구성체에 대해, 단일 클론의 게놈 DNA의 제한효소 소화에 의한 다수 클론의 분석, 이어서 5' 프로브, 3' 프로브, 및 내부 프로브와의 혼성화를 통해 Rosa26 로커스 내의 적정 위치에 적정한 단일 삽입을 포함하는 클론을 생성하였다. 그 예는 도 14에 제시된다.
- [0183] 실시예 15
- [0184] 트랜스제닉 마우스주의 생성
- [0185] 실시예 14에서 설명된 바와 같이 생성되고 그들의 변형에 대해 확인된 모든 ES 세포주를, 사배체 재조합에 의해 안정한 트랜스제닉 마우스를 생성하기 위해 사용하였다. 그 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 호르몬의 투여 후에, 과배란된 Balb/c 암컷을 Balb/c 수컷과 교배시켰다. 포배를 dpc 3.5에 자궁으로부터 분리하였다. 미세주사를 위해, 포배를 광유 아래의 15% FCS와 함께 DMEM의 소적에 놓았다. 내경이 12 - 15 마이크로미터이고 끝이 평평한 피에조 구동 방식의 (piezo actuated) 미세주사-피펫을 10-15개의 표적화된 C57BL/6 N.tac ES 세포를 각각의 포배 내로 주사하기 위해 사용하였다. 회수 후에, 주사된 포배를 교배 2.5일 후의 위 임신 NMRI 암컷의 각각의 자궁각에 옮겼다. 키메라 현상 (chimerism)은 Balb/c 숙주 (흑/백)에 대한 ES 세포의 외피 색상 기여도에 의해 키메라 (G0)에서 측정하였다. 키메라도가 높은 마우스를 C57BL/6 암컷과 교배시켰다. 계획의 필요성에 따라, 마우스주 C57BL/6 교배 파트너는 재조합효소 유전자 (Flp-딜리터 (deleter) 또는 Cre-딜리터 또는 CreER 유도가능 딜리터 또는 Flp-딜리터/CreER의 조합)의 존재에 대한 비-돌연변이체 (W) 또는 돌연변이체이다. 생식계열 전달은 흑색의 마우스주 C57BL/6, 자손 (G1)에 의해 확인되었다.
- [0186] 예를 들어, ESC 클론 IgVK1-39 2683 8 (실시예 5 및 14 참조)을 3회의 독립적인 실험에서 총 62개의 포배에 주사하였다. 3마리의 동배새끼를 포함하여 총 6마리의 새끼를 얻었다. 모든 새끼는 키메라이었다. 3마리의 이중접합성 자손 새끼를 얻고, 추가의 교배를 위해 사용하였다.
- [0187] ESC 클론 카파 2692 A-C10 (실시예 3 및 14 참조)을 3회의 독립적인 실험에서 총 54개의 포배에 주사하였다. 3마리의 동배새끼를 포함하여 총 11마리의 새끼를 얻었고, 이 중에서 10마리는 키메라이었다. 8마리의 이중접합성 자손 새끼를 얻고, 추가의 교배를 위해 사용하였다.
- [0188] ESC 클론 카파 2692 B-C1 (실시예 3 및 14 참조)을 3회의 독립적인 실험에서 총 51개의 포배에 주사하였다. 2마리의 동배새끼를 포함하여 총 6마리의 새끼를 얻었고, 이 중에서 4마리는 키메라이었다. 3마리의 이중접합성 자손 새끼를 얻고, 추가의 교배를 위해 사용하였다.
- [0189] 실시예 16
- [0190] 번식
- [0191] 본 실시예는 실시예 14에서 설명된 트랜스제닉 발현 카세트를 포함하는 마우스 및 내인성 람다 및 카파 로커스가 사일런싱되는 낙아웃 마우스를 얻기 위한 번식에 대해 설명한다. 염색체 16 상의 V-람다 및 염색체 7 상의 CD19의 편제를 통해 표준 번식 절차를 수행할 수 있다. 약 24 cM의 거리로 염색체 6 상에 공동 편제된 Vk 로커스 및 Rosa26 로커스의 번식은 단지 일부의 자손만이 두 변형이 하나의 염색체 상에서 함께 발생하는 방식으로 교차를 보이기 때문에 스크리닝 동안 특별히 유의해야 한다.
- [0192] 4개의 모든 로커스는 CD19-cre (설명하지 않음) 및 변형된 Rosa26 트랜스젠에 동중접합성 또는 이중접합성이고

다른 로커스에 동종접합성인 단일 마우스 주에서 조합되어야 한다. 번식은 상업적인 번식 회사 (예를 들어 타코닉아르테미스)에 의해 제공되는 적절한 표준 번식 및 스크리닝 기술에 의해 수행된다.

- [0193] 실시예 17
- [0194] 마우스의 면역화
- [0195] 마우스의 1차 및 부스터 면역화는 표준 프로토콜을 이용하여 수행한다.
- [0196] CD19-HuV κ 1 마우스로부터의 B 세포에서 인간 재배열된 V κ 012 (IGKV1-39) - 래트 C κ 경쇄 (실시예 5, 14-16 참조)의 트랜스제닉 발현을 확인하고 면역화 후에 VH 레퍼토리 크기, VH 패밀리를 사용한 다양성 및 V(D)J 재조합에 대한 그의 영향을 평가하기 위해, CD19-HuV κ 1 트랜스제닉 마우스를 파상풍 독소이드 백신 (TT 백신)으로 면역화시키고, CD19-HuV κ 1 마우스로부터 무작위로 선발된 클론의 VH 서열 다양성을 TT-면역화 wt 마우스 및 CD19-Cre HuV κ 1 음성 동배새끼와 비교하였다. 면역화시킨 마우스에서 인간 V κ 012 트랜스젠의 SHM 빈도에 대한 데이터를 얻었다. 인간 V κ 012를 포함하는 적어도 40개의 TT-특이적이고 클론상 비관련된 mAb의 다양한 컬렉션을 파지 디스플레이에 의해 CD19-HuV κ 1 마우스로부터 회수하였다.
- [0197] 이를 위해, 3마리의 성체 CD19-HuV κ 1 마우스를 표준 면역화 절차를 사용하여 TT 백신으로 면역화하였다. 면역화 후에, 혈청 역가를 TT 특이적 ELISA (TT: 스타텐스 세럼 인스티튜트 (Statens Serum Institute), Art. no. 2674)를 사용하여 측정하고, 비장 현탁액을 트랜스제닉 B 세포를 분리하기 위해 래트 C κ -특이적 모노클로날 항체 (클론 RG7/9.1; 비디 파밍겐# 553901, Lot# 06548)로 염색한 후 FACS 절차에 의한 세포 분류에 적용하였다. 래트 C κ -양성 B 세포로부터의 RNA를 추출하고, 생성되는 cDNA 물질을 라이브러리 구축 및 SHM 분석에 사용하였다.
- [0198] 표준 모노클로날 마우스 항-래트 C κ 항체 (클론 RG 7/9.1; 비디 파밍겐# 553901, Lot# 06548)를 B 세포를 발현하는 트랜스젠의 FACS 분석에 사용하였다 (Meyer et al., 1996, Int. Immunol., 8: 1561). 클론 RG7/9.1 항체는 단형 (monotypic) (공통적인) 카파 사슬 결정자와 반응한다. 상기 항-래트 C κ 항체 (클론 RG7/9.1 (비디 파밍겐# 553901, Lot# 06548)를 FACS 분석 및 분류를 위해 제조사의 지시에 따라 LYNX 신속 접합 키트를 사용하여 R-피코에리트린 (PE)으로 표지하였다. 표지된 항체는 일시 형질감염된 HEK-293T 세포 내에서 생산된 래트 C κ -함유 기능적 경쇄 단백질에 대한 결합에 대해 유동 세포 측정에 의해 먼저 시험하였고; 비-접합된 항체는 양성 대조군으로 기능하였다. ELISA 및 웨스턴-블롯에 의해 래트 C κ 에 결합하는 것으로 밝혀진 2개의 다른 항체 (실시예 7 참조)도 유동 세포 측정에 의해 시험하였다.
- [0199] Fab-파지 디스플레이 라이브러리 구축은 C57BL/6 VH 유전자의 증폭을 위해 설계된 최적화된 축퇴성 (degenerate) PCR 프라이머의 세트를 사용하여 수행하고; 최소 라이브러리 크기는 10⁶개의 클론이고, 최소 삽입 빈도는 80%이었다. 사용된 벡터 MV1043 (도 3 및 12)는 인간 C κ 구역에 융합된 인간 V κ 012를 포함하였다. 따라서, 래트 C κ 는 라이브러리 생성 과정에서 인간 상대물로 교체된다.
- [0200] 선택 전에, 96개의 무작위로 선발된 클론의 VH 서열결정은 TT로 면역화시킨 BALB/c 마우스로부터 동일한 절차를 사용하여 이전에 생성된 비선택된 라이브러리로부터 얻은 다양성에 비교되는 VH 레퍼토리 다양성을 확인하기 위해 수행하였다. 동일한 방식으로 면역화시킨 C57B1/6 wt 마우스로부터의 라이브러리를 사용하여 동일한 백신 및 동일한 유전적 배경을 공유하는 2개의 예비선택된 라이브러리 사이의 다양성을 비교할 수 있다.
- [0201] 여러 번의 독립적인 선택을 면역시험관에 코팅된 TT에 대해 수행하였다. 포함될 수 있는 변수는 용액에서 비오틴화 항원을 사용하는 선택 또는 포획된 TT에 대한 선택이다. 제1 선택에서 얻은 ELISA-양성 클론의 수 및 다양성을 기초로 하여, 추가의 선택 라운드를 결정하였다. 클론은 음성 대조군 클론에 비해 > 3x 양성일 때 양성으로 간주하였다. 양성 클론은 항원 특이성을 확인하기 위해 일군의 음성 대조군 항원에 대해 ELISA에 의해 분석하였다. 그 목적은 특이한 CDR3 서열 및 V μ DJ μ 재배열을 기초로 하여 적어도 40개의 특이한 VH 구역을 확인하는 것이다.
- [0202] 래트 C κ -양성 분류 B 세포로부터의 cDNA 물질의 증폭은 최근 연구 (Brady et al., 2006, JIM, 315: 61)에서 보고된 바와 같이 마우스 C κ 서열에서 풍부하지 않은 구역에서 인간 리더 서열에 특이적인 PCR 전방향 프라이머 및 래트 C κ 서열에 특이적인 PCR 역방향 프라이머를 사용하여 수행하였다. 프라이머 조합 및 어닐링 온도는 0817676_pSELECT_0815426 = IGKV1-39 DNA 카세트가 존재하는 pSELECT 벡터 (실시예 7 참조)로 형질감염된 HEK-293T 세포로부터의 cDNA에 대해 먼저 시험되었다.
- [0203] 증폭 생성물을 pJET-1 벡터에 클로닝하고, XL1-blue 형질전환 후에, V κ 012 (IGKV1-39) 생식계열 서열에 대한

직접 비교에 의해 VL SHM 빈도를 평가하기 위해 96개의 콜로니의 서열을 결정하였다. 인간 TT-특이적 항체에 대한 본 발명자들의 연구에서 설명된 R/S 비율 방법 (de Kruif et al., 2009, J. Mol. Biol., 387: 548)을 통해 VL 서열에서 발생하는 무작위 돌연변이와 항원-유발 돌연변이를 구별할 수 있다.

- [0204] 실시예 18
- [0205] 트랜스제닉 마우스 주에서 B 세포 집단의 면역형광 분석
- [0206] 본 실시예는 1차 (골수) 및 2차 (비장, 복막) 림프 기관 및 혈액에서 B 세포 집단을 분석하기 위해 항체 및 유동 세포 측정법의 사용에 대해 설명한다. 방법 및 시약은 문헌 [Middendorp et al. (2002) J. Immunol. 168:2695] 및 [Middendorp et al. (2004) J. Immunol. 172:1371]에 기재되어 있다. 골수에서 조기 B 세포 발달의 분석을 위해, 세포 표면을 그들의 표면 상에 트랜스젠을 발현하는 프로-B 세포, 프리-B 세포, 큰 프리-B 세포, 조기 및 후기 미성숙 B 세포 및 재순환 B 세포 집단을 검출하기 위해 B220, CD19, CD25, IgM, IgD, 마우스 C카파, 마우스 C람다 및 래트 C카파에 특이적인 항체 (백톤 디킨슨)의 조합물로 염색하였다. DAPI 염색 (인비트로젠)은 골수 세포 상의 Fc 수용체와의 항체 상호작용을 억제하기 위해서 분석 및 FC 차단 (백톤 디킨슨)으로부터 죽은 세포를 배제하기 위해 포함되었다. 말초 림프 기관 및 혈액에서 B 세포 집단에 대한 표면 트랜스젠 발현의 분석을 위해, 세포를 B220, CD5, CD19, CD21, CD23, IgM, IgD, 마우스 C카파, 마우스 C람다 및 래트 C카파에 특이적인 항체 (백톤 디킨슨)의 조합물로 염색하였다. DAPI 염색은 골수 세포 상의 Fc 수용체와의 항체 상호작용을 억제하기 위해서 분석 및 FC 차단으로부터 죽은 세포를 배제하기 위해 포함되었다. 또한, CD3, CD4, CD11b, CD11c 및 NK1.1에 특이적인 항체 (백톤 디킨슨)의 조합은 트랜스젠이 B 세포 컴파트먼트 이외의 세포 종류에서 발생하는지 결정하기 위해 포함되었다.
- [0207] C57BL6 배경에서 인간 IGKV1-39/래트 C카파 트랜스젠에 대해 이중접합성이고 CD19-Cre 트랜스젠에 대해 이중접합성인 3마리의 마우스 (HuVκ1/CD19-Cre)를 분석하였다. FACS 분석의 대조군으로서, C57BL6 배경 (CD19-Cre)에서 인간 IGKV1-39/래트 C카파 트랜스젠에 대해 야생형이고 CD19-Cre 트랜스젠에 대해 이중접합성인 3마리의 동배제기 마우스 및 2마리의 C57BL6/NTac 마우스 (Wt)가 포함되었다. 모든 동물은 분석 전에 1주 동안 동물 시설에 순응시켰고, 모든 마우스는 6주령의 수컷이었다. 림프구를 문헌에 설명된 바와 같은 통상적인 기술을 사용하여 마우스의 대퇴골, 비장, 복강 및 혈액으로부터 단리하였다 ([Middendorp et al. (2002) J. Immunol. 168:2695] 및 [Middendorp et al. (2004) J. Immunol. 172:1371]). 항체는 표 10에 제시된 바와 같이 예비 조합하고, 염색은 96웰 플레이트에서 수행하였다. PE-접합된 항-래트 C 카파 (상기한 바와 같은)와의 인큐베이션은 비-특이적 결합을 방지하기 위해 래트 항-쥐 항체를 사용한 염색 전에 수행하였다. 세포 염색 종료 후에, 표지된 세포를 백톤 디킨슨 LSR II FACS 기기로 분석하고, 획득한 데이터를 FlowJo 소프트웨어 (v6.4.7)로 분석하였다.
- [0208] 트랜스제닉 마우스는 중량, 외관 및 활성이 야생형 마우스와 유사하였다. 조직 회수 동안 어떠한 전체적인 해부학적 변경도 관찰되지 않았다. 트랜스제닉 마우스와 야생형 마우스 사이에, 골수 (BM) 및 비장에서 B 세포의 수 (표 11) 또는 말초 기관에서의 B 세포, T 세포 및 골수 세포의 수에서 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 또한, 상이한 림프구 발달 경로에서 세포의 빈도 또는 비율은 야생형 마우스에 비해 트랜스제닉 마우스에서 변경되지 않았다. 따라서, 이중 트랜스제닉 (HuVκ1/CD19-Cre) 및 트랜스제닉 (CD19-Cre) 마우스에서 림프 및 가장 중요하게는 B 세포 발달이 야생형 마우스와 구별할 수 없었다.
- [0209] 말초 림프 기관에서, 트랜스젠 특이적 항체 (항-래트C카파-PE)를 사용한 염색은 B 세포 집단에서만 관찰되었다. T 세포, 골수 세포 및 NK 세포 집단은 비장에서 트랜스젠의 표면 발현에 대해 모두 음성이었다 (도 23). 이와 대조적으로, 범 (pan) B 세포 마커 B220 및 CD19로 염색된 세포에서 모든 세포는 FACS 플롯에서 우측으로 이동하였고, 이것은 트랜스젠의 세포 표면 발현을 나타낸다 (도 24). 유사한 트랜스젠-특이적 염색이 B 세포의 발달상 별개의 집단인 복막의 CD5⁺ B1 세포에서 측정되었다 (도 25).
- [0210] 다계열성 (multilineage) 전구체로부터 성숙 B 세포로의 B 세포의 분화가 골수에서 발생한다. 골수로부터 분석된 림프구에서, 세포의 및 트랜스젠 발현은 최조기 B 세포 기원세포인 프로- 및 프리-B 세포에서 검출가능하지 않았고, 이것은 정상 경쇄 발현의 패턴과 일치하였다 (도 26). 트랜스젠 발현은 처음으로 미성숙 B 세포에서 검출가능하였고, 이 발달 단계에서 생식계열 쥐 경쇄는 재배열을 거치고, 예비선택된 중쇄의 환경에서 세포 표면에서 발현되었다 (도 26). 또한, 비장 트랜스제닉 경쇄에서의 염색과 일치하게, 발현은 성숙 재순환 B 세포에서도 검출되었다 (도 26). 따라서, 트랜스젠의 CD19-Cre 유도 발현은 정상적인 경쇄 발현 패턴과 일치하였다. 내인성 경쇄-특이적 항체를 사용한 염색은 트랜스젠-특이적 경쇄 항체보다 더 강하였다. 이것은 내인성 경쇄의 보다 높은 발현 수준, 내인성 경쇄-특이적 항체를 사용한 염색의 보다 큰 감수성 또는 이 둘의

조합을 나타낼 수 있다. 중요한 사실은, 트랜스제닉 경쇄의 표면 발현의 강도가 혈액 내의 순환 B 세포의 염색에서 관찰되는 내인성 경쇄 및 IgM 표면 발현 모두와 상호관련된다는 것이다 (도 27).

[0211] 따라서, 종합하면 상기 분석은 인간 IGKV1-39/C카파 트랜스젠의 발현이 B 세포 컴파트먼트로 제한되고, 그의 발현의 일시적인 조절은 내인성 카파 및 람다 경쇄와 유사하여 모든 B 세포 집단의 정상적인 발달을 야기함을 입증한다. 트랜스젠의 외관상 보다 낮은 발현 수준은 내인성 경쇄 유전자에 존재하는 프로모터 및 인핸서와 비교 시의 프로모터의 강도에 의해 또는 재배열된 중쇄와 페어링하는데 있어서 내인성 경쇄에 경쟁적 잇점을 제공하는 트랜스젠 발현의 지연에 의해 설명될 수 있다. 이것은 B 세포가 성숙하면서 트랜스젠 염색의 상대 강도가 내인성 경쇄에 비해 증가한다는 관찰과 일치한다. 또한, B 세포 수가 정상이고 모든 표면 Ig+ B 세포가 내인성 및 트랜스제닉 경쇄를 동시 발현한다는 관찰은 IGKV1-39 가변 구역이 상이한 쥐 중쇄 가변 구역의 정상 레퍼토리와 페어링할 수 있다는 결론을 지지한다. 본 발명자들은 상기 분석으로부터 CD19-Cre 활성화되는 CAGGS 프로모터에 의해 유도되는 IGKV1-39/라트 C카파 트랜스젠을 Rosa 로커스에 삽입하면 트랜스젠의 시기적절한 B 세포-특이적 발현이 용이해지고 트랜스젠이 쥐 중쇄의 정상 레퍼토리와 페어링할 수 있다고 결론지었다.

[0212] 실시예 19

[0213] IGKV1-39에 대한 에피베이스® T-세포 에피토프 프로파일

[0214] IGKV1-39의 단백질 서열 (도 12, 인간 생식계열 IGKV1-39/J 단백질)을 T_H-에피토프로도 알려진 추정 HLA 클래스 II 제한 에피토프의 존재에 대해 스캐닝하였다. 이를 위해, 알고믹스 (Algonomics)의 에피베이스® 플랫폼을 IGKV1-39에 적용하였다. 간단히 설명하면, 플랫폼은 표적 서열로부터 유도된 모든 가능한 10량체 펩티드의 HLA 결합 특이성을 분석한다 ([Desmet et al. Nature 1992, 356:539-542]; [Desmet et al. FASEB J. 1997, 11:164-172]; [Desmet et al. Proteins 2002, 48:31-43]; [Desmet et al. Proteins 2005, 58:53-69]). 프로파일링은 20 DRB1, 7 DRB3/4/5, 13 DQ 및 7 DP, 즉 총 47개의 HLA 클래스 II 수용체 (표 5 참조)에 대해 동종이형 수준에서 수행되었다. 에피베이스®는 각각의 47개의 HLA 클래스 II 수용체에 대한 펩티드의 결합의 자유 에너지 ΔG_{bind} 에 대한 정량적 추정치를 계산한다. 이어서, 상기 데이터를 다음과 같이 추가로 처리하였다:

[0215] - 자유 에너지는 $\Delta G_{bind} = RT \ln(Kd)$ 를 통해 Kd-값으로 전환되었다.

[0216] - 펩티드는 강한 (S), 중간 (M), 약한 및 비 (N) 결합물질로서 분류하였다. 다음 컷오프 (cutoff)가 적용되었다:

[0217] S: 강한 결합물질: $Kd < 0.1 \mu M$.

[0218] M: 중간 결합물질: $0.1 \mu M \leq Kd < 0.8 \mu M$.

[0219] N: 약한 및 비-결합물질: $0.8 \mu M \leq Kd$.

[0220] - 자가-펩티드에 상응하는 펩티드를 따로 처리하였다. 자가-펩티드의 목록은 293개의 항체 생식계열 서열로부터 취하였다. 이들을 '생식계열-여과된' 펩티드로서 칭한다.

[0221] S- 및 M-펩티드를 소위 에피토프 지도에서 표적 상에 매핑하였다; S-친화도는 정량적으로 플로팅되고; M-값은 정성적으로 제시된다. 그 결과에 대한 일반적인 개요로서, 표 6은 DRB1, DQ, DP 및 DRB3/4/5 유전자에 대응하는 HLA 클래스 II 수용체의 군에 대해 분석된 단백질에서 강한 및 중간 결합물질의 수를 제시한다. 계수는 강한 및 중간 친화도 결합물질에 대해 별개로 수행하였다. 동일한 군의 다수의 동종이형에 결합하는 펩티드는 하나로 계수하였다. 괄호 사이의 값은 생식계열-여과된 펩티드로 칭한다. 표 7에서, 서열은 실험 작업에 적합한 방식으로 제시된다. 서열은 12개 잔기가 중첩되는 연속적인 15량체로 분할하였다. 각각의 15량체에 대해, 불규칙성이 나열되고 (그에 대해 15량체가 중요한 결합물질을 함유하는, 총 47개 중에서 동종이형의 수), 함축된 혈청형도 제시된다. 에피베이스® 프로파일 및 에피토프 지도는 도 16 및 17에 제시된다.

[0222] IGKV1-39는 강한 비-자가 DRB1 결합물질을 함유하지 않는 것으로 결론내렸다. 일반적으로, 유의하게 더 많은 결합물질이 다른 HLA 유전자보다 DRB1에 대해서 발견되었다. 이것은 DRB1 군에 속하는 동종이형이 보다 강력한 펩티드 결합물질이라는 실험 증거와 일치한다. DRB1 동종이형에 대한 중간 강도의 에피토프는 집단 반응에 기여하는 것으로 예상되고, 이는 무시할 수 없는 것이다. 다시, 비-자가 DRB1 결합물질은 IGKV1-39에서 발견되지 않았다. 항원에 대해 유발된 체액 반응에서, 관찰된 T_H 세포 활성화/증식은 일반적으로 DRB1 특이성의 측면에서 해석된다. 그러나, DRB3/4/5, DQ 및 DP 유전자의 기여 가능성도 무시할 수 없다. DRB1에 비해 상기 유전자의 보다 낮은 발현 수준을 고려하여, DRB3/4/5, DQ 및 DP에 대한 강한 에피토프 클래스에 초점을 맞추었다. '

중요한 에피토프'는 임의의 DRB1, DRB3/4/5, DQ 또는 DP 동종이형에 대한 강한 결합물질 또는 DRB1에 대한 중간 결합물질인 에피토프이다. IGKV1-39는 DRB3/4/5, DQ, 또는 DP에 대한 강한 또는 중간 비-자가 결합물질을 함유하지 않는다.

[0223] 또한, 많은 펩티드가 생식계열 서열에 존재한다 (표 6에서 괄호 내의 값). 그러한 펩티드는 HLA에 매우 잘 결합할 수 있지만, 이들은 자가, 따라서 비-면역원성인 것으로 가정된다. 총 6개의 강한 및 16개의 중간 생식계열-여과된 DRB1 결합물질이 IGKV1-39에서 발견되었다. 프레임워크 구역 1 내지 프레임워크 구역 3은 생식계열 V-세그먼트 VKI 2-1-(1) 012 (VBase), a.k.a. IGKV1-39*01 (IMGT)에 정확하게 일치한다. 프레임워크 구역 4는 생식계열 J-세그먼트 JK1 (V-base) a.k.a. IGKJ1*01(IMGT)에 정확하게 일치한다. 이들 세그먼트가 임의의 비-자가 에피토프를 함유하지 않는다는 것은 놀라운 사실이 아니다.

[0224] 실시예 20

[0225] IGKV1-39의 생산 특징

[0226] 열역학상 안정하고 우수한 발현 수율을 제시하는 치료 항체를 생산하는 항체 발견 플랫폼에 대한 수요가 매우 크다. 상기 특징은 생산 동안 및 약품의 환자 내로의 주사 후에 약물 물질의 안정성 보장에 중요하다. 또한, 우수한 발현 수율은 약물 제조 비용에 직접적인 영향을 주고, 따라서 가격 책정, 환자 이용성 및 수익성에 영향을 준다. 현재 임상에서 사용되는 실질적으로 모든 치료 항체는 인간 IgG1 및 카파 불변 구역으로 이루어지지만, 특이성을 부여하는 상이한 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 이용한다. 인간 가변 중쇄 및 경쇄 도메인은 80% 초과 서열 차이를 갖는 패밀리로 나뉠 수 있다. 생식계열 입체형상에서 이들 패밀리의 재배열된 예를 조합하여 안정성 및 수율에 대해 비교할 때, 유전자 패밀리가 생물리학적 특성에서 동일하지 않다는 것이 분명하다. 특히, V_H3, V_H1 및 V_H5는 중쇄에 대한 유리한 안정성을 갖고, Vk1 및 Vk3은 경쇄에 대한 가장 우수한 안정성 및 수율을 갖는다. 또한, 돌연변이가 체세포 과다돌연변이 과정의 일부로서 도입될 때, 돌연변이는 V_H/V_L 페어링을 방해할 수 있다. 상이한 돌연변이 비율을 갖는 상이한 경쇄 유전자가 고정된 V_H 쇠의 생산 특징에 대해 갖는 효과를 평가하기 위해서, Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 면역화시킨 공여자로부터의 일군의 44개의 TT 결합 중쇄와 조합된 6개의 비처리된 건강한 공여자로부터의 경쇄 (카파 및 람다)로 구축하였다. 1 라운드의 선택 후에, TT 결합 Fab 클론을 단리하였다. 이들 중 몇몇은 상이한 경쇄와 조합된 TT 클론 PG1433과 동일한 V_H 유전자를 공유하였다. Fab 경쇄 단편을 카파 발현 벡터 내로 재클로닝하고, PG1433의 중쇄를 코딩하는 DNA와 조합하여 293 세포 내로 형질감염시키고, 특이적 IgG 생산을 ELISA로 측정하였다. 표 8에 예시된 바와 같이, 상이한 경쇄와 조합된 PG1433 V_H를 함유하는 선택된 클론은 IGKV1-39와 조합된 PG1433 V_H보다 5 내지 10배 더 낮은 단백질 발현을 보였다. 모든 경쇄가 V_H 페어링을 파괴하고 생산 안정성을 감소시킬 수 있는 그들의 코딩 구역 내에 아미노산 돌연변이를 포함함에 주목한다. 따라서, 원치 않는 면역원성의 가능성을 감소시키는 것 이외에, 돌연변이가 존재하지 않는 경쇄 IGKV1-39의 사용은 다양한 특이성에 기여하는 V_H 유전자의 개선된 생산 안정성 및 수율에 기여할 것으로 예상된다. 실제로, IGKV1-39와 페어링된 상이한 모든 V_H 유전자의 형질감염에 의해 생성된 안정한 클론은 고도로 계대배양될 수 있고, 표 9에 제시된 바와 같은 강력한 생산 특징을 계속 보유한다.

[0227] 실시예 21

[0228] 완전 인간 V_H 및 V_L 구역을 발현하는 마우스의 생성.

[0229] 본 발명에 따른 트랜스제닉 마우스를 이미 인간 VH 로커스를 함유하는 마우스와 교배시켰다. 인간 VH 로커스를 포함하는 적절한 마우스의 예는 문헌 [Taylor et al. (1992). *Nucleic Acids Res* 20: 6287-95]; [Lonberg et al. (1994). *Nature* 368: 856-9]; [Green et al. (1994). *Nat Genet* 7: 13-21]; [Dechiara et al. (2009). *Methods Mol Biol* 530: 311-24]에 개시되어 있다.

[0230] 교배 및 적어도 IGKV1-39 트랜스젠 및 인간 VH 로커스에 이중접합성인 마우스에 대한 선택 후에, 선택된 마우스를 표적으로 면역화시켰다. VH 유전자를 상기한 바와 같이 수거하였다. 상기 방법은 VH 유전자가 이미 완전 인간 유전자이고, 따라서 인간화를 필요로 하지 않는다는 잇점을 갖는다.

[0231] 실시예 22

- [0232] 만성 염증성 질병, 예를 들어 류마티스성 관절염의 치료를 위한, 인간 IL6을 표적화하는 항체의 단리, 특성 결정, 올리고클로닉 구성 및 생산
- [0233] 인간 재조합 IL6으로 면역화시킨 트랜스제닉 마우스로부터의 비장 VH 레퍼토리를 단일 인간 IGKV1-39-C 카파 경쇄 (마우스 트랜스젠과 동일)와 함께 파지 디스플레이 Fab 벡터에 클로닝하고, 면역원성 인간 IL6에 대해 패닝 하였다. 2 내지 4 라운드의 패닝 후에 얻은 클론을 그들의 결합 특이성에 대해 분석하였다. 특유한 클론을 확인하고 VH, DH 및 JH 이용성을 지정하기 위해서 IL6-특이적 Fab 단편을 코딩하는 VH 유전자의 서열을 분석하였다. Fab 단편을 IgG1 분자로서 재구성하고, 일시 발현시켰다. 이어서, 특유한 클론을 결합 분석에서의 비-경쟁을 기초로 하여 분류하고, 친화도 및 기능적 분석을 수행하였다. 가장 강력한 항-IL6 IgG1 mAb는 하나의 IGKV1-39-C-계 카파 경쇄와 함께, 올리고클로닉 구성에서 상이한 VH-구역을 포함하는 2, 3, 4 또는 5개의 중쇄의 조합물로서 후속적으로 발현시키고, IL-6과의 복합체 형성에 대해 시험관 내에서 시험하였다. 올리고클로닉을 또한 마우스로부터 인간 IL-6의 소실에 대해 생체 내에서 시험하였다. 가장 강력한 소실 활성을 갖는 올리고클로닉을 선택하고, 쥐 VH 유전자를 통상적인 방법에 따라 인간화하였다. 인간화 IgG1을 포유동물 세포주 내로 형질감염시켜 안정한 클론을 생성시켰다. 최적 하위클론을 마스터 세포 은행 (master cell bank)의 생성 및 임상 시험 물질의 생성에 대해 선택하였다.
- [0234] 본원에서 설명되는 많은 프로토콜은 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 및 관심있는 항원에의 결합에 대한 파지의 패닝을 위한 표준 프로토콜이고, 예를 들어 문헌 [Antibody Phage Display: Methods and Protocols. 2002. Editor(s): Philippa M. O'Brien, Robert Aitken. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA]에 설명되어 있다.
- [0235] 면역화
- [0236] 어쥬번트 (adjuvant)로서 시그마 타이타맥스 (Sigma titerMax)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 트랜스제닉 마우스에 대한 면역화를 2주마다 인간 IL6으로 3회 수행하였다.
- [0237] RNA 단리 및 cDNA 합성
- [0238] 마지막 면역화 3일 후에, 마우스로부터의 비장 및 림프절을 제거하고, PBS (pH 7.4)가 존재하는 시험관 내로 70 마이크로미터 필터를 통과시켜 단일 현탁액을 생성시켰다. 림프구의 세척 및 펠렛화 후에, 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA의 단리를 위해 TRIzol LS 시약 (인비트로젠) 내에 현탁하고, 제조사 (인비트로젠)의 절차에 따라 1 μ g의 RNA, Superscript III RT를 dT20과 조합하여 사용하는 역전사 반응에 적용하였다.
- [0239] Fab 파지 디스플레이 라이브러리의 생성은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행한다.
- [0240] 코팅된 면역시험관에서 파지의 선택
- [0241] 인간 재조합 IL6을 PBS에 5 μ g/ml의 농도로 용해시키고, MaxiSorp Nunc-Immuno Tube (Nunc 444474)에 4°C에서 철야 코팅하였다. 코팅 용액을 버리고, 시험관을 PBS (차단 버퍼) 중의 2% 탈지유 (ELK)로 1시간 동안 실온 (RT)에서 차단하였다. 이와 함께, 0.5 ml의 파지 라이브러리를 1 ml 차단 버퍼와 혼합하고, 20분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 파지의 차단 후에, 파지 용액을 IL6 코팅된 시험관에 첨가하고, 결합시키기 위해 서서히 회전하는 플랫폼 상에서 2시간 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 시험관을 PBS/0.05% Tween-20으로 10회 세척한 후, 회전 휠 상에서 1 ml 50 mM 글라이신-HCl (pH 2.2)과 10분 동안 RT에서 인큐베이팅하는 파지 용출, 바로 이어서 수거된 용리액의 0.5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)을 사용한 중화를 수행하였다.
- [0242] 파지 클론의 수거
- [0243] O.D. 0.4의 5 ml XL1-Blue MRF (스트라타젠) 배양액을 수거된 파지 용액에 첨가하고, 파지를 감염시키기 위해서 진탕하지 않으면서 30분 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 세균을 카르베니실린/테트라사이클린 4% 글루코스 2*TY 플레이트에 도말하고, 37°C에서 철야 성장시켰다.
- [0244] 파지 생산
- [0245] 파지를 성장시키고, 헬퍼 파지 균주로서 VCSM13을 사용하여 문헌 [Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59]에 기재된 바와 같이 처리하였다.
- [0246] 파지 ELISA
- [0247] ELISA 플레이트를 PBS 중의 2.5 μ g/ml의 농도로 웰당 100 μ l 인간 재조합 IL6으로 4°C에서 철야 코팅하였다.

PBS 중의 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 100 μl 갑상선글로불린으로 코팅된 플레이트를 음성 대조군으로 사용하였다. 웰을 비우고, 종이 타월에 가볍게 두드려 건조시키고, PBS-4% 탈지유 (ELK)로 완전히 채우고, 웰을 차단하기 위해서 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 차단 용액을 버린 후, 50 μl 차단 용액과 미리 혼합한 파지 미니프랩을 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, PBS-0.05% Tween-20으로 5회 세척하여 미결합된 파지를 제거하였다. 결합된 파지는 웰을 100 μl 항-M13-HRP 항체 접합체 (차단 버퍼에 1/5000으로 희석)와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅함으로써 검출하였다. 유리 항체는 상기한 바와 같은 세척 단계를 반복하여 제거하고, 발색이 가시화될 때까지 TMB 기질 인큐베이팅을 수행하였다. 웰당 100 μl 의 2 M H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 중지시키고, 450 nm 방출 파장에서 ELISA 판독기로 분석하였다.

[0248] 서열결정

[0249] 배경 신호보다 적어도 3배의 신호를 생성시킨 클론을 증식시키고, DNA 미니프랩 절차 (절차는 퀴아젠 미니프랩 취급설명서 참조)에 사용하고, 뉴클레오티드 서열 분석을 수행하였다. 서열결정은 인간 IgG1 중쇄의 CH1 구역의 5' 서열 (Fab 디스플레이 벡터 MV1043에 존재, 도 3 및 12)을 인식하는 역방향 프라이머 (CH1_Rev1, 표 1)를 사용하여 빅 다이 1.1 키트 (어플라이드 바이오시스템즈)에 동봉된 취급설명서에 따라 수행하였다. 쥐 VH 구역의 서열을 다양한 DH 및 JH 유전자 세그먼트에 대해 분석하였다.

[0250] 키메라 IgG1의 제조 및 발현

[0251] 트랜스젠 (IGKV1-39) L쇄 단편을 인간 IgG1- 및 카파 불변 구역을 포함하는 벡터 pcDNA3000Neo의 유도체 (크루셀 (CruCell), 네덜란드 라이덴) 내로 클로닝함으로써 벡터 MV1057 (도 12 및 22)을 생성하였다. VH 구역을 MV1057 내로 클로닝하고, 모든 구성체에 대한 뉴클레오티드 서열을 표준 기술에 따라 확인하였다. 생성되는 구성체를 HEK293T 세포에서 일시 발현시키고, 키메라 IgG1을 포함하는 상등액을 얻고, 문헌 (Throsby, M. 2006. J Virol 80: 6982-92)에 기재된 표준 절차를 사용하여 정제하였다.

[0252] IgG1 결합 및 경쟁 분석

[0253] IgG1 항체를 상기 설명한 바와 같은 IL6 코팅된 플레이트 및 항-인간 IgG 퍼옥시다제 접합체를 사용하여 ELISA에서 적정하였다. 에피토프 인식을 기초로 하여 항체를 분류하기 위한 경쟁 ELISA는 IL6 코팅된 플레이트에서 Fab 파지를 IgG1과 함께 또는 IL6에 대한 시판 항체 (예를 들어 아브캄 (Abcam) cat. no. ab9324)와 함께 인큐베이팅한 후, 항-M13 퍼옥시다제 접합체를 사용한 결합된 Fab 파지의 검출에 의해 수행하였다.

[0254] IgG1 친화도 측정

[0255] IL6에 대한 항체의 친화도는 Octet (포르테바이오 (ForteBio))에서 정량적 동적 프로토콜을 사용하여 결정하였다. 항체를 항-인간 IgG Fc 포획 바이오센서 상에 포획하고, 유리 IL6에 노출시키고, 각각의 항체의 Kd를 계산하기 위해서 독점 (proprietary) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0256] IL6 항체의 기능적 활성화

[0257] IL6과 IL6 수용체 (IL6R) 사이의 결합을 억제하는 선택된 항체의 능력을 시험하기 위해서, ELISA 기반 분석을 사용하였다. 다양한 농도의 항체를 문헌 [Naoko et al. 2007, Can. Res. 67: 817-875]에 기재된 바와 같이 고정된 농도 (10 ng/ml)의 비오틴화 IL6과 혼합하였다. IL6-항체 면역 복합체를 고정된 IL6R에 첨가하였다. 비오틴화 IL6의 IL6R에 대한 결합은 호스래디시 (horseradish) 퍼옥시다제-결합된 스트렙타비딘으로 검출하였다. ELISA 신호의 감소는 억제의 척도이다. IL6과 IL6R 사이의 결합 억제에 대한 양성 대조군으로서, 항-IL6R 항체 (아브캄 cat. no. ab34351; 클론 B-R6) 또는 항-IL6 항체 (아브캄 cat. no. ab9324)를 사용하였다. 선택된 항-IL6 항체의 시험관내 차단 활성화는 IL6 의존 세포주 7TD1을 사용하는 증식 분석에서 측정하였다. 간단히 설명하면, 세포를 항-IL6 항체의 존재 또는 부재 하에 상이한 농도의 인간 IL6과 함께 인큐베이팅하였다. IL6의 이용가능한 양이 증식 정도를 결정한다. 따라서, 첨가된 항체가 IL6 결합을 차단하면, 증식 판독치는 비결합 항체 대조군에 비해 감소한다. 증식은 제조사의 지시에 따라 5-브로모-2'-데옥시-우리딘 (BrdU) 증식 키트 (로슈 cat. no. 11444611001)를 사용하여 BrdU를 DNA 내로 혼입시킴으로써 측정하였다.

[0258] 항-IL6 올리고클로닉의 생성

[0259] 가장 강력한 항-IL6 항체는 각각의 에피토프 기로부터 선택하였다. 상기 항체를 발현하는 발현 구성체를 상이한 비 (1:1:1; 3:1:1; 1:3:1; 1:1:3; 3:3:1; 1:3:3; 3:1:3; 10:1:1; 1:10:1; 1:1:10; 10:10:1; 1:10:10; 10:1:10; 3:10:1; 10:3:1; 1:10:3; 3:1:10; 10:1:3; 1:3:10)의 3개의 비-경쟁 기로 HEK293T 세포 내로 형질감

염시켰다. 항체 함유 상등액을 수거하고, 정제하여 상기한 바와 같이 특성을 결정하였다.

[0260]

항-IL6 올리고클로닉의 복합체 형성 및 생체내 소실

[0261]

항-IL6 올리고클로닉이 면역 복합체를 형성하는 능력을 측정하고 상기 복합체를 분석하기 위해, TNF α에 대한 상이한 항체와 형성된 면역 복합체의 특성을 결정하는 문헌 [Min-Soo Kim et al. (2007) JMB 374: 1374-1388]에 개시된 방법에 따라 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 사용하였다. 상이한 몰비의 항-IL6 올리고클로닉을 인간 IL6과 혼합하고, 20시간 동안 4℃ 또는 25℃에서 인큐베이팅하였다. 혼합물을 크기 배제 컬럼이 구비된 HPLC 시스템으로 분석하고; 여기서 상이한 용출 시간은 분자량 표준물질을 이용할 때 분자량과 상호관련된다. IL6과 복합체를 형성하는 항체의 능력은 생체 내에서 순환으로부터 시토킨을 신속하게 소실시키는 그들의 능력과 상호관련된다. 이것은 마우스로부터 방사성 표지된 IL6의 소실을 측정함으로써 확인된다. 간단히 설명하면, 6 내지 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 얻고, 실험 18시간 전에 동물에게 상이한 용량의 정제된 항-IL6 올리고클로닉을 측부 꼬리 정맥을 통해 정맥 내로 (IV) 주사하였다. 제0일에, 마우스에게 50 μl의 방사성 표지된 IL-6 (1x10E7 cpm/mL)를 동일한 조건 하에 IV 주사하였다. 혈액 샘플 (대략 50 μl)을 수 시간 간격으로 수집하고, 4℃에서 보관하였다. 샘플을 5분 동안 4000 xg에서 원심분리하고, 혈청의 방사성을 측정하였다. 모든 약동학 실험은 각각의 처리에 대해 3마리의 동물을 사용하여 동시에 수행하였다.

[0262]

항-IL6 올리고클로닉 안정한 클론의 생성 및 전임상 개발

[0263]

선도적인 항-IL6 올리고클로닉은 상기 결정된 바와 같은 시험관내 및 생체내 효능을 기초로 하여 선택하였다. 쥐 VH 유전자는 표준 방법에 따라 인간화하고, 상기한 바와 같이 발현 벡터에서 완전 인간 IGKV1-39 경쇄와 조합하였다. 인간화 방법의 예는 재표면화 (Padlan, E. A., et al., (1991). Mol. Immunol., 28, 489), 초인간화 (Tan, P., D. A., et al., (2002) J. Immunol., 169, 1119) 및 인간 스트링 함량 최적화 (Lazar, G. A., et al., (2007). Mol. Immunol., 44, 1986)과 같은 방식을 기초로 한 것을 포함한다. 3개의 구성체를 표준 방법에 따라 G418의 선택압 하에서 소정의 최적 비율 (상기한 바와 같은)로 PER.C6 세포 내로 형질감염시켰다. 안정한 고생산 항-IL6 올리고클로닉 클론을 선택하고, 효과적인 검증된 마스터 세포 은행을 생성하였다.

표 1

항체	항-IL6 올리고클로닉 복합체 형성 능력 측정											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.038	0.039	0.035	0.044	0.038	0.047	0.036	0.042	0.033	0.035	0.042	0.041
B	0.035	0.042	0.041	0.035	0.033	0.045	0.035	0.045	0.037	0.048	0.044	0.035
C	0.048	0.047	0.047	0.038	0.035	0.046	0.035	0.047	0.038	0.035	0.035	0.032
D	0.047	0.049	0.038	0.038	0.038	0.046	0.035	0.047	0.038	0.038	0.038	0.035
E	0.048	0.047	0.047	0.047	0.047	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.042
F	0.035	0.047	0.038	0.035	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
G	0.033	0.048	0.035	0.035	0.038	0.048	0.038	0.048	0.038	0.038	0.038	0.038
H	0.037	0.035	0.038	0.035	0.037	0.038	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
A	0.047	0.033	0.035	0.035	0.033	0.044	0.038	0.042	0.037	0.038	0.038	0.038
B	0.042	0.042	0.042	0.042	0.038	0.044	0.044	0.042	0.042	0.038	0.042	0.038
C	0.044	0.035	0.038	0.044	0.038	0.044	0.044	0.044	0.044	0.038	0.044	0.038
D	0.035	0.044	0.044	0.044	0.035	0.044	0.044	0.044	0.044	0.038	0.044	0.038
E	0.038	0.035	0.038	0.044	0.035	0.044	0.044	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
F	0.038	0.035	0.044	0.038	0.044	0.044	0.044	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
G	0.038	0.038	0.035	0.035	0.044	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
H	0.038	0.035	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
A	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
B	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
C	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
D	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
E	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
F	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
G	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
H	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038

[0264]

감상선급도불면-코딩 플레이트 10/10회 세척

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.047	0.051	0.045	0.043	0.051	0.044	0.046	0.042	0.047	0.048	0.049	0.05
B	0.042	0.042	0.042	0.042	0.043	0.041	0.041	0.042	0.043	0.045	0.042	0.046
C	0.044	0.043	0.043	0.044	0.043	0.044	0.043	0.042	0.043	0.041	0.044	0.046
D	0.045	0.044	0.044	0.044	0.045	0.046	0.045	0.046	0.045	0.046	0.048	0.73
E	0.046	0.045	0.046	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.047	0.046	0.047	0.926
F	0.046	0.045	0.044	0.046	0.044	0.043	0.044	0.046	0.046	0.046	0.046	0.792
G	0.051	0.046	0.045	0.045	0.044	0.043	0.046	0.045	0.048	0.051	0.045	0.053
H	0.064	0.05	0.049	0.047	0.05	0.051	0.047	0.046	0.047	0.047	0.047	0.056

감상선급도불면-코딩 플레이트 15/15회 세척

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.036	0.049	0.045	0.044	0.046	0.047	0.046	0.042	0.042	0.043	0.042	0.041
B	0.045	0.042	0.041	0.043	0.043	0.043	0.045	0.045	0.047	0.048	0.044	0.045
C	0.049	0.047	0.047	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.046	0.045	0.045	0.052
D	0.047	0.049	0.048	0.048	0.048	0.048	0.047	0.048	0.048	0.046	0.048	0.456
E	0.049	0.047	0.047	0.047	0.047	0.049	0.047	0.048	0.047	0.046	0.048	0.412
F	0.05	0.047	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.047	0.048	0.528
G	0.05	0.048	0.045	0.045	0.046	0.049	0.048	0.046	0.053	0.049	0.05	0.057
H	0.057	0.05	0.046	0.045	0.047	0.049	0.047	0.047	0.046	0.047	0.053	0.048

표 5

T_H-에피토프 프로파일링에서 고려되는 HLA 동종이형. 대응하는 웰칭형 및 백인 집단에서의 동종이형 빈도를 제시한다 (Klitz et al. Tissue Antigens 2003, 62:296-307]; [Gjertson and Terasake (eds) in: HLA 1997]; [Gjertson and Terasake (eds) in: HLA 1998]; [Castelli et al. J. Immunol. 2002, 169:6928-6934]). 빈도는 각각의 개체가 각각의 유전자에 대해 2개의 대립유전자를 갖기 때문에 100%를 초과하는 수준까지 합해질 수 있다. 단일 유전자의 모든 대립유전자 빈도가 알려진 경우, 빈도는 동종적합성 개체에 의해 200%보다 약간 더 작은 수준까지 합해질 것이다.

HLA 단일	웰칭형	집단 %	HLA 단일	웰칭형	집단 %
DRB1*0101	DR1	17.4	DRB2*0102	DR53	21
DRB1*0102	DR1	4.6	DRB5*0101	DR51	15.8
DRB1*0301	DR1*03	21.2	DRB5*0102	DR51	5.7
DRB1*0401	DR4	11.5	DQA1*0101/DQB1*0301	DO5(1)	20.5
DRB1*0402	DR4	3.1	DQA1*0102/DQB1*0302	DO5(1)	2.6
DRB1*0404	DR4	5.5	DQA1*0102/DQB1*0602	DO6(1)	26.5
DRB1*0405	DR4	2.2	DQA1*0102/DQB1*0604	DO6(1)	6.7
DRB1*0407	DR4	<2	DQA1*0103/DQB1*0603	DO6(1)	11
DRB1*0701	DR7	23.4	DQA1*0104/DQB1*0303	DO5(1)	4
DRB1*0801	DR8	3.3	DQA1*0201/DQB1*0202	DO2	20.9
DRB1*0802	DR8	<2	DQA1*0201/DQB1*0303	DO2	7.2
DRB1*0901	DR9	<2	DQA1*0301/DQB1*0301	DO2(3)	12.5
DRB1*1101	DR11(5)	17	DQA1*0301/DQB1*0302	DO2(3)	18.3
DRB1*1104	DR11(5)	5.7	DQA1*0401/DQB1*0402	DQ4	4.5
DRB1*1201	DR12(5)	3.1	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	20.9
DRB1*1301	DR13(6)	15.4	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ7(3)	19.9
DRB1*1302	DR13(6)	10.8	DQA1*0103/DQB1*0401	DR*2	65.1
DRB1*1401	DR14(6)	4.2	DQA1*0103/DQB1*0402	DR*4	24.3
DRB1*1401	DR14(6)	13.2	DQA1*0201/DQB1*0101	DR*1	6.3
DRB1*1601	DR16(7)	5.5	DQA1*0201/DQB1*0301	DR*3	<2
DRB1*1601	DR16(7)	24.6	DQA1*0201/DQB1*0301	DR*5	<2
DRB1*0202	DR52	43	DRB1*0201/DQB1*0301	-	2.4
DRB1*0301	DR52	10	DRB1*0201/DQB1*0301	-	2.4
DRB1*0101	DR53	25.5			

표 6

IGKV1-39에 대한 T_H 에피토프 계수. 동일한 군의 다수의 HLA (DRB1, DRB3/4/5, DP, DQ)에 결합하는 펩티드는 하나만 계수한다. 괄호 내의 값은 생식계열 여파된 펩티드들 의미한다.

Matrix IGKV1-39	DRB1		DRB3/4/5		DP		DQ	
	각 0 (n=3)	중간 0 (n=10)	각 0 (n=3)	중간 0 (n=9)	각 0 (n=3)	중간 0 (n=9)	각 0 (n=3)	중간 0 (n=9)

[0271]

표 7

전통적인 15량체 펩티드 방식의 Merus IGKV1-39에 대한 에피토페이스® 예측 지도. 이 표는 Merus IGKV1-39 서열에 걸치는 각각의 15량체에 대한 중요 에피토프의 동종이형 계수 및 함축된 혈청형을 보여준다.

15량체	출발 위치	15량체 서열	동종이형 계수	함축된 혈청형
1	1	DIQHTQSPSSLSAIV	6	DR1, DR4, DR7, DR9
2	4	HTQSPSSLSASVGDR	5	DR1, DR4, DR9
3	7	SPSSLSAEVGDRTVI	0	
4	10	SLSASVGDRTVITCR	0	
5	13	AEVGDRTVITCRASQ	0	
6	16	GDRVTITCRASQSIS	2	DR11(5), DR7
7	19	VITITCRASQISSYL	4	DQ2, DR11(5), DR4, DR7
8	22	TCRASQISSYLNWY	2	DQ2, DR4
9	25	ASQISSYLNWYQOK	5	DR13(6), DR15(2), DR4
10	28	SISYLNWYQOKPKGK	8	DR12(5), DR13(6), DR15(2), DR16(2), DR4, DR8
11	31	SYLNWYQOKPKGKAPK	10	DR1, DR12(5), DR16(2), DR4, DR51, DR8
12	34	NWYQOKPKGKAPKLLI	9	DR1, DR15(2), DR4, DR51, DR8
13	37	QGRPKGKAPKLLIYAA	7	DQ4, DR1, DR11(5), DR15(2), DR51, DR8
14	40	PKGKAPKLLIYAASSL	7	DQ4, DR1, DR11(5), DR4, DR8
15	43	APKLLIYAASSLQSG	15	DR1, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR15(2), DR4, DR51, DR8, DR9
16	46	LLIYAASSLQSGVPS	15	DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR15(2), DR4, DR51, DR8, DR9
17	49	YAASSLQSGVPSRFS	1	DR15(2)
18	52	SSLQSGVPSRFSGSG	1	DR15(2)
19	55	QSGVPSRFSGSGSGT	0	
20	58	VPSRFSGSGSGTDFPT	0	
21	61	RFSGSGSGTDFPTLTI	0	
22	64	GSGSGTDFPTLTISSL	1	DR52
23	67	SGTDFPTLTISSLOPE	4	DR4, DR52, DR7, DR9
24	70	DFTLTISSLOPEPFA	4	DQ2, DR4, DR7, DR9
25	73	LTISSLOPEPFATY	1	DQ2
26	76	SSLQPEPFATYCCQ	0	
27	79	QPEPFATYCCQSYS	1	DR4
28	82	DFATYCCQSYSTFP	5	DR4, DR51, DR7
29	85	TYCCQSYSTPPTFG	4	DR4, DR51, DR7
30	88	CQSYSTPPTFGQGT	0	
31	91	SYSTPPTFGQGTKE	0	
32	94	TPPTFGQGTKEIK	0	

[0272]

표 8

상이한 아미노산 돌연변이 비율을 갖는 다양한 경쇄 유전자와 페어링된 PG1433으로부터의 V_H 유전자를 IGKV1-39 유전자를 함유하는 원래의 클론과 생산 수준에 대해 비교하였다.

IgG 명칭	경쇄 유전자	아미노산 돌연변이의 수	농도 (µg/ml)	5
PG1433	1-39	0	63, 45.5, 38.6 (avg = 49)	
PG1631	1-12	4	10.5	
PG1632	1-27	7	9.3	
PG1634	1D-12	10	10.8	10
PG1635	1D-33	6	10.2	
PG1642	1-5	8	7.1	
PG1644	1-9	3	7.8	
PG1650	1D-39	3	9.1	
PG1652	2D-28	3	7.1	
PG1653	3-15	14	7	
PG1654	3-20	2	5.2	
PG1674	1-40	7	8.2	15
PG1678	2-11	2	8.1	
PG1680	2-14	15	10.8	
PG1682	3-1	13	9.9	
PG1683	6-57	6	13.9	

[0273]

표 10

림프구 집단의 염색을 위해 사용된 항체 혼합물. BM = 골수, PC = 복강, PP = 파이어 판 (Peyer's patch)

A	염색			혼합물								
	Facs #	유브 #	프로노클로날	작업 회의	부피	1단계	2단계	3단계	최종 회의			
비장	1	1-8	CD31 ^{FltC}	640	320	0.50						
			C카파 레프트 PE	150		2.00						
			CD118 ^{FltC} Cy5.5	640		0.50						
			CD22 ^{PE-Cy7}	50	120	6.40				1000		
			DAPI									
			C카파 마우스 ^{FltC} APC	100	150	3.20	APC			5000		
			C람다 마우스 ^{FltC} APC	100	130	6.40	APC			3000		
			B220 ^{FltC} APC	150		2.00						
			FC 차단	400		0.80						
			비장 BM	2	9-18 17-24	CD31 ^{FltC}	640	640	1.00			
C카파 레프트 PE	150					4.00						
CD118 ^{FltC} Cy5.5	500					1.28						
IgM ^{PE-Cy7}	640					1.00						
DAPI												
C카파 마우스 ^{FltC} APC	100	150				6.40	APC			5000		
C람다 마우스 ^{FltC} APC	100	130				6.40	APC			3000		
B220 ^{FltC} APC	150					4.00						
FC 차단	400					1.60						
비장	3	25-32				C카파 마우스 ^{FltC}	400	320	0.80			
			C카파 레프트 PE	150		2.00						
			CD118 ^{FltC} Cy5.5	500		0.84						
			IgM ^{PE-Cy7}	640		0.50						
			DAPI									
			C람다 마우스 ^{FltC} APC	100	130	3.20	APC			3000		
			B220 ^{FltC} APC	150		2.00						
			FC 차단	400		0.80						
			비장 PP	4	33-40 31-48	C카파 마우스 ^{FltC}	400	640	1.80			
						람다 ^{FltC}	600		1.07			
C카파 레프트 PE	150					4.00						
CD118 ^{FltC} Cy5.5	500					1.28						
IgM ^{PE-Cy7}	640					1.00						
DAPI												
IgD ^{PE4F}	1280					0.50						
B220 ^{FltC} APC	150					4.00						
PP16 ^{FltC} BVV-APC-Cy7	300					2.13	PP-Cy7					
FC 차단	400					1.60						
PC	5	49-56	IgM ^{FltC}	150	320	2.00						
			C카파 레프트 PE	150		2.00						
			CD118 ^{FltC} Cy5.5	500		0.84						
			C카파 마우스 ^{FltC} PE-Cy7	100	150	3.20	PE-Cy7			5000		
			C람다 마우스 ^{FltC} PE-Cy7	100	130	3.20	PE-Cy7			3000		
			DAPI									
			CD6 ^{APC}	320		1.00						
			B220 ^{FltC} APC	150		2.00						
			FC 차단	400		0.80						
			BM	6	57-64	IgM ^{FltC}	150	640	4.00			
C카파 레프트 PE	150					4.00						
CD118 ^{FltC} Cy5.5	500					1.28						
C카파 마우스 ^{FltC} PE-Cy7	100	150				6.40	PE-Cy7			5000		
C람다 마우스 ^{FltC} PE-Cy7	100	130				6.40	PE-Cy7			3000		
DAPI												
CD25 ^{APC}	80					8.00						
B220 ^{FltC} APC	150					4.00						
FC 차단	400					1.60						
PP1 비장	7	144				C카파 레프트 PE	150	80	0.5			
			레프트 B220 ^{FltC}	150		0.5						
비장	8	97-104	Cyt CD31 ^{FltC}	320	320	1						
			Cyt C카파 레프트 PE	80		4.00						
			Cyt CD11c ^{FltC} PE-Cy7	75		4.27						
			Cyt IREK1 ^{FltC} PE-Cy7	200		1.8	PE-Cy7					
			Cyt CD118 ^{FltC} Cy5.5	320		1						
			Cyt CD4 ^{APC}	500		0.84						
			Cyt CD11b ^{FltC} APC	50		6.40						

[0275]

표 11

야생형 및 트랜스제닉 마우스의 골수 및 비장에서부터 수거된 림프구의 수

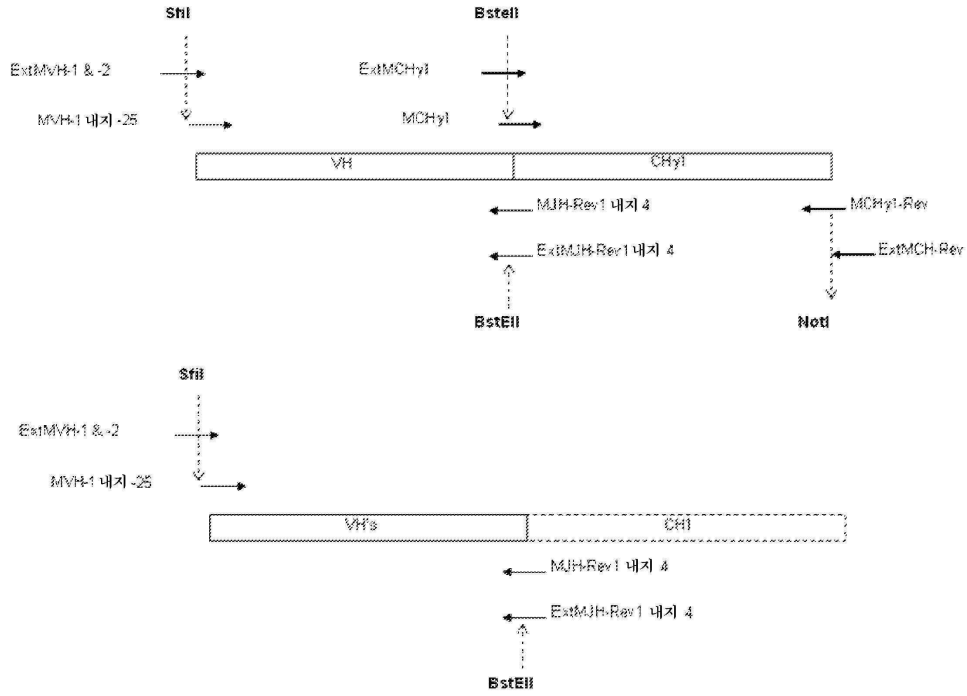
골수	총 세포		
	*10e6/ml 세포	총 부피 (ml)	*10 ⁶
Wt	18.82	5.05	95.0
Wt	19.24	4.96	95.4
CD19-Cre	23.42	5.08	119.0
CD19-Cre	20.58	4.82	99.2
CD19-Cre	25.77	5.15	132.7
CD19-Cre / HuVκ1	17.71	5.06	89.6
CD19-Cre / HuVκ1	12.60	5.33	67.2
CD19-Cre / HuVκ1	18.13	5.27	95.5

비장	총 세포		
	*10e6/ml 세포	총 부피 (ml)	*10 ⁶
Wt	41.70	5.36	223.5
Wt	37.85	4.71	178.3
CD19-Cre	60.19	3.77	226.9
CD19-Cre	35.06	3.66	128.3
CD19-Cre	80.69	4.60	371.2
CD19-Cre / HuVκ1	51.67	4.48	231.5
CD19-Cre / HuVκ1	58.80	6.24	366.9
CD19-Cre / HuVκ1	24.37	6.25	152.3

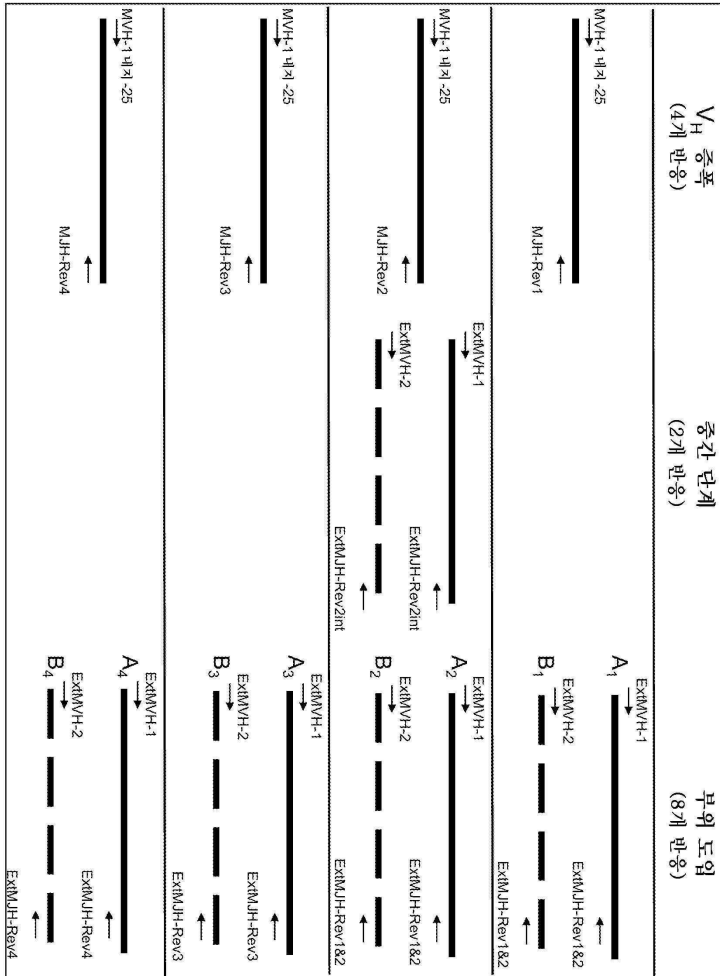
[0276]

도면

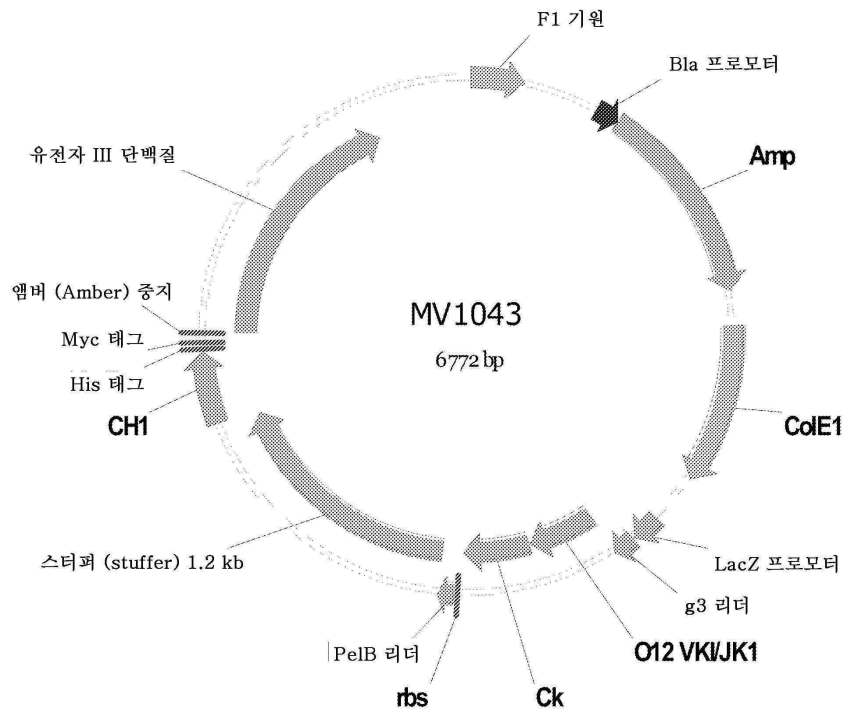
도면1



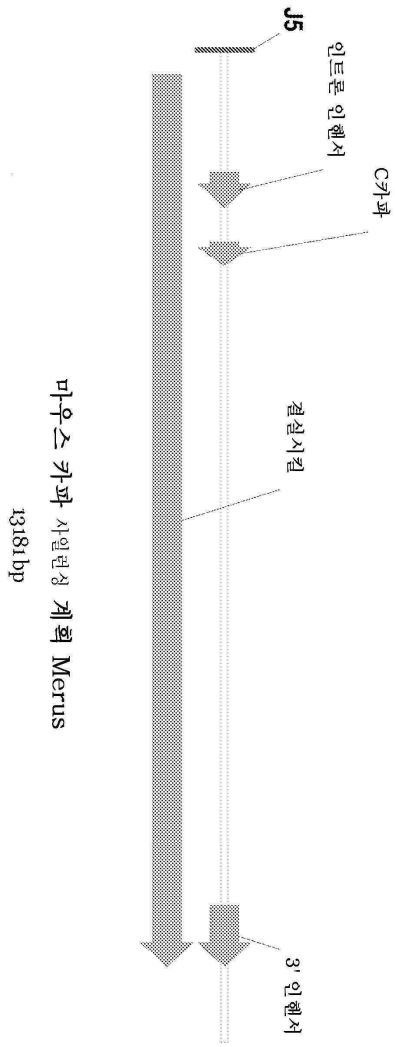
도면2



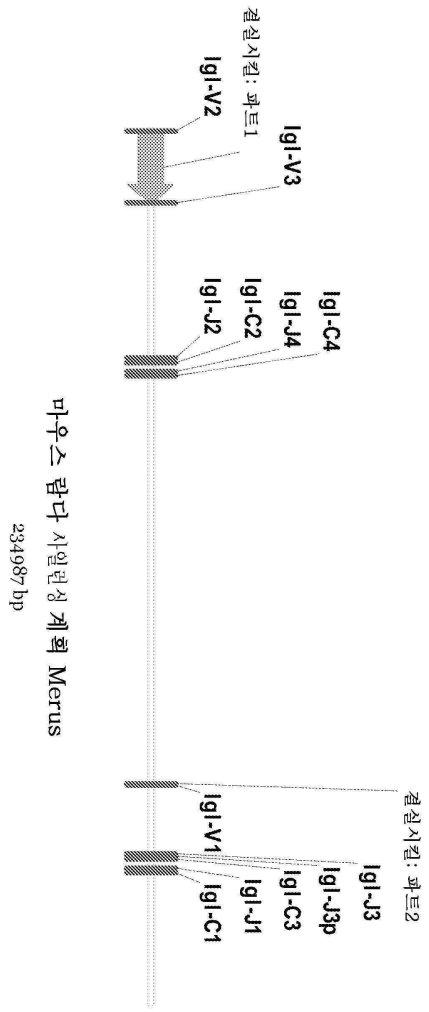
도면3



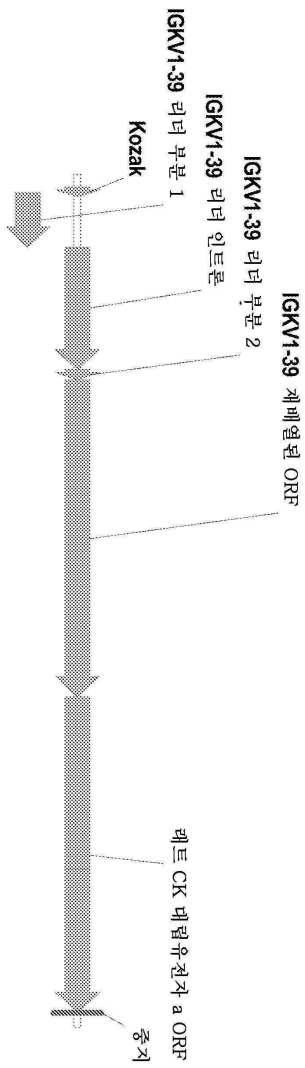
도면4



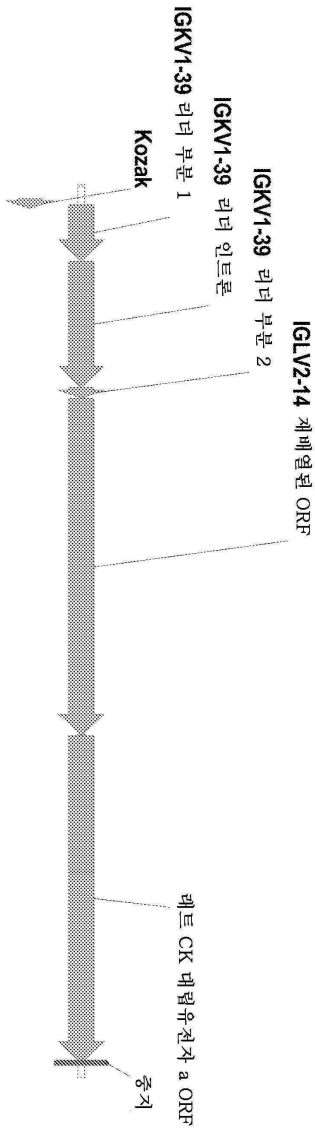
도면5



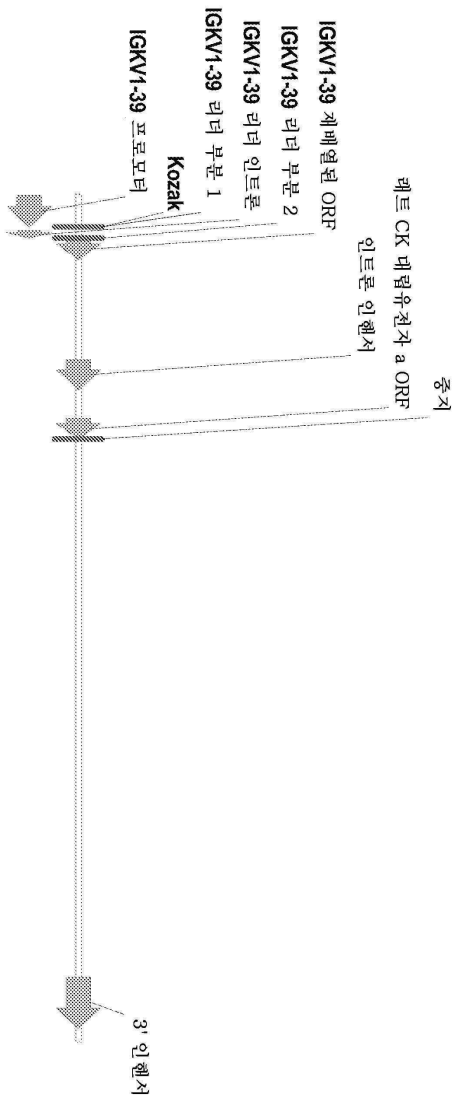
도면6



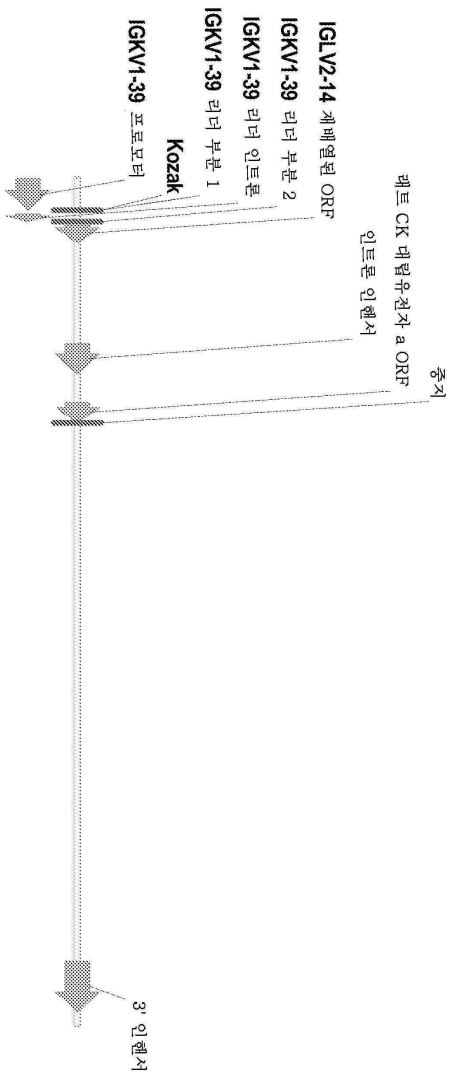
도면7



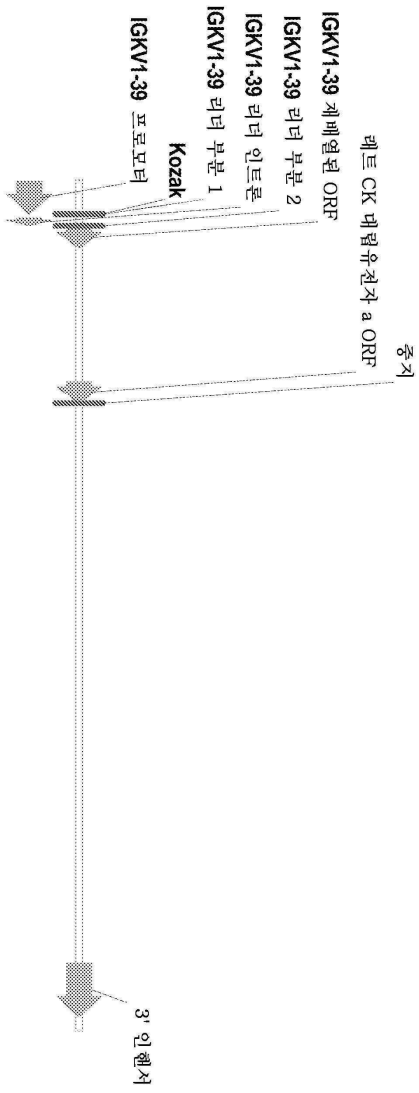
도면8



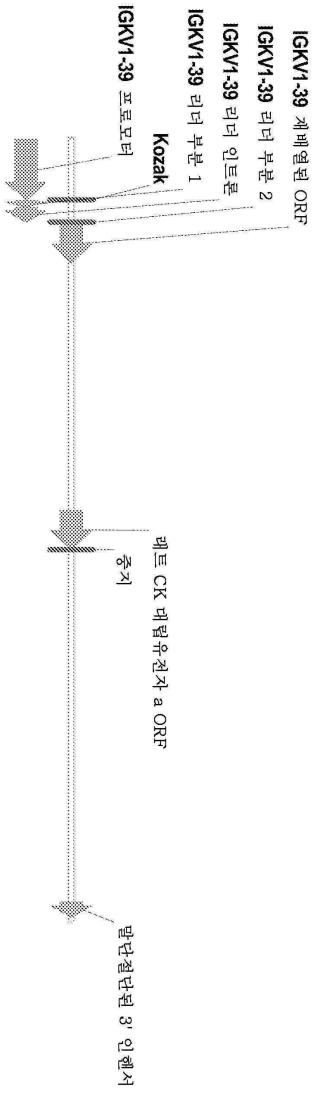
도면9



도면10



도면11



인간 생식계열 IGV1-39/J DNA

1 GAG ATC CAG AAG ACC CAG AAG CCC AAG ACC GTG GAG GGC AAG GTC GAG GAG GAG GAG AAG GAG ACC ATC ACC TGC AAG GGC ACC
 76 CAG AAC ATC AAG ACC TAG CAG CAG AAG TCC TAT CAG CAG AAG GGC ACC GAG AAG GGC CCC AAG CTG CTA AIC TAG GGC GGC AAG
 157 TCC CTG CAG AAG GGC GTG CCG AAG AAG TCC TAG AAG GGC AAG GGC TCC GGC ACC GAG CTG AAG ACC AAG AAG AAG GTC
 236 CAG CCC CAG GAG TTC GGC ACC TAG TAG TAG CAG CAG AAG TAG AAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 323 GAG ATC AAG

인간 생식계열 IGV1-39/J 단백질

1 DIQTQSRHS LRSAYGRVY ITRKASQIS SYINWYQKRF GRAPKELIYA
 51 ASFLGQVPER RFRGSGSGTD FLLTISLQF EDPATVYCCQ SYSTPTPRQ
 101 GTVVRHK

인간 생식계열 IGLV2-14/J DNA

1 CAG TCT GCC CTG ACC CAG CAG CCC GGC TCT GTG TGT GGC AAG CCT GAT CAG AAG ATC ACC AAG ACC TGC ACC GAG ACC AAG
 79 AGC GAC GTG GGC GGC TAG AAG TAC TAC TCC TGG TAT CCG CAG CAG CCC GGC AAG GGC CCC AAG CTG ATG ATG TAG GAG
 157 GTG TCC AAC AAG CCC ACC AAG GAG GAG GGC AAG TTC AAC AAG TTC ACC AAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 236 GGC CTC CAG GGT GAG GAG GAG GGC GAG TAC TAG ACC AAG ACC TAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 323 ACA AAG CTG ACC GTG CTG

인간 생식계열 IGLV2-14/J 단백질

1 QSALIQPASY SCSPPQSITI SCTYTSDDVG GYNYVWYQQ HPGKARKLMI
 51 YEVNRRBSGV SNRFSGSKSG NTRSLITLSQL QAEDEADVYC SSYTSSSLIV
 101 FQSGTKLTVL

라트 IGCK 대립유전자 a DNA

1 AGA GGC GAC GCC GCT CCC ACC GTC TCC ATC TTC CCC ACC AAG ATG GAA CAG CTG ACC TGT GGC GGA GCC ACC ACC ACC ACC
 79 TGC TTC GTG AAC AAC TTG TAG CCG AAG GAC ATC ACC AAG TAG AAG TGG AAG ATC GAC GGC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 157 CTG GAC AAG GTG ACC GAC CAG GAG GAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 236 TAC GAG AAG CAC AAC CTG TAG ACC ACC TGG AAG GTG GTC CAG AAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
 323 AAC GAG TGT

라트 IGCK 대립유전자 a 단백질

1 RADAPATVSI PEPPIBOLITS GQATVQFVFN NRPYEDISYK WKIYSSBQSD
 51 GVLDEVTDDU SKDSTYSKSS TSLIKVETK RHNLVTCVY HTISSSEVVK
 101 SPNENKNC

도면 12a

IGKV1-39/1-CK
 1 GGT ACC GCG GCC ACC ATG GAC ATG AAG ATG CCG GCC CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTC CGA GGT AAG
 75 SAT GAA GAA CAC TAG GAA TTT ACT CAG CCA ATG ATG TGC TCA GTA CTG ACT GAA ACT TCA GGG AAG TTC TCT GAT AAC ATG
 157 ATT AAT AAT AAG AAT AAT TGT TTT TAT TAT TCC AAT CTC AAG TGC CAG ATG TGA CAT CCA GAT SAC CCA GAG CCC CAG
 235 CAG CCT GAG CCG CAG CAG AAT GAT CAG CAG AAT GAC CCA GAT GAC CAG CCA GAG CAG CAG CCA GAT CTA CCT GAA CTG
 313 GTA TCA GCA GAA GCC CCG CAA GGC CCC CAA GCT GCT GAT CTA CCG CCG CAG CCG CCA GAT GAT CTA CCT GAA CTG
 391 ATT CAG CCG CAG CCG CTC CCG CAG CAG CCA CCA CTT CAG CAG CAT CAG CAG CCA GAT GAT CAA GAT GAG AAG CCA CAC CAC TCC
 469 CTG CCA GCA GAG CTA CAG CAG CCC CCC CAG CTT CCG CCA GAG CCA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 547 CAG CGT GTC CTT CCC CCG CAG
 625 CTA CCC CAG AAG CAT CAG CAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 703 CCA GAA CAG CAA GAG CTC CTA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 781 GTA CAC CTG CAG GAT
 859 CGA GCT C

IGLV2-14/1-CK
 1 GGT ACC GCG GCC ACC ATG GAC ATG AAG ATG CCG GCC CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTC CGA GGT AAG
 75 SAT GAA GAA CAC TAG GAA TTT ACT CAG CCA ATG ATG TGC TCA GTA CTG ACT GAA ACT TCA GGG AAG TTC TCT GAT AAC ATG
 157 ATT AAT AAT AAG AAT AAT TGT TTT TAT TAT TCC AAT CTC AAG TGC CAG ATG TGA CAT CCA GAT SAC CCA GAG CCC CAG
 235 TGT GTC TGG TCA TCA GAA CCG CCG CAG CAT CAG GAT CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 313 GTC CTG GTA TCA GAA GAA CCG CCG CAG CAT CAG GAT CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 391 CAA CAG ATT CAG CCG CAG
 469 CTA CTA CTG CAG CAG CTA GAC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 547 CCG CCG TCC CAG
 625 GAA CAA CTT CTA CCG CAG AAG CAT CAG CAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 703 CAG CAG CCA CCA GAG CAG CAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 781 GCA CAA CCT GTA CAG CTC CAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 859 TTG AGC TAG CAG GCT C

VP-IGKV1-39/1-CK
 1 GGC CCG CCC ACA TGA AAC AAT GGG AAC CAT GTG ACA ATC ACA GAG GTG TTG TTA CTA TAG CAA AAG GGA TTG TTA CTC
 79 TCC ACA TCC CTT TAA GTC ACT TAA AAG CCT TAA AAG CCC ACC CTC TAA GAC TTC ATT AAG CAT TCC CTA CCA AAG GTT
 157 ATA CTC TCC TGT ATC CTC CCA ATA CTT TCA AAT ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
 235 TTT TTT CTT TCC TCA AAA TAT CTT TGG TCA CAA CAG CCG CTC TAG AAG GAA ATA CAT TCC CTC CAG GCA AAT CTA TGC TGC
 313 GGT GGT CAG ACC TGG GAC CCT GGG GAC ATT GAC CCG CTG ATT TAG CAA GAT GAG CCA GCC CTG CAG CTG TGC TCA
 391 GGC TGC CCC ATG CCG TGC TGA TTG ATT TGC AAT TGC CAG AAG ACA GGC CAG CAG CAT GAG GAT GGC CCG CCG GGT CCG
 469 TCG CAC CCT GTG CAG GAG TCA TGG TCA TGG ATG AAG GAC CAT GAG GAT GAG GAT GAG GAT GAG GAT GAG GAT GAG GAT
 547 AGT ACT CTG GCT CCG AAG TAA GAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 625 AAG GAA GTT CTG TCA TGA
 703 TCC AAG TAA CCC AAG GGC CCA GGA GGC TAA GAG ACC TAA GAG ACC CCG TGG GCG ACA GAG TAA CCA TCA CCG ACA GAG
 781 GCA TCA GAA GCT ACC TGA ACT GAT AAT AAG ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
 859 TCG AAG ACT TCG CCA CCG ACT ACT GGC AAG TCA GAA GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT
 1035 TCA AAG ACT TCG CCA CCG ACT ACT GGC AAG TCA GAA GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT TCA GAG GAT
 1093 GAA AAT CTT GAG AAA AAG AAG GAG GCT CAT TAT CAG TTG ACG TGG CAG GAT ACA GTG TCA GAT TTT CTG TTC AAT AAG CTA

도면12c

1171 GTR RGR TTA GSG GGA AAA AGA GSC TTT AGT TGA GAG GAA AGT AAT TAA TAC TAT GGT CAC CAT CGA AGA GAT TGG ATC
1249 GGA GAA TAA GCA TGA GTA GTT ATT GAG ATC TGG GTC TGA CTG CAG GTA GCG TGG TCT TCT AGA CTT TTA AGT GGG RAA
1337 TTT GGA GGG GAT SAG GAA TGA ASG AAC TTC ASG ATA GAA AAG GSC TGA AGT CAA GTT CAG CTC CTA AAA TGG ATG TGG
1405 GAG CAA ACT TTG AMG ATA AAC TGA ATG ACC CAG AGG ATG AAA CAG CSC AAN TGA BAA AGG GSC CTG GAG CTC TGA GAA
1483 GAG AAG DAG ACT CAT CCG TGT TGA GTT TCC AAC AGT ACT GTC TTG AGT TTT GGA ATX AAA GGG GSA TNG CAG AGT TGA
1561 GTR AGC GGT AGG CTG AGT TCT CTC TTT TGT CTC CTA AGT TTT TAT GAC TAC AAA AAT CAG TNG TAT GTC CTG AAA TAA
1539 TCA TTA AGC TGT TTG ABA GTA TGA CTG CTT GCC ATG TNG ATX CCA TGG CTT GCT GAA TBA TCA GAA GAG GNG TGA CTC
1717 TTA TTG TAA AAT TTG TCA CAA AAT GTC AAA ATG AGA GAG TCT GGA SGA AGG AGT CTT TAT TAT AMG AGT BAA AAT ACA GHT GGG
1795 TTT TTC TGT TGT CTC ATT TCT TAA TGA TAA ATG TGG TAA GAC ATT TGG TCC TTT GTT TTC CCA GTT ATT ACT CGA TTG TAA
1873 TTT GAT CTA TAT GTT TTA ATG GGC AGG GTT TTG TAA GAC ATT TGG TCC TTT TTA CAA CTG GGT GAG CTC GGG GGT GNG CCA GGC
1951 TTT TGG GGT TCA CCC TGC TGC TAA GGG CCA TCC TGT TTT TTA CAA CTG GGT GAG CTC GGG GGT GNG CCA GGC
2029 ATT TGG GGT TCA CCC TGC TGC TAA GGG CCA TCC TGT TTT TTA CAA CTG GGT GAG CTC GGG GGT GNG CCA GGC
2107 GAG GCA CAG TGA TNG GAA CAG AAC CAG TAA TCT GAA GAG AAC AGA GAT GNG ACA GAT TAC ACT AAT GNG ABA AAA ACA
2185 AAG AAA GGG TGA CTT ATT GGA GAT TTC AGA GAT TTT ABA AAT AAA ATG CAG TTA TTA TTA TAT TCC CTT ATT TTA ATT TTC TAT TNG
2263 GAG AAT BAA AAG GSC AHA AAC TGT TTT AIC CAG TGT AAT ATT TGA CTG AAC TCT CAC TAA ACY CCT CTA AAT TAT ATG TCA TAT TAA
2441 CTA CAG CCA GCA BAA GTC ATG GTA AAT TGT TGA ATG ACC TTA BCT GBT TNG GTA GAA TAT TTT TCT TCA AAT TAT ATG TCA TAT TAA
2419 GTR GAT BAA TTA BTA TBA ATT TGT TGA CAA BAA TAT TTC CCA ATX TAC TAT TTT TGT TNG GTA GAA TAT TTT TCT TCA AAT TAT ATG TCA TAT TAA
2497 CCA TAA TTT TGA BAA CTA TTT APT AGC TTT TGT CCA ATX TAC TAT TTT TGT TNG GTA GAA TAT TTT TCT TCA AAT TAT ATG TCA TAT TAA
2575 CCA TAA TTT TGA BAA CTA TTT APT AGC TTT TGT CCA ATX TAC TAT TTT TGT TNG GTA GAA TAT TTT TCT TCA AAT TAT ATG TCA TAT TAA
2653 AAA CTT TTG AAA CTA CTT TNG AGT CAT TAA GAT AAT TAA CCA CTA TTT ACT TTA AAT ACT TTA BAA ATG TGT TCA TAT TAA
2731 AAC TAT TBA TTT AAT TTA AGG GGA AAG CTG CTG AAT ATT CTA TTG TTT TTC TGG GGA AAG AAC TGT CAG TTT TGG
2809 TTT TTA GCA CCT CTG TGA CCC GTP CCA GTP COT CCG AGG AGT TGG CAT CTC AAC BAA GGG GAC TTT CCG ABA GGC CAT CTG GCA GPT TGA
2887 GAT CAG AAG TGA AGT CTG CCA GTP COT CCG AGG AGT TGG CAT CTC AAC BAA GGG GAC TTT CCG ABA GGC CAT CTG GCA GPT TGA
2965 TTR TGC GAT GTR GAT ABA AAC GAT TGA AGC AGG GTC TGA TGA AAT TTT GAT GAT AAT TTT TGT GGA GAG CCA AAT TAA GAC
3043 COT GGT TTA GAG CCG TGT CCA TAC AGT AGG TTT AGC TTT TGT TGT TNG ACA CCA AAG GAA GAT TTA GAG CCG TTA GAG CCG TTA GAG
3121 TAT TGT TGG RAG SAG CAG SAG SAG AAT ATG AAT TCT TGA AGT AHA GAT TTA GAT CTG AHA CTG AHA AAG ATG TGG TTT TCA GAG TCT CAA AHA
3199 GCA GTR TGA SAG RAG CAG GAT TGA AAT TCT TGA AGT AHA GAT TTA GAT CTG AHA CTG AHA AAG ATG TGG TTT TCA GAG TCT CAA AHA
3277 GCA AHA TGA SAG RAG CTG AHA TTA TAT TTA AAT TCT TGA AGT AHA GAT TTA GAT CTG AHA CTG AHA AAG ATG TGG TTT TCA GAG TCT CAA AHA
3355 AAT AHA TGA SAG RAG CTG AHA TTA TAT TTA AAT TCT TGA AGT AHA GAT TTA GAT CTG AHA CTG AHA AAG ATG TGG TTT TCA GAG TCT CAA AHA
3433 TTT TGT GTR TTT GTR TAT AAC RAG CTG GTT TAC ACA TAA TAC ACT GAA ATG GAG CCG TTA TCT GTR SAG AHA AGC TTA TAC GAT
3511 CTT CTT TGT TGT CTT CTT CAG SAG CCG AGG CCG CTC CCA CCG TGT CCA TCT TCA TCT CCG CCA SCA TGG BAC AGC TTA TAC GAT
3589 CTR GCG SAG CCA CCG TGG TCT GGT TGG TGA ACA ACT TCT ACC CCA GAG AHA TCA GCG TGA AGT GSA AHA TGG AAG TGG ACG GCA
3667 GGG AGC TGA CCA AAG TGG AGT AAG AHA GAG ACT TST ACA CCG AGG AHA AGS ACT CCA CCA AGT CCG CAG GCA GAT CCA GAT CCG
3745 TGA GCG TGA CCA AAG TGG AGT AAG AHA GAG ACT TST ACA CCG AGG AHA AGS ACT CCA CCA AGT CCG CAG GCA GAT CCA GAT CCG
3823 TGG TCA AGT CCT TCA ACC GGA AAG TGG AGT AAG AHA GAG ACT TST ACA CCG AGG AHA AGS ACT CCA CCA AGT CCG CAG GCA GAT CCA GAT CCG
3901 AIC TGC CTT TCT AAG GTC TTS GAG GGT TCC CCA CAA GAG TAC CAC TGT TGT TGT GAG AAT AIT GCA TAA AGT SAG TCT TGG
3979 TCC TTT TCC TCC TCC CTT TCC TTT CTC TTT ACT AIG CTA AHA TTT GCA TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA
4057 CAG TTG AHA TTT AGT TCC CCT GAA ATG AAT GAT AAT CAG TTT TTT CAG TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA
4135 AGT TAA ATG TTA AGT TCC CCT GAA ATG AAT GAT AAT CAG TTT TTT CAG TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA CTT GAT TTA
4213 CAC TAC ATG GCA GTC CTT TCT AAG GTT CAC GAG TAC TAT TGA TGG CTT ATT TCT CTS GAG CAT GAT AAG TTC TGT AAT
4291 GCA TAC TTG GTA GTT TTC CCG TAA GTC TAC TGA TGG GTC CTS AAG GSA AGC APT TAC AAG CAG ACC TAA ATG TGC
4369 CTR AIT CAA CCT ACC CAG TAA ACT TGG CCA AAG GTC AHA GHA TGA TTT TCA TTT CCA GAG CCA GAT CCA GAT CCA GAT CCA
4447 AAG CAA TNG SAA AAT GNG SAA GGC CAG TTT GCA TGG CCA AGG TTT AAT AGT ACT TGG ACT TCA TTT GCT TTA CCA GAT CCA GAT CCA
4525 TGA CCT GGC TCC TAT CTG CCA TTG CCA AGG TTT AAT AGT ACT TGG ACT TCA TTT GCT TTA CCA GAT CCA GAT CCA GAT CCA
4603 ACA CAG ATX CAT CAA AAT TTG GSA BAA GTT CTA CCA BAC TGA GAG CTG ATC ACC CCA CTA CTT CTA GAT CCA GAT CCA GAT CCA
4681 ACA CCA GAA BAC TTA ABA ACT BAC GAC TAC TTA TGA AAG TGT BAA ACT CAT TTA TGA AAG TGT BAA ACT CAT TTA TGA AAG TGT
4759 CAC CAA CAG TTA AAT TAT GAC ATG TTT GAC ATT GAG CTA TTA TAT BAC GAG AAT TAA TAA AAT AAA ACT TAA GAG
4837 CAT AGT TTA ATC TGA TAA ACA BAA TAA TAA GCA AAA CAA AAG AAT TTT TTA TCC ATG TTA GTT TAA AAG CAG GTA AAA

도면12g

1487 AAT AAT AAT TTA GCA CAA AAA TAT TTG CGA ATA CTT TAA TAC TGT GAT ABA AAA ATG TTT AAC TCA GCT ACT AAT AAT
 1494 GAC AAG AAA AAA TGA AAA CTA TTT AAT TGG CTA CAC CAA AAG AAG CCA TAC TAC ABA GGC TAA TAT CAG AAT AAT CTT GCA AAA
 2574 AAT AAC TGG TCA GAA TCC CTA TCG GCT CCA ACC TTA TGG TGA TGA AAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 2732 AAT AAC TGG TCA GAA TCC CTA TCG GCT CCA ACC TTA TGG TGA TGA AAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 2839 GCT TGA AAA TTT
 2889 CAA CAA GAT TGT AAT TTT
 2967 TAT AAT AAT TGA TGA TTT
 3043 TTT GTC AAG GAT CCA GAT TTT
 3121 CTT GAT CTA CTT
 3199 CAG CAG GAT GCA
 3277 GAT
 3355 CAA CCG GAA
 3433 AAG TCT TGG AAG CTT CCG CAC AAG GAA GAT TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA
 3511 GAT CTT TCT TCA
 3589 TGT CTT TCT TCA
 3747 GTC TTT CTA AAG TTT ACG AAT
 3833 TTT TCT TCC CTT AAG TCC AAG TGG TCA AAT TCA ACC CTA CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
 3901 CCC AAT AAA CTT GGC GAA GCA AAG TGG AAT CAA TAT CAC AAG AAG CAA GTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 4057 AAT TGG AAG CCA AAT
 4135 AAT TGG AAG CCA AAT
 4213 TAA GAA GCA ACC AAT
 4369 CAA CAA CAA TGT TCA CAA TTG AAG TAT TAC TTA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4447 AAG AAT TAA GAT TTT AAG TGG CAA GAT AAG AAG TAT TAC TTA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4523 GAT ACT AAT GAT GAA TTT AAG TGG CAA GAT AAG AAG TAT TAC TTA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4603 CTA AAT CCC AAT GCA TAC AAT
 4681 AAT CAG GAT CAA AAT CCG TCC TTG GAG TCA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4759 CAA CCA CCA GAT CCG TCC TTG GAG TCA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4837 AAG CCA CCA GAT CCG TCC TTG GAG TCA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 4915 GGA AAG
 4993 CAA CCA CCA GAT CCG TCC TTG GAG TCA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 5071 TCC CCC AAT TAA TAT GCA CAA TTT CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA
 5149 CAG CAA AAT GAA AAG GGC AAC CCA TTT CCG TCC TCC CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
 5227 TTA AAT GCT TTT
 5305 AAC AAT GCT TTT
 5383 CCC AAT
 5461 TAA TCT AAT
 5539 CAC AAT
 5617 CAG AAT
 5695 AAT TGT TGA CAA TGT CAA AAT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 5773 TGA TGT TGA CAA TGT CAA AAT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 5851 AAT TGT TGA CAA TGT CAA AAT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 5929 CAG CCG AAG AAG CAG GCA GAT CAG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 6007 GAT
 6085 AAT TGT GAA CTT TGG AAT TGG TGT
 6163 TAC CAG TCT AAG AAG TTT CAA AAC TTT CTT ACT GAA GAA GAT TCC CCA TGT GAG ACC CTT ACA GAC TCT TTT GCT CAA

도면12h

6241 AAA ACT GCT TCC CTG CTG CTG TGA TAT CTG TTT TGC TTT TAT GAT AGC ATA ATA TTA TAA GAA ANG TTT GNG TGA ATA
6316 AAC GAA AOA TAT GAT AAA AGC AAA TAT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
6397 TCC KKA AHA CTG GAT CCA AAT AAA TCC TCA TAT CAA TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
6476 GAC AAG GAG ABA GAG CTG GAC GAT GGC ATC GNG GAG ABA GAC TGA TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
6553 TCC AKA AOG CAC CAA KAG NAG GAG GAT GCG TCA TAA TAT GGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
6633 CTT TTT GCT TAA GAC TTG TTS CPT TCA TAA GAA CTG TGA GAA GAT GAC TTG GAC TTS TGG TAA GCT GCA GTA TGT GGC APT
6709 TTT TTA ABA TAA GAT CAA GAA KIC AAT ABA AIG GAA AOA GAA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA ABA
6787 AAT TTT
6865 GAG GAT TT TTT GAT TTT
6943 TTT
7021 TCA GAG GAG AIC CTG TAA TTT CAA AAT ABA GAA TTT TGG AAT GAG AAT GAG AAT GAG AAT GAG AAT GAG AAT GAG AAT
7099 ACT TAT
7177 CAA TTS ATG TTT CTG GAG ABA GAA TAT GAA TAC AAT TTA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA
7255 TAA TGT CAG ACC CAG AAG TAT GCA GAC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
7333 CTT GSA AHA GAA AIT MAG GAT AAA TAC AAT TAA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA AHA
7411 AAA AAA AAT CCA GAA TTA GAT CTT CTT CAA AAT TGC TAC TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
7489 AAA ABA TAA TAA GAA TAA
7567 GCA GAA GAA AAG GCT GAT AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
7645 CCT AIC TGT TAT
7723 GAG TCC TTT TTT CTT AHA ACC AAG CCC CCA GHA TGC TCA TST AAG TAT CAG GTC CTT TTA AAG GCT TAA TTT TTC AAT
7801 GAT TAT AAT TAT
7879 ABA GAT TGT AOA AIG TAT TTT TGA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
7957 CTA TAT AHA TGA GAT AAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
8035 TTT CAC TGT AHA GGC CTG GCT GTC CTG GAA CCG ACP TGG TAA ACC AAG CTG SCC TCA AAC TCA GAA ACC TAC CTG CCT
8113 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT
8191 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT
8269 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT
8347 TCT CAT TCT AIT TCT AIC ABA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
8425 TGT AIT GAT
8503 CTT TGC TTT GCT TTT
8581 GAA GAA ABA AHA
8659 ACT TGC CTT
8737 CAA AAG TTT CTA GAC TTA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA
8815 TCA TAC TCT AHA CTT TAT DAG ABA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA AHA TAA
8893 TGT TTS CCA TCA TGC AHA GGC TTA GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG
8971 ACT GSA AAG CAG TGC CCT DAG AIT CTT TAC TGA AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT AAG GCT TTT
8948 TTT AAT GHA TAA TTT TTT TAT TAT TTT CAC TAA TTT TAT TTT TTA TTA TTT TTA TTA TTT TTA TTA TTT TAT TAT TAT
9127 AAT AOA TGG AOA AAA AAA TAC AAG AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT
9205 AAG AIT CAA CAC TCA TTT TTT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
9283 CTT TCC CTT
9361 TTT AAA AAA CCA CCA GGC GCT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
9439 CAG CTT TGG GSA TTA CTT TTT AAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
9517 TTT TGT AAT TCC TTT AAT AAG GGC CTT GAT TCC CCA AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT AHA AAT
9595 ACT GGC AHA GCT TCA CAA ABA ABA GAG AAG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
9673 CTG GAT TGG GAT GHA TAT
9751 AAA CTT TGT TAT
9829 TTT CTT
9907 AHA TCA TGC GAT TTA TTT TAT

도면12i

9385 TTC AIT AAT TCA CTG TTT TTA ATT GCT GAA TNG TAC TCC AIT GTS TAA ATG TAC CAC AAT TTC TST AIC CAT TCC TCT
 10663 GTT GAG SSS CAT CTG GGT TCT TTG CAG CTT CTC GCT AAT ATR AAT AAG GCT GCT AIG AGC ATA GCG GAG CAT GTS TCC
 10131 TTA TCA AAT TGG AAC ATC TTC TNG GTA TAT GTC TNG GTA TAT GTC CAG GAG ACG AAT TGC TNG AIC TTC CCG TNG TAC CAT CAA CAT GCA
 10219 ATG ACC AAT AIC AIC AIC CTA GAA GAA GCG CTA GAA GCG CTA GAA GCG CTA GAA GCG CTA GAA GCG CTA GAA GCG CTA GAA GCG CTA
 10277 ATC ACC AAT
 10375 CTC ATC CAT AAT GAG ATT GAA GCG TTA GCT GGA GCA CAT TAA TAA GCT CCA TTA AAT TCA GAG GAC TCC CCA CTA TCC CTA CTT
 10433 AAT TGT TTT CAA TNG AAG AIT ATR TTA TCT TAT ACC CAA TGA CCT CAA AAT TTG ACT AGA AAA AAT GTA GAA AAT AAT AAT AAT
 10481 AAT AAT TTC ACC AAA GTS TTA TGA TGC ACC ACA TCC TTA TTC TTC TCC CCA GCT TCT GCT TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC
 10689 GTA TCT CAC AAA ACG TTC CAC ACT GAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
 10765 CTC AAG AAG GAA AIG ACG GCG ACG
 10843 TAA TTT CTC ATG ATR CTT CAC ACT GAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
 10921 TGA GTG TTA TNG AAT GAG TNG AAG
 10989 CAC AAG TGG CAT AIC AGA TAT CCA TAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 11077 GAA TGT TGA GAC CCA CTG TAA TNG GCT CTA TAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 11135 ACA TTT GGC ACA TGG TAA GCT CTA TAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 11233 CTG TCT ATC ACC CAT CTA TAT AAT
 11389 AAG CAT AAG AAT GAA ACA TGA ATG ATG ACC AAA TNG GAA AIC CAT GTA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 11467 CCG TCT TGC AAG ACG AAT TTA GTC CTA CTT TGC TAC TNG TAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 11545 GAT CAT GCA ACC AAT TAA GTC CAA CTT GGC AAG GAA TCA TCA GTS AAT AIC CCT AAT GGG AAA ADA CTT GGA AAT GAA ATG TGA
 11761 TTT TGT ATG GTT GCT GAT TCC GGA ACG AAG GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA
 11879 CAT TTA ACA GAT TNG GAG ATG AAA CAG CTT AAG ACT CTG TGT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 11935 GAG AAT TGG AIG TTA AGA TGT GGT GAG TCA TAA GAG GCA GAA TTT GAA TTT GAA TTT GAA TTT GAA TTT GAA TTT GAA TTT
 12013 AAA TTT GGA TAA GGA TCT AAG TAT TAT CAG CCA ACG TCT TCT ACC AAT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT
 12149 CCG ATC CCG CAT ACC AGA CTA AAG TAT TAT CAG CCA ACG TCT TCT ACC AAT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT
 12287 TTT GGA GAG TCC CAT GSA CCA AAG TAT TAT CAG CCA ACG TCT TCT ACC AAT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT TCA TTT
 12463 CCG TTT CAA GAT TCC AAA GCG TCA TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC
 12481 AAA ATG ATA CCG CAC CTC CAT CTT GTT TGA TAT TCC TTT AAT TCA AAG CCG AAG TTA GTC ACT GGG CCG AAT GAT CTT
 12559 GCG CAT TGG SAA AAG ATG TTT CAT GGG GCG CAC CAT TCT AAG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 12637 AAG CAT TGG SAA AAG ATG TTT CAT GGG GCG CAC CAT TCT AAG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 12715 TAA ACA CCG CAC CCA TAA CAA AAG AAG TAT TCT CTT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT
 12871 TAT TTT TTC TNG ACG GCC GGC C

도면12j

Vkp-IGKV1-39/J-CK-A2

1 59C CGS CGC ACA TGA AAG AAT GCG AAC CTT GTS ACA AAG ACA GAG GTS TTS TTA CTA TNG GAA AAG GGA TNS TTA CTC
74 TCC AQA TCC CTT TAA GTA ACT TGA AGS GTC GAT AGA ACA ACC ACC CTC TAA GAC TTC ATT AGA GAT TCC GGA GAA GAA ATG GTT
152 ATR GTC TCC TGT ATR TTT CCA ATR CAA TAT ATR TTA TTC CAA ATR ATR TTA TTC CAA ATR ATR CTT AGS TTT GTR TTA AAG TTT GAC
135 ATT TTT CCT TCA AAA TAT CTT TTG TCA CAA CAG CAG GTC TAA AGA ATR ATR CAA TCC CTC GAG GAA AAT CTA TGC TGC TGC
313 GCT GAT CTA ACC TGG GAC CTT GAG GAC ATT GTC CTA GAT TAC TAA GAT GAG CAA GAC CTA GAG GAA GAT TCC CTC GAG TGC TGC
391 GCC TAC CCG ATG ACC TCC TGA TTG ATT TCC ATG TTT CAG AGC ACA GGC CCC TCC CCT GAA GAC TTT TTT AAG GAG TGG
969 TCG CAC CTT GTS CAG GAG TCA GTC TCA GTC AGS AGC CAG CMT GSA CMT GAG AGT GGC CAG CCA TGT GAT CCA GAT GTS AGC CTT
547 GCT ACT CTA GAT CCG AGS TAA GAT TAA
625 AAG GAA GAT CTC TGA TAA CMT GAT TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
703 TCC AGA TGA CCG ACC TGA ACT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA
781 TCC TGA GCA GCG TGC TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA
959 CCG AAG ACT TGG CCA CCT AAT ACT ACC AGC AGA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA
927 TCA AAC GTA AGT AQA CTT TTC TCA TGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1615 GAA AAT CTT GAG AAG GAT ATR
1171 GTG AGA TTA GSA TGA TGA GTA GAT ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
1249 TTT GSA GGG GAT GAG GAA TGA AAG AAC TTC AGS ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
1327 GAG CAA ACT TTG AAG ATR
1405 AAG AAG GAG ACT CMT CCG TGT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA GAT TCA
1483 GTG AGC CCG AGS CTA AGT TCT CTC TTT TGT CTA AGT TTT TAT GAT TTT TAT GAT TTT TAT GAT TTT TAT GAT TTT TAT GAT
1551 TCA TTA AAG TAT TTT
1639 TTA TTC TTA AAT TTG TCA CAA AAT GTC AAA ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
1712 TTT TTC CTT TGT CTT
1795 TTT GAA CTA TAT GAT TTG ATR
1873 TTT TAT ATR GCC AGC AAT GGA CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG CTA GAG
2029 AAT TGG CPT TCA CCG TGG CCA TGT GAA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
2107 GAG GCA CAG TGA TNG GAA CAG AAG CAC TAA TCT GAA GAG AAG AAC ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
2185 AAG AAA GGG TGA CTT AIT GSA GAT TTC AGA AAT AAA ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
2263 AGA ATT AGA AAG GGC ATR AAG TGC TTT ATR CAG TGT TAT CMT ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR
2341 CTA CAG CCA GCA AAA GTC AIT GTC AAT ATT CTT TGA CTA ACT CTT TGA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA
2419 CTG GAT AAA TTA TTA TAA AAT TGT TAT AAT ATT ACC TTA ACT GAT TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG TNG
2497 AAT AAT AAT TTA
2575 CCA TAA TTT TTA AAA CTA TTT AAT TGG CAA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG CTA CCG
2653 AAG AAG AGA AAA TGA AAG CCA GCT TGT GCT ACC TTA TGA TGT GAT CAG ACT CCC AAA CAT CAG GAG TGT GAG
2731 ATA AAC TGG TCT GAA TCT CTG TGT GAA GCA TCG AAC TGA TAA GAA TGT AAT TTT AAG GAA GAA TAA TAA TAA TAA TAA
2809 GCC TAA GAA TAT CTT CAA AAG GTC ABA CTC AAT TTA CTT TCT TAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA
2887 CAA CAA GAT TGT ATR TAT GTG GAT TAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
3043 TAT ATR ACA TAA CTA TTT ACA CAG CAC CCA CTA CCG CAG AAA TGG AGC CTT CCG CCG CAG CAG GAA GAT CAG CTT GGT TGT
3121 CGT GGT CTA GAT CCG CAG CCG GGC CAG CCG CCA CCG CAG AAA TGG AGC CTT CCG CCG CAG CAG GAA GAT CAG CTT GGT TGT
3199 CCG CPT CTA GAT CCG CAG CCG GGC CAG CCG CCA CCG CAG AAA TGG AGC CTT CCG CCG CAG CAG GAA GAT CAG CTT GGT TGT
3277 GAT GGA GTA CAA GAG GTC CAA CCA CCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA
3355 CAA CCG GAA CAA GAT TGG AAG ACA AAG GTC CTA CCG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
3433 AAG TCT TGG AAG CTT CCG CAG AAG GTC ACC ACC GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
3511 CCT CCG TTT CTT CTT TGG CTT TTA TCA TGC TAA TAT TTT TGG CAG AAA ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR

도면12m

4369 TTC TGT AAT CTG ATT CAA CCT ACC CAG TAA ACT TGG CGA AGC AAA GTA GAA TCA TTA CAG GAA GCA AAG GCA ACC
4447 TAA ATG TGC MAG CAG TAC
4523 TTT TAA ACA TGA TGA GCT GGC TCC TAT CTG CCA TTA TGG GCA MAG CTG GGC ACT ACC CAC AAC CTA CTT CAA GGA CCT CTA TAC
4603 CQT GAG ATT ACG CAC AYA CAG TAA TGG GAA AAG GAT TGG GAA AAG GAT TGG GAA AAG GAT TGG GAA AAG GAT TGG GAA AAG
4681 TAT CTC TGT ACG CCA GAA ACC TTA TGA AAC ACC AAG CAG TAT TGA GAG ACT CAT TTA TGA AAG TCT AAA ACT GGA TAC AAC
4759 CAA AAT GTC CAG CAA CAG TTA AAT TAT GAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
4837 ACT TAA GAG CAT AAT TTA ATC TCA TAA ACA ABA TAA TAA GCA AAA CAA AAC ATT TTT TTA TCC TCC ATG TAA GAT TAA AAG
4915 CAG GTA AAA TTT AAT AAT AAG ABA GAC ATA AAT TTT GAG GTA GCA ABA TGG AAA CTC TGG GGC TGG GGG AAT GTT CTA
5071 TCT CTC TGT ATG GAA TGT ABA AAT TAC TAT TGT GAA ATT GGG ATC TGA ABA GAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
5149 CAA AAA GAC AAT AAA GAA ATA TCT AAT ACC CAG TGG ATG CAG TGA AAT CTC CCA CCA CCT TGA GGC TTT ATG CAT GGA AAT AGC
5207 TCA AAG TAC AAA ACG CAT AAT TCA AAC ACA TGA TCC CTC CTT GGG GTC TCT TCC ATG CAT GGA AAT AGC
5305 CAT GTA TAA AAT GAG ATA GAG ACC TAC ATC AAC GGG TCA AAG AAT ATA GAT AAT TTT GTC TGG GTA TGA ABA GGC
5383 CAC GTA TGA MAG GTT ACA TTA GGG AAG GAA GAG GAG ACT AAC AAT GAC TTT CAT TCT CCC CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
5461 TGC AAT TGA TCC CTC GTC GGC TCA TCC ACT CAG CAG CAC KCA TTT AAT AAG CAT CTT CTC AAG CTA CAC TCT GAA GGC AAT
5539 GCA GAT TAA TGT TGA TGT CCC TTC CCC CAG TTA ATG TGG AGT CCA GAT TCC CTC CTG CTT CCC TTT CTC AGT CGA CAT
5617 AAG GAT GAT GGG ABA GGA CAG TCA CCA AAT AAG ABA GGG CAA CCC TTT GGC TTT CTA CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
5695 TAT CCA CTT TTT GAA ACT TCT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
5773 CTG GGA ACC AAA TTT ATC AAT GAA CAG TGC CTC TAA TCT GGC TAT TAA TAC AAA GAT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
5851 TGG AGT CTT ATC TAA AAC ABA ACC CAC AAT AAA GAA GAA ABA ATA CAT ATA AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
5929 TGG ABA GAA ABA GAA GAG CAG ATC ACT GAT CCT AAG ATC TGA GGA TGT TAC ABA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
6007 TGA CAA GAA GAA TGT TCA MAG TCA CAG AAT CAC TGT CTT GAT TGT AAT GAT TGT AAT GAT TGT AAT GAT TGT AAT GAT
6085 AAT GAT AAT TGG ACG ABA AAG ABA AAG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
6163 AAT GAT AAT TGG ACG ABA AAG ABA AAG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
6241 AAT GAT AAT TGG ACG ABA AAG ABA AAG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
6319 TTT GGA TAA CTA ATG ABA AGC CAG TTT ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
6397 CCT AAG CCT CAG ABA GAA GGC CCT GTC GGC CAG GAA GCA GGC AGC ABA GAT AAG AAG TAA ACC CAG GAG CCA TGA TAT
6475 CCT AAG CTA TGT TTT
6553 ACT GGC GAA ABA CAT TAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
6631 CCT TGT CTA TGT TTT
6709 CCT TGT CTA TGT TTT
6787 AAT AAG AAT GAT GAT TGT TGT GAT AAT ABA CAC AAT TTT TAA MAG CAA ATA TGG GAT CAA GAT CAA GAT CAA GAT
6865 TGG TCA AAG AAG AAT ABA AAG
6943 AAT AAG AAT GAT GAT TGT TGT GAT AAT ABA CAC AAT TTT TAA MAG CAA ATA TGG GAT CAA GAT CAA GAT CAA GAT
7021 TGG TCA AAG AAG AAT ABA AAG
7099 AAT AAG AAT GAT GAT TGT TGT GAT AAT ABA CAC AAT TTT TAA MAG CAA ATA TGG GAT CAA GAT CAA GAT CAA GAT
7177 CTA AAG CCA GGC CTT CCT TCT TAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT
7255 TGT TTT GAT TGG GAA GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG
7333 TGT TTT GAT TGG GAA GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG
7411 TGT TTT GAT TGG GAA GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG GAT TTT TGG
7489 TTT TAT CTT TAA TAT TTA CTT ACT TAC TTA TTT TGT GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
7567 TTA TTT ACT AAT GAG GAG CTA CAG ACG AAT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
7645 GCA ACT AAT GAG GAG CTA CAG ACG AAT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
7723 GGG TCA ACC ATG TCT CTG TGG GTG AAT TGA CAG TCC GCA GGA GTA TGC ABA CAA CCA AAT TTT GAG AAT AAT GAT TGT GAT
7801 AAA AAT AAA AAG GAT GAA GGT TGG GAT AAG TAT TAA GGA TAA ATA CAA TTA AAT ACG AAN TAT TGT GAG AAC TTT ACG
7879 AAT AAA AAG AAT TTT TCT TTT
7957 AAT TAA ATA AAT TAT TAT AAT GAT GAA AAG AAG AAT AAT GAG TGA TGG ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
8035 GAG GAA GAT AAG GAA GAA GAA AAG AAG AAT AAT GAG TGA TGG ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT

도면12n

8113 AGC CAG GAT GGG TAT TTC TTT GGC TAT CTG TGA CTT GCA GAT GGT CTT GGC AAT TAT TAT TGA TGA GTT CAA GGC TTA ATT
9131 CTT CAC TTG TGC CAA CTC MAC MAA GTC TTT CTT TCT TAT TAC CAG GGC CCC AGT ATG CTE ATG TAT GYA TGA GAT GAT
8289 CTT ATC TCC TTA TAG CAA TCC TGT TTA TGA CTG GGT MAC TTT GTS AAG GAA TAT AAG TAG TGC ACA GTC TAT GAT ACA
9347 ACT TTT TAA TAC TAA AAT TTG AAG AHT TTG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
8425 TAT TAT GAT TTT GGA GAC AAG GAT TCT CTG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
8503 TAT TAT GAT TTT GGA GAC AAG GAT TCT CTG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
8581 AAA CTC AGA AAC GTA CTT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT
8659 GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT
9737 GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT
8915 GGC CTC AAG AGT AAT GGC AAG TTG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
8971 TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT
9049 TTT TTT CCG SAG SAG GGA GGG TGG AAG AAG AAT CTT ACT ATG AAG CTC TGA CTG TCC TGG SAA CTC ACT ATA TAG ATC
9127 AAG CTT GAT TCA ACT CMT AGA GAT CTG CTT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT
9205 AAG TAG TGA TCC CAA GAT TTA GAA AAA GAT TCT AGA CTT TCT AGA CTT TCT AGA CTT TCT AGA CTT TCT AGA CTT TCT AGA
9283 ACT AAT GTS SAG TTT ACC TGA ATC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
9361 TAG AGC CAG CAT TCA AVG GGA GTG TTT GGC TAT ACT TTA TCA AGC CAT AGG CTT AGT CTT CAG TGC TGA AAG GCA TTG SGG GCA TAG
9439 TTA CTC ATT ATG AAG ATG AAG AAC TGG AAG ACC AAA TAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
9517 AAA ATC TTT TAC TTT CAA TAT TTT TAA TGT ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
9595 AAG AAG TAA ATG CAA TAA ACC AAA TAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
9673 AAG AAG TAA ATG CAA TAA ACC AAA TAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
9751 GCT ATC CCC AAA GGC CCC TAT ACC TCT CCG TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC
9829 CTO TAT ACT SAG GCA TAT GAT CTT CAA AAA ACC AAG SGC CTC TCC TCT CMT TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG
9897 GCT ACA TAT GCA ACT AGA SAG ACA GGT CTG SGG GTT ACT GAT TAG TTC CTT CMT TAG SGG CCC TGT CTC CCA TCC AAT AGA TGA CTG TGA GCA
9985 CCG CTT TAG CAC CTT GSA TAC TTT CTO TAG TTC CTT CAT TAG SGG CCC TGT CTC CCA TCC AAT AGA TGA CTG TGA GCA
10063 TCC ACT TCT GHA TTT GGC AGS CAG TGG CMT AGC CTC ACG AGA AAG AAG AAG CTA TGT CCG AAT AGA TGA CTG TGA GCA
10141 TTT CTG GAT TAT GCA ATG GHA TCT GGG TTT GGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
10219 TCC TTG CTT CCA TCT CAG CTC CAA ACT TTG TCT CTG TGA TAT GAT TAT GAT TAT GAT TAT GAT TAT GAT TAT GAT TAT GAT TAT
10297 GTG AAG AAT CCA CAC TTT GGT CTT GGT CTT CTT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT
10375 ATG TCC ACG TAT CAG TGA GTG CMT ATC ATG CPT GAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
10453 ATG CAT CCA TTT CCA TTC CTA TGT TGA GGG GCA TCT GGG TTC TTT CCA GCT TCT GGC TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
10531 CAG TTT CTT TAT CCA TTT CCA TTC CTA TGT TGA GGG GCA TCT GGG TTC TTT CCA GCT TCT GGC TAT TAT TAT TAT TAT TAT
10609 GAG CAT AGC GAA GCA TGT GTC CTT ATG AAG TGA CAG CTT CTA GGG ACT GHA TGC CCA GAG AAG AHA TTC CAA CAT AAT
10687 CCG GTA OTH CCA TCA ACA TGC ATG CTT CTT AAG AAG COT AHA ACA AAG AAG ACT GHA TGC CCA GAG AAG AHA TTC CAA CAT AAT
10765 AAA GGT TAT GHA TGA CAA ACT CMT CAG CAA TAT CCT AAA TGA AHA CCA TTA AHA AAG TCC ATT AAA ATC AAT
10843 GAA CTG CCC ACT
10921 CAA ATG GAA AAA TAT TAA GAT TAT CAA TAA TTT TGA TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
11000 TGG TTG CTT CTT TCT
11078 GCT GTA ACT CAC CTG TGA CTG AAT ATG TCA AAC GAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
11155 GCT ATG AAG CTG TGT ACA TAG TGC AAT GAA SAG AAT GAG AAG SAG AAT GAG AAG SAG AAT GAG AAG SAG AAT GAG AAG SAG
11233 GCA GAG CTA AAG TTC TCA TAT TGT AHT TCT CMT ACT TCA CAC TGA SMT GTT AIT AHC TGT AHC TCA TAG SHG AAG AAG
11309 TAT GGG TCA AAG TCC CTT TTT ACA GAG GTT GCA TAT CAG ATG TCC TAA TTT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
11387 TAT
11465 TAT
11543 TAT
11621 TAT
11701 TAT
11779 TTT AAA TGG AHA AAG GTC TTC ACT GTG TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT

```

11857 AAA TSC AAA AAT CCT GAA COT AAG ACA TNG CAG TGA BAC AIT GAT GAC CAA AHA GGA AAT CCA TST ABA GAC CTT CTA
11876 TCT TCT GAT GCG TCC AOA GGC AOC AIC TNS CAA GAG AOT TCT AOT TNG CTA CCA GHA AHS AAT ACA GAG TCT CAA CTT
11913 CTS CCA TNG AAT CPT CAG GAA GOC CTT GAA AHS AOT TST AOT AOA CCA TTP CTT ABA GAG ABA AAT AAT AAG AAT TAA
11933 AAG GAA TAA AHS TGA TSC CTS BBA TCA TSC AAT AAS TCA TGA AOT AOT AOA AAT AOT AOT AOA AAT AAT AAT AAT AAT
11939 AAT GAT GAT AAT TCA CTA GAT CTT GTS TAT GAT TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC
11949 AAT AAT TSC AAT TCA AAT GTC TCA TTT AAT AAT TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
11959 AIC CCA TGS GHA TGA AHA CTA CTS BGG CAG GHA GAT GTC GAG CTA GAA AOS GHA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
11969 AAT AAT AAT CTA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA
11979 AAT TTT CTA CTT GAT AHS TTT TAA AIT GHA GHA AHS AIC TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
11989 GCA AOA AHA GAG AAT GTS AIT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
11999 AOT AOC GAC CCA TAT TTC COT AOC AOT COT CCA TGA CAG AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12009 TGA TAA BBA TAA TGA TGC TTT GAG AAT GAT ACC CCA TGA AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12019 GGC TST AIC GAG CAC TGG GAT TGA AAT GAT ACC CCA TGA AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12029 AOT COT GAG TCC CAA TGC TTT TSC AOA TST TGA AHA AAT GAT GAT TCA TGG GAG CCA GAC AOC TTC TGG AAG TAC TGA AHA
12039 CAC TGS GGC CAA AIT AHA CCA TST BAG AOA TST TGA AHA AAT GAT GAT TCA TGG GAG CCA GAC AOC TTC TGG AAG TAC TGA AHA
12049 AOC AIT TGA GGA TAA TGG TTS TCA GHA TAA TST TGA AHA AAT GAT TGA GAG AHA AOC CCA TGA GGA AAT AOA AOC AHS GAC TAT AIC
12059 TCC AHS TAA AHS GCT GCT AHA TTT GAT CTA GAA GAA TTA TCC TCT TAT AIT AIC CTT CTT TTT CCA
13389
11857 AAA TSC AAA AAT CCT GAA COT AAG ACA TNG CAG TGA BAC AIT GAT GAC CAA AHA GGA AAT CCA TST ABA GAC CTT CTA
11876 TCT TCT GAT GCG TCC AOA GGC AOC AIC TNS CAA GAG AOT TCT AOT TNG CTA CCA GHA AHS AAT ACA GAG TCT CAA CTT
11913 CTS CCA TNG AAT CPT CAG GAA GOC CTT GAA AHS AOT TST AOT AOA CCA TTP CTT ABA GAG ABA AAT AAT AAG AAT TAA
11933 AAG GAA TAA AHS TGA TSC CTS BBA TCA TSC AAT AAS TCA TGA AOT AOT AOA AAT AOT AOT AOA AAT AAT AAT AAT AAT
11939 AAT GAT GAT AAT TCA CTA GAT CTT GTS TAT GAT TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC TGA TSC
11949 AAT AAT TSC AAT TCA AAT GTC TCA TTT AAT AAT TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
11959 AIC CCA TGS GHA TGA AHA CTA CTS BGG CAG GHA GAT GTC GAG CTA GAA AOS GHA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
11969 AAT AAT AAT CTA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA
11979 AAT TTT CTA CTT GAT AHS TTT TAA AIT GHA GHA AHS AIC TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
11989 GCA AOA AHA GAG AAT GTS AIT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
11999 AOT AOC GAC CCA TAT TTC COT AOC AOT COT CCA TGA CAG AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12009 TGA TAA BBA TAA TGA TGC TTT GAG AAT GAT ACC CCA TGA AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12019 GGC TST AIC GAG CAC TGG GAT TGA AAT GAT ACC CCA TGA AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT AOT
12029 AOT COT GAG TCC CAA TGC TTT TSC AOA TST TGA AHA AAT GAT GAT TCA TGG GAG CCA GAC AOC TTC TGG AAG TAC TGA AHA
12039 CAC TGS GGC CAA AIT AHA CCA TST BAG AOA TST TGA AHA AAT GAT GAT TCA TGG GAG CCA GAC AOC TTC TGG AAG TAC TGA AHA
12049 AOC AIT TGA GGA TAA TGG TTS TCA GHA TAA TST TGA AHA AAT GAT TGA GAG AHA AOC CCA TGA GGA AAT AOA AOC AHS GAC TAT AIC
12059 TCC AHS TAA AHS GCT GCT AHA TTT GAT CTA GAA GAA TTA TCC TCT TAT AIT AIC CTT CTT TTT CCA
13389

```

pSELECT:GK/1-39/J-CK

```

1 GCG GGC GCA AHA AAA TAT TAT TTT CAT TAC AIC TST GTS TNG GAT TTT TST GTS TNG GAT TTT TST GTS TNG GAT TTT
79 TCC AIT GAA AOA AOA AAA GAG AAC AAA ACA AOA AAC AAC TAA TAA CAA AAT AAG CAG TCC CCA GTS CAA GTS CAG GAA CAA CAA TTT
157 GGG GAG GAG TGG TGG GCA AIT GAA GAG GAT GAA CCT ABA GAA GAT GAA GAT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
235 TCC GGC TTT TTT CCG AAG GTG GAG GAG AAC CTA AHA TAA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA GHA
313 TGG CCG CCA GAA CAC GAC AAG TAC TCC CAG CTC CCG CCA TCA TCT CTT CAC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
469 AIC CAG GGC GAT TGA GTC TSC TTC TCC CAG CTC CCG CCA TCA TCT CTT CAC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
547 TAA AAG TCA GAT CAG GAC GCG GCG TTT GAT CCG CAG TCC CTT GSA GCG TAC CTA GAC TCA GAC GAC GAC GAC GAC GAC GAC
625 CCG TGA CCG TGC TTS CAC AOC TCT ACG TCT TTS TTT CCG TTT CCG TTT CCG TTT CCG TTT CCG TTT CCG TTT CCG TTT
703 CCG CTA CCG GAG AIC AOC GAG GTG TCG AAG CCA CCA TGA AOA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
781 TCT GAG TCC GAG GHA AAG AHS GAG AAC ACT AAG AAT TTA CTC AAG TGG TGG CCG CCG AOC TCC TGG GAG TCC TGG TAA
859 AAT TCT CTA AHA AOA TGA TTA AHA AHA TTT GAT TTT AHS TTT CCA AIT TCA TCA GAG GAG AAT TCA TCA TCA TCA TCA
899 AAG AOC CAG AAG CCG AOC CAG TAT CAG CAG AAG CCG CCG AAG GAC CCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
937 AOC AOC TAC CTS AAG TGG TAT CAG CAG AAG CCG CCG AAG GAC CCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1015 AOC AOC TAC CTS AAG TGG TAT CAG CAG AAG CCG CCG AAG GAC CCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1093 AOC AOC TAC CTS AAG TGG TAT CAG CAG AAG CCG CCG AAG GAC CCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1171 GAC TTT GCC ACC TAC TAC TAC CAG AAG ACC CCG CCG ACC CCG ACC TTT CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1249 GAC TTT GCC ACC TAC TAC TAC CAG AAG ACC CCG CCG ACC CCG ACC TTT CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1317 CCG TTT GTS AAG AAT TTT CCG CCG AAG AAT AIC AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
1405 TCG GAC AAG GTS AOC GAC CAG GAC CAG CAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
1483 AAC GAG AAG CAG AAG CAG CAG TAC CCG TGC CAG GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS GTS
1561 AAC GAG TST TGA GCT AAG TSG CCA GAC AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
1639 AAA AAA TCC TTT AIT TGT GAA AIT TGT GAT GCT AIT GCT TTA TTT GHA ACC AAT AHA AOC TGC AAT TAA CAA GAT AAC
1717 AAA AAT AAT TCC AIT TGT GAA AIT TGT GAT GCT AIT GCT TTA TTT GHA ACC AAT AHA AOC TGC AAT TAA CAA GAT AAC
1795 AAA TST GAT AIT GAA TTT CAA TAT ACA GAA TAA GAG GAT TTT AAC CTT CTA CCA AIT AAG CTT CTA GAA TCC TTT TCT
1873 GAG GAA TGA AHA AHS GAT AHS GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG

```


도면12q

7311 TCT TGC TCC GAG GTA AGG ATG GAG AAC ACT AAG AAT TTA CTC AGC CAG TGT GGT CAG TAC TGA CTA CTT CAG GSA
9839 AGT TCT CTS ATA ACA TGA TTA ATA GTA AGA ATA TTT GTT TTT ATG TTT CCA ATC ACA GGT GCC ABA TPT CAG TCT GTC
9337 CTG ACC CAG CCG CCG TCT GTG TGC TGC AGC CTT GGC CAG AGC ATG ACC ATC AGC TGC ACC GGC ACC AGC AGC AGC GAC GTG
10338 GGC GGC TAC AAC TAC TAC GTG TCC TGG TAT CAG GGC CAC CCG GGC AAG GCC CCC AAG CAG ATG ATC TAC GAG GTG TCC AAC
10993 AGA CCC AAG GGC GTG AGC TAC TAC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC
1171 GCT GAG GAG GAG GGC GAC GGC GCT CCG AOC GTG ACC TAC ACC AAG GGC TCC ACC AAG GGC ACC AOC GTG TCC AAC
12438 ACC GTG GTG TGC TGC TGC GTG AGC AAC TTT TAC CCG AAG TCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
13277 AAC GAG GTG TGC TGC TGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
14083 GAC GGC GTG TGC TGC TGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
14883 TTT AAC CCG AAC GAG TGT GTA GCT AGC TGG CCA GAC ATG ATA ABA TGA TAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
9377 GTG AAT CAG CCG CCG TCC GTC TCC GTG TCC TGG TAC CAA CAG CCG CCA GSC ABA GGC CCC ABA CTV ATG ATT TAT GAG GTG AGT AAT
1634 GGT GAT TAT AAC TAT GTG TCC TGG TAC CAA CAG CCG CCA GSC ABA GGC CCC ABA CTV ATG ATT TAT GAG GTG AGT AAT
10893 CCG CCC TCA GGG GTT TCT AAT GCG TTC TCT GGC TCC AAG TCT GSC ACC AOC SCC TCC CTG ACC ATG TCT GGT GGT CAG
11371 GCT GAG GAG GAG GGC GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT ACA AAG ACC AAG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
12349 AOX GTG GTG TGC TGC TGC GTG AGC AAC TTC TAT CCG ABA GAC ATC APT GTG AAG TGG AAG ATT GAT GAT GAT GAT GAT
14085 GAT GAT GTG TGC TGC TGC GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
14833 AAG GTT GAA TAT GAA AGS CAT AAC CTC TAT AAC TPT GAG GTT GTT CNT AAG ACA TCA TCC TCA CCC GTG AAG AGC
15813 TTT AAC AAG AAT GAG TGT TGG TGT ATT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
16439 ATG CAG TGA BAA BAA TGC TTT ATT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
1737 CAA GTT AAC AAC AAC AAC TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
17958 AAC CTG TAC BAA TGT GAT ATG GAA TGC TAA AAT TAT ACA GCA TGA CAA AAG TTT AAC CTC CAA ATC AAG CCG CTG CAG
18373 TCC TTT TCT GAG GSA TGA ATA ABA TGT AGT GTA TTT TCC CAA GSC TIG AAK TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
19813 CTT TCA TGG AGT TTA ABA TAT AGT GTA TTT TCC CAA GSC TIG AAK TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
20239 GAC CTC CCA CAT TCC CTT TTT AGT ABA ADA TTT AAC AAT TAA AAT TAA AAT TAA AAT TAA AAT TAA AAT TAA AAT TAA
2107 TTT AAG CAG AAT CCA GAT GCT CAA GGC CCG TCA TAA TAT CCG CAA GTT TGG TGG TTA GGG TTA GGG AAC BAA GGA AOC
2185 TTT AAT ABA AAT TGG ACA GGA ABA ABA CCA GAT AAT GAG AAT TCC CAA GSC TIG AAK TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA
2263 GGG CTT CCG TTT CCA CTA TCG GCG APT ACT TCT AAC GSA TTC TCG ACT CAG TCC TTT GCG CAC TCC CCG GCG AAT TGT
2341 GTA GCG CCG ACA GNV CCG GPT CCG GAT CCG AAT CCG AAG AIT GCG TCG CAA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
2418 CCG TCA ACC AAG CTC TGA TGG AGT TGG TCG TCA BAA CCA ATG CAG AGC ABA TAC SCC CCG AGC CAG GAT CTT GCA AAT
2497 TCC GSA TGC CVC CCG TCG AAG TBA GCG GTG TGC TCC ATA CAA GGC GSC CVC CAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG
2575 ACC TCG TAT TGG GAA TCC CCG AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC AOC
2663 TTT TGG GAG CCG BAA TCC GCG TGG ACG AGG TCG CAG TCC ACC GCT GAT ATO GCG CAA AGC ATG AGC TGA TCG BAA
2731 GCT TGC GCG ACG GAA CTC CTS GAG TCC TCC AAC GAA GAT TGG TGG CAG TGA TAC GAT TGG TGG TGG TGG TGG TGG
2809 AAG BAA TCA CCG CAV GTA GTC TAT TTA CCG AAT CCG TSC CCG AAT GSG CCG AAT GSG CCG AAT GSG CCG AAT GSG CCG
2887 GCT GCA CCG TGT GCA TCC ATG
2965 GUG AOA CCG TGT GCA TCC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
3043 GGG XGG GCG GCG COT COT BDA TGG AAG TCG GAA TAA BAA CCA TCT TTT TGG AAA CCA TCG GCG CAG TTA TTT ACC GCG AAG
3121 AON TAT CCA CCG COT COT BDA TGG AAG TCG GAA TAA BAA CCA TCT TTT TGG AAA CCA TCG GCG CAG TTA TTT ACC GCG
3199 TCG TCG AAC TTT TGG ATC ABA ABA TGG AAG TCG GAA TAA BAA CCA TCT TTT TGG AAA CCA TCG GCG CAG TTA TTT
3277 TGA GTG GTA TTA TGG TAT GAT ABA ABA TGG AAG TCG GAA TAA BAA CCA TCT TTT TGG AAA CCA TCG GCG CAG TTA TTT
3355 CUG ACC GAT AAC TAA TCG TGC TGT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
3433 GGA GTT GAT AAG AOA TTT TGG BAA GTC CTA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
3511 AAT TGG BAA TCC CTA TBA GTG TBA CCG TTA TCC AAC AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
3589 GAT GAC TAA TAC GTA GAT GTA TGG CCA AAT AAG TAA GTC CCA TAA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
3667 TTT ACC GTG AIT GAC AAT ABA GAG GAT AIT TGG GAT AIT TGG GAT AIT TGG GAT AIT TGG GAT AIT TGG GAT AIT TGG
3743 TAA ATA CTC CAC CCA TTS ACG TCA ATG GAA AAT CCG TAT TGG GAT TAT GAG AAC ABA GAT GAT TAT TAA CTA

도면12r

3223 T09 G03 G99 G10 G21 G03 G03 T0A G0C A99 G99 G0C A11 T0C G0T A03 G0C G0C T0A T0T A0C G0C T0C A0G T0A G11 A03 A0C
3224 A10 T0A G0C A0A G0C C0A C0A C0A C0C T0A C0C A09 A0C G0T A0A A09 G0C G0C T10 C10 G03 T11 T1C G0T A03 T0A G11 A03 A0C
3225 C0T G0C G0G G0T G0C A0A A01 C0A C0C T0A G0T A01 C0A G0C T0G C0A A0C C0G A0A G0A G11 T0A A0A T0C C0G G0G T11
3226 C0C C0T G0A A0G T0C T1C G10 G0C T0T C0T G0T C0G A0C C10 C0G C11 A0C G0A T0C G10 G11 G0C T0C A0C T11 C1C G0C T0C
4057 4115 G0A A0C G10 G0G C11 T01 G0T A0C T0C C0C T0C G0C T10 T0C A01 T0G T0G G10 G11 G0C T0C A0C C0G G10 A0A C0C
4116 C0C C0C G0A C0C C0C G0T A0C C0C G0C T0C G0C T0C G0C T10 T0C A01 T0G T0G G10 G11 G0C T0C A0C C0G G10 A0A C0C
4221 G0C T1A T0G C0A C10 G0A G0A A0C A0T G0T A0C A09 A11 A0C A0A G0A G11 G0T A0C T0C G0C G0T C10 C10 A0A G0A T1C G0A
4222 A0A A0A G0T G0T A0C T1C T0A T0C G0C A0A C0A C0A A0C A0C G0T A0C T0C G0C G0T T11 G11 G0T T0C A0G C0G C0G A11
4369 A0G C0C A0A A0A A0A G0A T01 T0A T0C G0C A0A C0A C0A C0T T10 A0G T11 T01 A0G T0G T0C G0C T0C A0A G0A A0C T0A
4447 C0T T0A G0G A11 T10 G10 G10 G0T A0T A0T T0A T0A T0A T11 A0A T0A
4525
4603

NV10A3

1 C1T G0T T0G G0T G0A G0T A0T G0C G0A G0C T0G C0C T0A T0G A0G G11 T0T C0C C0T T0G A0G T0G G0G T0C A0G
79 T1C T1T A0T A0T G0A G0C T1C T1G T1C C0A A0C G0A A0A A0A C1A C1C A0C T0C T0C T0C T0C T0C T11 G0T T1A T1A G0G
157 A0T T10 C0G A11 T1A T0G T0C
235 A0G T1T A0A A11 T1A T0G T0C
313 A0A C0C G0C G0C G0C C0C T0A C0G G0T T0T C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10 C10
391 T0C A0G T0T C0A A0G T11 T0A C0G T0A T0A C0G T0C A0A C0C G0C A0A C0A C0A G0C C10 G10 A10 C0C C10 T11 T1A T0G
459 G1T A0T G1C A10 A1A
537 T1A T1T T1C T1A T1A C0A C0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A T0A
625 A0G A0G A0T A10 A0T A11 C0A C0A T0C C0T G10 G0C C1T A0T C0C T11 T1T G0C G0A T11 T0C C1T C0T G11 T1T G0T
703 C0C C0A G0A A0C C10 G10 A0A G0T G0C G0A G0T C0C G0A G0T C0C G0A G0T C0C G0A G0T C0C G0A G0T C0C G0A G0T
781 A0C A0C G0T A0G A0C C1T G0T A0T G0T A0C G0C G0C G0A G0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A
839 G0C G0G G1A T1A T0C G0T A11 T0C G0T A0T G0C A0C G0C G0C G0A G0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A C0A
937 G0G T0C T0A C0A G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C G0C A0C
1015 A0T G0T A0C A0C G0C G0C A0C T1A C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T
1093 G0G G0T A0T G0A A10 G0A A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C
1171 A10 C0T G1A G0A A10 G0A A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C
1249 A1A G0C T0G A10 G0A G0G G0T A0A G0T T0G A0A C1A C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T C1T
1327 A0A T0T G0A G0C G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T
1405 G1T A1C T0C A0C A0C G0G A0T G0C G0A A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C
1483 A0G C0T T0G T0A C10 T0A C0A G0T T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C
1561 A1C T0G G10 A0G A1C C1T T1T G0T A0T A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C
1639 C0C T0G G0A A0G A1C A0A G0A T0T T0T T0A G0T C0T T1T T1T C10 C0C G1A A1C T0C T0C T0C T0C T0C T0C T0C
1717 C0G C1A C0A G0G G10 G11 T0T T10 C0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G G0T G0G
1795 C0G A1A C0A A0T A0C G1T C1T C1A G10 T0G T0G C0G A0C T1C A0G A0C T1C G0A C0C C0T A0C A0C T0C
1873 C1C G0T C10 C1A A1C C10 T1A C0A G10 G0T G0C T0G A0C G0G G0T T0G T0C A1A C0G C0C A0C T0G G0G C0A A0A C0A
1951 T0G T1A C0G G0T A0G C0G C0G C0G T0A G0C T0G A0C G0G G0T T0G T0C A1A C0G C0C A0C T0G G0G C0A A0A C0A
2029 A0C G0A C10 A0A T0C C1A C0C G0T G0G C1A T0G G0A A0C G0C A0C C1T C0C G0A G0A A0G C0G C0G T0G T0T C0T
2107 G1A A0C G0C A0G G10 G0A A0A G0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C A0C
2185 G0G T1T C0C C0C T1C T0A C1T G0G C0T C0A T1T T10 T0A T0C T0G T0A G0C T0G T0A G0G C0G A0C C0C T0G T0T C0T
2263 A0C G0C G0C T1T T1A C0G C0C T1C T0A C1T G0G C0T C0A T1T T10 T0A T0C T0G T0A G0C T0G T0A G0G C0G A0C C0C
2341 G10 G0T A0C C0T A11 A0C G0C T1T G0A T0A G0T A0C A0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C
2419 A0C G0G G0A G0C G0A G0G C0C C0A A1A C0C A0A C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C C0C
2497 G0C A0G T1T C0C G0C T0G A0A G0G G0C A0T G0G C0C A0T G0G A0T A0T G0G A0T A0T G0G A0T A0T G0G A0T A0T
2575 G0T T1A C0C T1T A10 C1T C0G G0T C0T A0G T10 T10 G0A A11 G10 G10 G10 G10 G10 G10 G10 G10 G10 G10 G10

도면12s

5553 GAC CAT GAT TAC GGC AAG CTT TSS GAT TTT TTT GSA GAT TTT CAA CBT GAA AAA AIT AIT ATT CCG MAT TCC TTT
2731 APT TOT TOC TTT CTA TTC TCA GAG TPC ACH GAT CCA MAT GAC CCA GTC TOC ATO CCT CTC TPC TPC APT TST APT APT
2809 CAG APT CAC CAT CAC TAC TCG GAT AAG TAC GAG CAT TAG CAG CTA CTT AAA TAT GAT TCA GCA GAA ACC APT GAA APT
2887 CCG TAA GCT CCT GAT CTA TGC TCG ATC ATT CAG TTT GCA AAG TGS GGT CCC AIC AAT GAT CAG TGS CAG TAP AIC TGS GAC
2965 AQA TTT CAC TCT CAC CAT CAC TAC TCG CAG TCT GCA ACC TGA AQA TTT TGC AAG TTA CTA CTA TCA AQA GAT TTA CAG TAG CCG
3043 TCC AAG GAT CCG CCA APT GAC CAG GAT CCA APT GAC CAG GAT CCA APT GAC CAG GAT CCA APT GAC CAG GAT CCA APT GAC
3121 TGA TGA GCA GTT GAA ATC TGS TAC TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
3199 GAT
3277 CAG CCG CAG
3343 CAG TCA TAA TGA TCA
3411 CTA TCA
3489 CTA TCA
3545 GAG TPC GAT GAT APT CCA GCG CCG GAT TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
3617 CTA TCA
3745 GAG TPC GAT GAT APT CCA GCG CCG GAT TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
3823 CAG CCG CAG
3901 TCG TTA CAA ATA AAG CAA TAG CAT CAC AAA TTT CAC AAA TAA AAG AAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
3979 CAA ACT CAA TAA TGT ATC TTA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
4057 GTT TCC TGT GTG AAG TAA TTA TCC GGT CAC AAA TTT CAC AAA TAA AAG AAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
4135 TGC CTA ATG APT GAT TAC ACT CAC AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
4213 GAA TTT GAT GAA GAA TCT GCT TAG GAT TCA ACT CAC AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
4291 TTA TTC AIT GAT TAT ATA GCA TAA AIC AAT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
4369 AIT TAT AIT GAT TAT ATA GCA TAA AIC AAT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
4447 GAG TCA TTA GTT CAC TAC CCA TAT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
4535 AAG GAC CCG CAC CCA TTA TGA
4603 TSS GTG AAG TAT TTA CAG TAA ACT GCG CTA TCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
4681 GTC AAT GAC GAT CAC CCG TTA CAG TAA ACT GCG CTA TCG AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
4759 CCG CCG CAG
4837 CCG CCG CAG
4915 GAA APT TGA GTC CCA ATC TTS TGC GCG CCA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
5071 AQA APT TGA GTC CCA ATC TTS TGC GCG CCA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
5149 CTA GAA AQA CCA CAA AAC TTT AQA TCG TTA CCG TAA CTA TGA GAG CAG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5227 TAA GAG TGA GAA AAC TTT AQA TCG TTA CCG TAA CTA TGA GAG CAG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5305 TAA GAG TGA GAA AAC TTT AQA TCG TTA CCG TAA CTA TGA GAG CAG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5383 GAG CTA TAC TTA TAT CAA CCG TCT CCA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
5461 TCT TAA GAA GAT TGT TAC TGA GAT TTT TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
5539 TTA TAC GAG GAT TGT TAC TGA GAT TTT TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
5617 GTA TAA GAG GAT TGT TAC TGA GAT TTT TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
5695 ARA TAA AAG CCA AAT GTC TGA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5773 CTA TAA AAG CCA AAT GTC TGA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5851 CAG TAA AAG CCA AAT GTC TGA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
5929 CAA TAA AAG CCA AAT GTC TGA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
6007 TTT CAT TGG TGA TCG
6085 TAA APT GAG TAA CAG TAA TAA TCC AAT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT AIT
6163 ATR TCG CCG TTA TST CTT TGS CAG TGS TAA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
6241 TST CTT TCG GAT TCT AAT TGA TST TCT AAT TGA TST TCT AAT TGA TST TCT AAT TGA TST TCT AAT TGA TST TCT AAT
6319 GTC TTA AAT AQA AAT CAC TGS TGS TGS TTT TAC AAC GTC GAT GAG AAA ACC CTA GCG TTA CCG AAC TTA AAT CAC

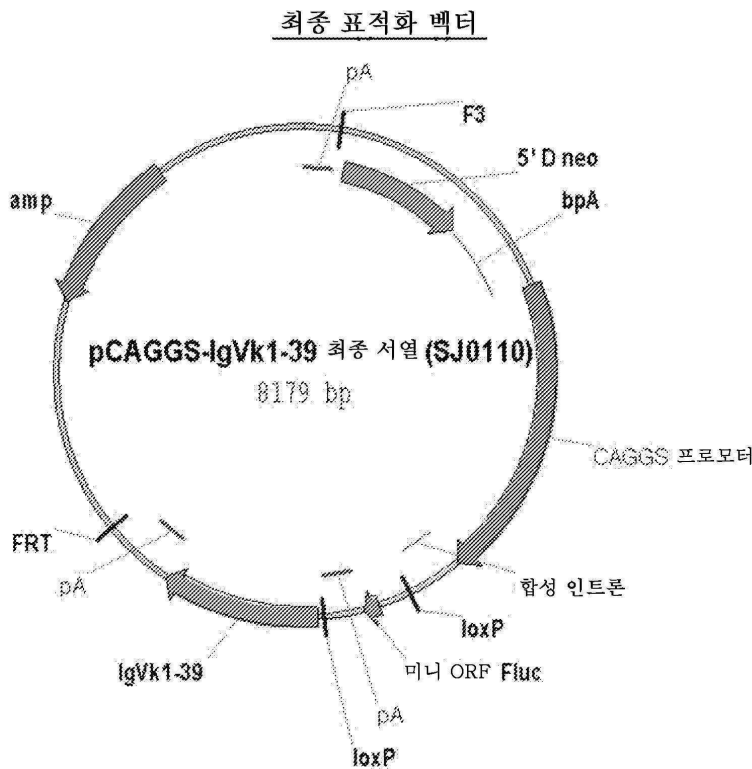
도면12f

MV1057

6397 TTG DAG DAG ATC CCC GTT TCG CGA GCT GAG GTA ATA GCG AAG AGG CCC GCA CGG ATC GGC GTT CCC AAG AGT TGG GGA
6475 GCC TGA ATG GCG AAT GAG GCC TGA TGG GGT ATT TTC TCC TTA GCG ATC TGT GCG GTA TTT CAC ACC GAA TAC TAC GTC AAA
6553 GCA ACC ATA GTA CGC GCC CTG TAA GAG CAC AAT AAG CGC GAC GSA TGG GAT TAC GCG DAG CGT GAC CGA CGG TAC ACT
6631 TGC DAG CGC GTT ACG GCC CGC TCC GTT CAC TTT CTT CCC CTG TCT TCG CAC GAT CGC CGS CTT TCC CGS TCA AGC
6789 TCT AAA TCG GGG GCT CCC TTT AGG GTT CCG AAT TAA TGG TGC TTT ACG GCA CGT CSA CCC GAA AAA A

1 TAC TCT TCC TTT TTC AAT ATT ATT GAA GCA TTT ATC AGG GTT ATT GTC TCA TGA GCG GAT ACA TAT TTG AAT GTA TTT
79 AGA AAA ATA AAG AAA TAG GAG TTC TCC GCA GCT GAC GCA CAT TTC CCC GAA AAG TGC DAC CTG ACG TCG ACG GAT CGS GAG ATC TCC
237 GAA TCC CCT AAG GTG CAC TCT CAG TAC TAT CAT CTG TCA TGA TGC CGC ATA GAT GAT AAG CCA GTA TCT SCT CCC TGC TTS TGT
235 GTT GSA GAT CGC TGA GTA GTG CGC GAG CAA AAT TTA AGC TAC AAG AAG GCA AAG CGT GAC CGA CGA TTA TTT ATT GGT TAT
313 TCT GCT TAG GGT TGG GCG TTT TGC GCT GCT TCG CAT AAG GGT CAA TAT TGG COA TTA GCG ATG TAC GCG ATA TTT ATT GGT TAT
391 ATA GCA TAA ATC AAT ATT GAG TAT TGG COA TTT GCA TAT TGA CAT TGA TTA TTT AAT TAT COA TAT CAT AAT ATG TAC ATT ATT GGT TAT
489 TGT CCA ACA TTA ATG CGS CCA TGT TGA CAT TGA TTA TTT ACG GAT TAT TAT TAA TAG TAA TAA ATT ACG GGG TCA TTA GGT CAT
547 AGC CCA TAT ATG GAG TTC CGC GTT ACG AHA GTA ACG CGA ATA GCG CGA AAT GAG CCT CGT GAC TBA CCG CCC AAG GAC CCC CGC CCA
625 TTS ACG TCA ATA ATG ACG TAT GTC CCC AHA GTA ACG CGA ATA GCG CGA AAT GAG CCT CGT GAC TBA CCG CGC AAG GAC CCC CGC CCA
703 CGG TAA ACT GCC CAC TTT GCG GTA TAC CAT GAA GTC TAT CAT ATC CGA ACG TTT CGT ACT TGC GAG TTT ATT GAC TTT COA AGT
781 TGG CCC GCC TGG CAT TAT GCG CAG TAC ATG TAC TGG GAG TTT CCT ACT TGG GAG TTT CCT ACT TGC GAG TTT ATT GAC TTT COA AGT
859 GCT ATT ACC ATG GTS ATG CGG TTT TGG CAG TAC ATC AAT GGG CFT GGA TAG CCG TTT CCA AAG TGT CFT AAG AAC TCC
1015 GCC CCA TTG ACG CAA ATG GCG GAT GAG CGT TTT TGG CAC CAA AAT CAA CGS GAG TTT CCA AAG TGT CFT AAG AAC TCC
1093 ATC GCC TGG AGA CGC CAT CGA CGC TGT TTT GAC CTC CGT AAG AAG CAG CAG GAG GTC TAT ATG AAG ADA SGT CFT TTA GTS AAG CBT CAG
1171 CGG TGC ATT GGA AGC TTT GTA CGC GTG AAT TGG CCG GCC CGC GCG GTC GAG GTT ATC AAT CTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1249 AGA GGC CGC AAT TCC CTA CGC ACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1405 CTA ATG GAG ATG CGS ATC CGC TGG GAG ACT GGG CGS AAT TAG GGG CGS GAT TGG GGG CGS AGT TAG GGG CGS GAG TAT GGT TGG TGA
1483 AGT TGG GAG ATG CGS ATC CGC TGG GAG ACT GGG CGS AAT TAG GGG CGS GAT TGG GGG CGS AGT TAG GGG CGS GAG TAT GGT TGG TGA
1581 TAA GAA TTT CAC ACA GAA AAG ACC CAG GCT TTA CAC TTT ATG ATG CTT CCG GCT CGT AAG TTG TGT GGA ATT GTS AGC GSA
1639 AHA GAG CCC ACC GCA TCC CGA CGA TGG CTG CTA TTG TCT TCC CAA TCC CCC CTG TGG TGC TCC GCG TCA GAA GCG
1717 CCC AGA ATA GAA TGA CAC CTA CTC AAG CAA TAC TAC TAC TCC CAA TCC CCC CAA TCC CCC CTG TGG TGC TCC GCG TCA GAA GCG
1873 CCT TCC AAG GTC AAG GAA GAG ACG GGG GAG GAG GAG TCC TTT GCG GAT TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1951 GAG GAA SGT CTA GAT CAT CGA TAT AAT GGG TCG TGG CCT CTT TTT GAT TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
2029 CGG CTG GTA GAA GAG GAT GCG
2197 TCC GAG
2185 GGG CTG GTT GGG CTG GTC GGG CTG GAG
2233 CAT GCG CGS GCG GAT GCG GAG
2341 GTC GTG CAG GAC CAA CAG CCG CTT GCG GAT GCG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
2419 CAG TGC TNG CAC CAA GGG CCC ATC GAT GCG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
2487 GAG CTG CCT GGT CAA GGA CTA CTT CCC GCA ACG GCG GAT GCG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
2575 CAC CTA SAG CTA CAT CTG CAA GGT CTT CCG GCA ACG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG
2653 ACG CCA SAG CTA CAT CTG CAA GGT CTT CCG GCA ACG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG
2731 ACG GAG SAG GAG GAT GTC TGG TGG AAG CCA GAG TCA GAG CCG CTG CTG CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC
2809 AAG GCA GCA AAG CAG GCG CCG TCT CTA GCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT
2887 TCT GCG TTT TTC CCG AAG CTG TGG CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT
2965 CTG GAG TCA GAC CTG CCA AAG GCG ATG TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG GAT TCC CCG GCG
3043 CAC TCC CTC AAG TGG GAG ACC TCC TCT CCT CCC ABA TTC CAG TAA CTC CCA ATC TTC TCT CTG CAG AAG CCA AAT CTT

도면13a



도면13ba

```

1 atccagcgc ggatcaataa aagatcatta ttttcaatag atctgtgtgt tggttttttg
61 tgtgccttgg gggaggggga ggcagaatg aggcgcggcc aagggggagg gggagggcag
121 aatgaccttg ggggaggggg aggcagaat gaccttgggg gagggggagg ccagaatgag
181 gcgcggatcc ggagaagtcc ctattccgaa gtctctatcc tcaaatagt ataggaactt
241 cgctcgaggg atcggccatt gaacaagatg gattgcaocg aggttctccg gccgcttggg
301 tggagagggc attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc
361 tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg
421 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccaag acgggctgtc
481 cttgcccage tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattggggc
541 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgcgagaaa gtatccatca
601 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc taactgccca ttcgaccacc
661 aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga agccggctct gtcgatcagg
721 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg
781 cgccatgccc cgacggcgag gatctcgtcg tgaoccatgg cgatgcctgc ttgccgaata
841 tcatgggtgga aaatggccgc tttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg
901 accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat
961 gggctgaccc ctctctctgt ctttacggta tcgocgctcc cgattcgcag cgcacgctc
1021 tctatcgctc tcttgacgag ttcttctgag gggatcgatc cgtgtagtgt ctgcagaaat
1081 tgatgatcta ttaacaata aagatgtcca ctaaatgga agttttctct gtcatacttt
1141 gttaaagaag gtcagaacag agtacctaca ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg
1201 tgggggtggg gtcggattag ataaatgctc gctctttact gaaggctctt tactattgct
1261 ttatgataat gtttcatagt tggatcatat aatttaaca agcaaaacca aattaagggc
1321 cagctcattc ctcccactca tgatctatag atctatagat ctctcgtggg atcattgttt
1381 ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtgggt tccaaatgtg tcagtttcat
    
```

도면 13bb

1441 agcctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca cttcattctc agtattgttt
 1501 tgccaagtgc taattccatc agaagctgac tctagatggc gcgtagcag gttttcgaca
 1561 ttgattattg actagttatt aatagtaate aattacgggg tcattagttc atagcccata
 1621 tatggagtgc cgcgttacat aacttacggt aaatggccc cctggctgac cgcccacga
 1681 cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcca tagggacttt
 1741 ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt
 1801 gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgctggca
 1861 ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tccactctgg cagtacatct acgtattagt
 1921 catcgctatt accatggctg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccactctccc
 1981 cccctcccca ccccaattt tgtatttatt ttttttttaa ttattttgtg cagcgatggg
 2041 ggcggggggg gggggggcgc gcgccagcgc gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg
 2101 cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaa tttccttta
 2161 tggcgaggcg gcggcggcgg cggcctata aaaagcgaag cgcgcggcgc gggggagtgc
 2221 ctgcgttgcc ttcgcccgt gccccctcc cgcgcgcctc gcgccggcgc ccccgctct
 2281 gactgacgc gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct ccgggctgta
 2341 attagcgtt ggtttaatga cggctcgttt cttttctgtg gctgctgaa agccttaaag
 2401 ggctccggga gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg cgtgtgtgtg
 2461 tgcgtgggga gcgcgcgtg cggcccgccg tgcgccggcg ctgtgagcgc tgcgggcgcg
 2521 gcgcgggctc ttgtgcctc cgcgtgtgcg cagggggagc gcggccgggg gcggtgcgcc
 2581 gcggtgcggg ggggctgcga ggggaacaaa ggcctcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg
 2641 tgagcagggg gttggggcgc ggcggctcgg ctgtaacccc cccctgcacc ccctcccgc
 2701 agttgctgag cagggcccgc cttcgggtgc ggggctcctg gcggggcgtg gcgcggggct
 2761 cgcctgcgc gcgggggggt ggcggcaggt ggggtgcgc gcgggggcgc ggcgcctcgc
 2821 ggcgggggag ggcctggggg aggggcgcgc cggcccccga gcgccggcgc ctgtcgaggc
 2881 gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcg agagggcgcg gggacttctc
 2941 ttgtcccaaa tctgtcggga gccgaaatct gggagggcgc gccgcacccc ctctagcggg

도면 13bc

3001 cgcggggcga agcgggtcgg cgcgggcagg aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg
 3061 tgcgccgcgc gccgtccctc tctccctc cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc
 3121 tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctc
 3181 agaagcgttg gggtgagtag tccctcctca aagcgggcat gacttctgcg ctaagattgt
 3241 cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcacctggcc cgcggtgatg cctttgaggg
 3301 tggccgcgct catctggtca gaaaagacaa tcttttgtt gtcaagcttg aggtgtggca
 3361 ggcttgagat ctggccatc acttgagtga cattgacatc cactttgctt tctctccac
 3421 aggtgtccac tcccaggcgc gcctcgggag cgatcgccga tccgcctagg caattgttta
 3481 aatcggccgc ccataacttc gtataatgta tgcatacga agttatggat cctcacagta
 3541 ggtggcatcg ttcctttctg actgcccgc ccccgcatgc cgtcccgoga tattgagctc
 3601 cgaacctctc gccctgcgc cgcgggtgct cgtcgcgcgc cgcgccgcca tggaatcgaa
 3661 gccaccatgy atcttacgcg aaaactcgcg gcaagaaaaa tcagagagat cctcataaag
 3721 gtcaagaagg gcggaaagat cgcctgttaa ttctagaccg gttcagagatc caggcgcgga
 3781 tcaataaaag atcattattt tcaatagatc tgtgtgttgg tttttgtgt gccctggggg
 3841 agggggaggc cagaatgagg cgcggccaag ggggaggggg aggccagaat gacctggggg
 3901 gagggggagg ccagaatgac cttgggggag ggggaggcca gaatgaggcg gcacctcgt
 3961 cgacctataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat ggcggccgc accatggaca
 4021 tgagagtgc cgcccagctc ctggggctcc tgcactctg gctccgaggg aaggatggag
 4081 aacactagga atttactcag ccagtgtgct cagtactgac tggaaactca gggagttct
 4141 ctgataacat gattaatagt aagaatattt gttttatgt tccaatctc aggtgccaga
 4201 tgtgacatcc agatgaccca gagcccagc agcctgagcg ccagcgtggg gcacagagtg
 4261 accatcacct ccagagccag ccagagcatc agcagctacc tgaactggtc tcagcagaag
 4321 cccggcaagg ccccaagct gctgatctac gccgccagct cctgcagag cggcgtgcgc
 4381 agcagattca gcggcagcgc ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctgcag
 4441 cccgaggact tcgccacctc ctactgccag cagagctaca gcaccccccc cacctcggc
 4501 cagggcacca aggtggagat caagagagcc gacgcctcct ccacctgtc catcttccc

도면 13bd

4561 cccagcatgg aacagctgac ctctggcgga gccaccgtgg tctgcttctg gaacaacttc
 4621 taccocagag acatcagcgt gaagtggaaag atcgacggca gcgagcagag ggacggcgtg
 4681 ctggacagcg tgaccgacca ggacagcaag gactccacct acagcatgag cagcaccctg
 4741 agcctgacca aggtggagta cgagaggcac aacctgtaca cctgcgaggt ggtgcacaag
 4801 accagctcca gccccgtggt caagtccttc aaccggaacg agtggtgagc tagcttaaga
 4861 tttaaatagg ccggccgctg cgacctcgag atccaggcgc ggtcaataa aagatcatta
 4921 ttttaaatag atctgtgtgt tggttttttg tgtgccttgg gggaggggga ggccagaatg
 4981 aggcgoggcc aagggggagg gggaggccag aatgaccttg ggggaggggg aggcagaat
 5041 gaccttgggg gagggggagg ccagaatgag gcgcccccc gggtaaccgag ctcgaaatag
 5101 tggatcctca cagtaggtgg catcgttctt ttctgactgc ccgccccccg catgccgtcc
 5161 cgcgatattg agctccgaac ctctcgccct gccgcccgcg gtgctccgtc gccgcccgcg
 5221 cgccatggaa tcgcccgggt aaccgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg
 5281 aataggaact tcaagccgggt acccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc
 5341 ttggcgtaat catggtcata gctgttctct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca
 5401 caaacatcac gagccgggag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa
 5461 ctcaatataa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgcccag
 5521 ctgcattaat caatcggcca acgcccgggg agagggcgtt tgcgtattgg gcgctcttcc
 5581 gcttctctgc tcactgactc gctgcccctg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct
 5641 cactcaaggc cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataaccgagc aaagaacatg
 5701 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc
 5761 cataggtctc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga
 5821 aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct
 5881 cctgttccga cctgcccgtc taccggatac ctgtcccctt ttctcccttc gggagcgtg
 5941 gcgctttctc atagctcaag ctgtaggat ctcaagtccg tgtaggctgt tcgctccaag
 6001 ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgct gcgcttatc cggtaactat
 6061 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac

도면 13be

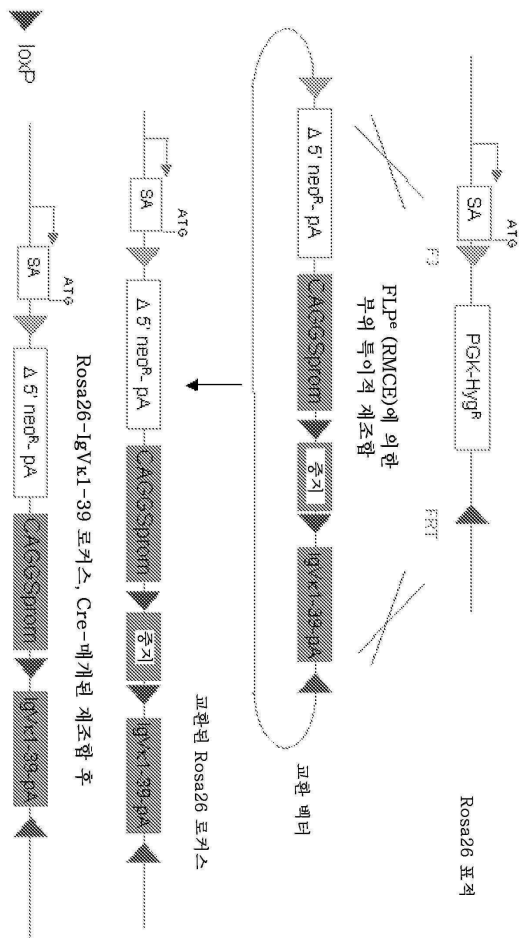
6121 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac
 6181 tacggctaca ctagaaggac agtatctggt atctgcgctc tgcggaagcc agttaccttc
 6241 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaaaaacca ccgctggtag cgggtggttt
 6301 tttgtttgca agcagcagat tacgcccaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcccttgatc
 6361 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggctatg
 6421 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca
 6481 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca
 6541 cctatctcag cgatctgtct attcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag
 6601 ataaactcga tacgggaggg cttaccatct ggcccagtg ctgcaatgat accgagagac
 6661 ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccgggag ggcgagcgc
 6721 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct
 6781 agagtaagta gttcggcagt taatagtttg cgcaacgctg ttgocattgc tacaggcatc
 6841 gtgggtgcac gctcgtcgtt tggtaggctc tcatcagct ccggttccc acgatcaagg
 6901 cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tctccgatc
 6961 gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtggtt tcaactatgg tbatggcagc actgcataat
 7021 tctcttactg tcatgcatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccag
 7081 tcatctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat
 7141 aataccgccc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaaag ttcttcgggg
 7201 cgaaaaactc caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca
 7261 cccaactgat cttcagcatc ttttaacttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaaacagga
 7321 aggcaaaaatg ccgcaaaaaa gggaaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc
 7381 ttcccttttc aatattatgt aagcatttat cagggttatt gtcctatgag cggatacata
 7441 tttgaatgta tttagaaaaa taacaaaata ggggttccgc gcacatttc ccgaaaagtg
 7501 ccacctaaat tgtaaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca
 7561 gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga
 7621 ccgagatagg gttgagtggt gttccagttt ggaaacaagag tccactatta aagaacgtgg

도면13bf

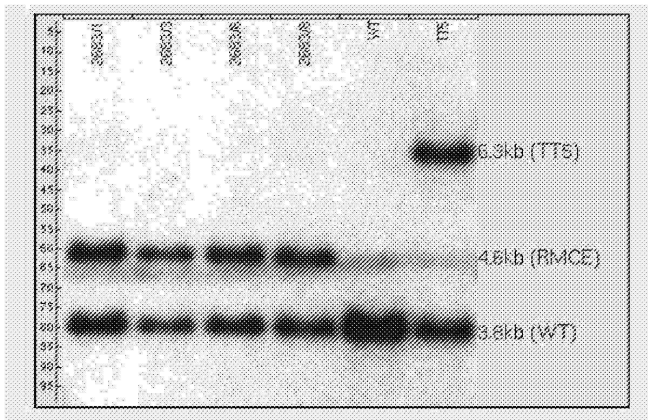
```

7681 actccaactg caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacctat
7741 caccctaatac aagttttttg gggctcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aacctaaag
7801 ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaagga
7861 agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcccgtaa
7921 ccaccacacc cgccgcgctt aatgcccgcg tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc
7981 tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc cagctggcga
8041 aaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtccagc
8101 gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattggggg
8161 taactaagta aggatcgag
    
```

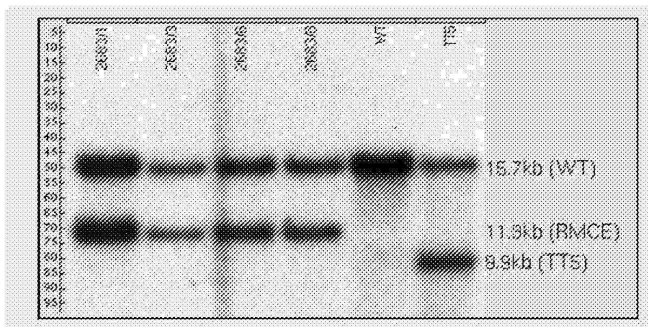
도면13c



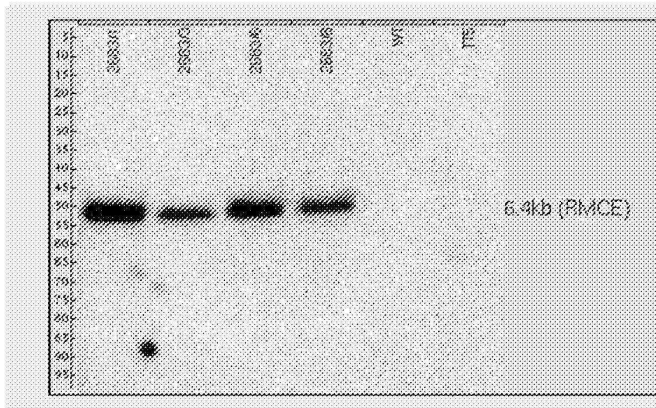
도면14a



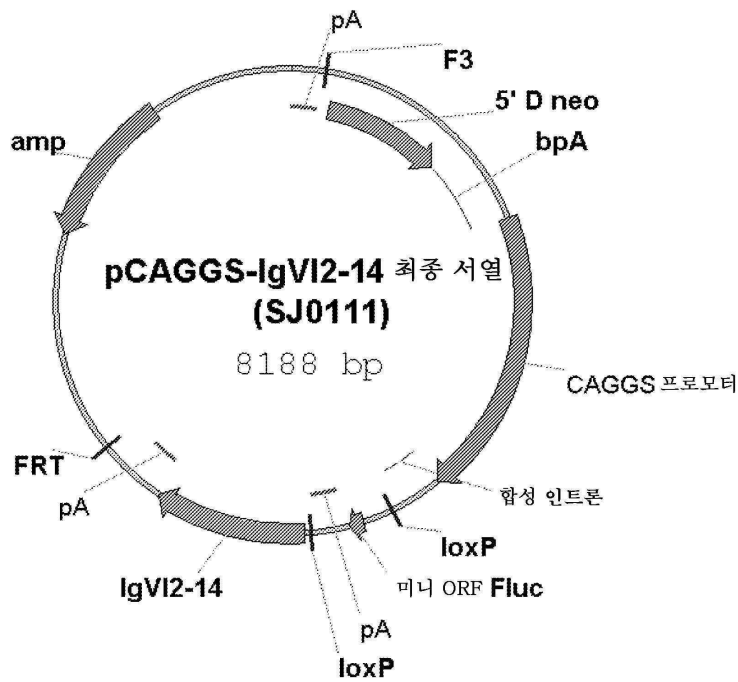
도면14b



도면14c



도면15a



도면15b

```

1 atccaggcgc ggatcaataa aagatcatta ttttcaatag atctgtgtgt tggttttttg
61 tgtgccttgg gggaggggga ggccagaatg aggcgcggcc aagggggagg gggaggccag
121 aatgaccttg gggagggggg aggcagaatg gaccttgggg gagggggagg ccagaatgag
181 gcgcggatcc ggagaagtcc ctattccgaa gttcttattc ttcaaatagt ataggaactt
241 cgctcgaggg atcggccatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg
301 tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgcccggc
361 tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg
421 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccaac acgggcgctt
481 cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggog
541 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgcgagaaa gtatccatca
601 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc a ttcgaccacc
661 aagcgaaca tgcacgcgag cgagcacgta ctggatgga agcgggtctt gtcgatcagg
721 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg
781 cgcgcgatgc cgacggcgag gatctctgct tgaccatgg cgatgcctgc ttgcccgaata
841 tcatggtgga aaatggcgcg ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg
901 accgctatca ggacatagcg ttggotaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat
961 gggctgaccg cttctcgtg ctttacggta tcgcccctcc cgattcgcag cgcacgcct
1021 tctatcgcct tcttgacgag ttctctgag gggatcgatc cgctgtaagt ctgcagaaat
1081 tgatgatcta ttaacaata aagatgtcca ctaaaatgga agtttttct gtcatacttt
1141 gttaagaagg gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg
1201 tgggggtggg gtgggattag ataaatgctt gctctttact gaaggctctt tactattgct
1261 ttatgataat gtttcatagt tggatatcat aatttaaaca agcaaaacca aattaagggc
1321 cagctcattc ctcccactca tgatctatag atctatagat ctctctggg atcattgttt
    
```

도면15bb

1381 ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtggtt tccaaatgtg tcagtttcat
 1441 agcctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca ctctattctc agtattgttt
 1501 tgccaagttc taattccatc agaagctgac totagatggc gcgtatgcag gttttogaca
 1561 ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata
 1621 tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgccaacga
 1681 cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt
 1741 coattgacgt caatgggtgg agtatattac gtaaacctgc caottggcag tacatcaagt
 1801 gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca
 1861 ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tctacttggc cagtacatct acgtattagt
 1921 catcgctatt accatggteg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc coactctccc
 1981 cccctcccca cccccaattt tgtatttatt ttttttttaa ttattttgtg cagcgatggg
 2041 ggcggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg
 2101 cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttctttta
 2161 tggcgaggcg gcggcggcg cgccctata aaaagcgaag cgcgcgccgg gcgggagtcg
 2221 ctgctgtgcc ttegcccgct gccccgctcc gcgcgcctc gcgcgcgcc ccccgctct
 2281 gactgaccgc gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cctctctcct cggggtgta
 2341 attagcgtt ggttaaatga cggctcgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttaaag
 2401 ggctccggga gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg cgtgtgtgtg
 2461 tgcgtgggga gcgcccgtg cggcccgcgc tgcggggcg cgtgagcgc tgcggggcg
 2521 gcgcgggct ttgtgcctc cgcgtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg gcggtgcccc
 2581 gcggtgcggg ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg
 2641 tgagcagggg gtgtggggcg ggcggtcggg ctgtaacccc cccctgcacc cccctccccg
 2701 agttgctgag cacggcccg ctctgggtgc ggggtccgt gcggggcgtg gcgcggggct
 2761 cgcctgcccg ggcggggggg ggcggcaggt gggggctcgg ggcggggcg gcgcggctcg
 2821 ggcgggggag ggtcggggg aggggcgcgg cggccccgga gcgcggcgcg ctgctgagggc
 2881 gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcg agagggcgca gggacttctc

도면15bc

2941 ttgtcccaaa totgtgcgga gccgaaactc gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg
 3001 cgcggggcga agcgtgcgg gcgccgagc aaggaaatgg gcggggaggg cctctcgtgc
 3061 tgcgcgcgcc gccgtccctc tctccctctc cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc
 3121 tgccttcggg ggggacgggg caggcggggg ttcggcttct gcggtgtgac cggcggtctc
 3181 agaagcgtt gggtagtac tccctctcaa aagcgggcat gacttctgcg ctaagattgt
 3241 cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcacctggcc cgcggtgatg cctttgaggg
 3301 tggccgctc catctggtca gaaaagacaa tctttttgtt gtoagcttg aggtgtggca
 3361 ggcttgagat ctggccatac acttgagtga cattgacatc cactttgctt ttctctccac
 3421 aggtgtccac tccagggcg gcctccggag cgatcgcga tccgcctagg caattgttta
 3481 aatcggcccg ccataacttc gtataatgta tgctatacga agttatggat cctcacagta
 3541 ggtggcatcg ttcctttctg actgcgcccc ccccgcatgc cgtcccgcga tattgagctc
 3601 cgaacctctc gccctgcgc gcgcgggtct ccgtcgcgc gcgcgcgcca tggaaatcga
 3661 gccaccatgg atcttaccgg aaaactcgac gcaagaaaaa tcagagagat cctcataaag
 3721 gtcaagaagg gcggaagat gcggctgtaa tcttagaccg gttcgagatc caggcgggga
 3781 tcaataaaag atcattatth tcaatagatc tgtgtgttgg tttttgtgt gccttggggg
 3841 agggggaggc cagaatgagg gcgcggcgaag ggggaggggg aggccagaat gacctggggg
 3901 gagggggagg ccagaatgac cttgggggag ggggagggca gaatgaggcg gcctccctg
 3961 cgacctataa cttcgtataa tgtatgctat acgaaattat ggcggccgcc accatggaca
 4021 tgagagtgcc egcccagctc ctggggctcc tgetactctg gctccgaggt aaggatggag
 4081 aacctagga atttactcag ccagtgtgct cagtactgac tggaaactca gggaaagtct
 4141 ctgataacat gattaatagt aagaatattt gtttttatgt tccaatctc aggtgccaga
 4201 tgtcagctcg cctgaccca gccgcctct gtgtctggca gccctggcca gagcaccac
 4261 atcagctgca ccggcaccag cagcagcgtg ggcggctaca actacgtgtc ctggtatcag
 4321 cagcaccocg gcaaggcccc caagctgatg atctacgagg tgtccaacag acccagcggc
 4381 gtgagcaaca gattcagcgg cagcaagagc ggcaacaccg ccagcctgac catcagcggc
 4441 ctccaggctg aggacgaggc cgactactac tgcagcagct acaccagcag ctccaccctg

도면15bd

4501 gtgtttggcg gcggaacaaa gctgaccgtg ctgagagcog acgcccgtcc caccgtgtcc
 4561 atcttccccc ccagcatgga acagctgacc tctggcggag ccaccgtggg ctgcttcgtg
 4621 aacaacttct accccagaga catcagcgtg aagtggaaga tcgacggcag cgagcagagg
 4681 gacggcgtgc tggacagcgt gaccgaccag gacagcaagg actccaccta cagcatgagc
 4741 agcacccctga gcctgaccaa ggtggagtac gagaggcaca acctgtacac ctgcgaggtg
 4801 gtgcacaaga ccagctccag ccccgtggtc aagtccttca accggaacga gtgttgagct
 4861 agcttaagat ttaaataggc cggccgcgtc gacctcgaga tccaggcgcg gatcaataaa
 4921 agatcattat tttcaataga tctgtgtgtt ggttttttgt gtgccttggg ggagggggag
 4981 gccagaatga ggcgcggcca aggggggagg ggaggccaga atgaoccttg ggagggggga
 5041 ggccagaatg accttggggg aggggggagg cagaatgagg cgcgcccccg ggtaccgagc
 5101 tcgaattagt ggatcctcac agtaggtggc atcgttccct tctgactgcc cgcctccgctg
 5161 atgcccgtccc gcgatatgta gctccgaacc tctcgcctcg cgcgcgcggg tgcctccgctg
 5221 ccgcccgcgcc gccatggaat cgcgcggta accgaagtto ctatactttc tagagaatag
 5281 gaacttcgga ataggaaact caagccggtta cccagctttt gttcccttta gtgagggtta
 5341 atttcgagct tggcgtaatc atggctatag ctgttccctg tgtgaaatg ttatccgctc
 5401 acaattccac acaacatacg agcccggagc ataaagtgt aagcctgggg tgccaatga
 5461 gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcaactgccc cttccagtc gggaaacctg
 5521 tcgtgccagc tgcattaatg aatcggcaca cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg
 5581 cgtcttccg cttcctcgtc cactgactcg ctgcccctcg togttcggct gcggcgagcg
 5641 gtatcagctc actcaaaggc ggtataatcg ttatccacag aatcagggga taacgcagga
 5701 aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg
 5761 gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtccg
 5821 aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc
 5881 gtgcgctctc ctgttccgac cctgcgcctt accggatacc tgtccgctt tctccctccg
 5941 ggaagcgtgg cgttttctca tagctccagc ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt
 6001 cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc

도면15be

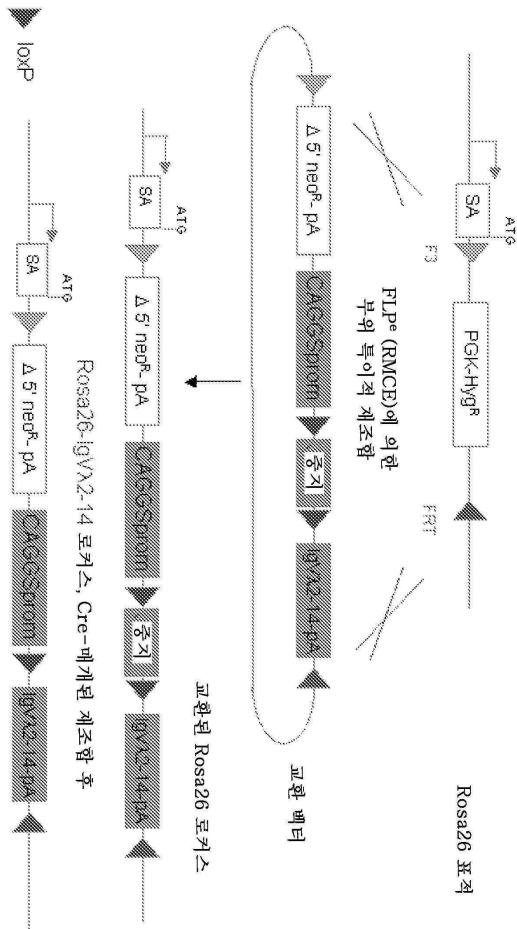
6061 ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc
 6121 actggttaaca ggtatagcag agcaggtat gtaggcggg ctacagagtt cttgaagtgg
 6181 tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttgta tctgcgctct gctgaagcca
 6241 gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aaaaaaccac cgtcggtagc
 6301 ggtggttttt ttgttgcgaa gcagcagatt acgcccagaa aaaaaggatc tcaagaagat
 6361 cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaag aaaactcacg ttaagggatt
 6421 ttggctatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt
 6481 tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc
 6541 agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc
 6601 gtogttaga taactacgat accggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata
 6661 ccgcgagacc caogetcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg
 6721 gccgagcgca gaagtggtoe tgcaacttta tccgcctcca tccagctat taattgttgc
 6781 cgggaagcta gagtaagttag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct
 6841 acaggcatcg tgggttcacg ctgctcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa
 6901 cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccttcggt
 6961 cctccgatog ttgtcagaag taagtggccc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca
 7021 ctgcataatt ctcttactgt catgocattc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac
 7081 tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta
 7141 atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag tgcctatcat tggaaaaagt
 7201 tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc
 7261 actcgtgac ccaactgac ttcagcatct ttaactttca ccagcgtttc tgggtgagca
 7321 aaaaacaggaa gcaaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata
 7381 ctcaactctc tctttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc
 7441 ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc
 7501 cgaaaagtgc cacctaatt gtaagcgtta atattttgtt aaaattccg ttaattttt
 7561 gttaaatcag ctcatttttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa

도면15bf

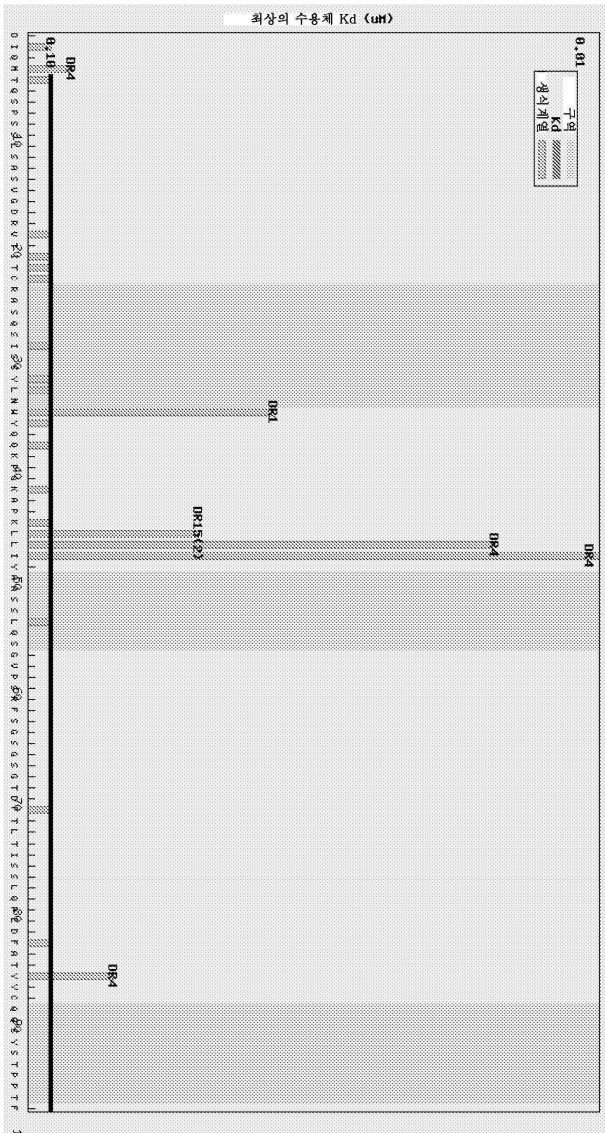
```

7621 aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa
7681 agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac
7741 gtgaaccatc accctaataca agtttttttg ggctcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga
7801 accctaagg gagccccga tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa
7861 aggaagggaa gaaagcgaag ggagcgggct ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc
7921 tgcgcgtaac caccacacc gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tccattcgc
7981 cattcaggct gcgcaactgt tgggaaggc gatcgggtgc gccctcttcg ctattacgc
8041 agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaaccca gggttttccc
8101 agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg agcgcgcgta atacgactca ctatagggcg
8161 aattgggggt aactaagtaa ggatcgag
    
```

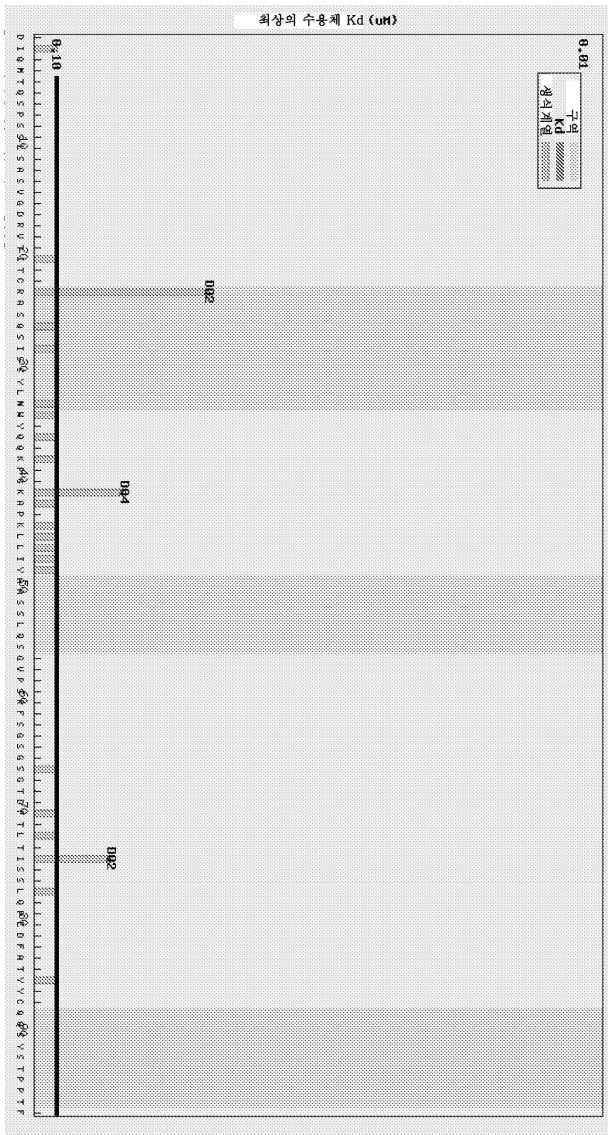
도면15c



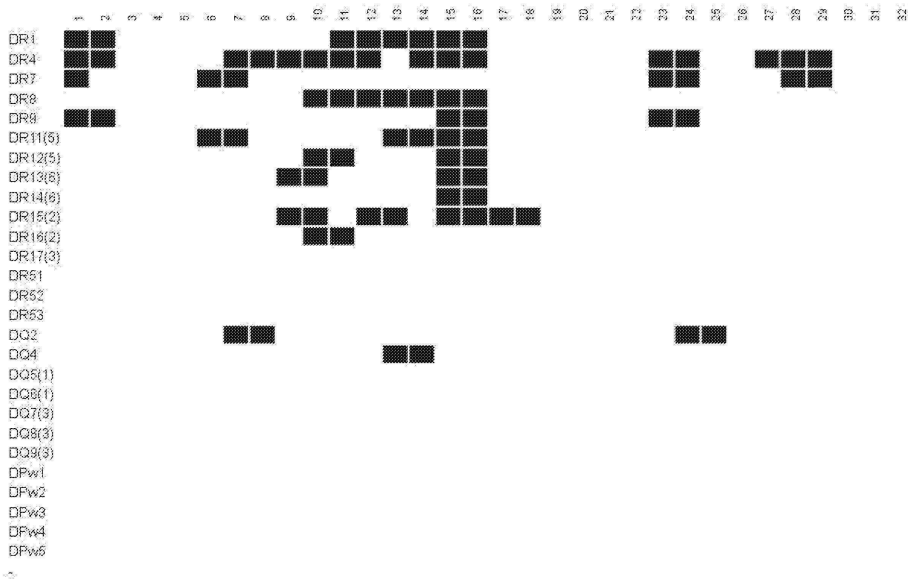
도면16a



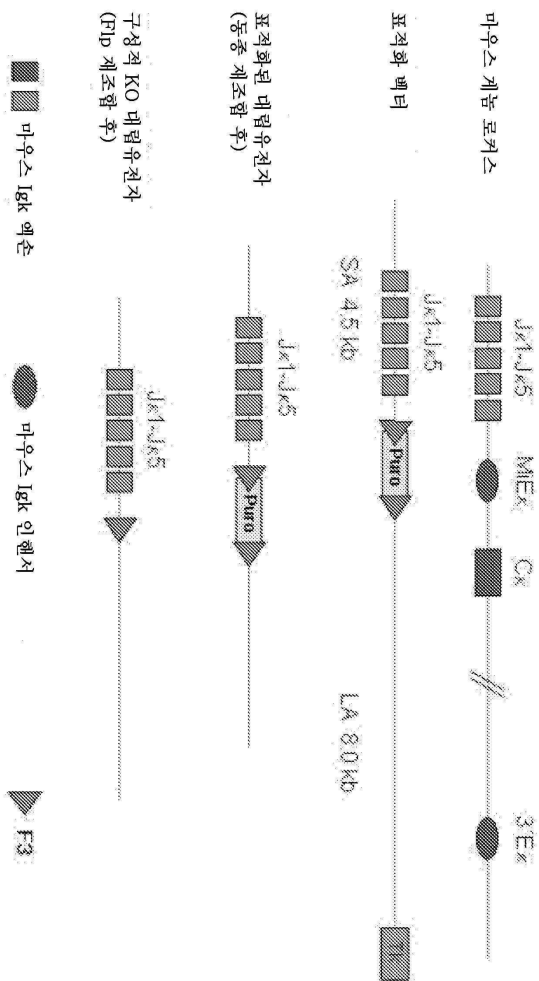
도면16c



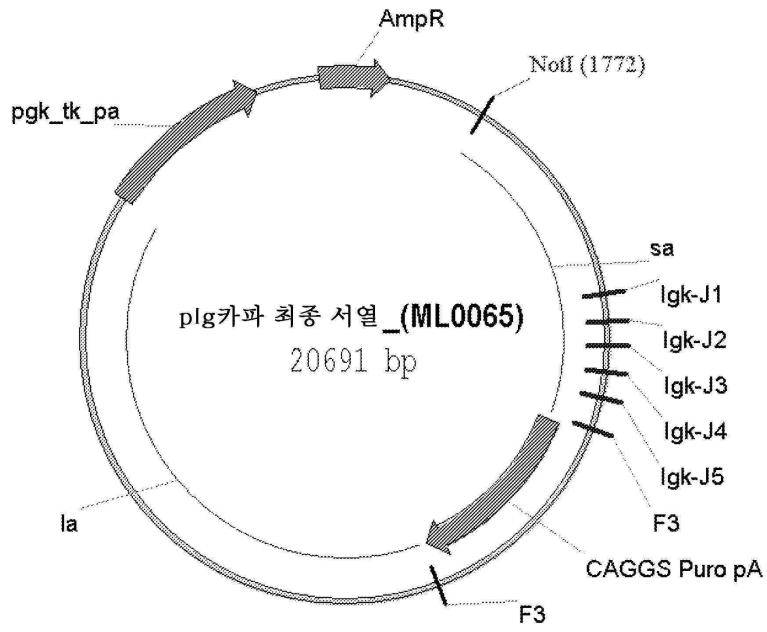
도면17



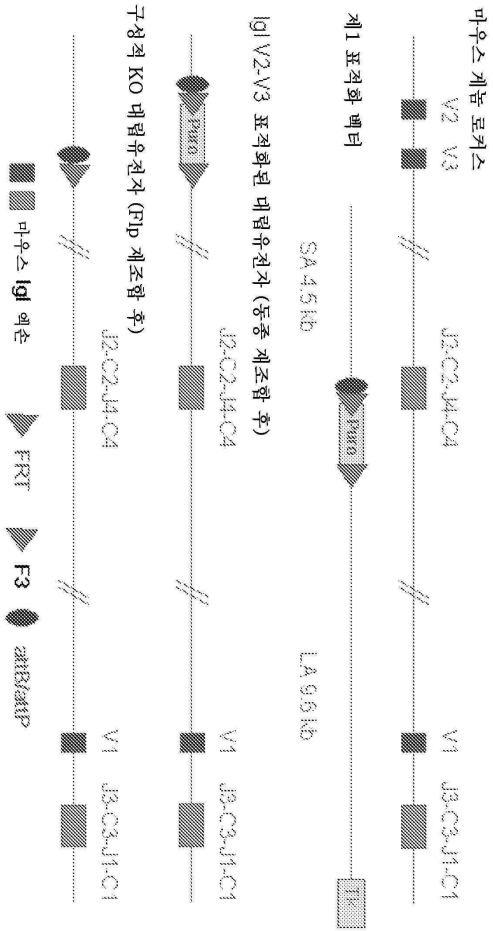
도면18a



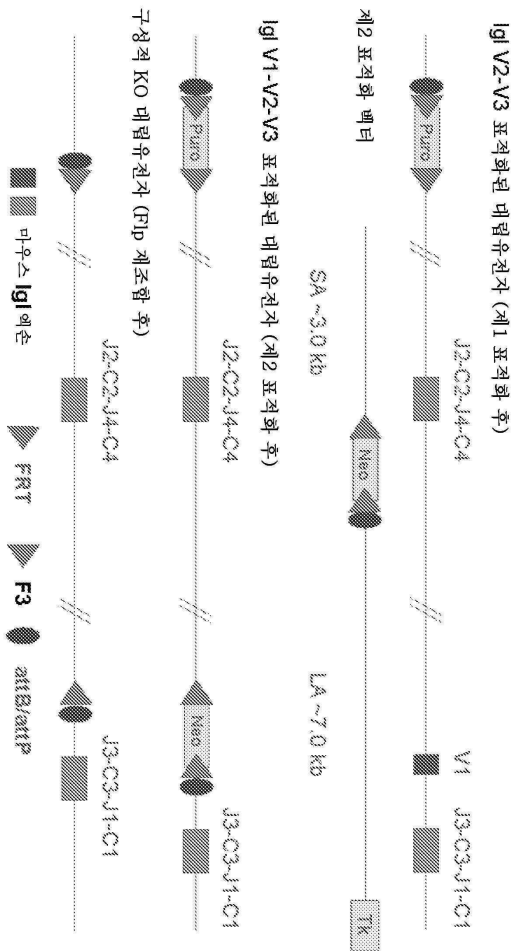
도면18b



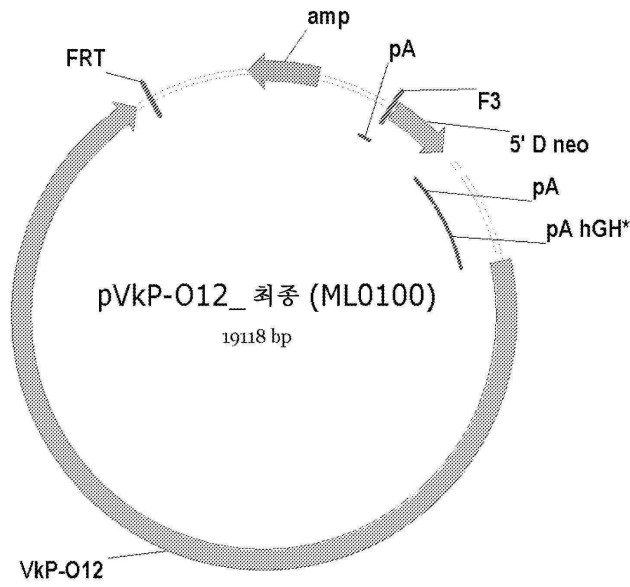
도면19a



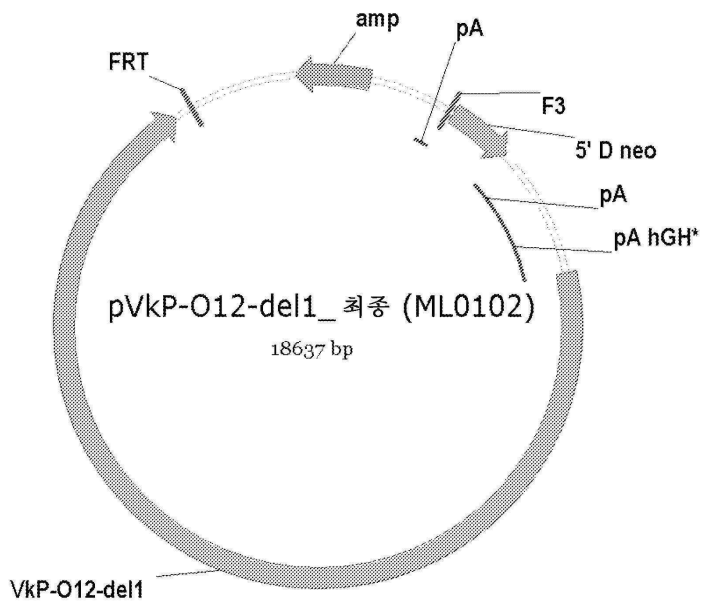
도면19b



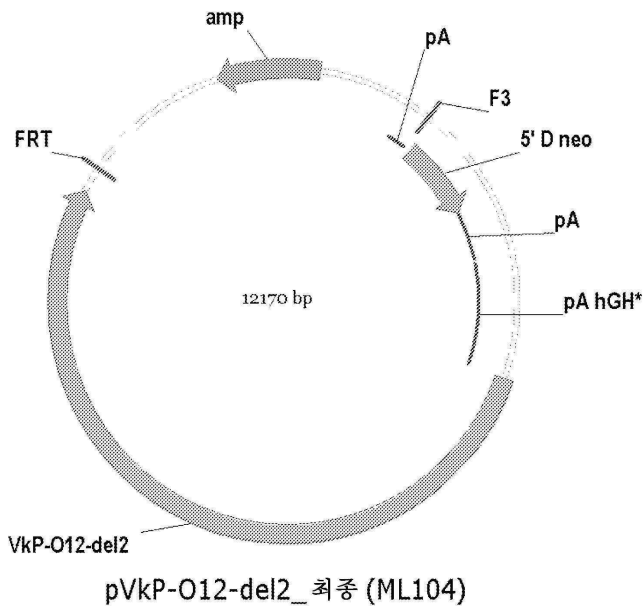
도면20a



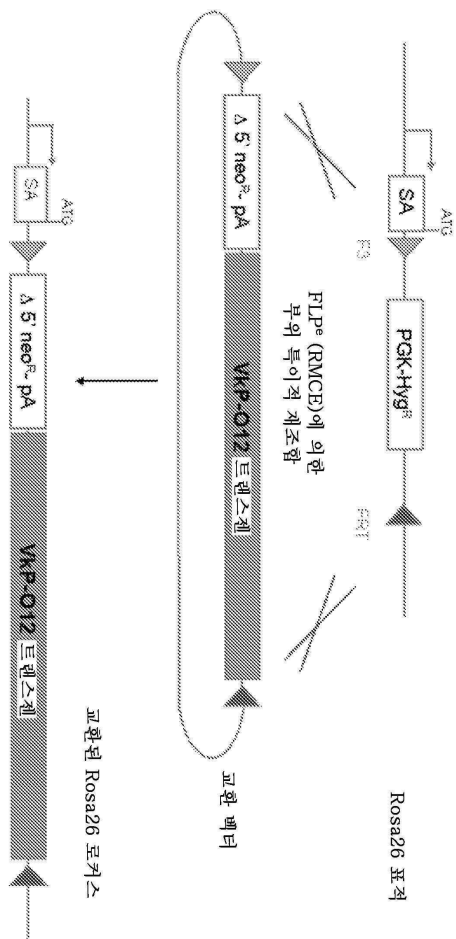
도면20b



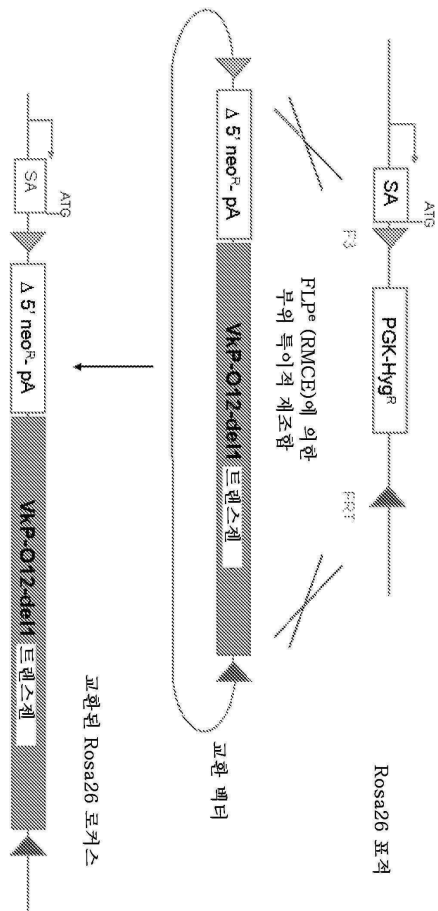
도면20c



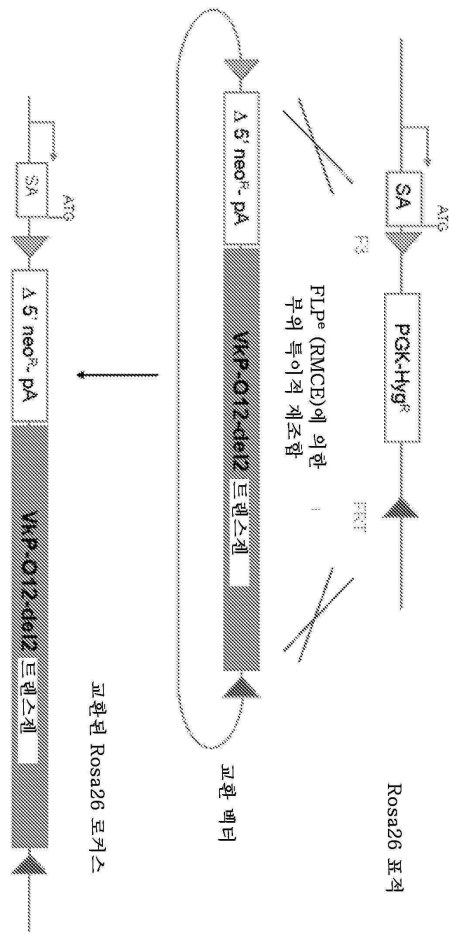
도면21a



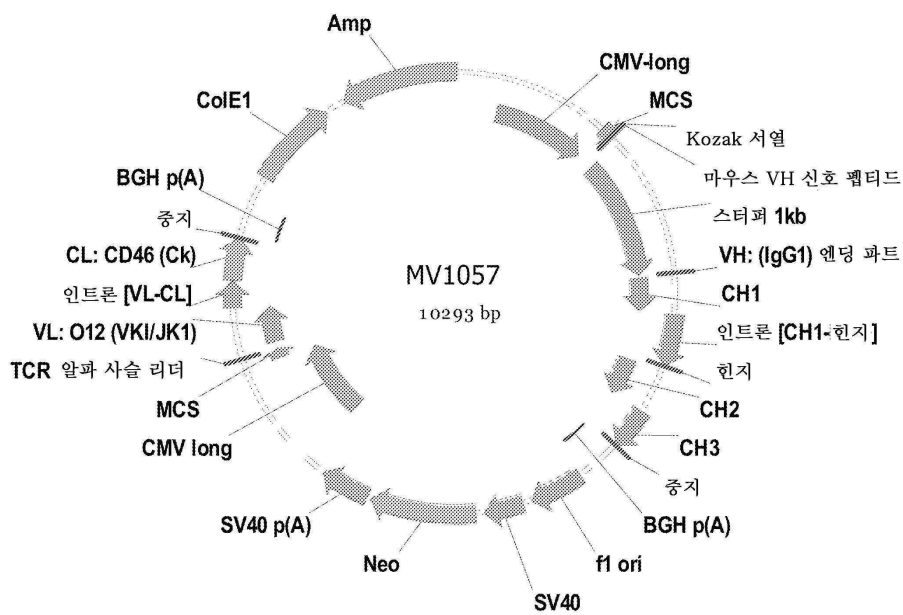
도면21b



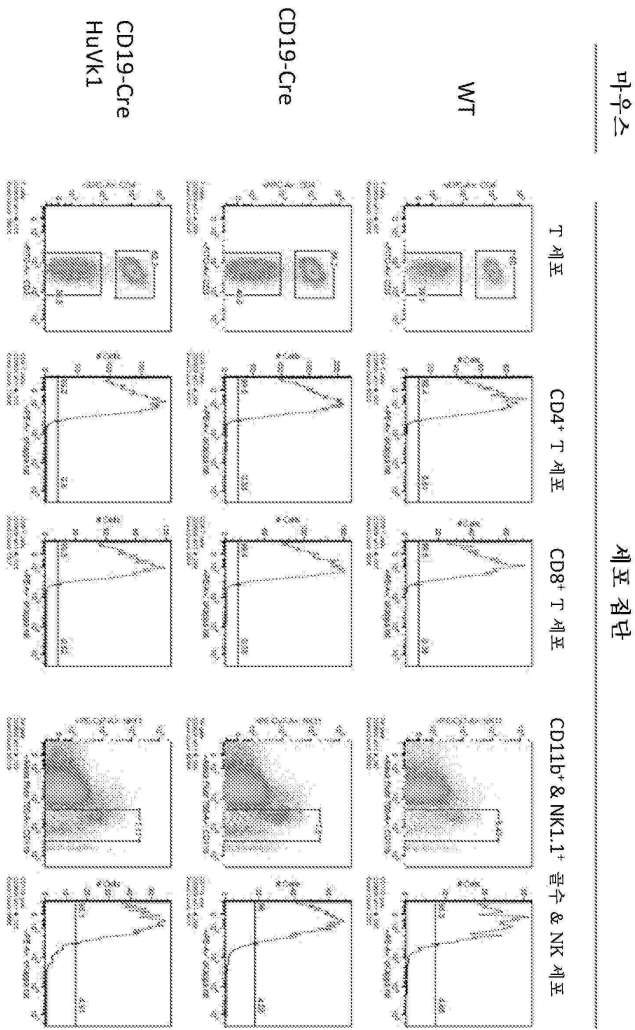
도면21c



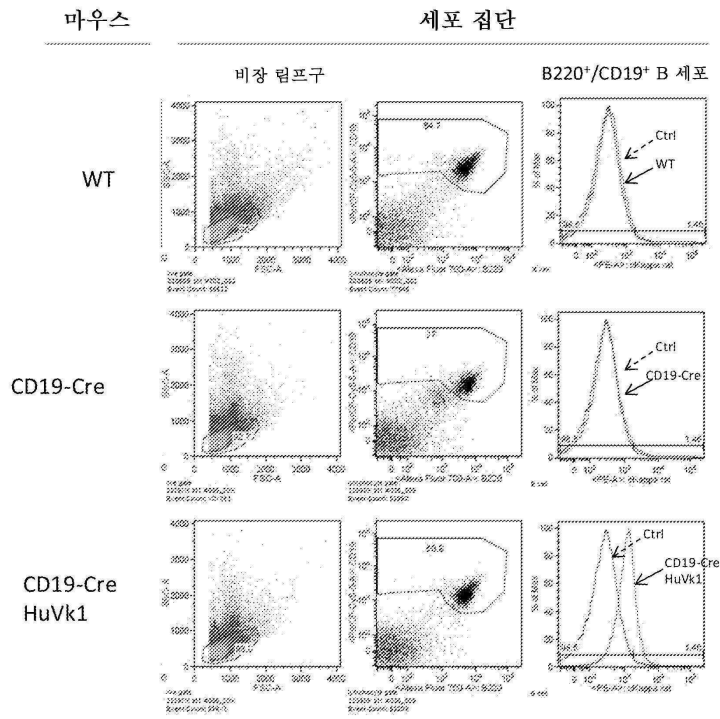
도면22



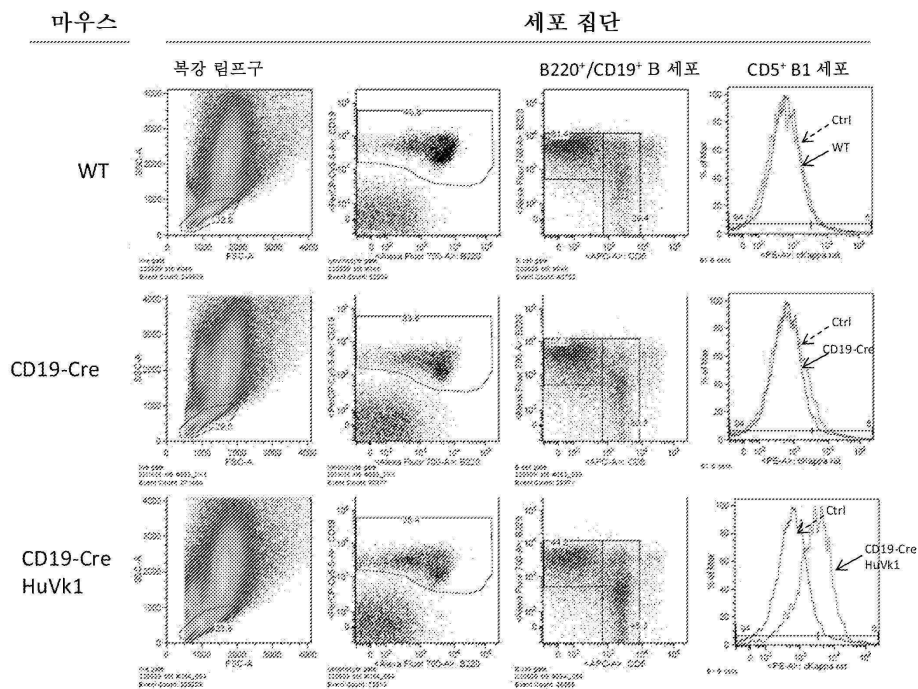
도면23



도면24



도면25



도면27

