



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월03일
(11) 등록번호 10-1995735
(24) 등록일자 2019년06월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/46 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7003853(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년02월08일
심사청구일자 2018년03월05일
(85) 번역문제출일자 2018년02월08일
(65) 공개번호 10-2018-0018838
(43) 공개일자 2018년02월21일
(62) 원출원 특허 10-2012-7021534
원출원일자(국제) 2011년02월08일
심사청구일자 2016년02월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/023971
(87) 국제공개번호 WO 2011/097603
국제공개일자 2011년08월11일
(30) 우선권주장
61/302,282 2010년02월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02011097603 A1
W02009157771 A1
- (73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리
버 로드 777
(72) 발명자
맥휘터 존
미국 뉴욕 10591 태리타운 크레센트 드라이브
2035
맥도날드 린
미국 뉴욕 10605 화이트 플레인즈 게드니 웨이 16
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 40 항

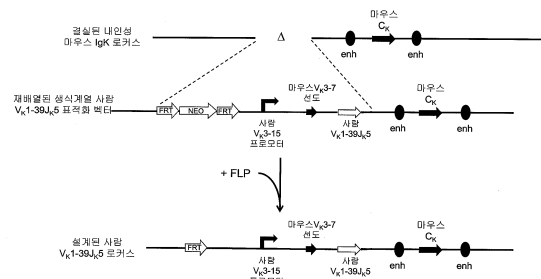
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 일반적인 경쇄 마우스

(57) 요약

유전적으로 변형된 마우스가 제공되는데, 마우스는 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 서열을 재배열하고 발현할 수 없고, 마우스는 내인성 마우스 K 로커스에서 마우스 카파 (κ) 불변 유전자와 작동 가능하게 연결된 사람 면역글로불린 서열에 의해 발현된 하나 또는 두 개의 사람 경쇄 가변 도메인만을 발현하고, 마우스는 단지 두 (뒷면에 계속)

대표도



개의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 중 하나로부터 유래한 경쇄 가변 도메인 및 마우스 κ 불변 도메인, 및 내인성 마우스 중쇄 로커스의, 사람 중쇄 가변 도메인 및 마우스 중쇄 불변 도메인을 갖는 역 키메라 항체를 발현한다. 완벽히 사람인 이중특이적 에피토프-결합 단백질이 제공되고, 두 개의 다른 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 중 하나로부터 유래한 가변 도메인을 포함하는 동일한 경쇄와 연관된 두 개의 다른 중쇄를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
C07K 14/435 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C07K 14/54 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/24 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)

(72) 발명자

스티븐스 셴

미국 캘리포니아 94158 샌프란시스코 베리 스트리트 #413 355

데이비스 사무엘

미국 뉴욕 10024 뉴욕 웨스트 88 스트리트 332 아파트먼트 비2

버클리 데이비드 알.

미국 뉴저지 07930 체스터 에릭 코트 6

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕 10520 크로톤 온 허드슨 뉴턴 코트 10

명세서

청구범위

청구항 1

마우스를 만드는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스에서, 단일 재배열된 사람 $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa}$ 서열 또는 단일 재배열된 사람 $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ 서열을 삽입하는 단계로서, 여기서 재배열된 사람 $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa}$ 서열 또는 재배열된 사람 $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ 서열은 내인성 마우스 κ 불변 유전자와 작동 가능하게 연결되고, 마우스는 마우스 κ 가변 영역을 암호화하는 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 결핍하는, 삽입하는 단계; 및

(b) 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 가변 영역 로커스에서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 삽입하는 단계로서, 여기서 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역과 작동 가능하게 연결되고, 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 재배열된 사람/마우스 키메라 면역글로불린 중쇄 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는, 삽입하는 단계

를 포함하는, 마우스를 만드는 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 마우스는 마우스 면역글로불린 경쇄 불변 영역에 관하여 마우스 κ 인트론의 인핸서 5'을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서, 마우스는 재배열된 V_{κ}/J_{κ} 서열의 다운스트림에 마우스 κ 3' 인핸서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-59 , V_H6-1 , 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H5-51 , V_H6-1 , 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 $D1-7$, $D1-26$, $D3-3$, $D3-10$, $D3-16$, $D3-22$, $D5-5$, $D5-12$, $D6-6$, $D6-13$, $D7-27$ 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서, 마우스는 V_H2-5 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H5-51 로부터 선택된 V_H 유전자 세그먼트로부터 유래하고; $D1-7$, $D1-26$, $D3-3$, $D3-16$, $D3-10$, $D3-22$, $D5-5$, $D5-12$, $D6-6$, $D6-13$, $D7-27$ 로부터 선택된 D

유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자를 포함하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 B 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 V_K1-39/J_K 서열은 사람 J_K5 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 V_K3-20/J_K 서열은 사람 J_K1 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

유전적으로 변형된 마우스를 이용하여 사람 일반적인 경쇄 항체를 만드는 방법으로서, 상기 마우스는,

(a) 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스에서, 단일 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 단일 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열의 삽입으로서, 여기서 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열은 내인성 마우스 κ 불변 유전자와 작동 가능하게 연결되고, 마우스는 마우스 κ 가변 영역을 암호화하는 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 결핍하는, 삽입; 및

(b) 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 가변 영역 로커스에서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 삽입으로서, 여기서 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 유전자와 작동 가능하게 연결되고, 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 재배열된 사람/마우스 키메라 면역글로불린 중쇄 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는, 삽입

을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스를 이용하여 사람 일반적인 경쇄 항체를 만드는 방법.

청구항 11

제10 항에 있어서, 마우스는 마우스 면역글로불린 경쇄 불변 영역에 관하여 마우스 κ 인트론의 인헨서 5'을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10 항에 있어서, 마우스는 재배열된 V_K/J_K 서열의 다운스트림에 마우스 κ 3' 인헨서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제10 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트에서 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 세그먼트이고, 여기서 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 내 V_H 유전자 세그먼트는 V_H1-2, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H2-5, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-59, V_H6-1, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제10 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트에서 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 세그먼트이고, 여기서 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 내 V_H 유전자 세그먼트는 V_H1-2, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H2-5, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H5-51, V_H6-1, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제10 항에 있어서, 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트에서 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 사람 V_H , D 및 J_H 유전자 세그먼트이고, 여기서 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 내 D 유전자 세그먼트는 D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제10 항에 있어서, 마우스는 V_H2-5 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H4-39 , V_H4-59 및 V_H5-51 로부터 선택된 V_H 유전자 세그먼트로부터 유래하고; D1-7, D1-26, D3-3, D3-16, D3-10, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27로부터 선택된 D 유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자를 포함하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 B 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제10 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 V_K1-39/J_K 서열은 사람 J_K5 유전자 세그먼트를 가지는 사람 V_K1-39 유전자 세그먼트의 재배열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제10 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 V_K3-20/J_K 서열은 사람 J_K1 유전자 세그먼트를 가지는 사람 V_K3-20 유전자 세그먼트의 재배열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

이중특이적 항원-결합 단백질을 만드는 방법으로서,

(a) 첫 번째 에피토프를 포함하는 관심의 첫 번째 항원으로 면역화된 첫 번째 유전적으로 조작된 마우스의 B 세포로부터 유래된 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 의해 암호화된 가변 도메인을 포함하는 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 발현하는 단계로서, 여기서 마우스는,

(i) 단일 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 단일 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열에 대해 동형(homozygous) 또는 이형(heterozygous)인 생식계열(germline) 게놈을 가지며, 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열은 마우스 C_K 영역에 작동 가능하게 연결되며, 마우스는 마우스 κ 가변 영역을 암호화하는 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 결핍하고;

(ii) 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트, 사람 D 유전자 세그먼트 및 사람 J_H 유전자 세그먼트를 포함하는 생식계열 게놈을 가지며, 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트는 마우스 C_H 영역에 작동 가능하게 연결되며; 그리고

(iii) B 세포 집단을 포함하고, 그 집단 내 각각의 B 세포는 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 V_K3-20/J_K 서열로부터 유래된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현하고, B 세포 집단은 사람 V_H 유전자 세그먼트로부터 유래된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현하는 적어도 하나의 B 세포를 포함하는,

첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 발현하는 단계;

(b) 두 번째 에피토프를 포함하는 관심의 두 번째 항원으로 면역화된 두 번째 유전적으로 조작된 마우스의 B 세포로부터 유래된 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 의해 암호화된 가변 도메인을 포함하는 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 발현하는 단계로서, 여기서 마우스는,

(i) 단일 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 단일 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열에 대해 동형(homozygous) 또는 이형(heterozygous)인 생식계열(germline) 게놈을 가지며, 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열은 마우스 C_K 영역에 작동 가능하게 연결되며, 마우스는 마우스 κ 가변 영역을 암호화하는 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 결핍하고;

(ii) 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트, 사람 D 유전자 세그먼트 및 사람 J_H 유전자 세그먼트를

포함하는 생식계열 계놈을 가지며, 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트는 마우스 C_H 영역에 작동 가능하게 연결되며; 그리고

(iii) B 세포 집단을 포함하고, 그 집단 내 각각의 B 세포는 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 V_K3-20/J_K 서열로부터 유래된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현하고, B 세포 집단은 사람 V_H 유전자 세그먼트로부터 유래된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현하는 적어도 하나의 B 세포를 포함하는,

두 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 발현하는 단계; 및

(c) 이중특이적 항원-결합단백질을 만들기 위해, 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 의해 암호화된 가변 도메인을 포함하는 발현된 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄를, 사람 면역글로불린 경쇄; 및 사람 면역글로불린 경쇄와도 짝을 이루는 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역에 의해 암호화된 가변 도메인을 포함하는 발현된 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄와 짝을 이루는 단계

를 포함하는, 이중특이적 항원-결합 단백질을 만드는 방법.

청구항 20

제19 항에 있어서, 첫 번째 마우스 및 두 번째 마우스는 동일한 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제20 항에 있어서, 짝을 이루는 단계는 첫 번째 및 두 번째 마우스에 존재하는 동일한 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 동일한 사람 V_K3-20/J_K 로부터 유래된 사람 면역글로불린 경쇄를 가진 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 발현하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제19 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 마우스의 생식계열 계놈은 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-59 , V_H6-1 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제19 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 마우스의 생식계열 계놈은 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H5-51 및 V_H6-1 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 세그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제19 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 2-5/6-6/1, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/1-7/4, 3-30/5-12/4, 3-30/6-13/4, 3-30/6-6/4, 3-30/7-27/4, 3-30/3-22/5, 3-30/6-6/5, 3-30/7-27/5, 4-39/1-26/3, 4-59/3-16/3, 4-59/3-22/3, 4-59/3-16/4, 5-51/5-5/3, 5-51/6-13/5, 5-51/3-16/6을 포함하는 복수의 사람 $V_H/D/J_H$ 재배열 중 하나로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제19 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째 마우스 및 두 번째 마우스는 동일한 마우스 또는 별개의 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25 항에 있어서, 동일한 마우스 또는 별개의 마우스에서 발현된 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열 또는 V_K3-20/J_K 서열로부터 유래된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인은 동일한 재배열된 사람 생식계열 J 세그먼트로

부터 유래된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제25 항에 있어서, 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인은 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열로부터 유래되고, 재배열된 사람 V_K1-39/J_K 서열은 V_K1-39/J_K5 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제27 항에 있어서, V_K1-39/J_K5 서열은 SEQ ID NO:1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제25 항에 있어서, 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인은 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열로부터 유래되고, 재배열된 사람 V_K3-20/J_K 서열은 V_K3-20/J_K1 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29 항에 있어서, V_K3-20/J_K1 서열은 SEQ ID NO:11인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제25 항에 있어서, 동일한 또는 별개의 마우스는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 유전자를 형성하도록 재배열할 수 있는 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 세그먼트를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제19 항에 있어서, 관심의 첫 번째 및 두 번째 항원은 두 개의 상이한 항원; 또는 동일한 항원이고, 첫 번째 및 두 번째 에피토프는 동일한 항원의 두 개의 상이한 에피토프인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제32 항에 있어서, 관심의 첫 번째 및 두 번째 항원은 동일한 항원이고, 상기 동일한 항원에 대한 이중특이적 항원-결합 단백질의 결합 반응(binding response)이 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄만을 가지는 단일특이적 항원-결합 단백질 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄만을 가지는 단일특이적 항원-결합 단백질의 결합 반응에 비하여 2배 이상 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제19 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 마우스는 V_H1-2, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H2-5, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-59, V_H6-1 각각을 포함하는 생식계열 계보를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제19 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 마우스는 V_H1-2, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H2-5, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H4-51 및 V_H6-1 각각을 포함하는 생식계열 계보를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제19 항에 있어서, 이중특이적 항원-결합 단백질의 첫 번째 또는 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄는, 하지만 동시에 둘은 아닌, 단백질 A에 대한 친화도를 감소시키는 아미노산 변형을 가지며, 그 변형은 95R (EU 435R), 96F (EU 436F) 및 이의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

숙주 세포로서,

(a) 첫 번째 항원에 결합하는 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 첫 번째 핵산 서열로서, 여기서 첫 번째 사람 면역글로불린 중쇄는 첫 번째 사람 중쇄 가변 도메인의 서열을 포함하고, 첫 번째 사람 중쇄 가변 도메인의 서열은 첫 번째 항원으로 면역화된 첫 번째 마우스로부터 얻은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 첫 번째 핵산 서열;

(b) 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 두 번째 핵산 서열로서, 여기서 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄는 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인의 서열을 포함하고, 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인의 서열은 두 번째 항원으로 면역화된 두 번째 마우스로부터 얻은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화 되는, 두 번째 핵산 서열; 및

(c) 첫 번째 및 두 번째 마우스에 존재하는 단일 재배열된 사람 V_K/J_K 서열로부터 유래된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 서열을 포함하는 사람 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 세 번째 핵산 서열로서, 여기서 세 번째 핵산 서열은 사람 면역글로불린 경쇄를 암호화하는, 세 번째 핵산 서열

을 포함하고,

여기서 첫 번째 및 두 번째 마우스에서 단일 재배열된 사람 V_K/J_K 는 (i) 단일 재배열된 사람 V_{K1-39}/J_K 서열 또는 (ii) 단일 재배열된 사람 V_{K3-20}/J_K 서열이고, 재배열된 사람 V_{K1-39}/J_K 서열 또는 재배열된 사람 V_{K3-20}/J_K 서열은 내인성 마우스 κ 불변 유전자에 작동 가능하게 연결되고, 마우스는 마우스 κ 가변 영역을 암호화하는 유전자를 재배열 및 형성할 수 있는 내인성 마우스 κ 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 결핍하고, 여기서 첫 번째 및 두 번째 마우스는 각각 복수의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현하고,

여기서, 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 핵산 서열은 첫 번째 및 두 번째 항원에 결합하는 이중특이적 항원-결합 단백질을 생성하도록 발현하는, 숙주 세포.

청구항 38

제37 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-59 또는 V_H6-1 로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 39

제37 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-20 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H5-51 또는 V_H6-1 로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 40

제37 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 $2-5/6-6/1$, $3-23/3-3/4$, $3-23/3-10/4$, $3-30/6-6/1$, $3-30/6-6/3$, $3-30/1-7/4$, $3-30/5-12/4$, $3-30/6-13/4$, $3-30/6-6/4$, $3-30/7-27/4$, $3-30/3-22/5$, $3-30/6-6/5$, $3-30/7-27/5$, $4-39/1-26/3$, $4-59/3-16/3$, $4-59/3-22/3$, $4-59/3-16/4$, $5-51/5-5/3$, $5-51/6-13/5$, $5-51/3-16/6$ 을 포함하는 복수의 사람 $V_H/D/J_H$ 재배열 중 하나로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

다양한 사람 가변/마우스 불변 중쇄와 연관된 일반적인 사람 가변/마우스 불변 경쇄를 갖는 항체를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 마우스의 B 세포의 사람 가변 영역 유전자 서열로부터 사람 이중특이적 항체를 만드는 방법이 제공된다.

배경 기술

[0002]

항체는 전형적으로 호모다имер의 중쇄 구성요소를 포함하는데, 각각의 중쇄 모노머는 동일한 경쇄와 연관된다.

헤테로다имер의 중쇄 구성요소를 갖는 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)는 치료상 항체로서 바람직하다. 하지만 이중특이적 항체의 각각의 중쇄와 만족스럽게 연관될 수 있는 적합한 경쇄 구성요소를 갖는 이중특이적 항체를 만드는 것은 문제가 많은 것으로 증명되었다.

[0003] 한 접근에서, 경쇄는 모든 경쇄 가변 도메인에 대한 사용량 통계를 조사함으로써, 사람 항체에서 가장 흔하게 사용되는 경쇄를 확인함으로써, 및 시험관 내에서 경쇄가 다른 특이성의 두 개의 중쇄와 짝을 이루으로써 선택될 수도 있다.

[0004] 또 다른 접근에서, 경쇄는 파지 디스플레이 라이브러리 (예를 들어, 사람 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리, 예를 들어, 사람 ScFv 라이브러리)에서 경쇄 서열을 관찰함으로써 및 라이브러리로부터 가장 일반적으로 사용되는 경쇄 가변 영역을 선택함으로써 선택될 수도 있다. 경쇄는 원하는 두 개의 다른 중쇄에 대해 테스트 될 수 있다.

[0005] 또 다른 접근에서, 경쇄는 프로브로서 원하는 중쇄 둘 다의 중쇄 가변 영역 서열을 사용하여 경쇄 가변 서열의 파지 디스플레이 라이브러리를 검정함으로써 선택될 수도 있다. 중쇄 가변 서열 둘 다와 연관된 경쇄는 중쇄에 대한 경쇄로서 선택될 수도 있다.

[0006] 또 다른 접근에서, 후보 경쇄는 중쇄의 동족 경쇄와 일치할 수도 있고, 변형은 중쇄 둘 다의 동족 경쇄에 대해 일반적인 서열 특징과 더 밀접하게 일치하는 경쇄에서 만들어진다. 만약 면역원성 기회가 최소화될 필요가 있으면, 변형은 바람직하게 면역원성의 가능성을 평가하는 단백질 가수분해 과정이 업계에 알려진 파라미터 및 방법에 기초하여 T 세포 에피토프를 발생시키지 않을 것 같은, 알려진 사람 경쇄 서열에 존재하는 서열로 이끈다 (즉, 인실리코 습식 검정).

[0007] 모든 상기 접근은 많은 사전 제약, 예를 들어, 서열 동일성, 특이적 사전 선택된 중쇄와 연관된 능력, 등을 포함하는 시험관 내 방법에 의존한다. 업계에 시험관 내 환경을 조작하는 것에 의존하지 않지만, 대신 일반적인 경쇄를 포함하는, 사람 에피토프-결합 단백질을 만드는, 더 많은 생물학적으로 합리적인 접근을 활용하는 조성물 및 방법에 대한 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 제한된 경쇄 가변 레파토리를 갖는, 사람 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 친화도-성숙한 사람 중쇄 가변 도메인의 다양한 레파토리와 연관되고 이를 발현하는 사람 경쇄 가변 도메인을 발생시키는 생물학적 시스템이 제공된다. 면역글로불린 가변 도메인을 갖는 결합 단백질을 만드는 방법이 제공되는데, 원하는 항원으로 제한된 면역글로불린 경쇄 레파토리를 갖는 마우스를 면역화하는 단계, 원하는 항원과 특이적으로 결합하는 결합 단백질에서 마우스의 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열을 활용하는 단계를 포함한다. 방법은 다중특이적인 항원-결합 단백질을 만드는데 사용에 적합한 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 만드는 방법을 포함한다.

[0009] 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 레파토리로부터 유래한 적합한 친화도-성숙한 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 선택하는 유전적으로 조작된 마우스가 제공되는데, 친화도-성숙한 사람 중쇄 가변 도메인은 하나의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트로부터 유래한 단일 사람 경쇄 가변 도메인과 연관되고 이와 함께 발현한다. 두 개의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 주는 유전적으로 조작된 마우스가 또한 제공된다.

[0010] 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 제한된 레파토리로부터 사람 경쇄 가변 영역, 또는 단일 사람 경쇄 가변 도메인의 제한된 레파토리를 발현하는 유전적으로 조작된 마우스가 제공된다. 마우스는 단일 경쇄를 발현하는 (또는 둘 중 하나 또는 둘 다의 경쇄를 발현하는) 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 (또는 두 개의 재배열된 경쇄 가변 영역 유전자)를 형성하기 위해 재배열된 단일 재배열되지 않은 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 (또는 두 개의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트)를 포함하도록 유전적으로 조작된다. 재배열된 사람 경쇄 가변 도메인은 마우스에 의해 선택된 복수의 친화도-성숙한 사람 중쇄와 짝을 이룰 수 있는데, 중쇄 가변 영역은 특이적으로 다른 에피토프와 결합된다.

[0011] 한 양태에서, 면역글로불린 경쇄의 사람 VL 도메인을 재배열하고 암호화할 수 있는 단일 사람 면역글로불린 경쇄 가변 (VL) 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 또 다른 양태에서, 마우

스는 면역글로불린 경쇄의 사람 VL 도메인을 재배열하고 암호화할 수 있는 두 개 이하의 사람 VL 유전자 세그먼트를 포함한다.

- [0012] 한 양태에서, 면역글로불린 경쇄의 사람 VL 도메인을 암호화하는 단일 재배열된 (V/J) 사람 면역글로불린 경쇄 가변 (VL) 영역 세그먼트 (즉, V/J 세그먼트)를 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 또 다른 양태에서, 마우스는 면역글로불린 경쇄의 사람 VL 도메인을 암호화할 수 있는 두 개 이하의 재배열된 사람 VL 유전자 세그먼트를 포함한다.
- [0013] 한 구체예에서, VL 유전자 세그먼트는 사람 V_K1-39J_K5 유전자 세그먼트 또는 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트이다. 한 구체예에서, 마우스는 사람 V_K1-39J_K5 유전자 세그먼트 및 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트 둘 다를 갖는다.
- [0014] 한 구체예에서, 사람 VL 유전자 세그먼트는 사람 또는 마우스 선도 서열과 작동 가능하게 연결된다. 한 구체예에서 선도 서열은 마우스 선도 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스 선도 서열은 마우스 V_K3-7 선도 서열이다.
- [0015] 한 구체예에서, VL 유전자 세그먼트는 면역글로불린 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 프로모터 서열은 사람 프로모터 서열이다. 특정 구체예에서, 사람 면역글로불린 프로모터는 V_K3-15 프로모터이다.
- [0016] 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 면역글로불린 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열할 수 있는 내인성 마우스 VL 유전자 세그먼트를 포함하지 않는 VL 로커스 (locus)를 포함하는데, VL 로커스는 경쇄 유전자의 VL 영역을 암호화하기 위해 재배열할 수 있는 단일 사람 VL 유전자 세그먼트를 포함한다. 한 특정 구체예에서, 사람 VL 유전자 세그먼트는 사람 V_K1-39J_K5 유전자 세그먼트 또는 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트이다.
- [0017] 한 구체예에서, VL 로커스는 사람 면역글로불린 프로모터와 5' (VL 유전자 세그먼트의 전사 방향에 관하여) 플랭킹된 및, 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함하는 역 키메라 경쇄의 VL 도메인을 재배열하고 암호화하는 사람 VL 유전자 세그먼트와 3' 플랭킹된 선도서열을 포함한다. 특정 구체예에서, VL 유전자 세그먼트는 마우스 카파 (κ) VL 로커스에 있고, 마우스 CL은 마우스 κ CL이다.
- [0018] 한 구체예에서, 마우스는 비기능적 람다 (λ) 면역글로불린 경쇄 로커스를 포함한다. 특정 구체예에서, λ 로커스는 로커스의 하나 이상의 서열의 결실을 포함하는데, 하나 이상의 결실은 λ 로커스를 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열할 수 없게 만든다. 또 다른 구체예에서 모든 또는 실질적으로 모든 λ 로커스의 VL 유전자 세그먼트가 삭제된다.
- [0019] 한 구체예에서, 변형된 마우스의 VL 로커스는 κ 로커스이고, κ 로커스는 마우스 κ 인트론의 인핸서 (enhancer), 마우스 κ 3' 인핸서, 또는 인트론의 인핸서 및 3' 인핸서 둘 다를 포함한다.
- [0020] 한 구체예에서, 마우스는 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한, 체세포 돌연변이된 VL 도메인을 포함하는 경쇄를 만든다. 한 구체예에서, 경쇄는 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한, 체세포 돌연변이된 VL 도메인, 및 마우스 κ CL 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 마우스는 λ 경쇄를 발현하지 않는다.
- [0021] 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 사람 VL 영역 서열을 체세포 초돌연변이 (hypermutation) 시킬 수 있다. 특정 구체예에서, 마우스는 VL 도메인을 재배열하고 암호화할 수 있는 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자를 포함하는 세포를 포함하고, 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자는 체세포 돌연변이된 VL 도메인을 포함한다.
- [0022] 한 구체예에서, 마우스는 마우스 κ CL과 연결된 체세포 돌연변이된 사람 VL 도메인을 포함하는 경쇄를 발현하는 세포를 포함하는데, 경쇄는 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 유래한 체세포 돌연변이된 VH 도메인을 포함하는 중쇄와 연관되고 중쇄는 마우스 중쇄 불변 영역 (CH)를 포함한다.
- [0023] 한 구체예에서, 마우스는 내인성 마우스 VH 유전자 세그먼트의 하나 이상의 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체를 포함하는데, 사람 VH 유전자 세그먼트는 마우스가 사람 VH 유전자 세그먼트를 재배열하고 사람 VH 도메인 및 마우스 CH 도메인을 포함하는, 역 키메라 면역글로불린 중쇄를 발현하는 마우스 CH 영역 유전자와 작동 가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 90-100%의 재배열된 마우스 VH 유전자 세그먼트는 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 VH 유전자 세그먼트는 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 19개, 적어도 39개, 또는 적어도 80 또는 81개의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능적 재배열하지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트, 적어도 25개의 기능적 재배열되

지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트, 또는 적어도 43개의 기능적 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 된다. 한 구체예에서, 마우스는 모든 마우스 D 및 J 세그먼트의 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 D 세그먼트 및 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 J 세그먼트로 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 D 세그먼트는 D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 J 세그먼트는 J1, J3, J4, J5, J6, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 사람 VH 유전자 세그먼트는 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 사람 VH 유전자 세그먼트, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0024] 한 구체예에서, 마우스는 원하는 항원에 특이적으로 결합하는 결합 단백질을 발현하는 B 세포를 포함하는데, 결합 단백질은 사람 V_K1-39/J_K5 유전자 재배열 또는 사람 V_K3-20/J_K1 유전자 재배열로부터 유래한 경쇄를 포함하고, 세포는 VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-39, VH4-59, 및 VH5-51 유전자 세그먼트로부터 선택된 사람 유전자 세그먼트의 재배열로부터 유래한 재배열된 면역글로불린 중쇄 유전자를 포함한다. 한 구체예에서, 하나 이상의 사람 VH 유전자 세그먼트는 J1, J3, J4, J5, 및 J6으로부터 선택된 사람 중쇄 J 유전자 세그먼트로 재배열된다. 한 구체예에서, 하나 이상의 사람 VH 및 J 유전자 세그먼트는 D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, 및 D7-27로부터 선택된 사람 D 유전자 세그먼트로 재배열된다. 특정 구체예에서, 경쇄 유전자는 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개 또는 그 이상의 체세포 돌연변이를 갖는다.

[0025] 한 구체예에서, 마우스는 VH2-5 + JH1 + D6-6, VH3-23 + JH4 + D3, VH3-23 + JH4 + D3-10, VH3-30 + JH1 + D6-6, VH3-30 + JH3 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D1-7, VH3-30 + JH4 + D5-12, VH3-30 + JH4 + D6-13, VH3-30 + JH4 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D7-27, VH3-30 + JH5 + D3-22, VH3-30 + JH5 + D6-6, VH3-30 + JH5 + D7-27, VH4-39 + JH3 + D1-26, VH4-59 + JH3 + D3-16, VH4-59 + JH3 + D3-22, VH4-59 + JH4 + D3-16, VH5-51 + JH3 + D5-5, VH5-51 + JH5 + D6-13, 및 VH5-51 + JH6 + D3-16를 포함하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변영역 유전자 서열을 포함하는 B 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, B 세포는 마우스 중쇄 불변 영역과 융합된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 마우스 경쇄 불변 영역과 융합된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합 단백질을 발현한다.

[0026] 한 구체예에서, 사람 VL 유전자 세그먼트는 사람 V_K1-39/J_K5 유전자 세그먼트이고, 마우스는 (i) 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한 VL 도메인 및 (ii) 마우스 CL을 포함하는, 역 키메라 경쇄를 발현하는데; 경쇄는 (i) 마우스 CH 및 (ii) 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 및 6-1 사람 VH 유전자 세그먼트, 및 이들의 조합으로부터 선택된 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 유래한 체세포 돌연변이된 사람 VH 도메인을 포함하는 역 키메라 중쇄와 연관된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, CL은 마우스 κ CL이다.

[0027] 한 구체예에서, 사람 VL 유전자 세그먼트는 사람 V_K3-20/J_K1 유전자 세그먼트이고, 마우스는 (i) 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한 VL 도메인 및 (ii) 마우스 CL을 포함하는, 역 키메라 경쇄를 발현하는데; 경쇄는 (i) 마우스 CH 및 (ii) 1-2, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 4-59, 및 5-51 사람 VH 유전자 세그먼트, 및 이들의 조합으로부터 선택된 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 유래한 체세포 돌연변이된 사람 VH 도메인을 포함하는 역 키메라 중쇄와 연관된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, CL은 마우스 κ CL이다.

[0028] 한 구체예에서, 마우스는 사람 V_K1-39/J_K5 유전자 세그먼트 및 사람 V_K3-20/J_K1 유전자 세그먼트 둘 다를 포함하고, 마우스는 (i) 사람 V_K1-39/J_K5 유전자 세그먼트 또는 사람 V_K3-20/J_K1 유전자 세그먼트로부터 유래한 VL 도메인, 및 (ii) 마우스 CL을 포함하는, 역 키메라 경쇄를 발현하는데; 경쇄는 (i) 마우스 CH, 및 (ii) 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-1, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 사람 VH 유전자 세그먼트, 및 이들의 조합으로부터 선택된 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 유래한 체세포 돌연변이된 사람 VH를 포함하는 역 키메라 중쇄와 연관된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서 CL은 마우스 κ CL이다.

[0029] 한 구체예에서, 90-100%의 내인성 재배열되지 않은 마우스 VH 유전자 세그먼트는 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 재배열되지 않은 마우스 VH 유전자 세그먼트는 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 18개, 적어도 39개, 적어도 80 또는 81개의 재배열하지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능적 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트, 적어도 25개의

기능적 재배열하지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트, 또는 적어도 43개의 재배열되지 않은 사람 VH 유전자 세그먼트로 된다.

- [0030] 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 C57BL 종이고, 특정 구체예에서, C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 상기 129 종 및 상기 C57BL/6 종의 잡종이다. 또 다른 구체예에서, 마우스는 상기 129 종의 잡종, 또는 상기 BL/6 종의 잡종이다. 특정 구체예에서, 129 종의 잡종은 129S6 (129/SvEvTac) 종이다.
- [0031] 한 구체예에서, 마우스는 사람 V κ 1-39J κ 5 유전자 세그먼트 또는 사람 V κ 3-20J κ 1 유전자 세그먼트로부터 유래한 마우스 κ CL 및 체세포 돌연변이된 사람 VL 도메인을 포함하는 경쇄, 및 마우스 CH 및 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 및 6-1 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 선택된 사람 VH 유전자 세그먼트로부터 유래한 체세포 돌연변이된 사람 VH 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 역 키메라 항체를 발현하는데, 마우스는 완벽한 마우스 항체를 발현하지 않고 완벽한 사람 항체를 발현하지 않는다. 한 구체예에서, 마우스는 내인성 마우스 κ VL 유전자 세그먼트의 사람 V κ 1-39J κ 5 유전자 세그먼트 또는 사람 V κ 3-20J κ 1 유전자 세그먼트로 대체를 포함하고, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 VH 유전자 세그먼트의 완벽한 또는 실질적으로 완벽한 레파토리의 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체를 포함하는 κ 경쇄 로커스를 포함한다.
- [0032] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 마우스로부터 분리된 마우스 세포가 제공된다. 한 구체예에서, 세포는 ES 세포다. 한 구체예에서, 세포는 림프세포이다. 한 구체예에서, 림프세포는 B 세포다. 한 구체예에서, B 세포는 사람 유전자 세그먼트로부터 유래한 가변 도메인을 포함하는 키메라 중쇄; 및 재배열된 사람 V κ 1-39/J 세그먼트, 재배열된 사람 V κ 3-20/J 세그먼트, 또는 이들의 조합으로부터 유래한 경쇄를 발현하는데; 중쇄 가변 도메인은 마우스 불변 영역에 융합되고 경쇄 가변 도메인은 마우스 또는 사람 불변 영역에 융합된다.
- [0033] 한 양태에서, 잡종 세포 (hybridoma)가 제공되는데, d여기서 잡종 세포는 여기에 설명된 바와 같이 마우스의 B 세포로 만들어진다. 특정 구체예에서, B 세포는 여기에 설명된 바와 같이 원하는 에피토프를 포함하는 면역원으로 면역화된 마우스로부터 유래하고, B 세포는 원하는 에피토프와 결합하는 결합 단백질을 발현하고, 결합 단백질은 체세포 돌연변이된 사람 VH 도메인 및 마우스 CH를 갖고, 사람 V κ 1-39J κ 5 또는 사람 V κ 3-20J κ 1 유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 VL 도메인 및 마우스 CL을 갖는다.
- [0034] 한 양태에서, 마우스 배아가 제공되는데, 배아는 여기에 설명된 바와 같이 마우스로부터 유래한 기증자 ES 세포를 포함한다.
- [0035] 한 양태에서, 표적화 벡터가 제공되는데, 벡터의 5' 및 3' 마우스 상동성 팔의 서열을 참고하여 전사 방향에서 5'에서 3'으로, 5' 마우스 상동성 팔, 사람 또는 마우스 면역글로불린 프로모터, 사람 또는 마우스 선도 서열, 및 사람 V κ 1-39J κ 5 또는 사람 V κ 3-20J κ 1 유전자 세그먼트로부터 선택된 LCVR 유전자 세그먼트, 및 3' 마우스 상동성 팔을 포함한다. 한 구체예에서, 5' 및 3' 상동성 팔은 5'에 존재하고 마우스 κ 불변 영역 유전자의 근위에 있는 인핸서 서열에 관하여 서열 5'으로 벡터를 표적화한다. 한 구체예에서, 프로모터는 사람 면역글로불린 가변 영역 유전자 세그먼트 프로모터이다. 특정 구체예에서, 프로모터는 사람 V κ 3-15 프로모터이다. 한 구체예에서, 선도 서열은 마우스 선도 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스 선도 서열은 마우스 V κ 3-7 선도 서열이다.
- [0036] 한 양태에서, 상기 설명된 바와 같이 표적화 벡터가 제공되지만, 5' 마우스 상동성 팔의 위치에서 사람 또는 마우스 프로모터는 부위-특이적 재조합효소 인식 부위 (SRRS)와 5' 플랭킹되고, 3' 마우스 상동성 팔의 위치에서 사람 LCVR 유전자 세그먼트는 SRRS와 3' 플랭킹된다.
- [0037] 한 양태에서, 상기 설명된 바와 같이 마우스에 의해 만들어진 역 키메라 항체는 마우스 CL 및 사람 VL을 포함하여 마우스 CL 및 사람 VL을 포함하는 경쇄, 및 사람 VH 및 마우스 CH를 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0038] 한 양태에서, 항체를 만드는 방법이 제공되는데, 단일 세포에서 (a) 여기에 설명된 바와 같이 사람 CH 유전자 서열과 융합된 면역화된 마우스의 첫 번째 VH 유전자 서열을 발현하는 단계; (b) 여기에 설명된 바와 같이 사람 CL 유전자 서열과 융합하는 면역화된 마우스의 VL 유전자 서열을 발현하는 단계; 및, (c) 완벽히 사람 항체를 발현하기 충분한 조건 하에 세포를 유지하는 단계, 및 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 세포는 여기에 설명된 바와 같이 사람 CH 유전자 서열과 융합된 두 번째 면역화된 마우스의 두 번째 VH 유전자 서열을 포함하고, 첫 번째 VH 유전자 서열은 첫 번째 에피토프를 인식하는 VH 도메인을 암호화하고, 두 번째 VH

유전자 서열은 두 번째 에피토프를 인식하는 VH 도메인을 암호화하는데, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프는 동일하지 않다.

[0039] 한 양태에서, 에피토프-결합 단백질을 만드는 방법이 제공되는데, 여기에 설명된 바와 같이 마우스를 원하는 에피토프를 포함하는 면역원에 노출하는 단계, 마우스가 원하는 에피토프와 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 발생시키기위해 충분한 조건 하에 마우스를 유지하는 단계, 및 원하는 에피토프와 특이적으로 결합하는 면역글로불린을 분리하는 단계를 포함하고; 에피토프-결합 단백질은 사람 V_K1-39J_K5 또는 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트로부터 유래한 마우스 CL 및 사람 VL을 포함하는 경쇄와 연관된, 체세포 돌연변이된 사람 VH 및 마우스 CH를 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0040] 한 양태에서, 에피토프 결합 단백질을 발현하는 세포가 제공되는데, 세포는

[0041] 한 양태에서, 에피토프-결합 단백질을 발현하는 세포가 제공되는데, 세포는 (a) 사람 면역글로불린 경쇄 불변 도메인 cDNA 서열 (예를 들어, 사람 κ 불변 도메인 DNA 서열)과 (직접적으로 또는 연결자를 통해) 융합되는, 사람 V_K1-39J_K5 또는 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 VL 도메인을 암호화하는 사람 VL 뉴클레오티드 서열; 및 (b) 사람 면역글로불린 중쇄 불변 도메인 cDNA 서열과 (직접적으로 또는 연결자를 통해) 융합되는, 첫 번째 사람 VH 뉴클레오티드 서열로부터 유래한 사람 VH 도메인을 암호화하는 첫 번째 사람 VH 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 에피토프-결합 단백질은 첫 번째 에피토프를 인식한다. 한 구체예에서, 에피토프-결합 단백질은 10^{-6} M 이하의, 10^{-8} M 이하의 10^{-9} M 이하의, 10^{-10} M 이하의, 10^{-11} M 이하의, 또는 10^{-12} M 이하의 해리 상수로 첫 번째 에피토프와 결합된다.

[0042] 한 구체예에서, 세포는 두 번째 사람 VH 도메인을 암호화하는 두 번째 사람 VH 뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 두 번째 사람 VH 서열은 (직접적으로 또는 연결자를 통해) 사람 면역글로불린 중쇄 불변 도메인 cDNA 서열과 융합되고, 두 번째 사람 VH 도메인은 특이적으로 첫 번째 에피토프를 인식하지 않고 (예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 또는 그 이상의 해리 상수를 나타냄), 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린 중쇄는 각각 (a)의 동일한 경쇄와 연관된다.

[0043] 한 구체예에서, 두 번째 VH 도메인은 10^{-6} M 이하의, 10^{-8} M 이하의 10^{-9} M 이하의, 10^{-10} M 이하의, 10^{-11} M 이하의, 또는 10^{-12} M 이하의 해리 상수로 두 번째 에피토프와 결합된다.

[0044] 한 구체예에서, 에피토프 결합 단백질은 첫 번째 면역글로불린 중쇄 및 두 번째 면역글로불린 중쇄를 포함하고, 각각 사람 V_K1-39J_K5 또는 사람 V_K3-20J_K1 유전자 세그먼트로부터 선택된 사람 VL 유전자 세그먼트로부터 유래한 동일한 경쇄와 연관되는데, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 나노몰 내지 피코몰의 해리 상수로 첫 번째 에피토프와 결합하고, 두 번째 면역글로불린 중쇄는 나노몰 내지 피코몰의 해리 상수에서 두 번째 에피토프와 결합하고, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프는 동일하지 않고, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 두 번째 에피토프와 결합하지 않거나 마이크로몰 범위보다 약한 (예를 들어, 밀리몰 범위) 해리 상수로 두 번째 에피토프와 결합하고 두 번째 면역 글로불린 중쇄는 첫 번째 에피토프와 결합하지 않거나 마이크로몰 범위보다 약한 (예를 들어, 밀리몰 범위) 해리 상수로 첫 번째 에피토프와 결합하고, 하나 이상의 VL, 첫 번째 면역글로불린 중쇄의 VH, 및 두 번째 면역글로불린 중쇄의 VH, 는 체세포 돌연변이된다.

[0045] 한 구체예에서, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 단백질 A-결합 잔기를 포함하고, 두 번째 면역글로불린 중쇄는 단백질 A-결합 잔기가 결핍된다.

[0046] 한 구체예에서, 세포는 CHO, COS. 293, HeLa, 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포 (예를 들어, PERC.6TM 세포)로부터 선택된다.

[0047] 한 양태에서, 사람 VH 및 마우스 중쇄 불변 도메인, 사람 VL 및 마우스 경쇄 불변 도메인을 포함하는, 역 키메라 항체가 제공되는데, 항체는 여기에 설명된 바와 같이 에피토프를 포함하는 면역원으로 마우스를 면역화하는 단계를 포함하는 과정에 의해 만들어지고, 항체는 특이적으로 마우스가 면역화된 면역원의 에피토프와 결합된다. 한 구체예에서, VL 도메인은 체세포 돌연변이된다. 한 구체예에서, VH 도메인은 체세포 돌연변이된다. 한 구체예에서, VL 도메인 및 VH 도메인 둘 다는 체세포 돌연변이된다. 한 구체예에서, VL은 마우스 κ 불변 도메인과 연결된다.

[0048] 한 양태에서, 내인성 마우스 로커스에서 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 중쇄 가변 유전자 세그먼트; 모든 마우스 경쇄 가변 유전자 세그먼트를 대체하는, 재배열된 V_K1-39J_K5 및 재배열된 V_K3-20J_K1 세그먼트, 또는

이들의 조합으로부터 선택된 하나 또는 두 개 이하의 사람 경쇄 가변 유전자 세그먼트를 대체하는 사람 중쇄 가변 유전자 세그먼트를 포함하는 마우스가 제공되는데; 사람 중쇄 가변 유전자 세그먼트는 마우스 불변 유전자와 연결되고, 사람 경쇄 가변 유전자 세그먼트는 사람 또는 마우스 불변 유전자와 연결된다.

[0049] 한 양태에서, 마우스 ES 세포는 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 중쇄 가변 유전자 세그먼트를 사람 중쇄 가변 유전자 세그먼트로 대체, 및 하나 또는 둘 이하의 재배열된 사람 경쇄 V/J 세그먼트를 포함하고, 사람 중쇄 가변 유전자 세그먼트는 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 유전자와 연결되고, 사람 경쇄 V/J 세그먼트는 마우스 또는 사람 면역글로불린 경쇄 불변 유전자와 연결된다. 특정 구체예에서, 경쇄 불변 유전자는 마우스 불변 유전자이다.

[0050] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 마우스에 의해 만들어진 항원-결합 단백질이 제공된다. 특정 구체예에서, 항원-결합 단백질은 마우스 불변 영역과 융합된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 V_K1-39 유전자 세그먼트 또는 V_K3-20 유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 경쇄 불변 영역은 마우스 불변 영역이다.

[0051] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 마우스의 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열로부터 만들어진 충분한 사람 항원-결합 단백질이 제공되는데, 항원-결합 단백질은 여기에 설명된 바와 같이 마우스의 서열로부터 유래한 사람 가변 영역을 포함하는 충분한 사람 중쇄, 및 V_K1-39 또는 V_K3-20 가변 영역을 포함하는 충분한 사람 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 하나 내지 다섯 개의 체세포 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 마우스의 B 세포에서 중쇄 가변 영역과 짝을 이룬 동족의 경쇄 가변 영역이다.

[0052] 한 구체예에서, 충분한 사람 항원-결합 단백질은 첫 번째 중쇄 및 두 번째 중쇄를 포함하는데, 첫 번째 중쇄 및 두 번째 중쇄는 여기에 설명된 바와 같이 독립적으로 마우스로부터 유래한 다른 가변 영역을 포함하고, 숙주 세포로부터 발현되는 첫 번째 및 두 번째 중쇄 각각은 V_K1-39 유전자 세그먼트 또는 V_K3-20 유전자 세그먼트로부터 유래한 사람 경쇄와 연관된다. 한 구체예에서, 첫 번째 중쇄는 첫 번째 항원의 첫 번째 에피토프와 특이적으로 결합하는 첫 번째 중쇄 가변 영역을 포함하고, 두 번째 중쇄는 두 번째 항원의 두 번째 에피토프와 특이적으로 결합하는 두 번째 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 첫 번째 및 두 번째 항원은 다르다. 특정 구체예에서, 첫 번째 항원 및 두 번째 항원은 같고, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프는 동일하지 않다; 특정 구체예에서, 결합 단백질의 첫 번째 분자에 의한 첫 번째 에피토프의 결합은 결합 단백질의 두 번째 분자에 의한 두 번째 에피토프의 결합을 차단하지 않는다.

[0053] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 마우스의 사람 면역글로불린 서열로부터 유래한 충분한 사람 결합 단백질은 첫 번째 면역글로불린 중쇄 및 두 번째 면역글로불린 중쇄를 포함하는데, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 두 번째 면역글로불린 중쇄의 가변 영역과 동일하지 않은 첫 번째 가변 영역을 포함하고, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 야생형 단백질 A 결합 결정 요인을 포함하고, 두 번째 중쇄는 야생형 단백질 A 결합 결정 요인이 결핍된다. 한 구체예에서, 첫 번째 면역글로불린 중쇄는 분리 조건 하에 단백질 A와 결합하고, 두 번째 면역글로불린 중쇄는 단백질 A와 결합하지 않거나 첫 번째 면역글로불린 중쇄가 분리 조건 하에 단백질 A와 결합하는 것보다 적어도 10배, 100배, 또는 1000배 더 약하게 단백질 A와 결합된다. 특정 구체예에서, 첫 번째 및 두 번째 중쇄는 IgG1 이소타입인데, 두 번째 중쇄는 95R (EU 435R), 96F (RU 436F), 및 이들의 조합으로부터 선택된 변형을 포함하고, 첫 번째 중쇄는 이러한 변형이 결핍된다.

[0054] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 첫 번째 마우스를 첫 번째 에피토프를 포함하는 원하는 첫 번째 항원에 노출하는 단계, 여기에 설명된 바와 같이 두 번째 마우스를 두 번째 에피토프를 포함하는 원하는 두 번째 항원에 노출하는 단계, 첫 번째 및 두 번째 마우스의 원하는 항원에 대한 면역 반응이 각각 증가하는 것을 허용하는 단계, 첫 번째 마우스에서 원하는 첫 번째 항원의 첫 번째 에피토프와 결합하는 첫 번째 사람 중쇄 가변 영역을 확인하는 단계, 두 번째 마우스에서 원하는 두 번째 항원의 두 번째 에피토프와 결합하는 두 번째 사람 중쇄 가변 영역을 확인하는 단계, 원하는 첫 번째 항원의 첫 번째 에피토프와 결합하는 첫 번째 중쇄를 암호화하는 첫 번째 충분한 사람 중쇄 유전자를 만드는 단계, 원하는 두 번째 항원의 두 번째 에피토프와 결합하는 두 번째 중쇄를 암호화하는 두 번째 충분한 사람 중쇄 유전자를 만드는 단계, 이중특이적 항원-결합 단백질을 형성하기 위해 사람 V_K1-39 또는 사람 V_K3-20 유전자 세그먼트로부터 유래한 단일 충분한 사람 경쇄를 발현하는 세포에서 첫 번째 중쇄 및 두 번째 중쇄를 발현하는 단계, 및 이중특이적 항원-결합 단백질을 분리하는 단계를 포함하는, 이중특이적 항원-결합 단백질을 만드는 방법이 제공된다.

[0055] 한 구체예에서, 첫 번째 항원 및 두 번째 항원은 동일하지 않다.

- [0056] 한 구체예에서, 첫 번째 항원 및 두 번째 항원은 동일하고, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프는 동일하지 않다. 한 구체예에서, 첫 번째 중쇄 가변 영역과 첫 번째 에피토프의 결합은 두 번째 중쇄 가변 영역과 두 번째 에피토프의 결합을 차단하지 않는다.
- [0057] 한 구체예에서, 첫 번째 항원은 가용성 항원 및 세포 표면 항원 (예를 들어, 종양 항원), 및 세포 표면 수용체를 포함하는 두 번째 항원으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 세포 표면 수용체는 면역글로불린 수용체이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 수용체는 Fc 수용체이다. 한 구체예에서, 첫 번째 항원 및 두 번째 항원은 같은 세포 표면 수용체이고, 첫 번째 중쇄와 첫 번째 에피토프의 결합은 두 번째 중쇄와 두 번째 에피토프의 결합을 차단하지 않는다.
- [0058] 한 구체예에서, 경쇄의 경쇄 가변 도메인은 2개 내지 5개의 체세포 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 도메인은 첫 번째 또는 두 번째 중쇄 가변 도메인으로 첫 번째 또는 두 번째 면역화된 마우스의 B 세포에서 발현되는 체세포 돌연변이된 동족의 경쇄이다.
- [0059] 한 구체예에서, 첫 번째 충분한 사람 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화도를 감소시키는 아미노산 변형을 일으키고, 두 번째 충분한 사람 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화도를 감소시키는 변형을 포함하지 않는다.
- [0060] 한 양태에서, 본 발명에 따라 만들어진, 사람 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 이중특이적 항체가 제공된다. 또 다른 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이 충분한 사람 항체 또는 충분한 사람 이중특이적 항체를 만들기 위한 마우스의 사용이 제공된다.
- [0061] 달리 지시되지 않거나 문맥상 분명하지 않으면, 여기에 설명된 구체예 및 양태 중 어느 것도 다른 것과 조합으로 사용될 수 있다. 다른 구체예는 다음 설명의 검토에서 당업자에게 분명해 질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 사람 V_K1-39J_K5 유전자 영역으로 대체하는 표적화 계획을 도시한다.
- 도 2는 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 사람 V_K3-20J_K1 유전자 영역으로 대체하는 표적화 계획을 도시한다.
- 도 3은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 사람 VpreB/J_λ5 유전자 영역으로 대체하는 표적화 계획을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 본 발명은 특정 방법, 및 설명된 실험적 조건에 제한되지 않고, 이러한 방법 및 조건은 달라질 수도 있다. 본 발명의 범위가 청구항에 의해 정의되기 때문에, 여기에 사용된 용어는 특정 구체예만 설명하기 위해서이고, 제한할 의도는 없다고 또한 생각될 것이다.
- [0064] 달리 정의되지 않으면, 반대가 명확하게 지시되거나 용어 또는 구절이 사용된 문맥에서 명확하게 분명하지 않으면, 여기에 사용된 모든 용어 및 구절은 용어 및 구절이 업계에서 얻은 의미들을 포함한다. 여기에 설명된 것들과 유사하거나 동등한 어느 방법 및 재료도 본 발명의 수행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 특정 방법 및 재료는 지금 설명된다. 언급된 모든 출판물은 본문에 참고로 포함된다.
- [0065] 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호연결된 네 개의 폴리펩티드 사슬, 두 개의 중쇄 (H) 및 두 개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 (VH) 영역 및 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 (VL) 영역 및 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함한다. VH 및 VL 영역은 골격 영역 (FR)이라고 불리는, 더 보존된 영역과 함께 섞여있는, 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 불리는, 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음의 순서로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 배열된 세 개의 CHR 및 네 개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로 줄여 쓸 수도 있다; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR 및 LCDR3으로 줄여 쓸 수도 있다). 용어 "높은 친화도" 항체는 약 10⁻⁹M 이하의 (예를 들어, 약 1 x 10⁻⁹M, 1 x 10⁻¹⁰M, 1 x 10⁻¹¹M, 또는 약 1 x 10⁻¹²M) 그것의 표적 에피토프에 관하여 KD를 갖는 항체를 나타낸다. 한 구체예에서, KD는 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance), 예를 들어, BIACORE™에 의해 측정된다; 또 다른 구체예에서, KD는 ELISA에 의해 측정된다.

- [0066] 구절 "이중특이적 항체"는 둘 이상의 에피토프와 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중특이적 항체는 일반적으로 다른 에피토프-두 개의 다른 분자 (예를 들어, 두 개의 다른 면역원에서 다른 에피토프) 또는 같은 분자 (예를 들어, 같은 면역원에서 다른 에피토프) 중 하나와 특이적으로 결합한 각각의 중쇄와 함께, 두 개의 동일하지 않은 중쇄를 포함한다. 만약 이중특이적 항체가 두 개의 다른 에피토프 (첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프)와 선택적으로 결합할 수 있으면, 첫 번째 에피토프에 대한 첫 번째 중쇄의 친화도는 일반적으로 두 번째 에피토프에 대한 첫 번째 중쇄, 및 그 반대의 친화도보다 낮은 정도의 적어도 하나 내지 두 개 또는 세 개 또는 네 개 이상의 순서일 것이다. 이중특이적 항체에 의해 특이적으로 결합된 에피토프는 같은 또는 다른 표적에 (예를 들어, 같거나 다른 단백질에) 있을 수 있다. 이중특이적 항체는, 예를 들어, 같은 면역원의 다른 에피토프를 인식하는 중쇄와 결합함으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 같은 면역원의 다른 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열은 같은 또는 다른 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열과 융합될 수 있고, 이러한 서열은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이적 항체는 각각 세 개의 중쇄 CDRs, 다음에 (N-말단 내지 C-말단) CH1 도메인, 경첩, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 갖는 두 개의 중쇄, 및 에피토프-결합 특이성을 제공하지 않지만 각각의 중쇄와 연관될 수 있거나, 각각의 중쇄와 연관될 수 있고 중쇄 에피토프-결합 영역에 의해 결합된 하나 이상의 에피토프와 결합할 수 있거나, 각각의 중쇄와 연관될 수 있고 하나 또는 둘 다의 중쇄와 결합할 수 있는 면역글로불린 경쇄를 갖는다.
- [0067] 용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현하는데 적합한 어느 세포도 포함될 수 있다. 세포는 원핵 세포 및 진핵 세포 (단일 세포 또는 다중 세포), 박테리아 세포 (예를 들어, *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., 등의 종), 미코박테리아 세포, 균 세포, 효모 세포 {예를 들어, 에스. 세레비시에 (*S. cerevisiae*), 에스. 폼베 (*S. pombe*), 피. 파스토리스 (*P. pastoris*), 피. 메타노리카 (*P. methanolic*), 등}, 식물 세포, 곤충 세포 (예를 들어, SF-9, SF-21, 바쿠로바이러스에 감염된 곤충 세포, 양배추은무늬밤나방 (*Trichoplusia ni*), 등}, 비-사람 동물 세포, 사람 세포, 또는 예를 들어, 갑종 세포 또는 콰드로마 (*quadroma*)와 같은 세포 융합의 그것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 사람, 원숭이, 유인원, 햄스터, 래트, 또는 마우스 세포다. 일부 구체예에서, 세포는 진핵 세포가고 다음 세포로부터 선택된다: CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-1 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (상피 세포), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 cell, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르톨리 세포 (Sertoli cell), BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수 세포, 종양 세포, 및 상기 세포들로부터 유래한 세포주. 일부 구체예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스를 발현하는 망막 세포 (예를 들어, PER.C6TM) 세포.
- [0068] 구절 "상보성 결정 영역", 또는 용어 "CDR", 은 면역글로불린 분자 (예를 들어, 항체 또는 T 세포 수용체)의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역에서 두 개의 골격 영역 사이에 정상적으로 (즉, 야생형 동물에서) 나타나는 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함한다. CDR은, 예를 들어, 생식계열 서열 또는 재배열되거나 재배열되지 않은 서열, 및, 예를 들어, 원래의 또는 성숙 B 세포 또는 T 세포에 의해 암호화될 수 있다. CDR은 체세포 돌연변이 (예를 들어, 동물의 생식계열에서 암호화되는 서열에 따라 달라짐), 사람화, 및/또는 아미노산 치환, 추가, 또는 결실로 변형될 수 있다. 일부 상황에서 (예를 들어, CDR3에 대해), CDR은 인접하지 않지만 (예를 들어, 재배열되지 않은 핵산 서열에서), 예를 들어, 서열의 스플라이싱 또는 연결 (예를 들어, 중쇄 CDR3를 형성하기 위한 V-D-J 재조합)의 결과로서, B 세포 핵산 서열에서 인접한 둘 이상의 서열 (예를 들어, 생식계열 서열)에 의해 암호화될 수 있다.
- [0069] 보존적인 아미노산 치환을 설명하기 위해 사용될 때, 용어 "보존적인"은 유사한 화학적 성질 (예를 들어, 전하 또는 소수성)의 측쇄 R 그룹을 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 실질적으로 단백질의 원하는 성질, 예를 들어, 원하는 친화도로 표적 에피토프에 특이적으로 결합하는 가변 영역의 능력을 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질의 측쇄를 갖는 아미노산의 거의 예는 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 및 이소루신과 같은 지방족 측쇄; 세린 및 트레오닌과 같은 지방족-히드록실 측쇄; 아스파라긴 및 글루타민과 같은 아미드 함유 측쇄; 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판과 같은 방향족 측쇄; 리신, 아르기닌, 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄; 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄; 및 시스테인 및 메티오닌과 같은 황 함유 측쇄를 포함한다. 보존적 아미노산 치환기는 예를 들어, 발린/루신/이소루신, 페닐알라닌/티로신, 리신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르트산염, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 일부 구체예에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에 사용된 바와 같이, 단백질에서 원래의 어느 잔기도 알라닌으로 치환이 될 수 있다. 일부 구체예에서, 본문에 참고로 포함되는, Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:

1443-45에 개시된 PAM250 log-가능성 매트릭스에서 양성 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다.

- [0070] 일부 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄에서 잔기 위치는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 달라진다. 일부 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 이들의 기능적 단편 (예를 들어, B 세포로부터 발현 및 분비가 허용된 단편)에서 잔기 위치는 여기에 아미노산 서열이 나열된 경쇄와 동일하지 않지만, 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 달라질 수도 있다.
- [0071] 이 구절 "에피토프-결합 단백질"은 적어도 하나의 CDR을 갖고 선택적으로 에피토프를 인식할 수 있는, 예를 들어, 약 1 마이크로몰 이하 (예를 들어, 약 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 또는 약 1×10^{-12} M의 K_D)의 K_D 를 갖는 에피토프와 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 치료적 에피토프-결합 단백질 (예를 들어, 치료적 항체)은 흔히 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 를 요한다.
- [0072] 구절 "기능적 단편"은 발현되고, 분비되고, 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위의 K_D 의 에피토프와 특이적으로 결합할 수 있는 에피토프-결합 단백질의 단편을 포함한다. 특이적 인식은 적어도 마이크로몰 범위, 나노몰 범위, 또는 피코몰 범위인 K_D 를 갖는 것을 포함한다.
- [0073] 용어 "생식계열"은 비-체세포 돌연변이된 세포, 예를 들어, 비-체세포 돌연변이된 세포 또는 전 B 세포 또는 조혈 세포에서 면역글로불린 핵산 서열에 대한 참고를 포함한다.
- [0074] 구절 "중쇄", 또는 "면역글로불린 중쇄"는 어느 유기체로부터의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열도 포함한다. 달리 명시하지 않으면, 중쇄 가변 도메인은 세 개의 중쇄 CDR 및 네 개의 FR을 포함한다. 중쇄의 단편은 CDR, CDR 및 FR, 및 이들의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 가변 도메인 (N-말단에서 C-말단까지)에 이어, CH1 도메인, 경첩, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능적 단편은 특이적으로 에피토프를 인식 (예를 들어, 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위의 K_D 를 갖는 에피토프를 인식)할 수 있는 단편을 포함하고, 그것은 세포에서 발현되고 분비될 수 있고, 적어도 하나의 CDR을 포함한다.
- [0075] 서열에 관해 사용될 때, 용어 "동일성"은 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 업계에 알려진 많은 다른 알고리즘에 의해 결정된 바와 같은 동일성을 포함한다. 여기에 설명된 일부 구체예에서, 동일성은 10.0의 오픈 갭 패널티, 0.1의 확장된 갭 패널티를 활용하는 ClustalW v. 1.83 (느림) 정렬을 사용하여, 및 Gonnet 유사성 매트릭스 (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008)를 사용하여 결정될 수 있다. 서열의 동일성에 관하여 비교된 서열의 길이는 특정 서열에 의존적이지만, 경쇄 불변 도메인의 경우에서, 길이는 예를 들어, 베타 가닥을 포함하는 두 개의 베타 시트 (sheet)를 형성할 수 있고, 사람 또는 마우스의 적어도 하나의 CH1 도메인과 상호작용할 수 있는 기본 경쇄 불변 도메인을 형성하기 위해 자가결합 (self-association) 할 수 있는 경쇄 불변 도메인을 감싸기에 충분한 길이의 서열을 함유해야 한다. CH1 도메인의 경우에서, 서열의 길이는 베타 가닥을 포함하는 두 개의 베타 시트를 형성할 수 있고 마우스 또는 사람의 적어도 하나의 경쇄 불변 도메인과 상호작용할 수 있는 CH1 도메인을 감싸기에 충분한 서열을 함유해야 한다.
- [0076] 구절 "면역글로불린 분자"는 두 개의 면역글로불린 중쇄 및 두 개의 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 중쇄는 동일하거나 다를 수도 있고, 경쇄는 동일하거나 다를 수도 있다.
- [0077] 구절 "경쇄"는 어느 유기체로부터 면역글로불린 경쇄 서열도 포함하고, 달리 명시되지 않으면, 사람 κ 및 λ 경쇄 및 VpreB, 뿐만 아니라 대리 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 (VL) 도메인은, 달리 명시되지 않으면, 전형적으로 세 개의 경쇄 CDR 및 네 개의 골격 (FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전체 길이 경쇄는, 아미노 말단에서 카르복실 말단까지, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는, VL 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 경쇄는, 예를 들어, 그들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 첫 번째 또는 두 번째 에피토프와 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 그들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 이상의 에피토프와 결합하고 이를 인식하는 중쇄와 결합하고 이를 인식하거나, 지원하는 것들을 포함한다. 일반적인 경쇄는 사람 V κ 1-39J κ 5 유전자 세그먼트 또는 사람 V κ 3-20J κ 1 유전자 세그먼트로부터 유래한 것들이고, 같은 것들의 체세포 돌연변이된 (예를 들어, 친화도-성숙한) 버전을 포함한다.
- [0078] 구절 "마이크로몰 범위"는 1-999 마이크로몰을 의미한다; 구절 "나노몰 범위"는 1-999 나노몰을 의미한다; 구절 "피코몰 범위"는 1-999 피코몰을 의미한다.
- [0079] 구절 "체세포 돌연변이"는 클래스-전환을 경험한 B 세포로부터 핵산 서열에 대한 참고를 포함하는데, 예를 들어, 클래스 전환을 경험하지 않은 B 세포 및 클래스 전환을 경험한 B 세포 사이에서 CDR 또는 골격 핵산 서열

의 차이와 같이, 클래스 전환된 B 세포에서 면역글로불린 가변 영역 (예를 들어, 중쇄 가변 도메인 또는 중쇄 CDR 또는 FR 서열을 포함하는)의 핵산 서열은 클래스 전환 전 B 세포에서 핵산 서열과 동일하지 않다. "체세포 돌연변이"는 친화도-성숙한하지 않은 B 세포에서 해당하는 면역글로불린 가변 영역 서열과 동일하지 않은 친화도-성숙한 B 세포의 핵산 서열에 대한 참고를 포함한다. 구절 "체세포 돌연변이"는 또한 원하는 에피토프에 B 세포 노출 후 B 세포의 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열에 대한 참고를 포함하는데, 핵산 서열은 원하는 에피토프에 B 세포 노출 전 해당하는 핵산 서열과 다르다. 구절 "체세포 돌연변이"는 동물, 예를 들어, 면역원 도전에 반응하여, 사람 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열을 갖는 마우스에서 발생되고 이러한 동물에서 본질적으로 작동되는 선택 과정으로부터 일어나는 항체의 서열에 대한 참고를 포함한다.

[0080] 핵산 서열에 대한 참고로, 용어 "재배열되지 않은"은 동물 세포의 생식계열에 존재하는 핵산 서열을 포함한다.

[0081] 구절 "가변 도메인"은 (달리 지시되지 않으면) N-말단에서 C-말단까지의 서열에서, 다음 아미노산 영역을 포함하는 (원하는 바와 같이 변형된) 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 아미노산 서열을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0082] **일반적인 경쇄**

[0083] 유용한 다중특이적 에피토프 결합 단백질, 예를 들어, 이중특이적 항체를 만들기 위한 이전의 노력은 흔히 공유하는 페리다임-시험관 내에서 헤테로다имер의 이중특이적 사람 면역글로불린과 짝을 이루기 위한 적합한 포맷을 합리적으로 조작, 또는 시행착오를 통해 조작하기 위한 서열의 선택 또는 조작-인 다양한 문제에 의해 저해된다. 불행하게도, 시험관 내에서 모두가 아닌 대부분의 조작적 접근은 크게 개개의 분자에 대한 적합한 즉석 고정을 제공한다. 반면, 사람 치료로 이어질 수 있는 생체 내에서 적절한 짝을 선택하기 위해 복합체 유기체를 활용하는 방법은 실현되지 않았다.

[0084] 일반적으로, 원래의 마우스 서열은 흔히 사람 치료적인 서열로 좋은 공급원은 아니다. 적어도 그 이유로, 일반적인 사람 경쇄와 짝을 이루는 마우스 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 발생시키는 것은 제한된 실제적 유용성이다. 일반적인 사람 경쇄와 커플링되는 능력을 유지하는 동안, 확실한 결과로, 에피토프 특이성 및 친화도를 유지하도록 희망하지만 더 많은 시험관 내 조작 노력이 마우스 중쇄 가변 서열을 사람화하기 위해 노력하는 시행착오 과정에 소비될 것이다. 이러한 과정의 끝에서, 최종 산물은 특이성 및 친화도의 일부를 유지할 것이고, 일반적인 경쇄와 연관되지만, 궁극적으로 사람에 면역원성은 엄청난 위험일 것이다.

[0085] 그러므로, 사람 치료제를 만드는 적합한 마우스는 내인성 마우스 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 자리에서 사람 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 적합하게 큰 레파토리를 포함한다. 사람 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 역 키메라 중쇄 (즉, 사람 가변 도메인 및 마우스 불변 영역을 포함하는 중쇄)를 형성하기 위해 내인성 마우스 중쇄 불변 도메인을 재배열하고 이와 재조합할 수 있을 것이다. 중쇄는 클래스 전환 및 체세포 초돌연변이를 할 수 있어서 중쇄 가변 도메인의 적합하게 큰 레파토리는 사람 경쇄 가변 영역의 제한된 레파토리와 연관될 수 있는 한 가지를 선택하기 위해 마우스에 사용 가능하다.

[0086] 복수의 중쇄에 대해 일반적인 경쇄를 선택하는 마우스는 실용적인 활용성을 갖는다. 다양한 구체예에서, 일반적인 경쇄를 발현만 할 수 있는 마우스에서 발현하는 항체는 동일하거나 실질적으로 동일한 경쇄와 관련되고 이를 발현할 수 있는 중쇄를 가질 것이다. 이것은 특히 이중특이적 항체를 만드는데 유용할 것이다. 예를 들어, 이러한 마우스는 첫 번째 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 발생시키기 위해 첫 번째 면역원으로 면역화될 수 있다. 마우스 (또는 마우스와 유전적으로 같은 것)는 두 번째 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 발생시키기 위해 두 번째 면역원으로 면역화될 수 있다. 가변 중쇄는 B 세포로부터 클로닝될 수 있고 같은 중쇄 불변 영역, 및 같은 경쇄를 발현하고, 이중특이적 항체를 만들기 위해 세포에서 발현될 수 있는데, 이중특이적 항체의 경쇄 구성요소는 경쇄 구성요소와 관련되고 이를 발현하기 위해 마우스에서 선택되었다.

[0087] 발명자들은 가변 영역이 생식계열 서열, 예를 들어, 친화도 성숙하거나 체세포 돌연변이된 가변 영역으로부터 떨어진 중쇄를 포함하는, 오히려 중쇄의 다양한 족과 적합하게 짝을 이루는 면역글로불린 경쇄를 발생시키기 위해 마우스를 조작하였다. 다양한 구체예에서, 마우스는 사람 경쇄 가변 도메인과 체세포 분열을 포함하는 사람 중쇄 가변 도메인이 짝을 이루는 것으로 고안되고, 따라서, 사람 치료제로서 사용에 적합한 높은 친화도의 결합 단백질로 가는 루트를 가능하게 한다.

[0088] 유기체 내에서 항체 선택의 길고 복잡한 과정을 통해, 유전적으로 조작된 마우스는 사람 중쇄 가변 도메인의 다양한 수거와 제한된 수의 사람 경쇄 옵션이 짝을 이루는데 생물학적으로 적절한 선택을 한다. 이것을 이루기 위

해, 마우스는 다양한 사람 중쇄 가변 도메인 옵션과 결합된 제한된 수의 사람 경쇄 가변 도메인 옵션을 제공하도록 조작된다. 면역원으로 도전시, 레파토리에서 숫자 또는 경쇄 옵션에 의해 대부분 또는 단독으로 제한된, 마우스는 항체를 면역원으로 개발하기 위한 그것의 레파토리에서 용액의 수를 최대화한다. 다양한 구체예에서, 이것은 마우스가, 특히 체세포 돌연변이된 사람 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 비교적 다양한 사람 중쇄 가변 도메인과 호환되는, 경쇄 가변 도메인의 적합하고 호환되는 체세포 돌연변이를 이루는 것을 허용하는 것을 포함한다.

[0089] 경쇄 옵션의 제한된 레파토리를 이루기 위해, 마우스는 원래의 마우스 경쇄 가변 도메인을 만드는, 또는 재배열하는, 그것의 능력을 비기능적으로 또는 실질적으로 비기능적으로 만들기 위해 조작된다. 이것은, 예를 들어, 마우스의 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 삭제함으로써 이루어질 수 있다. 내인성 마우스 로커스는 외인성 사람 가변 영역 유전자 세그먼트가 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 유전자를 재배열하고 이와 재결합할 수 있고 재배열된 역 키메라 경쇄 유전자 (사람 가변, 마우스 불변)를 형성할 수 있는 방식으로, 작동 가능하게 내인성 마우스 경쇄 불변 도메인에 결합된, 선택된 외인성 적합한 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트에 의해 변형될 수도 있다. 다양한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 체세포 돌연변이 될 수 있다. 다양한 구체예에서, 체세포 돌연변이를 얻기 위해 경쇄 가변 영역의 능력을 최대화하기 위해, 적절한 인헨서가 마우스에 유지된다. 예를 들어, 내인성 마우스 κ 가변 영역 유전자 세그먼트를 사람 κ 가변 영역 유전자 세그먼트로 대체하기 위한 마우스 κ 로커스의 변형에 있어서, 마우스 κ 인트론의 인헨서 및 마우스 κ 3' 인헨서는 기능적으로 유지되거나, 방해받지 않는다.

[0090] 다양한 역 키메라 (사람 가변, 마우스 불변) 중쇄와 연관된 역 키메라 (사람 가변, 마우스 불변) 경쇄의 제한된 레파토리를 발현하는 유전적으로 조작된 마우스가 제공된다. 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트는 삭제되고 작동 가능하게 내인성 마우스 κ 불변 영역 유전자와 연결된, 단일 (또는 두 개의) 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트로 대체된다. 사람 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 체세포 초돌연변이를 최대화에 대한 구체예에서, 마우스 κ 인트론의 인헨서 및 마우스 κ 3' 인헨서는 유지된다. 다양한 구체예에서, 마우스는 또한 비기능적 λ 경쇄 로커스, 또는 이것의 삭제 또는 로커스가 λ 경쇄를 만들 수 없게 만드는 삭제를 포함한다.

[0091] 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 경쇄 가변 유전자 세그먼트가 결핍되고 사람 가변 유전자 세그먼트를 포함하는 경쇄 가변 영역 로커스, 한 구체예에서, 마우스 불변 영역과 작동 가능하게 연결된, 재배열된 사람 V/J 서열을 포함하는 유전적으로 조작된 마우스가 제공되는데, 로커스는 체세포 초돌연변이를 경험할 수 있고, 로커스는 마우스 불변 영역과 결합된 사람 V/J 서열을 포함하는 경쇄를 발현한다. 따라서, 다양한 구체예에서, 로커스는 마우스 κ 3' 인헨서를 포함하는데, 이것은 체세포 초돌연변이의 정상, 또는 야생형, 레벨과 연관성이 있다.

[0092] 하나 또는 두 개의 경쇄가 예를 들어, 1개 내지 5개의 체세포 돌연변이를 포함하는 사람 경쇄 가변 영역을 포함하는 구체예를 포함하여, 다양한 구체예에서 항원으로 면역화될 때 유전적으로 조작된 마우스는 하나 또는 두 개의 재배열된 경쇄를 발현하고 이것으로 기능하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 다양한 재배열을 나타내는 B 세포를 발생시킨다. 다양한 구체예에서, 그렇게 발현되는 사람 경쇄는 마우스에서 발현되는 어느 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역과도 연관될 수 있고 이를 발현할 수 있다.

[0093] **하나 이상의 에피토프와 결합하는 에피토프-결합 단백질**

[0094] 여기에 설명된 조성물 및 방법은 높은 친화도로 하나 이상의 에피토프와 결합하는 결합 단백질, 예를 들어, 이종특이적 항체를 만들기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이점은 각각 단일 경쇄와 연관되는 적합하게 높은 결합 (예를 들어, 친화도 성숙) 중쇄 면역글로불린 체인을 선택하는 능력을 포함한다.

[0095] 이종특이적 결합 단백질의 합성 및 발현은, 부분적으로 두 개의 다른 중쇄 와 연관될 수 있고 이를 발현할 수 있는 적합한 경쇄를 확인하는 것과 연관된 이슈 때문에, 및 부분적으로 분리 이슈 때문에, 문제가 많았다. 여기에 설명된 방법 및 조성물은, 달리 자연적인 과정을 통해, 체세포 돌연변이된 (예를 들어, 친화도 성숙) 중쇄를 포함하는, 하나 이상의 중쇄와 연관되고 이를 발현할 수 있는 적합한 경쇄를 선택하는 유전적으로 변형된 마우스를 허용한다.

[0096] 역 키메라 중쇄 (즉, 사람 가변 및 마우스 불변)를 갖는 친화도 성숙 항체를 발현하는, 여기에 설명된 바와 같이 면역화된 마우스의 적합한 B 세포의 사람 VL 및 VH 서열은 확인되고 적합한 사람 불변 영역 유전자 서열 (예를 들어, 사람 IgG1)을 가진 발현 벡터의 골격에서 클로닝될 수 있다. 두 개의 이러한 구조가 제조될 수 있는데, 각 구조는 다른 에피토프와 결합하는 중쇄 가변 도메인을 암호화한다. 생식계열 서열에서 또는 서열이

체세포 돌연변이된 B 세포로부터, 사람 VLs (예를 들어, 사람 V_κ1-39J_κ5 또는 사람 V_κ3-20J_κ1) 중 하나는 적합한 사람 불변 영역 유전자 (예를 들어, 사람 κ 불변 유전자)에 대한 골격에서 융합될 수 있다. 이 세 개의 완벽한 사람 중쇄 및 경쇄 구조는 발현에 적합한 세포에 위치할 수 있다. 세포는 두 개의 주요 중: 동일한 경쇄를 갖는 호모다имер 중쇄, 및 이 동일한 경쇄를 갖는 헤테로다имер 중쇄를 발현할 것이다. 이 주요 중의 쉬운 분리를 허용하기 위해, 중쇄 중 하나는 단백질 A 결합 결정 요인을 생략하기 위해 변형되고, 헤테로다имер의 결합 단백질과 다른 호모다имер의 결합단백질의 친화도로 이어진다. 이 이슈를 나타내는 조성물 및 방법은, 본 원에 참고로 포함된, US 2010/0331527A1로 공개된, "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format"라는 제목의, 2010년 6월 25일 출원된, USSN 12/823,838에 설명된다.

[0097] 한 양태에서, 여기에 설명된 바와 같이, 에피토프-결합 단백질이 제공되는데, 사람 VL 및 VH 서열은 원하는 에피토프로 면역화된, 여기에 설명된 마우스로부터 유래한다.

[0098] 한 구체예에서, 첫 번째 및 두 번째 폴리펩티드를 포함하는 에피토프-결합 단백질이 제공되고, 첫 번째 폴리펩티드는, N-말단에서 C-말단으로, 첫 번째 에피토프에 선택적으로 결합하는 첫 번째 에피토프-결합 영역을 포함하고, 그 다음 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG4, 및 이들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH3 영역을 포함하고; 및, 두 번째 폴리펩티드는, N-말단에서 C-말단으로, 두 번째 에피토프에 선택적으로 결합하는 두 번째 에피토프-결합 영역을 포함하고, 그 다음 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG4, 및 이들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 CH3 영역을 포함하는데, 두 번째 CH3 영역은 단백질 A에 대한 두 번째 CH3 도메인의 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함한다.

[0099] 한 구체예에서, 두 번째 CH3 영역은 H95R 변형 (IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의해 H435R)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 두 번째 CH3 영역은 Y96F 변형 (IMGT; EU에 의해 Y436F)을 더 포함한다.

[0100] 한 구체예에서, 두 번째 CH3 영역은 변형된 사람 IgG1로부터 오고, D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, 및 V82I (IMGT; EU에 의해 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, 및 V422I)로 구성된 그룹으로부터 선택된 변형을 더 포함한다.

[0101] 한 구체예에서, 두 번째 CH3 영역은 변형된 사람 IgG2로부터 오고, N44S, K52N, 및 V82I (IMGT; EU에 의해 N384S, K392N, 및 V422I)로 구성된 그룹으로부터 선택된 변형을 더 포함한다.

[0102] 한 구체예에서, 두 번째 CH3 영역은 변형된 사람 IgG4로부터 오고, Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, 및 V82I (IMGT; EU에 의해 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, 및 V422I)로 구성된 그룹으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0103] 하나 이상의 에피토프와 결합하는 에피토프-결합 단백질을 만드는 한 방법은 본 발명에 따라 원하는 첫 번째 에피토프를 포함하는 항원으로 첫 번째 마우스를 면역화하는 것인데, 마우스는 경쇄를 재배열하고 형성할 수 있는 내인성 마우스 VL을 함유하지 않는 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스를 포함하고, 내인성 마우스에서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 로커스는 마우스 내인성 경쇄 불변 영역 유전자와 작동 가능하게 결합된 단일 사람 VL 유전자 세그먼트이고, 사람 VL 유전자 세그먼트는 사람 V_κ1-39J_κ5 및 사람 V_κ3-20J_κ1로부터 선택되고, 마우스에 의해 만들어지는 면역글로불린 중쇄는 사람 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 포함하는 단독의 또는 실질적으로 단독의 중쇄인, 내인성 마우스 VH 유전자 세그먼트는 전체적으로 또는 부분적으로 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체된다. 면역화될 때, 이러한 마우스는 역 키메라 항체를 만들 것이고 두 개의 사람 경쇄 가변 도메인 (예를 들어, 사람 V_κ1-39J_κ5 및 사람 V_κ3-20J_κ1) 중 단지 하나만을 포함한다. B 세포가 원하는 에피토프와 결합하는 VH를 암호화하는 것으로 확인될 때, VH (및, 선택적으로, VL)의 뉴클레오티드 서열은 회수될 수 있고 (예를 들어, PCR에 의해) 적합한 사람 면역글로불린 불변 도메인을 갖는 골격의 발현 구조로 클로닝될 수 있다. 이 과정은 두 번째 에피토프와 결합하는 두 번째 VH 도메인을 확인하기 위해 반복될 수 있고, 두 번째 VH 유전자 서열은 회수될 수 있고 두 번째 적합한 면역글로불린 불변 도메인에 대한 골격의 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린 불변 도메인은 같거나 다른 이소타입일 수 있고, 면역글로불린 불변 도메인 (하지만 다른 것은 그렇지 않음)은 여기에 또는 US 2010/0331527A1에 설명된 바와 같이 변형될 수 있고, 에피토프-결합 단백질은 적합한 세포에서 발현될 수 있고, 예를 들어, US 2010/0331527A1에 설명된 바와 같이, 호모다имер 에피토프 결합 단백질과 비교하여, 단백질 A에 대한 다른 친화도에 기초하여 분리될 수도 있다.

[0104] 한 구체예에서, 여기에 설명된 바와 같이 마우스로부터 첫 번째 친화도 성숙 (예를 들어, 하나 이상의 체세포 초돌연변이를 포함하는) 사람 VH 뉴클레오티드 서열 (VH1)을 확인하는 단계, 여기에 설명된 바와 같이 마우스로

부터 두 번째 친화도 성숙 (예를 들어 하나 이상의 체세포 돌연변이를 포함하는) 사람 VH 뉴클레오타이드 서열 (VH2)을 확인하는 단계, US 2010/0331527A1에 설명된 바와 같이 중쇄1 (HC1)을 형성하기 위한 단백질 A 결정 요인 변형이 결핍된 사람 중쇄를 가진 골격의 VH1을 클로닝하는 단계, 에 설명된 바와 같이 중쇄2 (HC2)를 형성하기 위해 단백질 A 결정 요인을 포함하는 사람 중쇄를 가진 골격의 VH2를 클로닝하는 단계, 사람 경쇄 불변 도메인과 융합된 사람 V_K1-39J_K5 및 사람 V_K3-20J_K1을 포함하는 사람 면역글로불린 경쇄를 또한 발현하는, 세포에 HC1을 포함하는 발현 벡터 또는 HC2를 포함하는 다른 발현 벡터를 도입하는 단계, 세포가 VH1에 의해 암호화된 VH 도메인 및 VH2에 의해 암호화된 VH 도메인을 포함하는 이중특이적 에피토프 결합 단백질을 발현하는 것을 허용하는 단계, 및 단일특이적인 호모다imer 에피토프 결합 단백질과 비교하여 단백질 A와 결합하는 차별된 능력에 기초하여 이중특이적 에피토프 결합 단백질을 분리하는 단계를 포함하는, 이중특이적 에피토프 결합 단백질을 만드는 방법이 제공된다. 특정 구체예에서, HC1은 IgG1, 및 HC2는 변형 H95R (IMGT; EU에 의해 H435R)을 포함하고 변형 Y96F (IMGT; EU에 의해 Y436F)를 더 포함하는 IgG1이다. 한 구체예에서, VH1에 의해 암호화되는 VH 도메인, VH2에 의해 암호화되는 VH 도메인, 또는 둘 다는 체세포 돌연변이된다.

[0105] 일반적인 사람 VL과 함께 발현하는 사람 VH 유전자

[0106] 네 개의 다른 항원에 대해 제기된 친화도 성숙 항체의 다양한 사람 가변 영역은 그들의 동족 경쇄, 또는 사람 V_K1-39J_K5, 사람 V_K3-20J_K1, 또는 사람 VpreBJ_λ5 중 적어도 하나와 함께 발현되었다 (실시예 1 참조). 각각의 항원에 대한 항체에 대해, 다른 유전자 패밀리의 체세포 돌연변이된 높은 친화도 중쇄는 재배열된 사람 생식계열 사람 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1 영역과 성공적으로 짝을 이루었고 중쇄 및 경쇄를 발현하는 세포로부터 분리되었다. V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1에 대해, 다음의 사람 VH 패밀리로부터 유래한 VH 도메인은 순조롭게 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 및 6-1을 발현하였다. 따라서, 하나 또는 둘 다의 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1의 사람 VL 도메인의 제한된 레퍼토리를 발현하기 위해 조작된 마우스는 마우스 VH 유전자 세그먼트를 사람 VH 유전자 세그먼트로 대체하기 위해 변형된 VH 로커스로부터 다양한 체세포 변형된 사람 VH 도메인을 발생시킬 것이다.

[0107] 원하는 항원이 면역화될 때, 단일 재배열된 경쇄 (예를 들어, V_K1-39/J 및 V_K3-20/J)와 연관된 역 키메라 (사람 가변, 마우스 불변) 면역글로불린 중쇄를 발현하기 위해 유전적으로 조작된 마우스는 다양한 사람 V 세그먼트 재배열을 포함하고 항원과 그것의 리간드가 결합하는 것을 차단하는 능력에 관하여, 및 다양한 항원과 결합하는 능력에 관하여 다양한 성질을 갖는 다양한 높은 친화도 항원 특이적 항체를 발현하는 B 세포를 발생시켰다 (실시예 5 내지 10 참조).

[0108] 따라서, 여기에 설명된 마우스 및 방법은 체세포 돌연변이된 사람 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 다양한 재배열로부터 일어나는, 다양한 친화도 (약 나노몰 이하의 K_D를 나타내는 단계를 포함), 다양한 특이성 (같은 항원과 다른 에피토프의 결합을 포함)을 나타내는, 같은 또는 실질적으로 같은 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역과 연관되고 이를 발현하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 만들고 선택하는데 유용하다.

[0109] 다음 예는 당업자들에게 본 발명의 방법 및 조성물을 만들고 사용하는 방법을 설명하기 위해 제공되고, 발명자들이 그들의 발명이라고 생각하는 것의 범위를 제한하려고 하지 않는다. 사용된 숫자 (예를 들어, 양, 온도, 등)에 관하여 정확성을 확실히 하기 위해 노력하였지만 일부 실험적 오차 및 편차는 설명되어야 한다. 달리 지시되지 않으면, 일부는 중량비 일부이고, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨로 나타나고, 압력은 대기압 수준이다.

[0110] 실시예

[0111] 실시예 1. 선택된 사람 경쇄 가변 영역과 연관된 사람 중쇄 가변 영역의 확인

[0112] 시험관 내 발현 시스템은 항원 특이적 사람 항체로부터 단일 재배열된 사람 생식계열 경쇄가 사람 중쇄와 동시에 발현될 수 있는지 결정하기 위해 구성되었다.

[0113] 유전적으로 변형된 마우스의 사람 항체를 발생시키는 방법은 알려져 있다 (예를 들어, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE® 참조). VELOCIMMUNE® 기술은 마우스가 항원성 자극에 반응하여 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 포함하는 항체를 생산하는, 내인성 마우스 불변 영역 로커스와 작동 가능하게 연결된 사람 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는 유전적으로 변형된 마우스의 발생을 수반한다. VELOCIMMUNE® 마우스로부터 생산된 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA는 완벽히 사람이다. 처음에, 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 높은 친화도 키메라 항체를 분리한다. 하기 설명된 바와 같이, 항체는 친화도, 선택성, 에피토프 등을 포함하는, 바람직한 특징으로 특징지어지고 이에 대해 선택된다. 마

우스 불변 영역은 비-IgM 이소타입, 예를 들어, 야생형 또는 변형된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 함유하는 완벽한 사람 항체를 발생시키기 위해서, 원하는 사람 불변 영역으로 대체된다. 선택된 불변 영역이 특이적 사용에 따라 다양할 수도 있지만, 높은 친화도 항원 결합 및 표적 특이성 특징은 가변 영역에 있다.

[0114]

VELOCIMMUNE® 마우스를 혈관형성 (Antigen C)을 촉진하는 성장 인자로 면역화하였고 항원-특이적 사람 항체를 분리하였고 업계에 인식된 표준 기술을 사용하여 V 유전자 사용에 대해 서열화하였다. 선택된 항체를 사람 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 클로닝하였고 69개의 중쇄를 세 개의 사람 경쇄: (1) 사람 κ 불변 영역에 연결된 동족 κ 경쇄, (2) 사람 κ 불변 영역과 연결된 재배열된 사람 생식계열 V κ 1-39J κ 5, 또는 (3) 사람 κ 불변 영역과 연결된 재배열된 사람 생식계열 V κ 3-20J κ 1 중 하나와 짝을 이루는 것에 대해 선택하였다. 각각의 중쇄 및 경쇄 짝을 표준 기술을 사용하여 CHO-K1 세포에 동시 트랜스펙션하였다. ELISA 검정에서 상층액에서 항체의 존재를 항-사람 IgG에 의해 검출하였다. 항체 적정농도 (ng/ml)를 각각의 중쇄/경쇄 짝에 대해 결정하였고 다른 재배열된 생식계열 경쇄의 적정농도를 부모의 항체 분자 (즉, 동족의 경쇄와 짝을 이룬 중쇄)로 얻은 적정농도와 비교하였고 원래 적정농도의 퍼센트를 계산하였다 (표 1). V_H: 중쇄 가변 영역. ND: 현재의 실험 조건 하에 검출된 발현 없음.

표 1					
V _H	항체 적정농도 (ng/ml)			원래 적정농도의 퍼센트	
	동족의 LC	V κ 1-39J κ 5	V κ 3-20J κ 1	V κ 1-39J κ 5	V κ 3-20J κ 1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-
4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1
-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4

[0115]

-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6
3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9
-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5
3-15	55	68	ND	123.1	-
-	32	68	3	210.9	10.6
1-8	28	48	ND	170.9	-
3-33	124	192	21	154.3	17.0
3-33	0	113	ND	56550.0	-
3-33	10	157	1	1505.8	12.5
3-33	6	86	15	1385.5	243.5
3-23	70	115	22	163.5	31.0
3-7	71	117	21	164.6	29.6
3-33	82	100	47	122.7	57.1
3-7	124	161	41	130.0	33.5

[0116]

[0117]

유사한 실험에서 VELOCIMUNE® 마우스를 여러 다른 항원으로 면역화하였고 항원 특이적 사람 항체의 선택된 중쇄를 다른 재배열된 사람 생식계열 경쇄와 짝을 이루는 그들의 능력에 대해 테스트하였다 (상기 설명된 바와 같이). 이 실험에서 사용된 항원은 콜레스테롤 항상성에 수반되는 효소 (항원 A), 글루코스 항상성을 조절하는데 수반되는 혈청 호르몬 (항원 B), 혈관형성을 촉진하는 성장 인자 (항원 C) 및 세포 표면 수용체 (항원 D)를 포함하였다. 항원 특이적 항체를 각각의 면역화 그룹의 마우스로부터 분리하였고 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 클로닝하였고 서열화하였다. 중쇄 및 경쇄의 서열로부터, V 유전자 사용을 결정하였고 선택된 중쇄는 그들의 동족 경쇄 또는 재배열된 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 영역과 짝을 이루었다. 각각의 중쇄/경쇄 짝을 CHO-K1 세포에 동시 트랜스펙션하였고 ELISA 검정에서 상층액에서 항체의 존재를 항-사람 IgG에 의해 검출하였다. 항체 적정농도 (ug/ml)를 각각의 중쇄/경쇄 짝에 대해 결정하였고 다른 재배열된 사람 생식계열 경쇄의 적정농도를 부모의 항체 분자 (즉, 동족의 경쇄와 짝을 이룬 중쇄)로 얻은 적정농도와 비교하였고 원래 적정농도의 퍼센트를 계산하였다 (표 2). V_K: K 경쇄 가변 영역. ND: 현재의 실험 조건 하에 검출된 발현 없음.

표 2							
항원	항체	V _H	V _K	적정농도 (μg/ml)			원래의 적정농도의 퍼센트
				V _H 단독	V _H + V _K	V _H + V _K 1-39J _K 5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2	104
	283	3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
	637	3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
	638	3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
	624	3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
	284	3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
	653	3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
	268	4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
	633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157
	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92
	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
	693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55

[0118]

	155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221
	163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
	171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
	145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
	49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
	51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
	159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
	169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
	134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
	141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
	142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

[0119]

[0120]

이 실험들로부터 얻은 결과들은 체세포 돌연변이된, 다른 유전자 패밀리로부터 높은 친화도 중쇄가 재배열된 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1 영역과 짝을 이룰 수 있고 정상 항체 분자로서 세포로부터 분비될 수 있다는 것을 증명한다. 표 1에 나타난 바와 같이, 부모의 항체의 동족 경쇄와 비교하여 재배열된 사람 V_K1-39J_K5 경쇄와 짝을 이룰 때 항체 적정농도는 약 61% (69 중 42) 중쇄에 대해 및 재배열된 V_K3-20J_K1 경쇄와 짝을 이룰 때 약 29% (69 중 20) 중쇄에 대해 증가하였다. 약 20% (69 중 14)의 중쇄에 대하여, 재배열된 사람 생식계열 경쇄 둘 다는 부모 항체의 동족 경쇄와 비교하여 발현의 증가를 수여하였다. 표 2에 나타난 바와 같이,

재배열된 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 영역은 부모 항체에 대한 동족 경쇄와 비교하여 항원의 다른 클래스의 범위에 대해 특이적인 여러 중쇄의 발현의 증가를 수여하였다. 항체 적정농도는 부모 항체의 동족 경쇄와 비교하여 약 35% (15/43)의 중쇄에 대해 2배 이상 증가되었다. 두 개의 중쇄 (315 및 316)에 대해, 부모 항체와 비교하여 증가는 10배보다 더 컸다. 부모 항체의 동족 경쇄에 비해 증가 발현을 나타낸 모든 중쇄 내에, 패밀리 세개 (VH3)의 중쇄는 다른 중쇄 가변 영역 유전자 패밀리와 비교하여 더 표현된다. 이것은 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1 경쇄와 짝을 이루는 사람 VH3 중쇄의 좋은 관계를 증명한다.

[0121] **실시예 2. 재배열된 사람 생식계열 경쇄 로커스의 발생**

[0122] 마우스 게놈의 박테리아 인공 염색체 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) 클론 302g12 및 254m04 (Invitrogen)을 변형하기 위해 다양한 재배열된 사람 생식계열 경쇄 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 만들었다 (US Pat. No. 6,586,251 및 Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6): 652-659 참조). 이 두 개의 BAC 클론을 사용하여, 게놈의 구조를 단일 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역을 함유하도록 조작하였고 이전에 내인성 κ 가변 및 합류 유전자 세그먼트를 삭제하도록 변형된 내인성 κ 경쇄 로커스에 삽입하였다.

[0123] **A. 재배열된 사람 생식계열 경쇄 표적화 벡터의 구조**

[0124] 세 개의 다른 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역을 업계에 알려진 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 만들었다. 이 세 개의 영역을 구성하기 위해 사용된 사람 가변 영역 세그먼트는 재배열된 사람 V_K1-39J_K5 서열, 재배열된 사람 V_K3-20J_K1 서열 및 재배열된 사람 VpreBJ λ 5 서열을 포함하였다.

[0125] 마우스 V_K3-7 유전자의 엑손 1 (선도 펩티드를 암호화하는) 및 인트론의 1을 함유하는 DNA 세그먼트를 데노보 DNA 합성 (de novo DNA synthesis) (Integrated DNA Technologies)에 의해 만들어졌다. 자연적으로 발생하는 BlnI 제한 효소 사이트까지의 5' 번역되지 않은 영역의 일부는 포함되었다. 사람 게놈의 BAC 라이브러리로부터 사람 V_K1-39 및 V_K3-20 유전자의 엑손을 PCR 증폭하였다. 정방향 프라이머는 마우스 V_K3-7 유전자의 인트론의 1의 스플라이스 수용체 사이트를 함유하는 5' 확장을 가졌다. 사람 V_K1-39 서열의 PCR에 사용된 역방향 프라이머는 사람 J_K5를 암호화하는 확장을 포함하였지만, 사람 V_K3-20 서열의 PCR에 사용된 역방향 프라이머는 사람 J_K1을 암호화하는 확장을 포함하였다. 사람 VpreBJ λ 5 서열을 데노보 DNA 합성 (Integrated DNA Technologies)에 의해 만들어졌다. 스플라이스 기증 사이트 (splice donor site)를 포함하는 사람 J_K-C_K 인트론의 일부를 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI로부터 PCR 증폭하였다. 정방향 PCR 프라이머는 사람 J_K5, J_K1, 또는 J λ 5 서열의 확장 암호화 부분을 포함하였다. 역방향 프라이머는 PI-SceI 사이트를 포함하였는데, 이것은 이전에 인트론의으로 조작되었다.

[0126] 마우스 V_K3-7 엑손 1/인트론의 1, 사람 가변 경쇄 엑손, 및 사람 J_K-C_K 인트론의 단편을 중복 확장 PCR에 의해 함께 만들어지고, BlnI 및 PI-SceI와 함께 소화되고, 및 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI로 결찰하였는데, 이것은 사람 V_K3-15 가변 유전자 세그먼트의 프로모터를 함유하였다. 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI 내에 리실 산화효소 (lysyl oxidase; lox)화된 히그로마이신 카세트는 NotI 및 AscI 사이트에 의해 플랭킹된 FRT (FLP 표적 부위)화된 히그로마이신 카세트로 대체되었다. 이 플라스미드의 NotI/PI-SceI 단편을 변형된 마우스 BAC 254m04로 결찰하였는데, 이것은 마우스 J_K-C_K 인트론의, 마우스 C_K 엑손, 및 마우스 ES 세포의 상동재조합에 대한 3' 상동성 팔을 제공하는, 약 75 kb의 마우스 κ 로커스의 게놈 서열 다운스트림의 일부를 함유한다. 이 BAC의 NotI/AscI 단편을 변형된 BAC 302g12로 결찰하였는데, 이것은 FRT화된 네오마이신 카세트 및 ES 세포에서 상동재조합에 대한, 약 23 kb의 내인성 κ 로커스의 게놈의 서열 업스트림을 함유한다.

[0127] **B. 재배열된 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 표적화 벡터 (도 1)**

[0128] 제한 효소 사이트를 표적화 벡터로 클로닝을 위해 조작된 경쇄 인서트의 5' 및 3' 말단에 도입하였다: 5' 말단에 AscI 사이트 및 3' 말단에 PI-SceI 사이트. 5' AscI 사이트 및 3' PI-SceI 사이트 내에 5' 내지 3' 표적화 구조는 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 로커스를 향한 서열 5'를 함유하는 5' 상동성 팔, FRT화된 네오마이신 저항 유전자, 사람 V_K3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 V_K307 가변 유전자 세그먼트의 선도 서열, 재배열된 사람 생식계열 V_K1-39J_K5 영역의 오픈 리딩 프레임, 사람 J_K-C_K 인트론의 일부를 함유하는 게놈의 서열, 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻은 내인성 마우스 J_K5 유전자 세그먼트의 서열 3'을 함유하는 3' 상동성 팔을 포함하였다 (도 1, 가운데). 내인성 마우스 κ 경쇄 로커스의 유전자 및/또는 서열 업스트림 및 대부분의 3' J_K 유전자 세그먼트 (예를 들어, 내인성 3' 인핸서)의 다운스트림은 표

적화 구조에 의해 변형되지 않았다 (도 1 참조). 조작된 사람 V_κ1-39J_κ5 로커스의 서열은 SEQ ID NO: 1에 나타난다.

[0129] BAC DNA로 재배열된 사람 생식계열 V_κ1-39J_κ5 영역의 표적화된 삽입을 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역 내에 서열에 위치한 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 마우스 V_κ3-7 선도 서열을 향한 인트론의 서열 3'은 프라이머 ULC-m1 F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEQ ID NO: 2) 및 ULC-m1 R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; SEQ ID NO: 3)로 확인되었다. 재배열된 사람 생식계열 V_κ1-39J_κ5 영역의 오픈 리딩 프레임은 프라이머 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; SEQ ID NO: 4) 및 1633-h2R (TGCAAACTGG ATGCAGCATA G; SEQ ID NO: 5)로 확인되었다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; SEQ ID NO: 6) 및 neoR (GAACACGGCG GCATCAG; SEQ ID NO: 7)로 확인되었다. 표적화된 BAC DNA를 재배열된 사람 생식계열 V_κ1-39J_κ5 영역을 발현하는 키메라 마우스의 발생을 위해 창조된 변형된 ES 세포에 마우스 ES 세포를 전기천공하는데 사용하였다.

[0130] 양성 ES 세포 클론을 내인성 로커스에 삽입된 조작된 V_κ1-39J_κ5 경쇄 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 TAQMAN™ 스크리닝 및 핵형분석 (karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 네오마이신 마커 유전자 내에 결합하는 프로브 neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO: 8), 마우스 V_κ3-7 선도 서열로의 인트론의 서열 3' 내에 결합하는 프로브 ULC-m1 P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEQ ID NO: 9), 및 재배열된 사람 생식계열 V_κ1-39J_κ5 오픈 리딩 프레임 내에 결합하는 프로브 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCT; SEQ ID NO: 10). 양성 ES 세포 클론을 생식계열 V_κ1-39J_κ5 경쇄 영역을 발현하는 새끼의 쓰레기를 생기기 하는 암컷 마우스에 이식하기 위해 사용하였다.

[0131] 대안으로, 재배열된 사람 생식계열 V_κ1-39J_κ5 경쇄 영역을 함유하는 ES 세포를 표적화 구조에 의해 도입된 FRT화된 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구조로 트랜스펙션한다. 선택적으로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스를 번식시킴으로써 제거된다 (예를 들어 US 6,774,279). 선택적으로, 네오마이신 카세트는 마우스에 유지된다.

[0132] C. 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 표적화 벡터 (도 2)

[0133] 유사한 방식으로, 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 영역을 발현하는 조작된 경쇄 로커스를 5'에서 3' 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 로커스를 향한 서열 5'를 함유하는 5' 상동성 팔, FRT화된 네오마이신 저항 유전자, 사람 V_κ3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 V_κ307 가변 유전자 세그먼트의 선도 서열, 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 영역의 오픈 리딩 프레임, 사람 J_κ-C_κ 인트론의 일부를 함유하는 게놈의 서열, 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻은 내인성 마우스 J_κ5 유전자 세그먼트의 서열 3'을 함유하는 3' 상동성 팔을 포함하는 표적화 구조를 사용하여 만들었다 (도 2, 가운데). 조작된 사람 V_κ3-20J_κ1 로커스의 서열은 SEQ ID NO: 11에 나타난다.

[0134] BAC DNA로 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 영역의 표적화된 삽입을 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역 내에 서열에 위치한 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 마우스 V_κ3-7 선도 서열을 향한 인트론의 서열 3'은 프라이머 ULC-m1 F (SEQ ID NO: 2) 및 ULC-m1 R (SEQ ID NO: 3)로 확인되었다. 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 영역의 오픈 리딩 프레임은 프라이머 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEQ ID NO: 12) 및 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEQ ID NO: 13)로 확인되었다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (SEQ ID NO: 6) 및 neoR (SEQ ID NO: 7)로 확인되었다. 표적화된 BAC DNA를 재배열된 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 영역을 발현하는 키메라 마우스의 발생을 위해 창조된 변형된 ES 세포에 마우스 ES 세포를 전기천공하는데 사용하였다.

[0135] 양성 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 로커스에 삽입된 조작된 V_κ3-20J_κ1 경쇄 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 TAQMAN™ 스크리닝 및 핵형분석 (karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 네오마이신 마커 유전자 내에 결합하는 프로브 neoP (SEQ ID NO: 8), 마우스 V_κ3-7 선도 서열 내에 결합하는 프로브 ULC-m1 P (SEQ ID NO: 9), 및 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 오픈 리딩 프레임 내에 결합하는 프로브 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCTGC AGGG; SEQ ID NO: 14). 양성 ES 세포 클론을 암컷 마우스에 이식하기 위해 사용하였다. 새끼의 쓰레기는 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 경쇄 영역을 발현한다.

[0136] 대안으로, 사람 생식계열 V_κ3-20J_κ1 경쇄 영역을 함유하는 ES 세포를 표적화 구조에 의해 도입된 FRT화된 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구조로 트랜스펙션할 수 있다. 선택적으로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스를 번식시킴으로써 제거될 수도 있다 (예를 들어 US 6,774,279). 선택적

으로, 네오마이신 카세트는 마우스에 유지된다.

[0137] **D. 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 표적화 벡터 (도 3)**

[0138] 유사한 방식으로, 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 영역을 발현하는 조작된 경쇄 로커스를 5'에서 3' 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 로커스를 향한 서열 5'를 함유하는 5' 상동성 팔, FRT화된 네오마이신 저항 유전자, 사람 V κ 3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 V κ 307 가변 유전자 세그먼트의 선도 서열, 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 영역의 오픈 리딩 프레임, 사람 J κ -C κ 인트론의 일부를 함유하는 게놈의 서열, 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻은 내인성 마우스 J κ 5 유전자 세그먼트의 서열 3'을 함유하는 3' 상동성 팔을 포함하는 표적화 구조를 사용하여 만들었다 (도 3, 가운데). 조작된 사람 VpreBJ λ 5 로커스의 서열은 SEQ ID NO: 15에 나타난다.

[0139] BAC DNA로 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 영역의 표적화된 삽입을 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역 내에 서열에 위치한 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 마우스 V κ 3-7 선도 서열을 향한 인트론의 서열 3'은 프라이머 ULC-m1 F (SEQ ID NO: 2) 및 ULC-m1 R (SEQ ID NO: 3)로 확인되었다. 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 영역의 오픈 리딩 프레임은 프라이머 1616-h1F (TGTCCTCGGC CCTTGA; SEQ ID NO: 16) 및 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTCCT; SEQ ID NO: 17)로 확인되었다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (SEQ ID NO: 6) 및 neoR (SEQ ID NO: 7)로 확인되었다. 표적화된 BAC DNA를 재배열된 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 영역을 발현하는 키메라 마우스의 발생을 위해 창조된 변형된 ES 세포에 마우스 ES 세포를 전기천공하는데 사용하였다.

[0140] 양성 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 로커스에 삽입된 조작된 VpreBJ λ 5 경쇄 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 TAQMANTM 스크리닝 및 핵형분석 (karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단히 말하면, 네오마이신 마커 유전자 내에 결합하는 프로브 neoP (SEQ ID NO: 8), 마우스 V κ 3-7 선도 서열 내에 결합하는 프로브 ULC-m1 P (SEQ ID NO: 9), 및 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 오픈 리딩 프레임 내에 결합하는 프로브 1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; SEQ ID NO: 18). 양성 ES 세포 클론을 생식계열 VpreBJ λ 5 경쇄 영역을 발현하는 새끼의 쓰레기를 생기기 하는 암컷 마우스에 이식하기 위해 사용하였다.

[0141] 대안으로, 사람 생식계열 VpreBJ λ 5 경쇄 영역을 함유하는 ES 세포를 표적화 구조에 의해 도입된 FRT화된 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구조로 트랜스팩션할 수 있다. 선택적으로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시킴으로써 제거될 수도 있다 (예를 들어 US 6,774,279). 선택적으로, 네오마이신 카세트는 마우스에 유지된다.

[0142] **실시예 3. 단일 재배열된 사람 생식계열 경쇄를 발현하는 마우스의 발생**

[0143] 상기 설명된 표적화된 ES 세포를 기증 ES 세포로서 사용하였고 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 (예를 들어, US Pat. No. 7,294,754 및 Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1): 91-99 참조) 8-세포 단계 마우스 배아로 도입하였다. 조작된 사람 생식계열 V κ 1-39J κ 5 경쇄 영역, V κ 3-20J κ 1 경쇄 영역 또는 VpreBJ λ 5 경쇄 영역을 독립적으로 함유하는 VELOCIMICE®를 독특한 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역의 존재를 검출하는 대립유전자 검정 (Valenzuela et al., supra)의 변형을 사용하여 지노타이핑 (genotyping)에 의해 확인하였다.

[0144] 새끼들을 지노타이핑하고 독특한 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역에 대한 새끼 이형접합체 (heterozygous)는 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역의 발현으로 특징지어지는 것에 대해 선택된다.

[0145] **실시예 4. 단일 재배열된 사람 생식계열 경쇄를 발현하는 마우스의 교배**

[0146] **A. 내인성 Ig λ 넉아웃 (KO)**

[0147] 조작된 경쇄 로커스를 활용하기 위해서, 하나의 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역을 함유하는 마우스를 내인성 λ 경쇄 로커스에서 결실을 함유하는 또 다른 마우스와 교배한다. 이 방식에서, 실시예 2에서 설명된 바와 같이 얻어진 자손은, 그들의 유일한 경쇄로서, 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역을 발현할 것이다. 업계에 인식된 표준 기술에 의해, 대안으로, 상업적 사육자 (예를 들어, The Jackson Laboratory)에 의해 교배를 수행한다. 조작된 경쇄 로커스 및 내인성 λ 경쇄 로커스의 결실을 함유하는 마우스 중은 독특한 경쇄의 존재 및 내인성 마우스 λ 경쇄의 부재에 대해 선별된다.

[0148] **B. 사람화된 내인성 중쇄 로커스**

[0149] 조작된 사람 생식계열 경쇄를 함유하는 마우스를 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자 로커스를 사람 중쇄 가변 유전자 로커스로 대체를 함유하는 마우스와 교배한다 (US 6,596,541; VELOCIMMUNE® mouse, Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 참조). VELOCIMMUNE® 마우스는 마우스가 항원성 자극에 반응하여 사람 중쇄 가변 영역 및 마우스 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 생산하는 내인성 마우스 불변 영역 로커스와 작동 가능하게 연결된 사람 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 포함한다. 항체의 중쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA를 분리하고 사람 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA와 작동 가능하게 연결하였다. DNA는 그때 항체의 전체 사람 중쇄를 발현할 수 있는 세포에서 발현된다.

[0150] 내인성 마우스 VH 로커스를 내인성 κ 경쇄 로커스에서 사람 VH 로커스 및 단일 재배열된 사람 생식계열 VL 영역으로 대체를 함유하는 마우스를 얻는다. 단일 사람 경쇄 (사람 VL 및 마우스 CL)와 함께 역 키메라 항체 함유 체세포 돌연변이된 중쇄 (사람 VH 및 마우스 CH)는 원하는 항원으로 면역화 시 얻어진다. 항체를 발현하는 B 세포의 VH 및 VL 뉴클레오티드 서열이 확인되고 전체 사람 항체는 적합한 발현 시스템에서 VH 및 VL 뉴클레오티드 서열과 사람 CH 및 CL 뉴클레오티드 서열의 융합에 의해 만들어진다.

[0151] **실시예 5. 사람 중쇄 및 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역을 발현하는 마우스로부터 항체의 발생**

[0152] 다른 내인성 Ig 로커스의 변형 및 결실을 함유하는 다양한 원하는 종에 조작된 사람 경쇄 영역을 함유하는 마우스의 교배 후 (실시예 4에 설명된 바와 같이), 선택된 마우스는 원하는 항원으로 면역화될 수 있다.

[0153] 일반적으로, 단일 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역 중 하나를 함유하는 VELOCIMMUNE® 마우스는 항원으로 도전하고, 림프 세포 (B-세포와 같은)를 동물의 혈청으로부터 회수한다. 불멸의 잡종 세포주를 제조하기 위해 림프 세포를 골수 세포와 융합하고, 이러한 잡종 세포주는 면역화에 사용된 항원에 대해 특이적인 사람 중쇄 가변 및 재배열된 사람 생식계열 경쇄를 함유하는 항체를 생산하는 잡종 세포주를 확인하기 위해 선별되고 선택된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA를 분리하였고 바람직한 이소타입의 중쇄 및 경쇄의 불변 영역과 연결하였다. 내인성 가변 영역의 존재 및 내인성 로커스에 존재하는 어느 추가적인 cis-작용하는 요소 때문에, 각각의 항체의 단일 경쇄는 체세포 돌연변이 될 수도 있다. 이것은 단일 경쇄 및 다양한 중쇄 서열을 포함하는 항원-특이적인 레파토리에 추가적인 다양성을 더한다. 얻어진 클로닝된 항체 서열은 다음에 CHO 세포와 같은, 세포에서 발현된다. 대안으로, 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA를 항원-특이적 림프 세포로부터 직접적으로 확인한다.

[0154] 처음에, 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 높은 친화도 키메라 항체를 분리한다. 상기 설명된 바와 같이, 항체는 친화도, 선택성, 에피토프, 등을 포함하는 원하는 특징으로 특징지어지고 이에 대해 선택된다.

[0155] 마우스 불변 영역은 체세포 돌연변이된 사람 중쇄 및 본 발명의 재배열된 사람 생식계열 경쇄 영역으로부터 유래한 단일 경쇄를 함유하는 전체 사람 항체를 발생시키기 위해 원하는 사람 불변 영역으로 대체된다. 적합한 사람 불변 영역은, 예를 들어, 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4를 포함한다.

[0156] 내인성 마우스 중쇄 로커스의 사람 V, D, 및 J 유전자 세그먼트로 대체 및 내인성 마우스 κ 경쇄 로커스의 조작된 생식계열 V κ 1-39J κ 5 사람 경쇄 영역 또는 조작된 생식계열 V κ 3-20J κ 1 사람 경쇄 영역 (상기 설명됨)으로 대체를 함유하는 VELOCIMMUNE® 마우스의 별도의 코호트는 사람 세포-표면 수용체 단백질 (항원 E)로 면역화되었다. 항원 E를 3-4일 마다 6번 연이은 주사로 마우스 뒷다리 발바닥에 직접적으로 투여하였다. 주사 전 2 내지 3 마이크로그램의 항원 E를 10 pg의 CpG 올리고뉴클레오티드 (Cat # tlr1-modn-ODN1826 올리고뉴클레오티드; InVivogen, San Diego, CA) 및 25 ug의 Adju-Phos (알루미늄 포스페이트 겔 보조제, Cat# H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark)를 섞는다. 희생되기 3-5일 전에 주어지는, 최종 항원 리콜 전 전체 6번의 주사가 주어진다. 네 번째 및 여섯 번째 주사 후 혈액은 수거되고 항체 면역 반응은 표준 항원-특이적 면역검정에 의해 관찰된다.

[0157] 원하는 면역 반응이 이루어질 때, 지라 세포를 수거하고 그들의 생존력을 보존하고 잡종 세포주를 형성하기 위해 마우스 골수 세포와 융합한다. 잡종 세포주는 항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체를 생산하는 세포주를 확인하기 위해 선별되고 선택된다. 이 기술을 사용하여 여러 항-항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체 (즉, 사람 중쇄 가변 도메인, 같은 사람 경쇄 가변 도메인, 및 마우스 불변 도메인)를 얻었다.

[0158] 대안으로, U.S. 2007/0280945A1에 설명된 바와 같이, 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체를 골수 세포와 융합하지 않고 항원-양성 B 세포로부터 직접적으로 분리하였고, 그 전문은 본원에 참고로 포함된다. 이 방법을 사용하여,

여러 완벽한 사람 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체 (즉, 사람 중쇄 가변 도메인, 조작된 사람 V_K1-39_K-5 경쇄 또는 조작된 사람 V_K3-20J_K1 경쇄 영역, 및 마우스 불변 도메인)을 얻었다.

[0159] 이 실시예의 방법에 따라 모범적인 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체의 생물학적 성질은 하기 제시된 섹션에서 상세하게 설명된다.

[0160] **실시예 6. 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체에서 중쇄 유전자 세그먼트 사용**

[0161] 생산된 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체의 구조를 분석하기 위해, 핵산 암호화 중쇄 항체 가변 영역을 클로닝하였고 서열화하였다. 항체의 핵산 서열 및 예측된 아미노산 서열로부터, 유전자 사용을 조작된 사람 V_K1-39J_K5 경쇄 또는 조작된 사람 V_K3-20J_K1 경쇄 영역을 함유하는 면역화된 VELOCIMUNE® 마우스로부터 얻은 선택된 일반적인 경쇄 항체의 중쇄 가변 영역 (HCVR)에 대해 확인하였다. 결과는 표 3 및 4에 나타나는데, 이것은 본 발명의 마우스가 단지 사람 V_K1-39- 또는 조작된 사람 V_K3-20-유래한 경쇄로부터 경쇄를 발현하는 마우스를 활용할 때, 다양한 재배열 때문에, 다양한 사람 중쇄 유전자 세그먼트로부터 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체를 발생시킨다. 2개, 3개, 4개, 및 5개의 패밀리의 사람 V_H 유전자 세그먼트는 항원-특이적 항체를 생산하기 위해 다양한 사람 D_H 세그먼트 및 사람 J_H 세그먼트로 재배열하였다.

표 3			
V _K 1-39J _K 5			
일반적인 경쇄 항체			
항체	HCVR		
	V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1
3022	3-23	3-10	4
3028	3-23	3-3	4
2955	3-30	6-6	1
3043	3-30	6-6	3
3014	3-30	1-7	4
3015	3-30	1-7	4
3023	3-30	1-7	4
3024	3-30	1-7	4
3032	3-30	1-7	4
3013	3-30	5-12	4
3042	3-30	5-12	4
2985	3-30	6-13	4
2997	3-30	6-13	4
3011	3-30	6-13	4
3047	3-30	6-13	4
3018	3-30	6-6	4
2948	3-30	7-27	4
2987	3-30	7-27	4
2996	3-30	7-27	4
3005	3-30	7-27	4
3012	3-30	7-27	4
3020	3-30	7-27	4
3021	3-30	7-27	4
3025	3-30	7-27	4
3030	3-30	7-27	4
3036	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5
2949	3-30	6-6	5
2950	3-30	6-6	5

[0162]

2954	3-30	6-6	5
2978	3-30	6-6	5
3016	3-30	6-6	5
3017	3-30	6-6	5
3033	3-30	6-6	5
3041	3-30	6-6	5
3004	3-30	7-27	5
3010	4-59	3-16	3
3019	4-59	3-16	3
2964	4-59	3-22	3
3027	4-59	3-16	4
3046	5-51	5-5	3

[0163]

표 4			
Vk3-20Jk1 일반적인 경쇄 항체			
항체	HCVR		
	V _H	D _H	J _H
2968	4-39	1-26	3
2975	5-51	6-13	5
2972	5-51	3-16	6

[0164]

[0165] 실시예 7. Luminex™ 검정에 의한 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체의 블록 능력의 결정

[0166] 항원 E에 대하여 증가된 98개의 사람 일반적인 경쇄 항체를 비드-기초한 검정에서 항원 E의 자연적 리간드 (리간드 Y)와 항원 E의 결합을 차단하는 블록하는 능력에 대해 테스트하였다.

[0167] 항원 E의 세포 밖의 도메인 (ECD)은 두 개의 myc 에피토프 태그 및 6X 히스티딘 태그 (항원 E-mmH)와 MES 완충액에 20 ug/ml 농도로, 카르복실화된 마이크로스피어와 커플링된 아민과 결합되었다. 혼합물을 상온에서 2시간 동안 배양 후 1M Tris pH 8.0으로 비드 불활성화 후 0.05% (v/v) Tween-20을 함유하는 PBS로 세척하였다. 그때 비드는 2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)를 함유하는 PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 블록되었다. 96웰 여과 플레이트에서, 항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체를 함유하는 상층액은 완충액에 1:15로 희석되었다. 항체 상층액으로서 같은 배지 성분인 가짜 상층액을 함유하는 음성 대조군을 제조하였다. 항원 E-표지된 비드를 상층액에 추가하였고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 비오틴화된 리간드 Y 단백질은 최종 농도 0.06 nM로 추가되었고 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 비드 표지된 Antigen E-myc-myc-6His와 결합된 비오틴화된 리간드 Y의 검출은 스트렙타비딘 (Moss Inc, Pasadena, MD)과 접합된 R-Phycoerythrin으로 결정된 후 Luminex™ 유동 세포분석법에 기초한 분석기로 측정되었다. 리간드 Y 없는 샘플의 배경 평균 형광 강도 (MFI)를 모든 샘플로부터 뺐다. 퍼센트 블로킹은 각각의 샘플의 배경을 뺀 MFI를 조정된 음성 대조군 값으로 나누고, 100을 곱하고 100에서 결괏값을 뺀으로써 계산된다.

[0168] 유사한 실험에서, 항원 E에 대한 같은 98개의 사람 일반적인 경쇄 항체를 항원 E와 리간드 Y 표지된 비드의 결합을 블록하는 능력에 대해 테스트하였다.

[0169] 간단히 말하면, 리간드 Y는 MES 완충액에 20 ug/ml의 농도로 희석된 카르복실화된 마이크로스피어와 커플링된 아민이었다. 혼합물은 상온에서 2시간 동안 배양 후 1M Tris pH 8로 비드의 불활성화 후 0.05% (v/v) Tween-20을 함유하는 PBS로 세척하였다. 그때 비드는 2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)를 함유하는 PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 블록되었다. 96웰 여과 플레이트에서, 항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체를 함유하는 상층액은 완충액에 1:15로 희석되었다. 항체 상층액으로서 같은 배지 성분인 가짜 상층액을 함유하는 음성 대조군을 제조하였다. 비오틴화된 항원 E-mmH를 최종 농도 0.06 nM로 추가하였고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 리간드 Y 표지된 비드를 항체/항원 E 혼합물에 추가하였고 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 리간드 Y-비드와 결합된 비오틴화된 항원 E-mmH의 검출은 스트렙타비딘 (Moss Inc, Pasadena, MD)과 접합된 R-Phycoerythrin으로 결정된 후 Luminex™ 유동 세포분석법에 기초한 분석기로 측정되었다. 항원 E 없는 샘플의 배경 평균 형광 강도 (MFI)를 모든 샘플에서 뺐다. 퍼센트 블로킹은 각각의 샘플의 배경을 뺀 MFI를 조정된 음

성 대조군 값으로 나누고, 100을 곱하고 100에서 결과 값을 뺌으로써 계산된다.

- [0170] 표 5 및 6은 두 번의 LuminexTM 검정으로 테스트된 모든 98개의 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체에 대한 퍼센트 블로킹을 나타낸다. ND: 현재 실험 조건 하에 결정 안 됨
- [0171] 상기 설명된 첫 번째 LuminexTM 실험에서, Vκ1-39Jκ5 조작된 경쇄를 함유하는 80개의 일반적인 경쇄 항체를 항원 E-표지된 비드와 결합하는 리간드 Y를 블록하는 그들의 능력에 대해 테스트하였다. 이 80개의 일반적인 경쇄 항체 중, 68개는 >50% 블로킹을 증명하였지만, 12개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 6개 및 <25% 블로킹에서 6개). Vκ3-20Jκ1 조작된 경쇄를 함유하는 18개의 일반적인 경쇄 항체에 대해, 12개는 항원 E-표지된 비드와 결합하는 리간드 Y의 >50% 블로킹을 증명하였지만, 6개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 3개 및 <25% 블로킹에서 3개).
- [0172] 상기 설명된 두 번째 LuminexTM 실험에서, Vκ1-39Jκ5 조작된 경쇄를 함유하는 같은 80개의 일반적인 경쇄 항체를 리간드 Y-표지된 비드와 결합하는 항원 E를 블록하는 그들의 능력에 대해 테스트하였다. 이 80개의 일반적인 경쇄 항체 중, 36개는 >50% 블로킹을 증명하였지만, 44개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 27개 및 <25% 블로킹에서 17개). Vκ3-20Jκ1 조작된 경쇄를 함유하는 18개의 일반적인 경쇄 항체에 대해, 1개는 항원 E-표지된 비드와 결합하는 리간드 Y의 >50% 블로킹을 증명하였지만, 17개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 5개 및 <25% 블로킹에서 12개).
- [0173] 표 5 및 6의 데이터는 표 3 및 4에 설명된 재배열이 다양한 효능의 정도로 리간드 Y와 그것의 동족 수용체 항원 E의 결합을 블록하는 항-항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체를 발생시켰다는 것을 입증하는데, 이것은 항원 E에 관하여 중복 및 비-중복 에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함하는 표 3 및 4의 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체와 일치한다.

표 5		
Vk1-39Jk5 일반적인 경쇄 항체		
항체	항원 E-표지된 비드의 % 블록	용액에서 항원 E의 % 블록
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9
2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4
2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7
3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6

[0174]

3010	98.0	82.6
3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6
3016G	93.1	66.4
3017	94.8	70.2
3017G	87.9	40.8
3018	85.4	54.0
3018G	26.1	12.7
3019	99.3	92.4
3019G	99.3	88.1
3020	96.7	90.3
3020G	85.2	41.5
3021	74.5	26.1
3021G	81.1	27.4
3022	65.2	17.6
3022G	67.2	9.1
3023	71.4	28.5
3023G	73.8	29.7
3024	73.9	32.6
3024G	89.0	10.0
3025	70.7	15.6
3025G	76.7	24.3
3027	96.2	61.6
3027G	98.6	75.3
3028	92.4	29.0
3028G	87.3	28.8
3030	6.0	10.6

[0175]

3030G	41.3	14.2
3032	76.5	31.4
3032G	17.7	11.0
3033	98.2	86.1
3033G	93.6	64.0
3036	74.7	32.7
3036G	90.1	51.2
3041	95.3	75.9
3041G	92.4	51.6
3042	88.1	73.3
3042G	60.9	25.2
3043	90.8	65.8
3043G	92.8	60.3

[0176]

표 6		
Vκ3-20Jκ1 일반적인 경쇄 항체		
항체	항원 E-표지된 비드의 % 블록	용액에서 항원 E의 % 블록
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3
2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2
2975G	32.0	19.5
2976	1.0	1.0
2976G	50.4	20.4

[0177]

[0178]

실시예 8. ELISA에 의한 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체의 블로킹 능력 결정

[0179]

항원 E에 대한 사람 일반적인 경쇄 항체를 ELISA에서 리간드 Y로 코팅된 표면에 결합하는 항원 E를 블로킹하는 능력에 대해 테스트하였다.

[0180]

리간드 Y는 PBS에 희석된 2 g/ml의 농도로 96웰 플레이트에 코팅되었고 하룻밤 동안 배양 후 0.05% Tween-20을 함유한 PBS로 4번 세척하였다. 플레이트는 PBS로 상온에서 1시간 동안 블로킹되었다. 별도의 플레이트에서, 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체를 함유한 상층액을 완충액에 1:10으로 희석하였다. 항체의 같은 성분을 갖는 가짜 상층액은 음성 대조군으로 사용되었다. 항원 E-mmH (상기 설명됨)를 최종 농도 150 nM로 추가하였고 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 항체/항원 E-mmH 혼합물을 그때 리간드 Y를 함유하는 플레이트에 추가하였고 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 리간드 Y와 결합된 항원 E-mmH의 검출은 항-펜타-His 항체 (Qiagen, Valencia, CA)와 결합된 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)로 결정되고 황산에 의해 중화된 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 (BD Biosciences, San Jose, CA)을 사용하여 표준 측색 반응 (standard colorimetric response)에 의해 발전되었다. 흡광도를 0.1초 동안 OD 450에서 읽었다. 항원 E가 없는 샘플의 배경 흡광도는 모든 샘플에서 뺐다. 퍼센트 블로킹은 각각의 샘플의 배경을 뺀 MFI를 조정된 음성 대조군 값으로 나누고, 100을 곱하고 100에서 결과 값을 뺀으로써 계산된다.

[0181]

표 7 및 8은 ELISA로 테스트된 모든 98개의 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체에 대한 퍼센트 블로킹을 나타낸다. ND: 현재 실험 조건 하에 결정 안 됨.

[0182]

이 실시예에서 설명된 바와 같이, 리간드 Y로 코팅된 표면에 항원 E가 결합하는 것을 블로킹하는 그들의 능력에 대해 테스트된 Vκ1-39Jκ5 조작된 경쇄를 함유하는 80개의 일반적인 경쇄 항체 중, 22개는 >50% 블로킹을 증명하였지만, 58개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 20개 및 <25% 블로킹에서 38개). Vκ3-20Jκ1 조작된 경쇄를 함유하는 18개의 일반적인 경쇄 항체에 대해, 1개는 리간드 Y 코팅된 비드와 결합하는 항원 E의 >50% 블로킹을 증명하였지만, 17개는 <50% 블로킹을 증명하였다 (25-50% 블로킹에서 5개 및 <25% 블로킹에서 12개).

[0183]

이 결과들은 또한 항원 E에 관하여 중복 및 비-중복 에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함하는 항원 E-특이적 일반적인 경쇄 항체 풀과 일치한다.

표 7	
Vk1-39Jk5 일반적인 경쇄 항체	
항체	용액에서 항원 E 의 % 블록
2948	21.8
2948G	22.9
2949	79.5
2949G	71.5
2950	80.4
2950G	30.9
2952	66.9
2952G	47.3
2954	55.9
2954G	44.7
2955	12.1
2955G	25.6
2964	34.8
2964G	47.7
2978	90.0
2978G	90.2
2982	59.0
2982G	20.4
2985	10.5
2985G	ND
2987	31.4
2987G	ND
2996	29.3
2996G	ND
2997	48.7
2997G	ND
3004	16.7
3004G	3.5
3005	87.2
3005G	54.3

[0184]

3010	74.5
3010G	84.6
3011	19.4
3011G	ND
3012	45.0
3012G	12.6
3013	39.0
3013G	9.6
3014	5.2
3014G	17.1
3015	23.7
3015G	10.2
3016	78.1
3016G	37.4
3017	61.6
3017G	25.2
3018	40.6
3018G	14.5
3019	94.6
3019G	92.3
3020	80.8
3020G	ND
3021	7.6
3021G	20.7
3022	2.4
3022G	15.0
3023	9.1
3023G	19.2
3024	7.5
3024G	15.2
3025	ND
3025G	13.9
3027	61.4
3027G	82.7
3028	40.3
3028G	12.3
3030	ND

[0185]

3030G	9.5
3032	ND
3032G	13.1
3033	77.1
3033G	32.9
3036	17.6
3036G	24.6
3041	59.3
3041G	30.7
3042	39.9
3042G	16.1
3043	57.4
3043G	46.1

[0186]

표 8	
Vk3-20Jk1 일반적인 경쇄 항체	
항체	용액에서 항원 E 의 % 블록
2968	68.9
2968G	15.2
2969	10.1
2969G	23.6
2970	34.3
2970G	41.3
2971	6.3
2971G	27.1
2972	9.6
2972G	35.7
2973	20.7
2973G	23.1
2974	ND
2974G	22.0
2975	8.7
2975G	19.2
2976	4.6
2976G	26.7

[0187]

[0188]

실시예 9. 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체에 대한 BIAcore™ 친화도 결정

[0189]

선택된 항체 상층액에 대한 평형 해리 상수 (K_D)는 SPR (표면 플라스몬 공명)에 의해 BIAcore™ T100 기구 (GE Healthcare)를 사용하여 결정되었다. 모든 데이터를 25℃에서 러닝 및 샘플 완충액 둘 다로 HBS-EP (10mM Hepes, 150mM NaCl, 0.3mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20, pH 7.4)를 사용하여 얻었다. 항체는 이전에 표준 아민 커플링 화학법 (standard amine coupling chemistry)를 사용하여 고밀도의 항-사람 Fc 항체로 피복된 CM5 센서 칩 표면의 미정제 상층액 샘플에서 캡처되었다. 캡처 단계 중, 상층액을 전체 3분 동안 3 ul/min의 유속으로 항-사람 Fc 표면에 걸쳐 주사하였다. 캡처 단계 후 유속 35 ul/min의 유속으로 2분 동안 100 nM의 농도로 러닝 완충액 또는 분석물을 주사하였다. 캡처된 항체로부터 항원의 해리 를 6분 동안 관찰하였다. 캡처된 항체는 10 mM 글리신, pH1.5의 간단한 주사에 의해 제거되었다. 모든 센서그램은 분석물 센서그램으로부터 완충액 주입된 센서그램을 뺀으로써 두 번 참고된다.

[0190]

분석물 센서그램에서 완충액 주사로부터 센서그램을 뺀으로써 두 번 참고되었고, 그로 인해 캡처 표면에서 항체의 해리 에 의해 일어나는 인공물이 제거된다. 각각의 항체에 대한 결합 데이터는 BIAcore T100 Evaluation 소프트웨어 v2.1을 사용하여 대량 수송과 1:1 결합 모델로 맞다. 결과는 표 9 및 10에 나타난다.

[0191]

표 3 및 4에 나타난 재배열을 포함하는 일반적인 경쇄 항체의 결합 친화도는 나노몰 범위에서 KD를 나타내는 거의 모든 것에 의해 달라진다. 친화도 데이터는 높은 친화도, 클론에 의해 선택된, 및 체세포 돌연변이된, 표 3 및 4에 설명된 재배열된 가변 도메인의 결합 연관성으로 인한 일반적인 경쇄 항체와 일치한다. 이전에 나타난 데이터와 커플링된, 표 3 및 4에 설명된 일반적인 경쇄 항체는 항원 E에서 하나 이상의 에피토프에 대한 특이성을 나타내는, 다양한, 높은 친화도 항체의 수집을 포함한다.

표 9		
Vκ1-39Jκ5 일반적인 경쇄 항체		
항체	100nM 항원 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (분)
2948	8.83	28
2948G	95.0	1
2949	3.57	18
2949G	6.37	9
2950	4.91	17
2950G	13.6	5
2952	6.25	7
2952G	7.16	4
2954	2.37	24
2954G	5.30	9
2955	14.4	6
2955G	12.0	4
2964	14.8	6
2964G	13.0	9
2978	1.91	49
2978G	1.80	58
2982	6.41	19
2982G	16.3	9
2985	64.4	9
2985G	2.44	8
2987	21.0	11
2987G	37.6	4
2996	10.8	9
2996G	24.0	2
2997	7.75	19
2997G	151	1
3004	46.5	14
3004G	1.93	91
3005	2.35	108

[0192]

3005G	6.96	27
3010	4.13	26
3010G	2.10	49
3011	59.1	5
3011G	41.7	5
3012	9.71	20
3012G	89.9	2
3013	20.2	20
3013G	13.2	4
3014	213	4
3014G	36.8	3
3015	29.1	11
3015G	65.9	0
3016	4.99	17
3016G	18.9	4
3017	9.83	8
3017G	55.4	2
3018	11.3	36
3018G	32.5	3
3019	1.54	59
3019G	2.29	42
3020	5.41	39
3020G	41.9	6
3021	50.1	6
3021G	26.8	4
3022	25.7	17
3022G	20.8	12
3023	263	9
3023G	103	5
3024	58.8	7
3024G	7.09	10
3025	35.2	6
3025G	42.5	8
3027	7.15	6
3027G	4.24	18
3028	6.89	37
3028G	7.23	22

[0193]

3030	46.2	7
3030G	128	3
3032	53.2	9
3032G	13.0	1
3033	4.61	17
3033G	12.0	5
3036	284	12
3036G	18.2	10
3041	6.90	12
3041G	22.9	2
3042	9.46	34
3042G	85.5	3
3043	9.26	29
3043G	13.1	22

[0194]

표 10		
Vκ3-20Jκ1 일반적인 경쇄 항체		
항체	100nM 항원 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (분)
2968	5.50	8
2968G	305	0
2969	34.9	2
2969G	181	1
2970G	12.3	3
2971G	32.8	22
2972	6.02	13
2972G	74.6	26
2973	5.35	39
2973G	11.0	44
2974	256	0
2974G	138	0
2975	38.0	2
2975G	134	1
2976	6.73	10
2976G	656	8

[0195]

[0196] 실시예 10. LuminexTM 검정에 의한 항원-특이적 일반적인 경쇄 항체의 결합 특이성의 결정

[0197] 선택된 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체를

[0198] 게먹이 원숭이 오솔로그 (Mf 항원 E)를 포함하는, 항원 E의 ECD 및 항원 E ECD 변종과 결합하는 그들의 능력에 대해 테스트 되었는데, 이것은 약 10%의 아미노산 잔기; ECD의 C-말단 끝에서 마지막 10개의 아미노산이 결합된 항원 E의 삭제 돌연변이 (항원 E-ΔCT); 및 리간드 Y와 상호작용의 의심되는 위치에서 알라닌 대체를 함유하는 두 개의 돌연변이 (항원 E-Ala1 및 항원 E-Ala2)에서 사람 단백질과 다르다. 항원 E 단백질은 CHO 세포에서 생산되고 각각은 myc-myc-His C-말단 태그를 함유하였다.

[0199] 결합 연구에 대해, 배양 배지 1ml에서 항원 E ECD 단백질 또는 변종 단백질 (상기 설명됨)은 항-myc 단클론성 항체 (MAb 9E10, 잡종 세포주 CRL-1729TM; ATCC, Manassas, VA)로 공유결합으로 코팅된 1×10^6 마이크로스피어 (LuminexTM) 비드로 상온에서 2시간 동안 배양에 의해 캡처되었다. 비드를 사용 전 PBS로 세척하였다. 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체를 함유하는 상층액을 완충액에서 1:4로 희석하였고 96웰 여과 플레이트에 추가하였다. 항체가 없는 가짜 상층액을 음성 대조군으로서 사용하였다. 캡처된 항원 E 단백질을 항체 샘플 (웰 당 3000 비드)에 추가하였고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날, 샘플 비드를 세척하였고 결합된 일반적인 경쇄 항체를 R-피코에리트린과 접합된 항-사람 IgG 항체로 검출하였다. 비드의 형광 강도 (각각의 항원 E 단백질에 결합하는 각각의 항체 샘플에 대해 계산된 약 100 비드)를 LuminexTM 유동 세포분석법에 기초한 분석기로 측정하였고, 비드/항체 상호작용 당 적어도 100에 대한 중간 형광 강도 (MFI)를 기록하였다. 결과는 표 11 및 12에 나타난다.

표 11					
Vk1-39Jk5 일반적인 경색 항체					
항체	평균 형광 강도 (MFI)				
	항원 E-ECD	항원 E-ΔCT	항원 E-Ala1	항원 E-Ala2	Mf 항원 E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880

[0200]

3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391

[0201]

3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

[0202]

표 12					
Vk3-20Jκ1 일반적인 경쇄 항체					
항체	평균 형광 강도 (MFI)				
	항원 E-ECD	항원 E-ΔCT	항원 E-Ala1	항원 E-Ala2	Mf 항원 E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

[0203]

[0204]

항-항원 E 일반적인 경쇄 항체 상층액은 항원 E-ECD와 결합된 비드에 높은 특이적 결합을 나타낸다. 이 비드에 대해, 항원 E-ECD 비드 샘플과 결합했을 때 음성 대조군 가짜 상층액은 무시해도 될 정도의 시그널 (<10 MFI)을 일으켰지만, 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체를 함유한 상층액은 강한 결합 시그널을 나타냈다 (98개의 항체 계면 활성제에 대해 2627의 평균 MFI; 91/98 항체 샘플에 대해 MFI > 500).

[0205]

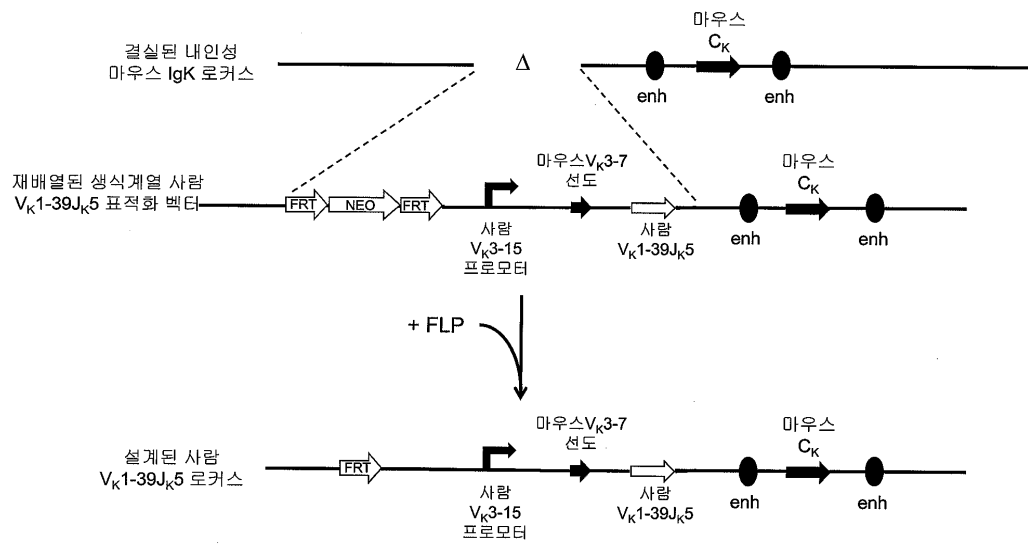
항원 E의 ECD에서 다른 에피토프를 확인하기 위한 선택된 항-항원 E 일반적인 경쇄 항체의 능력의 측정값과 같이, 변종에 대한 항원의 상대적 결합력이 결정된다. 원래의 항원 E-ECD 결합 연구에 대해 상기 설명된 바와 같이 모든 4개의 항원 E 변종을 항-myc LuminesxTM 비드로 캡처하였고, 상대적 결합률 ($MFI_{\text{Variant}}/MFI_{\text{Antigen E-ECD}}$)이 결정된다. 표 11 및 12에 나타난 98개의 테스트된 일반적인 경쇄 항체 상층액에 대해, 평균 비율 ($MFI_{\text{Variant}}/MFI_{\text{Antigen E-ECD}}$)은 각각의 변종에 대해 다르고, 비드에서 단백질의 다른 캡처량을 반영할 것이다 (항원 E-ΔCT, 항원 E-Ala1, 항원 E-Ala2, 및 Mf 항원, 각각에 대한 0.61, 2.9, 2.0, 및 1.0의 평균 비율). 각각의 단백질 변종에 대해, 98개의 테스트된 일반적인 경쇄 항체의 서브세트에 대한 결합은 크게 감소된 결합을 나타내었고, 특정 변종으로 특징지어진 돌연변이에 대한 민감도를 나타내었다. 예를 들어, 19개의 일반적인 경쇄 항체 샘플은 <8%의 $MFI_{\text{Variant}}/MFI_{\text{Antigen E-ECD}}$ 로 Mf 항원 E와 결합하였다. 이 그룹에서 많은 것들이 높거나 중간 정도로 높은 친화도 항체를 포함하기 때문에 (KD < 5nM인 5개, KD < 50 nM인 15개), 이 그룹에 대해 더 낮은 시그널은 더 낮은 친화도보다 원래의 항원 E-ECD 및 특정 변종 사이의 서열 (에피토프) 차이에 대한 민감도에 의해 일어난다.

[0206]

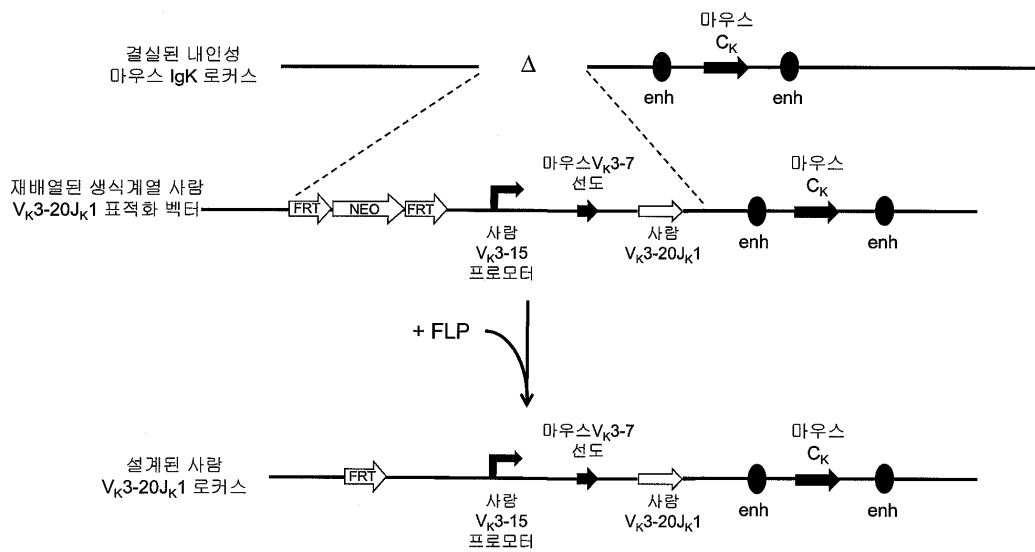
이 데이터는 표 3 및 4에 설명된 일반적인 경쇄 항체가 실제로 항원 E에서 하나 이상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 다양한 그룹의 항원 E 특이적 일반적인 경쇄 항체를 대표한다는 것을 입증한다.

도면

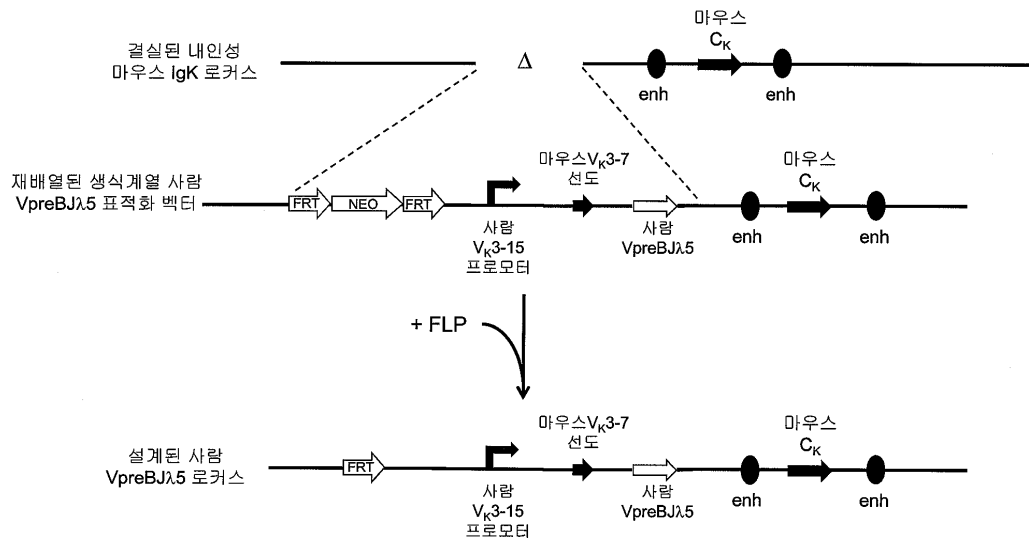
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MCWHIRTER, John
 MACDONALD, Lynn
 STEVENS, Sean
 DAVIS, Samuel
 MURPHY, Andrew J.
- <120> Common Light Chain Mouse
- <130> 0802A-WO
- <140> To be assigned
- <141>
- <150> 61/302,282
- <151> 2010-02-08
- <160> 18
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 3155
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic
- <400> 1

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaaccatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60

 tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120
 atgataagaag tgiagcataa atctatgaaa aattccattt cctgtgcctt acaacaacta 180
 cctgggattg aaaacttctt ccttctctct agtcttttct tctacaccta ctccacatc 240
 atctgtgact caaaacaata ctgttcagga aagatcccg aaagagcaaa aaagacttcc 300
 ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360
 gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
 tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540

 aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600
 gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tataaccagc 660
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
 attgtattgt attttctct tatatcatct tcttctctgt tcattaaaaa aaaaccgttc 780
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
 ttgaccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcttc attccaagg taacaagcct 900
 gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg 960
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020

 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
 tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag 1140
 accaaatcat taggatttaa agagttgtgt agagttagtg aaggaaaagc cttagaatta 1200
 aatttggtg cggataaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
 agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320
 ttaattgccg catacataat gtctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttccttt 1380
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtac cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
 accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcgga agccatggag 1500

 catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
 caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga cctcagaaa acattactaa 1620
 caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaag 1740
 acacagcttt ttatattgtt cttaacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860

cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtggcttttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980

agtcaattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gcctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160
ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220
ccagtccctt gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
atcattccag gtgccagatg tgacatccag atgaccagct ctccatectc cctgtctgca 2400
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta 2460

aattggtatc agcagaaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattccagt 2520
ttgcaaatg ggggtccatc aagggtcagt ggagctggat ctgggacaga tttcactctc 2580
accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt 2640
acccctccga tcaccttccg ccaagggaca cgactggaga ttaaactgaa gtaatttttc 2700
actattgtct tcigaaattt ggggtctgatg gccagtattg acttttagag gcttaaatag 2760
gagtttggtg aagattggta aatgagggca ttttaagattt gccatgggtt gcaaaagtta 2820
aactcagctt caaaaatgga tttggagaaa aaaagattaa attgctctaa actgaatgac 2880
acaaagtaaa aaaaaaagt gtaactaaaa aggaaccctt gtatttctaa ggagcaaaag 2940

taaatttatt tttgttcaact cttgccaaat attgtattgg ttgttgctga ttatgcatga 3000
tacagaaaag tggaaaaata catttttttag tctttctccc tttgtttga taaattattt 3060
tgtcagacaa caataaaaaa caatagcacg ccctaagatc tagatgcatg ctcgagtgcc 3120
atttcattac ctctttctcc gcacccgaca tagat 3155

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

aggtgagggt acagataagt gttatgag 28

<210> 3

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic
 <400> 3
 tgacaaatgc cctaattata gtgatca 27
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 4
 gggcaagtca gagcattagc a 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 5
 tgcaaactgg atgcagcata g 21
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic
 <400> 6
 ggtggagagg ctattcggc 19
 <210> 7
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 7
 gaacacggcg gcatcag 17
 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 8
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23
 <210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 9
 ccattatgat gctccatgcc tctctgttc 29
 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 10
 atcagcagaa accagggaat gccctt 26
 <210> 11
 <211> 3166
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic

<400> 11

```

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaacatc tatitgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120
atgataagaag ttagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180

cctgggattg aaaacttctt cccttgcctt agtcctttct tctacaccta ctccacatc 240
atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccgg aaagagcaaa aaagacttcc 300
ttagagggtg cagagattcc tatgccata tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360
gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540
aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600
gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tataccagc 660

atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
attgtattgt attttcctct tataatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaaccgttc 780
aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
ttgacccgat gaatatgttt ctttccaga catagtctc attccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag 1140

accaaatcat taggatttaa agagtgtgtg agagttagtg aaggaaaagc cttagaatta 1200
aatttggtg cgataaaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccg catacataat gtctgaata ctattgtaa tgttttatct tatttccttt 1380
aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagttttca ctttttaact 1560
caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620

caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca ttccatcga 1680
tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaag 1740

```

acacagcttt ttatattgtt cttaacagcg ttgtgccaaa catcttctgg gtggatttag 1800
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860
 cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
 gtgcagagag gaagaagcag gtggctcttg cagctgaaag ctgagctgat ttgcatatgg 1980
 agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100

gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160
 ccatgctctt ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc 2220
 ccagtccctt gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
 aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
 atcattccag gtgccagatg tataccaccg gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca 2400
 ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta 2460
 gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct 2520
 atggtgcatc cagcagggcc actggcatcc cagacagggt cagtggcagt gggctctggga 2580

cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttcagtg tattactgtc 2640
 agcagtatgg tagctcacct tggacgttcg gccaaggagc caaggtggaa atcaaacgta 2700
 agtaattttt cactattgtc ttctgaaatt tgggtctgat ggccagtatt gacttttaga 2760
 ggcttaata ggagtttggg aaagattggg aaatgagggc atttaagatt tgccatgggt 2820
 tgcaaaagtt aaactcagct tcaaaaatgg atttgagaa aaaaagatta aattgctcta 2880
 aactgaatga cacaagtaa aaaaaaaaaa tgtaactaaa aaggaaccct tgtatttcta 2940
 aggagcaaaa gtaaatttat tttgttcac tcttgccaaa tattgtattg gttgttgctg 3000
 attatgcatg atacagaaaa gtggaaaaat acatttttta gtctttctcc cttttgtttg 3060

ataaattatt ttgtcagaca acaataaaaa tcaatagcac gccctaagat ctatgcat 3120
 gctcgagtgc catttcatta cctctttctc cgcacccgac atagat 3166

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 12

tccaggcacc ctgtctttg

19

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

aagtagctgc tgctaacact ctgact 26

<210> 14

<211> 24

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 14

aaagagccac cctctcctgc aggg 24

<210> 15

<211> 3187

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 15

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60

tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120

atgatagaag ttagcataa atctatgaaa aattccatct cctgtgcct acaacaacta 180

cctgggattg aaaacttctt ccttgcctct agtcctttct tctacaccta ctccacatc 240

atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatccgg aaagagcaaa aaagacttcc 300

ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360

gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420

acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480

tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540

aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600

gctttccctc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tataccacgc 660
atattgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720

attgtattgt attttccctc tatatcatct tcttcttcgt tcattaaaaa aaaaccgttc 780
aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcttc attccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttcct tattgtcctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag 1140
accaaatcat taggatttaa agagtgtgtg agagttagtg aaggaaaagc cttagaatta 1200

aatttggctg cggataaaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaa tgttttatct tatttccttt 1380
aaactgtcta cagcactata aggttaggtac cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgccg ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680

tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaag 1740
acacagcttt ttatatgttt cttacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800
gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctca 1860
cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtggctcttg cagctgaaag ctgagctgat ttgcatatgg 1980
agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160

ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220
ccagtccctt gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
atcattccag gtgccagatg tgttgtgggc ctgagccggt gctgcatcag ccgccggcca 2400
tgtcctcggc ctttgaacc acaatccgcc tcacctgcac cctgaggaa caccatgaca 2460

tcggtgtgta cagcgtctac tggtaaccagc agaggccggg ccaccctccc aggttcctgc 2520
 tgagatattt ctcaaatca gacaagagcc agggccccc ggtccccct cgcttctctg 2580
 gatccaaaga tgtggccagg aacagggggg atttgagcat ctctgagctg cagcctgagg 2640

acgaggctat gtattactgt gctatgcata actcagtgac gcatgtgttt ggcagcggga 2700
 cccagctcac cgttttaagt aagtaatttt tcactattgt cttctgaaat ttgggtctga 2760
 tggccagtat tgacttttag aggcttaa at aggagtttgg taaagattgg taaatgaggg 2820
 catttaagat ttgccatggg ttgcaaaagt taaactcagc ttcaaaaatg gatttggaga 2880
 aaaaaagatt aaattgctct aaactgaatg acacaaagta aaaaaaaaaa gtgtaactaa 2940
 aaaggaaccc ttgtatttct aaggagcaaa agtaaattta tttttgttca ctcttgccaa 3000
 atattgtatt ggittgttct gattatgcat gatacagaaa agtggaaaaa tacatttttt 3060
 agtctttctc cttttgttt gataaattat tttgtcagac aacaataaaa atcaatagca 3120

cgccctaaga tctagatgca tgctcgagtg ccatttcatt acctctttct ccgcacccga 3180
 catagat 3187

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 16

tgctctcggc ccttgga 17

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 17

ccgatgtcat ggtcgttctt 20

<210> 18

<211> 23

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 18

acaatccgcc tcacctgcac cct

23