



등록특허 10-2696334



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월21일

(11) 등록번호 10-2696334

(24) 등록일자 2024년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01)

(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2024.01)
C07K 14/472 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7011761

(22) 출원일자(국제) 2018년09월27일
심사청구일자 2021년09월24일

(85) 번역문제출일자 2020년04월23일

(65) 공개번호 10-2020-0058487

(43) 공개일자 2020년05월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/053099

(87) 국제공개번호 WO 2019/067706
국제공개일자 2019년04월04일

(30) 우선권주장
62/565,438 2017년09월29일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020160058752 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

(72) 발명자
프라사드 브린다
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

투 낙신
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 34 항

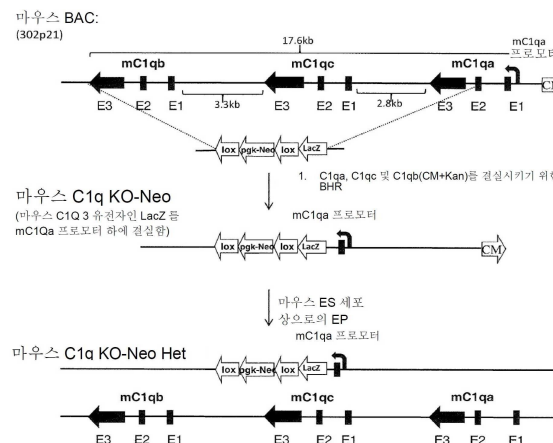
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 인간화 C1q 복합체를 발현하는 비인간 동물

(57) 요약

키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 키메라 C1q 폴리펩티드를 발현하는 단백질, 상기 핵산을 포함하는 비인간 동물, 및 상기 비인간 동물을 제조하거나 사용하는 방법이 본원에 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 1/025 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0337 (2013.01)
A01K 2267/0337 (2013.01)
A01K 2267/0368 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)

(72) 발명자

미거 캐롤리나

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
 내

맥도날드 린

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
 내

머피 앤드류

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
 내

스티븐스 셴

미국 캘리포니아 92014 델 마 카미니토 데 라스 올
 라스 12848

(56) 선행기술조사문헌

Mol Immunol. vol.45 no.11 pp.3244-3252 2008
 Acta Neuropathol. vol.125 no.6 pp.829-40 2013
 J Invest Dermatol. vol.125 no.1 pp.14-23 2005
 Cancer Immunol Immunother. vol.59 no.12
 pp.1791-1800 2010
 Pharmacol Ther. vol.173 pp.34-46 2017

명세서

청구범위

청구항 1

a. 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드 도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는, 핵산;

b. 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드 도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는, 핵산; 및

c. 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드 도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는, 핵산;

을 그의 게놈에 포함하는 유전적으로 변형된 설치류 동물로서,

키메라 C1qa, C1qb 및 C1qc 폴리펩티드는 설치류 동물에서 발현되고 기능적 C1q 복합체를 형성하고;

설치류 동물은 마우스 또는 래트이며;

설치류 동물은 기능적 내인성 C1qa 폴리펩티드, 기능적 내인성 C1qb 폴리펩티드, 또는 기능적 내인성 C1qc 폴리펩티드를 발현하지 않는, 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 4의 108-245를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 3

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 내인성 마우스 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 1의 아미노산 23-107을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 4

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 10의 아미노산 23-245을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 5

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이고, 내인성 래트 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 7의 아미노산 23-107을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 6

제1 항에 있어서, 설치류는 래트이고, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 55의 아미노산 23-245를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 7

제1 항에 있어서, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 5의 아미노산 115-251을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 8

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 내인성 마우스 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열

번호 2의 아미노산 26-114를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 9

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 11의 아미노산 26-251을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 10

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이고, 내인성 래트 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 8의 아미노산 26-114를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 11

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이고, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 56의 아미노산 26-251을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 12

제1 항에 있어서, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 6의 아미노산 113-245를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 13

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 내인성 마우스 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 3의 아미노산 30-113을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 14

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이고, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 12의 아미노산 30-246을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 15

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이고, 내인성 래트 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 9의 아미노산 32-115를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 16

제15 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이고, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 57의 아미노산 32-248을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 17

제1 항에 있어서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 내인성 설치류 C1qa 신호 펩티드를 포함하고, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 내인성 설치류 C1qb 신호 펩티드를 포함하고, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 내인성 설치류 C1qc 신호 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 18

제1 항에 있어서, (i) 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 설치류 C1qa 유전자좌에 있고, 및/또는 (ii) 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 설치류 C1qb 유전자좌에 있고, 및/또는 (iii) 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 설치류 C1qc 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 19

제1 항에 있어서, 내인성 설치류 C1q 유전자좌에 있는 내인성 게놈 서열은 인간 핵산 서열로 치환되었고, 임의로 인간 핵산 서열은 인간 C1q 유전자의 게놈 단편인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 20

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 래트이며,

- a. 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 래트/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 7의 래트 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1-111을 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112-245를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열;
- b. 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 래트/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 8의 래트 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1-117을 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118-251을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제3 및 제4 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; 및
- c. 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 래트/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 9의 래트 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1-116을 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114-245를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제5 및 제6 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열

을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 21

제1 항에 있어서, 설치류 동물은 마우스이며,

- a. 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 1의 마우스 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1-111을 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112-245를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열;
- b. 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 2의 마우스 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1-117을 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118-251을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제3 및 제4 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열;
- c. 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 핵산 서열은 서열번호 3의 마우스 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1-114를 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114-245를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고 제5 및 제6 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열

을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 설치류 동물.

청구항 22

유전적으로 변형된 설치류 동물을 만드는 방법으로서,

변형된 설치류 계놈이

- a) 설치류 C1qa 핵산 서열 및 인간 C1qa 핵산 서열을 포함하고, 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드 도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는, 핵산;
- b) 설치류 C1qb 핵산 서열 및 인간 C1qb 핵산 서열을 포함하고, 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드 도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는, 핵산; 및
- c) 설치류 C1qc 핵산 서열 및 인간 C1qc 핵산 서열을 포함하고, 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 (i) 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 구형 헤드

도메인, 및 (ii) 내인성 설치류 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는 핵산

을 포함하도록 설치류 게놈을 변형시키는 단계를 포함하며,

각각의 핵산 a) 내지 c)는 각각의 내인성 설치류 C1q 유전자좌에서 도입되고; 설치류 동물은 마우스 또는 래트인 것인, 방법.

청구항 23

제22 항에 있어서, 상기 변형시키는 단계는

- a. (i) 인간 C1qa 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자, (ii) 인간 C1qb 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자, 및 (iii) 인간 C1qc 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 설치류 배아 줄기(ES) 세포의 게놈에 도입하는 단계,
- b. 키메라 C1qa 폴리펩티드, 키메라 C1qb 폴리펩티드, 및 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하도록 내인성 설치류 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 각각의 내인성 C1q 유전자좌에 인간 핵산 서열이 통합되는 설치류 ES 세포를 수득하는 단계; 및
- c. b 단계에서 수득된 설치류 ES 세포로부터 설치류 동물을 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제1, 제2 또는 제3 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 키메라 설치류 C1q 단백질을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 설치류는 마우스 또는 래트이고,

- a. 제1 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하고,
- b. 제2 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하고,
- c. 제3 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하며,

제1, 제2, 및 제3 뉴클레오티드 서열 각각은 설치류 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하되,

인간 핵산 서열은 각각 인간 C1qa, C1qb, 및 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 암호화하고, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 4의 아미노산 108-245를 포함하고, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 5의 아미노산 115-251을 포함하며, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 6의 아미노산 113-245를 포함하고;

설치류 핵산 서열은 각각 동족 설치류 C1q 폴리펩티드인 C1qa, C1qb, 및 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 암호화하되,

- (i) 설치류 동물이 마우스일 때, 내인성 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 1의 아미노산 23-107을 포함하고, 내인성 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 2의 아미노산 26-114를 포함하며, 내인성 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 3의 아미노산 30-113을 포함하고;
- (ii) 설치류 동물이 래트일 때, 내인성 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 7의 아미노산 23-107을 포함하고, 내인성 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 8의 아미노산 26-114를 포함하며, 내인성 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 9의 아미노산 32-115를 포함하는 것인; 단리된 핵산.

청구항 25

제24 항에 있어서, 단리된 핵산은 제1 뉴클레오티드 서열, 제2 뉴클레오티드 서열 및 제3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 핵산.

청구항 26

제24항 또는 제25 항의 단리된 핵산을 포함하는 설치류 배아 줄기 (ES) 세포로서, 설치류 ES 세포는 마우스 ES 세포 또는 래트 ES 세포인, 설치류 ES 세포.

청구항 27

제26 항의 설치류 ES 세포를 포함하는 설치류 배아.

청구항 28

관심 항원을 표적으로 하는 약물 후보물질을 스크리닝하는 방법으로서,

- 제1 항 내지 제21 항 중 어느 한 항의 설치류 동물에 관심 항원을 도입하는 단계;
 - 상기 설치류 동물을 약물 후보물질과 접촉시키는 단계로서, 약물 후보물질은 인간 C1q 및 관심 항원에 대해 지시되는, 단계; 및
 - 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 약물 후보물질이 세포를 예방, 감소 또는 제거하는 데 효과적 인지 여부를 분석하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28 항에 있어서, 관심 항원은 중앙 관련 항원, 스태필로코커스 세포와 같은 박테리아 세포, 스태필로코커스 항원과 같은 박테리아 항원, 또는 바이러스 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제28 항에 있어서, 임의로 설치류 동물은 면역능이 있는 마우스 또는 면역능이 있는 래트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제28 항에 있어서, 약물 후보물질은 인간 C1q 단백질 및 관심 항원 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이적 항체 또는 이중특이적 항원 결합 단백질과 같은 항체 또는 항원 결합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

후보 항체가 보체 경로를 활성화하는지 여부를 평가하기 위한 방법으로서,

- 세포 표면에서 관심 항원을 발현하는 세포, 인간 Fc 영역을 포함하고 관심 항원에 대해 지시되는 후보 항체, 및 제1 항 내지 제21 항 중 어느 한 항의 설치류 동물 유래의 혈청 샘플을 제공하는 단계;
- 항체가 세포 표면에서 발현된 관심 항원에 결합할 수 있도록 세포를 후보 항체와 혼합하는 단계;
- 혈청 샘플 내 인간화 C1q 단백질이 세포 상의 관심 항원에 결합된 항체에 결합되도록 혈청 샘플을 세포-항체 혼합물에 첨가하는 단계; 및
- 세포의 세포독성을 측정하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 33

관심 항원 및 인간 C1q를 표적으로 하는 후보 이중특이적 항체를 평가하는 방법으로서,

- 관심 항원을 발현하는 세포 또는 바이러스, 후보 이중특이적 항체, 및 제1 항 내지 제21 항 중 어느 한 항의 설치류 동물 유래의 혈액 샘플을 혼합하고, 항체가 세포 또는 바이러스에 의해 발현된 관심 항원에 결합하고 혈액 샘플 내 인간화 C1q 분자에 결합할 수 있도록 인큐베이션하는 단계; 및
- 세포 또는 바이러스의 생존율을 측정하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33 항에 있어서, 세포는 스태필로코커스 세포와 같은 박테리아 세포이고, 항원은 스태필로코커스 항원과 같은

박테리아 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 9월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/565,438호의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 참조에 의한 서열 목록의 통합

[0004] 2018년 9월 25일에 생성되고, EFS-Web을 통해 미국 특허 상표청에 제출된 35342_10353US01_SequenceListing.txt로서 명명된 50 KB의 ASCII 텍스트 파일 형식의 서열 목록이 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0005] 전임상 약물 개발 단계 동안, 후보 제제는 일반적으로 이들의 효능, 독성, 및 기타 약동학적 및 약력학적 특성에 기초하여 연구된다. 항체와 같은 후보 제제는 일반적으로 인간 항원을 표적으로 하는데, 이는 인간 치료제를 개발하는 것이 조사의 최종 목표이기 때문이다. 보체 경로를 격리시키는 능력은 후보 치료제들에게 상당한 이점을 제공한다. 보체 경로는 선천적 면역 반응의 일부이며, 항원성 부위에 대식세포와 식세포를 동원하여 체액성 면역 반응을 돕는다. 보체 경로의 활성화는 사이토카인의 방출 및 식세포에 의한 항체-결합 항원의 옹소닌화

(opsonization)를 초래한다. 인간 질병을 퇴치하기 위해 보체 경로 및 선천적 면역 반응의 활성화를 목표로 치료제의 개발하는 동안, 체제의 작용 메커니즘 및/또는 치료 효능에 대한 연구를 가능하게 하는 모범적인 비인간 동물 시스템은 값을 매길 수 없을 정도로 유용하지만, 이러한 시스템이 결여되어 있다.

발명의 내용

- [0006] 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 포유류 C1qa, C1qb 및/또는 C1qc 폴리펩티드), 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자를 포함하고 키메라 C1q 폴리펩티드를 발현하는 비인간 동물(예를 들어, 설치류와 같은 포유동물)이 본원에 개시된다.
- [0007] 일 양태에서, 키메라 C1q 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 C1qa 폴리펩티드, 키메라 C1qb 폴리펩티드, 또는 키메라 C1qc 폴리펩티드)를 암호화하는 핵산을 그의 게놈에 포함하는 유전적으로 변형된 비인간 동물이 본원에 개시되며, 여기서 핵산은 비인간 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함한다.
- [0008] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 2개 이상의 핵산을 그의 게놈 내에 포함하는데; 예를 들어, 비인간 동물은 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 및 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 조합(예를 들어, 2개 또는 3개 모두)을 그의 게놈에 포함한다.
- [0009] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.
- [0010] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는: 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인(즉, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일함); 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기(stalk-stem) 영역(즉, 내인성 C1q 폴리펩티드와 같은 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일함)을 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1qa 폴리펩티드인 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는: 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 C1q 폴리펩티드와 같은 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 4의 아미노산 108~245를 포함한다.
- [0012] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 마우스이고, 상기 키메라 C1q 폴리펩티드는: 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 마우스 C1q 폴리펩티드와 같은 마우스 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 내인성 마우스 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 1의 아미노산 23~107을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 10(마우스/인간)의 아미노산 23~245를 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 10(마우스/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 랫트이고, 상기 키메라 C1q 폴리펩티드는: 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 랫트 C1q 폴리펩티드와 같은 랫트 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 내인성 랫트 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 7의 아미노산 23~107을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 55(랫트/인간)의 아미노산 23~245를 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 55(랫트/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하되, 상기 키메라 C1q 폴리펩티드는 키메라 C1qa 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는: 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 C1qb 폴리펩티드와 같은 비인간 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 5의 아미노산 115~251을 포함한다.
- [0015] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 마우스이고, 상기 키메라 C1qb 폴리펩티드는 내인성 마우스 C1qb 폴리펩티드와 같은 마우스 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 마우스 C1qb 폴리펩티드의

N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 2의 아미노산 26~114를 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 11(마우스/인간)의 아미노산 26~251을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 11(마우스/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 랫트이고, 상기 키메라 C1qb 폴리펩티드는 내인성 랫트 C1qb 폴리펩티드와 같은 랫트 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 랫트 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 8의 아미노산 26~114를 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 56(랫트/인간)의 아미노산 26~251을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 56(랫트/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하되, 상기 키메라 C1q 폴리펩티드는 키메라 C1qc 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는: 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 C1qc 폴리펩티드와 같은 비인간 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 6의 아미노산 113~245를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 마우스이고, 상기 키메라 C1qc 폴리펩티드는: 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 마우스 C1qc 폴리펩티드와 같은 마우스 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 내인성 마우스 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 3의 아미노산 30~113을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 12(마우스/인간)의 아미노산 30~246을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 12(마우스/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 랫트이고, 상기 키메라 C1qc 폴리펩티드는: 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인; 및 내인성 랫트 C1qc 폴리펩티드와 같은 랫트 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 랫트 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 9의 아미노산 32~115를 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 57(랫트/인간)의 아미노산 32~248을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 57(랫트/인간)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 내인성 비인간 C1q 신호 펩티드와 같은 비인간 C1q 신호 펩티드를 함유하도록 비인간 동물에서 번역된다. 즉, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 내인성 C1q 신호 펩티드와 같은 비인간 C1q 신호 펩티드에 대한 코딩 서열을 또한 포함한다. 예를 들어, 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 내인성 C1qa 신호 펩티드와 같은 비인간 C1qa 신호 펩티드에 대한 코딩 서열을 또한 포함하고; 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 내인성 C1qb 신호 펩티드와 같은 비인간 C1qb 신호 펩티드에 대한 코딩 서열을 또한 포함하며; 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 내인성 C1qc 신호 펩티드와 같은 비인간 C1qc 신호 펩티드에 대한 코딩 서열을 또한 포함한다. 마우스 및 랫트 C1q 신호 펩티드의 예가 본원에 개시된다(예를 들어, 도 3a 내지 3c의 내용 참조).

[0021] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 비인간 C1q 유전자좌 이외의 유전자좌에 존재한다. 다른 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 비인간 C1q 유전자좌에 존재한다. 예를 들어, 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 비인간 C1qa 유전자좌에 존재하고/하거나; 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 비인간 C1qb 유전자좌에 존재하고/하거나; 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 내인성 비인간 C1qc 유전자좌에 존재한다.

[0022] 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 내인성 비인간 C1q 유전자좌에 존재하는 구현예에서, 일부 이러한 구현예에서, 내인성 비인간 C1q 유전자좌에서의 내인성 게놈 서열은 인간 핵산 서열에 의해 치환된 것이다. 일부 구현예에서, 인간 C1q 유전자의 게놈 단편과 같은 인간 핵산 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 또한 인간 C1q 유전자의 3' UTR을 포함한다(인간 C1q 유전자의 폴리아데닐화 신호 및 폴리아데닐화 부위를 포함함).

[0023] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하며, 여

기서 핵산은 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하고, 인간 핵산 서열은 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 4의 아미노산 108~245를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 서열번호 4의 아미노산 112~245를 암호화한다.

[0024] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하고, 인간 핵산 서열은 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 5의 아미노산 115~251을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 서열번호 5의 아미노산 118~251을 암호화한다.

[0025] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하고, 인간 핵산 서열은 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 6의 아미노산 113~245를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 서열번호 6의 아미노산 114~245를 암호화한다.

[0026] 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 비인간 동물의 구현예에서, 핵산은 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하고, 비인간 핵산 서열은 내인성 비인간 C1q 폴리펩티드와 같은 비인간 C1q의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다. 내인성 비인간 C1q 유전자좌에 있는 내인성 게놈 서열이 인간 핵산 서열로 치환된 구현예에서, 일부 이러한 구현예에서, C1q 유전자좌에 남아 있는 내인성 게놈 서열은 내인성 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다.

[0027] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 마우스이고, 내인성 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 1의 아미노산 23~107(C1qa의 경우), 서열번호 2의 아미노산 26~114(C1qb의 경우), 또는 서열번호 3의 아미노산 30~113(C1qc의 경우)을 포함한다. 일부 구현예에서, 마우스는 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 마우스 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 마우스 핵산 서열은 서열번호 1의 아미노산 23~111을 암호화한다. 일부 구현예에서, 마우스는 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 마우스 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 마우스 핵산 서열은 서열번호 2의 아미노산 26~117을 암호화한다. 일부 구현예에서, 마우스는 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 마우스 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 마우스 핵산 서열은 서열번호 3의 아미노산 30~114를 암호화한다.

[0028] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트이고, 내인성 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 7의 아미노산 23~107(C1qa의 경우), 서열번호 8의 아미노산 26~114(C1qb의 경우), 또는 서열번호 9의 아미노산 32~115(C1qc의 경우)를 포함한다. 일부 구현예에서, 랫트는 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 랫트 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 랫트 핵산 서열은 서열번호 7의 아미노산 23~111을 암호화한다. 일부 구현예에서, 랫트는 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 랫트 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 랫트 핵산 서열은 서열번호 8의 아미노산 26~117을 암호화한다. 일부 구현예에서, 랫트는 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 핵산은 랫트 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하고, 랫트 핵산 서열은 서열번호 9의 아미노산 32~116을 암호화한다.

[0029] 특정 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 다음을 그의 게놈에 포함한다: (i) 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 7의 랫트 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1~111을 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112~245를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; (ii) 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 8의 랫트 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1~117을 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118~251을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제3 및 제4 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; 및 (iii) 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 9의 랫트 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1~116을 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제5 및 제6 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열. 특정 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 다음을 그의 게놈에 포함한다: 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 서열; 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 서열; 및 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 57의 아미노산 서

열을 포함하는 핵산 서열.

- [0030] 또 다른 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 다음을 그의 게놈에 포함한다: (i) 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 1의 마우스 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1~111을 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112~245를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; (ii) 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 2의 마우스 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1~117을 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118~251을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제3 및 제4 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; 및 (iii) 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 3의 랫트 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1~114를 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제5 및 제6 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열. 특정 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 다음을 그의 게놈에 포함한다: 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 서열; 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 서열; 및 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 서열.
- [0031] 본원에 개시된 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 기능적 내인성 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드(들)를 발현하지 않는다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 포유류(예를 들어, 마우스 또는 랫트를 포함하되 이에 한정되지 않는 설치류와 같은 비인간 포유동물)를 만드는 방법이 본원에 제공되며, 상기 비인간 동물은: 키메라 비인간/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 유전자; 키메라 비인간/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 유전자; 및/또는 키메라 비인간/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 그의 게놈에 포함하고, 상기 방법은, a) 키메라 비인간/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 유전자, b) 키메라 비인간/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 유전자, 및/또는 c) 키메라 비인간/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 핵산 서열(들)을 비인간 동물 게놈에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 핵산은 내인성 유전자좌 외부에 있는 게놈 내 위치에 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 내인성 C1q 유전자(들) 또는 이의 일부는, 비인간 동물이 기능적 내인성 C1q 폴리펩티드를 발현하지 않도록 (예를 들어, 기능적 내인성 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 발현하지 않도록) 침묵화되고/되거나 결실될 수 있다. 다른 구현예에서, 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 핵산은 내인성 비인간 C1q 유전자좌에 존재하며; 일 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 핵산은 내인성 C1q 유전자좌에서 내인성 비인간 C1q 유전자를 치환한다.
- [0033] 따라서, 본원에 기술된 유전적으로 변형된 비인간 동물을 만드는 방법으로서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 내인성 비인간 포유동물 C1q 유전자좌에 도입되는, 방법이 본원에 제공된다. 특정 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물을 제조하는 방법으로서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 내인성 비인간 포유동물 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 치환하는, 방법이 개시되다.
- [0034] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 변형된 비인간 동물, 예를 들어, 유전적으로 변형된 랫트 또는 마우스를 만드는 방법은, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드(들)를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 표적화 벡터(예를 들어, 큰 표적화 벡터(LTVEC))를 생성하는 단계; 상기 표적화 벡터를 ES 세포 내로 도입하는 단계; 및 상기 ES 세포로부터 상기 비인간 동물을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 포함하는 키메라 C1q 폴리펩티드로서, 키메라 C1qa 폴리펩티드, 키메라 C1qb 폴리펩티드, 및 키메라 C1qc 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키메라 C1q 폴리펩티드가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 이러한 키메라 C1q 폴리펩티드는 본원에 개시된 유전적으로 변형된 비인간 동물로부터 만들어진다. 다른 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 적절한 숙주 세포로부터 만들어진다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 키메라 C1q 폴리펩티드 중 하나 이상을 포함하는 키메라 C1q 단백질이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 단백질은 적어도 하나의 키메라 C1qa, 하나의 키메라 C1qb, 및 하나의

키메라 C1qc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 단백질은 키메라 C1qa 폴리펩티드, 키메라 C1qb 폴리펩티드, 및 키메라 C1qc 폴리펩티드를 6개씩 포함한다.

[0037] 또 다른 양태에서, 키메라 C1q 폴리펩티드(C1qa 폴리펩티드, C1qb 폴리펩티드, 또는 C1qc 폴리펩티드)를 암호화하고, 비인간 포유동물 핵산 서열 및 인간 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하고, 비인간 핵산 서열은 동족 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 단리된 핵산은 키메라 C1q 단백질을 암호화하고, 제1, 제2 또는 제3 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하되, 제1 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qa 폴리펩티드를 암호화하고, 제2 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qb 폴리펩티드를 암호화하며, 제3 뉴클레오티드 서열은 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화한다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 단리된 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 배아 줄기(ES) 세포, 예를 들어, 설치류(마우스 또는 랫트) ES 세포이다.

[0039] 다른 양태에서, 인간 C1q 및 관심 항원 둘 다에 결합하는 C1q-기반의 이중특이적 항원 결합 단백질을 시험하기 위한 설치류 모델로서, 본원에 개시된 유전적으로 변형된 설치류를 포함하고, 관심 항원 또는 관심 항원을 발현하는 세포를 추가로 포함하는 설치류 모델이 본원에 제공된다.

[0040] 또 다른 양태에서, 관심 항원을 표적으로 하는 약물 후보물질을 스크리닝하는 방법이 본원에 개시되며, 상기 방법은 관심 항원을 본원에서 제공된 유전적으로 변형된 비인간 동물, 예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류에게 도입하는 단계; 상기 설치류를 관심 약물 후보물질과 접촉시키되, 약물 후보물질은 인간 C1q 및 관심 항원에 대해 지시되는 단계; 및 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 약물 후보물질이 세포를 예방, 감소 또는 제거하는 데 효과적이지 여부를 분석하여 결정하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 도입하는 단계는 관심 항원을 동물에서 발현시키는 단계(예를 들어, 관심 항원을 발현하는 설치류를 유전적으로 변형하는 단계 등) 또는 관심 항원을 발현하는 세포 또는 바이러스를 상기 동물에게 도입하는 단계를 포함한다. 하나의 특정 양태에서, 세포는 종양 세포 또는 박테리아 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 관심 항원은 종양 관련 항원 또는 박테리아 항원일 수 있다. 또 다른 양태에서, 세포는 박테리아 세포일 수 있다.

[0041] 또 다른 양태에서, 관심 항원을 표적으로 하는 치료 약물 후보물질 중에서 스크리닝을 수행하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (a) 관심 항원을 발현하는 세포 또는 바이러스를 (i) 인간 C1q 및 관심 항원에 대해 지시되는 관심 약물 후보물질, 및 (ii) 본원에 기술된 유전적으로 변형된 설치류의 혈액 샘플(예: 전혈 샘플)과 혼합하는 단계, 및 (b) 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 약물 후보물질이 세포 또는 바이러스를 감소 또는 제거하는 데 효과적이지 여부를 분석하여 결정하는 단계를 포함한다. 결정은, 대조 약물을 사용하거나 약물을 전혀 사용하지 않는 경우와 비교해, 약물 후보물질이 사용되는 경우의, 예를 들어, 세포 또는 바이러스의 생존 백분율을 측정하는 것에 기초하여 이뤄질 수 있다. 관심 항원은 종양 관련 항원 또는 감염성 질환 관련 항원, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 항원은 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 항원과 같은 박테리아 항원이다. 일부 구현예에서, 세포는 스태필로코커스 세포와 같은 박테리아 세포이다.

[0042] 일부 구현예에서, 약물 후보물질을 스크리닝하는 방법이 제공되며, 여기서 도입하는 단계는 관심 항원(예를 들어, 스태필로코커스 항원과 같은 바이러스 항원 또는 박테리아 항원)으로 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)을 감염시키는 단계를 포함한다. 따라서, 일 양태에서, 도입하는 단계는 바이러스 또는 박테리아로 동물을 감염시키는 단계를 포함한다.

[0043] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류)은 면역능이 있는 동물(예를 들어, 면역능이 있는 랫트 또는 마우스)이다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전자 조작된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)을 사용해, 인간 Fc 영역을 포함하는 항체가 고전적인 보체 경로를 활성화시킬 수 있는지 여부를 평가하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 (a) 세포 표면에서 관심 항원을 발현하는 세포, 인간 Fc 영역을 포함하고 관심 항원에 대해 지시되는 후보 항체, 및 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전자 조작된 비인간 동물 유래의 혈청 샘플을 제공하는 단계; (b) 항체가 세포 표면에서 발현되는 관심 항원에 결합하도록 세포를 후보 항체와 혼합하는 단계; (c) 혈청 샘플 중의 인간화 C1q 단백질이 세포 상의 관심 항원에 결합된 항체에 결합하도록 혈청 샘플을 세포-항체 혼합물에 첨가하는 단계; 및 (d) 세포의 세포독성을 측정하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0045]

본 명세서에 포함되고 그 일부를 구성하는 첨부 도면은 여러 가지 구현예를 도시하며, 개시된 조성물 및 방법을 설명과 함께 도시한다.

구체적으로 명시되지 않는 한(예를 들어, loxP 등), 모든 인간 엑손 서열은 빈 박스로 표시되고 모든 인간 인트론 서열은 이중선으로 표시된다. 모든 마우스 또는 랫트 서열은 채워진 박스(엑손) 또는 단일 선(인트론)으로 표시된다.

도 1a는 3개의 마우스 C1q 유전자(마우스 유전자는 유전자 표지 앞에 "m"으로 표시됨) 모두를 포함하는 마우스 C1q 유전자좌를 결실시키는 예시적인 방법의 개략도이다(축척에 비례하지는 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). 마우스 BAC는 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosome)를 의미하고; BHR은 박테리아 상동성 재조합(bacterial homologous recombination)을 의미하며; EP는 전기천공(electroporation)을 의미한다. HET=이형접합체; CM=클로람페니콜; lox = loxP 부위; pgk-Neo = 네오마이신 선택 카세트.

도 1b는 분해/결합 및/또는 박테리아 상동성 재조합(BHR)에 의해 마우스 BAC 유전자(마우스 유전자는 유전자 표지 앞에 "m"으로 표시됨)에 삽입된 키메라 인간/마우스 유전자를 사용해 인간화 마우스 C1q 표적화 벡터를 생성하는 것에 대한 개략도를 도시한다(축척에 비례하지 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). 여러 가지 제한 효소 위치가 표시되어 있다. CM=클로람페니콜; lox = loxP 부위; Ub-Hyg = 히그로마이신 선택 카세트; p=polyA 꼬리; Spec=스펙티노마이신.

도 1c는 3개의 마우스/인간 키메라 C1q 유전자 모두를 함유하는 큰 표적화 벡터를 마우스 C1q KO HET ES 세포 내로 전기천공(EP)하는 것에 대한 개략도를 도시한다(축척에 비례하지 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). Lox = loxP 부위; Ub-Hyg = 히그로마이신 선택 카세트; pgk-Neo = 네오마이신 선택 카세트; p=polyA 서열. 마우스, 인간 또는 카세트 서열 간의 서열 접합부는 각각의 접합부 아래에 선과 함께 각 해당 서열에 대한 서열번호로 표시되어 있다.

도 2a는 3개의 랫트 C1q 유전자(랫트 유전자는 유전자 표지 앞에 "r"로 표시됨) 모두를 포함하는 랫트 C1q 유전자좌를 결실시키는 예시적인 방법의 개략도이다(축척에 비례하지는 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). 랫트 C1q BAC는 랫트 박테리아 인공 염색체를 의미하고; BHR은 박테리아 상동성 재조합을 의미하며; EP는 전기천공을 의미한다. HET=이형접합체; CM=클로람페니콜; loxP = loxP 부위; SDC-loxP-Hyg = 자체 결실 LoxP-히그로마이신 선택 카세트.

도 2b는 분해/집스 어셈블리(Gibson Assembly) 및/또는 CAS9/집스 어셈블리에 의해 랫트 BAC 유전자(랫트 유전자는 유전자 표지 앞에 "r"로 표시됨)에 삽입된 키메라 인간/랫트 유전자를 사용해 인간화 랫트 C1q 카세트를 생성하는 것에 대한 개략도를 도시한다(축척에 비례하지는 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). 여러 가지 제한 효소 위치가 표시되어 있다. CM=클로람페니콜; SDC-loxp-puro= 자가 결실 loxp - 퓨로마이신 카세트.

도 2c는 3개의 랫트/인간 키메라 C1q 유전자 모두를 함유하는 큰 표적화 벡터를 랫트 C1q KO HET ES 세포 내로 전기천공(EP)하는 것에 대한 개략도를 도시한다(축척에 비례하지 않음). 3개의 C1q 유전자의 엑손은 다아아그램 아래에 표시된다(예: E1, E2, 및 E3). SDC-loxp-puro= 자가 결실 loxp - 퓨로마이신 카세트; p=polyA 서열. 랫트, 인간 또는 카세트 서열 간의 서열 접합부는 각각의 접합부 아래에 선과 함께 각 해당 서열에 대한 서열번호로 표시되어 있다.

도 3a는 랫트(rC1qa), 인간(hC1QA), 및 마우스(mC1qa) 폴리펩티드에 대한 C1qa 아미노산 정렬을 도시하며, 유사한 것들은 외곽선을 둘러 표시하고 일치하지 않는 것들은 소문자로 표시하였다. 신호 펩티드 서열은 박스 안에 표시하고 표지를 붙였다. 콜라겐 삼중 나선 반복 서열은 박스 안에 표시하고 표지를 붙였다. C1qa 구형 헤드 도메인 서열은 파선 박스 안에 표시하고, 키메라 폴리펩티드에서 마우스/인간 또는 랫트/인간 서열의 접합부는 파선으로 도시하고 화살표로 표시하였다.

도 3b는 랫트(rC1qb), 인간(hC1QB), 및 마우스(mC1qb) 폴리펩티드에 대한 C1qb 아미노산 정렬을 도시하며, 유사한 것들은 외곽선을 둘러 표시하고 일치하지 않는 것들은 소문자로 표시하였다. 신호 펩티드 서열은 박스로 표시하고 표지를 붙였다. 콜라겐 삼중 나선 반복 서열은 박스 안에 표시하고 표지를 붙였다. C1qb 구형 헤드 도메인 서열은 파선으로 된 박스로 표시되어 있고, 키메라 폴리펩티드에서 마우스/인간 또는 랫트/인간 서열의 접합

부는 파선으로 도시하고 화살표로 표시하였다.

도 3c는 랫트(rC1qc), 인간(hC1QC), 및 마우스(mC1qc) 폴리펩티드에 대한 C1qb 아미노산 정렬을 도시하며, 유사한 것들은 외곽선을 둘러 표시하고 일치하지 않는 것들은 소문자로 표시하였다. 신호 펩티드 서열은 박스로 표시하고 표지를 붙였다. 콜라겐 삼중 나선 반복 서열은 박스 안에 표시하고 표지를 붙였다. C1qc 구형 헤드 도메인 서열은 파선으로 된 박스로 표시되어 있고, 키메라 폴리펩티드에서 마우스/인간 또는 랫트/인간 서열의 접합부는 파선으로 도시되고 화살표로 표시하였다.

도 4의 상단 패널은 항-인간 C1q 항체로 검출했을 때 인간화 C1q 마우스의 혈청에 키메라 C1q 단백질이 존재함을 보여준다. 도 4의 하단 패널은 야생형 한배 새끼 마우스(WT) 및 키메라 C1q 마우스(1615 HO; HO=동형접합성) 및 인간 혈청에서 유래된 혈청 샘플들을 비교해 보체 활성을 측정하는 용혈 분석을 도시한다.

도 5는 라지 세포 상에서 2 nM의 인간 항-CD20 항체와 혈청 샘플(정상 인간 혈청, 인간화 C1q 마우스 혈청, 또는 야생형 마우스 혈청)에 의해 매개된 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 도시한다.

도 6은 야생형 한배 새끼 랫트("WT"), 인간화 C1q 랫트("C1q Humin" 또는 100015HO; HO=동형접합성), C1q 녹아웃 랫트("C1q KO"), 정상 인간 혈청("NHS"), 및 C1q 고갈된 인간 혈청에서 유래된 혈청 샘플을 비교해 보체 활성을 측정하는 용혈 분석 결과를 도시한다. 왼쪽 패널: 암컷 랫트; 우측 패널: 수컷 랫트(C1q KO 랫트는 예외).

도 7은 라지 세포 상에서 20 nM의 인간 항-CD20 항체와 혈청 샘플(정상 인간 혈청, 인간화 C1q 랫트 혈청, 또는 야생형 랫트 혈청)에 의해 매개된 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 본 화합물, 조성물, 물품, 장치 및/또는 방법을 개시하고 기술하기 전에, 이들은, 달리 명시되지 않는 한 특정 합성 방법 또는 특정 제조법 생명공학 방법으로 한정되지 않으며, 달리 명시되지 않는 한 특정 시약에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 하고, 따라서 다양할 수 있다는 것도 이해해야 한다. 또한 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위한 것이며 제한하도록 의도되지 않음을 이해해야 한다.
- [0047] **A. 정의**
- [0048] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 문맥에 달리 명시되지 않는 한, 단수 형태("a," "an" 및 "the")는 다수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "약학적 담체"에 대한 참조는 2개 이상의 이러한 담체의 혼합물 등을 포함한다.
- [0049] 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값에서 및/또는 "약" 하나의 또 다른 특정 값까지로 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 구현예는 하나의 특정 값에서 및/또는 다른 하나의 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 근사값으로 표현될 때, 선행하는 "약"을 사용함으로써, 특정 값이 또 다른 구현예를 형성한다는 것을 이해하게 될 것이다. 범위 각각의 양단점(endpoints)은 타 단점과 관련하여 유의할 뿐 아니라 타 단점과 독립적으로 유의하다는 것이 추가로 이해될 것이다.
- [0050] 본 명세서 및 이어지는 청구범위에서 다수의 용어에 대한 참조가 이루어질 것이며, 이는 다음의 의미를 갖도록 정의되어야 한다:
- [0051] "임의로(optional 또는 optionally)"는, 후속하여 설명되는 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있고, 해당 설명이 상기 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함함을 의미한다.
- [0052] "프라이머(primer)"는 일부 유형의 효소 조작을 뒷받침할 수 있고 효소 조작이 일어날 수 있도록 표적 핵산과 혼성화할 수 있는 프로브의 서브세트이다. 프라이머는, 당업계에서 이용할 수 있고 효소 조작을 방해하지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합으로부터 만들어질 수 있다.
- [0053] "프로브(probe)"는 일반적으로 서열 특이적 방식으로, 예를 들어 혼성화를 통해 표적 핵산과 상호 작용할 수 있는 분자이다. 핵산의 혼성화는 당업계에서 잘 이해되고, 본원에서 논의된다. 일반적으로 프로브는 당업계에서 이용할 수 있는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합으로부터 만들어질 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 기능적 단백질을 참조하여 본원에서 사용되는 바와 같은 "기능적(functional)"은 일반적으로 천연 단백질(native protein)과 연관된 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 내인성 유전자좌에서의 치환(예를 들어, 내인성 비인간 C1q 유전자좌에서의 치환)은 기능적 내인성 단백질을 발현하지 못하는 유전자좌를 초래한다.

- [0055] 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은, 그렇게 기술된 구성 요소가 의도된 방식으로 기능하는 것을 허용하는 관계에 있는 병치를 포함한다. 이와 같이, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 유지하도록 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 침묵기 서열 등)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, "작동 가능하게 연결된"은, 핵산 발현 조절 서열(예컨대 프로모터)과 제2 핵산 서열 간의 기능적 연결을 의미하며, 여기서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 유도한다. 또한, 본 개시의 인간화 단백질의 다양한 부분은 세포 내 단백질의 적절한 접힘, 가공, 표적화, 발현, 및 다른 기능적 특성을 유지하도록 작동 가능하게 연결되거나 융합될 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, 본 개시의 인간화 단백질의 다양한 도메인은 서로 작동 가능하게 연결된다.
- [0056] "인간화 C1q 대립유전자", "인간화 C1qa 대립유전자", "인간화 C1qb 대립유전자", "인간화 C1qc 대립유전자", "인간화 C1q 유전자", "인간화 C1qa 유전자", "인간화 C1qb 유전자" 또는 "인간화 C1qc 유전자"에서 사용된 바와 같은 용어 "인간화(humanized)"는 내인성 비인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 전부 또는 일부가 인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 상응하는 부분에 의해 치환되는 구현예를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 용어 "인간화"는 내인성 비인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 코딩 영역(예: 엑손)이 인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 상응하는 코딩 영역과 완전히 치환되는 것을 지칭하지만, 비인간 동물의 내인성 비코딩 영역(들)(예컨대, 프로모터, 5' 및/또는 3' 비번역 영역(들), 인핸서 요소 등)이지만 이들로 한정되지는 않음)은 치환되지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 유전자 또는 대립유전자는 게놈 내에 무작위로 배치되거나 게놈 내의 특정 위치에 표적화된다. 따라서, 일부 구현예에서, 인간화 유전자 또는 대립유전자는 상응하는 내인성 유전자 또는 대립유전자에 대한 고유 위치가 아닌 게놈 내의 위치에 배치된다(즉, 내인성 유전자와 이외의 위치에 배치됨). 다른 구현예에서, 인간화 유전자 또는 대립유전자는 내인성 유전자좌에 배치되는데; 예를 들어, 인간화 유전자 또는 대립유전자는 내인성 유전자좌에서 내인성 유전자 또는 대립유전자를 치환할 수 있다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.
- [0057] "인간화 단백질(humanized protein)"은 암호화된 내인성 비인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 단백질의 전부 또는 일부가 인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 단백질의 상응하는 부분으로 치환되는 구현예를 포함하되, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, "인간화 단백질"은 인간화 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자에 의해 암호화될 수 있지만 여전히 완전한 인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 단백질이다(예컨대, 내인성 비인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 코딩 영역(예를 들어, 엑손)의 전부가 인간 C1q, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자 또는 대립유전자의 상응하는 코딩 영역으로 치환되지만, 비인간 동물의 내인성 비인간 영역(들)(예컨대, 프로모터, 5' 및/또는 3' 비번역 영역(들), 인핸서 요소 등; 이들로 한정되지는 않음)은 치환되지 않는 상황을 포함하되, 이에 한정되지는 않음). 일부 구현예에서, 인간화 단백질은 게놈 내 고유 위치에 있지 않는(예를 들어, 내인성 유전자좌에 있지 않는) 인간화 유전자 또는 대립유전자로부터 발현된다. 다른 구현예에서, 인간화 단백질은 내인성 유전자좌에 있는 인간화 유전자 또는 대립유전자로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 인간화 단백질은 내인성 유전자좌에서 내인성 유전자 또는 대립 유전자를 치환하는 인간화 유전자 또는 대립유전자로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.
- [0058] 본 발명은 유사한 인간화(like-for-like humanization)에 관한 것이다. 예를 들어, 내인성 비인간 C1q 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 동족 인간 C1q 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되어 키메라 인간화 유전자를 형성한다. 일부 구현예에서, 내인성 C1qa 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 인간 C1qa 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되어 인간화 C1qa 유전자를 형성한다. 다른 구현예에서, 내인성 C1qb 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 인간 C1qb 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되어 인간화 C1qb 유전자를 형성한다. 또 다른 구현예에서, 내인성 C1qc 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 인간 C1qc 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되어 인간화 C1qc 유전자를 형성한다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "키메라(chimeric)"는 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 같은 서열을 포함하며, 여기서 서열의 일부는 하나의 유기체로부터 유래되고 서열의 다른 일부는 상이한 유기체로부터 유래된다. 예를 들어, 키메라 C1q 폴리펩티드는 마우스 또는 랫트로부터 유래된 서열 및 인간 C1q 단백질로부터 유래된 다른 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편, 및 동족 마우스 또는 랫트 C1q 폴리펩티드의 자루(stalk) 도메인 및 줄기(stem) 도메인을 포함한다.
- [0060] "C1q 유전자좌"에서와 같이, 용어 "유전자좌(locus)"는 C1q 코딩 영역을 포함하는 게놈 DNA의 위치를 지칭한다. 예를 들어, C1qa 유전자좌는 C1qa 코딩 영역을 포함하는 게놈 DNA의 위치를 지칭하고; C1qb 유전자좌는 C1qb 코

딩 영역을 포함하는 게놈 DNA의 위치를 지칭하며; C1qc 유전자좌는 C1qc 코딩 영역을 포함하는 게놈 DNA의 위치를 지칭한다. "C1q 유전자좌"에 대한 참조는 C1qa, C1qb 또는 C1qc 유전자좌 중 어느 하나를 의미한다. 유전자좌작을 목적으로 도입된 다른 서열, 예를 들어 선택 카세트, 제한 부위 등이 C1q 유전자좌에 포함될 수 있다.

[0061] 본 명세서와 청구범위 전반에 걸쳐 사용된 다양한 용어의 다른 정의 및 의미는 전반적으로 관련 섹션에 포함된다.

[0062] 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 공개 문헌이 참조된다. 이들 공개 문헌의 개시내용은 그 전체가 참고로서 본 출원에 통합된다. 개시한 참조 문헌은 또한 개별적으로 그리고 구체적으로 본원에 참조로 포함되어 있으며, 그 문헌은 참조가 의존되는 문장에서 논의된 물질에 대한 그 전체가 참조로 포함된다. //개시된 참조 문헌은 또한 참고 문헌이 의존하는 문장에서 논의되는 이들에 포함 된 물질에 대해 그 전문이 본원에 개별적으로 그리고 구체적으로 참조로 포함된다.

[0063] B. 조성물

[0064] 개시된 조성물을 제조하는 데 사용될 성분을 비롯하여 본원에 개시된 방법 내에서 사용될 조성물 자체가 개시된다. 이들 및 다른 물질이 본원에 개시되어 있으며, 이러한 물질의 조합, 서브세트, 상호작용, 군 등이 개시되는 반면, 이들 구성 요소의 각각의 다양한 개별적 및 집합적 조합과 순열에 대한 구체적인 언급이 명시적으로 열거될 수 없을 때는 각각이 본원에 구체적으로 고려되고 기술되어 있는 것으로 이해한다. 예를 들어, 특정 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 핵산 또는 폴리펩티드가 개시되고 논의되며, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 핵산 또는 폴리펩티드를 포함하는 다수의 분자에 대해 이뤄질 수 있는 다수의 변형이 개시되는 경우, 구체적으로 반대로 언급되지 않는 한, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 핵산 또는 폴리펩티드의 모든 조합과 치환(permutation) 및 가능한 변형이 구체적으로 고려된다. 따라서, 분자 A, B, 및 C의 부류뿐만 아니라 분자 D, E, 및 F의 부류가 개시되고, 조합 분자의 일레인 A-D가 개시되는 경우, 각각이 개별적으로 인용되지 않더라도 각각이 개별적으로 및 집합적으로 고려되며, 이는 조합 A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, 및 C-F가 개시된 것으로 간주됨을 의미한다. 마찬가지로, 이들의 임의의 서브세트 또는 조합이 또한 개시된다. 따라서, 예를 들어, A-E, B-F, 및 C-E의 하위군이 개시된 것으로 간주될 것이다. 이러한 개념은, 개시된 조성물의 제조 및 사용 방법에서의 단계를 포함하되 이들로 한정되지 않는, 본 출원의 모든 양태에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가의 단계들이 존재하는 경우, 이들 추가의 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 특정 구현에 또는 구현에의 조합으로 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0065] C. 폴리펩티드

[0066] 본 개시는 신규한 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하고 키메라 C1q 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전적으로 변형된 비인간 포유동물을 제공한다.

[0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, (예를 들어, "C1q 단백질" 또는 "C1q 복합체"에서와 같은) "C1q"는 C1r 및 C1s와 함께 보체 경로의 활성화를 개시하는 C1 복합체의 일부분이다. C1q는 병원체, 세포사멸체(apoptotic body) 및 가능하게는 중앙 세포의 제거에 필요한 고전적인 보체 경로의 제1 성분이다(Ghai R 등의 Immunobiology. 2007;212(4-5):253-66; Lu JH 등의 Cell Mol Immunol. 2008 Feb;5(1):9-21 참조). 보체 경로는 선천적 면역 시스템의 일부이다. 보체 경로의 활성화는 항원의 직접적인 용해, 항원성 부위에 대한 식세포 및 대식세포의 동원, 식세포에 의한 항원의 옹소닌화, 및 사이토카인 분비를 초래할 수 있다.

[0068] 인간/마우스/랫트 C1q 단백질은, 3개의 유전자, 즉 C1qa, C1qc, 및 C1qb 유전자에 의해 암호화되고 5'에서 3' "넙袖막* A-C-B의 순서로 일렬로 배치된 3개의 폴리펩티드로 구성된다(Petry F 등의 Immunogenetics. 1996;43(6):370-6 참조). 이들 폴리펩티드는 본원에서 "C1q 폴리펩티드"로도 지칭되는데, 이는 C1qa 폴리펩티드, C1qb 폴리펩티드, 또는 C1qc 폴리펩티드일 수 있다. C1qa, C1qb 및 C1qc 폴리펩티드 사슬의 각각은 시스테인 잔기를 함유하는 자루(또는 목) 도메인을 포함하는 N-말단 영역, 이어지는 콜라겐-유사 도메인(줄기 도메인), 및 C-말단 영역(상공성 머리 도메인)을 갖는다. N-말단 영역은 본원에서 "N-말단 자루-줄기 영역"으로도 지칭되며, C-말단 영역은 "구형 헤드 도메인"으로도 지칭된다. 인간 C1q 단백질(약 410 kDa)은 각각 구형 헤드로 끝나는 6개의 콜라겐성 자루로 조립된 부케형 구조(bouquet-like structure)와 유사하다. 각각의 줄기/구형 헤드는 총 18개의 폴리펩티드로 이루어진 3개의 폴리펩티드 사슬(C1qA, C1qB 및 C1qC)로 구성된다(6개의 A-, 6개의 B-, 및 6개의 C-사슬이 1개의 C1q 분자를 형성함(Reid KB Biochem Soc Trans. 1983 Jan;11(1):1-12 참조)).

[0069] C1q는 인간 및 설치류 모두에서 비장 대식세포 및 수지상 세포에 의해 발현된다(Castellano G 등의 Blood. 2004

May 15;103(10):3813-20 참조). C1q는 인간 순환에서 대략 100 ug/ml으로 발현되고 발견되며, 마우스에서는 유사한 수준으로 발현되고 발견된다(Dillon SP 등의 Biotechnol J. 2009 August ; 4(8): 1210-1214; Yonemasu K 등의 Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988;86(1):97-101). 단백질은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 인식하는 방어 콜라겐의 군에 속하며, 여기서 C1q의 C-말단/구형 헤드는 IgM의 CH3 도메인; IgG의 CH2 도메인; 베타-아밀로이드; DNA를 포함하는 폴리-음이온; C-반응성 단백질; 혈청 아밀로이드 P뿐만 아니라, LPS, 바이러스, 및 프리온과 연관된 PAMP를 인식한다(Dunkelberger JR, Song WC, Cell Res. 2010 Jan;20(1):34-50; Ghai R 등의 Immunobiology. 2007;212(4-5):253-66 참조). C1q는 C1s-C1r-C1r-C1s 사량체와 자발적으로 조립되어 C1 거대 복합체를 형성한다. C1 거대 복합체는 1개의 C1q 복합체와 각각 C1r 및 C1s인 2개를 포함하는 3개의 단백질로 이루어진 오량체이며, 여기서 C1r 및 C1s는 C1q의 자루-줄기 도메인과 연관된다. C1r과 C1은 세르핀 프로테아제 억제제 계열 구성원인 C1 억제제(C1INH)에 의해 조절된다(Beinrohr L 등의 Trends Mol Med. 2008 Dec;14(12):511-21 참조). C1q는 또한 CD93, DC-SIGN과 CR1/CD35를 포함하는 수용체에 결합한다(Hosszu KK 등의 Blood. 2012 Aug 9;120(6):1228-36; Bohlson SS 등의 Mol Immunol. 2007 Jan;44(1-3):33-43 참조). PAMP에 결합함으로써, C1q는 옵소닌화하여 병원체 제거를 용이하게 하며, CR1 또는 FcγR을 통해 C3b/C4b 또는 IgG와 각각 최적 미만으로 옵소닌화된 표적 입자의 식균작용을 향상시킬 수 있다(Bobak DA 등의 J Immunol. 1987 Feb 15;138(4):1150-6 참조). 따라서, C1q는 고전적인 보체 경로를 활성화함으로써, 막 공격의 복합체(표적 용해)의 형성 및 활성화 단편 C3a 및 C5a의 생성 둘 다를 초래한다(Bohlson SS 등의 Mol Immunol. 2007 Jan;44(1-3):33-43 참조). 마지막으로, C1q는 사멸 세포-관련 분자 패턴을 인식함으로써 면역 복합체의 제거를 매개할 뿐만 아니라, 세포자멸을 겪는 세포 및 세포 액포(cells blebs)의 제거도 매개한다.

[0070] 고전적인 보체 경로를 활성화하기 위해, C1q는 이의 6개의 구형 헤드를 통해 항체의 병원체 표면 또는 Fc 도메인에 결합하는데, 이는 C1r 및 C1s 세린 프로테아제를 활성화시켜 하류 보체 성분을 절단시키고, 궁극적으로는 막 공격 복합체를 통해 보체 활성화, 침착 및 세포 용해를 야기한다(Reid KB Biochem Soc Trans. 1983 Jan;11(1):1-12 참조).

[0071] 인간, 마우스 및 랫트 C1qa, C1qb, 및 C1qc의 예시적인 서열 및 GenBank 수탁 번호는 아래 표 1, 2 및 8, 및 도 3a(C1qa), 도 3b(C1qb), 및 도 3c(C1qc)에 제시되어 있다.

[0072] 항체의 Fc 도메인 또는 항원을 직접 인식하는 것은 C1q이므로, 인간화 보체 시스템을 제공하는 데 있어서 핵심은 C1q이다. 인간 항체 또는 인간 병원체를 인식하는 것이 C1q의 구형 헤드 도메인(흔히 gC1q로 약칭됨)이므로, 본원에 제공된 특정 구현예에서, C1q의 구형 헤드 도메인을 이들이 이러한 분자들을 보다 쉽게 인식하도록 조작되었다. 특정 구현예에서, C1q의 구형 헤드 도메인은 인간인 반면, 단백질의 나머지는 비인간이다. 이러한 구현예에서, 본원에 제공된 비인간 동물은 C1r/C1s와 상호 작용하는 것으로 알려진 단백질의 일부와 보체 시스템의 나머지(예를 들어, 단백질의 자루 및 줄기 부분)를 보유한다. 따라서, 본원에서 제공된 구현예에서, 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 보유하는 C1q를 발현하는 비인간 동물은 치료 분자, 예를 들어 항체 작용의 효과기 메커니즘으로서의 보체 시스템에 대한 요건을 평가하는 데 유용하다. 제공된 구현예에서, 상기 비인간 동물은 보체 시스템이 항체에 의해 결합되는 경우 치료의 효과를 연구하는 데에도 유용하다. 제공된 구현예에서, 상기 비인간 동물은 감염성 질환 징후에 맞게 설계된 완전한 인간 치료 항체, 예를 들어 이중특이적 항체의 효능을 시험하기 위한 생체 내 모델로서도 유용하다.

[0073] 따라서, 일 양태에서, (예를 들어, 키메라 포유류 C1qa, C1qb 및/또는 C1qc 폴리펩티드와 같은) 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드가 본원에 개시된다.

[0074] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 키메라 C1q 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 도메인의 인식을 담당하거나, 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)의 인식을 담당하는 인간 C 말단 영역을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 키메라 C1q 폴리펩티드는 인간 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 키메라 C1q 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함한다. "실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인"이란, 키메라(인간화) C1q 폴리펩티드 내의 구형 헤드 도메인이 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일함을 의미한다. "실질적으로 동일하다"는 것은, (i) 일부 구현예에서, 구형 헤드 도메인이 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 서열이 적어도 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 것; (ii) 다른 구현예에서, 구형 헤드 도메인이 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 5, 4, 3, 2 또는 1개 아미노산(들)만큼 상이한 것; (iii) 또 다른 구현예에서, 구형 헤드 도메인이 도메인의 N- 또는 C- 말단 부분에서만 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 상이한 것, 예를 들어, 동일한 길이를 가지지만, 구형 헤드 도메인의 N- 또는 C- 말단 내에서(예를 들어, 구형 헤드 도메인의 N- 또는 C-말단에 있는

5~10 아미노산 내에서) 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개이지만, 5개를 초과하지 않음)이 아미노산 치환(예컨대, 보존적 치환)됨으로써 상이한 것; 및/또는 (iv) 다른 구현예에서, 구형 헤드 도메인이 도메인의 N-또는 C-말단에서 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인보다 1, 2, 3, 4, 5개(5개를 초과하지 않음)의 아미노산만큼 더 짧거나 더 긴 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인은 도메인의 N-말단 부분 내에서 (예를 들어, N-말단의 5~10 아미노산 내에서) 1, 2, 또는 3개 이하의 아미노산만큼 인간 구형 헤드 도메인과 상이하고; 이러한 특정 구현예에서, 이러한 차이는 인간 구형 헤드 도메인의 아미노산과 동족 비인간(예를 들어, 마우스 또는 랫트)의 구형 헤드 도메인의 상응하는 위치에 있는 아미노산과의 치환(들)을 포함한다. 예를 들어, 본원의 도 3a에는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 갖는 키메라 C1qa 폴리펩티드가 개시되어 있으며 - 이러한 키메라 C1qa 폴리펩티드의 구형 도메인은 구형 헤드 도메인의 N-말단의 3번 째 위치에 있는 단 하나의 아미노산만큼 (인간 C1qa 폴리펩티드에서는 "K", 키메라, 마우스 및 랫트 C1qa 폴리펩티드에서는 "R"임) 서열번호 4의 인간 C1qa의 구형 헤드 도메인과 상이하다.

[0077] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간(예를 들어, 내인성 설치류) C1s 및 C1r 및/또는 보체 경로의 다른 비인간(예: 내인성 설치류) 성분의 인식을 담당하는 N 말단 자루-줄기 영역을 포함한다.

[0078] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간 자루 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간 콜라겐 삼중 나선 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간 자루 도메인 및 줄기 도메인을 포함하는 비인간 N 말단 영역을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 키메라 C1q 폴리펩티드는 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. "실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역"이란, 키메라 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역이 비인간(예를 들어, 설치류) C1q 폴리펩티드의 상응하는 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일함을 의미한다. "실질적으로 동일하다"는 것은, (i) 일부 구현예에서, N-말단 자루-줄기 영역이 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 서열이 적어도 90%, 95%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 것; (ii) 다른 구현예에서, N-말단 자루-줄기 영역이 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산(들)만큼 상이한 것; (iii) 또 다른 구현예에서, N-말단 자루-줄기 영역이 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 C- 말단 부분에서만 상이한 것, 예를 들어, 동일한 길이를 가지지만, 자루-줄기 영역의 C-말단의 5~10 아미노산의 1개 이상이 아미노산 치환됨으로써 상이한 것; 및/또는 (iv) 다른 구현예에서, N-말단 자루-줄기 영역이 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역보다 1, 2, 3, 4, 5개(5개를 초과하지 않음)의 아미노산만큼 더 짧거나 더 긴 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 비인간 (예를 들어, 설치류) C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 동일하다.

[0080] 일 구현예에서, 인간 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 4에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 C1qa 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_001334394.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 5에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 C1qb 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_000482.3에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 6에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 C1qc 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_001334548.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0081] 일 구현예에서, 마우스 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 마우스 C1qa 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_031598.2에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 마우스 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 2에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 마우스 C1qb 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_033907.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 마우스 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 3에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 마우스 C1qc 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_031600.2에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0082] 일 구현예에서, 랫트 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 7에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 랫트 C1qa 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_001008515.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 랫트 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 8에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 랫트 C1qb 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_062135.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다.

포함한다. 일 구현예에서, 랫트 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 9에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 랫트 C1qc 폴리펩티드는 GenBank 수탁 번호 NP_001008524.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 따라서, 일 양태에서, 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드는 키메라 C1qa 폴리펩티드이다.

[0084] 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 인간 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 서열번호 4에 제시된 것과 같은 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 122~222를 포함하는 키메라 C1qa 폴리펩티드(예를 들어, 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 122~235 또는 112~245를 포함하는 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드)이다.

[0085] 일부 구현예에서, 키메라 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인(즉, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인)을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 4의 아미노산 108~245는 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 구성한다(도 3a 참조). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 4의 아미노산 108~245로 표시된 인간 C1qa 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 10의 아미노산 108~245로 표시되며, 이러한 도메인은 서열번호 4의 아미노산 108~245로 표시되는 인간 C1qa 구형 헤드 도메인과 하나의 아미노산(인간 C1qa에서의 "K" 대신에 마우스 및 랫트 C1qa에서와 같이 "R"인 제3 아미노산 잔기)이 상이하다. 또 다른 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 4의 아미노산 108~245로 표시되는 인간 C1qa 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드는 비인간 C1qa 자루 및/또는 줄기 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드는 서열 번호 1에 제시된 마우스 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 포함하는 마우스 서열인 비인간 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드는 서열 번호 7에 제시된 랫트 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 포함하는 랫트 서열인 비인간 서열을 포함한다.

[0087] 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역, 즉 비인간 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 마우스 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 마우스 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고(도 3a), 서열번호 1의 아미노산 23~107은 서열번호 1의 마우스 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3a). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 23~107로 표시된 마우스 C1qa N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 1의 아미노산 23~107로 표시된다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 랫트 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 랫트 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고(도 3a), 서열번호 7의 아미노산 23~107은 서열번호 7의 랫트 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3a). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 23~107로 표시된 랫트 C1qa N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 7의 아미노산 23~107로 표시된다.

[0088] 일부 구현예에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 예를 들어, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 10(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 23~245 또는 서열번호 55(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 23~245를 포함한다. 일 양태에서, 키메라 C1qa 폴리펩티드는 서열번호 10 또는 서열번호 55이거나 이를 포함한다.

[0089] 일 양태에서, 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드는 키메라 C1qb 폴리펩티드이다.

[0090] 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 인간 C1qb 구형 헤드 또는 이의 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 서열번호 5에 제시된 것과 같은 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 125~233(예를 들어, 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 120~250 또는 118~251)을 포함하는 키메라 C1qb 폴리펩티드이다.

[0091] 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인(즉, 인간 C1qb 폴리펩티드의

구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인)을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고(도 3b), 서열번호 5의 아미노산 115~251은 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 구성한다(도 3b 참조). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 5의 아미노산 115~251로 표시된 인간 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인을 포함한다. 5. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 11의 아미노산 115~251로 표시되며, 이러한 도메인은 서열번호 5의 아미노산 115~251로 표시된 인간 C1qb 구형 헤드 도메인과 하나의 아미노산(인간 C1qb에서의 "K" 대신에 마우스 C1qa에서와 같이 "R"인 제1 아미노산 잔기)이 상이하다. 또 다른 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 5의 아미노산 115~251로 표시된 인간 C1qb 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인을 포함한다.

[0092] 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 비인간 C1qb 자루 및/또는 줄기 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드는 서열 번호 2에 제시된 마우스 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114, 또는 26~117을 포함하는 마우스 서열인 비인간 포유동물 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 키메라 포유동물 C1qb 폴리펩티드는 서열 번호 8에 제시된 랫트 C1qb 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114 또는 26~117을 포함하는 랫트 서열인 비인간 포유동물 서열을 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역, 즉 비인간 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 마우스 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 마우스 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고(도 3b), 서열번호 2의 아미노산 26~114는 서열번호 2의 마우스 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3b). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 26~114로 표시된 마우스 C1qb N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 2의 아미노산 26~114로 표시된다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 랫트 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 랫트 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하며(도 3b), 서열번호 8의 아미노산 26~114는 서열번호 8의 랫트 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3b). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 8의 아미노산 26~114로 표시된 랫트 C1qb N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 8의 아미노산 26~114로 표시된다.

[0094] 일부 구현예에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 예를 들어, 키메라 포유동물 C1qb 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 폴리펩티드는 서열번호 11(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 26~251 또는 서열번호 56(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 26~251을 포함한다. 일 양태에서, 키메라 C1qb 폴리펩티드는 서열번호 11 또는 서열번호 56이거나 이를 포함한다.

[0095] 또 다른 양태에서, 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드는 키메라 C1qc 폴리펩티드이다.

[0096] 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 인간 C1qc 구형 헤드 또는 이의 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 서열번호 6에 제시된 것과 같은 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 118~234를 포함하는 키메라 C1qc 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 6에 제시된 바와 같은 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 포함하는 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드)이다.

[0097] 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인(즉, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인)을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하고(도 3c), 서열번호 6의 아미노산 113~245는 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 구성한다(도 3c). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 113~245로 표시된 인간 C1qc 구형 헤드 도메인과 실질적으로 동일한 구형 헤드 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인은 서열번호 6의 아미노산 113~245로 표시된 인간 C1qc 구형 헤드 도메인과 동일하다.

[0098] 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 비인간 C1qc 자루 및/또는 줄기 도메인을 포함한다. 예를 들어, 비인간 포유동물 서열이 서열번호 3에 제시된 마우스 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 31~111, 30~113, 또는

30~114를 포함하는 마우스 서열인 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드; 또는 비인간 포유동물 서열이 서열번호 9에 제시된 랫트 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~113, 32~115, 또는 32~116을 포함하는 랫트 서열인 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드가 본원에 개시된다.

[0099] 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역, 즉 비인간 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 마우스 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 마우스 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고(도 3c), 서열번호 3의 아미노산 30~113은 서열번호 3의 마우스 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3c). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 30~113으로 표시된 마우스 C1qc N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 3의 아미노산 30~113으로 표시된다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 랫트 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 랫트 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하며(도 3c), 서열번호 9의 아미노산 32~115는 서열번호 9의 랫트 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 구성한다(도 3c). 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 9의 아미노산 32~115로 표시된 랫트 C1qc N-말단 자루-줄기 영역과 실질적으로 동일한 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역은 서열번호 9의 아미노산 32~115로 표시된다.

[0100] 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인 및 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역을 포함한다. 예를 들어, 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드가 또한 본원에 개시되며, 여기서 폴리펩티드는 서열번호 12(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 30~246 또는 서열번호 57(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~248을 포함한다. 일 양태에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 서열번호 12 또는 서열번호 57이거나 이를 포함한다.

[0101] 하나의 특정 양태에서, 본원에 기술된 키메라 C1q 폴리펩티드 중 하나 이상을 포함하는 키메라 C1q 단백질이 본원에 개시된다. 예를 들어, 키메라 C1q 단백질이 본원에 개시되며, 여기서 단백질은 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 키메라 C1qa, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 키메라 C1qb, 및/또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 키메라 C1qc 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 단백질은 키메라 C1qa 폴리펩티드, 키메라 C1qb 폴리펩티드, 및 키메라 C1qc 폴리펩티드를 각각 6개씩 포함한다.

[0102] 개시된 C1q 폴리펩티드는 부분적으로 인간이고 부분적으로 비인간인 아미노산 구조를 포함하는 키메라 폴리펩티드이다. 개시된 키메라 폴리펩티드의 인간 및 비인간 부분은 C1q 폴리펩티드의 기능을 보유하는 방식으로 연결되거나, 융합되거나, 달리 화학적으로 결합되는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "기능(function)" 및 기능성(functionality)"은 천연 분자의 임무를 수행하는 능력을 지칭한다. C1qa, C1qb 및 C1qc의 경우, 기능성은 이량체(C1qa와 C1qb의 경우 이중이량체이고, C1qc의 경우 동종이량체임)를 형성하는 능력; 키메라 폴리펩티드의 각 부분이 적절한 접합을 수행하는 능력; C1q 복합체를 형성하는 삼량체(삼량체당 2개의 C1qa 및 C1qb 이중이량체 및 1개의 C1qc 동종이량체)로서 이량체를 조립하는 능력; C1r 및 C1s와 함께 오량체 C1 복합체를 형성하는 능력; 항체 또는 PAMP의 Fc 도메인을 인식하는 능력; 및 고전적인 보체 경로를 시작하는 능력을 포함한다. C1q 단백질의 조립은 기술되어 있다(예를 들어, Lu 등의 문헌[Cellular & Mol. Immunol. 2008, 5(1): 9-21]), 및 특히 도 1 참조). C1qa 및 C1qb 폴리펩티드 사슬은 N-말단 단부에서 이황화 결합을 통해 이량체화되고, 2개의 C1qc 사슬은 유사한 이황화 결합을 통해 동종이량체를 형성한다. 하나의 C1qa-C1qb 이량체와 단일 C1qc 사슬은 3중 나선을 형성하고, C1qc-C1qc 이량체의 다른 하나의 C1qc-사슬은 또 다른 C1qa-C1qb 이량체와 함께 삼량체화되어 2개의 C1qc 사슬 간의 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 3중 나선을 형성한다. 3개의 이러한 구조는 N-말단 결합을 통해 C1q 단백질 분자를 형성한다.

[0103] 특정 양태에서, 키메라 포유동물 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 본원에 개시된 폴리펩티드는 인간, 마우스, 또는 랫트 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 신호 서열을 각각 추가로 포함한다. 예시적인 인간, 마우스, 및 랫트 C1qa, C1qb, 및 C1qc 신호 서열은 도 3a, 도 3b 및 도 3c에 각각 도시되어 있다.

[0104] 개시된 키메라 폴리펩티드 중 어느 하나는 비인간 동물에서 발현될 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 본원에 기술된 키메라 C1q 단백질(들), 또는 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 아미노산 서열(들)의 보존적 아미노산 치환)를 포함하는 키메라 C1q 단백질(들)을 발현하는 유전적으로 변형된 비인간 동물, 예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류가 본 개시에 의해 포함된다.

- [0105] 따라서, 키메라 폴리펩티드는 알려져 있고 본원에서 고려되는 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드의 수많은 변이체 중 하나일 수 있다. 공지된 기능적 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 중 및 균주 변이체에 더하여, 개시된 방법 및 조성물에서도 작용하는 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드의 유도체가 존재한다. 단백질 변이체 및 유도체는 당업자에게 잘 이해되며, 아미노산 서열 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변형은 일반적으로 3개의 부류: 치환 변이체, 삽입 변이체 또는 결실 변이체 중 하나 이상에 포함된다. 이들 유형의 변형 및 이를 달성하기 위한 분자 기술은 당업계에 공지되어 있다. 최종 작제물에 도달하기 위해 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의의 조합이 조합될 수 있다. 이러한 변형은 서열을 관독 프레임 밖으로 배치하지 않아야 하며, 바람직하게는 이차 mRNA 구조를 생성할 수 있는 상보성 영역을 생성하지 않을 것이다. 보존적 아미노산 치환을 기술하는 데 사용되는 경우의 용어 "보존적(conservative)"은, 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 보존적 치환을 암호화할 뉴클레오타이드 변화를 도입하도록 서열을 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 관심 단백질의 기능적 성질, 예를 들어, 면역글로불린에 결합하거나 보체 경로를 활성화하는 C1q 복합체의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질을 가진 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: 지방족 측쇄, 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 지방족-하이드록실 측쇄, 예를 들어 세린 및 트레오닌; 아미드 함유 측쇄, 예를 들어, 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 측쇄, 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 염기성 측쇄, 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 산성 측쇄, 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산; 및, 황 함유 측쇄, 예를 들어, 시스테인 및 메티오닌. 보존적 아미노산 치환기는, 예를 들어, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/티로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르테이트, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에서 사용된 바와 같은 알라닌을 갖는 단백질 내 임의의 원래의 잔기의 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조로서 본원에 통합된 Gonnet 외의 문헌((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45)에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스 내에서 양의 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 적당한 보존적 치환인데, 이러한 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가진다.
- [0106] 기능에 있어서의 실질적인 변화는 위에 열거된 것들보다 덜 보존적인 치환을 선택함으로써, 즉 다음을 유지하는데 미치는 영향에 있어서 더 현저하게 상이한 잔기를 선택함으로써 이루어진다: (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서의 구조; (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 측쇄의 벌크. 일반적으로 단백질 특성에 가장 큰 변화를 일으킬 것으로 예상되는 치환은: (a) 세린 또는 트레오닌과 같은 친수성 잔기가 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌과 같은 소수성 잔기로 (또는 이에 의해) 치환되는 것; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기로 (또는 이에 의해) 치환되는 것; (c) 리실, 아르기닌, 또는 히스티딘과 같은 양전성(electropositive) 측쇄를 갖는 잔기가 글루타민 또는 아스파틸과 같은 음전성(electronegative) 측쇄로 (또는 이에 의해) 치환되는 것; 또는 (d) 페닐알라닌과 같은 벌키 측쇄를 갖는 잔기가 글리신과 같이 측쇄를 갖지 않는 것으로 (또는 이에 의해) 치환되는 것이거나, (e) 황화 및/또는 글리코실화 부위의 수를 늘리는 것이 될 것이다.
- [0107] 치환성 또는 결실성 돌연변이 유발이 N-글리코실화(Asn-X-Thr/Ser) 또는 O-글리코실화(Ser 또는 Thr)를 위한 삽입 부위에 사용될 수 있다. 시스테인 또는 기타 불안정한 잔기의 결실이 바람직할 수도 있다. 잠재적 단백질 분해 부위(예: Arg)의 결실 또는 치환은 예를 들어, 염기성 잔기 중 하나를 결실시키거나, 하나를 글루타민 또는 히스티딘 잔기에 의해 치환함으로써 달성된다.
- [0108] 본원에 개시된 단백질의 변이체 및 유도체를 정의하는 하나의 방법은 특정 공지된 서열에 대한 상동성/동일성 측면에서 변이체 및 유도체를 정의하는 것을 통하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 서열번호 1은 마우스 C1qa 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 2는 마우스 C1qb 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 3은 마우스 C1qc 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 4는 인간 C1qa 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 5는 인간 C1qb 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 6은 인간 C1qc 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 7은 랫트 C1qa 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하고, 서열번호 8은 랫트 C1qb 폴리펩티드의 특정 서열을 제시하며, 서열번호 9는 랫트 C1qc 폴리펩티드의 특정 서열을 제시한다. 본원에 개시된 이들 및 다른 단백질의 변이체로서, 명시된 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 갖는 변이체가 구체적으로 개시된다. 일부 구현예에서, 상동성 서열은 표 1, 2 및 8에 열거된 GenBank 수탁 번호로 표시된 것들이다. 당업자는 2개의 단백질의 상동성을 결정하는 방법을 쉽게 이해할 수 있다. 예를 들어, 상동성은, 상동성이 가장 높은 수준이 되도록 2개의 서열을 정렬한 후에 계산할 수 있다.

- [0109] 상동성을 계산하는 또 다른 방법은 공개된 알고리즘에 의해 수행될 수 있다. 비교를 위한 최적의 서열 정렬은 Smith 및 Waterman의 국소 상동성 알고리즘(*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981) 참조), Needleman 및 Wunsch의 상동성 정렬 알고리즘(*J. Mol Biol.* 48: 443 (1970) 참조), Pearson 및 Lipman의 유사도 검색 방법(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444 (1988) 참조), 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 수행(위스콘신주 매디슨 Science Dr. 575 소재 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package 중 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의해 수행되거나, 검사에 의해 수행될 수 있다.
- [0110] 동일한 유형의 상동성은 예를 들어, Zuker, M. *과학* 244:48-52, 1989, Jaeger 등 *생산 Natl. Acad. Sci. 미국* 86:7706-7710, 1989, Jaeger 등 *방법 효소* 183:281-306, 1989년.
- [0111] 보존적 돌연변이 및 상동성의 설명은, 변이체가 보존적 돌연변이인 특정 서열에 대해 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99%의 상동성을 갖는 구현예와 같이, 임의의 조합으로 함께 결합될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0112] 본 명세서는 다양한 단백질 및 단백질 서열을 논의하므로, 이들 단백질 서열을 암호화할 수 있는 핵산도 개시되는 것으로 이해된다. 이에는 특정 단백질 서열과 관련된 모든 축퇴 서열(degenerate sequence), 즉, 하나의 특정 단백질 서열을 암호화하는 서열을 갖는 모든 핵산을 비롯하여, 축퇴 핵산(degenerate nucleic acid)을 포함하여 개시된 단백질 서열의 변이체 및 유도체를 암호화하는 모든 핵산을 포함한다. 따라서, 각각의 특정 핵산 서열이 본원에서 기록되지 않을 수 있지만, 모든 서열이 개시된 단백질 서열을 통해 본원에 개시되고 기술되는 것으로 이해된다.
- [0113] **D. 핵산**
- [0114] 예를 들어 키메라 C1qa, C1qb, C1qc를 암호화하는 핵산, 또는 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전적으로 변형된 비인간 동물을 만들기 위한 본원에 기술된 임의의 핵산뿐만 아니라 다양한 기능적 핵산을 포함하는, 핵산 기반의 다양한 분자가 비롯하여 본원에 개시되어 있다.
- [0115] 비인간 및 인간 핵산 서열을 포함하는 키메라 포유동물 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 단리된 핵산 서열은 게놈의 전체 영역을 포함하는 큰 표적화 벡터이며, 엑손, 인트론 및/또는 유전자간 서열(intergenic sequence)을 포함한다. 이들은 5' 및 3' 비번역 영역, 인핸서, 프로모터 및 기타 조절 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이들 조절 요소는 비인간 조절 요소, 예를 들어 내인성 비인간 C1q 유전자의 조절 요소이다. 다른 구현예에서, 이들 조절 요소는 인간 조절 요소, 예를 들어 인간 C1q 유전자의 조절 요소이다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 단리된 핵산 서열은 cDNA 서열이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 단리된 핵산, 예를 들어, 큰 표적화 벡터는 단일 C1q 유전자보다 많은, 예를 들어, 2개 또는 3개의 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, 이는 본원에 기술된 3개의 키메라 C1qa, C1qb, 및 C1qc 유전자를 모두 암호화할 수 있음).
- [0116] 일 양태에서, 비인간 및 인간 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 핵산은 본원에서 기술한 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드(예를 들어, C1qa, C1qb, 또는 C1qc 폴리펩티드), 예를 들어, 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역 및 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0117] 일부 구현예에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산은 비인간 및 인간 핵산 서열을 포함하며, 여기서 인간 핵산 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하고, 비인간 핵산 서열은 동족 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다.
- [0118] "인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는 인간 C1q 핵산 서열"이란, 구형 헤드 도메인을 암호화하는 인간 C1q 유전자의 단편 또는 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 도메인보다 약간 더 길거나 짧은 폴리펩티드 단편을 의미한다. "약간 더 길거나 짧은"이란 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 이하의 길이 차이를 의미한다. 유사하게, "비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 비인간 C1q 핵산 서열"이란, N-말단 자루-줄기 영역을 암호화하는 비인간 C1q 유전자의 단편, 또는 비인간 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역보다 약간 더 길거나 짧은 폴리펩티드 단편을 의미한다.
- [0119] 비인간 C1q 폴리펩티드 및 동족 인간 C1q 폴리펩티드가 자루-줄기 영역과 구형 헤드 도메인 사이의 접합부 근처에서 공통 아미노산을 공유하는 상황에서는, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 정확하게 암호화하는 인간 C1q 핵산 서열을 이용하는 것이 필요하지 않을 수 있다. 키메라 C1q 폴리펩티드가 인간 C1q 폴리펩티드의

구형 헤드 도메인과 실질적으로 또는 완전히 동일한 구형 헤드 도메인 및 비인간 C1q 폴리펩티드의 자루-줄기 영역과 실질적으로 또는 완전히 동일한 자루-줄기 영역을 포함하도록, 비인간 동물 C1q 폴리펩티드의 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되고, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는 인간 C1q 유전자의 핵산 서열을 사용하는 것이 가능하다. 유사하게, 비인간 C1q 폴리펩티드 및 인간 C1q 폴리펩티드가 구형 헤드 도메인의 C-말단 근처에서 공통 아미노산을 공유하는 상황에서는, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 정확하게 암호화하는 인간 C1q 핵산 서열을 이용하는 것이 필요하지 않을 수 있다. 키메라 C1q 폴리펩티드가 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 여전히 실질적으로 또는 완전히 동일한 구형 헤드 도메인을 포함하도록, 구형 헤드 도메인의 C-말단에 있는 나머지 아미노산을 암호화하는 비인간 핵산에 작동 가능하게 연결되고, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인보다 약간 더 짧은 폴리펩티드를 암호화하는 인간 C1q 유전자의 약간 더 짧은 핵산을 삽입하는 것이 가능하다.

[0120] 일 양태에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 인간 핵산 서열은 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다(예를 들어, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화함). 예를 들어, 일 양태에서, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 핵산은 서열번호 4에 제시된 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 122~222를 암호화하는 적어도 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 핵산은 서열번호 4에 제시된 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 122~235 또는 112~245를 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, 인간 C1qa 엑손 3의 일부분)을 포함할 수 있다.

[0121] 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 개시된 핵산은 비인간 핵산 서열(예를 들어, 비인간 C1qa 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 핵산 서열)을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 단리된 핵산이 또한 본원에 개시되며, 여기서 핵산 서열은 서열번호 1에 제시된 마우스 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7에 제시된 랫트 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 단리된 핵산은 서열번호 10(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 23~245 또는 서열번호 55(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 23~245를 암호화한다. 일 양태에서, 단리된 핵산은 서열번호 10 또는 서열번호 55이거나 이를 포함하는 기능적 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화한다.

[0122] 또한, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는, 예를 들어, 인간 C1qb 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 키메라 포유동물 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다. 예를 들어, 키메라 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산은 서열번호 5에 제시된 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 125~233을 암호화하는 적어도 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 핵산은 서열번호 5에 제시된 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118~251을 암호화하는 핵산 서열(예: 인간 C1qb 엑손 3의 일부)을 포함할 수 있다.

[0123] 키메라 포유동물 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 개시된 핵산은 비인간 핵산 서열(예를 들어, 비인간 C1qb 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 핵산 서열)을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 단리된 핵산이 또한 본원에 개시되며, 여기서 핵산 서열은 서열번호 2에 제시된 마우스 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114, 또는 26~117을 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 핵산 서열은 서열번호 8에 제시된 랫트 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114, 또는 26~117을 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 단리된 핵산은 서열번호 11(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 26~251을 암호화하거나, 단리된 핵산은 서열번호 56(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 26~251을 암호화한다. 일 양태에서, 단리된 핵산은 서열번호 11 또는 서열번호 56이거나 이를 포함하는 기능적 키메라 포유동물 C1qb 폴리펩티드를 암호화한다.

[0124] 또한, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는, 예를 들어, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 및 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다. 일 양태에서, 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 개시되며, 여기서 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열번호 6에 제시된 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 118~234를 암호화하는 적어도 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 핵산은 서열번호 6에 제시된 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, 인간 C1qa 엑손 3의

일부분)을 포함할 수 있다.

- [0125] 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 비인간 핵산 서열(예를 들어, 비인간 C1qc 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 핵산 서열)을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 단리된 핵산이 또한 본원에 개시되며, 여기서 핵산 서열은 서열번호 3에 제시된 마우스 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 31~111, 30~113, 또는 30~114를 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 핵산 서열은 서열번호 9에 제시된 랫트 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 31~111, 30~113, 또는 30~114를 암호화하는 적어도 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 단리된 핵산은 서열번호 12(마우스/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 30~246을 암호화하거나, 단리된 핵산은 서열번호 57(랫트/인간)에 제시된 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~248을 암호화한다. 일 양태에서, 단리된 핵산은 서열번호 12 또는 서열번호 57이거나 이를 포함하는 기능적 키메라 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0126] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 내의 비인간 핵산 서열은 비인간 신호 펩티드, 예를 들어 내인성 비인간 C1q 폴리펩티드의 신호 펩티드를 또한 암호화한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 내의 비인간 핵산 서열은 비인간 5' UTR 영역, 예를 들어 내인성 비인간 C1q 유전자의 5' UTR 영역을 또한 포함한다.
- [0128] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 내의 비인간 핵산 서열은 인간 3' UTR 영역, 예를 들어 인간 C1q 유전자의 3' UTR 영역을 또한 포함한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 비인간 핵산 서열은 엑손 2의 코딩 부분(예컨대, 성숙한 형태의 비인간 C1q 폴리펩티드의 아미노산을 암호화하는 부분) 및 엑손 3의 일부(예를 들어, N-말단 자루-줄기 영역의 아미노산을 암호화하는 부분)를 포함하는 비인간 C1q 유전자의 게놈 단편이다. 일부 구현예에서, 비인간 핵산 서열은 엑손 2의 전체 코딩 부분(성숙한 형태의 비인간 C1q 폴리펩티드의 신호 펩티드와 아미노산 둘 다를 암호화하는 부분) 및 엑손 3의 일부(N-말단 자루-줄기 영역의 아미노산을 암호화하는 부분)를 포함하는 비인간 C1q 유전자의 게놈 단편이다. 일부 구현예에서, 비인간 핵산 서열은, 엑손 1, 엑손 2, 및 N-말단 자루-줄기 영역의 아미노산을 암호화하는 엑손 3의 일부를 포함함으로써 비인간 C1q 유전자의 5' UTR을 포함하는 비인간 C1q 유전자의 게놈 단편이다.
- [0130] 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 엑손 3의 일부를 포함하는 인간 C1q 유전자의 게놈 단편이다. 인간 핵산 서열은, 암호화된 키메라 C1q 폴리펩티드가 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역 및 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하고 기능적 C1q 폴리펩티드가 되도록, 비인간 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0131] 일부 구현예에서, 인간 핵산 서열은 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하고 인간 C1q 유전자의 전체 3' UTR을 포함하는 엑손 3의 3' 부분을 포함하는 인간 C1q 유전자의 게놈 단편이다.
- [0132] 하나의 특정 양태에서, 키메라 비인간 C1q 단백질을 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 핵산은 키메라 C1qa, 키메라 C1qb, 및/또는 키메라 C1qc를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc를 암호화하는 서열(들) 중 하나 이상은 인간 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc를 암호화하는 서열(들) 중 하나 이상은 비인간(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류) 줄기 및/또는 자루를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc를 암호화하는 서열(들) 중 하나 이상은 비인간(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류) 콜라겐 삼중 나선 도메인을 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0133] 일부 구현예에서, 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 단리된 핵산은 제1, 제2 또는 제3 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 키메라 비인간 포유동물 C1q 단백질을 암호화하고, 제1 뉴클레오티드 서열은 키메라 비인간 포유동물 C1qa 폴리펩티드를 암호화하고, 제2 뉴클레오티드 서열은 키메라 비인간 포유동물 C1qb 폴리펩티드를 암호화하며, 제3 뉴클레오티드 서열은 키메라 비인간 포유동물 C1qc 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0134] 일 구현예에서, 개시된 단리된 핵산은 도 3a, 도 3b 및/또는 도 3c에 제시된 바와 같이 인간, 마우스 또는 랫트 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0135] 또한, 키메라 포유동물 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 포유동물 핵산 서열은 비인간 포유동물 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자의 엑손 1 및 2를 포함한다.
- [0136] 개시된 핵산은 번역될 세포에 통합되어 발현될 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 개시된 핵

산은 키메라 C1q 폴리펩티드의 발현을 위해 세포의 게놈 내로 클로닝될 수 있다. 따라서, 임의의 선행 양태의 하나 이상의 단리된 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 세포가 본원에 제공된다.

[0137] 용어 "세포(cell)"는 재조합 핵산 서열을 발현하는데 적합한 임의의 세포를 포함한다. 세포는 원핵 세포 및 진핵 세포(단일 세포 또는 다세포), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균, 바실러스 종, 스트렙토 마이세스 종의 균주 등), 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예를 들어, *S.cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들어, SF-9, SF-21, 배콜로바이러스에 감염된 곤충 세포, *Trichoplusia ni* 등), 비인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 세포 융합물, 예를 들어, 하이브리도마 또는 쿼드로마(quadroma)의 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트, 또는 마우스 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵세포이고, 다음의 세포로부터 선택된다: CHO(예를 들어, CHOK1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60(예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포로부터 유래한 세포주. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6TM 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 ES 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 수지상 세포, 섬유아세포, 상피 세포, 또는 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형된 비인간 동물을 생산하는데 사용된다. 추가로, 일부 상피 세포는, 하나 이상의 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 적어도 암호화하는 개시된 핵산 중 어느 하나를 포함하는 유전적으로 변형된 비인간 동물에 통합될 수 있고 이를 개발하는데 사용될 수 있으며, 상피 폴리펩티드를 발현할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 제공된 유전적으로 변형된 비인간 동물로부터 수득된다. 일부 이러한 구현예에서, 세포는 1차 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 대식 세포 또는 수지상 세포일 수 있다.

[0138] 당업자는, 유전자 코드의 퇴화로 인해, 본원에 기술된 인간화 C1q 단백질을 암호화하는 핵산 잔기 이외의 다른 핵산이 본 개시의 폴리펩티드를 암호화할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본원에 기술된 인간화 C1q 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하는 유전적으로 변형된 비인간 동물 이외에, 유전자 코드의 퇴화로 인해 본원에 기술된 것들과 상이한 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하는 비인간 동물이 또한 제공된다.

[0139] 단백질 C1q, 예를 들어 폴리펩티드 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc를 비롯하여 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc, 또는 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 제조하기 위한 본원에 개시된 핵산 중 어느 하나와 관련된 다양한 서열이 존재하며, 이들 모두는 핵산에 의해 암호화되거나 핵산이다. 이들 유전자의 인간 유사체를 비롯하여 다른 유사체, 및 이들 유전자의 대립유전자, 및 스플라이스 변이체 및 다른 유형의 변이체에 대한 서열은 Genbank를 포함하는 다양한 단백질 및 유전자 데이터베이스에서 이용 가능하다. 당업자는 서열 불일치 및 차이를 해결하는 방법, 및 특정 서열과 관련된 조성물 및 방법을 다른 관련 서열과 조절하는 방법을 이해한다.

[0140] E. 유전적으로 변형된 인간화 C1q 동물

[0141] 추가 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같은 키메라, 인간화 C1q 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 C1qa, C1qb 또는 C1qc)를 발현하는 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 제공된다. 이러한 비인간 동물은 인간화 C1q 폴리펩티드를 포함하는 인간화 C1q 복합체를 발현한다.

[0142] 일 양태에서, 본원에서 전술한 키메라 C1q 폴리펩티드, 예를 들어, 실질적으로 비인간(내인성)인 N-말단 자루-줄기 영역 및 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1q 폴리펩티드(C1qa, C1qb, 또는 C1qc)를 그의 게놈 내에 포함하는 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시된다.

[0143] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 동물은 본원에서 전술한 바와 같은 키메라 C1q 폴리펩티드(예를 들어, C1qa, C1qb 또는 C1qc 폴리펩티드)를 암호화하는 핵산 분자를 포함하며, 여기서 핵산 분자는 비인간(예를 들어, 내인성) 및 인간 핵산 서열을 포함한다.

[0144] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는, 핵산 분자가 기능적 C1q 폴리펩티드를 암호화하도록 서로 작동 가능하게 연결된 비인간(예를 들어, 내인성) C1q 핵산 서열 및 동족 인간 C1q 핵산 서열을 포함한다. 용어 "동족(cognate)"은 키메라 분자의 맥락에서, 상이한 기원의 키메라 분자 내 서열이 동일한 유전자에 상응함을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 마우스 또는 랫트 C1qa 서열은 인간 C1qa 서열에 연결되어 키메라 C1qa 분자를 형성하고, 마우스 또는 랫트 C1qb 서열은 인간 C1qb 서열에 연결되어 키메라

C1qb 분자를 형성하며, 마우스 또는 랫 C1qc 서열은 인간 C1qc 서열에 연결되어 키메라 C1qc 분자를 형성한다. 일부 구현예에서, 키메라 C1qc 폴리펩티드는 실질적으로 비인간인 N-말단 자루-줄기 영역 및 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함한다.

- [0145] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물의 게놈에서 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 비인간 C1q 핵산 서열(예를 들어, 내인성 비인간 C1q 핵산 서열) 및 인간 C1q 핵산 서열을 포함하며, 여기서 인간 C1q 핵산 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화한다.
- [0146] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물의 게놈에서 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 비인간(예를 들어, 내인성) C1q 핵산 서열 및 인간 C1q 핵산 서열을 포함하며, 여기서 비인간 C1q 핵산 서열은 비인간(예를 들어, 내인성) C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다.
- [0147] 일부 구현예에서, 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 비인간(예를 들어, 내인성) C1q 유전자의 프로모터 및/또는 인핸서(들)와 같은 5' 조절 요소(들)에 작동 가능하게 연결된다.
- [0148] 일부 구현예에서, 게놈에서 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 내인성 C1q 유전자좌 이외의 유전자좌에 존재한다.
- [0149] 일부 구현예에서, 게놈 내의 키메라 C1q 핵산 분자는 내인성 C1q 유전자좌에 존재한다. 일부 이러한 구현예에서, 게놈 내 키메라 C1q 핵산 분자는 내인성 C1q 유전자의 내인성 유전자좌에서 내인성 C1q 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 동족 인간 C1q 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 대체함으로써 생성될 수 있다.
- [0150] 일부 구현예에서, 내인성 C1q 유전자좌에 있는 비인간 C1q 유전자의 인접 인접 게놈 서열은 키메라 인간화 C1q 유전자를 형성하기 위해 동족 인간 C1q 유전자의 인접 게놈 서열과 치환된 것이다.
- [0151] 일부 구현예에서, 내인성 비인간 C1q 유전자에 삽입된 인간 C1q 유전자의 인접 게놈 서열은, 생성되는 키메라 인간화 C1q 유전자가 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하도록 인간 C1q 유전자의 엑손 3의 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 비인간 C1q 유전자에 삽입된 인간 C1q 유전자의 인접 게놈 서열은 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는 인간 C1q 유전자의 엑손 3의 일부를 포함한다.
- [0152] 일부 구현예에서, 인간화 후 내인성 유전자좌에 남아서 삽입된 인접 인간 C1q 게놈 서열에 작동 가능하게 연결되는 내인성 C1q 유전자의 게놈 서열은 엑손 2의 3' 부분 및 엑손 3의 5' 부분을 포함하며, 내인성 C1q 폴리펩티드의 N-말단 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화한다.
- [0153] 비인간 C1q 폴리펩티드 및 동족 인간 C1q 폴리펩티드가 자루-줄기 영역과 구형 헤드 도메인 사이의 접합부 근처에서 공통 아미노산을 공유하는 상황에서는, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 정확하게 암호화하는 인간 C1q 핵산을 삽입하는 것이 필요하지 않을 수 있다. 키메라 C1q 폴리펩티드가 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 실질적으로 또는 완전히 동일한 구형 헤드 도메인 및 비인간 C1q 폴리펩티드의 자루-줄기 영역과 실질적으로 또는 완전히 동일한 자루-줄기 영역을 포함하도록, 비인간 동물 C1q 폴리펩티드의 자루-줄기 영역을 실질적으로 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되고, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는 인간 C1q 유전자의 약간 길거나 짧은 핵산을 삽입하는 것이 가능하다. 유사하게, 비인간 C1q 폴리펩티드 및 인간 C1q 폴리펩티드가 구형 헤드 도메인의 C-말단 근처에서 공통 아미노산을 공유하는 상황에서는, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 정확하게 암호화하는 인간 C1q 핵산 서열을 이용하는 것이 필요하지 않을 수 있다. 키메라 C1q 폴리펩티드가 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인과 여전히 실질적으로 또는 완전히 동일한 구형 헤드 도메인을 포함하도록, 구형 헤드 도메인의 C-말단에 있는 나머지 아미노산을 암호화하는 비인간 핵산에 작동 가능하게 연결되고, 인간 C1q 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 실질적으로 암호화하는 (즉, 이보다 약간 더 짧은) 인간 C1q 유전자의 약간 더 짧은 핵산을 삽입하는 것이 가능하다.
- [0154] 일부 구현예에서, 인간화 키메라 C1q 유전자에 포함된 인간 C1q 뉴클레오타이드 서열은 모든 C1q 유전자(즉, C1qa, C1qb 및 C1qc 유전자)에서 엑손 3의 마지막 부분인 인간 C1q 유전자의 3' 비번역 영역("UTR")을 또한 포함한다. 특정 구현예에서, 인간 C1q 유전자의 3' UTR 이외에, 인간 C1q 유전자좌 유래의 추가 인간 게놈 서열이 포함될 수도 있다. 추가의 인간 게놈 서열은 인간 C1q 유전자의 3' UTR의 바로 하류에 있는 인간 C1q 유전자좌에서 발견되는 적어도 10~200 bp, 예컨대 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp, 150 bp, 175 bp, 200 bp 또는 그 이상으로 이루어질 수 있다. 다른 구현예에서, 인간화 C1q 유전자에 포함된 인간 C1q 뉴클레오타이드 서열은 인간 C1q 유전자의 3' UTR을 포함하지 않으며; 대신에, 내인성 C1q 유전자의 3' UTR이 포함되어 인간화 C1q 유전자의

정지 코돈의 바로 뒤에 위치한다.

- [0155] 일부 구현예에서, 인간화 키메라 C1q 유전자에 포함된 내인성 비인간 C1q 핵산 서열(예를 들어, 인간화 후 내인성 유전자좌에 남아있는 내인성 게놈 C1q 서열)은 내인성 C1q 유전자의 5' UTR을 포함한다(엑손 1을 포함할 수 있고 대부분의 경우에 엑손 2의 5' 부분을 포함할 수 있음). 일부 구현예에서, 인간화 키메라 C1q 유전자에 포함된 내인성 비인간 C1q 뉴클레오타이드 서열은 내인성 C1q 폴리펩티드의 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 엑손 2의 5' 부분)을 또한 포함한다.
- [0156] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 비인간 동물은 그의 게놈에 있는 인간화 C1q 유전자에 대해 이형접합체이다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 비인간 동물은 그의 게놈에 있는 인간화 C1q 유전자에 대해 동형접합체이다.
- [0157] 특정 구현예에서, 비인간 동물은, 각각 내인성 C1q 유전자좌에 있거나 상이한 유전자좌에 있는 다수의, 즉 2개 이상의 키메라 C1q 유전자를 그의 게놈에 포함한다. 일부 구현예에서, 다수의 키메라 C1q 유전자는 비내인성 C1q 유전자좌에 있는 인접 핵산 단편 상에 존재한다. 일부 구현예에서, 다수의 키메라 C1q 유전자는 각각 그의 내인성 C1q 유전자좌에 존재한다. 예를 들어, 비인간 동물의 2개 또는 3개의 내인성 C1q 유전자(C1qa, C1qb 및 C1qc)는 동족 인간 C1q 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 인간화된 것이다.
- [0158] 다양한 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 키메라 비인간/인간 C1q 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드(들)를 발현한다. 따라서, 유전적으로 변형된 비인간 동물이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물은 하나 이상의 키메라 비인간/인간 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 발현한다. 이러한 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 키메라 비인간/인간 C1qa 폴리펩티드, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 키메라 비인간/인간 C1qb 폴리펩티드, 및/또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 키메라 비인간/인간 C1qc 폴리펩티드를 발현할 수 있다. 다양한 구현예에서, 발현된 키메라 C1q 폴리펩티드는 기능적 C1q 폴리펩티드이다. 다양한 구현예에서, 본원에서 제공되는 C1q 폴리펩티드는 전형적인 C1q 부케 구조로 배열되어 18개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 기능적 C1q 단백질을 형성한다.
- [0159] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 기능적 내인성 C1q 폴리펩티드(예: 내인성 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드)를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 기능적 내인성 C1qa 폴리펩티드, 기능적 내인성 C1qb 폴리펩티드, 또는 기능적 내인성 C1qc 폴리펩티드를 발현하지 않는다. 기능적 내인성 C1q 폴리펩티드(들)의 발현 결여는 내인성 C1q 유전자(들)의 불활성화, 결실 및/또는 인간화의 결과일 수 있다.
- [0160] 일부 양태에서, 비인간 동물은 인간 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인을 포함하는 하나 이상의 키메라 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 발현한다. 일부 양태에서, 비인간 동물은 서열번호 4에 제시된 인간 C1qa의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편(예를 들어, 서열번호 4에 제시된 바와 같은 아미노산 112~245, 122~235 또는 122~222)을 포함하는 키메라 C1qa 폴리펩티드를 발현한다. 일부 양태에서, 비인간 동물은 서열번호 5에 제시된 인간 C1qb의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편(예를 들어, 서열번호 5에 제시된 바와 같은 아미노산 118~251, 120~251 또는 125~233)을 포함하는 키메라 C1qb 폴리펩티드를 발현한다. 일부 양태에서, 비인간 동물은 서열번호 6에 제시된 인간 C1qc의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편(예를 들어, 서열번호 6에 제시된 바와 같은 아미노산 118~234 또는 아미노산 114~245)을 포함하는 키메라 C1qc 폴리펩티드를 발현한다. 일부 양태에서, 비인간 동물은 서열번호 10 또는 55에 제시된 바와 같은 키메라 C1qa, 서열번호 11 또는 56에 제시된 바와 같은 C1qb, 및/또는 서열번호 12 또는 57에 제시된 바와 같은 C1qc 폴리펩티드를 발현한다.
- [0161] 일 양태에서, 개시된 유전적으로 변형된 비인간 동물은 비인간 아미노산 서열 및 인간 아미노산 서열을 포함하는 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 추가로, 키메라 C1q의 구형 헤드 도메인의 전부 또는 일부는 인간 아미노산 서열을 구성하는 것으로 이해된다. 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 4에 제시된 것과 같은 인간 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 122~222를 암호화한다(예를 들어, 서열 번호 4에 제시된 것과 같은 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 122~235 또는 112~245를 암호화하는 핵산 서열). 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하되, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7에 제시된 랫트 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 암호화하거나; 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 인간 C1qa 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하되, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1에 제시된 마

우스 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~102, 30~102, 25~105, 23~107 또는 23~111을 암호화한다. 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 서열번호 10 또는 서열번호 55에 제시된 C1qa 폴리펩티드의 적어도 아미노산 23~245를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물은 서열번호 10 또는 서열번호 55에 제시된 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 서열번호 10에 제시된 것과 같은 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 서열번호 55에 제시된 것과 같은 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0162] 또 다른 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 5에 제시된 것과 같은 인간 C1qb 폴리펩티드의 적어도 아미노산 125~233을 암호화한다(예를 들어, 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 120~250 또는 118~251을 암호화하는 핵산 서열).

[0163] 또한, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 8에 제시된 랫트 C1qb 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114 또는 26~117을 암호화하거나; 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 인간 C1qb 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2에 제시된 마우스 C1qb 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~105, 27~105, 27~110, 26~114 또는 26~117을 암호화한다.

[0164] 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 서열번호 11 또는 서열번호 56에 명시된 C1qb 폴리펩티드의 적어도 아미노산 26~251을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물은 서열번호 11 또는 서열번호 56에 제시된 것과 같은 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 서열번호 11에 제시된 것과 같은 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 서열번호 56에 제시된 것과 같은 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0165] 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)은 핵산을 포함하며, 여기서 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 6에 제시된 것과 같은 인간 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 118~234를 암호화한다(예를 들어, 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 핵산 서열).

[0166] 또한, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 9에 제시된 랫트 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 33~113, 32~115, 또는 32~116을 암호화하거나; 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 인간 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3에 제시된 마우스 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 31~111, 30~113, 또는 30~114를 암호화한다.

[0167] 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 서열번호 12에 제시된 것과 같은 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 30~246을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열 또는 서열번호 57에 제시된 것과 같은 C1qc 폴리펩티드의 적어도 아미노산 32~248을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물은 서열번호 12 또는 서열번호 57에 제시된 것과 같은 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이며, 서열번호 12에 제시된 것과 같은 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이며, 서열번호 57에 제시된 것과 같은 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0168] 일부 양태에서, 신호 서열이 존재하는 것이 폴리펩티드의 발현에 유리하다. 개시된 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드를 암호화하는 개시된 핵산은 신호 서열을 포함하거나 신호 서열이 없을 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 유

전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물은 추가로 랫트, 마우스 또는 인간 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 작동 가능하게 연결된 상태로 포함한다. 랫트, 마우스 및 인간 C1qa, C1qb, 및 C1qc 폴리펩티드 유래의 신호 펩티드의 예는 도 3a~3c에 도시되어 있다. 예를 들어, 랫트 또는 마우스 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 유전자의 신호 펩티드-암호화 부분을 포함하는 핵산 서열을 작동 가능하게 연결된 상태로 포함하되, 적어도 상기 핵산 서열은 인간 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드의 구형 헤드 도메인 또는 이의 단편을 각각 암호화하는, 비인간 동물이 본원에 개시된다.

[0169] 일 구현예에서, 다음을 포함하는 계놈을 가진 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시된다: a) 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 7의 랫트 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1~111을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112~245를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; b) 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 8의 랫트 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1~117을 암호화하는 제3 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118~251을 암호화하는 제4 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제3 및 제4 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; 및 c) 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 랫트/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 9의 랫트 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1~116을 암호화하는 제5 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 제6 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제5 및 제6 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열. 일 구현예에서, 이러한 유전적으로 변형된 비인간 동물은 랫트이다.

[0170] 또한, 다음을 포함하는 계놈을 가진 유전적으로 변형된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)이 본원에 개시된다: a) 내인성 C1qa 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 1의 마우스 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 1~111을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 4의 인간 C1qa 폴리펩티드의 아미노산 112~245를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; b) 내인성 C1qb 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 2의 마우스 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 1~117을 암호화하는 제3 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 5의 인간 C1qb 폴리펩티드의 아미노산 118~251을 암호화하는 제4 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제3 및 제4 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열; 및 c) 내인성 C1qc 유전자좌에서 키메라 마우스/인간 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 3의 마우스 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 1~114를 암호화하는 제5 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 6의 인간 C1qc 폴리펩티드의 아미노산 114~245를 암호화하는 제6 뉴클레오타이드 서열을 5'에서 3' 방향으로 포함하고, 제5 및 제6 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되는, 핵산 서열. 일 구현예에서, 이러한 유전적으로 변형된 비인간 동물은 마우스이다.

[0171] 일 양태에서, 유전적으로 변형된 비인간 동물이 본원에 개시되며, 여기서 비인간 동물, 예를 들어, 랫트 또는 마우스는 기능적 내인성 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드를 발현하지 않는다.

[0172] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 포유동물이다. 일 양태에서, 비인간 동물은, 예를 들어, 뛰는 쥐상과(Dipodoidea 또는 Muroidea) 아목의 작은 포유동물이다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물은 설치류이다. 일 구현예에서, 설치류는 마우스, 랫트 및 햄스터로부터 선택된다. 일 구현예에서, 설치류는 쥐상과 아목으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물은 칼로미스쿠스과(Calomyscidae)(예를 들어, 마우스와 같은 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예: 햄스터, 미국 랫트 및 마우스, 들쥐), 쥐과(Muridae)(진짜 마우스 및 랫트, 사막쥐, 가시쥐, 갈기쥐), 네소미스과(Nesomyidae)(클라이밍 마우스, 락 마우스(rock mice), 흰꼬리 랫트, 말라가시 랫트 및 마우스), 가시겨울잠쥐과(Platacanthomyidae)(예: 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예: 두더쥐, 대나무쥐, 및 동북)로부터 선택된 과(family)로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 유전적으로 변형된 설치류는 진짜 마우스 또는 랫트(쥐상과), 사막쥐(gerbil), 가시쥐(spiny 마우스), 갈기쥐(crested rat)로부터 선택된다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 쥐상과의 구성원으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 동물은 설치류이다. 일 구현예에서, 설치류는 마우스 및 랫트로부터 선택된다. 일 구현예에서, 비인간 동물은 마우스이다.

[0173] 일 구현예에서, 비인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/Ola로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이

다. 또 다른 구현예에서, 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예를 들어, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 계통으로 이루어진 군으로부터 선택된 129 계통이다(예를 들어, Festing 등의 (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836 및 Auerbach 등의 (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines 참조). 구체적인 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 마우스는 전술한 129 계통 및 전술한 C57BL/6 계통의 혼합체이다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 마우스는 전술한 129 계통의 혼합체, 또는 전술한 BL/6 계통의 혼합체이다. 구체적인 일 구현예에서, 혼합체의 129 계통은 129S6(129/SvEvTac) 계통이다. 또 다른 구현예에서, 마우스는 BALB 계통, 예를 들어, BALB/c 계통이다. 또 다른 구현예에서, 마우스는 BALB 계통 및 전술한 다른 계통의 혼합체이다.

[0174] 일 구현예에서, 비인간 동물은 랫트이다. 일 구현예에서, 랫트는 위스타 랫트(Wistar rat), LEA 계통, 스프래그 다울리(Sprague Dawley) 계통, 피셔(Fischer) 계통, F344, F6, 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 일 구현예에서, 랫트 계통은 위스타, LEA, 스프래그 다울리, 피셔, F344, F6, 및 아크 아구티로 이루어진 군으로부터 선택된 2가지 이상 계통의 혼합체이다.

[0175] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 유전적으로 조작된 동물은 그의 혈청에서 하나 이상의 키메라 C1q 폴리펩티드를 포함하는 인간화 C1q 단백질을 발현한다. 특정 구현예에서, 동물은 그의 혈청에서 키메라 C1qa, C1qb 및 C1qc 폴리펩티드로 구성된 C1q 단백질을 발현하며, 이들 각각은 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물의 혈청 내 인간화 C1q 단백질의 수준은, 웨스턴 블롯 또는 ELISA와 같은 종래의 분석법 중 어느 하나에 의해 검출했을 때, 인간화되지 않은 대조군 동물 내 C1q 단백질의 수준과 비슷하다. "비슷한(comparable)"이란, 예를 들어, 10%, 20%, 30%, 또는 40%의 편차 이내인 수준 및 값을 지칭하는 의미를 갖는다.

[0176] 일부 구현예에서, 혈청에서 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전적으로 조작된 동물은 보체 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 보체 활성은 하기 실시예에서 추가로 예시된 바와 같은 고전적인 용혈 분석으로 검출할 수 있다. 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 그의 혈청에서 인간화되지 않은 대조군 동물에서의 수준과 비슷한 수준으로 고전적인 용혈 활성을 나타낸다. 다른 구현예에서, 보체 활성은 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석으로 시험관 내에서 검출할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간화 C1q 단백질을 포함하는 유전적으로 조작된 동물의 혈청은 정상 인간 혈청의 것과 비슷한 수준으로 CDC 활성을 나타낸다.

[0177] 다른 양태에서, 본원에 기술된 유전적으로 변형된 비인간 동물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다.

[0178] 일부 구현예에서, 상기 방법은 변형된 게놈이 인간화 C1q 폴리펩티드(즉, 인간화 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드)를 암호화하는 핵산 분자를 포함하도록 비인간 동물의 게놈을 변형시키는 단계를 포함한다.

[0179] 일부 구현예에서, 변형된 게놈은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 내인성 C1q 유전자좌와 상이한 유전자좌에 위치한다. 특정 구현예에서, 상이한 인간화 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 다수의 핵산 분자를 포함하는 인접 핵산 단편은 내인성 C1q 유전자좌와 상이한 유전자좌에 위치한다. 예를 들어, 인간화 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 인간화 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 인간화 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인접 핵산 단편은 내인성 C1q 유전자좌와 상이한 유전자좌에 위치한다.

[0180] 일부 구현예에서, 변형된 게놈은 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 내인성 C1q 유전자좌에 위치한다. 특정 구현예에서, 인간화 C1qa 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 인간화 C1qb 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 인간화 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인접 핵산 단편은 내인성 C1q 유전자좌에 위치한다.

[0181] 키메라 C1q 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 내인성 C1q 유전자좌로 도입하기 위해 변형시키는 경우, 일부 구현예에서, 내인성 C1q 뉴클레오타이드 서열이 인간 C1q 뉴클레오타이드 서열로 치환된다. 일 구현예에서, 치환은 C1qa, C1qb, 및 C1qc의 서열의 치환을 포함한다.

[0182] 인간화는 유전적 변형, 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 C1q 유전자좌에서의 유전적 변형을 통합하는 큰 표적화 벡터를 생성한 다음, 큰 표적화 벡터를 비인간(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류) ES 세포에 도입하여, 예를 들어 실시예 1에 기술된 바와 같은 마우스 또는 예를 들어 실시예 2에 기술된 바와 같은 랫트와 같은 비인간 동물을 만드는 것에 의해 달성될 수 있다.

[0183] 따라서, 일 구현예에서, 본 개시의 유전적으로 변형된 동물을 만들기 위한 큰 표적화 벡터가 본원에서

제공된다. 예시적인 구현예에서, 큰 표적화 벡터는 5' 및 3' 마우스 상동성 아암; 마우스 C1qa 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qa 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qa 유전자를 포함하는 DNA 단편; 마우스 C1qb 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qb 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qb 유전자를 포함하는 DNA 단편; 마우스 C1qc 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qc 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qc 유전자를 포함하는 DNA 단편; 및 선택 카세트를 포함한다. 예시적인 구현예에서, 큰 표적화 벡터는 5' 및 3' 랫트 상동성 아암; 랫트 C1qa 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qa 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qa 유전자를 포함하는 DNA 단편; 랫트 C1qb 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qb 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qb 유전자를 포함하는 DNA 단편; 랫트 C1qc 코딩 엑손 3의 부분 서열과 인간 C1qc 코딩 엑손 3의 부분 서열과의 치환을 포함하는 C1qc 유전자를 포함하는 DNA 단편; 및 선택 카세트를 포함한다.

[0184] 일부 구현예에서, 큰 표적화 벡터는 유전적으로 변형된 박테리아 인공 염색체(BAC) 클론이다. 비인간(예: 설치류) C1qa, C1qb 및 C1qc 유전자 중 하나 이상을 갖는 BAC 클론은 박테리아 상동성 재조합 및 VELOCIGENE® 기술을 사용해 변형되고 인간화될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 등의 (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659 참조). BAC 클론이 둘 이상의 비인간 C1q 유전자(예를 들어, 비인간 C1qa, C1qb 및 C1qc 유전자의 조합)를 포함하는 구현예에서, 다수의 비인간 C1q 유전자는 연속 박테리아 상동성 재조합을 통해 순차적으로 변형될 수 있다. 그 결과, 비인간 C1q 뉴클레오타이드 서열이 원 BAC 클론으로부터 결실되고, 인간 C1q 뉴클레오타이드 서열이 삽입되어, 하나 이상의 인간화 C1q 유전자를 갖고, 5' 및 3' 비인간 상동성 아암이 측면에 위치하는 변형된 BAC 클론이 생성되었다.

[0185] 선택 카세트는 표적 작제물 내에 삽입된 뉴클레오타이드 서열로서, 관심 작제물이 통합된 세포(예를 들어, 박테리아 세포, ES 세포)의 선택을 용이하게 한다. 다수의 적절한 선택 카세트가 당업계에 공지되어 있다(Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC 등). 또한, 선택 카세트의 측면에는 재조합 부위가 위치할 수 있는데, 이는 재조합 효소(recombinase enzyme)로 치료할 때 선택 카세트가 결실되도록 한다. 흔히 사용되는 재조합 부위는 Cre 및 Flp 효소에 의해 각각 인식되는 loxP 및 Frt이지만, 다른 것들도 당업계에 공지되어 있다. 선택 카세트는 작제물 내에서 코딩 영역 밖의 어디든지 위치할 수 있다. 일 구현예에서, 선택 카세트는 삽입된 인간 C1qa 서열의 상류에 삽입된다.

[0186] 변형된 BAC 클론과 같은 큰 표적화 벡터는 전기천공과 같은 알려진 기술에 의해 비인간(예: 설치류) 배아 줄기(ES) 세포에 도입될 수 있다. 마우스 ES 세포와 랫트 ES 세포 모두는 당업계에 기술되어 있다. 참조: 예를 들어, 미국 특허 제7,576,259호, 제7,659,442호, 제7,294,754호, 및 미국 특허 공개 제2008-0078000 A1호(이들 모두는 본원에 참조로서 통합됨)는 마우스 ES 세포, 및 유전적으로 변형된 마우스를 만드는 VELOCIMOUSE® 방법을 기술하고 있고; 미국 특허 공개 제2014/0235933 A1호, 제2014/0310828 A1호, Tong 등의 (2010) *Nature* 467:211-215, 및 Tong 등의 (2011) *Nat Protoc.* 6(6): doi:10.1038/nprot.2011.338(이들 모두는 본원에 참조로서 통합됨)은 랫트 ES 세포, 및 유전적으로 변형된 랫트를 만드는 방법을 기술하고 있다. 일부 구현예에서, 변형된 BAC 클론이 도입될 수용자 ES 세포는 내인성 C1q 유전자좌에서 뉴클레오타이드 서열의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 결실은 C1qa, C1qb 및 C1qc 유전자 중 하나 이상의 코딩 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 결실은 C1qa, C1qb 및 C1qc 유전자 모두의 코딩 영역을 포함하는데; 이는, 예를 들어 C1qa의 시작 코돈에서 C1qb의 정지 코돈까지를 포함하는 결실이다. 일부 구현예에서, 수용자 ES 세포는 내인성 C1q 유전자좌에서 결실에 대해 이형접합체이다. 다른 구현예에서, 수용자 ES 세포는 내인성 C1q 유전자좌에서의 결실에 대해 동형접합체이다.

[0187] 유전자 표적화가 완료되면, ES 세포 또는 유전적으로 변형된 비인간 동물을 스크리닝하여 관심 외인성 뉴클레오타이드 서열의 통합 또는 외인성 폴리펩티드의 발현이 성공적인지를 확인한다. 많은 기술이 당업자에게 공지되어 있고, 이에에는 서던 블롯팅, 장 PCR(long PCR), 정량적 PCR(예를 들어, TAQMAN®을 사용한 실시간 PCR), 형광 인시튜 혼성화, 노던 블롯팅, 유세포 계측법, 웨스턴 분석, 면역 세포 화학, 면역 조직 화학, 등이 포함되지만 이들로 한정되지는 않는다. 일 예에서, 관심 유전적 변형을 가진 비인간 동물(예를 들어, 마우스)은 Valenzuela 등의 문헌[(2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659 참조]에 기술된 대립유전자 분석법의 변형을 사용해 마우스 대립유전자의 상실 및/또는 인간 대립유전자의 획득에 대해 스크리닝함으로써 식별될 수 있다. 유전적으로 변형된 동물에서 특이적 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 식별하는 다른 분석법은 당업자에게 공지되어 있다. 그런 다음, 선택된 ES 세포는 VELOCIMOUSE 방법(예: 미국 특허 번호 제7,576,259호, 제7,659,442호, 제

7,294,754호, 및 미국 특허 공개번호 제2008-0078000 A1호 참조), 또는 미국 특허 공개번호 제2014/0235933 A1호 및 제2014/0310828 A1호에 기술된 방법을 사용함으로써 상실배 전시기(pre-morula stage)의 배아(예: 8 세포 배아)에 주입하기 위한 공여자 ES 세포로서 사용된다. 공여자 ES 세포를 포함하는 배아는 배반포기까지 인큐베이션된 다음, F0 설치류를 생산하기 위해 대리모에게 이식된다. 인간화 C1q 유전자를 가진 새끼는 비인간 대립유전자의 상실 및/또는 인간 대립유전자의 획득 분석을 사용해, 꼬리 단편(tail snips)으로부터 단리한 DNA의 유전자형 분석에 의해 식별할 수 있다. 인간화 C1q 유전자에 대해 이형접합체인 비인간 동물을 생성된 동형접합체 새끼들과 교배시킬 수 있다.

[0188] 일 양태에서, 키메라 인간/비인간 C1q 분자를 만드는 방법이 제공되며, 상기 방법은 단일 세포에서 본원에 기술된 바와 같은 뉴클레오티드 작제물 유래의 키메라 C1q 단백질을 발현시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 뉴클레오티드 작제물은 바이러스 벡터이고; 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들어, PERC.6TM 세포)로부터 선택된다.

[0189] 일 양태에서, 키메라 인간/비인간 C1q 단백질을 발현하는 세포가 제공된다. 일 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 C1q 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 일 구현예에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들어, PERC.6TM 세포)로부터 선택된다.

[0190] 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물에 의해 만들어진 키메라 C1q 분자가 또한 제공되며, 여기서 키메라 C1q 분자는, 일 구현예에서, 인간 C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc 폴리펩티드의 전부 또는 실질적으로 전부의 아미노산 서열, 및 비인간 C1q 단백질, 예를 들어, 마우스 C1q 단백질 유래의 적어도 줄기 및/또는 자루 도메인을 포함한다.

[0191] 유전적으로 조작된 비인간 동물에 추가하여, 비인간 배아(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류 배아)가 또한 제공되며, 여기서 배아는 상기 본원에 개시된 바와 같이 만들어지거나 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)로부터 유래된 공여자 ES 세포를 포함한다. 일 양태에서, 배아는 키메라 C1q 유전자, 및 숙주 배아 세포를 포함하는 ES 공여자 세포를 포함한다.

[0192] 조직(tissue)이 또한 제공되며, 여기서 조직은 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)로부터 유래되고 키메라 C1q 단백질을 발현한다. 일부 구현예에서, 조직은 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 비장, 림프절, 뇌, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0193] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물로부터 단리한 비인간 세포가 제공된다. 일 구현예에서, 세포는 ES 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 수지상 세포이다.

[0194] F. 인간 치료제를 시험하기 위한 설치류 모델

[0195] C1q 분자는 인간 C1q에 결합하는 하나의 아암과 관심 항원에 결합하는 다른 하나의 아암을 갖는 이중 특이적 제제, 예를 들어, 이중 특이적 항체의 표적으로서 연구되고 있다.

[0196] 전임상 약물 개발 단계 동안, 후보 제제는 일반적으로 이들의 효능, 독성, 및 기타 약동학적 및 약력학적 특성에 기초하여 연구된다. 항체와 같은 후보 제제는 일반적으로 인간 항원을 표적으로 하는데, 이는 인간 치료제를 개발하는 것이 조사의 최종 목표이기 때문이다. 많은 전임상 연구가 영장류와 같은 대형 동물에서 수행되는데, 이는 이들의 생리와 약물 대사가 인간과 가장 유사하기 때문이다. 약물 후보물질의 효능, 독성 및 다른 파라미터와 관련된 효과적인 전임상 조사를 실시하기 위해서는, 먼저 약물 후보물질이 영장류 C1q 분자를 인식하도록 결정되어야 한다.

[0197] 그러나, 항-C1q 치료제의 개발을 복잡하게 만드는 별도의 인자는, 침팬지와 같은 대형 영장류가 멸종위기에 있고, 많은 나라에서 침팬지를 이용한 연구가 금지되는 한 편; 다른 영장류, 예를 들어, 시노물구스 원숭이(*Macaca fascicularis*)를 이용한 연구는 윤리적 문제를 제기할 수 있다는 것이다. 따라서, 설치류(예: 마우스)와 같은 더 작은 동물 모델에서 수득할 수 있는 특정 치료제 후보물질에 대한 임의의 예비 데이터가 대형 영장류에서 전임상 조사의 추가 진행을 결정하는 데 도움이 될 수 있다.

[0198] 예비 연구를 수행하기에 가장 유용한 소형 동물 모델은, 인간 또는 인간화 C1q 단백질을 발현하고, 예를 들어, 종양 항원, 바이러스 항원, 또는 세균 항원(예를 들어, 스태필로코커스 항원)을 또한 표적으로 하는 항-C1q 약물 후보물질의 시험을 가능하게 하는 비인간 동물, 예를 들어, 설치류이다.

- [0199] 따라서, 일부 양태에서, C1q-표적화("항-C1q") 치료제를 시험하기 위한 설치류 모델(예를 들어, 마우스 또는 랫트 모델)이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항원 결합 단백질을 시험하기 위한 설치류 모델(예를 들어, 마우스 또는 랫트 모델)이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체를 시험하기 위한 설치류 모델(예를 들어, 마우스 또는 랫트 모델)이 본원에 제공된다. 일부 이러한 구현예에서, 항-C1q 다중 특이적(예: 이중 특이적) 항원 결합 단백질 또는 항-C1q 이중 특이적 항체를 시험하기 위한 설치류 모델이 제공된다. 이와 같이, 항-C1q 다중 특이적 항원 결합 단백질, 예를 들어 항-C1q 이중 특이적 항원 결합 단백질은 상기 인간화 C1q 폴리펩티드 또는 인간화 C1q 복합체 및 적어도 하나의 다른 관심 항원에 특이적으로 결합하거나 이를 표적으로 한다. 다양한 양태에서, 인간화 C1q 복합체(복합체의 C1qa, C1qb 및/또는 C1qc 폴리펩티드 중 하나 이상은 인간화됨) 및 관심 항원 둘 다에 결합할 수 있는 항-C1q 이중 특이적 항원 결합 단백질을 시험하기 위한 설치류 모델은 인간화 C1q 복합체를 암호화하는 핵산 서열(여기서 인간화 C1q 폴리펩티드는 C1qa, C1qb, C1qc, 및/또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택됨) 및 관심 항원을 발현하거나 포함하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 설치류는 상기 인간화 C1q 단백질(들)을 발현하는 수지상 세포를 포함한다.
- [0200] 면역글로불린 핵산 서열을 참조할 때의 용어 "생식계열(germline)"은 자손에게 전해질 수 있는 핵산 서열을 포함한다.
- [0201] 문구 "면역글로불린 분자(immunoglobulin molecule)"는 2개의 면역글로불린 중쇄 및 2개의 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 중쇄는 동일하거나 상이할 수 있고, 경쇄는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0202] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항원 결합 단백질(antigen-binding protein)"은 관심 항원에 결합할 수 있는 항체 및 다양한 자연적으로 생산된 분자 및 조작된 분자를 포함한다. 이러한 것들은, 예를 들어, 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체(예: 낙타류 및 어류로부터 유래된 항체), 도메인-결합 항체, 키메라 항체, CDR-이식 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예: 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈식 면역 약제(SMIP), 상어 가변 IgNAR 도메인, T 세포 수용체 가변 도메인 및 이의 단편을 포함하는 T 세포 수용체 분자(들) 등을 포함한다. 항원 결합 단백질은 또한 항원 결합 단편, 예컨대, (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 추가 가변 영역(예를 들어, CDR3 펩티드와 같은 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위 등을 포함할 수 있다.
- [0203] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체(antibody)"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 영역(C_H).을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 영역(C_L).을 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 보다 보존적인 영역이 사이 사이에 배치되는 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 추가변성 영역으로 다시 나뉘질 수 있다. 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단 방향으로 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로서 약칭될 수 있고; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로서 약칭될 수 있음).
- [0204] 본원에서 사용되는 바와 같이, "C1q에 결합하는 항체" 또는 "항-C1q 항체"는 단일 C1q 서브유닛(예를 들어, C1qa, C1qb, 및/또는 C1qc)을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 비롯하여, 2개의 C1q 서브유닛으로 이루어진 이량체 복합체(예를 들어, C1qa/C1qb, 및 C1qc/C1qc 이량체)를 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 항체 및 항원 결합 단편은 또한 가용성 C1q 및/또는 IgM 또는 IgG 결합 C1q에 결합할 수 있다.
- [0205] 용어 "고 친화도(high affinity)" 항체 또는 항원 결합 단백질은, 이의 표적 에피토프에 대해 약 10⁻⁹ M 이하(예: 약 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹⁰ M, 1x10⁻¹¹ M, 또는 약 1x10⁻¹² M)의 K_D를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0206] "이중특이적 항체" 또는 "이중 특이적 항원 결합 단백질"이라는 어구는 2개의 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 항체 또는 항원 결합 단백질을 포함한다. 이중특이적 항체는, 2개의 상이한 분자 상의 상이한 에피토프(예: 2개의 상이한 면역원 상의 상이한 에피토프) 또는 동일한 분자 상의 에피토프(예: 동일한 면역원 상의 상이한 에피토프)에 각각 결합하는 2개의 아암(예: 상이한 특이성을 갖는 2개의 중쇄)을 포함한다. 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단백질이 2개의 상이한 에피토프(제1 에피토프 및 제2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있는 경우, 제1 에피토프에 대한 제1 항체 아암의 친화도는 일반적으로 제2 에피토프에 대한 제1 항체 아암의 친화도보다 적어도 10배 내지 100배 또는 1,000배 또는 10,000배 또는 그 이상 낮아지거나 그 반대가 될

것이다. 이중특이적 항체가 특이적으로 결합된 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에(예를 들어, 동일하거나 상이한 단백질 상에) 존재할 수 있다. 예시적인 이중특이적 항체는 C1q에 특이적인 제1 항체 아암, 및 관심 항원(예를 들어, 감염원의 항원)에 특이적인 제2 항체 아암을 갖는 것들을 포함한다. 예를 들어, 동일한 면역원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄를 조합함으로써, 이중특이적 항체를 만들 수 있다. 예를 들어, 동일한 면역원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열은 동일하거나 상이한 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열에 융합될 수 있으며, 이러한 서열들은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 일반적인 이중특이적 항체는 2개의 중쇄를 갖는데, 이들 각각은 3개월 중쇄 CDR, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 이어지는 C_H1 도메인, 힌지, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인, 및 면역 글로불린 경쇄를 갖는데, 상기 면역 글로불린 경쇄는 에피토프 결합 특이성을 부여하지 않지만 각각의 중쇄와 결합할 수 있거나; 각각의 중쇄와 결합하면서 중쇄 에피토프 결합 영역에 의해 결합된 에피토프 중 하나 이상과 결합할 수 있거나; 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄 중 하나 또는 둘 다를 에피토프 중 하나 또는 둘 다에 결합시킬 수 있다. 유사하게, 문구 "다중특이적 항체"는 다수의 에피토프(예를 들어, 2개, 3개, 4개의 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다.

[0207] 문구 "상보성 결정 영역", 또는 용어 "CDR"은 면역 글로불린 분자의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내 2개의 프레임워크 영역 사이에서 흔히 (즉, 야생형 동물에서) 나타나는, 유기체의 면역 글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함한다. CDR은 예를 들어, 생식계열 서열 또는 재배열되거나 재배열되지 않은 서열에 의해 암호화될 수 있으며, 예를 들어, 미처리 B 세포 또는 성숙한 B 세포에 의해 암호화될 수 있다. CDR은 체세포 돌연변이되거나 (예를 들어, 동물의 생식 계열에서의 암호화된 서열에 따라 달라짐), 인간화되고/되거나 아미노산 치환, 부가, 또는 결실에 의해 변형될 수 있다. 일부 경우에(예: CDR3의 경우), CDR은, (예컨대, 재배열되지 않은 핵산 서열에서는) 서로 인접하지 않지만 B 세포 핵산 서열 내에서는 인접하는 2개 이상의 서열(예: 생식계열 서열)에 의해, 예를 들어 서열의 접합 또는 연결(예를 들어, 중쇄 CDR3을 형성하기 위한 V-D-J 재조합)의 결과로서 암호화될 수 있다.

[0208] 문구 "기능적 단편"은 발현되고, 분비되고, 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위의 K_D로 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질의 단편, 예컨대 항체를 포함한다. 특이적으로 인식하는 것은, 적어도 마이크로몰 범위, 나노몰 범위, 또는 피코몰 범위의 K_D를 갖는 것을 포함한다.

[0209] "면역글로불린 중쇄"에서와 같은 "중쇄"라는 문구는 임의의 유기체 유래의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 서열을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 달리 명시되지 않는 한, 3개의 중쇄 CDR 및 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편에는 CDR, CDR 및 FR 및 이들의 조합이 포함된다. 일반적인 중쇄는, 가변 도메인에 이어서 (N-말단에서 C-말단 방향으로) C_H1 도메인, 힌지, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능적 단편은 에피토프를 특이적으로 인식할 수 있고 (예, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D로 에피토프를 인식함), 세포로부터 발현 및 분비가 가능하고, 적어도 하나의 CDR을 포함하는 단편을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은, 생식선에 존재하는 V_H, D_H 및 J_H 분절의 레파토리로부터 유래한 V_H, D_H 및 J_H 분절을 일반적으로 포함하는 가변 영역 유전자 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V, D 및 J 중쇄 분절에 대한 서열, 위치 및 명명법은 국제 면역유전학 정보 시스템의 웹사이트(IMG T 데이터베이스)에서 확인할 수 있다.

[0210] "면역글로불린 경쇄"에서와 같은 "경쇄"라는 문구는 임의의 유기체 유래의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 인간 카파(kappa) 및 람다(lambda) 경쇄 및 VpreB, 및 대리 경쇄(surrogate light chain)를 포함한다. 경쇄 가변 (VL) 도메인은 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전장 경쇄는 아미노 말단에서 카르복실 말단까지, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 가변 도메인, 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 가변 도메인은, 생식선에 존재하는 V 및 J 분절의 레파토리로부터 유래된 V_L 및 J_L 분절을 일반적으로 포함하는 경쇄 가변 영역 유전자 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V 및 J 경쇄 분절에 대한 서열, 위치 및 명명법은 국제 면역유전학 정보 시스템의 웹사이트(IMG T 데이터베이스)에서 확인할 수 있다. 경쇄는, 예를 들어, 이들이 나타나는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)에 의해 인식되는 임의의 에피토프에 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 이들이 나타나는 항원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 1개 이상의 에피토프에 결합하고 이를 인식하거나, 중쇄가 상기 에피토프에 결합하고 이를 인식하도록 돕는 것들을 포함한다.

[0211] 다양한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 C1q 및 관심 항원 둘 다에 결합한다.

- [0212] 또 다른 구현예에서, 설치류 모델은 후보 이중특이적 항원 결합 단백질이 감염성 질환 관련 항원인 관심 항원을 차단되거나 이에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일 구현예에서, 설치류는 감염원에 감염된다. 일 구현예에서, 감염성 질환 관련 항원은 바이러스 항원이다.
- [0213] 또 다른 구현예에서, 관심 항원은 감염성 질환 관련 항원이고, 관심 항원은 박테리아 항원이다. 일부 양태에서, 박테리아 항원은 스태필로코커스 항원이다.
- [0214] 일부 양태에서, C1q-기반의 이중특이적 항원 결합 단백질은 인간 C1q 기반의 항원 결합 단백질이다. 일 구현예에서, 항원 결합 단백질은 인간 항체와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0215] 일부 구현예에서, 인간 C1q를 표적으로 하는 하나의 아암과 감염성 질환 관련 항원(예컨대, *S. aureus*)를 표적으로 하는 다른 하나의 아암을 갖는 이중특이적 항체를 시험하는 것은, 본원에 개시된 유전적으로 조작된 동물로서 이의 C1qa, C1qb 및 C1qc 폴리펩티드 사슬 각각에서 인간 또는 실질적으로 인간 구형 헤드 도메인을 갖는 인간화 C1q를 발현하는, 유전적으로 조작된 동물을 사용해 생체 내에서 수행된다. 동물은 감염성 질환 관련 항원(예컨대, *S. aureus*)으로 감염시킬 수 있고, 이중특이적 항체는 이러한 동물에서, 예를 들어, 박테리아 부담을 감소시키고/시키거나 생존율을 개선하는 이의 능력에 대해 평가할 수 있다.
- [0216] **G. 유전적으로 변형된 비인간 동물의 용도**
- [0217] 추가로, 본원에 기술된 유전적으로 변형된 비인간 동물을 사용하는 다양한 방법이 개시된다.
- [0218] 일 구현예에서, 관심 항원을 표적으로 하는 치료 약물 후보물질을 스크리닝하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은: (a) 키메라, 인간화 C1qa 폴리펩티드, C1qb 폴리펩티드 및/또는 C1qc 폴리펩티드 및/또는 이들의 임의의 조합을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 내인성 설치류 C1q 유전자좌를 가진 유전적으로 변형된 설치류(예: 마우스 또는 랫트)를 제공하거나 입수하는 단계; (b) 관심 항원을 상기 유전적으로 변형된 설치류에 도입하는 단계; (c) 상기 설치류를 관심 약물 후보물질과 접촉시키되, 약물 후보물질은 인간 C1q 및 관심 항원에 대해 유도되는 단계; 및 (d) 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 약물 후보물질이 세포 또는 바이러스를 예방, 감소 또는 제거하는 데 효과적인지 여부를 분석하는 단계를 포함한다. 다양한 구현예에서, 설치류는 기능적 인간화 C1q 복합체를 발현한다. 상기 방법의 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 설치류는 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1qa 폴리펩티드, 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1qb 폴리펩티드, 및 실질적으로 인간인 구형 헤드 도메인을 포함하는 키메라 C1qc 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 내인성 설치류 C1q 유전자좌에 포함한다. 본원에 기술된 방법의 일 구현예에서, 설치류는 상응하는 설치류 단백질의 기능적 구형 헤드 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하지 않는다.
- [0219] 본원에 기술된 방법의 다양한 구현예에서, 관심 항원을 본원에 기술된 유전적으로 변형된 설치류에 도입하는 단계는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 달성될 수 있으며, 이에겐 형질전환(transgenesis), 주사, 감염, 조직 또는 세포 이식 등이 제한없이 포함될 수 있다. 이와 같이, 도입하는 단계는 설치류에서 관심 항원을 발현시키는 단계에 의해 달성될 수 있는데, 이는 관심 항원을 발현하도록 상기 설치류를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 도입하는 단계는, 예를 들어 세포 또는 조직의 이식에서와 같이, 관심 항원을 발현하는 세포를 상기 설치류에 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 도입하는 단계는, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 감염에서와 같이, 관심 항원으로 상기 설치류를 감염시키는 단계를 또한 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 관심 항원은 관심 인간 항원일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이는 관심 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있다. 관심 항원은 위에서 상술한 것과 같은 종양 관련 항원 또는 감염성 질환 관련 항원, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있다.
- [0220] 또 다른 구현예에서, 관심 항원을 표적으로 하는 치료 약물 후보물질을 평가하거나 스크리닝하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (a) 관심 항원을 발현하는 세포 또는 바이러스를 (i) 인간 C1q 및 관심 항원에 대해 유도되는 관심 약물 후보물질, 및 (ii) 본원에 기술된 유전적으로 변형된 설치류의 혈액 샘플(예: 전혈 샘플)과 혼합하는 단계, 및 (b) 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 약물 후보물질이 세포 또는 바이러스를 감소 또는 제거하는 데 효과적인지 여부를 분석하여 결정하는 단계를 포함한다. 결정은, 대조 약물을 사용하거나 약물을 전혀 사용하지 않는 경우와 비교해, 약물 후보물질이 사용되는 경우의, 예를 들어, 세포 또는 바이러스의 생존 백분율을 측정하는 것에 기초하여 이뤄질 수 있다. 관심 항원은 위에서 상술한 것과 같은 종양 관련 항원 또는 감염성 질환 관련 항원, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 항원은 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 항원과 같은 박테리아 항원이다. 일부 구현예에서, 세포는 스태필로코커스 세포와 같은 박테리아 세포이다.

- [0221] 치료 약물 후보물질을 스크리닝하는 방법의 다양한 구현예에서, 약물 후보물질은 항원 결합 단백질, 예컨대 항체, 예컨대 이중특이적 항체일 수 있다. 다양한 양태에서, 이러한 약물 후보물질은 인간 C1q 및 관심 항원 둘 다에 결합할 수 있다. 관심 항원은 인간 항원일 수 있다. 관심 항원은 원숭이와 같은 영장류 항원일 수도 있다. 따라서, 스크리닝에 사용된 약물 후보물질은 인간 C1q에 결합하는 것 외에도, 인간 항원 및 상응하는 영장류 항원 둘 다에 결합할 수 있다. 약물 후보물질은 또한 원숭이와 같은 영장류 C1q에 결합할 수 있다. 따라서, 약물 후보물질은 인간 및 영장류(예: 원숭이) C1q 둘 다에 결합할 수 있으며; 일 구현예에서는, 관심 인간 항원에도 결합할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 관심 항원은 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있고, 약물 후보물질은 인간과 영장류(예: 원숭이) C1q 및 관심 항원(예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 항원) 둘 다에 결합할 수 있다.
- [0222] 본원에 기술된 방법의 다양한 구현예에서, 치료 후보물질은 질환을 감소, 제거 또는 예방할 수 있다. 일 구현예에서, 질환은 종양이고, 치료 후보물질은 관심 항원을 표적으로 하지 않는 제제와 비교했을 때 종양 성장을 감소, 제거 또는 예방할 수 있다. 상기 방법의 이러한 구현예에서, 약물 후보물질이 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 세포를 예방, 감소 또는 제거하는 데 효과적인지 여부를 결정하는 것은 종양 부피 분석, 종양 세포 살해 분석, 종양에서의 사멸 마커 유도, 종양에서의 혈관 성장 감소, 종양 내로 면역 세포의 침윤 등을 사용해 수행될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 질환은 감염성 질환이고, 치료 후보물질은 관심 항원을 표적으로 하지 않는 제제와 비교했을 때 박테리아 또는 바이러스 감염을 감소, 제거 또는 예방할 수 있다. 상기 방법의 이러한 구현예에서, 약물 후보물질이 관심 항원의 존재 또는 발현을 특징으로 하여, 세포 또는 바이러스를 예방, 감소 또는 제거하는 데 효과적인지 여부를 결정하는 것은 박테리아 또는 바이러스 역가의 측정, 감염 세포에서의 사멸 마커 유도 등을 사용해 수행되거나, 혈액 샘플(예를 들어, 전혈 샘플)을 사용해 박테리아 세포 또는 바이러스의 생존을 측정함으로써 수행될 수 있다.
- [0223] 인간화 C1q 단백질을 표적으로 하는 하나의 아암과 관심 항원을 표적으로 하는 다른 하나의 아암을 갖는 이중특이적 항체를 평가하는 것 이외에, 본원에 개시된 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전적으로 조작된 비인간 동물은 다른 항체, 예를 들어, 인간 Fc 영역을 갖는 단일특이적 항체(예를 들어, 인간 항체)의 효과를 평가하는 데 유용하다. 인간화 C1q가 항체의 인간 Fc 영역에 결합하면 고전적 보체 경로를 활성화시킬 수 있는데, 이는 보체의존성 세포독성(CDC)을 초래한다. 항체가 수용자의 보체 시스템에 영향을 미치는지 여부, 또는 치료 항체의 효능이 보체 시스템의 작용에 기인하는지 또는 얼마나 많이 기인하는지를 평가하는 데 어려움이 있었다. 본원에 개시된 인간화 C1q를 발현하는 유전적으로 조작된 비인간 동물은 인간 Fc 영역(예를 들어, 인간 항체)을 갖는 항체가 고전적인 보체 경로를 활성화시킬 수 있을 것인지 여부를 평가할 수 있게 할 것이고, 이러한 평가 결과는 이러한 항체가 인간 환자에게 투여될 때 고전적인 보체 경로를 활성화시킬 것인지 여부를 더 정확하게 반영할 것이다.
- [0224] 따라서, 다른 양태에서, 본원에 개시된 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전자 조작된 비인간 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류)을 사용해, 인간 Fc 영역을 포함하는 항체가 고전적인 보체 경로를 활성화시킬 수 있는지 여부를 평가하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0225] 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포 표면 상에서 관심 항원을 발현하는 세포, 인간 Fc 영역을 포함하고 관심 항원에 대해 유도되는 후보 항체, 및 인간화 C1q 단백질을 발현하는 유전자 조작된 비인간 동물로부터 유래된 혈청 샘플을 이용하며, 관심 항원을 발현하는 세포의 보체 의존성 세포독성을 시험 관 내에서 평가하도록 설계된다. 특정 구현예에서, 세포를 후보 항체와 먼저 혼합하여 세포 표면에서 발현된 관심 항원에 항체가 결합될 수 있게 하고; 그런 다음 세포-항체 혼합물에 혈청 샘플을 첨가하여 혈청 샘플 중의 C1q 단백질이 세포 상의 관심 항원에 결합된 항체에 결합될 수 있게 한다. 그런 다음, 상업적 공급원(예를 들어, Promega의 CytoTox-Glo™ 시약) 유래의 것들을 포함하여, 손쉽게 이용할 수 있는 시약을 사용해, 유세포 분석법을 이용하거나 미리 첨가된 방사성 동위원소를 표적 세포로부터 방출시켜 세포독성(즉, 상기 세포의 살해)을 측정할 수 있다. 인간화 C1q 단백질을 발현하는 인간화 비인간 동물의 혈청 샘플을 사용하는 세포독성을 인간화되지 않은 대조군 비인간 동물(음성 대조군)의 혈청 샘플과 비교할 수 있고, 인간 혈청 샘플(양성 대조군)과 비교할 수 있다.
- [0226] 일부 구현예에서, 이러한 방법에 사용하기에 적합한 세포는 라지 세포(Raji cell), 라모스 세포(Ramos cell), 다우디 세포(Daudi cell), HEK293 세포, 및 A431 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 라지 세포, 라모스 세포, 또는 다우디 세포가 본 방법에 사용된다. 세포는 세포 표면에서 관심 항원을 자연적으로 발현할 수 있거나, 세포 표면에서 관심 항원을 재조합적으로 발현하도록 변형될 수 있다.
- [0227] 일부 구현예에서, 후보 항체는 종양 항원, 박테리아 또는 바이러스 항원 등에 대해 유도되는 인간 항체이다. 후

보 항체의 예는 예를 들어, 항-CD20 등을 포함한다.

[0228] 일부 구현예에서, 인간 Fc 영역을 포함하는 항체가 고전적인 보체 경로를 활성화시킬 수 있는지 여부를 평가하는 방법은 C1q 인간화 동물 내 후보 항체의 효과를 C1q 녹아웃 동물과 비교함으로써 생체 내에서 수행된다. 효과가 ADCC(CDC와 반대임)로 인한 것임을 배제하기 위해서는, 동물에서 NK 세포, 호중구 및 대식세포를 고갈시켜 보체 시스템을 온전하게 남길 수 있다.

[0229] 실시예

[0230] 다음의 실시예는 당업자에게 본 명세서에 청구된 화합물, 조성물, 물품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 실시되고 평가되는지에 관한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되고, 순수하게 예시적인 것으로 의도되며, 본 개시를 한정하도록 의도되지 않는다. 수치(예를 들어, 양 등)와 관련하여 정확성을 보장하도록 노력하였지만, 일부 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, %는 중량%(parts by weight)이고, 온도는 °C이거나 주변 온도이며, 압력은 대기압이거나 이에 가깝다.

[0231] 실시예 1. 인간화 C1q 마우스 생성

[0232] C1q 유전자의 마우스 게놈 서열은 NCBI 수탁번호 NC_000070.6에서 확인할 수 있고, C1q 유전자좌는 마우스 염색체 4D3에 위치한다(기준 GRCh38.p4 C57BL/6J). C1q 유전자의 인간 게놈 서열은 NCBI 수탁번호 NG_007281.1, NG_007283.1 및 NG_007565.1에서 확인할 수 있고, C1q 유전자좌는 인간 염색체 1p36.1에 위치한다. 인간 및 마우스 C1q에 대한 게놈 및 아미노산 서열의 일부 예는 아래 표 1 및 표 2에 열거되어 있다. 열거된 서열번호 내의 예측 신호 펩티드 경계가 표시되어 있다. 신호 펩티드 경계는 도 3a~도 3c에도 박스로 표시되어 있다.

표 1

[0233] 마우스 C1q 서열에 대한 GeneBank 수탁번호

단백질/유전자 명칭	게놈 서열 NCBI 수탁번호	단백질 NCBI 수탁번호	서열번호 (미성숙 단백질)	신호 펩티드 (아미노산)
마우스 C1qa	NC_000070.6	NP_031598.2	1	1-22
마우스 C1qb	NC_000070.6	NP_033907.1	2	1-25
마우스 C1qc	NC_000070.6	NP_031600.2	3	1-29

표 2

[0234] 인간 C1q 서열에 대한 GeneBank 수탁번호

단백질/유전자 명칭	게놈 서열 NCBI 수탁번호	단백질 NCBI 수탁번호	서열번호 (미성숙 단백질)	신호 펩티드
인간 C1QA	NG_007282.1	NP_001334394.1	4	1-22
인간 C1QB	NG_007283.1	NP_000482.3	5	1-27
인간 C1QC	NG_007565.1	NP_001334548.1	6	1-28

[0235] 요약하자면, 키메라 C1q 마우스를 생성하기 위해, 마우스 BAC 라이브러리인 Mouse BAC ES release 2(Incyte Genomics, 129/SvJ in pBeloBAC11참조)를 사용해 인간 및 마우스 박테리아 인공 염색체(BAC) DNA로부터 고유한 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술(예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 등의 (2003) High-throughput engineering of the mouse genome couple with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659를 참조하되, 둘 다는 참조로서 본원에 통합됨)을 사용해 작제하여 마우스 C1q 유전자좌를 인간화하였다. 마우스 BAC 클론 302p21에서 유래된 DNA를 변형시켜 마우스 C1qa, C1qb, 및 C1qc(마우스 C1q 유전자는 마우스 염색체 4의 역방향 가닥 상에서 서로 밀접한 근위에 위치함)의 일부분을 암호화하는 게놈 DNA를 인간 C1qa, C1qb 및 C1qc의 상응하는 일부분과 각각 치환하였다(인간 C1q 유전자는 인간 염색체 1의 정방향 가닥 상에서 서로 밀접한 근위에 위치함).

[0236] 인간 C1q 서열을 도입함으로써 마우스 C1q BAC를 변형시켜 인간화 C1qa, C1qb, 및 C1qc 유전자를 포함하는 BAC를 생성하였다. 실질적으로 마우스 C1qa, C1qb, 및 C1qc 구형 도메인을 암호화하는 서열은 실질적으로 인간 C1qa, C1qb, 및 C1qc 구형 도메인을 암호화하는 상응하는 서열과 각각 치환하였다. 인간 및 마우스 (및 랫트)

C1q 단백질 서열의 정렬은 도 3a, b 및 c에 도시되어 있으며, 여기서 구형 헤드의 경계는 표시된 바와 같으며, 마우스/인간 유전자의 경계는 화살표로 표시되어 있다. 인간화 마우스 C1qa, C1qb, 및 C1qc 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 10, 11 및 12에 각각 제시되어 있고, 아래 표 3에 열거되어 있으며, 마우스 서열은 이탤릭체로 표시되어 있다.

표 3

키메라 마우스/인간 C1q 단백질의 아미노산 서열

단백질	서열	서열번호
C1qa	<i>METSQGWLVACVL TMTL VWTVAEDVCRAPNGKDGAPGNPGRPRGPKLKGERGEPGAAGIRTGIRGFKGDPGES</i> <i>GPPGKPGN</i> <i>VGLPGTGPLGDSGPQGLKGVKGNPGNIRD</i> QPRPAFSAIRRN PPMGGNVVIFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYFFTFQV LSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSOGMVL QLQQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA*	10
C1qb	<i>MKTQWGEVWTHLLLLLGLHVSWAQSSCTGPPGIPGIPGVPVPGSDGQPGTPGIKGEKGLPGLAGDLGEFG</i> <i>EKGDPGIPG</i> <i>TPGKVGPKGPVGPKGTPGPGSGRPGPKGDSGDYGAT</i> QKIAFSATRTINVPLRRDQTIIRFDHVIITNMNNYEPKSGKFTCKVPGLYFFTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQ KVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLFPDMEA*	11
C1qc	<i>MVVGPSQPPCGLCLLLLFLALPLRSQASAGCYGIPGMPGMPGAPGKDGHDLQGPKEPGIPAVPGTRGPK</i> <i>GQKGEPPGMPG</i> <i>HRGKNGPRGTSGLPGDPGPRGPPGEPGVEGR</i> YKQKFQS VFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTPNQGDYDTSTGKFTCKV PGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDMVGIQGSDS VFSGFLFPD*	12

실시예 1.1. C1q 녹아웃 마우스의 생성

상세하게는, 먼저, 3개의 C1q 유전자 전부를 포함하는 마우스 C1q 유전자좌를 변형시켜 마우스 C1q를 암호화하는 유전자를 포함하는 17.6 kb의 뉴클레오타이드 서열을 결실시켰다(도 1a 참조). LacZ-neo 카세트, 20 Kb 5' 상동성 아암 및 55 kb 3' 상동성 아암을 포함하는 표적화 벡터를 박테리아 상동성 재조합에 의해 마우스 BAC 302p21에 도입하여, C1qa ATG에서 C1qb 정지 코돈까지 3개의 마우스 C1q 유전자 전부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 17.6 Kb를 결실시켰다. 결실은 시작 ATG 바로 다음에 있는 C1qa 엑손 2로부터 C1qb 엑손 3을 거쳐 19 bp를 포함하는 정지 코돈을 지나 C1qb 3' UTR 내로 이어졌다. LacZ 코딩 서열이 C1qa ATG 코돈과 프레임 내에 있도록 카세트를 삽입하였다. LacZ 코딩 서열 다음에는 SV40 폴리아데닐화 부위가 이어지고, 그 다음에는 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 1(Pgk1) 프로모터에 의해 Pgk1 폴리아데닐화 신호로 조절되는 플록싱된(floxed) 네오마이신 내성 카세트가 이어진다. 생성된 벡터를 사용해 마우스 ES 세포를 전기천공하여 내인성 C1q 유전자좌가 결여된 마우스를 생성하기 위한 변형된 ES 세포를 생성하였다. 결실된 유전자좌 내의 다양한 접합부 서열은 도 1c의 두 번째 개략도에 표시되어 있고, 상응하는 핵산 서열은 아래 표 4에 열거되어 있다. 본 실시예에서, 표에 도시된 접합부는 짧은 뉴클레오타이드 서열만 열거하지만, 마우스 게놈 내에 서열이 삽입된 위치를 당업자가 알 수 있게 한다.

표 4

마우스 C1q 녹아웃 유전자좌의 접합 서열

접합 설명	서열	서열번호
마우스 C1qa/KpnI/lacZ	CATACCCAGTGTCCCTGTGTCTCTGTAGGGACACCATG/GGTACC/GATTAAAA TGATCCAGTGGTC	13
Pgk1 polyA/loxP/XhoI/마 우스 C1qb	GCAGCCCCTAG/ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT/CCTAGG/CT ATCCAACACCATCTTCTGTC	14

마우스 C1q 서열의 결실을 함유하는 ES 세포는 정량적 TAQMAN법 분석법(예를 들어, Lie 및 Petropoulos의

1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48 참조), 즉 대립유전자 변형 검정(MOA)에 의해 식별하였다. 카세트 서열의 삽입(대립유전자 획득, GOA) 및 마우스 서열 결실(대립유전자 상실, LOA)의 검출을 위한 .특이적 프라이머 세트 및 프로브를 설계하였다. 표 5는 정량적 PCR 분석에 사용된 프라이머/프로브 세트 각각의 명칭 및 위치를 알려준다.

표 5

[0242] 마우스 C1q 유전자좌의 결실을 확인하기 위해 MOA 분석에 사용된 프라이머 및 프로브

설명	서열	대립유전자 상실(LOA) 또는 대립유전자 획득(GOA)	서열번호
598TU 프로브 F R	TCCCGCACCATCCTGGAGGCAAT	LOA(마우스 C1qa)	15
	TAAGCGTTCTCTCCGGCTGG		16
	CGCTTCTCAGGACCCCTAAAC		17
LacZ 프로브F R	CGATACTGTCGTCGCCCTCAAACCTG	GOA	18
	GGAGTGCATCTTCCTGAGG		19
	CGCATCGTAACCGTGCATC		20
네오 프로브F R	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG	GOA	21
	GGTGGAGAGGCTATTCGGC		22
	GAACACGGCGGCATCAG		23
587mTD 프로브 F R	AGGACCATCAACAGCCCCTTGCGAC	LOA(마우스 C1qb)	24
	GAAAGTCGCCTTCTCTGCC		25
	CGAAGCGAATGACCTGGTTC		26

[0243] 전술한 표적화된 ES 세포를 공여자 ES 세포로서 사용하고, VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8세포 단계 마우스 배아에 도입하였다(예를 들어, 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou 등의 (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). 마우스 C1q 결실을 독립적으로 지니는 VELOCIMICE®(완전히 공여자 ES 세포로부터 유래된 F0 마우스)는, 마우스 C1q 유전자 서열의 부재를 검출하는 대립유전자 변형 검정(상기 참조)을 사용해 유전형 분석에 의해 식별하였다. 아래에 기술된 바와 같이, 결실된 마우스 C1q 유전자좌를 포함하는 변형된 마우스 ES 세포(마우스 C1q KO HET ES 세포)를 인간화 C1q를 작제하는 데 사용하였다.

[0244] 본 방법에 사용된 선택 카세트는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 플록싱된 카세트를 제거하기 위해 Cre를 발현하는 작제물로 C1q 녹아웃 유전자좌를 가진 ES 세포를 형질감염시킬 수 있다. 선택 카세트는 Cre 재조합효소를 발현하는 마우스와 교배시켜 임의로 제거할 수 있다. 임의로, 선택 카세트를 마우스 내에 유지시킬 수 있다.

[0245] 실시예 1.2. 인간화 C1q 마우스의 생성

[0246] 인간화 마우스 C1q를 생성하기 위해, C1q 구형 헤드 도메인에 대한 서열(아래 실시예에서 인간화 C1q 랫트에 대해 사용한 것과 동일한 서열) 및 중복 마우스 서열을 사용해 In-Fusion HD 클로닝 키트™(Clontech)로 공여자 플라스미드를 생성하였다. C1qb 인간화 작제물의 경우, loxP-Ub-Hyg 선택 카세트를 제한 분해(restriction digest)에 의해 인간 C1qb polyA 서열의 하류에 삽입하였다. C1qa 및 C1qc 작제물 둘 다의 경우, 스펙티노마이신(Spec) 선택 카세트를 제한 분해에 의해 각각의 C1qa 및 C1qc polyA 서열의 하류에 삽입하였다. 생성된 작제물을 박테리아 상동성 재조합을 통해 마우스 C1q BAC(302p21) 내에 순차적으로 도입한 다음, 도 1b에 도시된 바와 같이 선택 카세트를 제거하기 위한 선택 및/또는 분해 단계를 수행하였다. 이러한 특정 구현예에서는, C1qb에 대한 키메라 핵산 서열을 먼저 도입한 다음(도면에서 1), 키메라 C1qc DNA를 도입하고(도면에서 2), 이어서 키메라 C1qa DNA를 도입하였다(도면에서 3).

[0247] 3개의 키메라 C1q 유전자 전부를 함유하는 큰 표적화 벡터를 도 1c에 도시된 바와 같이 마우스 C1q KO HET ES 세포 내로 전기천공하고, 전술한 TAQMAN® 실시간 PCT-기반 대립유전자 변형 검정(MOA)에 의해 통합의 성공 여부를 확인하였다. MOA 검정에 사용된 프라이머 및 프로브, 및 이들의 위치는 표 6에 기재되어 있다.

표 6

[0248]

키메라 마우스/인간 C1q 유전자의 존재를 확인하기 위해 MOA 분석에 사용된 프라이머 및 프로브

설명	서열	대립유전자 상실 (LOA) 또는 대립유전자 획득 (GOA)	서열번호
1565ma1F R	TGACAAGGTCCTACCAACCAGGAGAG CGCTTGGCAACGTGGTTAT CCCGTGTGGTTCTGGTATGG	LOA(마우스 C1qa)	27 28 29
1565mb1F R	TATGAGCCACGCAACGGCAAGTTCA TCACCAACGCGAACGAGAA GGCCAGGCACCTTGCA	LOA(마우스 C1qb)	30 31 32
1565mc5F R	CCCATCCTCACTCAGACCTTCTCTCCA CACCTCGCTCCCTCTGCTT CAGGAACCAGGGTGGACTTC	LOA(마우스 C1qc)	33 34 35
1565ha1F R	CAACGTGGTCATCTTCGACACGGTCA CGGAACCCCCAATGG TGGTTCTGGTACGGTTCTTCCT	GOA(인간 C1qa)	36 37 38
1565hb2F R	ACCATCAACGTCCCCGTGCGC AATCGCTTCTCTGCCACAA GTGGTCGAAGCGGATGGT	GOA(인간 C1qb)	39 40 41
1565hc4 F R	CACCTGCAAAGTCCCCGGCCTC TGACACGAGCACTGGCAAGT CGACGCGTGGTAGACAAAGTAG	GOA(인간 C1qc)	42 43 44
HygF R	ACGAGCGGGTTCGGCCATTC TGCGGCCGATCTTAGCC TTGACCGATTCTTGCGG	LOA(Cre 도입 후 히그로마이신 내성 결실)	45 46 47

[0249]

키메라 유전자좌에서 다양한 유전자 조작된 성분들 간의 접합 서열이 아래 표 7에 도시되어 있고, 도 1c의 하단 개략도 상에 표시되어 있다. 본 실시예에서의 표에 도시된 접합부는 짧은 뉴클레오티드 서열만 열거하지만, 마우스 게놈 내에 서열이 삽입된 위치를 당업자가 알 수 있게 한다.

표 7

[0250]

키메라 인간/마우스 C1q 유전자좌의 접합 서열

접합 설명	서열	서열번호
마우스 C1qa 엑손 3/인간 C1QA (구형 도메인) CGGCCCCAAGGACTGAAGGGCGTGAAAGGCAATCCAGGCAATATCAGG GAC/CAGCCGAGGCCAGCCTTCTCCGCCATTCGGCGGAACCCCCCAATG GGGGGC	48	
인간 C1QA 3' UTR/AsiSI 부위/마우스 C1qa의 3' (비번역)	TTGAGAGGGAGGCCTAAGAATAATAACAATCCAGTGCTTAAGAGTCAGGC/GCGATCGC/T GATGCACGCCTTTAATCCAGCACTTGGGAGGCAGAGACAGGTGA	49
마우스 C1qc 엑손 3/인간 C1QC (구형 도메인) GCCAGGGGACCCAGGCCCCAGGGGGCCTCCGGGGGAGCCAGGTGTGGAG GGCCGA/TACAAGCAGAAATTCAGTCAGTGTTCACGGTCACTCGGCAG ACCCACCA	50	
인간 C1QC 3' UTR/마우스 C1qc의 3' (비번역)	TGAATTCGGATCTTCAACTTTCATCAGCCATAGCTGGGCTCTGGACTC/TACCTAACTA TAACGGTCTTAAGGTAGCGAAAGGGGATGATTGGAGT	51
마우스 C1qb 엑손 3/인간 C1QB (구형 도메인)	TCCAGGCCCCCTCTGGACCCCGCGGTCCCAAGGCGATTCTGGGGACTACGGGGCTACA/CA GAAATCGCCTTCTCTGCCACAAGAACCATCAACGTCCCCCTGCGCCGGG	52
인간 C1QB 3'UTR/loxP-Ub-Hyg 영역	GCACCTGGCACACCAGAAGTGCATGCTCAGAAATGTTGGTTACATGAATGAAT/GCGGCC GCACCGGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTA	53
loxP-Ub-Hyg 영역/마우스 C1qb 중 3' (비번역)	CCGGCGCGCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGAC/GAATGTTTCAT AGGCTGGGGAGATGGCTCAGTCAGTAAAGTACTTAGCTTGC	54

[0251] 전술한 표적화된 ES 세포를 공여자 ES 세포로서 사용하고, 전술한 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아에 도입한다. 인간화 C1q 유전자를 독립적으로 지니는 VELOCIMICE®는 고유한 인간 C1q 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 변형 검정(상기 참조)을 사용해 유전자형 분석에 의해 식별한다. C1q 유전자의 이형접합성 변형을 포함하는 마우스는 동형접합체와 교배시킨다.

[0252] 히그로마이신 내성 카세트가 없는 ES 세포를 생성하기 위해, cre 재조합효소 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 마우스 C1q KO HET ES 세포 내로 전기천공하고, 생성된 ES 세포 클론을 표 6에 기재된 프라이머 및 프로브를 사용해 TaqMan 분석법에 의해, 히그로마이신 내성 카세트의 상실에 대해 스크리닝하였다. 그런 다음, 선택된 클론을 전술한 바와 같은 8-세포 단계 마우스 배아에 미세주입하고, 생성된 마우스를 동형접합체와 교배시켰다. 그 결과 발현된 키메라 단백질은 위의 표 3 및 서열 목록에 나타나 있다.

[0253] 실시예 2. 인간화 C1q 랫트의 생성

[0254] C1q 유전자의 랫트 게놈 서열은 NCBI 수탁번호 NC_005104.4에서 확인할 수 있고, C1q 유전자좌는 랫트 염색체 5에 위치한다(기준 Rnor_6.0 1차 어셈블리). C1q 유전자의 인간 게놈 서열은 NCBI 수탁번호 NG_007283.1, NG_007282.1 및 NG_007565.1에서 확인할 수 있고, C1q 유전자좌는 인간 염색체 1p36.1에 위치한다. 랫트 및 인간 C1q에 대한 게놈 및 아미노산 서열의 일부 예는 표 8 및 표 2에 각각 열거되어 있다. 열거된 서열번호 내의 예측 신호 펩티드 경계가 표시되어 있다. 신호 펩티드 경계는 도 3a~도 3c에도 박스로 표시되어 있다.

표 8

[0255] 랫트 C1q 서열에 대한 GeneBank 수탁번호

단백질/유전자 명칭	게놈 서열 NCBI 수탁번호	단백질 NCBI 수탁번호	서열번호 (미성숙 단백질)	신호 펩티드
랫트 C1qa	NC_005104.4	NP_001008515.1	7	1-22
랫트 C1qb	NC_005104.4	NP_062135.1	8	1-25
랫트 C1qc	NC_005104.4	NP_001008524.1	9	1-31

[0256] 요약하자면, 키메라 C1q 랫트를 생성하기 위해, Regeneron을 위해 LUCIGEN®이 랫트 검은 아구티 ES 세포로부터 생성한 랫트 BAC 라이브러리를 사용해 합성한 인간 서열 및 랫트 박테리아 인공 염색체(BAC) DNA로부터, US 2014/0310828(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 랫트 표적화 기술을 사용해 고유한 표적화 벡터를 작제하여 랫트 C1q 유전자좌를 인간화하였다. BAC 서열은 차세대 시퀀싱으로부터의 데이터에 기초하여 확인하고 업데이트하였다. 랫트 BAC(랫트 C1q BAC, LUCIGEN®)의 DNA를 변형시켜 랫트 C1qa, C1qb, 및 C1qc(랫트 C1q 유전자는 랫트 염색체 5의 역방향 가닥 상에서 서로 밀접한 근위에 위치함)의 일부분을 암호화하는 게놈 DNA를 인간 C1qa, C1qb 및 C1qc의 상응하는 일부분과 각각 치환하였다(인간 C1q 유전자는 인간 염색체 1의 정방향 가닥 상에서 서로 밀접한 근위에 위치함).

[0257] 사내에서 생성한 전술한 랫트 C1q BAC를 인간 C1q 서열의 도입에 의해 변형시켜 인간화 C1qa, C1qb, 및 C1qc 유전자를 포함하는 벡터를 생성하였다. 랫트 C1qa, C1qb, 및 C1qc 구형 도메인의 대부분을 암호화하는 서열은 인간 C1qa, C1qb, 및 C1qc의 상응하는 서열과 각각 치환하였다. 인간 및 랫트 (및 마우스) C1q 단백질 서열의 정렬은 도 3a, b 및 c에 도시되어 있으며, 여기서 구형 헤드의 경계는 표시된 바와 같으며, 랫트/인간 유전자의 경계는 화살표로 표시되어 있다. 인간화 랫트 C1qa, C1qb, 및 C1qc 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 55, 56 및 57에 각각 제시되어 있고, 표 9에 열거되어 있으며, 랫트 서열은 이탤릭체로 표시되어 있다.

표 9

[0258]

키메라 랫트/인간 C1q 단백질의 아미노산 서열

단백질	서열	서열번호
C1qa	<i>METSQGWLVACVLAVTLVWTV AEDVCRAPNGKDVAGIPGRPGRPGLKGERGEPGAAGIRTGIRGLKGDM GESGPPGKPGN VGFGPTGPLGNSGPQGLKGVKGNPGNIRD QPRPAFSAIRRN PPMGGNVVIFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYFFTFQV LSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVS GGMVL QLQQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA*</i>	55
C1qb	<i>MKTQWSEILTPLLLLLLGLLHVSWAQSSCTGSPGIPGVPGIPGVPGSDGKPGTPGKGEKGLPGLAGDHG ELGEKGDAGIPGIPG KVGPKGPVGPKGAPGPPGPRGPKGDSGDYKAT QKIAFSATRT INVPLRRDQTI RFDHVI TNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFTY HASSRGNLCVNLMRGRERAQVVTFCDYAYNTFQVTTGGM VLKLEQGENVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA*</i>	56
C1qc	<i>MLRMVVGTSQCPQHGLYLLLLLLALPLRSQANAGCYGIPGMPGLPGTPGKGDHDLQGPKEGEPGIPAIPG TQGPKGQKGEPPGM PGHRGKNGPMGTSGSPGDPGPRGPPEEGEGR YKQKFQS VFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVL TNPDGYDTSTGKFTCKV PGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNS GGVLLRLQVGEEVWLAVNDYDMVG IQGSDSVFSGFLLFPD*</i>	57

[0259]

실시예 2.1 C1q 녹아웃 랫트의 생성

[0260]

상세하게는, 먼저, 3개의 C1q 유전자 전부를 포함하는 랫트 C1q 유전자좌를 변형시켜 랫트 C1q를 암호화하는 유전자를 포함하는 17.6 Kb의 뉴클레오타이드 서열을 결실시켰다(도 2a 참조). LacZ 유전자 및 자가 결실 히그로마 이신 선택 카세트를 포함하도록 표적화 벡터를 합성하고, 벡터에 5' 및 3' 상동성 아암을 포함시켜 C1qa ATG에서 C1qb 정지 코돈까지 3개의 랫트 C1q 유전자 전부가 결실되도록 하였다. C1q 서열 결실을 포함하는 벡터를 박테리아 상동성 재조합(BHR)을 통해 랫트 C1q BAC 내에 도입하고, 생성된 BAC DNA를 사용해 랫트 ES 세포를 전기천공하여, 내인성 C1q 유전자좌가 결여된 랫트를 생성하기 위한 변형된 ES 세포를 생성하였다. 결실된 유전자좌 내의 다양한 접합부 서열은 도 2c의 두 번째 개략도에 표시되어 있고, 상응하는 핵산 서열은 아래 표 10에 열거되어 있다. 본 실시예에서의 표에 도시된 접합부는 짧은 뉴클레오타이드 서열만 열거하지만, 랫트 게놈 내에 서열이 삽입된 위치를 당업자가 알 수 있게 한다.

표 10

[0261]

랫트 C1q 유전자좌 결실의 접합 서열

접합 설명	서열	서열번호
랫트 C1qa 프로모터/LacZ 서열	<i>GATTCTCCCAATCTCTCCTCTGCAGGACCACTGGATCATT TAAATCGGTACC/CATGATGTTCTGCAGAGACACACA GGGACCCCGGCATGCTGGACAGTCA</i>	58
LacZ 서열/SDC-1oxP-Hyg 카세트	<i>TAGTTATCGAGCCCGGGATCCACTAGTTCTAGTGTTTAAACTCTAGCCG/GGGGATCCAGACATGAT AAGATACATTGA TGAGTTTGGACAAACCACAAC</i>	59
SDC-1oxP-Hyg 카세트/랫트 C1q 서열의 3'	<i>AGGATTACTGGCAGGGAGGAGGTTTTGGATAGGAGTGATTGACCCCGTGA/GCTAGCATAACTTCGT ATAGCATACATT ATACGAAGTTATCTAGGGGCTG</i>	60

[0262]

랫트 C1q 서열의 결실을 함유하는 ES 세포를 전술된 정량적 TAQMAN제 분석, 대립유전자 변형 검정(MOA)에 의해 식별하였다. 표 11은 정량적 PCR 분석에 사용된 프라이머/프로브 세트 각각의 명칭 및 위치를 알려준다. 동일한 ES 세포를 사용해 인간 C1q 서열을 도입하여 후술하는 바와 같은 키메라 랫트를 생성한다.

표 11

[0263]

랫트 C1q 유전자좌의 결실을 확인하기 위해 MOA 분석에 사용된 프라이머 및 프로브

설명	서열	대립유전자 상실(LOA) 또는 대립유전자 획득(GOA)	서열번호
RnoC1qTU2-프로브F R	AACCCACCGACGTATGGCAACGT GCCAGCTTTCTCAGCTATTCG GCGGTTCTGGTATGGATTCTC	LOA(랫트 C1qa)	61 62 63
RnoC1qTD-프로브F R	AAACACCTTCCAGGTCACCACGGG TCTCACCTTCTGCGACTATGC CCTGCTCCAGCTTCAAGACTAC	LOA(랫트 C1qb)	64 65 66
Hyg-프로브F R	ACGAGCGGGTTCGGCCATTC TGCGGCCGATCTTAGCC TTGACCGATTCTTGCGG	GOA (히그로마이신)	67 68 69
LacZ 프로브F R	CGATACTGTCGTCGTCCTCAAACTG GGAGTGCATCTTCCTGAGG CGCATCGTAACCGTGCATC	GOA (LacZ)	70 71 72

[0264]

표적화된 키메라 C1q 검은 아구티 ES 세포를 스프래그 다울리 랫트 배아에 이식하여 C1q 유전자좌의 결실을 가진 F0 새끼를 생성한다. F0 키메라 새끼를 야생형 랫트와 교배시켜, 유전자 조작에 대해 이형접합체인 F1 새끼를 생성하고; 변형된 대립유전자의 존재는 전술한 바와 같은 TAQMAN® 분석에 의해 확인한다. F1 새끼는 후속하여 동형접합체와 교배시킨다.

[0265]

실시예 2.2. 인간화 C1q 랫트의 생성

[0266]

인간화 C1q 랫트를 생성하기 위해, 인간 C1q 구형 헤드 도메인에 대한 서열(상기 실시예 1에서 인간화 C1q 마우스에 사용한 것과 동일한 서열) 및 중첩 랫트 서열을 사용해 Blue Heron에 의해 플라스미드를 합성하였다. C1qb 인간화 작제물의 경우, 자가 결실 loxP-퓨로마이신(SDC-loxp-puro) 선택 카세트를 제한 분해에 의해 인간 C1qb polyA 서열의 하류에 삽입하였다. C1qa 및 C1qc 작제물 둘 다의 경우, 스펙티노마이신(Spec) 선택 카세트를 제한 분해에 의해 각각의 C1qa 및 C1qc polyA 서열의 하류에 삽입하였다. 생성된 구축물을, 도 2b에 표시된 바와 같이, CRISPR/CAS9 기술 및 깃슨 어셈블리(Gibson Assembly)의 조합 또는 박테리아 상동성 재조합(BHR)을 통해 LUCIGEN®의 랫트 C1q BAC 내에 순차적으로 도입하고, 이어서 선택 카세트를 제거하기 위한 선택 및/또는 분해 단계를 수행한다. 이러한 특정 구현예에서는, BHR에 의해 C1qb에 대한 키메라 핵산 서열을 먼저 도입한 다음(도면에서 1), BHR에 의해 키메라 C1qc DNA를 도입하고(도면에서 2), 이어서 BHR에 의해 키메라 C1qa DNA를 도입하였다(도면에서 3).

[0267]

3개의 키메라 C1q 유전자 전부를 함유하는 큰 표적화 벡터를 도 2c에 도시된 바와 같이 랫트 C1q KO HET ES 세포 내로 전기천공하고, TAQMAN® 실시간 PCT-기반 대립유전자 변형 검정(MOA)에 의해 통합의 성공 여부를 확인하였다. MOA 검정에 사용된 프라이머 및 프로브는 표 12에 기재되어 있다.

표 12

[0268]

키메라 인간/랫트 C1q 유전자의 존재를 확인하기 위해 MOA 분석에 사용된 프라이머 및 프로브

설명	서열	대립유전자 상실(LOA) 또는 대립유전자 획득(GOA)	서열번호
RnoC1qTU2-프로브F R	AACCCACCGACGTATGGCAACGT GCCAGCTTTCTCAGCTATTCG GCGGTTCTGGTATGGATTCTC	LOA(랫트 C1qa)	73 74 75
RnoC1qTD-프로브F R	AAACACCTTCCAGGTCACCACGGG TCTCACCTTCTGCGACTATGC CCTGCTCCAGCTTCAAGACTAC	LOA(랫트 C1qb)	76 77 78

1565ha2-프로브F R	CCTTCCAGGTGCTGTCCAGTG GTACCCGGCTACTACTACTTCA GAGACGATGGACAGGCAGATTTC	GOA(인간 C1qa)	79 80 81
1565hb2F R	ACCATCAACGTCCCCCTGCGC AATCGCCTTCTCTGCCACAA GTGGTCGAAGCGGATGGT	GOA(인간 C1qb)	82 83 84
1565hc4F R	CACCTGCAAAGTCCCCGGCCTC TGACACGAGCACTGGCAAGT CGACGCGTGGTAGACAAAGTAG	GOA(인간 C1qc)	85 86 87

[0269] 키메라 유전자좌에서 다양한 유전자 조작된 성분들 간의 접합 서열이 아래 표 13에 도시되어 있고, 도 2c의 하단 개략도 상에 표시되어 있다. 본 실시예에서의 표에 도시된 접합부는 짧은 뉴클레오티드 서열만 열거하지만, 랫트 게놈 내에 서열이 삽입된 위치를 당업자가 알 수 있게 한다.

표 13

[0270] 키메라 인간/랫트 C1q 유전자좌의 접합 서열

접합 설명	서열	서열번호
랫트 C1qa 엑손 3/ 인간 C1QA (구형 도 메인)	GCCCCAAGGGTTGAAAGGTGTGAAAGGCAATCCGGGCAATATCAGGGA/CCAGCCGAGGCCAGC CTTCTCCGCCATT CGGCGGAACCCCCCAATGGGGGGCA	88
인간 C1QA 3'UTR/ 랫 트 C1qa의 3' (비번 역)	GCATTGAGAGGGAGGCCTAAGAATAATAACAATCCAGTGCTTAAGAGTCAGGC/GCTGGGTAGCT GCCCCACG TTCTGCCATCTCCTGCACTCCCTGTGCGGGGCC	89
랫트 C1qc 엑손 3/ 인간 C1QC (구형 도 메인)	GGGATCCAGGCCCCAGGGGTCTCCCGGGGAGCCGGGTGAGGAGGGTCG/ATACAAGCAGAAATT CCAGTC AGTGTTCACGGTCACTCGGCAGACCCACCAGCCCC	90
인간 C1QC 3' UTR/ 랫트 C1qc의 3' (비 번역)	TGAATTTTCGGATCTTCAACTTTGCATCAGCCATAGCTGGGCTCTGGACTC/GAATGGCAGGCTGG GTCCA GCACCCGGACGCCCCGCTCGCTCCCTCTGTCT	91
랫트 C1qb 엑손 3/ 인간 C1QB (구형 도 메인)	GCCCCCTGGACCCCGGGTCCCAAAGGTGACTCTGGAGACTACAAGGCTACC/CAGAAATCGC CTTCTCTGCCA CAAGAACCATCAACGTCCCCCTGCGCCGG	92
인간 C1QB 3'UTR/SDC-loxP-pur o 영역	CTGGCACACCAGAAGTGCCATGCTCAGAAATGTTGGTTACATGAATGAAT/GTCGAGATAACTTC GTATAATGTATG CTATACGAAGTTATATGCATGCCAG	93
SDC-loxP-puro 영역/I-Ceu 부위/ 랫 트 C1qb의 3' (비번 역)	GGCGGCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGG/TAATATAACGGTC CTAAG GTAGCGA/GCTAGCTACGGGGTCAAATCACTCTATC CAAAACCTCCTCCCTGCCAGTAATCC	94

[0271] 표적화된 키메라 C1q 검은 야구티 ES 세포를 스프래그 다울리 랫트 배아에 이식하여 키메라 인간/랫트 C1q 유전자좌를 가진 F0 새끼를 생성한다. F0 키메라 새끼를 야생형 랫트와 교배시켜, 유전자 조작에 대해 이형접합체인 F1 새끼를 생성하고; 변형된 대립유전자의 존재는 전술한 바와 같은 TAQMAN® 분석에 의해 확인한다. F1 새끼는 후속하여 동형접합체와 교배시킨다.

[0272] 실시예 3: 인간화 C1q 마우스의 특성 분석

[0273] 실시예 3.1. 키메라 C1q는 마우스 혈청 내에 존재하고 기능적이다

[0274] 키메라 C1q가 마우스 혈청에서 발현하고 기능적인지 여부를 결정하기 위해, 웨스턴 블롯 및 고전적인 보체 용혈 검정에 의해 인간화 C1q 마우스의 표현형을 분석하였다. 모든 마우스는 특정 병원체가 없는 Regeneron Pharmaceuticals의 시설에 수용하고 사육하였다. 모든 동물 실험은 IACUC 및 Regeneron Pharmaceuticals에 의해 승인되었다.

[0275] (1) 웨스턴 블롯:

- [0276] 혈청 C1q 농도는 웨스턴 블롯을 사용하여 1615 HO 마우스(전술한 바와 같이 인간화 C1q에 대해 동형접합체인 마우스)에서 다음과 같이 분석하였다: 마우스 또는 정상 인간 혈청(NHS)을 PBS에서 희석시켰다. 정상 인간 혈청(Quidel)을 양성 대조군으로서 사용하였다. 혈청을 메르캅토에탄올 및 SDS를 함유하는 전기영동 샘플 로딩 완충액에 첨가하고, 환원/변성 조건 하에 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동시킨 다음, 니트로셀룰로오스 막 위로 옮겼다. 블롯을 차단한 다음, 염소 항마우스 C1q 1차 항체(Quidel)로 검사(probed)한 다음, 당나귀 항염소 IgG HRP(Santa Cruz)로 검출하였다. ThermoScientific Super Signal West Pico 화학 발광 기판을 사용하여 블롯을 진행시켰다. GE Image Quant LAS4000을 이미징에 사용하였다.
- [0277] **(2) 고전적인 경로 용혈 분석:**
- [0278] 원하는 수의 SRBC(양 적혈구 세포)를 GVB++ 완충액 중에서 세척하고 1×10^9 세포/mL로 재현탁하고, 토끼 항양 용혈제로 옅소닌화하였다. 민감화된 SRBC를 GVB++ 완충액에서 2×10^8 세포/mL로 희석한 후 용혈 분석에 사용하였다. WT 한배 새끼(n=5) 및 1615HO(n=4) 마우스로부터 7 내지 9주령에 혈청을 채취하였다. 마우스 혈청을 GVB++ 완충액을 사용해 1/5에서 1/160까지 6점, 2배 희석 시리즈로 연속 희석하였다 (웰당 100 μ L의 희석된 혈청). 200 μ L의 총 부피에 대해 100 μ L의 민감화된 SRBC(2×10^8 세포/mL)를 즉시 첨가하고, 37°C에서 1시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 시간이 지난 후, 세포를 4°C에서 1250 xg로 원심분리하여 스피너운하였다. 총 100 μ L의 상청액을 새로운 96-웰 편평한 바닥 플레이트에 옮기고 Molecular Devices Spectramax M5 마이크로플레이트 판독기 및 SoftMax Pro 소프트웨어를 이용해 541 nm에서 판독하였다. 용혈 활성을 계산하였다: 모든 실험 샘플의 OD541을 최대 세포 용해 시(100 μ L의 물로 처리한 세포)의 OD541로 나눈 후 100을 곱했다. 표시된 데이터는 단일 점들이다(중복된 것들은 배제함).
- [0279] 도 4의 상단 패널에 표시된 바와 같이, 항-인간 C1q 항체로 검출 했을 때, 키메라 C1q 단백질이 인간화 C1q 마우스의 혈청에서 검출되었고, 비록 인간 혈청에서 검출된 것보다는 적지만, C1q 단백질이 인간화 C1q 마우스 혈청에서 검출되었다. 인간화 마우스로부터 수득된 키메라 C1q 단백질은 용혈 분석에 의해 측정 했을 때, 야생형 마우스 C1q를 포함하는 마우스에서 관찰된 것과 유사한 고전적인 보체 활성을 나타냈다(도 4, 하단 패널).
- [0280] 마우스 혈청에서 키메라 인간/마우스 C1q의 농도 또한 C1q의 인간 헤드에 특이적인 항체를 이용한 샌드위치 ELISA 포맷을 사용해 결정하였다. 인간 C1q 단백질의 알려진 농도를 사용해 표준 곡선을 생성하고, 마우스 혈청에서의 키메라 C1q의 농도는 약 10~30 μ g/mL의 범위에 있는 것으로 결정하였다.
- [0281] **실시예 4: 인간 치료제를 시험하기 위한 모델로서의 인간화 C1q 마우스**
- [0282] 인간화 C1q 마우스가 인간 치료제를 시험하기 위한 모델로서의 역할을 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 인간 항-CD20 항체에 결합하여 라지 세포(세포-표면 항원 CD20을 발현하는 B 세포)의 보체 의존성 세포독성(CDC)를 활성화시키는 인간화 C1q의 능력을 평가하기 위한 시험관 내 분석법을 먼저 개발하였다. B-세포 특이적 세포 표면 항원 CD20에 대한 항-CD20 치료 항체는 B-세포의 CDC를 초래하는 것으로 나타났으며(Glennie 등의 2007, *Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies*, Mol. Immunol., Vol. 44(16) pp.3823-37 참조), CD20을 발현하는 세포주를 사용하는 CDC 분석은 이전에 기술되었다(Flieger 등의 2000, *Mechanisms of Cytotoxicity Induced by Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody IDEC-C2BB in CD20-Expressing Lymphoma Lines*, Cell Immunol., Vol. 204(1) pp. 55-63 참조).
- [0283] CDC 생물검정을 위해, RPMI 1640에 포함된 1% BSA 중의 96-웰 분석 플레이트 상에 10,000 세포/웰로 라지 세포를 시딩하였다. (인간화 C1q 또는 WT 마우스에서 유래된) 인간 또는 마우스 혈청으로 인한 CDC를 측정하기 위해, 인간 항-CD20 항체를 2 nM에서 0.007 nM까지 1:4로 희석하고 25°C에서 10분 동안 세포와 인큐베이션하였다. 항-CD20 항체와의 인큐베이션이 종료된 후, 혈청을 1%의 최종 농도로 세포에 첨가하였다. 37°C에서 5% CO₂ 하에 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 25°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, CytoTox-Glo제 시약(Promega, #G9291)을 첨가한 후 세포독성을 측정하였다. CytoTox-Glo제는 세포독성이 증가할 때(상대 광 단위(RLU)로 측정됨) 증가된 발광이 관찰되도록 세포 사멸을 측정하는 발광 기반 시약이다. 대조군 웰 중의 미처리 세포를 디기토닌(digitonin)으로 처리하여 용해시키고, 10분 후에 CytoTox-Glo제 시약을 첨가하여 세포의 최대 살해를 결정하였다. CytoTox-Glo제를 첨가하고 10~15분 후, Victor X 기기(Perkin Elmer)로 발광에 대해 플레이트를 판독하였다. 계산 값이 표시된 경우, 세포독성의 백분율은 다음의 식을 사용하여 RLU 값으로 계산한 것이다:

$$\text{세포독성(\%)} = 100 \times \frac{(\text{실험용 세포 용해} - \text{백그라운드 세포 용해})}{(\text{최대 세포 용해} - \text{백그라운드 세포 용해})}$$

[0284]

[0285]

본 식에서, "백그라운드 세포 용해"는 임의의 항-CD20 항체 없이 배지와 혈청만으로 처리한 세포로부터의 발광이며, "최대 세포 용해"는 디기토닌으로 처리한 세포로부터의 발광이다. 세포독성(%) 또는 RLU로 표현된 결과는 Prism 7 소프트웨어(GraphPad)를 이용해 비선형 회귀(4-파라미터 로지스틱스)를 사용해 분석하였다.

[0286]

2 nM 인간 항-CD20 항체 및 정상 인간 혈청에 의해 매개된 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성은 83%의 최대 용해를 초래한 반면, 2 nM 인간 CD20 항체 및 인간화 C1q 마우스의 혈청에 의해 매개된 CDC는 55~58%의 최대 용해를 나타냈다(도 5). 야생형 마우스 혈청을 사용한 경우 세포 용해가 검출되지 않았다. 따라서, 인간화 C1q 구형 헤드를 함유하는 혈청은 야생형 마우스 C1q 단백질을 함유하는 혈청과 비교했을 때, 인간 항-CD20 항체에 의해 매개된 라지 세포의 보다 효율적인 보체 의존적 용해를 초래하였다.

[0287]

생체 내 시험을 위해, 황색 포도상구균(*S. aureus*) 감염 모델을 선택하였다. 황색 포도상구균은 환자 내 균혈증의 주요 원인이며, 이러한 감염은 종종 치명적이다. 균혈증의 마우스 모델은, 감염 역학과 잠재적 치료제의 효과를 연구하기 위해, 실험실에 맞게 구성된 다양한 임상용 황색 포도상구균 단리체를 사용해 많은 실험실에 의해 개발되어 왔고, 다양한 마우스 백그라운드에서(O'Keeffe KM, 등의 Infect Immun. 2015 Sep;83(9):3445-57. Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection.; Rauch 등의 Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3721-32. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of *Staphylococcus aureus* peritoneal infection) 개발되어 왔다. C1q를 표적으로 하는 하나의 아암 및 황색 포도상구균에서 발현된 항원을 표적으로 하는 다른 하나의 아암을 갖는 이중특이적 항체(bisAbs)의 활성, 즉 박테리아 부담을 감소시키면서 생존율을 개선하는 활성을 평가하기 위한 박테리아 모델을 수립하였다.

[0288]

인간화 C1q 마우스 및 대조군 야생형 마우스를, 37°C의 TSB에서 $OD_{600} \leq 1$ 의 로그상(log phase)까지 성장시키고 PBS에서 3회 세척한 황색 포도상구균 뉴먼(*S. aureus* Newman) 200 μ L 부피로(마우스당 1.7×10^8 콜로니 형성 단위(CFU)) 복강 내 감염시키고, PBS 중에서 3회 세척하였다. 감염 직후, 마우스에게 bisAb 및 이소형-일치 항체 100 μ g씩을 100 μ L의 부피로 복강 내 투여하였다. 3일차에 마우스를 안락사시키고 신장을 채취하여 장기 부담을 결정하였다. 요약하자면, gentleMACS Octo Dissociator(Miltenyi Biotec)를 사용해 신장을 5.0 mL의 PBS 중에서 균질화시켰다. 조직 균질물을 PBS에서 희석하고, 수집배의 연속 희석물을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 개별 콜로니를 계수하여 감염 후 해당 시점의 박테리아 부담을 결정하고, 결과를 CFU/조직 그래프로 보고하였다.

[0289]

암컷 인간화 C1q 마우스 및 WT 대조군 마우스에서 박테리아 신장 부담을 감소시키는 효능에 대해 bisAb를 이소형 대조군 항체와 함께 시험하였다. 이소형 대조군 Ab로 치료한 마우스와 비교해, bisAb로 치료한 인간화 C1q 마우스의 경우 치료 후 3일차에 신장에서 2~4 로그의 박테리아 CFU 감소가 검출되었지만; 이는 이소형 대조군 항체로 얻은 결과와 유사하였으며, 내인성 마우스 C1q를 발현하는 WT 마우스를 bisAb로 치료한 경우 박테리아 부담의 감소가 관찰되지 않았다(데이터 미도시).

[0290]

bisAb가 생존율에 미치는 효과를 조사하기 위해, 전술한 바와 같이, 인간화 C1q 마우스를 마우스당 1.5×10^8 CFU의 황색 포도상구균 뉴먼으로 감염시키고, 시험 항체로 치료하였다. 3일차에 마우스를 희생시키지 않고, 18일차까지 모니터링하였다. 시작 체중의 20%가 감소한 마우스를 희생시키고, 사망으로 기록하였다. 생존 동물의 백분율은 연구 종료 후에 보고하였다.

[0291]

인간화 C1q 암컷 마우스(n=9)의 생존 연구에서의 효능에 대해 bisAb를 이소형 대조군 항체와 함께 시험하였다. 표 14에 나타난 바와 같이, 연구가 종료된, 감염 후 18일차에 BisAb로 치료한 마우스의 100%가 생존한 반면, 이소형 대조군으로 치료한 마우스는 78%가 생존하였다.

표 14

[0292]

균혈증 모델에서 인간화 C1q 마우스의 생존율

Ab	감염 후 D18에서의 생존율(%)	마우스 (n)
BisAb	100	9
이소형 대조군	78	9

Sham (PBS)	56	9
------------	----	---

[0293] 결론적으로, 이 연구는 인간화 C1q 마우스가 인간 C1q 단백질에 대해 유도되는 치료제, 예컨대 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 시험하기 위한 귀중한 모델임을 입증한다.

[0294] **실시예 5: 인간화 C1q 랫트의 특성 분석**

[0295] 키메라 C1q가 랫트 혈청에서 기능적인지 여부를 결정하기 위해, 고전적인 보체 용혈 검정에 의해 실시예 2에 기술된 인간화 C1q 랫트의 표현형을 분석하였다. 결과를 C1q 녹아웃(KO) 랫트 및 정상 인간 혈청과 비교하였다. 모든 랫트는 50% 검은 아구티와 50% 스프래그 다울리 백그라운드를 가졌다. 모든 랫트는 특정 병원체가 없는 Regeneron Pharmaceuticals의 시설에 수용하고 사육하였다. 모든 동물 실험은 IACUC 및 Regeneron Pharmaceuticals에 의해 승인되었다.

[0296] **(1) 고전적인 경로 용혈 분석**

[0297] 원하는 수의 SRBC(양 적혈구 세포)를 GVB++ 완충액 중에서 세척하고 1x10⁹ 세포/mL로 재현탁하고, 토끼 항양 용혈제로 옅소닌화하였다. 민감화된 SRBC를 GVB++ 완충액에서 2x10⁸ 세포/mL로 희석한 후 용혈 분석에 사용하였다. WT(n=3 암컷 및 n=4 수컷), 100015 HO(동형접합성 인간화 C1q 랫트)(n=5 암컷 및 n=6 수컷) 및 동형접합성 C1q 녹아웃 랫트(n=2 암컷)의 혈청을 10 내지 17주령일 때 채취하였다. 정상 인간 혈청(Quidel)을 양성 대조군으로서 사용하는 한 편, C1q 고갈 인간 혈청(Quidel)을 음성 대조군으로서 사용하였다. 랫트 및 인간 혈청을 GVB++ 완충액을 사용해 1/5에서 1/10240까지 12점, 2배 희석 시리즈로 연속 희석하였다 (웰당 100 μ L의 희석된 혈청). 200 μ L의 총 부피에 대해 100 μ L의 민감화된 SRBC(2x10⁸ 세포/mL)를 즉시 첨가하고, 37°C에서 1 시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 시간이 지난 후, 세포를 4°C에서 1250 xg로 원심분리하여 스피ندا운하였다. 총 100 μ L의 상청액을 새로운 96-웰 편평한 바닥 플레이트에 옮기고 Molecular Devices Spectramax M5 마이크로플레이트 판독기 및 SoftMax Pro 소프트웨어를 이용해 412 nm에서 판독하였다. 용혈 활성을 계산하였다: 모든 실험 샘플의 OD541을 최대 세포 용해 시(100 μ L의 물로 처리한 세포)의 OD541로 나눈 후 100을 곱했다. 표시된 데이터는 단일 점들이다(중복된 것들은 배제함).

[0298] 도 6에 나타난 바와 같이, 인간화 랫트로부터 수득한 키메라 C1q 단백질은 용혈 분석에 의해 측정했을 때, 야생형 랫트 C1q를 포함하는 랫트에서 관찰된 것 및 정상 인간 혈청을 사용한 경우에 관찰된 것과 유사한 고전적 보체 활성을 나타냈다. 수컷과 암컷 랫트 간에는 차이가 관찰되지 않았다.

[0299] **실시예 6: 인간 치료제를 시험하기 위한 모델로서의 인간화 C1q 랫트**

[0300] 인간화 C1q 랫트가 인간 치료제를 시험하기 위한 모델로서의 역할을 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 시험관 내 보체 의존성 세포독성 분석 및 전혈 박테리아 생존을 분석을 수행하였다.

[0301] **(1) 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석**

[0302] CDC 생물검정을 위해, 라지 세포(CD20을 발현하는 인간 B 세포주), 혈청 샘플(보체 보존성 인간 혈청, WT 랫트 혈청, 또는 실시예 2에 기술된 바와 같은 동형접합성 C1q 인간화 랫트), 및 항-CD20 항체를 사용하였다.

[0303] RPMI 1640이 포함된 1% BSA 중의 96-웰 분석 플레이트 상에 10,000 세포/웰로 라지 세포를 시딩하였다. 인간 또는 랫트 혈청을 사용했을 때의 CDC를 측정하기 위해, 항-CD20 항체를 20 nM에서 0.019 nM까지 1:4로 희석하고 (항체가 없는 대조군 샘플을 포함함), 25°C에서 10분 동안 세포와 함께 인큐베이션한 다음 0.5% 혈청을 첨가하였다. 37°C에서 5% CO₂ 하에 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 25°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, CytoTox-Glo제 시약(Promega, # G9291)을 첨가한 후 세포독성을 측정하였다. CytoTox-Glo제는 세포독성이 증가할 때(상대 광 단위(RLU)로 측정됨) 증가된 발광이 관찰되도록 세포 사멸을 측정하는 발광 기반 시약이다. CytoTox-Glo제 시약을 첨가한 직후, 대조군 웰 중의 미처리 세포를 디기토닌으로 처리하여 용해시켜 세포의 최대 살해를 결정하였다. CytoTox-Glo제를 첨가하고 10~15분 후, Victor X 기기(Perkin Elmer)로 발광에 대해 플레이트를 판독하였다. 계산 값이 표시된 경우, 세포독성의 백분율은 다음의 식을 사용하여 RLU 값으로 계산한 것이다:

$$\text{세포독성(\%)} = 100 \times \frac{(\text{실험용 세포 용해} - \text{백그라운드 세포 용해})}{(\text{최대 세포 용해} - \text{백그라운드 세포 용해})}$$

[0304]

[0305] 본 식에서, "백그라운드 세포 용해"는 임의의 항-CD20 항체 없이 배지와 혈청만으로 처리한 세포로부터의 발광

이며, "최대 세포 용해"는 디기토닌으로 처리한 세포로부터의 발광이다. 세포독성(%) 또는 RLU로 표현된 결과는 Prism 7 소프트웨어(GraphPad)를 이용해 비선형 회귀(4-파라미터 로지스틱스)를 사용해 분석하였다.

[0306] 도 7에 나타난 바와 같이, 20 nM CD20 항체 및 인간화 C1q 랫트(MAID10015) 혈청에 의해 매개된 보체 의존성 세포독성 활성은 라지 세포의 최대 85~90%를 용해시켰는데, 이는 야생형 랫트 혈청(93~112% 용해) 및 정상 인간 혈청(83% 용해)을 사용한 경우의 용해와 유사하였다. C1q 분자의 인간화는 랫트 C1q와 비교했을 때, CD20 항체에 의해 매개된 라지 세포의 보체 의존성 용해를 변화시키지 않았다.

[0307] **(2) C1q 인간화 랫트 혈액 중 황색 포도상구균의 생존율 및 이중특이적 항체의 효과**

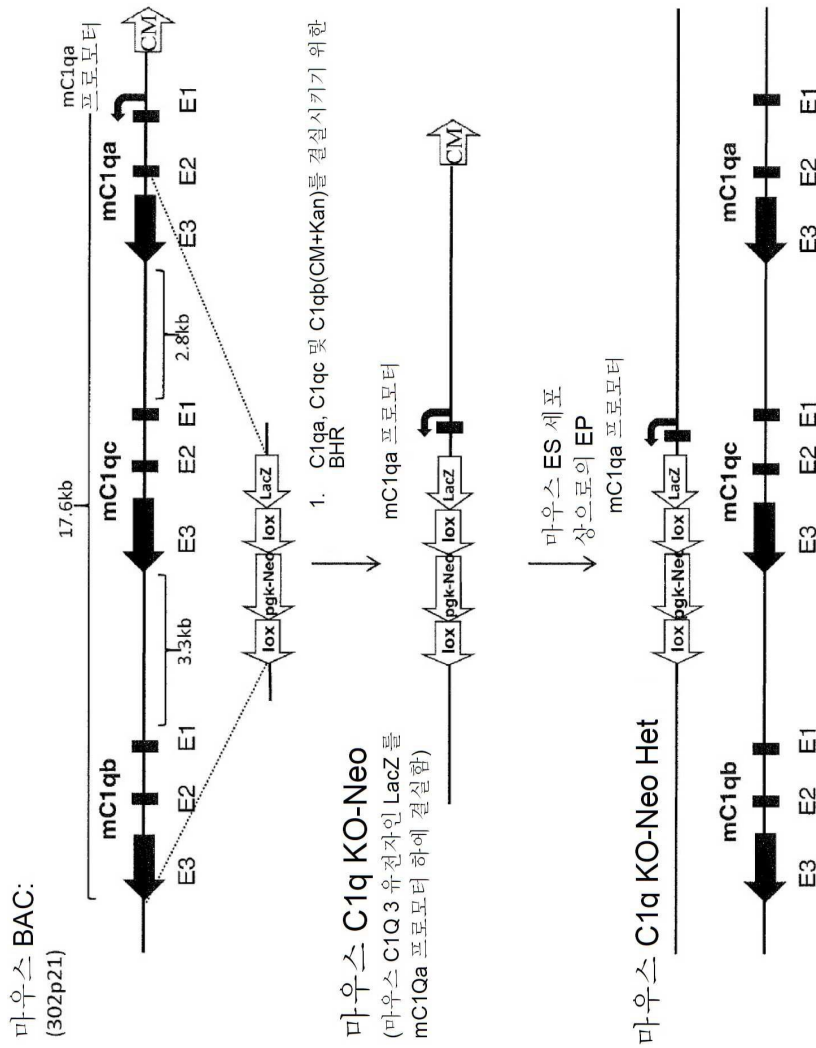
[0308] 인간 전혈 중 황색 포도상구균의 생존율은, 박테리아의 성장을 조절하는 데 있어서 보체 및 면역 효과기 세포의 역할을 탐구하는 생체 외 분석에서 평가할 수 있다(Thammavongsa 등의 J Exp Med. 2009 Oct26;206(11):2417-27 참조). 이러한 분석에서는, 황색 포도상구균의 생존율을 조절함에 있어서, C1q 및 황색 포도상구균을 표적으로 하는 이중특이적 항체의 활성을 측정하는데, 여기서 이중특이적 항체를 전혈에 첨가하고, 24시간 후에 생존율을 평가한다. 이러한 분석을, C1q 인간화 랫트 혈액을 사용하고, 황색 포도상구균 항원과 인간 또는 인간화 C1q 단백질은 특이적으로 인식하지만 랫트 C1q 단백질은 인식하지 않는 이중특이적 항체의 효과를 매개하는 데 있어서 인간화 키메라 C1q 단백질의 기능을 조사하는 본 실시예에 맞게 구성하였다. 동일한 황색 포도상구균 항원에 대한 2가 단일특이적 항체를 대조군으로서 사용하였다.

[0309] 요약하자면, 황색 포도상구균 뉴먼을 RPMI에서 밤새 성장시키고, PBS에서 세척하고, 1.25×10^8 콜로니 형성 단위(CFU)/mL의 농도로 PBS에 재현탁하고, 10^5 CFU/mL의 농도로 연속 희석하였다. 복제 시, 10^4 CFU의 황색 포도상구균 현탁액을 100 ug/mL의 이중특이적 항체, 대조군 항체 또는 무항체 대조군, 및 100 uL의 인간화 C1q 또는 야생형(WT) 랫트 혈액과 (응고를 방지하기 위해 500 nM 다비가트란(dabigatran)이 추가된 항응고제로서의 구연산나트륨 중에서) 혼합하였다. 샘플을 37°C의 96 웰 플레이트에서 진탕하며(100 rpm) 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 100 uL의 응집 용해 완충액(200U 스트렙토키나제, 2 ug/mL RNase, 10 ug/mL DNase, 0.5% 사포닌, PBS 1 mL당 100 ug 트립신으로 보충된 PBS)을 샘플에 첨가하고 펠릿이 사라질 때까지 격렬하게 휘저었다. 각 샘플로부터 유래된 총 50 uL를 PBS에서 연속 희석하고, LB 한천 플레이트 상에 도말하여 CFU를 계수하였다.

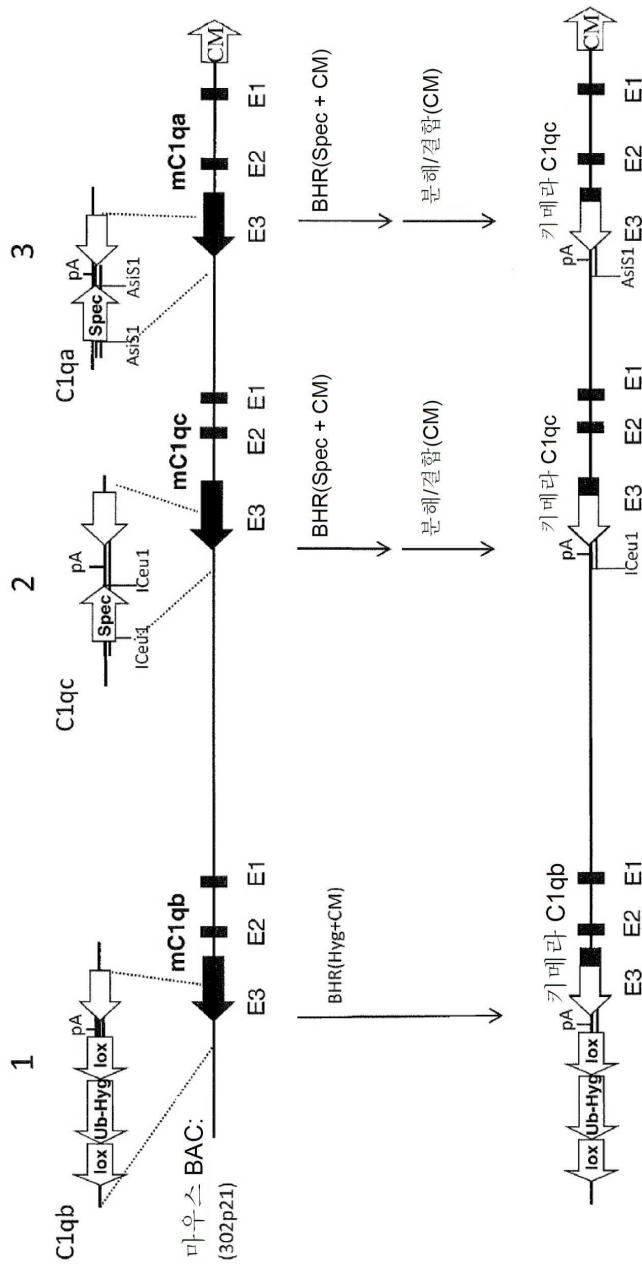
[0310] 이 분석에서는, 11마리의 인간화 C1q 랫트 및 10마리의 WT 랫트로부터 신선하게 채취한 혈액 샘플을 시험하였다. 이중특이적 항체 또는 대조군 항체로 치료한 후, 황색 포도상구균의 생존율을 결정하였다. 시험 항체가 없는 상태에서 랫트 혈액의 전체 성장은 100%로 정규화된다. 이중특이적 항체로 치료한 WT 랫트 혈액 중 황색 포도상구균의 생존율은 58~131%의 범위인 반면, 이중특이적 항체로 치료한 C1q 인간화 랫트 혈액에서의 생존율은 7~49%였다. 대조군 항체로 치료한 WT 랫트 혈액 중 황색 포도상구균의 생존율은 40~139%의 범위였고, 대조군 항체로 치료한 C1q 인간화 랫트 혈액에서의 생존율은 61~114%였다.

도면

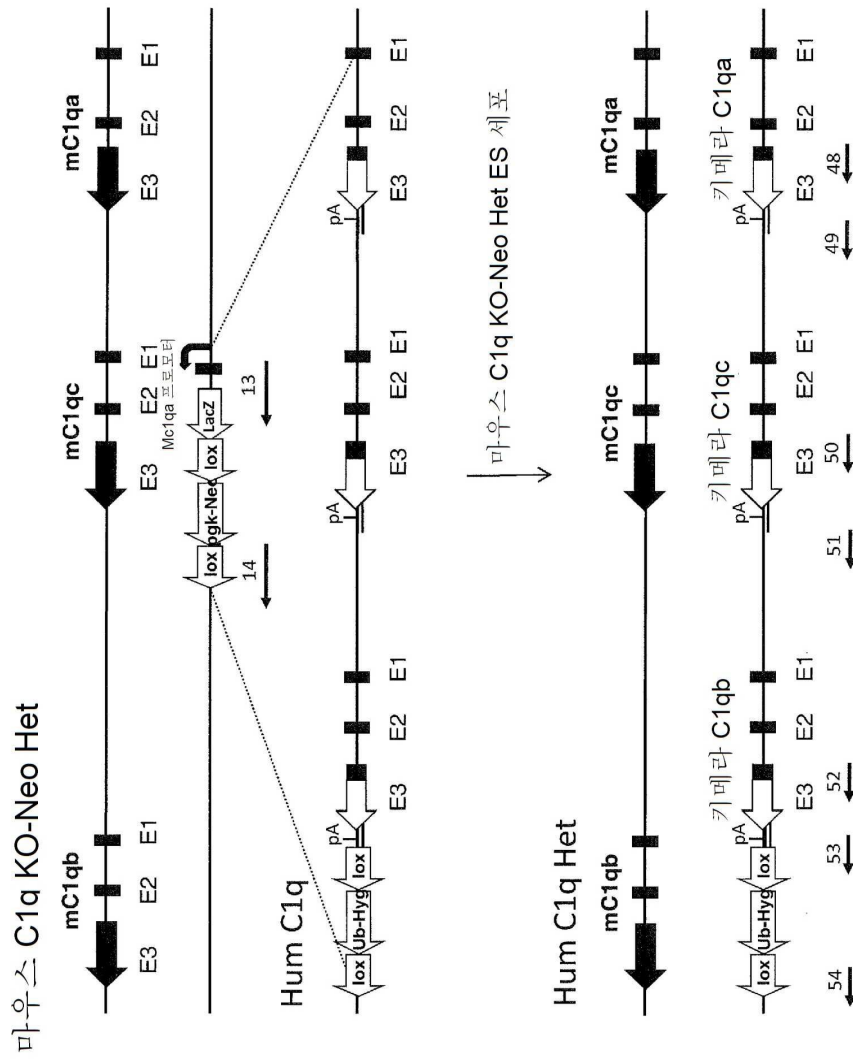
도면1a



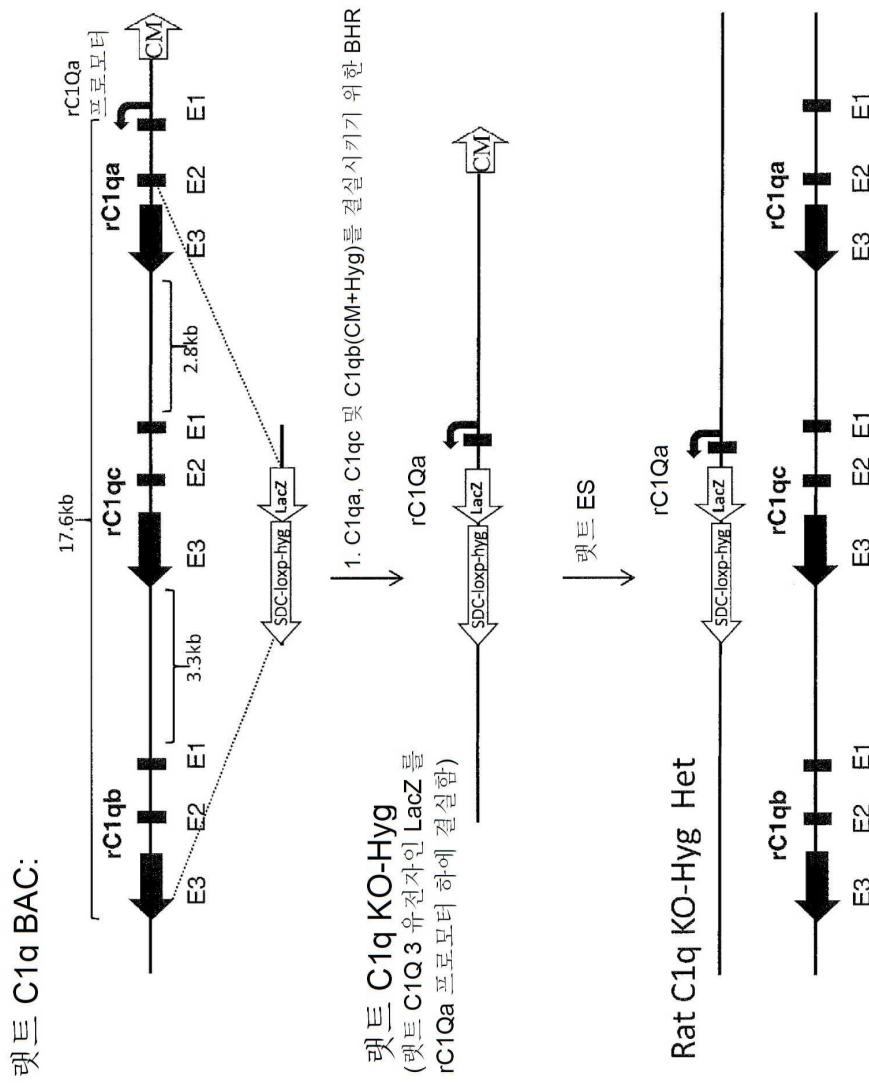
도면1b



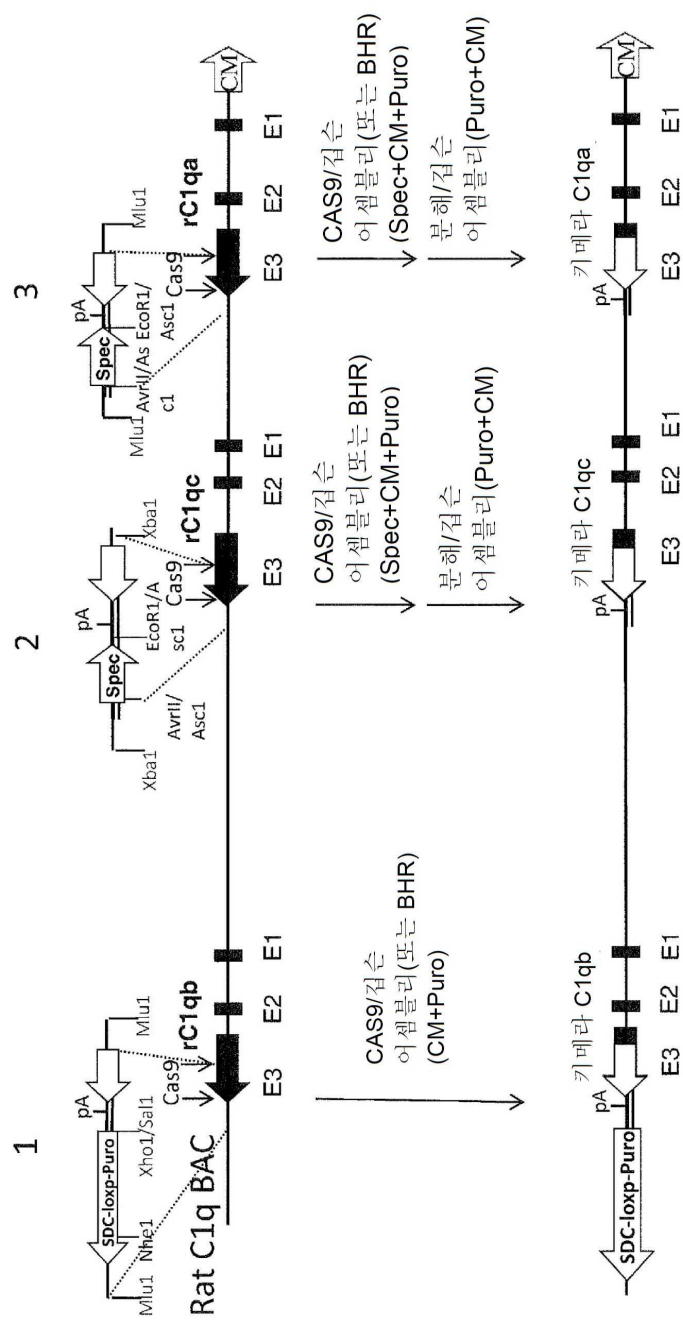
도면1c



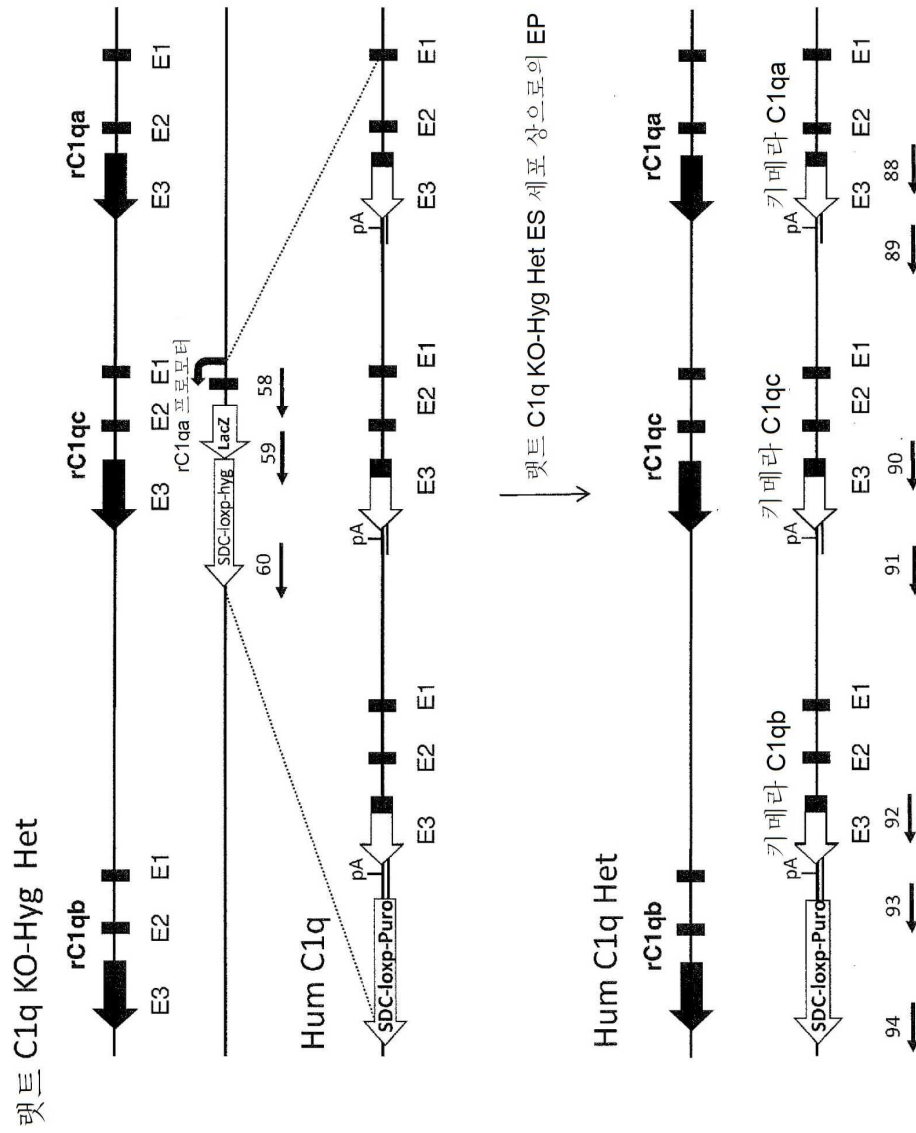
도면2a



도면2b

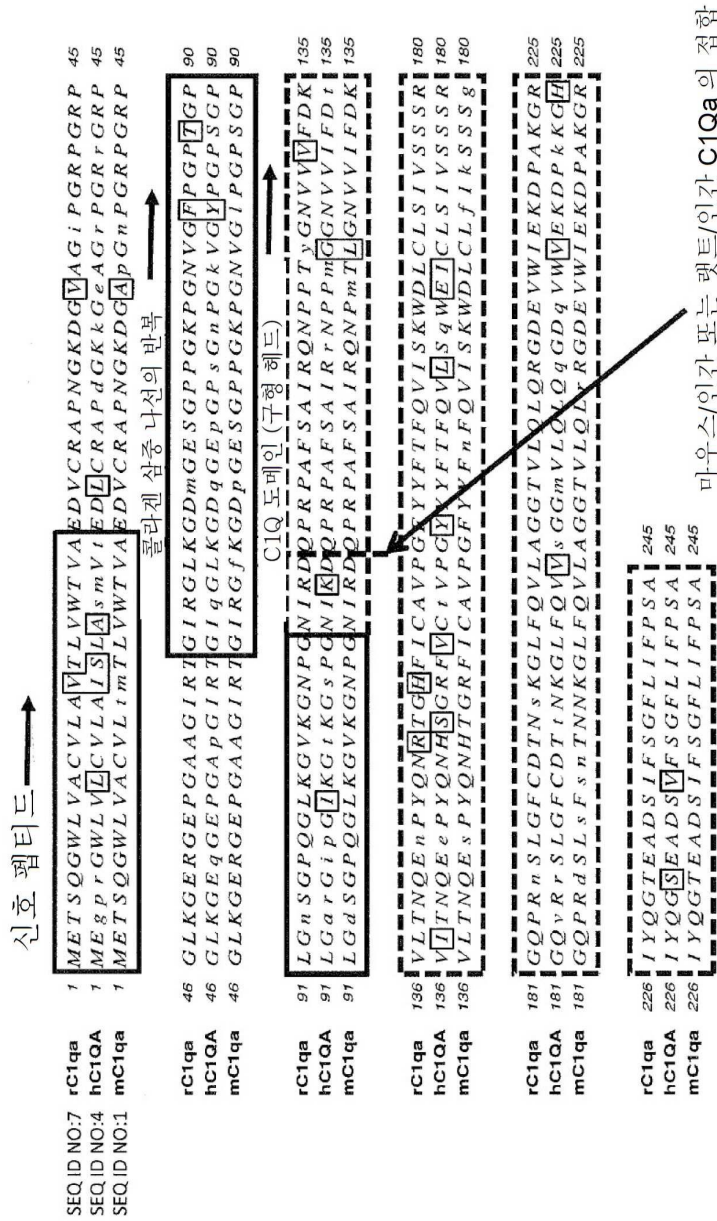


도면2c



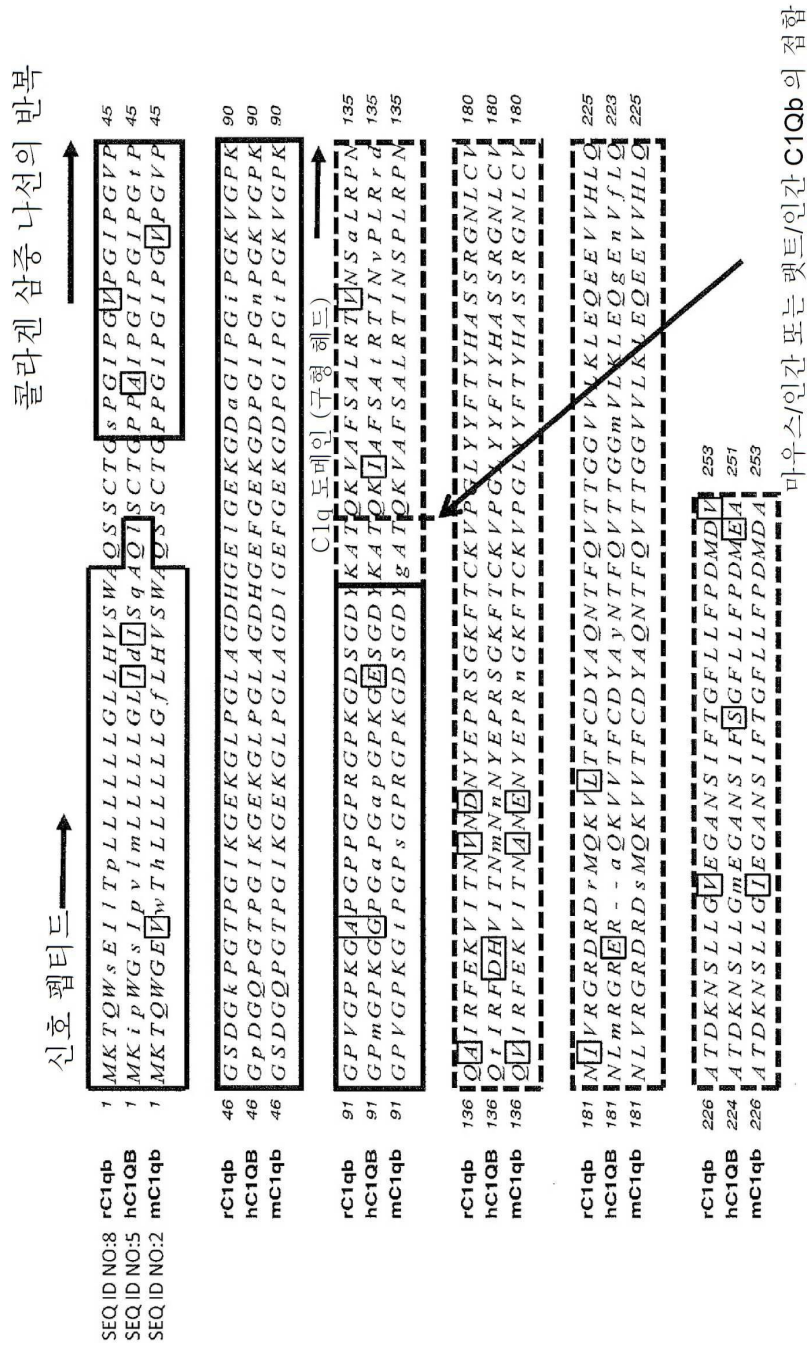
도면3a

C1Qa 정렬

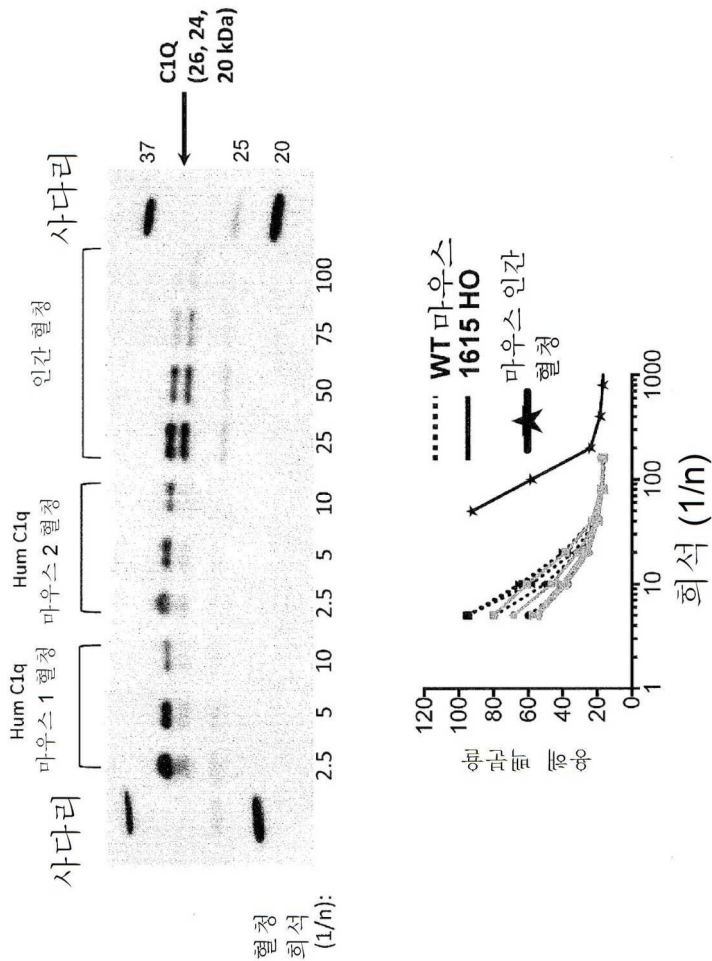


도면3b

C1Qb 정렬

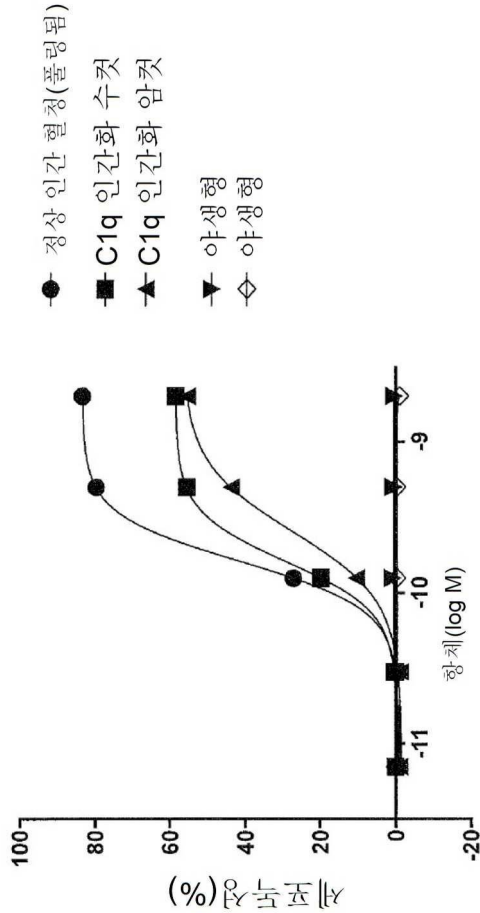


도면4



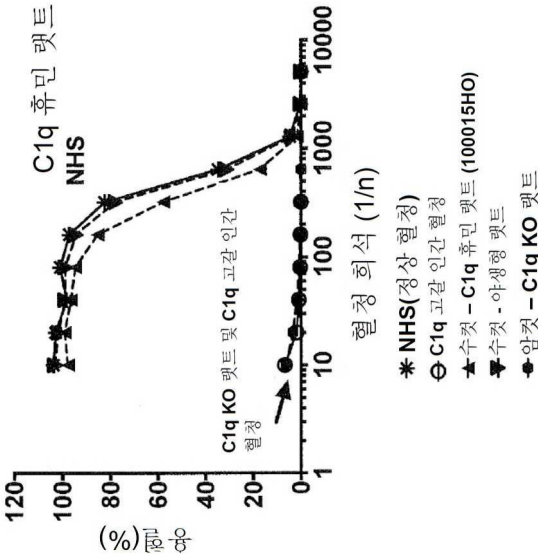
도면5

라지 세포를 사용한 CD20 hlgG

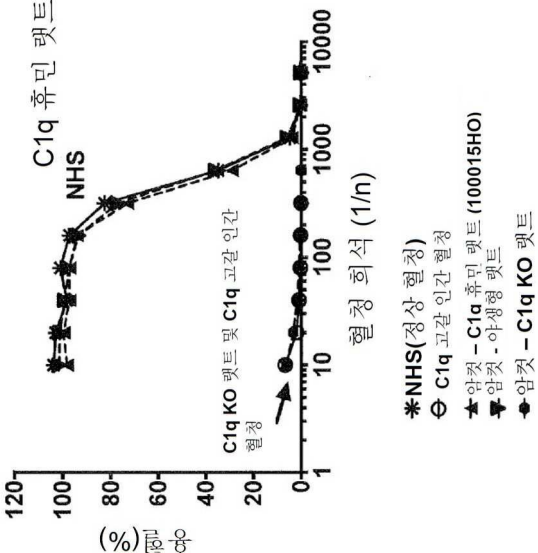


도면6

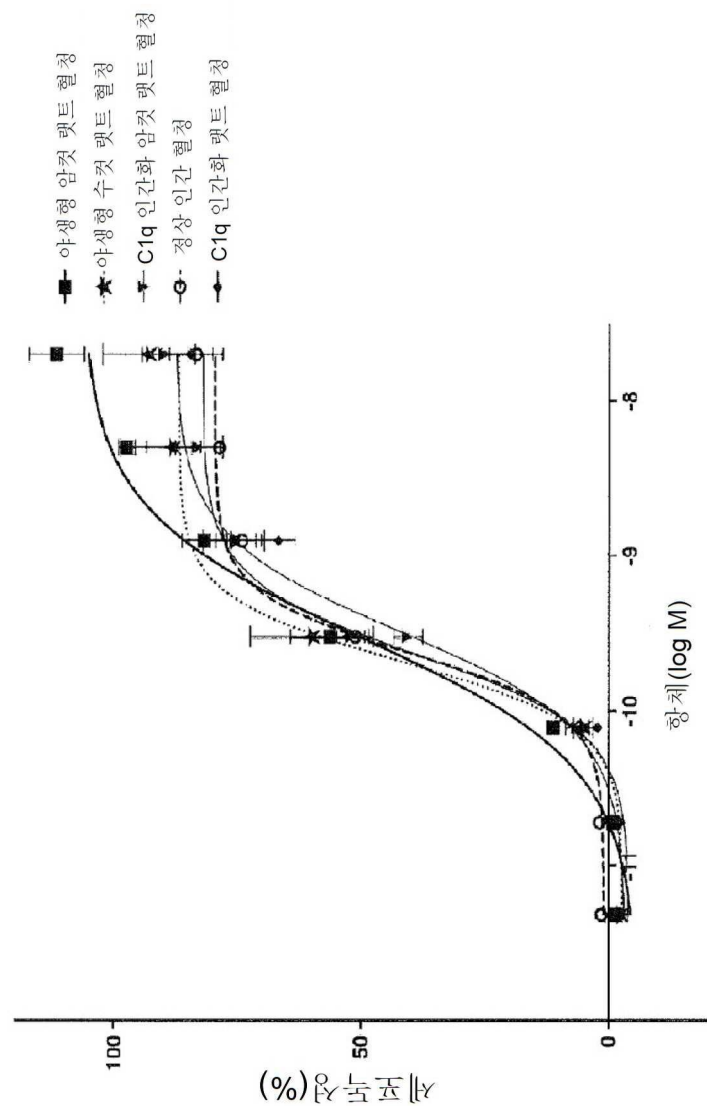
용혈 분석의 고전적 경로 60 분, 37°C 수컷 C1q 휴민 랫트



용혈 분석의 고전적 경로 60 분, 37°C 암컷 C1q 휴민 랫트



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Non-Human Animals Expressing Humanized C1Q Complex
- <130> 35342 (10353W001)
- <150> 62/565,438
- <151> 2017-09-29
- <160> 94
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 245

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Glu Thr Ser Gln Gly Trp Leu Val Ala Cys Val Leu Thr Met Thr

1 5 10 15

Leu Val Trp Thr Val Ala Glu Asp Val Cys Arg Ala Pro Asn Gly Lys

20 25 30

Asp Gly Ala Pro Gly Asn Pro Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly Leu Lys

35 40 45

Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Ala Gly Ile Arg Thr Gly Ile Arg

50 55 60

Gly Phe Lys Gly Asp Pro Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly

65 70 75 80

Asn Val Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Asp Ser Gly Pro

85 90 95

Gln Gly Leu Lys Gly Val Lys Gly Asn Pro Gly Asn Ile Arg Asp Gln

100 105 110

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Gln Asn Pro Met Thr Leu Gly

115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Lys Val Leu Thr Asn Gln Glu Ser Pro Tyr

130 135 140

Gln Asn His Thr Gly Arg Phe Ile Cys Ala Val Pro Gly Phe Tyr Tyr

145 150 155 160

Phe Asn Phe Gln Val Ile Ser Lys Trp Asp Leu Cys Leu Phe Ile Lys

165 170 175

Ser Ser Ser Gly Gly Gln Pro Arg Asp Ser Leu Ser Phe Ser Asn Thr

180 185 190

Asn Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Leu Ala Gly Gly Thr Val Leu Gln

195 200 205

Leu Arg Arg Gly Asp Glu Val Trp Ile Glu Lys Asp Pro Ala Lys Gly

210 215 220

Arg Ile Tyr Gln Gly Thr Glu Ala Asp Ser Ile Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240
 Ile Phe Pro Ser Ala
 245
 <210> 2
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Met Lys Thr Gln Trp Gly Glu Val Trp Thr His Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Phe Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Pro
 20 25 30
 Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp
 35 40 45
 Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asp Leu Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Ile
 65 70 75 80
 Pro Gly Thr Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys
 85 90 95
 Gly Thr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly
 100 105 110
 Asp Tyr Gly Ala Thr Gln Lys Val Ala Phe Ser Ala Leu Arg Thr Ile
 115 120 125
 Asn Ser Pro Leu Arg Pro Asn Gln Val Ile Arg Phe Glu Lys Val Ile
 130 135 140
 Thr Asn Ala Asn Glu Asn Tyr Glu Pro Arg Asn Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly
 165 170 175
 Asn Leu Cys Val Asn Leu Val Arg Gly Arg Asp Arg Asp Ser Met Gln

180 185 190
 Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Gln Asn Thr Phe Gln Val Thr
 195 200 205
 Thr Gly Gly Val Val Leu Lys Leu Glu Gln Glu Glu Val Val His Leu
 210 215 220
 Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Ile Glu Gly Ala Asn Ser

225 230 235 240
 Ile Phe Thr Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Asp Ala
 245 250

<210> 3

<211> 246

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Val Val Gly Pro Ser Cys Gln Pro Pro Cys Gly Leu Cys Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Ser Ala Gly
 20 25 30
 Cys Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Met Pro Gly Ala Pro Gly Lys

35 40 45
 Asp Gly His Asp Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro
 50 55 60
 Ala Val Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly
 65 70 75 80
 Met Pro Gly His Arg Gly Lys Asn Gly Pro Arg Gly Thr Ser Gly Leu
 85 90 95
 Pro Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Val Glu

100 105 110
 Gly Arg Tyr Lys Gln Lys His Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln
 115 120 125
 Thr Thr Gln Tyr Pro Glu Ala Asn Ala Leu Val Arg Phe Asn Ser Val
 130 135 140

Val Thr Asn Pro Gln Gly His Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Lys Phe Thr
145 150 155 160
Cys Glu Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr Tyr Thr Ser His Thr
165 170 175
Ala Asn Leu Cys Val His Leu Asn Leu Asn Leu Ala Arg Val Ala Ser
180 185 190
Phe Cys Asp His Met Phe Asn Ser Lys Gln Val Ser Ser Gly Gly Val
195 200 205
Leu Leu Arg Leu Gln Arg Gly Asp Glu Val Trp Leu Ser Val Asn Asp
210 215 220
Tyr Asn Gly Met Val Gly Ile Glu Gly Ser Asn Ser Val Phe Ser Gly
225 230 235 240
Phe Leu Leu Phe Pro Asp
245
<210> 4
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Met Glu Gly Pro Arg Gly Trp Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Ile Ser
1 5 10 15
Leu Ala Ser Met Val Thr Glu Asp Leu Cys Arg Ala Pro Asp Gly Lys
20 25 30
Lys Gly Glu Ala Gly Arg Pro Gly Arg Arg Gly Arg Pro Gly Leu Lys
35 40 45
Gly Glu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ile Arg Thr Gly Ile Gln
50 55 60
Gly Leu Lys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly
65 70 75 80
Lys Val Gly Tyr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile
85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly

115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr

130 135 140

Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr

145 150 155 160

Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val

165 170 175

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr

180 185 190

Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln

195 200 205

Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly

210 215 220

His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu

225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala

245

<210> 5

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr Gly Pro

20 25 30

Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Pro Asp

35 40 45

Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Ile
 65 70 75 80
 Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly Pro Lys
 85 90 95
 Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ser Gly
 100 105 110

Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg Thr Ile
 115 120 125
 Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His Val Ile
 130 135 140
 Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly
 165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln Lys Val
 180 185 190
 Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr Thr Gly
 195 200 205
 Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu Gln Ala
 210 215 220
 Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser Ile Phe
 225 230 235 240

Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
 245 250

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu

1	5	10	15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys			
	20	25	30
Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp			
	35	40	45
Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala			
	50	55	60
Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu			
65	70	75	80
Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro			
	85	90	95
Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly			
	100	105	110
Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr			
	115	120	125
His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu			
	130	135	140
Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys			
145	150	155	160
Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala			
	165	170	175
Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe			
	180	185	190
Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu			
	195	200	205
Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr			
	210	215	220
Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe			
225	230	235	240
Leu Leu Phe Pro Asp			
	245		

<210> 7

<211> 245

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Glu Thr Ser Gln Gly Trp Leu Val Ala Cys Val Leu Ala Val Thr
1 5 10 15

Leu Val Trp Thr Val Ala Glu Asp Val Cys Arg Ala Pro Asn Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Val Ala Gly Ile Pro Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Ala Gly Ile Arg Thr Gly Ile Arg
50 55 60

Gly Leu Lys Gly Asp Met Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly
65 70 75 80

Asn Val Gly Phe Pro Gly Pro Thr Gly Pro Leu Gly Asn Ser Gly Pro
85 90 95

Gln Gly Leu Lys Gly Val Lys Gly Asn Pro Gly Asn Ile Arg Asp Gln
100 105 110

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Gln Asn Pro Pro Thr Tyr Gly
115 120 125

Asn Val Val Val Phe Asp Lys Val Leu Thr Asn Gln Glu Asn Pro Tyr
130 135 140

Gln Asn Arg Thr Gly His Phe Ile Cys Ala Val Pro Gly Phe Tyr Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Phe Gln Val Ile Ser Lys Trp Asp Leu Cys Leu Ser Ile Val
165 170 175

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Pro Arg Asn Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
180 185 190

Asn Ser Lys Gly Leu Phe Gln Val Leu Ala Gly Gly Thr Val Leu Gln
195 200 205

Leu Gln Arg Gly Asp Glu Val Trp Ile Glu Lys Asp Pro Ala Lys Gly

210 215 220
 Arg Ile Tyr Gln Gly Thr Glu Ala Asp Ser Ile Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala
 245

<210> 8

<211> 253

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Met Lys Thr Gln Trp Ser Glu Ile Leu Thr Pro Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Ser

20 25 30

Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp

35 40 45

Gly Lys Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly

50 55 60

Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Leu Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Ile

65 70 75 80

Pro Gly Ile Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys

85 90 95

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly

100 105 110

Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Val Ala Phe Ser Ala Leu Arg Thr Val

115 120 125

Asn Ser Ala Leu Arg Pro Asn Gln Ala Ile Arg Phe Glu Lys Val Ile

130 135 140

Thr Asn Val Asn Asp Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys

145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly

165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Ile Val Arg Gly Arg Asp Arg Asp Arg Met Gln

180 185 190

Lys Val Leu Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Gln Asn Thr Phe Gln Val Thr

195 200 205

Thr Gly Gly Val Val Leu Lys Leu Glu Gln Glu Glu Val Val His Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Ile Phe Thr Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Asp Val

245 250

<210> 9

<211> 248

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

Met Leu Arg Met Val Val Gly Thr Ser Cys Gln Pro Gln His Gly Leu

1 5 10 15

Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Asn

20 25 30

Ala Gly Cys Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Thr Pro

35 40 45

Gly Lys Asp Gly His Asp Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly

50 55 60

Ile Pro Ala Ile Pro Gly Thr Gln Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu

65 70 75 80

Pro Gly Met Pro Gly His Arg Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Thr Ser

85 90 95

Gly Ser Pro Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly

100 105 110

Glu Glu Gly Arg Tyr Lys Gln Lys His Gln Ser Val Phe Thr Val Thr

115 120 125
 Arg Gln Thr Ala Gln Tyr Pro Ala Ala Asn Gly Leu Val Lys Phe Asn
 130 135 140
 Ser Ala Ile Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asn Thr Asn Thr Gly Lys
 145 150 155 160
 Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val His His Thr Ser

 165 170 175
 Gln Thr Ala Asn Leu Cys Val Gln Leu Leu Leu Asn Asn Ala Lys Val
 180 185 190
 Thr Ser Phe Cys Asp His Met Ser Asn Ser Lys Gln Val Ser Ser Gly
 195 200 205
 Gly Val Leu Leu Arg Leu Gln Arg Gly Asp Glu Val Trp Leu Ala Val
 210 215 220
 Asn Asp Tyr Asn Gly Met Val Gly Thr Glu Gly Ser Asp Ser Val Phe

 225 230 235 240
 Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp
 245
 <210> 10
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide sequence of a chimeric mouse/human Clqa
 <400> 10
 Met Glu Thr Ser Gln Gly Trp Leu Val Ala Cys Val Leu Thr Met Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Trp Thr Val Ala Glu Asp Val Cys Arg Ala Pro Asn Gly Lys
 20 25 30

 Asp Gly Ala Pro Gly Asn Pro Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly Leu Lys
 35 40 45
 Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Ala Gly Ile Arg Thr Gly Ile Arg
 50 55 60
 Gly Phe Lys Gly Asp Pro Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly

65 70 75 80
 Asn Val Gly Leu Pro Gly Pro Thr Gly Pro Leu Gly Asp Ser Gly Pro
 85 90 95

 Gln Gly Leu Lys Gly Val Lys Gly Asn Pro Gly Asn Ile Arg Asp Gln
 100 105 110
 Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly
 115 120 125
 Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr
 130 135 140
 Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 145 150 155 160

 Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
 165 170 175
 Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
 180 185 190
 Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
 195 200 205
 Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
 210 215 220

 His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240
 Ile Phe Pro Ser Ala
 245

 <210> 11
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide sequence of a chimeric mouse/human Clqb
 <400> 11
 Met Lys Thr Gln Trp Gly Glu Val Trp Thr His Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Phe Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Pro

20 25 30

Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp

35 40 45

Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly

50 55 60

Leu Ala Gly Asp Leu Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Ile

65 70 75 80

Pro Gly Thr Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys

85 90 95

Gly Thr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly

100 105 110

Asp Tyr Gly Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg Thr Ile

115 120 125

Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His Val Ile

130 135 140

Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys

145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly

165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln Lys Val

180 185 190

Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr Thr Gly

195 200 205

Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu Gln Ala

210 215 220

Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser Ile Phe

225 230 235 240

Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala

245 250

<210> 12

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of a chimeric mouse/human Clqc

<400> 12

Met Val Val Gly Pro Ser Cys Gln Pro Pro Cys Gly Leu Cys Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Ser Ala Gly

20 25 30

Cys Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Met Pro Gly Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Asp Gly His Asp Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro

50 55 60

Ala Val Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly

65 70 75 80

Met Pro Gly His Arg Gly Lys Asn Gly Pro Arg Gly Thr Ser Gly Leu

85 90 95

Pro Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Val Glu

100 105 110

Gly Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln

115 120 125

Thr His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val

130 135 140

Leu Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr

145 150 155 160

Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr

165 170 175

Ala Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr

180 185 190

Phe Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val

195 200 205

Leu Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp

210

215

220

Tyr Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly

225

230

235

240

Phe Leu Leu Phe Pro Asp

245

<210> 13

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 13

cataccagct gtcctgtgt gtctctgtag ggacacatg ggtaccgatt taaatgatcc 60

agtggtc 67

<210> 14

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 14

gcagccccta gataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatcctag gctatccaac 60

accatcttcc tgc 73

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 15

tcccgcacca tcctggagge aat 23

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 16
 taagcgttct ctccggctgg 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 17
 cgcttctcag gacccctaaa c 21
 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 18
 cgatactgtc gtcgtccct caaactg 27
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 19
 ggagtgcgat cttctgagg 20
 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 20
 cgcacgtaa ccgtgcac 19
 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 21

tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 22

ggtggagagg ctattcggc 19

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 23

gaacacggcg gcatcag 17

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 24

aggaccatca acagcccctt gcgac 25

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 25

gaaagtcgcc ttctctgccc 20

<210> 26

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 26
 cgaagcgaat gacctggttc 20
 <210> 27
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 27
 tgacaaggtc ctcaccaacc aggagag 27

 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 28
 cgcttggcaa cgtggttat 19
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 29
 cccgtgtggt tctggtatgg 20
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 30

tatgagccac gcaacggcaa gttca	25
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 31	
tcaccaacgc gaacgagaa	19
<210> 32	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 32	
ggccaggcac cttgca	16
<210> 33	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 33	
cccacctca ctcagacctc ttctcca	28
<210> 34	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 34	
cacctcgctc cctctgctt	19
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 35
 caggaaccag ggtggacttc 20
 <210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 36
 caacgtggtc atcttcgaca cgggtca 26
 <210> 37
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 37
 cggaaccccc caatgg 16
 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 38
 tggttctggt acggttcttc ct 22
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 39
 accatcaacg tccccctgcg c 21
 <210> 40
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 40
 aatcgcccttc tctgccacaa 20
 <210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 41
 gtggtcgaag cggatggt 18
 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 42
 cacctgcaaa gtccccggcc tc 22
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 43
 tgacacgagc actggcaagt 20
 <210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 44
 cgacgcgtgg tagacaaagt ag 22
 <210> 45

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 45
 acgagcgggt tcggccatt c 21

 <210> 46
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 46
 tgcggccgat cttagcc 17
 <210> 47
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 47
 ttgaccgatt ccttgagg 18
 <210> 48
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 48
 cggccccaa ggactgaagg gcgtgaaagg caatccaggc aatatcaggg accagccgag 60

 gccagccttc tccgccattc ggcggaacct cccaatgggg ggc 103
 <210> 49
 <211> 104
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 49
 ttgagaggga ggcctaagaa taataacaat ccagtgccta agagtcaggc gcgatcgctg 60
 atgcacgcct ttaatccag cacttgggag gcagagacag gtga 104
 <210> 50
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 50
 gccaggggac ccaggcccca gggggcctcc gggggagcca ggtgtggagg gccgatacaa 60
 gcagaaattc cagtcagtgt tcacggtcac tcggcagacc cacca 105
 <210> 51
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 51
 tgaatttcgg atcttcaact ttgcatcagc catagctggg ctctggactc tacctaacta 60
 taacggtcct aaggtagcga aagggggatg atttgagat 99
 <210> 52
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 52
 tccaggcccc tctggacccc gcggtcccaa aggcgattct ggggactacg gggctacaca 60
 gaaaatcgcc ttctctgcca caagaacat caacgtcccc ctgcgccggg 110
 <210> 53
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 53

gcacctggca caccagaagt gccatgctca gaaatgttgg ttacatgaat gaatgcggcc 60
gcaccggtat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt a 101
<210> 54
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 54
ccggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac gaatgttcat 60
aggctgggga gatggctcag tcagtaaagt acttagcttg c 101
<210> 55
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> polypeptide sequence of a chimeric rat/human Clqa
<400> 55
Met Glu Thr Ser Gln Gly Trp Leu Val Ala Cys Val Leu Ala Val Thr
1 5 10 15
Leu Val Trp Thr Val Ala Glu Asp Val Cys Arg Ala Pro Asn Gly Lys
20 25 30
Asp Gly Val Ala Gly Ile Pro Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly Leu Lys
35 40 45
Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Ala Gly Ile Arg Thr Gly Ile Arg
50 55 60
Gly Leu Lys Gly Asp Met Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly
65 70 75 80
Asn Val Gly Phe Pro Gly Pro Thr Gly Pro Leu Gly Asn Ser Gly Pro
85 90 95
Gln Gly Leu Lys Gly Val Lys Gly Asn Pro Gly Asn Ile Arg Asp Gln
100 105 110
Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly
115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr
130 135 140
Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
145 150 155 160
Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
165 170 175
Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
180 185 190
Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
195 200 205
Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
210 215 220
His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
225 230 235 240
Ile Phe Pro Ser Ala
245
<210> 56
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> polypeptide sequence of a chimeric rat/human Clqb
<400> 56
Met Lys Thr Gln Trp Ser Glu Ile Leu Thr Pro Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Gly Leu Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Ser
20 25 30
Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp
35 40 45
Gly Lys Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly
50 55 60
Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Leu Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Ile
65 70 75 80

Pro Gly Ile Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys
85 90 95

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly
100 105 110

Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg Thr Ile
115 120 125

Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His Val Ile
130 135 140

Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys
145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly
165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln Lys Val
180 185 190

Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr Thr Gly
195 200 205

Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu Gln Ala
210 215 220

Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser Ile Phe
225 230 235 240

Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
245 250

<210> 57

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of a chimeric rat/human Clqc

<400> 57

Met Leu Arg Met Val Val Gly Thr Ser Cys Gln Pro Gln His Gly Leu
1 5 10 15

Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Asn

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

85 90 95
Gly Ser Pro Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly
100 105 110
Glu Glu Gly Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr
115 120 125
Arg Gln Thr His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn
130 135 140
Ala Val Leu Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys

145 150 155 160
Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser
165 170 175
His Thr Ala Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val
180 185 190
Val Thr Phe Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly
195 200 205
Gly Val Leu Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val

210 215 220
Asn Asp Tyr Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe
225 230 235 240
Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp

245

<210> 58
<211> 103
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 58
 gattctccca atctctcttc tgcaggacca ctggatcatt taaatcggtta cccatgatgt 60
 tcctgcagag acacacaggg accccgggca tgctggacag tca 103

<210> 59
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 59
 tagttatcga gcccggggat ccactagttc tagtgtttaa actctagccg ggggatccag 60
 acatgataag atacattgat gagtttgac aaaccacaac t 101

<210> 60
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 60
 aggattactg gcaggaggga ggTTTTGGAT aggagtgatt tgaccccggtg agctagcata 60
 acttcgtata gcatacatta tacgaagtta tctaggggct g 101

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 61
 aaccaccca cgtatggcaa cgt 23

<210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 62	
gccagctttc tcagctattc g	21
<210> 63	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 63	
gcggttctgg tatggattct c	21
<210> 64	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 64	
aaacaccttc caggtcacca cggg	24
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 65	
tctcaccttc tgcgactatg c	21
<210> 66	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 66	
cctgctccag cttcaagact ac	22
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 67
 acgagcgggt tcggcccatt c 21
 <210> 68
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 68
 tgcggccgat cttagcc 17
 <210> 69
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 69
 ttgaccgatt ccttgagg 18
 <210> 70
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 70
 cgatactgtc gtcgtcccct caaactg 27
 <210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 71
 ggagtgcgat cttcctgagg 20
 <210> 72
 <211> 19

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 72	
cgcatcgtaa ccgtgcatc	19
<210> 73	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 73	
aaccaccga cgtatggcaa cgt	23
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 74	
gccagctttc tcagctattc g	21
<210> 75	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 75	
gcggttctgg tatggattct c	21
<210> 76	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 76	
aaacaccttc caggtcacca cggg	24

<210> 77
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 77
 tctcaccttc tgcgactatg c 21
 <210> 78
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 78
 cctgctccag cttcaagact ac 22

 <210> 79
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 79
 ccttccaggt gctgtcccag tg 22
 <210> 80
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 80
 gtaccggct actactactt ca 22
 <210> 81
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 81

gagacgatgg acaggcagat ttc	23
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 82	
accatcaacg tccccctgcg c	21
<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 83	
aatcgcccttc tctgccacaa	20
<210> 84	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 84	
gtggtcgaag cggatggt	18
<210> 85	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic oligonucleotide	
<400> 85	
cacctgcaaa gtccccggcc tc	22
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 86

tgacacgagc actggcaagt 20

<210> 87

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 87

cgacgcgtgg tagacaaagt ag 22

<210> 88

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 88

gcccccaagg gttgaaaggt gtgaaaggca atccgggcaa tatcaggac cagccgaggc 60

cagccttctc cgccattcgg cggaaccccc caatgggggg ca 102

<210> 89

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 89

gcattgagag ggaggcctaa gaataataac aatccagtgc ttaagagtca ggcgctgggt 60

agctgcccc cgttctgcca tctctgcac tcctgttgc ggggcc 106

<210> 90

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 90

gggatccagg ccccgagggt cctcccgagg agccgggtga ggagggtcga tacaagcaga 60

aattccagtc agtggtcacg gtcactcggc agacccacca gcccc 105

<210> 91

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 91

tgaatttcgg atcttcaact ttgcatcagc catagctggg ctctggactc gaatggcagg 60

ctgggtccag caccgcgacg cccgcctcgc tccctctgct 100

<210> 92

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 92

gcccccttg accccgcggt cccaaagtg actctggaga ctacaaggct acccagaaaa 60

tcgcttctc tgccacaaga accatcaacg tccccctgcg ccgg 104

<210> 93

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 93

ctggcacacc agaagtgcc tgctcagaaa tgttggttac atgaatgaat gtcgagataa 60

cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat atgcatgcc g 101

<210> 94

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 94

ggcggcctag ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagg taactataac 60

ggtcctaagg tagcgagcta gtcacgggg tcaaatcact cctatccaaa acctcctccc 120

tgccagtaat cc

132