



등록특허 10-2459666



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월27일

(11) 등록번호 10-2459666

(24) 등록일자 2022년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0278 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7042563(분할)

(22) 출원일자(국제) 2013년03월15일

심사청구일자 2021년12월27일

(85) 번역문제출일자 2021년12월27일

(65) 공개번호 10-2022-0002718

(43) 공개일자 2022년01월06일

(62) 원출원 특허 10-2021-7003301

원출원일자(국제) 2013년03월15일

심사청구일자 2021년03월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/032036

(87) 국제공개번호 WO 2013/138712

국제공개일자 2013년09월19일

(30) 우선권주장

61/611,950 2012년03월16일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2009125825 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 pH-민감성 면역글로불린 서열을 발현하는 비-사람 동물

(57) 요약

본원에는 적어도 하나의 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 가변 도메인을 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 적어도 하나의 히스티딘은 동물의 생식선에서 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환, 또는 생식선 면역글로불린 핵산 서열에서 히스티딘 코돈의 삽입에 의해 코드화된다. 또한 본원에는 하나 또

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a

	종지	SEQ ID NO.	친수성	SEQ ID NO.	소수성	SEQ ID NO.
D1-1	VOLER	8	YNWND	45	GTTGT	88
HD1-1	VPLAR	9	YHNWHD	46	GTTGT	88
D1-2	V*LER	-	YNNWN	47	GTTGT	89
HD1-7	VSLAL	10	YNNWHY	48	GTTGT	89
D1-20	V*LER	-	YNNWD	45	GTTGT	89
HD1-20	V*ELR	11	YHNWD	46	GTTGT	89
D1-24	V*WELL	12	YSHVY	49	GIVALT	90
HD1-28	V*EWPL	13	YHGSHY	50	GIMCAT	91
D2-2*02	RIL***YOLLY	14	GYSSTSCYT	51	DIVVPAAI	92
HD2-2*02	RTL*SYOLPY	15	GHSHTSCHT	52	DIVVPAAI	92
D2-8*01	RILY*VCHMLY	16, 17	GVTGNGCVYT	53	DIVVMAVM	94
HD2-9*01	RTLYSWCMPY	18	GHCTHGCVHT	54	DIVLMVAYI	94
D2-15	RIL*WV*ILL	-	GYSGGSGSCYS	55	DIVVVAAT	95
HD2-15	RTL*SV*PL	-	GHCSHGSGSCHS	56	DIVVVAAT	96
D2-24*02	SILWW*LLF	19	AVCGGDCYS	57	HIVVTAI	97
HD2-24*02	STL*WWSL*PF	20	AHCGGHCHS	58	HIVVTAI	97
D3-3*01	VLRFLEWLILY	21	YYDFWSSGYYT	59	ITIFGVII	98
HD3-3*01	VSPFLEWSLY	22	YHHFWSSGHYT	60	ITIFGVII	98
D3-4	VLRYFDWLIL*	23	YYDLITGYNN	61	ITIFLVII	99, 100
HD3-8	VSPYFDWSL*	24	YHHILTGHYN	62	ITIFLVII	99, 100
D3-10*01	VLIWFGEIL*	25	YYFGSGSSYNN	63	ITMVRGVII	101
HD3-10*01	VSPWFGEISL*	26	YHHGSGSGHYN	64	ITMVRGVII	101
D3-16*02	VI*LRLGELSLY	27	YYDVVWGSYRYT	65	IMITFGGVIVI	102
HD3-16*02	V\$BRLGEGESLY	28	YDHHWGSGHRYT	66	IMITFGGVIVI	102
D3-22	VLL***WLL	29	YYDDSSGYYY	67	ITMVVVIT	103
HD3-22	VSL\$*WSSL	30, 31	YHHGSGHYY	68	ITVVVIT	104
D4-4	*LO*L	-	DYSNY	69	TTVT	105
HD4-4	*PQSL	32	DHSHY	70	TTVT	105
D4-11p	*LO*L	-	DYSNY	69	TTVT	105

는 그 이상의 CDR, N-말단 영역, 및/또는 투프 4 영역에 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 유전자가 제공된다. 면역글로불린 가변 도메인은 비-항원-결합 비-히스티딘 잔기에 대해 치환된 하나 또는 그 이상의 히스티딘(예컨대 히스티딘 클러스터)을 포함한다. 또한 본원에는 변형된 중쇄 가변 유전자좌(V, D, J 절편), 변형된 경쇄 가변 유전자좌(V, J 절편) 및 재배열된 생식선 경쇄 유전자(VJ 절편)를 포함하는 동물의 자손인 비-사람 동물이 제공된다. 또한 본원에는 pH-민감성 방식으로 항원에 결합하는 면역글로불린 도메인을 생성하는 비-사람 동물이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

마틴 조엘 에이취

미국 뉴욕 10579 프트남 밸리 쳐치 로드 244

퍼피 앤드류 제이

미국 뉴욕 10520 크로톤-온-허드슨 뉴턴 코트 10

(56) 선행기술조사문헌

US20060015957 A1
 WO2010039900 A2
 WO2011023971 A1
 WO2011111007 A2
 JP2004524841 A
 JP2012021004 A
 WO2011097603 A1
 Nature Biotechnology, Vol. 28, No. 11, pp 1203-1207, 2010.
 J. Mol. Biol. vol.270 no.4 pp.587-597, 1997.
 Curr Opin Immunol.vol.20 no.4 pp.460-470,
 2008.
 J Biol Chem., vol.285 no.13 pp.9327-9338,
 2010.
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

61/612,126 2012년03월16일 미국(US)
 61/613,352 2012년03월20일 미국(US)
 61/736,930 2012년12월13일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

재배열되지 않은 면역글로불린 가변 유전자 서열에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하는 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물 배아 줄기(ES) 세포로서,

치환 또는 삽입된 상기 히스티딘 코돈은 해당하는 야생형 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않고,

상기 비-사람 동물 ES 세포에서 발생한 비-사람 동물은 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 유전자 서열에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈으로의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입으로부터 유래된 히스티딘 아미노산을 포함하는 면역글로불린 가변 도메인을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는, 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 비-인간 동물 ES 세포는 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌를 포함하고, 적어도 첫 번째 또는 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입 또는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 유전자 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 3

제2 항에 있어서, 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌는 각각 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입 또는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 유전자 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 4

제2 항에 있어서, 상기 첫 번째 면역글로불린 가변 유전자좌는 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열의 적어도 기능성 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 5

제4 항에 있어서, 상기 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 재배열되지 않은 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열의 적어도 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 6

제4 항에 있어서, 상기 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 유전자 서열은 재배열되지 않은 V 절편, 링커를 포함하는 합성 D 절편 및 사람 J 절편을 포함하는 사람 면역글로불린 중쇄 유전자 서열인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 7

제6 항에 있어서, 상기 합성 D 절편은 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 8

제2 항에 있어서, 상기 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌는 재배열되지 않은 V_L 및 J_L 절편을 포함하는 재배

열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 서열의 적어도 기능성 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 9

제2 항에 있어서, 상기 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌는 재배열된 면역글로불린 경쇄 $V_L J_L$ 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 10

제1 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 및/또는 히스티딘 코돈의 삽입은 면역글로불린 가변 도메인을 코드화하는 핵산 서열에 있고, 삽입 또는 치환된 상기 히스티딘은 면역글로불린 사슬의 N-말단 영역, 면역글로불린 사슬의 루프 4 영역, 면역글로불린 중쇄의 CDR1, 면역글로불린 중쇄의 CDR2, 면역글로불린 중쇄의 CDR3, 면역글로불린 경쇄의 CDR1, 면역글로불린 경쇄의 CDR2, 면역글로불린 경쇄의 CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 영역에 있는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 11

제2 항에 있어서, 상기 첫 번째 면역글로불린 가변 유전자좌 또는 두 번째 면역글로불린 가변 유전자좌 중 적어도 하나는 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에서 내인성 비-사람 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 12

제5 항에 있어서, 상기 재배열되지 않은 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 13

제12 항에 있어서, 상기 재배열되지 않은 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에서 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 14

제8 항에 있어서, 상기 재배열되지 않은 V_L 및 J_L 절편을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 15

제14 항에 있어서, 상기 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 16

제1 항에 있어서,

면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 사람 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 적어도 일부를 포함하고, 이때 하나 또는 그 이상의 V_H , D_H 및 J_H 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하며, 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_H , D_H 및 J_H 절편에 치환 또는 삽입된 상기 히스티딘 코돈은 사람 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않고;

면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 V_L 및 J_L 절편을 포함하는 사

람 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열의 적어도 일부를 포함하며, 이때 하나 또는 그 이상의 V_L 및 J_L 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하고, 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_L 및 J_L 절편에 치환 또는 삽입된 상기 히스티딘 코돈은 해당하는 사람 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않으며;

상기 비-사람 동물 ES 세포에서 발생한 비-사람 동물은 각각 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_H , D_H 및 J_H 절편 및/또는 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_L 및 J_L 절편에 적어도 하나의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 삽입으로부터 유래된 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 17

제16 항에 있어서, 상기 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열은 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 18

제17 항에 있어서, 상기 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 19

제16 항에 있어서, 상기 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 20

제19 항에 있어서, 상기 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 21

제1 항에 있어서,

면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 적어도 일부분을 포함하고, 이때 하나 또는 그 이상의 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하며, 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_H , D_H 및 J_H 절편에 치환 또는 삽입된 상기 히스티딘 코돈은 해당하는 사람 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않고;

면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 사람 V_LJ_L 서열을 포함하는 사람 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함하고, 이때 V_LJ_L 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하며, V_LJ_L 서열에 치환 또는 삽입된 상기 히스티딘 코돈은 해당하는 사람 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않으며;

상기 비-사람 동물 ES 세포에서 발생한 비-사람 동물은 각각 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열의 하나 또는 그 이상의 V_H , D_H 및 J_H 절편 및/또는 V_LJ_L 서열에 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 삽입으로부터 유래된 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 배아 줄기(ES) 세포.

청구항 22

제21 항에 있어서, 상기 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 23

제22 항에 있어서, 상기 사람 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 24

제23 항에 있어서, 상기 사람 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 서열은 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 25

재배열되지 않은 VL 및 JL 유전자 절편 및 상보성 결정 영역 3 (CDR3)코드화 서열, 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 유전자 서열을 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 포함하는 비-사람 동물 배아 줄기(ES) 세포로서,

상기 히스티딘 아미노산은 해당하는 야생형 비-인간 동물 ES 세포에 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않고,

상기 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열은 2개 이하의 재배열되지 않은 VL 유전자 절편 및 하나 또는 그 이상의 JL 유전자 절편을 포함하는, 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 26

제25 항에 있어서, 2개 이하의 VL 유전자 절편은 CDR3을 암호화하는 서열에 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 27

제25 항에 있어서, 재배열되지 않은 VL 및 JL 유전자 절편은 사람 VL 및 JL 유전자 절편인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 28

제25 항에 있어서, 재배열되지 않은 VL 및 JL 유전자 절편은 사람 V_K 및 사람 J_K 유전자 절편인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 29

제25 항에 있어서, 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열은 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌에서 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 30

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-사람 동물 ES 세포는 포유류 ES 세포인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 31

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-사람 동물 ES 세포는 설치류 ES 세포인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 32

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-사람 동물 ES 세포는 쥐 ES 세포인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 33

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-사람 동물 ES 세포는 마우스 ES 세포인 것을 특징으로 하는 비-사람 동물 ES 세포.

청구항 34

삭제

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 pH 의존성 방식으로 항원에 결합할 수 있는 항체를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물에 관한 것이다. 유전자 변형된 비-사람 동물은 양성화될 수 있는 아미노산을 코드화하는 코돈의 적어도 하나의 치환 또는 삽입을 함유하도록 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함한다. 유전자 변형된 비-사람 동물은 면역글로불린 중쇄 V, D 또는 J 유전자 절편, 또는 경쇄 V 또는 J 절편, 또는 그것의 재배열된 중쇄 VDJ 영역 또는 재배열된 경쇄 VJ 영역에 적어도 하나의 히스티딘 치환 및/또는 적어도 하나의 히스티딘 삽입을 함유하도록 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함한다. 유전자 변형된 비-사람 동물은 항원 결합에서 pH 민감성을 나타내는 면역글로불린

을 발현한다. 유전자 변형된 동물은 적어도 하나의 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 가변 도메인과 관련하여 풍부해진 B 세포 집단을 포함한다. 유전자 변형된 비-사람 동물은 면역글로불린 중쇄 V, D 및/또는 J 유전자 절편, 및/또는 경쇄 V 및/또는 J 절편, 및/또는 그것의 재배열된 중쇄 VDJ 서열 또는 재배열된 경쇄 VJ 서열에 삽입 및/또는 치환으로서 존재하는 둘 또는 그 이상의 히스티딘의 클러스터를 포함한다.

[0002] 비-사람 동물의 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 이 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 자신의 게놈에 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함하고 있는 비-사람 동물, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스 및 쥐는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 이 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 항원-결합 단백질을 발현할 수 있는 유전자 (engineered) 비-사람 동물은 pH-의존성 항원 결합, 개선된 재순환성 및/또는 증대된 혈청 반감기를 가지는 것을 특징으로 한다.

제 경 기술

[0003] 면역글로불린 결합 도메인은 광범위한 형식으로, 이를테면 동족의 경쇄와 결합된 단일이량체 면역글로불린 중쇄의 관례적인 항체 방식으로 치료적으로 사용된다. 관례적인 형식을 포함하여 이를 형식 중 많은 것이 광범위한 요인으로 인해, 생체 내에서 차선의 약동학적 특징을 나타낸다. 최근 수십년 동안, 약동학을 개선하기 위하여 이질적인 접근법들이 시도되어 왔다. 그런 접근법으로는, 예를 들면 중합체에의 포함에 의해 신장 소멸을 감소시키기 위해 유체역학적 반경을 증가시키는 것(예컨대 PEG; 예를 들면 Duncan, R. (2006) Polymer conjugates as anticancer nanomedicines, Nat. Rev. Cancer 6:688-701에서 검토됨); N-글리칸의 시알릴화(예컨대 Stork, R. et al. N-glycosylation as novel strategy to improve pharmacokinetic properties of bispecific single-chain diabodies, J. Biol. Chem. 283(12):7804-7812에서 검토됨); 중성 pH Fc-FcRn 결합을 촉진하는 한편 엔도솜 pH에서의 방출과 혈청 알부민과의 결합을 촉진하기 위한 Fc 변형(예컨대 Chuang et al. (2002) Pharmaceutical Strategies Utilizing Recombinant Serum Albumin, Pharm. Res. 19(5):569-577 참조)을 포함한다. 적절한 용도에서 및 적절한 형식에 대해, 이를 접근법은 각각 몇 가지의 유익을 제공할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나 치료 효과와 생물 약제학에 대한 양식 체계를 개선할 필요성은 여전히 남아있는데, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, pH-의존성 결합을 나타내는 가변 도메인을 공학처리하기 위하여 면역글로불린 가변 도메인 구조를 조작하는 것을 들 수 있다. 다양한 형식의 항원-결합 단백질에 사용하기 위한 가변 도메인에 대한 요구도 존재하는데, 이때 가변 도메인(또는 그것의 항원-결합 단편)은 표적 항원 또는 수용체에 대한 결합과 관련하여 항원-결합 단백질에 pH 민감성을 부여한다. 또한 pH-의존성 면역글로불린 가변 도메인과 그것의 항원-결합 단편을 제조하기 위한 시스템 및 방법에 대한 요구도 존재한다. 매우 다양한 면역글로불린 가변 도메인을 생성할 수 있는 생물학적 시스템에 대한 요구도 또한 존재하는데, 이때 광범위한 다양성은 가변 도메인에 pH 민감성, 예컨대 표적 항원 또는 에피토프에 한 pH(예컨대 중성 또는 높은 pH)에서 결합할 수 있지만, 두 번째 pH(예컨대 낮은 또는 엔도솜 pH)에서는 표적 항원 또는 에피토프를 방출할 수 있는 능력을 부여할 수 있는 적정 가능한 아미노산과 관련하여 풍부해진다.

[0005] 면역글로불린 경쇄는 특정 형식으로 독특한 도전을 제공한다. 항체는 전형적으로 단일이량체의 중쇄 성분을 포함하는데, 각각의 중쇄 단량체는 동일한 경쇄와 결합된다. 이종이량체의 중쇄 성분을 가지는 항체(예컨대 이중 특이성 항체)가 치료적 항체로서 바람직하다. 그러나 이중특이성 항체의 중쇄의 각각과 만족스럽게 결합할 수 있는 적당한 경쇄 성분을 가지는 이중특이성 항체를 만드는 것은 문제가 많은 것으로 증명되었다.

[0006] 한 접근법에서, 경쇄는 모든 경쇄 가변 도메인에 대한 용도 통계자료를 조사하고, 사람 항체에서 가장 빈번하게 사용되는 경쇄를 확인한 후, 그 경쇄를 시험관 내에서 상이한 특이성의 두 개의 중쇄와 짹을 이루게 함으로써 선택될 수 있다.

[0007] 다른 접근법에서는, 경쇄는 파지 디스플레이 라이브러리(예컨대 파지 디스플레이 라이브러리는 사람 경쇄 가변 영역 서열, 예를 들면 사람 scFv 라이브러리를 포함한다)에서 경쇄 서열을 관찰하고, 가장 통상적으로 사용되는 경쇄 가변 영역을 그 라이브러리로부터 선택함으로써 선택될 수 있을 것이다. 그런 다음 경쇄는 관심의 두 개의

상이한 중쇄에 대해 시험될 수 있다.

[0008] 또 다른 접근법에서, 경쇄는 프로브로서 관심의 중쇄 둘 다의 중쇄 가변 서열을 사용하여 경쇄 가변 서열의 과지 디스플레이 라이브러리를 분석함으로써 선택될 수 있을 것이다. 두 개의 중쇄 가변 서열과 모두 결합하는 경쇄는 중쇄에 대한 경쇄로서 선택될 수 있을 것이다.

[0009] 또 다른 접근법에서, 후보 경쇄는 중쇄의 동족 경쇄와 나란히 배열될 수 있고, 변형은 두 개의 중쇄의 동족 경쇄에 공통적인 서열 특성과 더 밀접하게 매치할 수 있도록 경쇄에서 이루어진다. 만약 면역원성의 기회가 최소화될 필요가 있다면, 변형은 바람직하게는 공지된 사람 경쇄 서열에 존재하는 서열을 초래하고, 그로써 단백질 가수분해성 처리는 면역원성의 가능성을 평가하기 위해 당업계에 알려져 있는 변수 및 방법을 토대로 하여 T 세포 에피토프를 생성하는 것 같지는 않다(즉 습식 분석뿐 아니라 가상 환경에서).

[0010] 그런 접근법은 모두 많은 실험적 규제들, 예컨대 서열 동일성, 특이한 사전-선택된 중쇄와의 결합 능력 등을 포함하는 시험관 내 방법에 의존한다. 당업계에는 공통의 경쇄를 포함하는 사람 에피토프-결합 단백질을 제조하기 위하여 시험관 내 조건을 조작하는 것에 의존하지 않고, 대신 보다 생물학적으로 민감한 접근법을 사용하는 조성물 및 방법에 대한 요구가 있다.

[0011] 또한, 치료적 항체, 예컨대 이중특이성 치료 항체는 그것이 원하는 효능을 이루기 위해서는 자주 고용량을 필요로 한다는 점에서 몇 가지 한계를 나타낸다. 이것은 부분적으로는 항체-항원 복합체가 엔도솜 내에 내재화되고, 표적-중재된 소멸로 불리는 과정에서 리소좀성 분해에 대해 표적화된다는 사실에 기인한다. 그러므로 당업계에는 보다 효과적인 재순환, 예컨대 이중특이성 항체 재순환을 유도하고, 엔도솜 구획에서 항원을 향한 항체의 특이성 및 친화성을 순상시키지 않으면서 항체-항원 복합체의 해리를 촉진함으로써 항체의 분해를 방지하는 방법 및 조성물에 대한 요구가 있다.

[0012] 신체에 투여된 약물, 이를테면 치료용 단클론성 항체는 다양한 제거 메커니즘, 이를테면 신사구체 여과(예컨대 뇨 안으로), 분비(예컨대 담즙 안으로) 및 세포에 의한 이화작용을 통해 영향을 받을 수 있다. 작은 분자는 신장 여과를 통해 신체로부터 제거되는 반면, 대부분의 분비된 항체(예컨대 IgG, 사구체를 통하여 여과되기에 너무 크다)는 주로 세포-중재된 이화작용, 예컨대 유동상 세포내 섭취(식세포작용) 또는 수용체-중재된 세포내 섭취를 통해 신체로부터 제거된다. 예를 들어 여러 개의 반복된 에피토프를 가지고 있는 가용성 분자는 다수의 순환하는 항체에 의해 결합되고, 그 결과 생성된 큰 항원-항체 복합체는 분해를 위해 세포 안으로 신속하게 포식작용을 받는다. 다른 한편으로, 항체에 의해 결합되는 세포 표면 표적 수용체(즉 수용체-항체 복합체)는 용량-의존성 방식으로 표적-중재된 세포내 섭취가 진행되고, 그것은 세포 내부에서 리소좀성 분해가 정해진 엔도솜의 형성을 유도한다. 어떤 경우에, 세포내 섭취된 수용체-항체 복합체는 pH-의존성 방식으로 엔도솜 내부에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하고 중성의 세포외재성 pH(예컨대 pH 7.0 내지 7.4)에 노출될 때 원형질 또는 간질액으로의 방출을 위해 세포 표면으로 복귀된다.

[0013] 당업계에는 적정가능한 잔기를 가지는 항원-결합 단백질을 생성하는 시스템, 예컨대 비-사람 동물, 세포, 및 계놈 유전자좌, 예를 들면 pH의 변화에 반응하는 중쇄 가변 도메인을 생성하도록 면역글로불린 유전자 절편을 재배열하는, 예컨대 양성자를 주거나 받는, 그리고 예컨대 그것의 결합 특성이 양성자화 상태에 따라 달라지는 유전자 변형된 유전자좌에 대한 요구가 있다.

[0014] 또한 당업계에는 관심의 항원을 향한 항원-결합 단백질의 특이성 및 친화성을 순상시키지 않으면서 수용체-항원-결합 단백질로부터 항원-결합 단백질이 해리를 촉진함으로써 또는 산성 엔도솜 구획에서 FcRn을 향한 항원-결합 단백질의 친화성을 증가시킴으로써 세포내 섭취된 항원-결합 단백질의 재순환 효율을 추가로 증가시킬 수 있는 방법 및 조성물에 대한 요구가 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명에는 비-사람 동물의 생식선(germline) 변형에 의해 코드화된 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하는 면역글로불린 가변 도메인을 만드는 유전자 변형된 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공되는데, 상기 생식선 변형은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 중쇄 V, D 또는 J 절편 안으로의 삽입, 히스티딘 코돈의 경쇄 V 또는 J 절편 안으로의 삽입, 히스티딘 코돈의 재배열된 경쇄 VJ 유전자 안으로의 삽입, 중쇄 V, D 또는 J 절편에서 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환, 경쇄 V 또는 J 절편에서 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환, 재배열된 경쇄 VJ 서열에서 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0016] 본 발명에는 또한 비-사람 동물의 생식선 면역글로불린 서열에 히스티딘 코돈의 클러스터를 도입하기 위한 조성

물 및 방법이 제공된다.

- [0017] 또한 본 발명에는 면역글로불린 유전자의 N-말단-코드화 영역, 면역글로불린 유전자의 루프 4-코드화 영역, 면역글로불린 유전자의 CDR-코드화 영역(예컨대 재배열된 V(D)J 서열 또는 V, (D), J 유전자 절편)에 히스티딘 삽입, 또는 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 도입하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.
- [0018] 비-사람 동물 자손을 제조하기 위한 조성물 및 방법은 면역글로불린 중쇄 유전자좌와 면역글로불린 경쇄 유전자좌 둘 다에서 히스티딘 코돈의 삽입 및/또는 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.
- [0019] 한 측면으로, 유전자 변형된 비-사람 동물은 그것의 생식선에, 면역글로불린 가변 유전자좌에서 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하고 있는 면역글로불린 유전자좌를 포함한다. 한 구체예에서, 가변 유전자좌(예컨대 재배열되지 않은 V(D)J 절편 유전자좌)는 적어도 일부의 사람 가변 (V(D)J 절편) 유전자좌를 포함한다.
- [0020] 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물은 그것의 생식선에 첫 번째 가변 유전자좌(예컨대 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 (V(D)J 절편 유전자좌) 및 두 번째 가변 유전자좌(예컨대 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 (V, J 절편 유전자좌; 또는 재배열된 면역글로불린 경쇄 VJ 서열)을 포함한다
- [0021] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 첫 번째 및 두 번째 가변 유전자좌를 포함하는데, 이때 적어도 첫 번째 또는 두 번째 가변 유전자좌는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입 또는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.
- [0022] 한 구체예에서, 첫 번째 및 두 번째 가변 유전자좌는 둘 다 각각 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 또는 삽입을 포함한다.
- [0023] 한 구체예에서, 첫 번째 가변 유전자좌는 재배열되지 않은 중쇄 가변 유전자좌(재배열되지 않은 V, D, J 절편)의 적어도 기능성 부분을 포함한다.
- [0024] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 유전자좌는 사람 유전자좌(재배열되지 않은 V, D, J 절편)의 적어도 일부를 포함한다.
- [0025] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 유전자좌는 재배열되지 않은 V 절편, 링커를 포함하는 합성 D 절편 및 사람 J 절편을 포함하는 사람 유전자좌이다. 한 구체예에서, 합성 D 절편은 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0026] 한 구체예에서, 두 번째 가변 유전자좌는 재배열되지 않은 경쇄 유전자좌(재배열되지 않은 V, J 절편)의 적어도 일부를 포함한다.
- [0027] 한 구체예에서, 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 및/또는 히스티딘 코돈의 삽입은 가변 도메인을 코드화하는 핵산 서열에서 일어나고, 히스티딘은 면역글로불린 사슬의 N-말단 영역, 면역글로불린 사슬의 루프 4 영역, 중쇄의 CDR1, 중쇄의 CDR2, 중쇄의 CDR3, 경쇄의 CDR1, 경쇄의 CDR2, 경쇄의 CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택되는 영역에 있다.
- [0028] 한 구체예에서, 첫 번째 가변 유전자좌 또는 두 번째 가변 유전자좌중 적어도 하나는 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있는 내인성 비-사람 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0029] 한 구체예에서, 첫 번째 가변 유전자좌(재배열되지 않은 사람 V, D, J 절편)는 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0030] 한 구체예에서, 첫 번째 가변 유전자좌(재배열되지 않은 사람 V, D, J 절편)는 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있는 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0031] 한 구체예에서, 두 번째 가변 유전자좌(재배열되지 않은 V, J 절편)는 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0032] 한 구체예에서, 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있다.
- [0033] 한 구체예에서, 가변 영역 서열은 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 및/또는 히스티딘 코돈의 삽입 인 2, 3, 4 또는 5개의 히스티딘의 클러스터를 포함한다.

- [0034] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 유전자좌는 중쇄 유전자좌의 배향 방향과 관련하여 반전된 D 유전자 절편을 포함한다. 한 구체예에서, 반전된 D 절편은 친수성 리딩 프레임에 있다.
- [0035] 한 측면으로, 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열(재배열되지 않은 V, D, J 절편)의 적어도 일부와, 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열(재배열되지 않은 V, J 절편)의 적어도 일부를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데; 이때 하나 또는 그 이상의 V, D 및 J 유전자 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하고, 하나 또는 그 이상의 V 및 J 유전자 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하며; 비-사람 동물은 마우스의 생식선에 히스티딘 치환 또는 삽입으로부터 유도된 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현한다.
- [0036] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류이다. 한 구체예에서, 포유류는 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0037] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열은 비-사람 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0038] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 불변 영역 핵산 서열은 비-사람 동물의 생식선의 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있다.
- [0039] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 불변 영역 핵산 서열은 비-사람 동물의 생식선의 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있다.
- [0040] 한 측면으로, 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열(재배열되지 않은 V, D, J 절편)의 적어도 일부와, 경쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열(재배열된 VJ 서열)을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데; 이때 하나 또는 그 이상의 재배열되지 않은 V, D 및 J 유전자 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하고, 재배열된 VJ 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환, 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈 삽입을 포함하며; 비-사람 동물은 마우스의 생식선에 히스티딘 치환 또는 삽입으로부터 유도된 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 발현한다.
- [0041] 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물은 포유류이다. 한 구체예에서, 포유류는 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0042] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열은 비-사람 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 불변 영역 서열은 비-사람 동물의 생식선의 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있다. 한 구체예에서, 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비-사람 불변 영역 서열은 비-사람 동물의 생식선의 내인성 비-사람 면역글로불린 유전자좌에 있다.
- [0043] 한 측면으로, 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데, 이 동물은 야생형 비-사람 동물에 비교하여 B 세포 집단의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄에서 히스티딘 잔기의 증대된 존재를 특징으로 하는 B 세포 집단을 포함한다. 한 구체예에서, 증대는 약 2 내지 4배이다. 한 구체예에서, 증대는 약 2 내지 10배이다.
- [0044] 한 측면으로, 비-사람 동물의 생식선 면역글로불린 서열에 있는 치환 및/또는 삽입에 의해 코드화된 히스티딘을 포함하는 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공된다.
- [0045] 한 측면으로, 생식선 히스티딘 코돈에 의해 코드화된 히스티딘을 가지는 항체 가변 도메인을 만드는 비-사람 동물의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 비-사람 동물의 생식선이 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변(재배열되지 않은 V, D, J 절편) 유전자좌에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 비-히스티딘 코돈에 대한 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하도록 비-사람 동물을 변형하고; 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변(재배열되지 않은 V, J 절편) 유전자좌에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 비-히스티딘 코돈에 대한 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하도록 비-사람 동물의 생식선을 변형시키는 것을 포함한다.
- [0046] 한 구체예에서, 방법은 마우스의 생식선이 적어도 일부의 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 (V, D,

J 절편) 유전자좌를 포함하도록 유전자를 변형하는 것과, 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 (재배열되지 않은 V, D, J 절편) 사람 유전자좌에 히스티딘 치환 또는 삽입을 만드는 것을 포함한다.

[0047] 한 구체예에서, 방법은 마우스의 생식선이 적어도 일부의 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 경쇄 (재배열되지 않은 V, J 절편) 유전자좌를 포함하도록 유전자를 변형하는 것과, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 히스티딘 치환 또는 삽입을 만드는 것을 포함한다.

[0048] 방법의 한 구체예에서, 비-사람 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다.

[0049] 한 측면으로, 생식선 히스티딘 코돈에 의해 코드화된 히스티딘을 가지는 항체 가변 도메인을 만드는 비-사람 동물의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 비-사람 동물이 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변(재배열되지 않은 V, D, J 절편) 유전자좌에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 비-히스티딘 코돈에 대한 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하도록 비-사람 동물을 변형시키고; 생식선의 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 서열(재배열된 VJ 서열)에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 비-히스티딘 코돈에 대한 치환 또는 히스티딘 코돈의 삽입을 포함하도록 비-사람 동물을 변형시키는 것을 포함한다.

[0050] 방법의 한 구체예에서, 비-사람 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다.

[0051] 다양한 측면 및 구체예에서, 비-사람 동물은 비-사람 동물은 다능성 또는 분화전능성 세포(예컨대 배 줄기(ES) 세포)의 유전자를 변형하고, 유전자 변형된 세포를, 유전자 변형된 공여 세포로부터 유도된 동물을 잉태하기 위한 대리모에서 숙주 배를 가지는 공여 세포로서 사용함으로써 유전자 변형된다. 다양한 측면 및 구체예에서, 비-사람 동물은 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 다른 방법에 의해서도 유전자 변형된다.

[0052] pH-의존성 항원 결합을 나타내는 항체 가변 도메인을 제조하는 방법 및 조성물이 제공된다. 낮은(예컨대 엔도솜 성) pH에서 낮은 친화성으로 표적 항원에 결합하고, 더 높은(예컨대 세포 외재성) 또는 중성의 pH에서 높은 친화성으로 동일한 표적 항원에 결합하는 변형된 항원-결합 단백질이 제공될 뿐 아니라, 그것들을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

[0053] 한 측면으로, pH-의존성 결합을 나타내는 항체를 제조하기 위한 방법이 제공되는데, 그 방법은 히스티딘 잔기를 첨가하거나, 또는 히스티딘 잔기에 대해 기존의 잔기를 치환하여 히스티딘-변형된 가변 도메인을 형성하기 위해 항체의 가변 도메인의 서열을 변형하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 치환은 결합 항원에 대해 결정적이지 않은(예컨대 중성 또는 세포외재성 pH에서) 잔기의 치환이다.

[0054] 한 구체예에서, 2, 3, 4, 5 또는 6 또는 그 이상의 잔기가 히스티딘에 대해 치환된다. 한 구체예에서, 히스티딘에 대해 치환된 2, 3, 4, 5 또는 6 또는 그 이상의 잔기는 클러스터로 존재한다. 한 구체예에서, 클러스터는 둘 또는 그 이상의 연속적인 히스티딘 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 클러스터는 하나 또는 그 이상의 비-히스티딘 잔기에 의해 분리된 2 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 클러스터는 길이가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기이며, 결합 항원에 대해 결정적이지 않은(예컨대 중성 또는 세포외재성 pH에서) 모든 잔기는 히스티딘에 대해 변형된다.

[0055] 한 구체예에서, 가변 도메인은 경쇄 가변 도메인이다(예컨대 κ 또는 λ). 한 구체예에서, 가변 도메인은 중쇄 가변 도메인이다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인의 서열은 변형된다.

[0056] 한 구체예에서, 가변 도메인의 서열은 CDR 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 중쇄의 CDR 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 경쇄의 CDR 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 중쇄의 CDR 서열 및 경쇄의 CDR 서열이다.

[0057] 한 구체예에서, CDR 서열은 CDR3 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 CDR2 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 CDR3 서열이다.

[0058] 한 구체예에서, CDR 서열은 경쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이다. 한 구체예에서, CDR 서열은 중쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이다.

[0059] 한 구체예에서, 항체의 가변 도메인의 서열은 루프 4 서열이다. 한 구체예에서, 루프 4 서열은 중쇄 루프 4 서열이다. 한 구체예에서, 루프 4 서열은 경쇄 루프 4 서열이다.

[0060] 한 구체예에서, 항체의 가변 도메인의 서열은 N-말단 서열이다. 한 구체예에서, N-말단 서열은 중쇄 N-말단 서

열이다. 한 구체예에서, N-말단 서열은 경쇄 N-말단 서열이다.

[0061] 한 구체예에서, 항체의 가변 도메인의 서열은 중쇄의 CDR 서열, 경쇄의 CDR 서열, 중쇄의 루프 4 서열, 경쇄의 루프 4 서열, 중쇄의 N-말단 서열, 경쇄의 N-말단 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.

[0062] 한 구체예에서, 가변 도메인은 중쇄로부터 유래되고, 가변 도메인의 서열은 첫 번째 CDR 서열과 N-말단 서열, 루프 4 서열, 두 번째 CDR 서열, 세 번째 CDR 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 첫 번째 CDR 서열은 CDR3이고, 가변 도메인의 서열은 추가로 N-말단 서열, 루프 4 서열, CDR2 서열, CDR1 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0063] 한 구체예에서, 히스티딘-변형된 가변 도메인은 중쇄로부터 유래되고, 히스티딘 변형은 루프 4 서열 및 CDR1 또는 CDR2 또는 CDR3, N-말단 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열에 있다. 특정 구체예에서, 히스티딘 변형은 루프 4 서열 및 CDR3 서열에 있다. 특정 구체예에서, 히스티딘 변형은 루프 4 서열과 CDR3 서열 및 N-말단 서열에 있다. 특정 구체예에서, 히스티딘 변형은 루프 4 서열 및 N-말단 서열에 있다.

[0064] 한 측면으로, 본원에서 기술된 것과 같은 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인이 제공되는데, 이 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 관심의 항원에 결합하지 않거나 6보다 낮은 pH에서 첫 번째 친화성으로 관심의 항원에 결합하고; 약 7 또는 그 이상의 pH에서 두 번째 친화성으로 관심의 동일한 항원에 결합한다. 한 구체예에서 첫 번째 pH는 5.5 미만, 또는 5 미만이다. 한 구체예에서 첫 번째 pH는 5.75이다. 한 구체예에서 두 번째 pH는 약 7 또는 그 이상이다. 한 구체예에서, 두 번째 pH는 사람의 세포외 pH이다. 한 구체예에서 두 번째 pH는 7.2 내지 7.4이다. 특정 구체예에서, 두 번째 pH는 7.2이다.

[0065] 한 구체예에서, his-변형된 가변 도메인은 CDR, N-말단, 루프 4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열에 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, his-변형된 가변 도메인은 CDR3의 변형을 포함한다. 한 구체예에서, his-변형된 가변 도메인은 중쇄의 CDR3의 변형, 경쇄의 CDR3의 변형 및 그것들의 조합으로부터 선택된 변형을 포함한다. 한 구체예에서, his-변형된 가변 도메인은 CDR(예컨대 CDR3)에 적어도 하나의 치환 및 N-말단, 루프 4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열에 적어도 하나의 치환을 포함한다.

[0066] 한 구체예에서, CDR은 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0067] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 CDR3를 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 CDR3와 중쇄 CDR3를 포함한다.

[0068] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 중성 또는 염기성 pH(예컨대 pH 7 내지 7.4)에서 관심의 항원에 약 10^{-6} 또는 그 미만(예컨대 $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}$)의 K_D 로 결합하는데, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환되거나, 또는 CDR1이 히스티딘 치환의 클러스터를 포함하는 CDR1을 포함한다. 한 구체예에서, 가변 도메인은 관심의 항원에 결합하지 않거나, 또는 산성 pH(예컨대 pH 5 내지 6, 한 구체예에서는 pH 6)에서 관심의 항원에 10^2 내지 10^6 배 더 약하게 결합한다.

[0069] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 관심의 항원에 중성 또는 염기성 pH(예컨대 pH 7 내지 7.4)에서 약 10^{-6} 또는 그 미만(예컨대 $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}$)의 K_D 로 결합하는데, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환되거나, 또는 CDR2가 히스티딘 치환의 클러스터를 포함하는 CDR2를 포함한다. 한 구체예에서 가변 도메인은 관심의 항원에 결합하지 않거나, 또는 산성 pH(예컨대 pH 5 내지 6, 한 구체예에서는 pH 6)에서 관심의 항원에 10^2 내지 10^6 배 더 약하게 결합한다.

[0070] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 관심의 항원에 중성 또는 염기성 pH(예컨대 pH 7 내지 7.4)에서 약 10^{-6} 또는 그 미만(예컨대 $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}$)의 K_D 로 결합하는데, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환되거나, 또는 CDR3가 히스티딘 치환의 클러스터를 포함하는 CDR3를 포함한다. 한 구체예에서 가변 도메인은 관심의 항원에 결합하지 않거나, 또는 산성 pH(예컨대 pH 5 내지 6, 한 구체예에서는 pH 6)에서 관심의 항원에 10^2 내지 10^6 배 더 약하게 결합한다.

게 결합한다.

[0071] 한 측면으로, his-변형된 도메인을 포함하는 사람 항원-결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공되는데, 그 방법은 본원에 기술된 것과 같은 면역글로불린 가변 도메인 뉴클레오티드 서열을 his-변형된 도메인을 코드화하는 핵산을 형성하도록 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 코드화하도록 변형시키는 것과, his-변형된 도메인을 코드화하는 핵산 서열을 사람 면역글로불린 서열에 융합시키는 것(직접 또는 링커를 사용하여)을 포함한다.

[0072] 한 구체예에서, 사람 면역글로불린 서열은 면역글로불린 불변 도메인 서열이다. 특정 구체예에서, 사람 면역글로불린 불변 도메인 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화한다.

[0073] 한 측면으로, his-변형된 가변 도메인을 발현하는 세포가 제공되는데, 이때 his-변형된 가변 도메인은 본원에서 기술된 것과 같이 변형된다. 한 구체예에서, 세포는 포유류 세포이다. 한 구체예에서, 세포는 HeLa 세포, DU145 세포, Lncap 세포, MCF-7 세포, MDA-MB-438 세포, PC3 세포, T47D 세포, THP-1 세포, U87 세포, SHSY5Y(사람 신경모세포종) 세포, Saos-2 세포, Vero 세포, CHO 세포, GH3 세포, PC12 세포, 사람 망막 세포(예컨대 PERC.6TM 세포) 및 MC3T3 세포로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0074] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인이 제공되는데, 이 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 관심의 항원에 결합하지 않거나 또는 5 내지 6의 pH(예컨대 5.75)에서 첫 번째 친화성으로 관심의 항원에 결합하고 7 내지 7.4(예컨대 7.2)의 pH에서 두 번째 친화성으로 동일한 관심의 항원에 결합하며, 이때 적어도 하나의 CDR은 2 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함하고, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함하며, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 N-말단 서열, 루프 4 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.

[0075] 한 구체예에서, 첫 번째 친화성은 결합이 없거나, 또는 10^{-6} 또는 그 이상(예컨대 10^{-3})의 K_D 를 특징으로 하고, 두 번째 친화성은 첫 번째 친화성보다 적어도 2-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 10^2 -배, 적어도 10^3 -배, 적어도 10^4 -배, 적어도 10^5 -배 또는 적어도 10^6 -배 더 강한 것을 특징으로 한다.

[0076] 한 구체예에서, 비-CDR 서열은 적어도 하나의 CDR 서열과 동일한 폴리펩티드상에 있다. 한 구체예에서, 비-CDR 서열은 적어도 하나의 CDR 서열과 상이한 폴리펩티드상에 있다.

[0077] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR3이고, 그 CDR3는 비-항원-결합 아미노산 잔기의 적어도 절반의 히스티딘으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, CDR3의 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기는 히스티딘으로 치환된다.

[0078] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR3이고, 그 CDR3는 3 또는 그 이상의 비-항원-결합 아미노산 잔기의 히스티딘으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 4 또는 그 이상의 비-항원-결합 아미노산 잔기는 히스티딘으로 치환된다.

[0079] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR3이고, 그 CDR3는 2 또는 그 이상의 연속적인 비-항원-결합 아미노산 잔기의 히스티딘으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, CDR3는 3 또는 그 이상의 연속적인 비-항원-결합 아미노산 잔기의 히스티딘으로의 치환을 포함한다.

[0080] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 및/또는 중쇄의 CDR3이고, 추가로 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 및 그것들의 조합으로부터 선택된 CDR을 포함한다.

[0081] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 및/또는 중쇄의 CDR3이고, 추가로 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 및 그것들의 조합으로부터 선택된 CDR을 포함한다.

[0082] 한 구체예에서, CDR은 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0083] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 CDR3를 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 CDR3 및 중쇄 CDR3를 포함한다.

[0084] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 및/또는 중쇄의 CDR3이고, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 루프 4 서열이며, 이때 루프 4 서열은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함한다.

- [0085] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄 및/또는 중쇄의 CDR3이고, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 N-말단 서열이며, 이때 N-말단 서열은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 포함한다.
- [0086] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 경쇄의 CDR3이고, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 가지는 N-말단 서열 및 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 가지는 루프 4 서열을 포함한다.
- [0087] 한 구체예에서, 적어도 하나의 CDR은 중쇄의 CDR3이고, 적어도 하나의 비-CDR 서열은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 가지는 N-말단 서열 및 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 가지는 루프 4 서열을 포함한다.
- [0088] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 7 내지 7.4의 pH(예컨대 pH 7.2)에서 관심의 항원에 약 10^{-7} 또는 그 미만(예컨대 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12})의 K_D 로 결합하며, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환된 CDR1을 포함한다.
- [0089] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 7 내지 7.4의 pH(예컨대 pH 7.2)에서 관심의 항원에 약 10^{-7} 또는 그 미만(예컨대 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12})의 K_D 로 결합하며, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환된 CDR2를 포함한다.
- [0090] 한 구체예에서, his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 7 내지 7.4의 pH(예컨대 pH 7.2)에서 관심의 항원에 약 10^{-7} 또는 그 미만(예컨대 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12})의 K_D 로 결합하며, 이때 his-변형된 면역글로불린 가변 도메인은 모든 비-항원-결합 아미노산 잔기가 히스티딘으로 치환된 CDR3를 포함한다.
- [0091] 한 측면으로, 사람 질병 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 본원에서 기술된 것과 같은 방법의 용도가 제공된다. 한 구체예에서, 의약은 항체이다. 특정 구체예에서, 항체는 사람 항체이다.
- [0092] 한 측면으로, 사람 질병 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 본원에 기술된 것과 같은 his-변형된 가변 도메인의 용도가 제공된다. 한 구체예에서, 의약은 항체이다. 특정 구체예에서, 항체는 사람 항체이다.
- [0093] 한 측면으로, 사람 질병 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 본원에서 기술되는 것과 같은 방법 또는 his-변형된 가변 도메인의 용도가 제공되는데, 이때 의약은 항체, 다중-특이성 항체(예컨대 이중특이성 항체), scFv, 이중 특이성 scFv, 이중체, 삼중체, 사중체, V-NAR, VH_H, VL, F(ab), F(ab)2, DVD(즉 이중 가변 도메인 항원-결합 단백질), SVD(즉 단일 가변 도메인 항원-결합 단백질), 또는 이중특이성 T-세포 참여자(engager)(즉 BiTE)로부터 선택되는 항원-결합 단백질을 포함한다.
- [0094] 한 측면으로, 사람 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 중쇄 및 κ 또는 λ 경쇄 가변 영역 서열을 제조하기 위하여 본원에서 기술된 것과 같은 방법이 사용되는데, 그 방법은 추가로 중쇄 및/또는 경쇄 his-변형된 가변 영역 서열을 (직접적으로 또는 링커를 통하여) 사람 중쇄 및 경쇄 불변 영역 서열에 융합시켜서 융합된 서열을 형성하고, 그 융합된 서열을 세포에서 발현시키며, 융합된 서열을 포함하는 발현된 항원-결합 단백질을 회수하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 사람 중쇄 불변 영역은 IgM, IgD, IgA, IgE 및 IgG로부터 선택된다. 다양한 특정 구체예에서, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택된다. 다양한 구체예에서, 사람 중쇄 불변 영역은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3, C_H4 및 그것들의 조합을 포함하는 서열로부터 선택된다. 특정 구체예에서 조합은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3이다. 특정 구체예에서, 조합은 C_H1, C_H2 및 C_H3이다. 특정 구체예에서, 조합은 헌지, C_H2 및 C_H3이다. 특정 구체예에서, 조합은 헌지, C_H2 및 C_H3이다.
- [0095] 한 측면으로, 중성 pH에서는 표적 항원에 결합하지만 산성 pH(예컨대 pH 5.0 내지 6.0)에서 동일한 항원의 결합은 감소하는 것으로 나타나는 항체 또는 항체 가변 도메인을 제조하기 위한 생물학적 시스템이 제공된다. 그 생물학적 시스템은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 변형을 포함하는 재배열된 경쇄 서열(예컨대 재배열된 V-J)을 가지는 비-사람 동물, 예컨대 설치류(예컨대 마우스 또는 쥐)를 포함한다. 다양한 측면으로, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 변형은 경쇄 CDR3 코돈에 있다. 다양한 측면으로, 비-사람 동물은 사람 또는 인간화된 중쇄 면역글로불린 유전자좌를 포함한다. 다양한 측면으로, 비-사람 동물은 내인성 비-사람 중쇄 가변 유전자 절편이 하나 또는 그 이상의 사람 중쇄 V_H, D_H 및 J_H 절편으로 대체되어 있고, 이때 사람 절편은 비-사람 면역글로불린 불변 영역과 작동가능하게 연결된다. 다양한 측면으로, 히스티딘 잔기로 비-히스티딘 잔기가 치환되어 있는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 보편적인 경쇄를 가지는 비-사람 동물이 제공된다. 다양한 측면으로 이들 히스티딘-변형된 보편적 경쇄 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 마우스)은 히스티딘-보편적 경쇄 마우스, 히스티딘-ULC

마우스 또는 HULC 마우스로 언급된다.

[0096] 그러므로 한 측면으로, 본원에는 자신의 생식선에 사람 V_L 및 J_L 절편 서열을 포함하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되며, 이때 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열은 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열은 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열은 내인성 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 기능성 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 결핍되어 있다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있다.

[0097] 한 구체예에서, 동물은 추가로 자신의 생식선에 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열은 비-사람 중쇄 불변 영역 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 비-사람 중쇄 불변 영역 유전자 서열은 내인성 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 있다.

[0098] 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 상보성 결정 영역(CDR)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 있다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 CDR3를 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 있다. 한 구체예에서, 치환은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 CDR3 코돈의 치환이다. 한 측면으로, 면역글로불린 경쇄 유전자좌에서 포함된 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 사람 V_{K1-39} 또는 V_{K3-20} 유전자 절편으로부터 유도된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열된 V_{K1-39}/J_{K5} 또는 V_{K3-20}/J_{K1} 유전자 서열로부터 유도된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열된 V_{K1-39}/J_{K5} 유전자 서열로부터 유도되고, V_{K1-39}/J_{K5} 유전자 서열은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체를 포함한다. 다른 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열된 V_{K3-20}/J_{K1} 유전자 서열로부터 유도되고, V_{K3-20}/J_{K1} 유전자 서열은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체를 포함한다.

[0099] 한 측면으로, 본원에서 기술되는 비-사람 동물은 중성의 pH와 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배의 해리성 반감기($t_{1/2}$)의 감소를 나타내는 항체에 대해 풍부해진 관심의 항원에 대해 반응하는 B 세포의 집단을 포함한다. 한 구체예에서, 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 $t_{1/2}$ 의 감소는 약 30배 또는 그 이상이다.

[0100] 한 구체예에서, 동물은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열에서 치환된 적어도 하나의 코돈에 의해 코드화된 아미노산 위치에서 적어도 하나의 비-히스티딘 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환을 가지는 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현한다. 한 구체예에서, 동물은 체세포성 과돌연변이에도 불구하고, 발현된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인에서 적어도 하나의 비-히스티딘 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환을 보유하는 항체를 발현한다.

[0101] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류이다. 한 구체예에서, 포유류는 설치류, 예를 들면 쥐 또는 마우스이다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 마우스이다. 그러므로 한 측면으로, 본원에는 사람 V_L 및 J_L 절편 서열을 포함하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 자신의 생식선에 포함하고 있는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 이때 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 마우스는 기능성 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 결핍되어 있다.

[0102] 한 구체예에서, 마우스의 생식선의 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열은 쥐 또는 마우스 면역글로불린 경쇄 불변 영역 유전자 서열로부터 선택된다. 한 구체예에서, 면역글로불린

경쇄 불변 영역 유전자 서열은 마우스 서열이다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있다.

[0103] 추가의 구체예에서, 마우스는 또한 그것의 생식선에 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 사람 V_H, D_H 및 J_H 절편을 포함하고 있는 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함한다. 한 측면으로, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열은 쥐 또는 마우스 중쇄 불변 영역 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열은 마우스 서열이다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 있다.

[0104] 한 측면으로, 마우스는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하며, 이때 치환은 CDR을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 있다. 한 구체예에서, 치환은 CDR3 코돈에, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 CDR3 코돈에 있다. 한 구체예에서, 마우스의 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 사람 V_K 1-39 또는 V_K 3-20 절편으로부터 유도된 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는데, 예컨대 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 재배열된 V_K 1-39/J_K 5 또는 V_K 3-20/J_K 1 유전자 서열로부터 유도된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 재배열된 V_K 1-39/J_K 5 유전자 서열로부터 유도되고, V_K 1-39/J_K 5 서열은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 그러한 대체는 위치 105, 106, 108 및 111에서 히스티딘을 대체하도록 디자인된다. 다른 구체예에서, 그런 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 대체하도록 디자인된다.

[0105] 다른 구체예에서, 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 재배열된 V_K 3-20/J_K 1 유전자 서열로부터 유도되고, V_K 3-20/J_K 1 유전자 서열은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 그러한 대체는 위치 105, 106, 107 및 109에서 히스티딘을 대체하도록 디자인된다. 다른 구체예에서, 그런 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 대체하도록 디자인된다.

[0106] 한 구체예에서, 본원에서 기술되는 마우스는 중성의 pH와 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배의 해리성 반감기($t_{1/2}$)의 감소를 나타내는 항체에 대해 풍부해진 관심의 항원에 대해 반응하는 B 세포의 집단을 포함한다. 한 구체예에서, 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 $t_{1/2}$ 의 감소는 약 30배 또는 그 이상이다.

[0107] 한 구체예에서, 본원에 기술된 마우스는 관심의 항원에 대해 반응하는 항원-특이적 항체의 집단을 발현하는데, 이때 모든 항체는 (a) 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 동일한 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열로부터 유도된 면역글로불린 경쇄 가변 도메인과, (b) 사람 중쇄 V, D 및 J 절편의 레퍼토리로부터 유도된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 포함한다.

[0108] 또한 본원에는 사람 V_L 및 J_L 절편 서열을 포함하고 있는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 비-사람 유전자좌, 예컨대 마우스 유전자좌가 제공되는데, 이 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자좌는 비-사람 동물의 생식선에 포함된다. 한 구체예에서, 유전자좌는 사람 V_K 1-39 또는 V_K 3-20 유전자 절편으로부터 유도된, 예컨대 재배열된 V_K 1-39/J_K 5 또는 V_K 3-20/J_K 1 유전자 서열로부터 유도된 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함한다. 유전자좌에 존재하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열이 재배열된 V_K 1-39/J_K 5 서열로부터 유도된 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 유전자좌에 존재하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열이 재배열된 V_K 3-20/J_K 1 서열로부터 유도되는 다른 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 다양한 구체예에서, 본원에서 기술된 비-사람 유전자좌는 아래에서 유전자 변형된 비-사람 동물을 제조하기 위해 기술된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0109] 또 다른 측면으로, 본원에는 그것의 생식선에 유전자 변형된 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물의 제조 방법이 개시되는데, 그 방법은 비-사람 동물의 계놈을 변형시켜서 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 내인성 면역글로불린 경쇄 V 및 J 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만드는 것과, 계놈에 적어도 하나의 비-

히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 위치시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 그런 방법으로 관심의 항원에 대해 pH-의존성 결합을 나타내는 항체에 대해 풍부해진 B 세포 집단을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 초래된다. 한 구체예에서, 게놈에 위치한 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 사람 V_K1-39 또는 V_K3-20, 예컨대 V_K1-39/J_K5 또는 V_K3-20/J_K1 유전자 서열로부터 유도된다. 그러므로 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열이 재배열된 V_K1-39/J_K5로부터 유도되는 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열이 재배열된 V_K3-20/J_K1로부터 유도되는 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다.

[0110] 또 다른 측면으로, 본원에는 관심의 항원에 대해 pH-의존성 결합을 나타내는 항체를 제조하는 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 본원에 기술된 마우스(예컨대 그것의 생식선에 사람 V_L 및 J_L 절편 서열을 포함하고 그것의 재배열된 경쇄 가변 영역 서열에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스)를 제조하는 단계, (b) 관심의 항원으로 그 마우스를 면역시키는 단계, 그리고 (c) 중성의 pH에서 원하는 친화성으로 관심의 항원에 결합하는 한편 산성 pH에서는 항원에 대해 감소된 결합을 나타내는 항체를 선택하는 단계로 이루어진다. 한 구체예에서, 그 방법은 산성 pH 및 37°C에서 약 2분 또는 그 미만의 t_{1/2}를 나타내는 항체의 생성을 유발한다. 한 구체예에서, 그 방법은 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배의 해리성 반감기(t_{1/2})의 감소를 나타내는 항체의 생성을 유발한다.

[0111] 다른 측면으로, 본원에는 관심의 항원에 대해 pH-의존성 결합을 나타내는 항체를 제조하는 추가 방법이 제공된다. 그런 방법 중 한 가지는 (a) 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는 첫 번째 항체를 선택하고, (b) 첫 번째 항체의 면역글로불린 경쇄 뉴클레오티드 서열을 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하도록 변형시키며, (c) 세포에서 첫 번째 항체의 면역글로불린 중쇄 및 변형된 면역글로불린 경쇄를 발현시키고, 그리고 (d) 중성 pH에서 관심의 항원에 대해 원하는 친화성을 보유하고 산성 pH에서는 관심의 항원에 대해 감소된 결합을 나타내는 세포에서 발현된 두 번째 항체를 선택하는 것으로 이루어진다. 한 구체예에서, 첫 번째 항체의 면역글로불린 경쇄 뉴클레오티드 서열은 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열로부터 유도된 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하는 비-사람 동물, 예컨대 마우스에서 생성되고, 면역글로불린 경쇄의 변형은 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 가변 영역 서열에서 일어난다. 한 구체예에서, 첫 번째 항체는 사람 V_H, D_H, 및 J_H 절편의 레퍼토리로부터 유도된 면역글로불린 중쇄 서열을 추가로 포함하는 비-사람 동물, 예컨대 마우스에서 생성된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 V_K1-39/J_K5 및 V_K3-20/J_K1 유전자 서열로부터 선택된다. 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열이 V_K1-39/J_K5인 구체예에서, 첫 번째 항체의 면역글로불린 경쇄 뉴클레오티드 서열의 변형은 105, 106, 108, 111, 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 CDR3 코돈에서 이루어진다. 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열이 V_K3-20/J_K1인 구체예에서, 첫 번째 항체의 면역글로불린 경쇄 뉴클레오티드 서열의 변형은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 CDR3에서 이루어진다.

[0112] 한 구체예에서, 본원에 기술된 관심의 항원에 대해 pH-의존성 결합을 나타내는 항체의 제조 방법은 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배의 해리성 반감기(t_{1/2})의 감소를 나타내는 항체를 유발한다. 한 구체예에서, 항체의 제조 방법은 산성 pH 및 37°C에서 약 2분 또는 그 미만의 t_{1/2}를 나타내는 항체를 유발한다.

[0113] 비-사람 동물의 생식선 게놈에서 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌가 제공되는데, 이 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 유전자 변형된 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열(예컨대 하나 또는 그 이상의 유전자 변형된 사람 V_H, D_H 및/또는 J_H 유전자 절편)을 포함하고, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 다양한 구체예에서, 유전자 변형된 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은

면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함한다. 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열(예컨대 IgM, IgD, IgA, IgE 및 IgG로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열)에 작동가능하게 연결된다.

[0114] 그들의 생식선 게놈에서 면역글로불린 중쇄 게놈 유전자좌를 함유하도록 유전자 공학처리된 비-사람 동물(포유류, 예컨대 설치류, 예를 들면 마우스, 쥐 또는 햄스터)이 제공되는데, 이때 게놈 유전자좌는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열(예컨대 하나 또는 그 이상의 유전자 변형된 사람 V_H , D_H 및/또는 J_H 유전자 절편)을 포함하고, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 다양한 구체예에서, 비-사람 동물의 게놈은 (i) 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H , D_H 및/또는 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 비기능성으로 만들고(예컨대 뉴클레오티드 서열, 예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열의 면역글로불린 유전자좌에의 삽입을 통해, 또는 내인성 V_H , D_H 및/또는 J_H 유전자 절편의 비-기능성 재배열 또는 반전을 통해); (ii) 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열(예컨대 유전자 변형된 사람 V_H , D_H 또는 J_H 유전자 절편)을 도입하는 변형을 포함하며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 다양한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나 (즉 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 있거나(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌와는 상이한 유전자좌에) 또는 그것의 내인성 유전자좌 내에 있다(예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다). 다양한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다(예컨대 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgA, IgE 및 IgG로부터 선택되는 면역글로불린 아이소타입을 코드화한다).

[0115] 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현할 수 있는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 하나 또는 그 이상의 히스티딘은 해당하는 야생형 비-사람 동물의 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않는다.

[0116] 해당하는 야생형 비-사람 동물의 생식선 유전자 절편에 의해 코드화되지 않은 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 가지는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 유전자를 특징으로 하는 B 세포 집단을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공된다.

[0117] 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 함유하는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물의 제조 방법 및 조성물이 제공된다.

[0118] 항원에 대해 pH-의존성 결합을 나타내는 항원-결합 단백질을 만드는 비-사람 동물에 대한 방법 및 조성물이 제공된다. pH-의존적인, 예컨대 특히 중쇄 가변 도메인, 및/또는 그것의 항원-결합 단편에서 pH-의존적인 항원-결합 단백질로 풍부해진 (해당하는 야생형 동물과 비교하여) B 세포 집단, 또는 항체 집단을 가지는 비-사람 동물의 제조 방법 및 조성물이 제공된다.

[0119] 한 측면으로, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 비-사람 동물의 생식선 게놈의 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌가 제공되는데, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0120] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0121] 한 구체예에서, 첨가되거나 치환된 히스티딘 코돈은 사람 V_H 유전자 절편, 사람 D 유전자 절편, 사람 J_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄 유전자 절편에 존재한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자 절편은 사람 생식선 V_H 유전자 절편, 사람 생식선 D 유전자 절편, 사람 생식선 J_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.

- [0122] 한 구체예에서, 사람 V 유전자 절편(V_H)은 V_H1-2 , V_H1-3 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H1-45 , V_H1-46 , V_H1-58 , V_H1-69 , V_H2-5 , V_H2-26 , V_H2-70 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-16 , V_H3-20 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 , $V_H3-30-3$, $V_H3-30-5$, V_H3-33 , V_H3-35 , V_H3-38 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H3-49 , V_H3-53 , V_H3-64 , V_H3-66 , V_H3-72 , V_H3-73 , V_H3-74 , V_H4-4 , V_H4-28 , $V_H4-30-1$, $V_H4-30-2$, $V_H4-30-4$, V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H4-61 , V_H5-51 , V_H6-1 , V_H7-4-1 , V_H7-81 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0123] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편은 $D1-1$, $D1-7$, $D1-14$, $D1-20$, $D1-26$, $D2-2$, $D2-8$, $D2-15$, $D2-21$, $D3-3$, $D3-9$, $D3-10$, $D3-16$, $D3-22$, $D4-4$, $D4-11$, $D4-17$, $D4-23$, $D5-12$, $D5-5$, $D5-18$, $D5-24$, $D6-6$, $D6-13$, $D6-19$, $D6-25$, $D7-27$ 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0124] 한 구체예에서, 사람 J 유전자 절편은 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H5 , J_H6 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0125] 한 구체예에서, 첨가되거나 치환된 히스티딘 코돈은 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3 또는 그것들의 조합을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.
- [0126] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상, 34 또는 그 이상, 35 또는 그 이상, 36 또는 그 이상, 37 또는 그 이상, 38 또는 그 이상, 39 또는 그 이상, 40 또는 그 이상, 41 또는 그 이상, 42 또는 그 이상, 43 또는 그 이상, 44 또는 그 이상, 45 또는 그 이상, 46 또는 그 이상, 47 또는 그 이상, 48 또는 그 이상, 49 또는 그 이상, 50 또는 그 이상, 51 또는 그 이상, 52 또는 그 이상, 53 또는 그 이상, 54 또는 그 이상, 55 또는 그 이상, 56 또는 그 이상, 57 또는 그 이상, 58 또는 그 이상, 59 또는 그 이상, 60 또는 그 이상, 또는 61 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0127] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0128] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1 , 헌지, C_H2 , C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1 , 헌지, C_H2 및 C_H3 (C_H1 -헌지- C_H2 - C_H3)를 포함한다.
- [0129] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌 내에, 예컨대 면역글로불린 가변유전자좌 내에, 이때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0130] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3 의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경에서(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH 범위인 엔도솜에서) FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0131] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q); 250 및 428(예컨대 L 또는 F); 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308에서의 변형(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I), 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434 (예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)를 포함하고, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5

내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0132] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_{H2} 아미노산 서열을 코드화하고, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_{H2} 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0133] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_{H2} 아미노산 서열을 코드화하고, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_{H2} 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0134] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_{H3} 아미노산 서열을 코드화하는데, 이때 C_{H3} 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에 적어도 하나의 변형을 포함하고, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_{H3} 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0135] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0136] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0137] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0138] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0139] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 이들 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0140] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 이들 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0141] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 C_{H3} 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 두 번째 대립유전자, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소 또는 제거하는 변형을 포함한다(예를 들면 US2010/0331527A1 참조).

[0142] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU에 의해서는 H436F)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU에 의해서는 H436F)을 포함한다.

[0143] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래하고 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다.

[0144] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래하고 추가로 N44S, K52N 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다.

[0145] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG24로부터 유래하고 추가로 Q15R, N44S, K52N,

V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGT: EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다.

[0146] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 설명된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형을 포함한다.

[0147] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 하나 또는 그 이상의 상기에서 설명된 어떠한 유형의 변형을 포함한다.

[0148] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H , D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 뉴클레오티드 서열(예컨대 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H , D, J_H 절편의 비-기능성 재배열, 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예컨대 모든 내인성 V_H , D 또는 J_H 유전자 절편의 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예컨대 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 J 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.

[0149] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H , D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하거나; 유전자 변형된 유전자좌는 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 가지는 하나 또는 그 이상의 사람 V_H , D 및/또는 J_H 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우에 존재하거나 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌 내에, 예를 들면 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이때 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0150] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자, 또는 둘 다를 포함하고, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자, 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0151] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 비정상적인 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자, 또는 둘 다를 포함한다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서 Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서 Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0152] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고, 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열과 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0153] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 도입시키는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대해 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

이상의 내인성 비-히스티딘 코돈이 히스티딘 코돈으로 대체된다.

[0162] 한 구체예에서, 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택된 아미노산을 코드화한다.

[0163] 한 구체예에서, 히스티딘 코돈에 의해 치환된 내인성 비-히스티딘 코돈은 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3, 이것들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 가변 도메인을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0164] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 CDR1, CDR2, CDR3 및 이것들의 조합으로부터 선택된 상보성 결정 영역 (CDR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0165] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 FR1, FR2, FR3, FR4 및 이것들의 조합으로부터 선택된 프레임 영역(FR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0166] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 V_H 유전자 절편을 포함하고, 이때 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0167] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함하고, 이때 사람 V_H 유전자 절편은 V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-45, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-16, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-30-3, V_H3-30-5, V_H3-33, V_H3-35, V_H3-38, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-49, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-66, V_H3-72, V_H3-73, V_H3-74, V_H4-4, V_H4-28, V_H4-30-1, V_H4-30-2, V_H4-30-4, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H4-61, V_H5-51, V_H6-1, V_H7-4-1, V_H7-81 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0168] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 J_H 유전자 절편을 포함하고, 이때 사람 J_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0169] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 J_H 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함하며, 이때 사람 J_H 유전자 절편은 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5, J_H6 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0170] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 CDR3의 일부분을 코드화하는 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다. 한 구체예에서, CDR3의 일부분은 리딩 프레임의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함한다.

[0171] 한 구체예에서, 히스티딘 코돈으로 치환된 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택된 아미노산을 코드화한다.

[0172] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 VELOCIMMUNE® 인간화된 면역글로불린 마우스에서 가장 자주 관찰되는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 존재한다.

[0173] 한 구체예에서, CDR3의 일부분을 코드화하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 소수성 프레임, 중지 프레임 및 친수성 프레임으로부터 선택된다.

[0174] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임이다.

[0175] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D1-1(GTTGT; SEQ ID NO:88), D1-7(GITGT; SEQ ID NO:89), D1-20(GITGT; SEQ ID NO:89) 및 D1-26(GIVGAT; SEQ ID NO:90)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0176] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D2-2(DIVVVPAAI; SEQ ID NO:92), D2-8(DIVLMVYAI; SEQ

ID NO:94), D2-15(DIVVVVAAT; SEQ ID NO:95) 및 D2-21(HIVVVTAI; SEQ ID NO:97)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0177] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D3-3(ITIFGVII; SEQ ID NO:98), D3-9(ITIF*LVII; SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100), D3-10(ITMVRGVII; SEQ ID NO:101), D3-16(IMITFGGVIVI; SEQ ID NO:102) 및 D3-22(ITMIVVVIT; SEQ ID NO:103)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0178] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D4-4(TTVT; SEQ ID NO:105), D4-11(TTVT; SEQ ID NO:105), D4-17(TTVT; SEQ ID NO:105) 및 D4-23(TTVVT; SEQ ID NO:106)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0179] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D5-5(VDTAMV; SEQ ID NO:107), D5-12(VDIVATI; SEQ ID NO:108), D5-18(VDTAMV; SEQ ID NO:107) 및 D5-24(VEVATI; SEQ ID NO:109)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0180] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D6-6(SIAAR; SEQ ID NO:111), D6-13(GIAAAG; SEQ ID NO:113) 및 D6-19(GIAVAG; SEQ ID NO:115)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0181] 한 구체예에서, 소수성 프레임은 사람 D7-27(LTG)를 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0182] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임이다.

[0183] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D1-1(VQLER; SEQ ID NO:8), D1-7(V*LEL), D1-20(V*LER), D1-26(V*WELL; SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0184] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D2-2(RIL**YQLLY; SEQ ID NO:14), D2-8(RILY*WCMLY; SEQ ID NO:16 및 SEQ ID NO:17), D2-15(RIL*WW*LLL) 및 D2-21(SILWW*LLF; SEQ ID NO:19)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0185] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D3-3(VLRFLEWLLY; SEQ ID NO:21), D3-9(VLRYFDWLL*; SEQ ID NO:23), D3-10(VLLWFGELL*; SEQ ID NO:25), D3-16(VL*LRLGELSLY; SEQ ID NO:27) 및 D3-22(VLL***WLL; SEQ ID NO:29)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0186] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D4-4 (*LQ*L), D4-11 (*LQ*L), D4-17 (*LR*L) 및 D4-23 (*LRW*L)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0187] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D5-5(WIQLWL; SEQ ID NO:35), D5-12(WI*WLRL; SEQ ID NO:37), D5-18(WIQLWL; SEQ ID NO:35) 및 D5-24(*RWLQL; SEQ ID NO:39)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0188] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D6-6(V*QLV), D6-13(V*QLV; SEQ ID NO:41) 및 D6-

19(V*QWLV; SEQ ID NO:43)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0189] 한 구체예에서, 중지 리딩 프레임은 사람 D7-27(*LG)를 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0190] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임이다.

[0191] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D1-1(YNWND; SEQ ID NO:45), D1-7(YNWNY; SEQ ID NO:47), D1-20(YNWND; SEQ ID NO:45) 및 D1-26(YSGSYY; SEQ ID NO:49)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0192] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D2-2(GYCSSTSCYT; SEQ ID NO:51), D2-8(GYCTNGVCYT; SEQ ID NO:53), D2-15(GYCSGGSCYS; SEQ ID NO:55) 및 D2-21(AYCGGDCYS; SEQ ID NO:57)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0193] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D3-3(YYDFWSGYYT; SEQ ID NO:59), D3-9(YYDILTGYYN; SEQ ID NO:61), D3-10(YYYGSGSYNN; SEQ ID NO:63), D3-16(YYDYVWGSYRT; SEQ ID NO:65) 및 D3-22(YYYDSSGYYY; SEQ ID NO:67)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SE ID NO:66, SEQ ID NO:68 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0194] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D4-4(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-11(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-17(DYGDY; SEQ ID NO:71) 및 D4-23(DYGGNS; SEQ ID NO:73)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0195] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D5-5(GYSYGY; SEQ ID NO:75), D5-12(GYSGYDY; SEQ ID NO:77), D5-18(GYSYGY; SEQ ID NO:75) 및 D5-24(RDGYN; SEQ ID NO:79)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0196] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D6-6(EYSSSS; SEQ ID NO:81), D6-13(GYSSSWY; SEQ ID NO:83) 및 D6-19(GYSSGWY; SEQ ID NO:85)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:76 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0197] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D7-27 (NWG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

- [0198] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86 및 그것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0199] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-힌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.
- [0200] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나 (즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 여기서 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0201] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에 변형을 포함하는데, 그 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0202] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0203] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0204] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0205] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0206] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0207] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0208] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0209] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0210] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

- [0211] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0212] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있으며, 이 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).
- [0213] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.
- [0214] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0215] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0216] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0217] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0218] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0219] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능성 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H, D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.
- [0220] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고, 게놈 유전자좌는 적어도 하나의 리딩 프레임에서 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는, 유전자 변형되고 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형되고 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 좌석은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0221] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전

자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0222] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0223] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0224] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0225] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0226] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 본원에서 기술된 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0227] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0228] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존

성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0229] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체 예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노 산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0230] 한 측면으로, 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는 비-사람 동물의 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌가 제공되는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여 5'이 3'으로 반전되어 있고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0231] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0232] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 생식선 계놈에 존재한다.

[0233] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 하나 또는 그 이상, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상 또는 34 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 코드화한다.

[0234] 한 구체예에서, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 또는 모든 또는 실질적으로 모든 가능성 사람 D 유전자 절편이 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향이다.

[0235] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H, D, J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 비기능성이 되고(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 뉴클레오티드 서열, 예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열의 삽입을 통해 또는 비-기능성 재배열 또는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로 불린 V_H, D, J_H 절편의 반전을 통해), 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향으로 존재하고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0236] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편은 사람 V_H 유전자 절편, 및/또는 사람 J_H 유전자 절편에 작동 가능하게 연결된다.

[0237] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-5, D5-12, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D7-27 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0238] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D1 유전자 절편이다.

[0239] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D2-2, D2-8, D2-15, D2-21 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D2 유전자 절편이다.

[0240] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D3 유전자 절편이다.

[0241] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D4-4, D4-

11, D4-17, D4-23 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D4 유전자 절편이다.

[0242] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D5-5, D5-12, D5-18, D5-24 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D5 유전자 절편이다.

[0243] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D6-6, D6-13, D6-19 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D6 유전자 절편이다.

[0244] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D7-27이다.

[0245] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 중지 리딩 프레임, 친수성 리딩 프레임 및 소수성 리딩 프레임으로부터 선택되고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0246] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0247] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0248] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-헌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.

[0249] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌내에, 이때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0250] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에서의 변형을 포함하는데, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0251] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0252] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0253] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0254] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

- [0255] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0256] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0257] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0258] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0259] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0260] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0261] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 C_H3 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).
- [0262] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.
- [0263] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0264] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0265] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0266] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0267] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0268] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능성 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내

인성 V_H , D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.

[0269] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H , D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 유전자 변형된 유전자좌는 본원에 기술된 것과 같은 적어도 하나의 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0270] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0271] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0272] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0273] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0274] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0275] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 본원에서 기술된 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0276] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자

변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0277] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존 성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0278] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0279] 한 측면으로, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 자신의 생식선 게놈에 포함하고 있는 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0280] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0281] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 사람 V_H 유전자 절편, 사람 D 유전자 절편, 사람 J_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄 유전자 절편에 존재한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자 절편은 사람 생식선 V_H 유전자 절편, 사람 생식선 D 유전자 절편, 사람 생식선 J_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.

[0282] 한 구체예에서, 사람 V_H 유전자 절편은 V_H1-2 , V_H1-3 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-24 , V_H1-45 , V_H1-46 , V_H1-58 , V_H1-69 , V_H2-5 , V_H2-26 , V_H2-70 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-16 , V_H3-20 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 , $V_H3-30-3$, $V_H3-30-5$, V_H3-33 , V_H3-35 , V_H3-38 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H3-49 , V_H3-53 , V_H3-64 , V_H3-66 , V_H3-72 , V_H3-73 , V_H3-74 , V_H4-4 , V_H4-28 , $V_H4-30-1$, $V_H4-30-2$, $V_H4-30-4$, V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H4-61 , V_H5-51 , V_H6-1 , V_H7-4-1 , V_H7-81 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0283] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-14, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-12, D5-5, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D6-25, D7-27 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0284] 한 구체예에서, 사람 J_H 유전자 절편은 J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H5 , J_H6 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0285] 한 구체예에서, 첨가되거나 치환된 히스티딘 코돈은 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3 또는 그것들의 조합을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0286] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는

그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상, 34 또는 그 이상, 35 또는 그 이상, 36 또는 그 이상, 37 또는 그 이상, 38 또는 그 이상, 39 또는 그 이상, 40 또는 그 이상, 41 또는 그 이상, 42 또는 그 이상, 43 또는 그 이상, 44 또는 그 이상, 45 또는 그 이상, 46 또는 그 이상, 47 또는 그 이상, 48 또는 그 이상, 49 또는 그 이상, 50 또는 그 이상, 51 또는 그 이상, 52 또는 그 이상, 53 또는 그 이상, 54 또는 그 이상, 55 또는 그 이상, 56 또는 그 이상, 57 또는 그 이상, 58 또는 그 이상, 59 또는 그 이상, 60 또는 그 이상 또는 61 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 포함한다.

- [0287] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0288] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-헌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.
- [0289] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나 (즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 여기서 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0290] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에 변형을 포함하는데, 그 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0291] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0292] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0293] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0294] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0295] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0296] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으

로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0297] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0298] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0299] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0300] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0301] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).

[0302] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.

[0303] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0304] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0305] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0306] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.

[0307] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.

[0308] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능적 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H, D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.

[0309] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유

전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 유전자 변형된 유전자좌는 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 가지는 하나 또는 그 이상의 사람 V_H, D 및/또는 J_H 유전자 절편을 포함하는데, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 시슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0310] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0311] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0312] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0313] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0314] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0315] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이고, 비-사람 동물은 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 우선적으로 유도된 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현할 수 있다.

[0316] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 본원에서 기술된 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0317] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH

(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

- [0318] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존 성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0319] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.
- [0320] 한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.
- [0321] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.
- [0322] 한 구체예에서, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상, 34 또는 그 이상, 35 또는 그 이상, 36 또는 그 이상, 37 또는 그 이상, 38 또는 그 이상, 39 또는 그 이상, 40 또는 그 이상, 41 또는 그 이상, 42 또는 그 이상, 43 또는 그 이상, 44 또는 그 이상, 45 또는 그 이상, 46 또는 그 이상, 47 또는 그 이상, 48 또는 그 이상, 49 또는 그 이상, 50 또는 그 이상, 51 또는 그 이상, 52 또는 그 이상, 53 또는 그 이상, 54 또는 그 이상, 55 또는 그 이상, 56 또는 그 이상, 57 또는 그 이상, 58 또는 그 이상, 59 또는 그 이상, 60 또는 그 이상 또는 61 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈이 히스티딘 코돈으로 대체된다.
- [0323] 한 구체예에서, 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택된 아미노산을 코드화한다.
- [0324] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3, 그것들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 가변 도메인을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.
- [0325] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 상보성 결정 영역(CDR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.
- [0326] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 FR1, FR2, FR3, FR4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 프레임 영역(FR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.
- [0327] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 V_H 계놈 절편을 포함

하는데, 이때 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0328] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하고, 이때 사람 V_H 유전자 절편은 V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-45, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-16, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-30-3, V_H3-30-5, V_H3-33, V_H3-35, V_H3-38, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-49, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-66, V_H3-72, V_H3-73, V_H3-74, V_H4-4, V_H4-28, V_H4-30-1, V_H4-30-2, V_H4-30-4, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H4-61, V_H5-51, V_H6-1, V_H7-4-1, V_H7-81 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0329] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 J_H 유전자 절편을 포함하고, 이때 사람 J_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0330] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 J_H 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하고, 이때 사람 J_H 유전자 절편은 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5, J_H6 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0331] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 CDR3의 부분을 코드화하는 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다. 한 구체예에서, CDR3의 부분은 리딩 프레임에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함한다.

[0332] 한 구체예에서, 히스티딘 코돈으로 치환된 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택되는 아미노산을 코드화한다.

[0333] 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈은 VELOCIMMUNE® 인간화된 면역글로불린 마우스에서 가장 자주 관찰되는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 존재한다.

[0334] 한 구체예에서, CDR3의 부분을 코드화하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 소수성 프레임, 중지 프레임 및 친수성 프레임으로부터 선택된다.

[0335] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임이다.

[0336] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D1-1(GTTGT; SEQ ID NO:88), D1-7(GITGT; SEQ ID NO:89), D1-20(GITGT; SEQ ID NO:89) 및 D1-26(GIVGAT; SEQ ID NO:90)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0337] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D2-2(DIVVVPAI; SEQ ID NO:92), D2-8(DIVLMVYAI; SEQ ID NO:94), D2-15(DIVVVVAAT; SEQ ID NO:95) 및 D2-21(HIVVVTAI; SEQ ID NO:97)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0338] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D3-3(ITIFGVVII; SEQ ID NO:98), D3-9(ITIF*LVII; SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100), D3-10(ITMVRGVII; SEQ ID NO:101), D3-16(IMITFGGVIVI; SEQ ID NO:102) 및 D3-22(ITMIVVVIT; SEQ ID NO:103)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0339] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D4-4(TTWT; SEQ ID NO:105), D4-11(TTWT; SEQ ID NO:105), D4-17(TTWT; SEQ ID NO:105) 및 D4-23(TTVWT; SEQ ID NO:106)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있

는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0340] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D5-5(VDTAMV; SEQ ID NO: 107), D5-12(VDIVATI; SEQ ID NO:108), D5-18(VDTAMV; SEQ ID NO:107) 및 D5-24(VEVATI; SEQ ID NO:109)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0341] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D6-6(SIAAR; SEQ ID NO:111), D6-13(GIAAG; SEQ ID NO:113) 및 D6-19(GIAVAG; SEQ ID NO:115)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0342] 한 구체예에서, 소수성 프레임은 사람 D7-27(LTG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0343] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임이다.

[0344] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D1-1(VQLER; SEQ ID NO:8), D1-7(V*LEL), D1-20(V*LER), D1-26(V*WELL; SEQ ID NO:12)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0345] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D2-2(RIL**YQLLY; SEQ ID NO:14), D2-8(RILY*WCMLY; SEQ ID NO:16 및 SEQ ID NO:17), D2-15(RIL*WW*LLL) 및 D2-21(SILWW*LLF; SEQ ID NO:19)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0346] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D3-3(VLRFLEWLLY; SEQ ID NO:21), D3-9(VLRYFDWLL*; SEQ ID NO:23), D3-10(VLLWFGELL*; SEQ ID NO:25), D3-16(VL*LRGELSLY; SEQ ID NO:27) 및 D3-22(VLL***WLL; SEQ ID NO:29)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0347] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D4-4(*LQ*L), D4-11(*LQ*L), D4-17(*LR*L) 및 D4-23(*LRW*L)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0348] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D5-5(WIQLWL; SEQ ID NO:35); D5-12(WI*WLRL; SEQ ID NO:37), D5-18(WIQLWL; SEQ ID NO:35) 및 D5-24(*RWLQL; SEQ ID NO:39)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0349] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D6-6(V*QLV), D6-13(V*QQLV; SEQ ID NO:41) 및 D6-19(V*QWLV; SEQ ID NO:43)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0350] 한 구체예에서, 중지 프레임은 D7-27(*LG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0351] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임이다.

[0352] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D1-1(YNWND; SEQ ID NO:45), D1-7(YNWNLY; SEQ ID NO:47), D1-20(YNWNND; SEQ ID NO:45) 및 D1-26(YSGSYY; SEQ ID NO:49)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는

적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0353] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D2-2(GYCSSTSCYT; SEQ ID NO:51), D2-8(GYCTNGVCYT; SEQ ID NO:53), D2-15(GYCSGGSCYS; SEQ ID NO:55) 및 D2-21(AYCGGDCYS; SEQ ID NO:57)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0354] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D3-3(YYDFWSGYYT; SEQ ID NO:59), D3-9(YYDILTGYYN; SEQ ID NO:61), D3-10(YYGSGSYYN; SEQ ID NO:63), D3-16(YYDYVWGSYRYT; SEQ ID NO:65) 및 D3-22(YYYDSSGYYY; SEQ ID NO:67)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0355] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D4-4(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-11(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-17(DYGDY; SEQ ID NO:71) 및 D4-23(DYGGNS; SEQ ID NO:73)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0356] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D5-5(GYSYGY; SEQ ID NO:75), D5-12(GYSGYDY; SEQ ID NO:77), D5-18(GYSYGY; SEQ ID NO:75) 및 D5-24(RDGYN; SEQ ID NO:79)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0357] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D6-6(EYSSSS; SEQ ID NO:81), D6-13(GYSSSWY; SEQ ID NO:83) 및 D6-19(GYSSGWY; SEQ ID NO:85)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:76 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0358] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D7-27(NWG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0359] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86 및 그것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0360] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 함유하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0361] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된

다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-헌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.

[0362] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 여기서 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0363] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에 변형을 포함하는데, 그 경우 변형은 산성환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0364] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0365] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0366] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0367] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0368] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0369] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0370] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0371] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0372] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0373] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0374] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG

의 두 번째 C_β3 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).

[0375] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.

[0376] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0377] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0378] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0379] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.

[0380] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.

[0381] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능적 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H, D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.

[0382] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 게놈 유전자좌는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 유전자 변형되고, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형되고, 재배열되지 않은 중쇄 가변 유전자 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0383] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0384] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0385] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경

쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로 불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0386] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리팅 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0387] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0388] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0389] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0390] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0391] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다

적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0392] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이고, 비-사람 동물은 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 우선적으로 유도된 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현할 수 있다.

[0393] 한 측면으로, 사람 V_H , D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여 5'에서 3'으로 반전되었고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0394] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0395] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 생식선 계놈에 존재한다.

[0396] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 하나 또는 그 이상, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상 또는 34 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0397] 한 구체예에서, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 또는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 D 유전자 절편이 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향이다.

[0398] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H , D, J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 비기능성이 되고(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 뉴클레오티드 서열, 예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열의 삽입을 통해 또는 비-기능성 재배열 또는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H , D, J_H 절편의 반전을 통해), 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 사람 V_H , D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향으로 존재하고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0399] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편은 사람 V_H 유전자 절편, 및/또는 사람 J_H 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다.

[0400] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-5, D5-12, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D7-27 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0401] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D1 유전자 절편이다.

[0402] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D2-2, D2-8, D2-15, D2-21 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D2 유전자 절편이다.

[0403] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D3 유전자 절편이다.

[0404] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D4-4, D4-11, D4-17, D4-23 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D4 유전자 절편이다.

[0405] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D5-5, D5-12, D5-18, D5-24 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D5 유전자 절편이다.

[0406] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D6-6, D6-

13, D6-19 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D6 유전자 절편이다.

[0407] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D7-27이다.

[0408] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 중지 리딩 프레임, 친수성 리딩 프레임, 소수성 리딩 프레임 및 그것들의 조합으로부터 선택되고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.

[0409] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0410] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-헌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.

[0411] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이 때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0412] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에서의 변형을 포함하는데, 이 때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0413] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0414] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이 때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0415] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이 때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0416] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이 때 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0417] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0418] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0419] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

- [0420] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0421] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0422] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0423] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).
- [0424] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.
- [0425] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0426] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0427] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0428] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0429] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0430] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능적 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H, D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.
- [0431] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 유전자 변형된 유전자좌는 본원에 기술된 것과 같은 적어도 하나의 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 그 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것

의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0432] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.

[0433] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.

[0434] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.

[0435] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0436] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0437] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이고, 비-사람 동물은 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 우선적으로 유도된 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현할 수 있다.

[0438] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0439] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는

항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0440] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0441] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0442] 한 측면으로, 증강된 pH-의존성 재순환성 및/또는 증대된 혈청반감기를 가지는 항원-결합 단백질을 발현할 수 있는 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 비-사람 동물은 그것이 생식선 계놈에 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 그 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 본원에 기술된 것과 같이 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0443] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0444] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0445] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0446] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가

번 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체 예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0447] 한 측면으로, 비-사람 동물의 게놈 D 영역 또는 게놈 V 및 J 영역에 동종성인 5' 및 3' 표적화 아암을 포함하는 표적화 구성물이 제공되는데, 이때 적어도 하나의 V_H , D 또는 J_H 유전자 절편은 본원에 기술된 것과 같은 변형 중 어떠한 것, 예를 들면 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가, 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환, 및/또는 해당하는 야생형 서열과 관련하여 적어도 하나의 기능성 D 유전자 절편의 반전을 포함한다.

[0448] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물 중 어느 것의 세포로부터 유도되는 하이브리도마 또는 콰드로마(quadroma)가 제공된다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0449] 한 측면으로, 기술된 본 발명의 다양한 게놈 변형을 포함하는 비-사람 동물로부터 유도된 다능성, 유도된 다능성 또는 분화전능성 줄기 세포가 제공된다. 특정 구체예에서, 다능성, 유도된 다능성 또는 분화전능성 줄기 세포는 마우스 또는 쥐의 배 줄기(ES) 세포이다. 한 구체예에서, 유도된 다능성 또는 분화전능성 줄기 세포는 XX 핵형 또는 XY 핵형을 가진다. 한 구체예에서, 유도된 다능성 또는 분화전능성 줄기 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0450] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형, 예컨대 전핵성 주입에 의해 세포에 도입된 변형을 함유하고 있는 핵을 포함하는 세포가 또한 제공된다. 한 구체예에서, 다능성, 유도된 다능성 또는 분화전능성 줄기 세포는 유전자 변형된 면역글로불린 게놈 유전자좌를 포함하고, 이때 게놈 유전자좌는 5'에서 3' 방향으로 (1) FRT 재조합 부위, (2) 사람 V_H 게놈 유전자 절편, (3) 마우스 adam6 유전자, (4) loxP 재조합 부위, (5) 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편, (6) 사람 J_H 유전자 절편, 이어서 (7) 마우스 E_i (인트로닉 인핸서) 및 (8) 마우스 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0451] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같이 유전자 변형된 비-사람 동물로부터 분리된 림프구가 제공된다. 한 구체 예에서, 림프구는 B 세포인데, B 세포는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역글로불린 게놈 유전자좌를 포함하고, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 유전자 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0452] 한 측면으로, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 비-사람 동물로부터 분리된 림프구가 제공된다. 한 구체예에서, 림프구는 B 세포로, B 세포는 사람 V, D 및 J 유전자 절편을 포함하는 면역글로불린 유전자좌를 포함하고, 이때 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나는 야생형 서열과 관련하여 5'에서 3'으로 반전되었고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 코드화한다. 한 구체예에서, B 세포는 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질을 생성할 수 있다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 중쇄 가변 도메인은 중쇄 불변 영역 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0453] 한 측면으로, 항원-결합 단백질을 발현할 수 있는 B 세포 집단이 제공되는데, 이때 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하고, B 세포 집단은 본원에 기술된 것과 같은 어떠한 유전자 변형이든지 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 히스티딘 잔기는 중쇄 CDR에 존재한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 히스티딘 잔기는 CDR3에 존재한다.

[0454] 한 측면으로, 증대된 혈청반감기 및/또는 증강된 pH-의존성 재순환성을 가지는 항원-결합 단백질을 발현할 수 있는 B 세포 집단이 제공되는데, 이때 B 세포 집단은 본원에 기술된 것과 같은 어떠한 유전자 변형을 포함한다.

[0455] 한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 비-사람 동물의 게놈이 내인성 면역글로불린 중쇄 V, D 및 J 유전자 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만들도록(예컨대 뉴클레오티드 서열, 예컨대 외인성 뉴클레오티드 서열을 면역글로불린 유전자좌에 삽입하는 것을 통해서 또는 내인성 V_H , D, J_H 절편의 비기능성 재배열 또는 반전을 통해서) 비-사람 동물의 게놈을 변형시키고, (b) 게놈에 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 위치시키는 것으로 이루

어지며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 본원에 기술된 것과 같이 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0456] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.

[0457] 한 구체예에서, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상, 34 또는 그 이상, 35 또는 그 이상, 36 또는 그 이상, 37 또는 그 이상, 38 또는 그 이상, 39 또는 그 이상, 40 또는 그 이상, 41 또는 그 이상, 42 또는 그 이상, 43 또는 그 이상, 44 또는 그 이상, 45 또는 그 이상, 46 또는 그 이상, 47 또는 그 이상, 48 또는 그 이상, 49 또는 그 이상, 50 또는 그 이상, 51 또는 그 이상, 52 또는 그 이상, 53 또는 그 이상, 54 또는 그 이상, 55 또는 그 이상, 56 또는 그 이상, 57 또는 그 이상, 58 또는 그 이상, 59 또는 그 이상, 60 또는 그 이상 또는 61 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈이 히스티딘 코돈으로 대체된다.

[0458] 한 구체예에서, 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택된 아미노산을 코드화한다.

[0459] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3, 그것들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 가변 도메인을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0460] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 상보성 결정 영역(CDR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0461] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 FR1, FR2, FR3, FR4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 프레임 영역(FR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0462] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 V_H 유전자 절편을 포함하는데, 이때 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0463] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 V_H 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하고, 이때 사람 V_H 유전자 절편은 $V_{H1}-2$, $V_{H1}-3$, $V_{H1}-8$, $V_{H1}-18$, $V_{H1}-24$, $V_{H1}-45$, $V_{H1}-46$, $V_{H1}-58$, $V_{H1}-69$, $V_{H2}-5$, $V_{H2}-26$, $V_{H2}-70$, $V_{H3}-7$, $V_{H3}-9$, $V_{H3}-11$, $V_{H3}-13$, $V_{H3}-15$, $V_{H3}-16$, $V_{H3}-20$, $V_{H3}-21$, $V_{H3}-23$, $V_{H3}-30$, $V_{H3}-30-3$, $V_{H3}-30-5$, $V_{H3}-33$, $V_{H3}-35$, $V_{H3}-38$, $V_{H3}-43$, $V_{H3}-48$, $V_{H3}-49$, $V_{H3}-53$, $V_{H3}-64$, $V_{H3}-66$, $V_{H3}-72$, $V_{H3}-73$, $V_{H3}-74$, $V_{H4}-4$, $V_{H4}-28$, $V_{H4}-30-1$, $V_{H4}-30-2$, $V_{H4}-30-4$, $V_{H4}-31$, $V_{H4}-34$, $V_{H4}-39$, $V_{H4}-59$, $V_{H4}-61$, $V_{H5}-51$, $V_{H6}-1$, $V_{H7}-4-1$, $V_{H7}-81$ 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0464] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 유전자 변형된 사람 J_H 유전자 절편을 포함하고, 이때 사람 J_H 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 있는 하나 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈은 히스티딘 코돈으로 대체되었다.

[0465] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 J_H 절편의 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하고, 이때 사람 J_H 유전자 절편은 J_{H1} , J_{H2} , J_{H3} , J_{H4} , J_{H5} , J_{H6} 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0466] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 CDR3의 부분을 코드화하는 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다. 한 구체예에서, CDR3의 부분은 리딩 프레임에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체시키는 변형을 포함하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함한다.

- [0467] 한 구체예에서, 히스티딘 코돈으로 치환된 내인성 비-히스티딘 코돈은 Y, N, D, Q, S, W 및 R로부터 선택되는 아미노산을 코드화한다.
- [0468] 한 구체예에서, 첨가된 또는 치환된 히스티딘 코돈은 VELOCIMMUNE® 인간화된 면역글로불린 마우스에서 가장 자주 관찰되는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임에 존재한다.
- [0469] 한 구체예에서, CDR3의 부분을 코드화하는 유전자 변형된 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 소수성 프레임, 중지 프레임 및 친수성 프레임으로부터 선택된다.
- [0470] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임이다.
- [0471] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D1-1(GTTGT; SEQ ID NO:88), D1-7(GITGT; SEQ ID NO:89), D1-20(GITGT; SEQ ID NO:89) 및 D1-26(GIVGAT; SEQ ID NO:90)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0472] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D2-2(DIVVVPAAI; SEQ ID NO:92), D2-8(DIVLMVYAI; SEQ ID NO:94), D2-15(DIVVVVAAT; SEQ ID NO:95) 및 D2-21(HIVVVTAI; SEQ ID NO:97)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0473] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D3-3(ITIFGVVII; SEQ ID NO:98), D3-9(ITIF*LVII; SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100), D3-10(ITMVRGVII; SEQ ID NO:101), D3-16(IMITFGGVIVI; SEQ ID NO:102) 및 D3-22(ITMIVVVIT; SEQ ID NO:103)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0474] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D4-4(TTVT; SEQ ID NO:105), D4-11(TTVT; SEQ ID NO:105), D4-17(TTVT; SEQ ID NO:105) 및 D4-23(TTVVT; SEQ ID NO:106)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0475] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D5-5(VDTAMV; SEQ ID NO: 107), D5-12(VDIVATI; SEQ ID NO:108), D5-18(VDTAMV; SEQ ID NO:107) 및 D5-24(VEVEMATI; SEQ ID NO:109)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0476] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 소수성 프레임은 D6-6(SIAAR; SEQ ID NO:111), D6-13(GIAAG; SEQ ID NO:113) 및 D6-19(GIAVAG; SEQ ID NO:115)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0477] 한 구체예에서, 소수성 프레임은 사람 D7-27(LTG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0478] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임이다.
- [0479] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D1-1(VQLER; SEQ ID NO:8), D1-7(V*LEL), D1-20(V*LER), D1-26(V*WELL; SEQ ID NO:12)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0480] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D2-2(RIL**YQLLY; SEQ ID NO:14), D2-8(RILY*WCMLY; SEQ ID NO:16 및 SEQ ID NO: 17), D2-15(RIL*WW*LLL) 및 D2-21(SILWW*LLF; SEQ ID NO:19)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.
- [0481] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D3-3(VLRFLEWLLY; SEQ ID NO:21), D3-9(VLRYFDWLL*;

SEQ ID NO:23), D3-10(VLLWFGELL*; SEQ ID NO:25), D3-16(VL*LRLGELSLY; SEQ ID NO:27) 및 D3-22(VLL***WLLL; SEQ ID NO:29)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0482] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D4-4(*LQ*L), D4-11(*LQ*L), D4-17(*LR*L) 및 D4-23(*LRW*L)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0483] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D5-5(WIQLWL; SEQ ID NO:35); D5-12(WI*WLRL; SEQ ID NO:37), D5-18(WIQLWL; SEQ ID NO:35) 및 D5-24(*RWLQL; SEQ ID NO:39)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0484] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 중지 리딩 프레임은 D6-6(V*QLV), D6-13(V*QLV; SEQ ID NO:41) 및 D6-19(V*QWLV; SEQ ID NO:43)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0485] 한 구체예에서, 중지 프레임은 D7-27(*LG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0486] 한 구체예에서, 리딩 프레임은 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임이다.

[0487] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D1-1(YNWND; SEQ ID NO:45), D1-7(YNWNY; SEQ ID NO:47), D1-20(YNWND; SEQ ID NO:45) 및 D1-26(YSGSYY; SEQ ID NO:49)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0488] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D2-2(GYCSSTSCYT; SEQ ID NO:51), D2-8(GYCTNGVCYT; SEQ ID NO:53), D2-15(GYCSGGSCYS; SEQ ID NO:55) 및 D2-21(AYCGGDCYS; SEQ ID NO:57)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0489] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D3-3(YYDFWSGYYT; SEQ ID NO:59), D3-9(YYDILTGYYN; SEQ ID NO:61), D3-10(YYYGSGSYYN; SEQ ID NO:63), D3-16(YYDYVWGSYRT; SEQ ID NO:65) 및 D3-22(YYDSSGYYY; SEQ ID NO:67)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SE ID NO:66, SEQ ID NO:68 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0490] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D4-4(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-11(DYSNY; SEQ ID NO:69), D4-17(DYGDY; SEQ ID NO:71) 및 D4-23(DYGGNS; SEQ ID NO:73)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0491] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D5-5(GYSYGY; SEQ ID NO:75), D5-12(GYSGYDY; SEQ ID NO:77), D5-18(GYSYGY; SEQ ID NO:75) 및 D5-24(RDGNY; SEQ ID NO:79)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노

산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0492] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D6-6(EYSSSS; SEQ ID NO:81), D6-13(GYSSSWY; SEQ ID NO:83) 및 D6-19(GYSSGWWY; SEQ ID NO:85)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 친수성 프레임은 SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:76 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0493] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 D7-27(NWG)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 사람 D 유전자 절편은 추가로 뉴클레오티드 서열에 있는 적어도 하나의 내인성 코돈을 히스티딘 코돈으로 대체하는 변형을 포함한다.

[0494] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 프레임은 SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86 및 그것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0495] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0496] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-힌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.

[0497] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이 때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).

[0498] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에서의 변형을 포함하는데, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0499] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0500] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0501] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5

내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_h2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

- [0502] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_h3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_h3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_h3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0503] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0504] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0505] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0506] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0507] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0508] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.
- [0509] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 C_h3 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).
- [0510] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.
- [0511] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0512] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0513] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0514] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0515] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.

- [0516] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H , D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H , D, J_H 절편의 비-기능적 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H , D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.
- [0517] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H , D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 게놈 유전자좌는 적어도 하나의 리딩 프레임에서 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 유전자 변형된, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형되고, 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0518] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.
- [0519] 한 구체예에서, 유전자 변형된 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.
- [0520] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.
- [0521] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.
- [0522] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.
- [0523] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

- [0524] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.
- [0525] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0526] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.
- [0527] 한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 비-사람 동물의 게놈이 내인성 면역글로불린 중쇄 V, D 및 J 유전자 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만들도록(예컨대 뉴클레오티드 서열(예컨대 외인성 뉴클레오티드 서열)을 면역글로불린 유전자좌에 삽입하는 것을 통해서 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비기능성 재배열 또는 반전을 통해서) 비-사람 동물의 게놈을 변형시키고, (b) 게놈에 사람 V_H, D, J_H 절편을 위치시키는 것으로 이루어지며, 이때 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나는 야생형 서열과 관련하여 5'에서 3'으로 반전되었고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0528] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류, 이를테면 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.
- [0529] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 생식선 게놈에 존재한다.
- [0530] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 하나 또는 그 이상, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상 또는 34 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 코드화한다.
- [0531] 한 구체예에서, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 또는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 D 유전자 절편이 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향을 가진다.

- [0532] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H, D, J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 비기능성이 되고(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 뉴클레오티드 서열, 예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열의 삽입을 통해 또는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H, D, J_H 절편의 비-기능성 재배열 또는 반전을 통해), 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여 반전된 방향으로 존재하고, 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0533] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편은 사람 V_H 유전자 절편, 및/또는 사람 J_H 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다.
- [0534] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-5, D5-12, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D7-27 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0535] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D1-1, D1-7, D1-20, D1-26 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D1 유전자 절편이다.
- [0536] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D2-2, D2-8, D2-15, D2-21 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D2 유전자 절편이다.
- [0537] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D3 유전자 절편이다.
- [0538] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D4-4, D4-11, D4-17, D4-23 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D4 유전자 절편이다.
- [0539] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D5-5, D5-12, D5-18, D5-24 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D5 유전자 절편이다.
- [0540] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D6-6, D6-13, D6-19 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 D6 유전자 절편이다.
- [0541] 한 구체예에서, 해당하는 야생형 서열에 비교하여 반전된 방향으로 존재하는 사람 D 유전자 절편은 D7-27이다.
- [0542] 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 리딩 프레임은 중지 리딩 프레임, 친수성 리딩 프레임, 소수성 리딩 프레임 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.
- [0543] 한 구체예에서, 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0544] 한 구체예에서, 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3(C_H1-헌지-C_H2-C_H3)를 포함한다.
- [0545] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 게놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이 때 내인성 유전자좌는 게놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0546] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에서의 변형을 포함하는데, 이 때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.
- [0547] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 250(예컨대 E 또는 Q), 250 및 428(예컨대 L 또는 F), 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250

및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함하는 사람 중 쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다. 한 구체예에서, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예컨대 308F 또는 308P)을 포함하며, 이 경우 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0548] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0549] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0550] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0551] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0552] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0553] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 N434A 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0554] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0555] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0556] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 코드화한다.

[0557] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 다음을 포함한다: (1) 본원에서 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 CH₃ 아미노산 서열을 코드화하는 첫 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 첫 번째 대립유전자; 및 (2) 본원에 기술된 것과 같은 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 C_H3 아미노산 서열을 코드화하는 두 번째 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있고, 이때 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 단백질 A에 대한 두 번째 CH₃ 아미노산 서열에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함하고 있는 두 번째 대립유전자(예를 들면 US 2010/0331527A1 참조).

[0558] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 추가로 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F)을 포함한다. 다른 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R) 및 Y96F 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU에 의하면 H436F) 두 가지를 모두 포함한다.

[0559] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 D356E, L38M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터

선택된 돌연변이를 포함한다.

- [0560] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0561] 한 구체예에서, 두 번째 CH₃ 아미노산 서열은 변형된 사람 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0562] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0563] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 상기에서 기술된 하나 또는 그 이상의 어떠한 유형의 변형이든지 포함한다.
- [0564] 한 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편은 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 결실되거나 또는 비-기능성으로 된다(예컨대 면역글로불린 유전자좌에 있는 뉴클레오티드 서열(예를 들면 외인성 뉴클레오티드 서열)의 삽입을 통해 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비-기능성 재배열 또는 반전을 통해). 한 구체예에서, 예를 들면 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상, 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 V_H, D 또는 J_H 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예를 들면 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 V, D 또는 유전자 절편이 결실되거나 비기능성이 된다.
- [0565] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 또는 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 유전자 변형된 유전자좌는 본원에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 반전된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 재배열된 중쇄 가변 영역을 포함하며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치에 존재하거나(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예를 들면 그것의 계놈에 있는 내인성 면역글로불린 사슬 유전자좌와는 다른 유전자좌에 있거나 또는 그것의 내인성 유전자좌, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에 있고, 이 경우 내인성 유전자좌는 계놈의 상이한 위치에 있거나 상이한 위치로 이동된다).
- [0566] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하며, 유전자 변형은 내인성 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다.
- [0567] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 비정상 위치에 존재하는 Adam6a 유전자, Adam6b 유전자 또는 둘 다를 포함하다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 비-사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 마우스 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6a 유전자는 사람 Adam6a 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 비-사람 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 마우스 Adam6b 유전자이다. 한 구체예에서, Adam6b 유전자는 사람 Adam6b 유전자이다.
- [0568] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 추가로 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 및/또는 κ 경쇄 가변 유전자 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열 및 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 면역글로불린 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 λ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, λ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다. 한 구체예에서, 인간화되고 재배열되지 않은 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, κ 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 마우스, 쥐 또는 사람 서열이다.
- [0569] 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 적어도 하나의 리딩 프레임에 적어도 하나의 히스티딘 코돈을 도입하는 적어도 하나의 변형을 함유하는 재배열되지 않은 경쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 경쇄 CDR에 히스티딘에 대한 1, 2, 3 또는 4개의 코돈을 포함하는 재배열된(예컨대 재배열된 λ 또는 κ V/J 서열) 서열을 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배

열된 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열이다. 한 구체예에서, 재배열되지 않은 또는 재배열된 사람 λ 또는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 유전자좌이다. 한 구체예에서, 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌는 마우스 λ 유전자좌이다.

[0570] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 마우스의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 VELOCIMMUNE® 마우스의 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재한다.

[0571] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은, 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서 유전자 변형이 없는 해당하는 야생형 중쇄 가변 도메인보다 더 약한 항원 결합을 나타낸다.

[0572] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0573] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0574] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0575] 한 측면으로, 증대된 혈청 반감기 및/또는 증강된 pH-의존성 재순환성을 가지는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 생성할 수 있는 비-사람 동물의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 비-사람 동물의 계놈이 내인성 면역글로불린 중쇄 V, D 및 J 유전자 절편을 결합시키거나 비-기능성으로 만들도록(예컨대 뉴클레오티드 서열(예컨대 외인성 뉴클레오티드 서열)을 면역글로불린 유전자좌에 삽입하는 것을 통해서 또는 내인성 V_H, D, J_H 절편의 비기능성 재배열 또는 반전을 통해서) 비-사람 동물의 계놈을 변형시키고, (b) 계놈에 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 위치시키는 것으로 이루어지며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하며, 비-사람 동물에 의해 생성된 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 야생형 면역글로불링 중쇄 도메인에 비교하여 증대된 혈청반감기 및/또는 증강된 pH-의존성 재순환

성을 나타낸다.

- [0576] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 항원과 접촉될 때, 증대된 혈청반감기 및/또는 증강된 pH-의존성 재순환성을 가지는 항원-결합 단백질을 발현하는 B 세포 레퍼토리의 풍부해진 집단을 생성할 수 있으며, 이 풍부해진 B 세포 집단은 본원에 기술된 것과 같은 어떠한 유전자 변형이든지 포함한다.
- [0577] 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물에 의해 생성된 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서 관심의 항원에 대한 충분한 친화성 및 중성 pH보다 낮은 pH(예컨대 엔도솜 pH, 예를 들면 약 5.5 내지 6.0의 pH)에서 항원-항원-결합 단백질 복합체로부터 항체의 증강된 해리를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0578] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 환경(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.
- [0579] 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 유전자 변형이 없는 야생형 항원-결합 단백질과 비교하여 개선된 pH-의존성 재순환성, 증대된 혈청반감기 또는 둘 다를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0580] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 관심의 항원으로 자극될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 생성할 수 있는 B 세포 집단을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같은 항원-결합 단백질은 대상에게 투여될 때, 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질을 능가하는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유사한 또는 충분히 유사한 아미노산 서열을 가지지만 중쇄 가변 도메인에 히스티딘 잔기를 포함하지 않은 해당하는 야생형 항원-결합 단백질보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배 더 높은 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.
- [0581] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 중성 pH(약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 및 10^{-12} 보다 낮은 친화성(K_D)을 가지는 관심의 항원에 특이하게 결합할 수 있는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0582] 한 측면으로, 증강된 재순환성 및/또는 개선된 혈청 반감기를 가지는 항원-결합 단백질을 얻는 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 가지는 비-사람 동물을 면역시키는 것, 이때 비-사람 동물은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하고; (b) 비-사람 동물이 면역 반응을 시작하는 것을 허용하며; (c) 면역화된 비-사람 동물로부터 림프구(예컨대 B 세포)를 수득하고; (d) 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하며; 그리고 (e) 하이브리도마 세포에 의해 생성된 항원-결합 단백질을 얻는 것으로 이루어지며, 상기 항원-결합 단백질은 증강된 재순환성 및/또는 혈청 안정성을 나타낸다.
- [0583] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 방법 중 어느 것에 의해서든지 얻을 수 있는 유전자 변형된 면역글로불

런 중쇄 유전자좌가 제공된다.

- [0584] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 방법 중 어느 것에 의해서든지 얻을 수 있는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공된다.
- [0585] 다양한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류이다. 한 구체예에서, 포유류는 설치류, 예컨대 마우스, 쥐 또는 햄스터이다.
- [0586] 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 비-사람 동물, 예컨대, 포유류, 예를 들면 마우스, 쥐 또는 햄스터의 생식선 개놈에 존재한다.

도면의 간단한 설명

- [0587] 도 1a 및 도 1b는 사람 D 유전자 절편(D)의 세 개의 리딩 프레임(즉, 중지, 친수성 및 소수성 리딩 프레임)에 의해 코드화된 아미노산 서열 및 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD)의 세 개의 리딩 프레임에 의해 코드화된 아미노산 서열을 도시한다. 친수성 리딩 프레임에 히스티딘 코돈을 도입(진하게 표시됨)하는 것은 또한 중지 리딩 프레임의 많은 중지 코돈을 Ser 코돈으로 치환시켰지만(진하게 표시됨) 소수성 리딩 프레임에도 소수의 치환을 도입한다. "*"기호는 중지 코돈을 나타내고, 두 개의 SEQ ID NO 사이의 쉼표는 거기에 중지 코돈에 의해 분리된 두 개의 아미노산 서열이 있음을 가리킨다.

도 2는 MAID 1116의 5' 단부에 스펙티노마이신 선택 카세트를 함유하고 있는 pLMA0174를 표적화(단계 1. BHR (Spec))하기 위한 개략도를 도시한다. 단계 1에서, 클로르암페니콜 선택 카세트, 네오마이신 선택 카세트, loxP 부위, 두 개의 V_H 유전자 절편(h V_H 1-3 및 h V_H 1-2), 사람 Adam6 유전자는 모두 h V_H 6-1의 상류에 위치하고 있다가 클론으로부터 결실되었고, 스펙티노마이신 카세트에 의해 대체되어 VI433 클론이 생성되었다. 단계 2(BHR (Hyg+Spec))에서, FRT 부위가 양옆에 있는 하이그로마이신 카세트를 함유하고 있는 pNTu0002는 사람 면역글로불린 D 유전자 절편을 포함하는 영역 안으로 표적화되었다. 단계 2를 통해서, 모든 사람 D 유전자 절편이 VI433으로부터 결실되었고, 하이그로마이신 카세트로 대체되어서 MAID6011 VI 434(클론 1)가 생성되었다.

도 3은 순차적인 결찰을 통해 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 조립하기 위한 개략도를 도시한다.

도 4는 효소-중재 소화(PI-SceI 및 I-CeuI) 및 결찰을 통해 대부분의 D-근위 V_H 유전자 절편(V_H 6-1)과 대부분의 D-근위 J_H 유전자 절편(J_H 1) 사이의 영역에 네오마이신 카세트를 함유하는 사전-조립된, 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 도입하는 것을 도시한다. 이 과정은 MAID 6011 VI434로부터 하이그로마이신 카세트를 제거하고 클론에 사전-조립된 사람 히스티딘-치환된 D 유전자 절편을 도입한다. 성공적으로 표적화된 클론을 포함하고 있는 박테리아 세포가 네오마이신과 스펙티노마이신 내성 둘 다를 토대로 선택된다. 그 결과 생성된 클론 (MAID6012 VI469)은 5'에서 3'방향으로, (1) 스펙티노마이신 선택 카세트, (2) 사람 V_H 유전자 절편(V_H 6-1)을 포함하고 있는 50kb의 아암, (3) loxP 부위가 양 옆에 있는 네오마이신 카세트, (4) 히스티딘 치환(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))을 함유하고 있는 사람 D 유전자 절편, (5) 사람 J_H 유전자 절편을 함유하고 있는 약 25kb의 게놈 영역, (6) 마우스 E_i 서열(SEQ ID NO:5; 발달하는 B 세포에서 V_H 에서 DJ_H 로의 재배열을 촉진하는 인트로닉 인핸서) 및 (7) 마우스 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열(mIgM 엑손 1; SEQ ID NO:7)을 포함한다.

도 5는 MAID 6011 VI434에서 하이그로마이신 선택 카세트를 사용하여 MAID 1460 het의 129 균주-유도된 염색체를 표적화함으로써 MAID 1460 이형접합성 ES 세포로부터 사람 면역글로불린 중쇄 D 유전자 영역을 결실시키기 위한 개략도를 도시한다.

도 6은 MAID 6011을 확인하기 위한 선별 분석에서 대립유전자의 손실(LOA), 대립유전자의 획득(GOA) 또는 모(원래의) 대립유전자(Parental)를 확인하기 위해 사용된 프라이머와 프로브의 목록을 도시한다.

도 7은 MAID 6012 VI469를 사용하여 MAID 6011 이형접합성 ES 세포를 표적화함으로써 MAID 6012 het을 구성하기 위한 개략도를 도시한다. MAID 6012 VI469 구성물의 MAID 6011 이형접합성 ES 세포 안으로의 일렉트로포레이션 결과, 129 균주-유도된 염색체가 5'에서 3'방향으로 FRT 부위, 사람 V_H 유전자 절편, adam6 유전자를 포함하는 마우스 게놈 영역, 플록스트(floxed) 네오마이신 선택 카세트, 히스티딘 치환(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25,

1.26(11592bp); SEQ ID NO:4))을 함유하고 있는 사람 D 유전자 절편, 사람 J_H 유전자 절편, 마우스 Ei 서열(SEQ ID NO:5; 발달하는 B 세포에서 V_H에서 DJ_H로의 재배열을 촉진하는 인트로닉 인핸서) 및 마우스 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열(mIgM 엑손 1; SEQ ID NO:7)을 함유하도록 변형되는 MAID 6012 이형접합성 ES 세포가 생성된다.

도 8은 MAID 6012를 확인하기 위한 선별 분석에서 대립유전자의 손실(LOA), 대립유전자의 획득(GOA) 또는 모(원래의) 대립유전자(Parental)를 확인하기 위해 사용된 프라이머와 프로브의 목록을 도시한다.

도 9는 MAID 6012 이형접합성 ES 세포로부터 네오마이신 카세트를 제거하기 위한 개략도를 도시한다. Cre-발현 플라스미드의 MAID 6012 ES 세포 안으로의 일렉트로포레이션은 플록스트 네오마이신 카세트의 재조합 및 결실을 유도하여 MAID 6013 이형접합성 ES 세포가 생성된다.

도 10a 내지 도 10e는 6개의 리딩 프레임의 각각에 대한 번역을 포함하는 사람 D 유전자 절편 뉴클레오티드 서열을 도시한다. 즉 세 개의 리딩 프레임은 직접적인 5'에서 3' 방향에 대한 것이고, 세 개의 리딩 프레임은 역 방향(3'에서 5' 방향)에 대한 것이다. "*" 기호는 중지 코돈을 나타내고, 두 개의 SEQ ID NO사이의 쉼표는 거기 에 중지 코돈에 의해 분리된 두 개의 아미노산 서열이 있음을 가리킨다.

도 11 내지 도 13은 129 균주-유도된 염색체의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))을 포함하는 6013 F0 이형접합성 마우스에 의해 발현된 mRNA 서열 및 그것의 코드화된 단백질 서열을 도시한다. 각 도면에서 박스 안의 서열은 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 유도된 CDR3 서열에 히스티딘 코돈이 존재를 가리킨다. FWR은 프레임 영역을 나타내고, CDR은 상보성 결정 영역을 나타낸다. 배열에서 점 "."은 의문의 서열에 동일한 서열을 나타내고, 대시 "-"는 서열의 갭을 나타낸다.

도 14는 면역글로불린 중쇄 CDR3 서열의 히스티딘 통합 빈도를 예시한다. X-축은 각각의 CDR3 서열에서 보이는 히스티딘 코돈의 수를 나타내고, Y-축은 판독되는 해당 부분을 나타낸다. "6013 F0 het"은 히스티딘-치환된 D 유전자 절편을 포함하고 있는 6013 이형접합성 마우스에 의해 발현된 CDR3 서열을 가리킨다. "VI3-Adam6"는 본원에 기술된 것과 같은 히스티딘 변형이 없는 사람 VH, D 및 JH 유전자 절편을 포함하고 있는 대조 마우스로부터 얻어진 CDR3 서열을 가리킨다. "ASAP"는 또 다른 대조표준으로 사용된, Regeneron 항체 데이터베이스로부터 얻어진 CDR3 ↓열을 가리킨다.

도 15는 다양한 항원-특이적 항체(A-K 항체)로부터의 사람 V_K1-39-유도된 경쇄의 아미노산 배열을 도시한다. 각 경쇄 서열 내에 위치한 히스티딘(H) 잔기는 진하게 표시된다. 다양한 경쇄 영역(프레임워크 및 CDR)은 배열 위에 표시된다.

도 16은 돌연변이생성에 의해 사람 V_K1-39-유도된 경쇄의 CDR3 영역에서 공학처리된 히스티딘 잔기의 조합 및 위치를 도시한다. 해당하는 핵산 서열이 포함된다. 돌연변이생성과 해당하는 핵산 잔기를 통해 도입된 히스티딘 잔기는 진하게 표시된다. 아미노산 위치(105, 106 등)는 문헌(Lefranc et al. (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77)에 기술된 독특한 넘버링을 토대로 하고, 그것은 www.imgt.org 상에서도 볼 수 있다.

도 17은 CDR3의 표시된 위치(Y 축 참조)에 공학처리된 히스티딘 잔기를 가지는 5개의(1 내지 5) 상이한 중쇄 및 V_K1-39-유도된 경쇄를 코드화하는 핵산으로 형질전환된 CHO 세포의 상층액에서 검출되는 항체 발현 수준을 ng/mL로 표시한 것이다.

도 18은 CHO 세포 상층액에서 히스티딘 공학처리된 경쇄를 함유하는 선택된 항원-특이적 사람 항체의 발현을 보여주는 웨스턴 블롯이다.

도 19a 내지 도 19j는 중성(7.4) 및 산성(5.5) pH에서 다양한 히스티딘 공학처리된 경쇄와 짹을 이루는 항원-특이적 항체로부터 선택된 중쇄에 대한 결합 동역학을 도시한다.

도 20a 내지 도 20e는 중성(7.4) 및 산성(5.75) pH에서 다양한 히스티딘 공학처리된 경쇄와 짹을 이루는 항원-특이적 항체로부터 선택된 중쇄(1 내지 5)에 대한 결합 동역학을 도시한다. k_a, k_d, K_D 및 t_{1/2}를 포함한 다양한 동역학 매개변수들이 도시된다. NB=결합 없음.

도 21은 표시된 중쇄(2, 3 및 6)과 짹을 이루는 원래의 보편적인 경쇄 또는 히스티딘-변형된 보편적인 경쇄를 포함하는 항체에 대한 동역학적 매개변수(K_D 및 t_{1/2})를 도시한다. 히스티딘 치환은 여러 항체에서 강력한 pH 의

존성을 유도한다. 히스티딘 치환은 CDR3에서 서열 $_{105}QQSYSTP_{111}$ (SEQ ID NO:3)을 $_{105}HHSYSTH_{111}$ (SEQ ID NO:329)로 전환시키기 위하여 만들어졌다. NB=결합되는 검출이 없음을 주지할 것($K_d > 10$ 마이크로몰).

도 22는 히스티딘 잔기를 재배열된 사람 $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ 경쇄 서열의 CDR3에 공학적으로 도입하기 위하여 사용된 선택된 돌연변이생성 프라이머의 서열 및 특성(%GC 함량, N, % 미스매치, Tm)을 도시한다. 서열 목록에 사용된 이들 프라이머에 대한 SEQ ID NO는 아래의 표에 포함된다. F=전방 프라이머, R=역프라이머.

도 23a 내지 도 23b는 변형된 사람 경쇄를 함유하는 항체를 발현하는 유전자 변형된 마우스를 제조하기 위하여 $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ 가변 영역으로부터 유도된 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열에 히스티딘 잔기를 공학적으로 도입하기 위한 표적화 벡터의 구성을 위한 일반적인 전략을 도시한다. 도 23c 내지 도 23d는 ES 세포 안으로의 ULC-H105/106/108/111 치환을 위한 표적화 벡터의 도입 및 그것으로부터의 이형접합성 마우스의 생성을 도시하고; 도 23e 내지 도 23f는 ES 세포 안으로의 ULC-H106/108/111 치환을 위한 표적화 벡터의 도입 및 그것으로부터의 이형접합성 마우스의 생성을 도시한다. 도표는 척도로 표시되지 않는다. 다른 표시가 없는 한, 검게 칠해진 타원과 실선은 마우스 서열을 나타내고, 비어있는 타원과 이중선은 사람 서열을 나타낸다.

도 24는 히스티딘 보편적 경쇄(HULC)(4개의 His 치환 포함 - HULC 1927 마우스; 3개의 His 치환 포함 - HULC 1930 마우스) 및 두 번째 출혈에서 얻은 야생형 동물에 대해 이형접합성인 마우스로부터의 면역원에 대한 항혈청 역가를 도시한다.

도 25는 HULC(1927 대 1930) 및 WT 마우스로부터의 하이브리도마 융합물로부터 얻어진 총 항원 포지티브 클론의 수와 pH 민감성 항원 결합을 나타내는 항원 포지티브 클론의 수를 비교한 것이다. 이 도면은 각 마우스 타입("마우스 1" 및 "마우스 2")에 대하여 두 마리 마우스에 대한 데이터를 포함한다.

도 26a 내지 도 26c는 어느 하나의 이형접합성 HULC 또는 WT 마우스로부터의 단클론성 항체(AA, BB, CC, DD, HH, GG, NN 및 OO)가 중성 pH(pH 7.4)에서 면역원과 결합하는 것이 허용되고 이어서 해리 단계에 대해 7.4 또는 6.0의 어느 하나의 pH를 가지는 완충액으로 시프트되는 것이 허용되는 표면 플라스몬 공명 결합 실험으로부터의 센서그램을 도시한다. 각 그래프에서 개별적인 라인은 각각의 항체의 상이한 농도에서의 결합 반응을 나타낸다. 모든 실험은 25°C에서 수행되었다. 해리성 반감기 $t_{1/2}$ 은 각각의 센서그램 위에 표시되고, $t_{1/2}$ 로 표시되는 접힘 변화는 각각의 센서그램의 오른쪽에 포함된다. 항체 AA, BB, CC, DD, HH 및 GG는 His-치환된 경쇄를 사용하는 HULC 1927로부터 유래되고, NN은 WT 경쇄를 사용하는 HULC1927 마우스로부터 유래되며, OO는 WT 마우스로부터 유래한다(명확한 것은 표 5 참조).

도 27은 돌연변이생성에 의해 사람 $V\kappa 3-20$ -유도된 경쇄의 CDR3 영역에 공학적으로 도입된 히스티딘 잔기의 위치를 도시한다. 돌연변이생성을 통해 도입된 히스티딘 잔기와 해당하는 핵산 잔기는 진하게 표시된다. 아미노산 위치(105, 106 등)는 문헌에 기술된 것과 같은(Lefranc et al. (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77) 독특한 네모버킹을 토대로 하고, www.imgur.org 상에서도 볼 수 있다.

도 28은 히스티딘 잔기를 재배열된 사람 $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ 경쇄 서열의 CDR3에 공학적으로 도입하기 위하여 사용된 선택된 돌연변이생성 프라이머의 서열 및 특성(%GC 함량, N, % 미스매치, Tm)을 도시한다. 서열 목록에 사용된 이들 프라이머에 대한 SEQ ID NO는 아래의 표에 포함된다. F=전방 프라이머, R=역프라이머.

도 29a 내지 도 29b는 변형된 사람 경쇄를 함유하는 항체를 발현하는 유전자 변형된 마우스를 제조하기 위하여 $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ 경쇄 가변 영역으로부터 유도된 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열에 히스티딘 잔기를 공학적으로 도입하기 위한 표적화 벡터의 구성을 위한 일반적인 전략을 도시한다. 도 29c는 ES 세포 안으로의 ULC-Q105H/Q106H/Y107H/S109H 치환을 위한 표적화 벡터의 도입 및 그것으로부터의 이형접합성 마우스의 생성을 도시하고; 도 29d는 ES 세포 안으로의 ULC-Q105H/Q106H/S109H 치환을 위한 표적화 벡터의 도입 및 그것으로부터의 이형접합성 마우스의 생성을 도시한다. 도표는 척도로 표시되지 않는다. 다른 표시가 없는 한, 검게 칠해진 타원과 실선은 마우스 서열을 나타내고, 비어있는 타원과 이중선은 사람 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0588] 본 발명은 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않지만, 그러한 방법 및 조건은 달라질 수 있다. 본 발명의 범주가 청구범위에 의해 규정되기 때문에 본원에서 사용된 용어는 특정 구체예를 기술할 목적으로만 사용되고, 제한하려는 의도는 아니라는 것이 또한 인지되어야 한다.

[0589] 다르게 규정되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 용어 및 구절은 그 용어 또는 구절이 사용되는 맥락으로부터

그것과 반대되는 뜻이 분명하게 표시되거나 명백하게 드러나지 않는 한, 그 용어와 구절이 해당 기술분야에서 사용되는 의미를 포함한다. 비록 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 어떠한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 특정 방법 및 재료를 이제 설명하기로 한다.

[0590] 정의

본원에서 사용된 용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 연결된 두 개의 무거운(H) 사슬과 두 개의 가벼운(L) 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 도메인과 중쇄 불변 영역(C_H)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인과 경쇄 불변 영역(C_L)을 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 또한 과가변성 영역, 이를하여 상보성 결정 영역(CDR)으로 세분화될 수 있고, 그 사이사이에 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 더 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 세 개의 CDR과 네 개의 FR을 포함하는데, 이것들은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음과 같은 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4(중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로 약칭되고; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로 약칭될 수 있다). 용어 "고 친화성" 항체는 그것의 표적 에피토프와 관련하여 약 10⁻⁹ M 또는 그 이하의(예컨대 약 1×10⁻⁹ M, 1×10⁻¹⁰ M, 1×10⁻¹¹ M 또는 약 10⁻¹² M) K_D를 가지는 항체를 말한다. 한 구체예에서, K_D는 표면 플라스마 공명, 예컨대 BIACORE™에 의해 측정되고, 다른 구체예에서 K_D는 ELISA에 의해 측정된다.

구절 "이중특이성 항체"는 선택적으로 둘 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중특이성 항체는 일반적으로 두 개의 동일하지 않은 중쇄를 포함하는데, 각각의 중쇄는 상이한 에피토프 - 두 개의 상이한 분자 중 어느 하나(예컨대 두 개의 상이한 면역원의 상이한 에피토프)에 또는 동일한 분자 상에서(예컨대 동일한 면역원 상의 상이한 에피토프) 특이적으로 결합한다. 만약 이중특이성 항체가 선택적으로 두 개의 상이한 에피토프(첫 번째 에피토프와 두 번째 에피토프)에 결합할 수 있다면, 첫 번째 에피토프에 대한 첫 번째 중쇄의 친화성을 일반적으로 두 번째 에피토프에 대한 첫 번째 중쇄의 친화성보다 적어도 1 내지 2 또는 3 또는 4 또는 그 이상의 크기 차수만큼 낮을 것이고, 그 역도 마찬가지이다. 이중특이성 항체에 의해 특이적으로 결합된 에피토프는 동일하거나 상이한 표적(예컨대 동일하거나 상이한 단백질) 상에 있을 것이다. 그런 이중특이성 항체의 예를 들면 종양 항원에 대해 특이한 첫 번째 중쇄 및 세포독성 마커, 예컨대 Fc 수용체(예컨대 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 등) 또는 T 세포 마커(예컨대 CD3, CD28 등)에 대해 특이한 두 번째 중쇄를 가지는 이중특이성 항체가 있다. 나아가, 두 번째 중쇄 가변 도메인은 상이한 원하는 특이성을 가지는 중쇄 가변 도메인으로 치환될 수 있다. 예를 들어, 종양 항원에 대해 특이한 첫 번째 중쇄와 독소에 대해 특이한 두 번째 중쇄를 가지는 이중특이성 항체가 종양 세포에 독소(예컨대 사포린, 빙카 알카로이드 등)를 전달하기 위해 짹을 이를 수 있다. 다른 예시적인 이중특이성 항체로는 활성화 수용체(예컨대 B 세포 수용체, Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA, Fc α RI, T 세포 수용체 등)에 대해 특이한 첫 번째 중쇄 및 억제제 수용체(예컨대 Fc γ RIIB, CD5, CD22, CD72, CD300a 등)에 대해 특이한 두 번째 중쇄를 가지는 것들을 포함한다. 그런 이중특이성 항체는 세포 활성화(예컨대 알레르기 및 천식)와 관련된 치료 조건에 대해 구성될 수 있다. 이중특이성 항체는 예를 들면 동일한 면역원의 상이한 에피토프를 인지하는 중쇄를 조합시킴으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 동일한 면역원의 상이한 에피토프를 인지하는 중쇄 가변 서열을 코드화하는 핵산 서열은 동일 또는 상이한 중쇄 불변 영역을 코드화하는 핵산 서열에 융합될 수 있고, 그런 서열은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이성 항체는 각각 세 개의 중쇄 CDR과, 이어서 (N-말단에서 C-말단 방향으로) C_H1 도메인, 힌지, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인을 가지는 두 개의 중쇄, 및 에피토프-결합 특이성을 부여하지는 않지만 각각의 중쇄와 결합할 수 있거나, 또는 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 하나 또는 그 이상의 중쇄 에피토프-결합 영역에 의해 결합된 에피토프와 결합하거나, 또는 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 하나 또는 두 개 전부의 에피토프에 하나 또는 두 개 전부의 중쇄를 결합시킬 수 있는 면역글로불린 경쇄를 가진다.

용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현하기에 적당한 모든 세포를 포함한다. 세포는 원핵 및 진핵 세포(단일-세포 또는 다중-세포), 박테리아 세포(예컨대 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예컨대 맥주효모균, S. 품베, P. 파스토리스, P. 메탄올리카 등), 식물 세포, 곤충 세포(예컨대 SF-9, SF-21, 배풀로바이러스-감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니 등), 비-사람 동물 세포, 사람 세포, 또는 세포 융합물, 예컨대 하이브리도마 또는 콰드로마를 포함한다. 어떤 구체예에서, 세포는 사람, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포이다. 어떤 구체예에서, 세포는 진핵세포이고 다음의 세포로부터 선택된다: CHO(예컨대 CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예컨대 COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예

컨대 HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60(예 컨대 BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피의), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT 1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포 및 상기 언급된 세포로부터 유도된 셀라인. 어떤 구체예에서, 세포는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자, 예컨대 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포 (예컨대 PER.C6TM 세포)를 포함한다.

[0594] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 정상적으로(즉 야생형 동물에서) 면역글로 불린 분자(예컨대 항체 또는 T 세포 수용체)의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역에 있는 두 개의 프레임워크 영역 사이에서 나타나는 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 코드화된 아미노산 서열을 포함한다. CDR은 예를 들면 생식선 서열 또는 재배열된 서열에 의해 코드화될 수 있고, 예컨대 꾸밈이 없는 또는 성숙한 B 세포 또는 T 세포에 의해 코드화될 수 있다. CDR은 체세포성 돌연변이될 수 있고(예컨대 동물의 생식선에 코드화된 서열로부터 변화한다), 인간화될 수 있으며, 및/또는 아미노산 치환, 침가 또는 결실로 변형될 수 있다. 어떤 상황에서는(예컨대 CDR3에 대해), CDR은 연속적이지 않지만(예컨대 재배열되지 않은 핵산 서열에서), 예컨대 서열의 스플라이싱 또는 연결(예컨대 중쇄 CDR3를 형성하기 위한 V-D-J 재조합)의 결과로서 B 세포 핵산 서열에서 연속적인 둘 또는 그 이상의 서열(예컨대 생식선 서열)에 의해 코드화될 수 있다.

[0595] 용어 "보존성"은 보존성 아미노산 치환을 설명하기 위해 사용될 때, 유사한 화학적 특성(예컨대 전하 또는 소수성)을 가지는 측쇄 R 기를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의해 아미노산 잔기가 치환되는 것을 포함한다. 일반적으로 보존성 아미노산 치환은 실질적으로는 단백질의 관심의 기능적 특성, 예를 들면 가변 영역이 원하는 친화성으로 표적 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 특성을 가지는 측쇄를 가지는 아미노산 그룹의 살례로는 글리신, 알라닌, 발린, 로이신 및 이소로이신과 같은 지방족 측쇄; 세린 및 쓰레오닌과 같은 지방족-하이드록실 측쇄; 아스파라긴 및 글루타민과 같은 아마이드-함유 측쇄; 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판과 같은 방향족 측쇄; 라이신, 아르기닌 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄; 아스파트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄; 및 시스테인 및 메티오닌과 같은 황-함유 측쇄를 들 수 있다. 보존성 아미노산 치환 그룹으로는 예를 들면 발린/로이신/이소로이신, 페닐알라닌/타이로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파테이트 및 아스파라긴/글루타민이 있다. 어떤 구체예에서, 보존성 아미노산 치환은 예를 들면 알라닌 스캐닝 돌연변이 생성에 사용되는 것과 같이, 알라닌으로 단백질의 어떠한 천연 잔기를 치환하는 것일 수 있다. 어떤 구체예에서, 문헌에 개시된 PAM250 로그-유사성 매트릭스(Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45)에서 포지티브 값을 가지는 보존성 아미노산 치환이 만들어진다. 어떤 구체예에서, 치환은 치환이 PAM250 로그-유사성 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가지는 적당하게 보존성인 치환이다.

[0596] 어떤 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄에서 잔기 위치는 하나 또는 그 이상의 보존성 아미노산 치환만큼 다르다. 어떤 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 그것의 기능성 단편(예컨대 B 세포로부터의 발현 및 분비를 가능하게 하는 단편)에서 잔기 위치는 그것의 경쇄 아미노산 서열이 본원에서 열거된 것과 동일하지는 않고, 하나 또는 그 이상의 보존성 아미노산 치환만큼 상이하다.

[0597] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "해리성 반감기" 또는 " $t_{1/2}$ "는 다음 식에 의해 계산된 값을 나타낸다: $t_{1/2}$
(분)=($\ln 2/kd$)/60, 식에서 kd 는 해리 속도 상수를 나타낸다.

[0598] 구절 "에피토프-결합 단백질"은 적어도 하나의 CDR를 가지고 선택적으로 에피토프를 인지할 수 있는, 예컨대 약 1 마이크로몰 또는 그 이하의 K_D (예컨대 약 $1 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-8} M$, $1 \times 10^{-9} M$, $1 \times 10^{-10} M$, $1 \times 10^{-11} M$ 또는 약 $1 \times 10^{-12} M$ 인 K_D)로 에피토프에 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 치료적 에피토프-결합 단백질(예컨대 치료적 항체)은 자주 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 를 필요로 한다.

[0599] 예를 들어 기능성 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "기능성"은 천연 단백질과 정상적으로 관련된 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 경우에 기능성 면역글로불린 유전자 절편은 재배열된 면역글로불린 유전자 서열을 생성하기 위해 재생적으로 재배열할 수 있는 가변 유전자 절편을 포함할 수 있다.

[0600] 구절 "기능성 단편"은 발현되고, 분비되며, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 로 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 에피토프-결합 단백질의 단편을 포함한다. 특이적 인지는 적어도 마이크로몰 범위, 나노몰

범위, 또는 피코몰 범위의 K_D 를 가지는 것을 포함한다.

- [0601] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "생식선"은 면역글로불린 핵산 서열과 관련하여, 자손에게 계대될 수 있는 핵산 서열에 대한 언급을 포함한다.
- [0602] 구절 "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"는 어떠한 유기체로부터의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함하여, 면역글로불린 중쇄 서열을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 다르게 명시되지 않는 한 세 개의 중쇄 CDR 및 네 개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄 단편은 CDR, CDR과 FR 및 그것들의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 가변 도메인 다음에 (N-말단으로부터 C-말단 쪽으로): C_{H1} 도메인, 힌지, C_{H2} 도메인 및 C_{H3} 도메인을 가진다. 중쇄의 기능성 단편은 에피토프를 특이적으로 인지할 수 있고(즉 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 로 에피토프를 인지할 수 있음), 세포로부터 발현되고 분비될 수 있으며, 적어도 하나의 CDR을 포함하는 단편을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 일반적으로 생식선에 존재하는 V_H , D_H 및 J_H 절편의 레퍼토리로부터 유도된 V_H , D_H 및 J_H 절편을 포함하는 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 의해 코드화된다. 다양한 유기체에 대하여 V , D 및 J 중쇄 절편에 대한 서열, 위치 및 명명법은 IMGT 데이터베이스에서 찾아볼 수 있고, URL "imgt.org"에서 월드 와이드 웹(www) 상에서 인터넷을 통해 접근할 수 있다.
- [0603] 용어 "동일성"은 서열과 관련하여 사용될 때, 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 해당 기술분야에 공지되어 있는 많은 상이한 알고리즘에 의해 측정된 것과 같은 동일성을 포함한다. 본원에서 기술되는 어떤 구체예에서, 동일성은 10.0의 오픈 캡 폐널티, 0.1의 연장 캡 폐널티를 사용하는 ClustalW v.1.83(slow) 배열을 사용하고, Gonnet 유사성 매트릭스(MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008)를 사용하여 측정된다. 서열의 동일성과 관련하여 비교되는 서열의 길이는 특정 서열에 따라 좌우되겠지만, 경쇄 불변 도메인의 경우 길이는 자체-결합되어 규준적인 경쇄 불변 도메인을 형성할 수 있는, 예컨대 베타 가닥을 포함하고 사람 또는 마우스의 적어도 하나의 C_{H1} 도메인과 상호작용할 수 있는 두 개의 베타 시트를 형성할 수 있는 경쇄 불변 도메인으로 접히기에 충분한 길이의 서열을 함유하여야 한다. C_{H1} 도메인의 경우, 서열의 길이는 베타 가닥을 포함하고 사람 또는 마우스의 적어도 하나의 경쇄 불변 도메인과 상호작용할 수 있는 두 개의 베타 시트를 형성할 수 있는 C_{H1} 도메인으로 접히기에 충분한 길이의 서열을 함유하여야 한다.
- [0604] 구절 "면역글로불린 문자"는 두 개의 면역글로불린 중쇄 및 두 개의 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 중쇄는 동일하거나 상이하며, 경쇄는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0605] 구절 "경쇄"는 어떠한 유기체로부터의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하고, 다르게 명시되지 않는 한 사람 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄 및 VpreB, 및 대체 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 도메인은 전형적으로, 다르게 명시되지 않는 한 세 개의 경쇄 CDR과 네 개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로 전체 길이의 경쇄는 아미노 말단으로부터 카르복실 말단 방향으로, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 가변 도메인과 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 경쇄 가변 도메인은 일반적으로 생식선에 존재하는 경쇄 V 및 J 유전자 절편의 레퍼토리로부터 유도된 경쇄 V_L 및 경쇄 J_L 유전자 절편을 포함하는 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 의해 코드화된다. 다양한 유기체에 대한 경쇄 V 및 J 유전자 절편에 대한 서열, 위치 및 명명법은 IMGT 데이터베이스에서 찾아볼 수 있고, URL "imgt.org"에서 월드 와이드 웹(www) 상에서 인터넷을 통해 접근할 수 있다. 경쇄는 예를 들면 그것들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 첫 번째 또는 두 번째 에피토프 중 어느 하나에 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 그것들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합하고 그것들을 인지함으로써 중쇄와 결합하고, 인지하거나 또는 보조하는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 그것들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합하고 그것들을 인지함으로써 중쇄에 결합하고 인지하거나, 또는 보조하는 것들을 포함한다. 통상적이거나 보편적인 경쇄는 사람 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 유전자 또는 사람 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 유전자로부터 유도된 것들을 포함하고, 그것들의 체세포성 돌연변이된(예컨대 친화성 성숙된) 버전을 포함한다.
- [0606] 구절 "마이크로몰 범위"는 1 내지 999 마이크로몰을 의미하는 것으로 의도되고; 구절 "나노몰 범위"는 1 내지 999 나노몰을 의미하는 것으로 의도되며; 구절 "피코몰 범위"는 1 내지 999 피코몰"을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0607] "중성 pH"는 약 7.0과 약 8.0 사이의 pH, 예컨대 약 7.0과 약 7.4 사이의 pH, 예를 들면 약 7.2와 약 7.4 사이

의 pH, 예컨대 마우스 또는 사람의, 예컨대 생리적 pH를 포함한다. "산성 pH"는 6.0 또는 그 이하의 pH, 예컨대 약 5.0과 약 6.0 사이의 pH, 약 5.75와 약 6.0 사이의 pH, 예를 들면 엔도솜 또는 리소좀 구획의 pH를 포함한다.

[0608] 용어 "작동가능하게 연결된"은 작동가능하게 연결된 성분들이 그것들의 의도된 방식으로 기능하는 관계를 말한다. 한 가지 경우에, 단백질을 코드화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 유지하기 위하여 조절 서열(예컨대 프로모터, 인핸서, 침묵 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 가지 경우에, 면역글로불린 가변 영역(또는 V(D)J 절편)의 핵산 서열은 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 서열로의 서열 사이의 적절한 재조합을 가능하게 하기 위하여 면역글로불린 불변 영역의 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0609] 구절 "체세포성 돌연변이된"은 본원에서 사용되는 것과 같이, 부류간 스위칭(class-switching)을 진행하는 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 언급을 포함하는데, 이때 면역글로불린 가변 영역의 핵산 서열, 예컨대 부류간 스위칭된 B 세포의 중쇄 가변 영역(예컨대 중쇄 가변 도메인 또는 중쇄 CDR 또는 FR 서열을 포함하는)은 예를 들면 부류간 스위칭이 진행되지 않은 B 세포와 부류간 스위칭이 진행된 B 세포 사이의 CDR 또는 프레임워크 핵산 서열의 차이와 같이, 부류간 스위칭 전의 B 세포의 핵산 서열과 동일하지 않다. 구절 "체세포성 돌연변이된"은 친화성-성숙되지 않은 B 세포의 해당하는 면역글로불린 가변 영역 뉴클레오티드 서열(즉 생식 세포의 게놈 서열)에 동일하지 않은 친화성-성숙된 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 언급을 포함한다. 구절 "체세포성 돌연변이된"은 또한 관심의 에피토프에 대한 B 세포의 노출 후에 B 세포로부터의 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열에 대한 언급을 포함하는데, 이때 핵산 서열은 관심의 에피토프에 대한 B 세포의 노출 전의 해당하는 핵산 서열과는 다르다. 용어 "체세포성 돌연변이된"은 또한 면역원 도전에 대한 반응으로 사람 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열을 가지는 동물, 예컨대 마우스에서 생성된, 그리고 그런 동물에서 고유하게 작동하는 선택 과정으로부터 유발된 항체로부터의 서열을 말한다.

[0610] 핵산 서열과 관련하여 용어 "재배열되지 않은"은 동물 세포의 생식선에 존재하는 핵산 서열을 포함한다.

[0611] 구절 "가변 도메인"은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로(다른 표시가 없는 한) 순서대로 다음의 아미노산 영역: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4를 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄(원하는 대로 변형된)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0612] 구절 "작동가능하게 연결된"은 기술된 성분들이 그것들의 의도된 방식으로 기능하도록 그것을 허용하는 관계로 나란히 배치되는 것을 말한다. 한 가지 경우에, 단백질을 코드화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 유지하기 위하여 조절 서열(예컨대 프로모터, 인핸서, 침묵 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 가지 경우에, 면역글로불린 가변 영역(또는 V(D)J 절편)의 핵산 서열은 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 서열안으로의 서열 사이의 적절한 재조합이 가능하도록 면역글로불린 불변 영역의 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0613] 용어 "대체"는 유전자 대체와 관련하여, 내인성 유전자 유전자좌에 외인성 유전자 물질을 놓고, 그로써 내인성 유전자의 전부 또는 부분을 이종상동성 또는 상동성 핵산 서열로 대체하는 것을 말한다.

[0614] 예를 들어 기능성 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "기능성"은 천연 단백질과 정상적으로 관련된 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 경우에 기능성 면역글로불린 유전자 절편은 재배열된 면역글로불린 유전자 서열을 생성하기 위해 재생적으로 재배열할 수 있는 가변 유전자 절편을 포함할 수 있다.

히스티딘 치환을 포함하는 가변 도메인

[0615] 사람 면역글로불린-기초 치료법의 디자인은 잘 연구된 현상이지만, 최적의 특성을 가지는, 예컨대 그런 치료법의 혈청 반감기의 연장 또는 그렇지 않으면 치료 분자당 더 많은 표적을 결합하는 능력의 개선을 포함하는 그런 치료법을 만드는 데 있어 아직은 해결되지 않은 어떤 문제점들이 지속적으로 존재한다. 지난간 20여년에 걸쳐 혈청 면역글로불린 전환을 설명하는 것을 겪냥한 방대한 작업은 항체 구조를 변형시킴으로써, 치료적으로 중요한 항체, 또는 면역글로불린-기초 치료법의 혈청 반감기를 증가시키기 위한 방법들에 초점이 맞추어져 왔다. 대부분의 경우 이런 변형 작업은 항체의 불변 도메인과 신생 Fc 수용체(FcRn)와의 상호작용에 초점이 맞추어졌다. 세포외재성 표면 상의 신생 Fc 수용체는 함입된, 또는 세포내 섭취된 항체-FcRn 복합체를 형성하기 위하여 그것들의 Fc 영역을 통해 순환하는 항체에 결합하여 세포 안으로 들어가고, 그곳에서 리간드와 항체 부분 경로 및 항체-FcRn 복합체는 항체를 가져가고 FcRn을 세포 표면으로 되돌려주는 순환 공정을 진행하게 됨으로써 세포 표면에서 항체가 방출되고 새로운 표적 분자와 재결합할 수 있다. 항체-FcRn 복합체의 순환은 수용체 순환의 일반적인 메커니즘이 발견된 후에 집중적인 관심을 받는 영역이 되었다.

[0617]

수용체 순환은 다양한 메커니즘에 의해 진행될 수 있다. 수용체-중재된 세포내 섭취는 세포 표면 수용체와 (어떤 경우에는, 예컨대 FcRn) 그것들의 리간드의 조절된 재순환에 대한 엔도솜성 경로를 제공한다. (세포흡수작용된 분자는 다르게는 전형적으로 엔도솜성 경로를 통해 왕복되고 궁극적으로는 분해된다.) 수용체-중재된 세포내 섭취 메커니즘과 막 수용체의 재순환과 관련된 작업 실체의 발견으로 일반적인 수용체-리간드 전환에 대해 상세한 이해의 틀이 제공되었다(Brown, M.S., Anderson, R. G. W. and Goldstein, J. L. 1983) *Recycling Receptors: The Round-Trip Itinerary of Migrant Membrane Proteins*, Cell 32:663-667; Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2009) *The LDL Receptor*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:431-438; Basu, S. K. (1984) *Receptor-mediated endocytosis: An overview of a dynamic process*, *J. Biosci.* 6(4):535-542 참조). 엔도솜성 분류에 대한 다른 작업은 순환하는 면역글로불린의 운명과 면역글로불린 수용체 재순환 현상 및 항체 약물의 약물동역학에 대한 의문점의 뼈대를 적절하게 정하는 것을 보조하였다. 이 작업으로 혈청에서 IgG 분자의 상대적으로 긴 반감기에 주로 기여하는 것으로 보이는 복합체 항체-FcRn 복합체 순환 과정이 드러났다. 실제로 이 영역에서 초기 작업에서도 엔도솜이 FcRn의 가장 흔한 생체 내 공급원이라는 것이 밝혀졌다(Roberts, D. M. et al. (1990) *Isolation and Characterization of the Fc Receptor from the Fetal Yolk Sac of the Rat*, *J. Cell. Biol.* 111:1867-1876). 수용체-포지티브 엔도솜성 분획은 대부분 응집이 일어나지 않은 경우에 (예컨대 Dunn, K.W. et al. (1989) *Iterative Fractionation of Recycling Receptors from Lysosomally Destined Ligands in an Early Sorting Endosome*, *J. Cell. Biol.* 109(6):3303-3314 참조), 리소좀 분해에 해당되지 않은 것으로 오랫동안 관찰되어 왔다(Brown, M. S. et al. (1983) *Recycling Receptors: The Round-Trip Itinerary of Migrant Membrane Proteins*, Cell 32:663-667; von Figura et al. (1984) *Antibody to mannose 6-phosphate specific receptor induces receptor deficiency in human fibroblasts*, *EMBO J.* 3(6):1281-1286 참조). FcRn에 결합하는 항체(예컨대 사람 IgG1 항체)가 산성 조건하에서 잘 견디는 것을 보장하는 순환 과정에 관여하는 이런 엔도솜 시스템이야말로 혈청에서 연장된 기간 동안 지속된다.

[0618]

일부 보고에 따르면, FcRn-함유 엔도솜의 재순환 메커니즘은 신규하고 특이한 것이다; 그것은 유비퀴틴-의존성 완전한 세포 기관 합류를 포함하지 않을 뿐 아니라 오히려 키스-및-링거 모델에 더 유사한 관상 연장에 의해 중재된 불완전한 합류를 닮아있다(Gan, Z. et al. (2009) *Analyses of the recycling receptor, FcRn, in live cells reveal novel pathways for lysosomal delivery*, *Traffic* 10(5):600; Tzabari, S. et al. (2009) *The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity*, *J. Cell Biol.* 185(4):673-684). 그러므로, 항체-FcRn 순환 모델은 다른 엔도솜 경로와는 구별되는 것으로 여겨진다.

[0619]

항체-FcRn 엔도솜 순환 메커니즘은 FcRn에 잘 결합하는 항체가, 엔도솜 구획에서 결합된 항체를 격리시키는 것을 수반함으로써, FcRn에 대한 항체의 결합이 유지되고, 그로써 FcRn에 결합된 항체의 리소좀성 분해가 방지되는 다소 연속적인 FcRn-보호 과정을 통하여 혈청 중에 연장된 존재를 지속시킬 수 있음을 확인시켜준다. 전형적으로, 순환하는 항체 분자는 세포 표면에서 FcRn에 결합한다. 항체-FcRn 복합체는 연속적인 세포내 섭취 과정의 결과로서 엔도솜에 나타난다. FcRn-결합된 분자(예컨대 항체, 또는 Fc 융합 단백질)는 산-안정성 Fc-FcRn 상호 작용을 통해 산성 엔도솜 구획에서 FcRn과 결합된 상태를 유지한다. 엔도솜 표면에 결합되지 않은 분자(예컨대 FcRn 또는 다른 수용체를 통해)는 리소좀성 경로에 왕복되고 분해되는 반면, 수용체-결합된 분자는 엔도솜이 원형질 막과 융합될 때 원형질 막으로 재순환된다. 원형질 막과 융합될 때, 산-안정성 Fc-FcRn 상호작용은 거의 중성의 세포외재성 pH에 노출되고, 그 경우 Fc는 FcRn으로부터 쉽게 해리된다. 특정 Fc의 FcRn에의 결합을 통해 혈청 농도를 유지하는 능력에 주로 기여하는 것으로 여겨지는 것은 바로, 양자화 상태에 따라 달라지는 FcRn의 차등적인 열 안정성과 결합된 Fc의 pH 결합 차이이다. 엔도솜성 순환 메커니즘에 대한 핵심은 산성 엔도솜성 구획에서 수용체에 의한 리간드 방출이다(검토는 예컨대 Brown, M.S. et al. (1983) 참조).

[0620]

IgG1 Fc 부분은 pH 6.0 내지 약 6.5에서 높은 친화성으로 FcRn에 결합한다; pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서의 결합은 아마도 FcRn과 결합하는 Fc의 영역, 잔기 310 내지 433 가까이에 있는 히스티딘 잔기의 적정으로 인해, 그리고 양자화 상태에 의해 중재되는 FcRn 분자 내 열 안정성 차이로 인해 약 2차수의 크기만큼 더 약하다(Raghavan, M. et al. (1995) *Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants*, *Biochemistry* 34:14649-14657; Vaughn, D.E. and Bjorkman, P.J. (1998) *Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor*, *Structure* 6:63-73); 쥐의 FcRn이 pH 8.0에서보다 pH 6.0에서 더 좋은 열 안정성 프로필을 나타내는 것으로 증명되었다(Raghavan, M. et al. (1993) *The class I MHC-related Fc receptor shows pH dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release*, *Biochemistry* 32:8654-8660).

[0621] FcRn과 결합하는 Fc 구조는 자연스럽게 차이가 있긴 하지만, Fc 구조를 디자인하기 위하여 발생한 Fc 공학처리의 과학으로는 FcRn에 보다 더 단단하게 그리고 -아마도- 더 긴 혈청 반감기로 결합하게 될 것이다. 많은 그러한 구조가 디자인되고 시험되었으며, 지금까지 수없이 많이 검토되었는데, 성공 정도는 달랐다. FcRn 결합 특성을 변형시킴으로써 항체의 재순환을 촉진하기 위한 면역글로불린 불변 영역 서열의 돌연변이는 길고 변화무쌍한 역사를 가진다. 지금까지 돌연변이를 확인하기 위한 전부가 아니라면 대부분의 노력을 FcRn과의 결합 또는 상호 작용에 결정적인 것으로 여겨지는 잔기, 즉 그것의 변형이 FcRn에 대한 Fc의 친화성에 영향을 미치는 잔기에 집중되어 왔다.

[0622] 그러나 FcRn에 대한 Fc의 결합은 그 자체로 복잡한 문제이다. 상이한 유형의 치료적 항체(인간화된, 키메릭 및 마우스), 및 심지어 유형 내에서의 상이한 유형(예컨대 상호간에 비교할만한 상이한 인간화된 항체, 상호간에 비교할만한 IgG1 아이소타입 등)은 약 2-배 정도나 크게 다른 FcRn과 관련된 해리 상수를 나타낸다(예컨대 Suzuki, T. et al. (2010) Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR, J. Immunol. 184:1968-1976). 이런 관찰은 불변 영역의 일차 구조가 모든 약물동역학적 행태를 설명할 수 없다는 추론을 가능하게 한다. 다른 사람들은 불변 영역 일차 구조를 고정상태로 유지하면서 항체의 전체적인 등전점(pI)이 - 아마도 명시되지 않은 비-FcRn-의존성 메커니즘을 통하여- 혈청 반감기의 중요한 결정인이라고 가정하였다(Igawa, T. et al. (2010) Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region, Protein Engineering, Design & Selection 23(5):385-392). 이런 관점 하에서는, 항체의 pI가 낮을수록 FcRn에 대한 결합은 더 단단해진다(동일). 적어도 하나의 IgG4 아이소타입 항체에 대해, 9.2로부터 7.2로의 pI의 변화는 반감기의 2.4-배 증가와 상관되고, 소멸의 4.4-배 감소와 상관되는데(동일), 이것은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다에서 함께 잔기를 변형시킴으로써 pI를 비특이적으로 낮추는 것은 약물동역학적 행태에 상당히 영향을 줄 수 있다는 추론과 일치한다. 그 보고서에서, 잔기 변형은 어떠한 특정 패턴을 따르지 않았고, 어떤 잔기도 히스티딘으로 치환되지 않았지만, 경쇄 CDR2의 적어도 하나의 잔기가 히스티딘 잔기로부터 글루타메이트 잔기로 교체되었다(상기 동일, 도 5, p390). 나아가, 시험관 내 FcRn 결합과 생체 내 약물동역학을 비교할 때 특이한 역설이 쏟아질 수 있다: FcRn과 상호작용하는 Fc 영역에 다수의 치환을 가지고 있는 적어도 하나의 임상적으로 중요한 IgG1 항체에 대해, 시험관 내 FcRn 결합은 생체 내 약물동역학적 행태와 상관이 없었다(Petkova, S.B. et al. (2006) Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease, Int'l Immunol. 18(12):1759-1769). 결국, 원형질 막과 융합될 때 FcRn으로부터의 Fc 리간드의 방출은 미지의 메커니즘의 2단계- 급속 단계와 연장된 단계-에서 일어나는 것으로 보인다(Ober R.J. et al. (2004) Exocytosis of IgG as mediated by the receptor FcRn: an analysis at the single-molecule level, Proc. Natl Acad. Sci. USA 101:11076-11081).

[0623] 결국, 혈청 중에서 항체의 반감기를 연장시키는 것은 항체 치료법의 효능을 증강시키는 한 가지 방법이다. 동일한 항체 또는 가변 도메인이 2 또는 3 또는 그 이상의 표적 분자에 결합하여 제거하는 효력의 개선, 또는 활용성의 개선은 본질적으로는 표적 항원에 영향을 미치는 FcRn 결합 및 전환의 개선에 의해 해명되지 않는다. Fc의 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 변형은 전환을 증가시키고, 따라서 치료적 항체의 약물동역학을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다. 항원-항체 복합체는 FcRn에 단단하게 결합하고, 그 결과 항원-항체 복합체가 리소좀성 경로에 의해 분해되기보다는 세포외재성 공간으로 재순환된다. 그러나 이런 각본에서는 항원 또는 표적은 대부분이 항체와의 복합체 상태로 유지될 수 있고, 항체와 함께 세포외재성 공간으로 재순환될 수 있다. 치료적 항체에 대해 이런 현상은 매우 바람직하지 않을 수 있다.

[0624] 그러나 그것의 항원과의 상호작용이 pH-의존성이 경우, 즉 엔도솜 pH에서 더 낮은 친화성으로 항원에 결합하도록 공학처리된 항체는 엔도솜성 구획에서 항원-항체 복합체의 불안정성으로 인해 FcRn-의존성 방식으로 항원을 재순환하지 못할 것이다. 이것은 엔도솜의 산성 환경 때문에, 항원이 항체-FcRn 복합체로부터 떨어져 나올 것이고, 항체-결합된 FcRn이 세포의 표면으로 재순환될 것인 반면, 떨어져 나온 유리 항원은 리소좀성 분해 경로로 왕복될 것이기 때문이다. 이런 방식으로, pH-의존성 항원 결합은 FcRn-중재된 순환의 맥락 내에서(그러나 직접적으로는 Fc-FcRn 상호작용에 의존하지 않음) 순환된 항체를 항원에 결합시키고, FcRn에 결합시키며, 엔도솜을 통해 순환시키고, 더 많은 항원을 결합시키고 더 많은 항원을 리소좀성 분해 경로에 왕복시키기 위하여 세포외재성 공간에 재-유입시키는 것으로부터 벗어남으로써 증강된 효능 및/또는 약물동역학을 제공할 수 있다.

[0625] 리간드는 엔도솜성 pH에서 그것의 수용체로부터 빈번하게 해리될 것이라는 관찰 결과를 활용하여, 항체에 대한 연구 조사 결과, 세포에 독소를 유입하고 그 독소를 엔도솜 내에 방출시키기 위하여 특정 세포를 표적으로 하는

특정의 특이한 다중기능성 분자를 만들기 위하여 엔도솜성 pH에서 항원을 효과적으로 방출시키는 것이 제안되었다(예컨대 미국 특허 5,599,908호 및 미국 특허 5,603,931호 참조). 그러나 그렇게 하는 것이 특히 사람을 대상으로 한 치료법의 경우 항원-항체 순환을 해명해주지는 못한다.

[0626] 항원-FcRn 복합체의 FcRn-의존성 순환을 유지하면서, 리소좀성 경로를 통해 엔도솜으로부터 떨어져 나온 항원을 왕복시키기 위한 항체 구조를 이루기 위하여, pH-의존성 항원 결합에 대한 특정 접근법이 탐색되었다. 그런 접근법은 잔기를 히스티딘으로 치환하기 위하여 가변 영역을 덮는 일반화된 히스티딘-주사(scanning) 및 히스티딘 대체의 일반화된 접근법이 원하는 pH-의존성 항원 결합을 가지는 항체를 생성하는 지의 여부를 시험하는 것을 포함한다(예컨대 Igawa, T. et al. (2010) Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization, Nature Biotech. 28(11):1203-1208; 미국 특허 출원 공개 번호 2011/0111406 A1 참조). 이 접근법의 있음직한 단점은 항원 결합에 중요한 잔기를 변형시키는 것이 산성 또는 중성 pH에서 결합을 파괴하는 것 같다는 것이고, 그것은 엔도솜 구획과 세포외재성 공간 사이의 pH 차이로 인해 어떠한 영향력도 제거할 수 있다는 것이다.

[0627] 다양한 측면으로, 항체 가변 영역에서 사려깊게 선택된 소수의 영역에서 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환을 만들기 위한 조성을 및 방법이 제공되어, pH-의존성 방식으로 표적 항원에 결합하는 항체 가변 도메인, 예컨대 중성 또는 염기성 또는 세포외재성 pH에서 첫 번째 친화성으로 관심의 항원에 결합하지만, 산성 pH에서 두 번째 친화성으로 관심의 동일한 항원에 결합하는 가변 도메인을 제조하기 위한 방법을 제공하는데, 이때 첫 번째 친화성은 높은 반면 두 번째 친화성은 낮다.

[0628] 다양한 측면으로, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR1, CDR2, CDR3 N-말단 및/또는 루프 4 서열에서 일어난다.

[0629] 어떤 측면에서, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에서 일어난다.

[0630] 어떤 측면에서, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR3 및 루프 4 서열에서 일어난다. 추가의 구체예에서, 치환은 또한 N-말단 서열에서 일어난다.

[0631] 어떤 측면에서, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR3 및 N-말단 서열에서 일어난다. 추가의 구체예에서, 치환은 또한 루프 4 서열에서 일어난다.

[0632] 어떤 측면에서, 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR2 서열 및 루프 4 서열에서 일어난다. 추가의 구체예에서, 치환은 또한 N-말단 서열에서 일어난다.

[0633] 어떤 측면으로, 루프 4 서열은 λ 경쇄 가변 도메인 잔기 83 내지 88; κ 경쇄 가변 도메인 잔기 83 내지 88; 및 중쇄 가변 영역 82 내지 88(IMGT 넘버링)에 대한 것이다.

[0634] 어떤 측면으로, 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 가변 도메인에 대한 N-말단 서열은 잔기 1 내지 26이다(IMGT 넘버링). 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의(클러스터를 형성하는) 히스티딘 치환을 포함하는 N-말단 서열은 잔기 1 내지 5이고, 한 구체예에서는 잔기 1 내지 10이며, 한 구체예에서는 1 내지 15이고, 한 구체예에서는 1 내지 20이며, 한 구체예에서는 1 내지 25이고, 한 구체예에서는 5 내지 10이며, 한 구체예에서는 10 내지 15이고, 한 구체예에서는 15 내지 20이며, 한 구체예에서는 20 내지 25이고, 한 구체예에서는 5 내지 15이며, 한 구체예에서는 10 내지 20이고, 한 구체예에서는 5 내지 20이다. 한 구체예에서, 히스티딘 치환은 2 또는 그 이상(예컨대 3, 4, 5, 또는 6 또는 그 이상)이고, 적어도 2 또는 그 이상의 히스티딘 치환이 약 3 잔기, 4 잔기, 5 잔기 또는 6 잔기 또는 그 이상인 N-말단 서열의 연장부 내에서 이루어진다. 한 구체예에서, 다수의 히스티딘 치환은 N-말단에서 이루어지고, 히스티딘 치환은 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4개의 히스티딘 치환의 클러스터를 포함한다. 한 구체예에서, 히스티딘 치환의 적어도 하나의 클러스터는 하나 또는 그 이상의 비-히스티딘 치환에 의해 분리된 히스티딘 치환을 포함한다.

[0635] 어떤 측면으로, CDR의 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 CDR 내의 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환이다. 한 구체예에서, 중성 pH에서 결합에 대해 중요하지 않은 CDR의 모든 잔기는 히스티딘으로 치환된다. 한 구체예에서, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환은 연속적이고; 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환이 클러스터에 존재하는데, 이때 클러스터는 적어도 하나의 비-히스티딘 잔기를 포함하며; 한 구체예에서, 클러스터는 두 개의 비-히스티딘 잔기를 포함하고; 한 구체예에서, 클러스터는 세 개의 비-히스티딘 잔기를 포함하며; 한 구체예에서, 클러스터는 4개의 비-히스티딘 잔기를 포함한다.

[0636] 어떤 측면으로, N-말단의 하나 또는 그 이상의 히스티딘 치환은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환이다. 한 구체예

에서, 중성 pH에서 항원 결합을 감소시키지 않는(예컨대 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 이상으로) N-말단의 모든 잔기는 히스티딘으로 치환된다. 한 구체예에서, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환은 연속적이고; 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환이 클러스터에 존재하는데, 이때 클러스터는 적어도 하나의 비-히스티딘 잔기를 포함하며; 한 구체예에서, 클러스터는 두 개의 비-히스티딘 잔기를 포함하고; 한 구체예에서, 클러스터는 세 개의 비-히스티딘 잔기를 포함하며; 한 구체예에서, 클러스터는 4개의 비-히스티딘 잔기를 포함한다.

[0637] 어떤 측면으로, 방법은 가변 도메인이 CDR1, CDR2, CDR3, N-말단, 루프 4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 영역에 히스티딘 치환의 클러스터(예컨대 본원에 기술된 것과 같이, 연속적이거나 또는 하나 또는 그 이상의 비-히스티딘 잔기가 개재된)를 포함하도록 가변 도메인을 변형시키는 것을 포함한다. 어떤 측면으로, 클러스터는 첫 번째 히스티딘 잔기에 의해 상류에서, 그리고 두 번째 히스티딘 잔기에 의해 하류에서 결합된 서열이고, 첫 번째와 두 번째 히스티딘 잔기 사이에 하나 또는 그 이상의 잔기를 포함한다. 한 구체예에서, 첫 번째와 두 번째 히스티딘 잔기 사이의 하나 또는 그 이상의 잔기는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 또는 그 이상의 비-히스티딘 잔기이다. 한 구체예에서, 첫 번째와 두 번째 히스티딘 잔기 사이의 하나 또는 그 이상의 잔기는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 히스티딘 잔기이다. 한 구체예에서, 클러스터는 3개의 잔기이고, 한 구체예에서는 4개의 잔기이며, 한 구체예에서는 5개의 잔기이고, 한 구체예에서는 6개의 잔기이며, 한 구체예에서는 7개의 잔기이고, 한 구체예에서는 8개 또는 그 이상의 잔기이다.

[0638] 다양한 측면으로, 방법은 항원 결합에 중요한(예컨대 중성 pH에서, 예를 들면 pH 7 내지 7.4, 예컨대 pH 7.2, 예컨대 세포외재성 pH에서) 항체 가변 도메인(중쇄 및/또는 경쇄)의 서열을 확인하고, 그 서열 내에 있는 하나 또는 그 이상의 잔기를 히스티딘으로 치환하는 것을 포함하는데, 이때 히스티딘으로의 치환은 중성 pH에서 가변 도메인의 표적 항원에 대한 결합을 제거하지는 않는다. 다양한 측면으로, 중성 pH에서 결합에 중요하지 않은 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상 또는 5 또는 그 이상의 잔기의 클러스터는 히스티딘 잔기로 치환된다. 다양한 측면으로, 히스티딘 잔기의 클러스터는 CDR, 루프 4, N-말단 또는 그것들의 조합 내에 있다.

[0639] 다양한 측면으로, 결합에 중요한 잔기는 거의 중성(또는 세포외재성) pH에서 치환체 아미노산으로 치환될 때 가변 도메인의 결합을 한 구체예에서 적어도 5%, 한 구체예에서 적어도 10%, 한 구체예에서 적어도 20%, 한 구체예에서 적어도 30%, 한 구체예에서 적어도 40%, 한 구체예에서 적어도 50%, 한 구체예에서 적어도 60%, 한 구체예에서 적어도 70%, 한 구체예에서 적어도 80%, 한 구체예에서 적어도 90%, 한 구체예에서 검출가능한 결합이 초래되지 않을 정도로 감소시키는 잔기로서 확인된다. 한 구체예에서, 치환체 아미노산은 알라닌이다.

[0640] 한 측면으로, 중성 또는 염기성 pH에서 동일한 항원에 결합하는 것보다 산성 pH에서 더 약하게 항원에 결합하는 항체 가변 도메인을 제조하는 방법이 제공되는데, 그 방법은 가변 영역의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 산성 pH에서의 결합은 무시할만하거나 없다.

[0641] 한 구체예에서, 치환된 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 경쇄에 있다. 특정 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 경쇄의 N-말단 영역에 있다. 특정 구체예에서, N-말단 잔기는 1 내지 26, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 6 또는 1 내지 5(IMGT 넘버링)로부터 선택된다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 루프 3에 있다. 특정 구체예에서, 루프 4 잔기는 V_k 또는 V_λ 의 83 내지 88에, 및 V_h 의 82 내지 88에 있다 (IMGT 넘버링).

[0642] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 중쇄에 있다. 특정 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 중쇄의 N-말단 영역에 있다. 특정 구체예에서, N-말단 잔기는 1 내지 26, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 6 또는 1 내지 5(IMGT 넘버링)로부터 선택된다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 루프 4에 있다. 특정 구체예에서, 루프 3 잔기는 (V_k 및/또는 V_λ 에 대하여) 83, 84, 85, 86, 87, 88 및 그것들의 조합에 (IMGT 넘버링); 또는 (V_h 에 대해) 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 및 그것들의 조합에 (IMGT 넘버링); 및 그것들의 조합에 있다.

[0643] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 잔기는 CDR1, CDR2 및 CDR3로부터 선택된 CDR에 있고; 하나 또는 그 이상의 잔기는 치환될 때(예컨대 알라닌으로 또는 히스티딘으로) 중성 또는 염기성 pH에서 표적 항원의 결합의 감소를 유발하지 못한다. 특정 구체예에서, 중성 또는 염기성 pH에서 치환의 결과로서(예컨대 알라닌 또는 히스티딘 치환에 의한) 표적 항원의 감소된 결합은 비-치환 가변 도메인과 비교하여 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하 또는 20% 이하, 25% 이하 또는 30% 이하이다.

[0644] 어떤 측면으로, 표적 항원과 복합체를 형성한 his-변형된 가변 도메인은 상승된 pH(예컨대 세포외재성 pH 또는

7 내지 7.4의 pH, 예컨대 pH 7.2)에서 적어도 약 20분의 반감기를 나타내고, 엔도솜 pH 또는 예컨대 pH 5 내지 6의 pH, 예컨대 pH 5.75에서 5분 미만, 4분 미만, 3분 미만, 2분 미만 또는 1분 미만의 반감기를 나타낸다. 한 구체예에서, 표적 항원과 복합체를 형성한 his-변형된 가변 도메인은 상승된 pH에서 적어도 약 20분의 반감기를 나타내고, 엔도솜 pH에서 60초 미만, 30초 미만, 10초 미만, 5초 미만, 4초 미만, 3초 미만 또는 2초 미만의 반감기를 나타낸다. 한 구체예에서, 표적 항원과 복합체를 형성한 his-변형된 가변 도메인은 상승된 pH(예컨대 7 내지 7.4의 pH, 예컨대 pH 7.2)에서 적어도 약 20분의 반감기를 나타내고, 엔도솜 pH에서 약 1초 미만, 0.5초 미만, 0.1초 미만 또는 0.05초 미만의 반감기를 나타낸다. 한 구체예에서, 엔도솜 pH에서 반감기는 표적 항원과 복합체를 형성한 his-변형된 가변 도메인이 중성 또는 상승된 pH에서 BIACORE™ 칩의 표면에서 평행화되고, 그 복합체 위로 엔도솜 pH(또는 예컨대 5 내지 6의 pH, 예를 들면 pH 5.75)에서 완충액이 흐르게 되는 BIACORE™ 분석을 사용하여 측정된다.

[0645]

다양한 측면으로, 세포외재성 pH에서 첫 번째 친화성으로 표적 항원과 결합하고, 표적 항원과 결합하지 않거나 또는 엔도솜 pH에서 두 번째 친화성으로 표적 항원에 결합하는 항체 가변 도메인을 제조하는 방법이 제공되는데, 이때 첫 번째 친화성은 두 번째 친화성보다 약 10, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 또는 10^{-12} -배 (또는 그 이상의 배수)이다. 어떤 측면으로, 첫 번째 친화성은 피코몰에서 나노몰 범위(예컨대 K_D 는 10^{-12} 내지 10^{-9} 이다)이고, 두 번째 친화성은 마이크로몰 또는 그 이상의 범위이다(예컨대 $K_D=10^{-6}$ 또는 그 이상, 예를 들면 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1 또는 그 이상). 어떤 측면으로, 첫 번째 친화성은 약 $K_D 10^{-9}$ 내지 약 $K_D 10^{-12}$ 의 범위이고, 두 번째 친화성은 약 $K_D 10^{-3}$ 내지 약 1 또는 그 이상의 범위이다. 한 구체예에서, 첫 번째 친화성은 약 $K_D 10^{-9}$ 내지 약 $K_D 10^{-12}$ 범위이고, 두 번째 친화성은 K_D 가 1보다 큰 것이 특징이며; 특정 구체예에서, 두 번째 친화성은 $K_D>>1$ (예컨대 10, 10^2 , 10^3 또는 그 이상)인 것을 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 첫 번째 친화성은 약 10^{-9} 내지 약 10^{-12} 의 K_D 를 특징으로 하고, 두 번째 친화성은 BIACORE™ 결합 분석에서 바탕값 이상의 결합이 검출되지 않는 것을 특징으로 한다.

[0646]

다양한 측면은 사람 경쇄 가변 서열이 하나 또는 그 이상의, 클러스터를 포함하여, 히스티딘을 경쇄 CDR3에 함유하도록 변형되고, 그 경쇄는 동족의 사람 종쇄를 가진 CHO 세포에서 발현되는 특별한 경우에 의해 예시된다. 그것에 히스티딘-변형된 항체가 결합하게 되는 항원의 정체성은 중요하지 않은데, 왜냐하면 경쇄 가변 도메인이 특별한 서열이기 때문이다. 실시예에서 설명되는 원리는 CDR3, CDR, CDR1, N-말단 영역 또는 루프 4에도 적용될 수 있다. 예를 들어 인용된 영역의 잔기들은 히스티딘에 대해, 단독으로 또는 예컨대 2, 3, 4 또는 5개의 클러스터로 치환될 수 있고, 그 결과의 항체는 pH-의존성 항원 결합에 대해 시험된다.

[0647]

pH 의존성 방식으로 항원에 결합할 수 있는 항체를 공학적으로 제조하기 위한 방법은 면역글로불린 경쇄 가변 영역에, 기술된 것과 같이 경쇄의 서열을 따라 하나 또는 그 이상의 위치에서(예컨대 CDR3, CDR2, CDR1, 루프 4, N-말단에) 변형을 일으킴으로써 만들어질 수 있다. 히스티딘은 CDR 영역에서 내성이이고; 경쇄는 전형적으로 가변 영역 서열을 따라 체세포성 과돌연변이를 나타내고, 어떤 경우에는 그런 돌연변이는 CDR에 히스티딘 잔기의 치환을 유발할 수 있다(도 15).

[0648]

실시예에서, 히스티딘 치환은 경쇄 CDR3 영역의 하나 내지 4개의 위치에서 확인되었는데, 그 위치의 잔기는 중성 pH에서 표적 항원 결합에 대해 중요하지 않으며, 그것으로부터 15개의 돌연변이 구성물이 제조되었다. 제시된 특정 경쇄 -다양한 상이하지만 동족의 종쇄를 포함함-는 단일 V_κ 및 단일 J_κ 절편으로부터 유도된다(V_κ 1-39/J_κ 5). 그런 돌연변이는 발현될 때 항체(동족 종쇄와 함께)에 pH-의존성 항원 결합 특성을 부여한다. 돌연변이 구성물은 항원-특이적 항체 가변 도메인을 사용하여 제조되었고, 발현 및 대략 중성의 pH에서의 항원 결합 및 낮은 pH에서의 방출("포획-및-방출")에 대해 시험된다. 제시된 특정 실시예에서 4개의 확인된 잔기의 위치(히스티딘에 대한 돌연변이는 중성 pH에서 결합에 대해 중요하지 않다)는 Q105H, Q106H, Y108H 및 P111H이다. 상이한 표적 항원에 결합하는 항체 또는 상이한 재배열된 V-J 서열을 포함하는 항체에 대하여, pH-의존성 가변 도메인을 제조하기 위한 his-돌연변이 가능한 잔기는 그 잔기가 중성 pH에서 결합에 중요한지를 확인하고, 그런 다음 하나 또는 그 이상의 그런 잔기들(예컨대 클러스터의)을 변형시키고, 돌연변이를 포함하는 항체를 발현시켜서 중성 pH(예컨대 세포외재성 pH)에서 및 산성 pH(예컨대 엔도솜 pH)에서의 결합(및/또는 방출 시간, 예컨대 t_{1/2})에 대해 시험됨으로써 발견된다. 비록 본원에 제시된 데이터가 V_κ 1-39/J_κ 5 경쇄에 대한 것이긴 하지만,

다른 경쇄, 이를테면 V κ 3-20/J κ 1 재배열로부터 유도된 것들도 중쇄와 같이, 본원에 기술된 접근법에 적용될 수 있다.

[0649] 본 실험에서 제조된 히스티딘-공학처리된 경쇄 구성물은 모두 중쇄와 함께 잘 발현된다. 나아가 pH-의존성 방식으로 항원에 대한 항체의 결합은 동일한 세포 표면 항원을 특이적으로 인지하는 5개의 상이한 중쇄를 가지고 있는 15개의 돌연변이에 대해 중성 pH 및 산성 pH 주변에서 항원의 결합을 보여주는 BIACORE™ 분석 데이터로부터 증명되었다(도 19a 내지 도 19j).

[0650] 기술된 방법, 및 본원의 특정 실시예 및 도면에서 예시를 목적으로 사용된 특별한 방법은 예를 들면 CDR3에 히스티딘을 포함하는 사람 면역글로불린 가변 도메인에 의해 그것들의 표적에 결합하는 사람 치료적 결합 단백질을 제조하기 위해 사용될 수 있는 항체의 가변 영역을 제조하는데 유용하다. 더 낮은 pH에서의 변경된 결합은 어떤 상황에서는 더 빠른 전환을 허용할 것인데, 왜냐하면 치료제가 세포 표면에서 표적에 결합할 것이고, 엔도솜에 내재화되며, 엔도솜에서 표적으로부터 보다 쉽게 또는 보다 빠르게 해리될 것이고, 그로써 치료제는 표적의 또 다른 분자(예컨대 또 다른 세포 상에서 또는 동일한 세포 상에서)에 결합하기 위해 재순환될 수 있기 때문이다. 다양한 구체예에서, 이것은 더 낮은 용량으로 치료제를 투약하는, 또는 치료제를 덜 자주 투약하는 능력을 유발할 것이다. 이것은 특히 빈번하게 투약하거나 또는 안전성 또는 독성의 이유로 특정 단위용량 이상을 투여하는 것이 바람직하지 않은 경우에 유용하다. 예를 들어 대상의 혈청 중의 항체 치료제의 반감기는 그 결과로서 증가될 것이다.

[0651] 그러므로, 다양한 구체예에서 재배열된 사람 경쇄를 코드화하는 유전자의 코돈은 위치 105, 106, 108, 111 또는 그것들의 조합된 위치에서 만들어질 수 있다. 예를 들어 위치 105는 하나 또는 그 이상의 106, 108 및 111과 함께; 위치 106은 하나 또는 그 이상의 105, 108 및 111과 함께; 위치 108은 하나 또는 그 이상의 105, 106 및 111과 함께; 위치 111은 하나 또는 그 이상의 105, 106 및 108과 함께 만들어질 수 있다. 다른 경쇄(예컨대 다른 V-J 재배열로부터 유도된)의 해당하는 위치는 다양한 구체예에 포함된다.

면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 발현하는 비-사람 동물

히스티딘 잔기의 포함

[0654] 기술된 발명은 pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질을 생성할 수 있는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공한다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같이 유전자 변형된 비-사람 동물에 의해 생성된 항원-결합 단백질은 증가된 pH-의존성 재순환 효율 및/또는 증대된 혈청반감기를 나타낸다. 특히 기술된 발명은 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 안으로 히스티딘 코돈을 도입하고, 임의로 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 항원-결합 단백질의 재순환을 촉진하는, FcRn 수용체에 대한 항체 불변 영역의 결합을 증가시키는 CH₂ 및/또는 CH₃ 도메인을 코드화하는 돌연변이(들)을 도입하기 위한 유전자 변형을 사용한다. 변형을 포함하는 항원-결합 단백질은 항원 결합 부위에 위치한 양자화된 잔기로 인해 세포외재성 환경에서 또는 세포의 표면에서(즉 생리적 pH, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.4 범위의 pH에서)보다 산성 세포내 구획에서(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜에서) 더 느슨하게 그것의 표적에 결합할 수 있다. 그러므로, 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형을 포함하는 항원-결합 단백질은 표적-중재된 세포내 흡수에 이어서 그런 유전자 변형을 포함하지 않는 야생형 항원-결합 단백질보다 더 빠르게 또는 효과적으로 재순환될 수 있을 것이다. 나아가, 변형된 히스티딘 잔기가 중성 pH에서가 아니라 산성 환경에서만 양자화되기 때문에, 그런 변형은 생리적 pH에서 관심의 항원을 향한 항원-결합 단백질의 결합 친화성 및/또는 특이성에 영향을 미치지 않을 것이다.

[0655] 다양한 측면으로, 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하고 있는 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0656] 다양한 측면으로, 비-사람 동물을 제조하고 사용하는 방법들이 또한 제공된다. 관심의 항원으로 면역될 때, 유전자 변형된 비-사람 동물은 히스티딘 잔기를 가지는 중쇄 가변 도메인을 포함하고 있는 항원-결합 단백질을 생성하는 B 세포 집단을 생성할 수 있고, 이때 항원-결합 단백질은 증강된 pH-의존성 재순환 및/또는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 다양한 구체예에서, 비-사람 동물은 동족의 사람 경쇄 가변 도메인을 따라 사람 중쇄 가변 도메인을 발현하는 B 세포 집단을 생성한다. 다양한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 비-사람 동물의 생식선 개념에 존재한다.

[0657]

다양한 구체예에서, 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만드는 변형을 포함하고; 유전자 변형된 유전자좌는 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 가지는 하나 또는 그 이상의 사람 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 포함하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이때 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 위치에(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적인 위치에 존재한다(예컨대 그것의 계놈에서 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와는 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자 좌 내에, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이때 내인성 유전자좌는 계놈에 위치하거나 상이한 위치로 이동된다). 한 구체예에서, 예컨대 약 80% 또는 그 이상, 약 85% 또는 그 이상, 약 90% 또는 그 이상, 약 95% 또는 그 이상, 약 96% 또는 그 이상, 약 97% 또는 그 이상, 약 98% 또는 그 이상 또는 약 99% 또는 그 이상의 모든 내인성 중쇄 V, D 또는 J 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다. 한 구체예에서, 예컨대 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 내인성 기능성 중쇄 V, D 또는 J 유전자 절편이 결실되거나 비-기능성이 된다.

[0658]

한 구체예에서, 비-사람 동물은 포유류이다. 비록 본원에서 논의된 구체예에서는 마우스의 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 유전자 서열에 히스티딘 코돈을 도입하는 것에 집중적으로 향해 있지만, 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 첨가 또는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 함유하는 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 다른 비-사람 동물도 또한 제공된다. 그런 비-사람 동물은 본원에 기술된 것과 같이 히스티딘-함유 중쇄 가변 도메인을 발현하도록 유전자 변형될 수 있는 어떠한 동물이든지, 이를테면 마우스, 쥐, 토끼, 돼지, 소(예컨대 암소, 황소, 물소), 양, 사슴, 염소, 닭, 고양이, 개, 족제비, 영장류(예컨대 마모셋, 붉은털 원숭이) 등을 포함한다. 예를 들어 그것에 대한 적당한 유전자 변형가능한 ES 세포가 쉽게 활용될 수 없는 그런 비-사람 동물의 경우, 유전자 변형을 포함하는 비-사람 동물을 제조하기 위하여 다른 방법이 사용된다. 그런 방법으로는, 예를 들면 비-ES 세포 계놈(예컨대 섬유아세포 또는 유도된 다능성 세포)을 변형시키는 것과 유전자 변형된 계놈을 적당한 세포, 예컨대 핵이 제거된 난모세포에 전달하기 위한 체세포 핵 전달(SCNT)을 사용하는 것과, 배(embryo)를 형성하기에 적당한 조건 하에서 비-사람 동물에서 변형된 세포(예컨대 변형된 난모세포)를 숙성시키는 것을 포함한다. 비-사람 동물 계놈(예컨대 돼지, 소, 설치류, 닭 등의 계놈)을 변형시키기 위한 방법은 예를 들면 계놈이 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하도록 계놈을 변형시키기 위하여 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 사용하는 것을 포함한다.

[0659]

한 구체예에서, 비-사람 동물은 예를 들면 다이포도이데아(*Dipodoidea*) 또는 뮤로이데아(*Muroidea*) 슈퍼페밀리의 작은 포유류이다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다. 한 구체예에서, 설치류는 뮤로이데아 슈퍼페밀리로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 칼로마이시다에(예컨대 마우스-유사 햄스터), 크라이세티다에(예컨대 햄스터, 신세계 쥐 및 마우스, 들쥐), 뮤리다에(트루 마우스 및 쥐, 게르빌루스 쥐, 아프리카 가시쥐, 크레스트 쥐), 네소마이다에(클라이밍 마우스, 락 마우스, 꼬리가 달린 쥐, 마다가스카라 쥐 및 마우스), 플라타칸토마이다에(예컨대 가시가 있는 동면쥐류) 및 스팔라시다에(예컨대 두더지, 대나무 쥐 및 조코(zokor))로부터 선택된 패밀리로부터 유래된다. 특정 구체예에서, 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 쥐(뮤리다에 패밀리), 게르빌루스 쥐, 아프리카 가시쥐 및 크레스트 쥐로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 뮤리다에 패밀리의 구성원으로부터 유래한다. 한 구체예에서, 동물은 설치류이다. 특정 구체예에서, 설치류는 마우스와 쥐로부터 선택된다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 마우스이다.

[0660]

한 구체예에서, 비-사람 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6N, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스이다. 다른 구체예에서, 마우스는 129 계통이다. 한 구체예에서, 129 계통은 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예컨대 129S1/SV, 129S1/Sv1m), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/ScEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2로 이루어진 군으로부터 선택된다(예컨대 Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, Auerbach et al. (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL 계통(예컨대 C57BL/6 계통)의 혼합이다. 다른 구체예에서, 마우스는 상기언급된 129 계통끼리의 혼합, 또는 상기 언급된 C57BL/6 계통의 혼합이다. 한 구체예에서, 혼합의 129 계통은 129S6(129/SvEvTac) 계통이다. 다른 구체예에서, 마우스는 129/SvEv- 및 C57BL/6-유도된 계통의 혼합이다. 특정 구체예에서, 마우스는 문헌(Auerbach et al. 2000 BioTechniques 29:1024-1032)에서 기술된 것과 같은 129/SvEv- 및 C57BL/6-유도된 계통의 혼합이다. 다른 구체예에서, 마우스는 BALB 계통, 예

컨대 BALB/c 계통이다. 다른 구체예에서, 마우스는 BALB 계통(예컨대 BALB/c 계통)과 다른 상기 언급된 계통의 혼합이다.

[0661] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 쥐이다. 한 구체예에서, 쥐는 위스타 쥐, LEA 계통, 스프라그 도울리 계통, 피셔 계통, F344, F6 및 검은 아구터로부터 선택된다. 한 구체예에서, 쥐 계통은 위스타, LEA, 스프라그 도울리, 피셔, F344, F6 및 검은 아구터로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 또는 그 이상의 계통의 혼합이다.

[0662] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 마우스이다. 한 구체예에서, 마우스는 VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스이다.

[0663] 내인성 마우스 유전자좌에서 마우스 면역글로불린 가변 영역이 사람 면역글로불린 가변 영역으로 정확히 대체되어 있는 VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스(예컨대 US 6,596,541, USC7,105,348 및 US20120322108A1 참조)는 B 세포 발달과 관련하여 야생형 마우스에 대해 놀라울 정도로 현저한 유사성을 나타낸다. VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스는 본질적으로는 면역처리에 대하여 정상적인 야생형 반응을 보이지만, 유일하게 야생형 마우스와 다른 한 가지 중요한 것은 면역처리에 대한 반응으로 생성된 가변 영역이 완전히 사람의 것이라는 것이다.

[0664] VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스는 마우스 면역글로불린 중쇄(IgH)와 면역글로불린 경쇄(예컨대 κ 경쇄, Igκ)의 생식선 가변 영역 뉴클레오티드 서열이 내인성 유전자좌에서 해당하는 사람 면역글로불린 가변 영역 뉴클레오티드 서열로 정확하게 대규모로 대체된 것을 포함한다(예컨대 US 6,596,541, USC7,105,348 및 US20120322108A1 참조). 전체적으로, 약 6 메가베이스의 마우스 유전자좌가 약 1.5 메가베이스의 사람 게놈 서열로 대체된다. 이런 정확한 대체는 사람 가변 영역과 마우스 불변 영역을 가지는 중쇄 및 경쇄를 만드는 하이브리드 면역글로불린 유전자좌를 가지는 마우스를 초래한다. 마우스 V_H-D-J_H 및 V_κ-J_κ 절편의 정확한 대체로 하이브리드 면역글로불린 유전자좌에서 무상의 기능성 마우스 서열이 양 옆에 있게 된다. 마우스의 체액성 면역시스템은 야생형 마우스의 그것과 유사하게 기능한다. B 세포 발달은 어떠한 유의미한 관점에서도 방해받지 않으며, 사람 가변 영역의 풍부한 다양성은 항원 도전시에 마우스에서 발생된다.

[0665] VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스는 중쇄 및 κ 경쇄에 대한 면역글로불린 유전자 절편이 사람과 마우스에서 유사하게 재배열하기 때문에 가능한데, 그렇다고 해서 그것들의 유전자좌가 동일하거나 거의 동일하다고는 말할 수 없으며, 명백하게는 그것들은 동일하지 않다. 그러나, 유전자좌는 중쇄 가변 유전자 유전자좌의 인간화가 V_H, D 및 J_H 유전자 절편을 모두 함유하는 연속하는 마우스 서열의 약 3백만개의 염기쌍이 기본적으로는 사람 면역글로불린 유전자좌로부터의 동등한 서열을 포함하는 약 백만개의 염기의 연속적인 사람 게놈 서열로 대체됨으로써 이루어질 수 있기 때문에 충분히 유사하다.

[0666] 어떤 구체예에서, 특정 마우스 불변 영역 뉴클레오티드 서열의 사람 불변 영역 뉴클레오티드 서열로의 추가의 대체(예컨대 마우스 중쇄 C_H1 뉴클레오티드 서열의 사람 중쇄 C_H1 뉴클레오티드 서열로의 대체, 및 마우스 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열의 사람 경쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열로의 대체)는 예를 들어 전체적으로 사람 항체 단편, 예컨대 전체 사람 Fab'을 제조하기에 적당한 사람 가변 영역과 부분적으로 사람 불변 영역을 가지는 항체를 만드는 하이브리드 면역글로불린 유전자좌를 가지는 마우스를 유발한다. 하이브리드 면역글로불린 유전자좌를 가지는 마우스는 정상적인 가변 유전자 절편 재배열, 정상적인 체세포성 과돌연변이 빈도, 및 정상적인 부류간 스위칭을 나타낸다. 이들 마우스는 야생형 마우스와 구별되지 않는 체액성 면역 시스템을 나타내며, B 세포 발달의 모든 단계에서 정상적인 세포 집단을 나타내고, - 마우스가 사람 가변 영역 뉴클레오티드 절편의 전체 레퍼토리가 없는 경우에도 정상적인 텁프종 기관 구조를 나타낸다. 이들 마우스를 면역처리하면 광범위하게 다양한 가변 유전자 절편 용도를 나타내는 건강한 체액 반응이 유발된다.

[0667] 마우스 생식선 가변 영역 뉴클레오티드 서열의 정확한 대체로 부분적으로 사람 면역글로불린 유전자좌를 가지는 마우스를 제조하는 것이 가능해진다. 부분적인 사람 면역글로불린 유전자좌는 정상적으로 재배열, 과돌연변이 및 부류 스위칭을 하기 때문에, 부분적인 사람 면역글로불린 유전자좌는 사람 가변 영역을 포함하는 마우스에서 항체를 생성한다. 가변 영역을 코드화하는 뉴클레오티드 서열은 확인되고 클론된 후에 선택된 어떠한 서열, 예컨대 특별한 용도에 적당한 어떠한 면역글로불린 아이소타입과 융합되어(예컨대 시험관 내 시스템에서) 사람 서열로부터 전체적으로 유도된 항체 또는 항원-결합 단백질을 유발한다.

[0668] 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈이 N-말단 영역, 루프 4 영역, CDR1, CDR2, CDR3 또는 그것들의 조합을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

[0669] 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 히스티딘 코돈이 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진 군으로부터 선택된 프레임워크 영역(FR)을 코드화하는 재배열되지 않은 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 존재한다.

- [0670] 다양한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 적어도 하나의 코돈이 히스티딘 코돈으로 대체되어 있는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0671] 다양한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 적어도 하나의 내인성 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0672] 한 구체예에서, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상, 25 또는 그 이상, 26 또는 그 이상, 27 또는 그 이상, 28 또는 그 이상, 29 또는 그 이상, 30 또는 그 이상, 31 또는 그 이상, 32 또는 그 이상, 33 또는 그 이상, 34 또는 그 이상, 35 또는 그 이상, 36 또는 그 이상, 37 또는 그 이상, 38 또는 그 이상, 39 또는 그 이상, 40 또는 그 이상, 41 또는 그 이상, 42 또는 그 이상, 43 또는 그 이상, 44 또는 그 이상, 45 또는 그 이상, 46 또는 그 이상, 47 또는 그 이상, 48 또는 그 이상, 49 또는 그 이상, 50 또는 그 이상, 51 또는 그 이상, 52 또는 그 이상, 53 또는 그 이상, 54 또는 그 이상, 55 또는 그 이상, 56 또는 그 이상, 57 또는 그 이상, 58 또는 그 이상, 59 또는 그 이상, 60 또는 그 이상 또는 61 또는 그 이상의 내인성 비-히스티딘 코돈이 히스티딘 코돈으로 대체된다.
- [0673] 사람 면역글로불린 D 유전자 절편의 리딩 프레임 용도에 대한 이전의 연구는 세 개의 리딩 프레임(즉 중지, 소수성 및 친수성) 중에서 중지 프레임이 매우 드물게 사용되는 것을 밝혔다. 분명하게도 일부 중지 프레임은 후면 소화되고(chewed back) 발현을 유발한다. 그러나 중지 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 공학적으로 도입하기 위한 목적에 대해서는 낮은 빈도로 사용되므로, 중지 리딩 프레임을 사용하지 않는 것이 더 효과적이다. 친수성 리딩 프레임과 소수성 리딩 프레임중에서는 친수성 리딩 프레임이 바람직한 것으로 보인다. 그러므로 한 구체예에서, 사람 D 유전자 절편의 친수성 리딩 프레임은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 함유하도록 공학적으로 처리된다(중지 프레임 또는 소수성 프레임과 비교된다).
- [0674] 돌연변이를 시험관 내에서 도입하는 방법, 예컨대 부위-특정 돌연변이 생성은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 상기 기술된 본 발명의 어떤 구체예에서, 히스티딘 코돈은 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 가상현실에서 (in silico) 디자인함으로써(예컨대 Y, D 및 N 코돈의 H 코돈으로의 돌연변이, 예컨대 CAT, CAC) 풍부해지고, 그것은 그것들을 재결합시키기 위해 결찰시키기 위하여 (독특한) 제한 효소 부위로 합성된다(예컨대 화학적 합성). 합성된 D 유전자 절편은 적절한 재조합 신호 서열(RSS) 상류 및 하류를 사용하여 제조된다. 한 구체예에서, 상호간에 결찰될 때, 합성된 히스티딘-치환된 D 유전자 절편은 각각의 D 유전자 절편 사이에 사람에서 관찰된 유전자간 서열을 포함한다.
- [0675] 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 코드화하는 코돈은 재배열 및/또는 체세포성 과돌연변이될 때, 하나 또는 그 이상의 히스티딘이 다른 아미노산으로 바뀌는 것처럼 변화될 수 있다. 그러나 이것은 비-사람 동물의 각각의 및 모든 재배열에서 각각의 및 모든 히스티딘을 코드화하는 코돈에 대해 일어나지 않을 수 있다. 만약 그런 변화가 일어난다면, 그 변화는 일부에서 그러나 모든 B 세포에서 일어나지 않거나 또는 일부에서 그러나 모든 중쇄 가변 서열에서 일어날 수 있다.
- [0676] 다양한 측면으로, 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌는 사람 중쇄 V, D 및 J 유전자 절편을 포함하는데, 이때 적어도 하나의 사람 D 유전자 절편은 해당하는 야생형 서열과 관련하여, 5'에서 3'으로 반전되었고, 이때 반전된 사람 D 유전자 절편의 적어도 하나의 리딩 프레임은 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0677] 다양한 구체예에서, 뉴클레오티드 서열은 하나 또는 그 이상, 2 또는 그 이상, 3 또는 그 이상, 4 또는 그 이상, 5 또는 그 이상, 6 또는 그 이상, 7 또는 그 이상, 8 또는 그 이상, 9 또는 그 이상, 10 또는 그 이상, 11 또는 그 이상, 12 또는 그 이상, 13 또는 그 이상, 14 또는 그 이상, 15 또는 그 이상, 16 또는 그 이상, 17 또는 그 이상, 18 또는 그 이상, 19 또는 그 이상, 20 또는 그 이상, 21 또는 그 이상, 22 또는 그 이상, 23 또는 그 이상, 24 또는 그 이상 또는 25 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 포함한다.
- [0678] 각각 3 내지 5 구성원을 가지는 6개의 패밀리에 25개의 기능성 사람 D 유전자 절편이 있다(한 패밀리-D7 패밀리-는 단일 구성원을 가진다). 사람 D 유전자 절편의 직접 재조합은 반전보다 훨씬 더 자주 일어나지만, 반전된 리딩 프레임이 더 많은 히스티딘 코돈을 나타낸다. 특정 D 유전자 절편 및 리딩 프레임은 다른 것보다 더 자주 사용된다. 모든 기능성 D 유전자 절편에 대해 세 개의 모든 직접적인 리딩 프레임과 세 개의 모든 반전된 방향의 리딩 프레임은 도 10a 내지 도 10e에 제시된다. 도 10a 내지 도 10e에서 도시된 것과 같이 직접적인 리딩 프

레임에서보다 반전된 리딩 프레임에 더 많은 히스티딘 코돈이 있다. 보다 구체적으로, 반전된 리딩 프레임에는 34개의 히스티딘이 있고 직접 리딩 프레임에는 단지 4개가 있다. 또한, 직접 리딩 프레임에 있는 4개 중에서 세 개의 히스티딘은 위유전자(pseudogene)에 의해 코드화되거나 대체 대립유전자에 존재한다. 그러므로, 히스티딘 코돈을 함유하는 생식선 사람 D 유전자 절편의 오직 하나의 직접적인 리딩 프레임이 있으며, 추가의 히스티딘 코돈은 가능하게는 대체 대립유전자에서 볼 수 있다(아마도 사람 집단의 하위세트에서).

[0679] 반전된 D 재배열은 극히 드물다. Tuailion 등은 반전된 리딩 프레임(제한 회석 PCT에 의해 측정되는 것과 같아)의 이용이 매우 드물다, 즉 직접 대 간접 재배열의 비율이 대부분의 경우 100 대 1000이라는 것을 밝혔다 (Tuailion et al., J. Immunol., 154(12):5453-6465). 직접 대 간접 재배열의 비율은 낮은 정도였는데, 그것은 매우 낮은 이용률을 나타내는 그런 D 절편에서만 관찰되었다. 또한 J1에 인접하여 위치한(다른 D 패밀리 구성원들로부터는 멀리 떨어져 있다) D 유전자 절편 패밀리 7은 주로 태아에서 사용되지만, 성인에서는 낮은 이용률을 나타낸다(Schroeder et al., Immunology 30, 2006, 119-135). 그러므로, 한 구체예에서, D 패밀리 7 서열은 5'에서 3'으로 반전되지 않는다.

[0680] 한 구체예에서, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 또는 모든 또는 실질적으로 모든 사람 기능성 D 유전자 절편이 해당하는 야생형 서열과 관련해서 5'에서 3'으로 반전된다.

[0681] 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-자연적으로 발생하는 히스티딘 잔기를 포함하는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 pH-의존성 항원 결합 특징을 나타낸다. 예를 들어 변형된 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체는 중성 pH 근처(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서 충분한 친화성으로 표적에 결합하지만, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서는 동일한 표적에 결합하지 않거나 보다 약하게 결합한다. 한 구체예에서, 산성 pH는 약 5.5, 약 5.6, 약 5.8, 약 5.9 및 약 6.0으로부터 선택된다. 한 구체예에서 중성 pH는 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3 및 약 7.4로부터 선택된다.

[0682] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 2분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 25°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH) 및 37°C에서 1분 미만의 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 의해 발현된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질은 중성 pH(예컨대 약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여, 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 해리성 반감기($t_{1/2}$)가 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된다.

[0683] 한 구체예에서, 유전자 변형된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질은 중성 또는 생리적 pH(약 7.0 내지 약 7.4의 pH)에서 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 또는 10^{-12} 보다 낮은 친화성(K_D)으로 관심의 항원에 특이하게 결합할 수 있다.

[0684] 산성 pH(예컨대 약 5.5 내지 약 6.0의 pH)에서의 면역글로불린 중쇄 가변 도메인의 변경된 결합 특성은 어떤 상황에서, 치료적 항체가 세포 표면의 표적에 결합하고, 엔도솜으로 내재화되며, 보다 쉽게 또는 보다 빠르게 엔도솜에서 표적으로부터 해리되어서 치료제가 재순환되어 다른 세포에 존재하는 표적의 또 다른 분자에 결합할 수 있기 때문에 더 빠른 항체의 전환을 가능하게 한다. 이것은 더 낮은 용량으로 치료제를 투여하는 것 또는 치료적 항체를 덜 빈번하게 투여하는 것을 가능하게 한다. 이것은 특히 치료적 항체를 빈번하게 투여하거나 또는 안전성 또는 독성의 이유로 특정 단위용량 이상의 수준으로 투여하는 것이 바람직하지 않은 상황에서 유용하다.

[0685] 다양한 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같이 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람

또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열(예컨대 IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA로부터 선택된 면역글로불린 아이소타입을 코드화하는 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 다양한 구체예에서, 사람 또는 비-사람 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H2, C_H3 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H1, 힌지, C_H2 및 C_H3를 포함한다(예컨대 C_H1-힌지-C_H2-C_H3).

[0686] 다양한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 내인성 유전자좌에(즉 뉴클레오티드 서열이 야생형 비-사람 동물에 위치하는 경우) 또는 비정상적으로(예컨대 그것의 게놈에서 내인성 면역글로불린 사슬 유전자와는 상이한 유전자좌에, 또는 그것의 내인성 유전자좌 내에, 예컨대 면역글로불린 가변 유전자좌 내에, 이때 내인성 유전자좌는 게놈에 위치하거나 상이한 위치로 이동된다) 존재한다.

[0687] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 C_H2 또는 C_H3에 변형을 포함하고, 이때 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 중쇄 불변 영역 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0688] IgG에 대한 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 어머니로부터 그녀의 태아로의 태반 및 근위의 소장을 가로지르는 수동 체액성 면역성의 전달에서 특성확인이 잘 되어 있다(Roopenian, D. and Akilesh, S., Nat. Rev. Immun., 2007, 7:715-725). FcRn은 고전적인 Fc γ Rs 또는 보체의 C1q 성분의 결합 부위로부터 떨어져 있는 부위에서 IgG의 Fc 부분에 결합하여, 고전적인 보체 활성화 경로를 개시한다. 보다 구체적으로, FcRn은 IgG 항체의 C_H2-C_H3 힌지 영역-또한 스타필로코쿠스 단백질 A, 스트렙토코糗스 단백질 G 및 류머티즘 인자와도 결합하는 다용도 영역에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 다른 Fc-결합 단백질과는 대조적으로, FcRn은 생리적 pH 7.4에서 엄격하게 pH-의존성 방식으로 IgG의 Fc 영역에 결합한다. FcRn은 IgG에는 결합하지 않는 반면, 엔도솜의 산성 pH에서(예컨대 엔도솜의 pH 범위는 약 5.5 내지 약 6.0이다) FcRn은 IgG의 Fc 영역에 대해 낮은 마이크로몰 내지 나노몰의 친화성을 나타낸다. 이런 pH-의존성 상호작용은 IgG의 C_H2-C_H3 영역의 히스티딘 잔기의 적정 및 그것들의 계속되는 FcRn의 표면상의 산성 잔기와의 상호작용에 의해 중재되는 것으로 밝혀졌다(Roopenian, D. and Akilesh, S., Nat. Rev. Immun., 2007, 7:715-725).

[0689] 산성 pH에서 FcRn에 대한 Fc 영역의 친화성을 증가시킬 수 있는 IgG의 C_H2-C_H3 영역의 다양한 돌연변이는 해당 기술분야에 알려져 있다. 그러한 것의 예를 들면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 위치 250(예컨대 E 또는 Q); 250 및 428(예컨대 L 또는 F); 252(예컨대 L/Y/F/W 또는 T); 254(예컨대 S 또는 T) 및 256(예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예컨대 L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예컨대 H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 다른 실례로는, 변형은 428L(예컨대 M428L) 및 434S(예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I(예컨대 V259I) 및 308F(예컨대 V308F) 변형; 433K(예컨대 H433K) 및 434(예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형 또는 그것들의 조합을 포함한다.

[0690] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 252 내지 257에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0691] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 위치 307 내지 311에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하는 사람 C_H2 아미노산 서열을 코드화하며, 이때에 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 사람 C_H2 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0692] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 C_H3 아미노산 서열을 코드화하고, 이때에 C_H3 아미노산 서열은 위치 433 내지 436에 있는 아미노산 잔기에서 적어도 하나의 변형을 포함하며, 그 변형은 산성 환경(예컨대 pH 범위가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 C_H3 아미노산 서열의 친화성을 증가시킨다.

[0693] 한 구체예에서, 본원에서 기술된 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열에 의해 코드화된 사람 불변 영역 아미노산 서열은 M428L, N434S 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 사람 불변 영역 아미노산 서열은 M428L, V259I, V308F 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 사람 불변 영역 아미노산 서열은 N434A 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서,

사람 불변 영역 아미노산 서열은 M252Y, S254T, T256E 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 사람 불변 영역 아미노산 서열은 T250Q, M248L 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 사람 불변 영역 아미노산 서열은 H433K, N434Y 또는 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.

[0694] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 비-사람 불변 영역 아미노산 서열이고, 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 하나 또는 그 이상의 상기 기술된 변형의 어떠한 유형이든지 포함한다.

[0695] 한 구체예에서, 중쇄 불변 영역 뉴클레오티드 서열은 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이고, 사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 하나 또는 그 이상의 상기 기술된 변형의 어떠한 유형이든지 포함한다.

면역글로불린 경쇄 유전자에 공학적으로 도입된 히스티딘 잔기

[0697] 다양한 구체예에서, 자신의 게놈, 예컨대 생식선에 pH-의존성 항원 결합을 나타내는 사람 항체 분자를 코드화하는 뉴클레오티드 서열(들), 예컨대 pH-의존성 항원 결합을 나타내는 항체를 코드화하는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄의 뉴클레오티드 서열; 그것을 포함하는 배, 세포 및 조직을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예컨대 포유류, 예를 들면 마우스, 쥐, 토끼 등); 및 그것의 사용방법이 제공된다.

[0698] 본 발명자들은 pH 의존성 방식으로 항원에 결합할 수 있는 항체를 발현하는 비-사람 동물이 경쇄의 서열을 따라 하나 또는 그 이상의 위치에서 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 변형을 만듦으로써 제조될 수 있다는 것을 발견하였다. 비-사람 동물의 생식선에 변형을 만들어서 동물이 항체의 CDR에서 히스티딘을 발현하도록 하는 방법이 기술된다. 특히 마우스의 생식선의 면역글로불린 경쇄 가변 서열에 변형을 만드는 방법이 기술된다. 예를 들어 경쇄의 가변 영역 서열은 전형적으로 가변 영역 서열을 따라 체세포성 과돌연변이를 나타내고, 어떤 경우에는 그런 돌연변이가 히스티딘 잔기의 치환을 유발할 수 있다(도 15 참조). 그런 돌연변이는 항원 결합에 기여하는 가변 도메인 영역인 상보성 결정 영역(CDR)에서도 일어날 수 있다. 어떤 경우에는 그런 돌연변이는 pH-의존성 항원 결합, 예컨대 중성 pH에서의 항원 결합에 비교하여 산성 pH에서 감소된 항원 결합을 나타내는 항체를 유발할 수 있다. 그런 pH-의존성 항원 결합은 그것으로 인해 세포 외부에서 항원에 항체가 결합하는 것이 가능해지고, 엔도솜으로 내재화될 때 항원이 방출되어 표적-중재된 소멸을 피하면서 표면으로 되돌아가서 또 다른 항원에 결합하도록 재순환되기 때문에 바람직하다. 이런 효과를 이루기 위하여 pH-의존성 결합 특성을 항-IL-6R 항체에 공학적으로 도입하기 위하여 무작위 his-주사 돌연변이 생성을 사용함으로써 히스티딘 잔기를 도입하기 위한 접근법은 보고된 바 있다(US 2011/0111406 A1). 그러나 항체 잔기의 무작위 돌연변이 생성은 항원에 대한 항체의 감소된 친화성을 유발할 수 있다. 항체 서열에 히스티딘 치환을 발현하도록 유전자 변형된 비-사람 동물은 관심의 항원에 대한 반응으로, 히스티딘 변형(들)으로 인해 또한 pH-의존성 항원 결합을 나타낼 고친화성 항체를 생성하는 것이 가능해진다.

[0699] 그러므로 다양한 구체예에서, 본원에는 pH-의존성 방식으로 항원에 결합할 수 있는 항체를 발현하는 동물을 유발하는 변형을 포함하는 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 그것의 게놈, 예컨대 생식선에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 마우스 또는 쥐)이 제공된다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(어떤 경우에는 "히스티딘 치환", "히스티딘 코돈 치환" 등으로도 언급될 수 있다)을 포함하는 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열(예컨대 V_L 및/또는 J_L 절편 서열)의 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 사람 면역글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역(CDR; 예컨대 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3)에 포함한다. 한 구체예에서, 치환은 CDR3 코돈에 있다. 한 구체예에서, 경쇄는 κ 경쇄이다. 한 구체예에서, 동물은 적어도 하나의 아미노산의 히스티딘으로의 치환을 포함하는 면역글로불린 경쇄, 예컨대 경쇄 CDR, 예를 들면 경쇄 CDR를 발현한다. 다른 구체예에서, 경쇄는 λ 경쇄이다. 또 다른 구체예에서, 마우스는 κ 및 λ 경쇄에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0700] 히스티딘 잔기는 두 개의 상이한 코돈, CAT와 CAC(테옥시리보핵산 잔기)에 의해 코드화된다. 그러므로 비-히스티딘 코돈은 CAT 또는 CAC로 치환될 수 있다. 치환은 그것의 생식선 형태(즉 비-체세포성 돌연변이 상태)에서 히스티딘 잔기를 코드화하지 않는 코돈에서 공학적으로 처리된다.

[0701] 한 구체예에서, 경쇄는 보편적 경쇄(또한 통상적인 경쇄로도 언급된다)이다. 미국 특허 출원 13/022,759, 13/093,156, 13/412,936 및 13/488,628(미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 및 2013/0045492)에 기술되어 있는 것과 같이, 다수의 중쇄에 대해 통상적인 경쇄를 선택하는 비-사람 동물(예컨대

마우스)이 실제로 활용된다. 다양한 구체예에서, 통상적인 경쇄만을 포함하는 비-사람 동물에서 발현된 항체는 동일한 또는 실질적으로 동일한 경쇄와 결합하고 발현할 수 있는 중쇄를 가질 것이다. 이것은 특히 이중특이성 항체를 만들 때 유용하다. 예를 들어 그런 동물은 특이적으로 첫 번째 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 생성하기 위해 첫 번째 면역원으로 면역될 수 있다. 동물(또는 유전적으로 동일한 동물)은 두 번째 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 생성하기 위하여 두 번째 면역원으로 면역될 수 있다. 가변 중쇄 영역은 B 세포로부터 클론될 수 있고, 이중특이성 항체를 제조하기 위하여 세포에서 동일한 중쇄 불변 영역 및 동일한 경쇄(예컨대 통상적인 경쇄)와 함께 발현될 수 있는데, 이때 이중특이성 항체의 중쇄 성분은 동일한 경쇄 성분과 결합하여 발현하는 동물에 의해 선택될 수 있다. 기술된 다양한 구체예에서, 유전자 공학처리된 마우스의 가변 영역은 사람 가변 영역이다.

[0702] 그러므로, 중쇄의 보다 다양한 패밀리, 이를테면 그것의 사람 가변 영역이 생식선 서열과는 동떨어진 중쇄, 예컨대 친화성 성숙된 또는 체세포성 돌연변이된 가변 영역과 적절하게 짹을 이를 면역글로불린 경쇄를 생성할 수 있는 마우스가 공학적으로 제조될 수 있다. 다양한 구체예에서, 마우스는 사람 경쇄 가변 도메인이 체세포성 돌연변이를 포함하는 사람 중쇄 가변 도메인과 짹을 이루게 하고, 그로써 고친화성 결합 단백질로의 경로가 사람 치료제로서 사용하기에 적당하게 되도록 고안된다.

[0703] 유기체 내에서 길고 복잡한 항체 선택 과정을 거쳐 유전자 공학제조된 마우스는 다양하게 수집된 사람 중쇄 가변 도메인을 제한된 수의 사람 경쇄 옵션과 짹을 이루는 데 있어 생물학적으로 적절한 선택을 하게 된다. 이것을 이루기 위하여, 마우스는 광범위한 다양한 사람 중쇄 가변 도메인 옵션과 함께 제한된 수의 사람 경쇄 가변 도메인 옵션을 제공하도록 공학처리된다. 면역원으로 도전받을 때, 마우스는 그것의 레퍼토리에서 크게 또는 수 또는 경쇄 옵션에 단독으로 제한되는, 면역원에 대한 항체를 발생시키기 위해 그것의 레퍼토리에서 해결의 수를 최대화시킨다. 다양한 구체예에서, 이것은 마우스가 그럼에도 불구하고 상대적으로 매우 다양한 사람 중쇄 가변 도메인, 이를테면 특히 체세포성 돌연변이된 사람 중쇄 가변 도메인과 부합하게 될 경쇄 가변 도메인의 적절하고 부합하는 체세포성 돌연변이를 이루는 것을 허용하는 것을 포함한다.

[0704] 미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 및 2013/0045492에 기술되어 있는 공학적으로 제조된 통상적인 경쇄 마우스는 제한된 레퍼토리의 경쇄 옵션, 예컨대 2 이하의 V_L 절편 또는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함한 통상적인 또는 보편적인 경쇄 "ULC"를 코드화하는 핵산 서열을 포함하였다. 그런 제한된 레퍼토리를 이루기 위하여, 마우스는 천연 마우스 경쇄 가변 도메인을 만들거나 재배열하는 능력이 비기능성 또는 실질적으로 비기능성이 되도록 공학적으로 처리되었다. 한 측면으로, 이것은 예를 들면 마우스의 경쇄 가변 영역 유전자 절편을 결실시킴으로써 이루어졌다. 앞서 기술된 것과 같이, 내인성 마우스 유전자좌는 그런 다음, 외인성 사람 가변 영역 유전자 절편이 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 유전자와 조합되어 재배열된 역 키메릭 경쇄 유전자(사람 가변, 마우스 불변)를 형성할 수 있는 방식으로, 내인성 마우스 경쇄 불변 도메인에 작동가능하게 연결된, 선택된 적절한 외인성 사람 경쇄 가변 영역 유전자 절편에 의해 변형될 수 있다. 다양한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 체세포성 돌연변이될 수 있다. 다양한 구체예에서, 체세포성 돌연변이를 획득하기 위해 경쇄 가변 영역의 능력을 최대화하기 위해 적절한 인핸서(들)이 마우스에 보유된다. 한 측면으로, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자 절편을 사람 κ 경쇄 유전자 절편으로 대체하기 위해 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 변형시킬 때, 마우스 κ 인트로닉 인핸서 및 마우스 κ 3' 인핸서가 기능적으로 유지되거나 또는 파괴되지 않는다.

[0705] 그러므로 다양한 역 키메릭(사람 가변, 마우스 불변) 중쇄와 결합된 제한된 레퍼토리의 역 키메릭(사람 가변, 마우스 불변) 경쇄를 발현하는 유전자 공학처리된 마우스가 제공되었다. 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자 절편은 결실되고 내인성 마우스 C κ 유전자에 작동가능하게 연결된 단일한(또는 2개의) 재배열된 사람 경쇄 영역으로 대체된다. 재배열된 사람 경쇄 영역의 체세포성 과돌연변이를 최대화하기 위한 구체예에서, 마우스 κ 인트로닉 인핸서 및 마우스 κ 3' 인핸서가 유지된다. 다양한 구체예에서, 마우스는 또한 비기능성 λ 경쇄 유전자좌, 또는 그것의 결실 또는 유전자좌가 λ 경쇄를 만들 수 없도록 만드는 결실을 포함한다.

[0706] 보편적인 경쇄 마우스는 V_H , D_H 및 J_H 절편의 다양한 레퍼토리를 포함하고 있는 다양한 레퍼토리의 중쇄 가변 영역 서열을 활용할 수 없는 다양한 항원에 대한 반응으로 항체를 생성하였다. 그런 유전자 공학처리된 ULC 마우스에서 생성된 항체는 이중특이성 치료 항체를 디자인하는 데 유용하다; 그러나 어떠한 다른 항체와 같이, 각각의 이중특이성 항체는 그것의 혈장 내에서의 반감기 동안 오직 하나의 표적에만 결합할 수 있고; 항체는 엔도솜 안에 내재화되어 리소좀 분해의 표적이 된다. 연구 결과들은 MHC-부류-I-유사 Fc γ 수용체 FcRn이 면역글로불린을 분류하는 엔도솜으로부터 세포 표면으로 재순환시킴으로써 리소좀 분해로부터 면역글로불린을 구할 수 있음

을 보여주었다(Simister and Mostov (1989) An Fc receptor structually related to MHC class I antigens. Nature 337:184-187). 상기에서 설명된 것과 같이, 항체 재순환의 효율을 개선하기 위하여, 항체 서열에 대한 추가의 변형, 예컨대 산성 pH(예컨대 엔도솜의 pH)에서 감소된 항원 결합을 유발하는 변형을 만드는 한편, 중성 pH(예컨대 혈액과 같은 신체 체액의 pH)에서 항체-항원 친화성과 특이성을 보유하는 것이 유익하다. 보편적 경쇄 서열에서 비-히스티딘 잔기에 대해 히스티딘 잔기가 치환되어 있는, 본원에서 기술된 비-사람 동물이 유익한데, 왜냐하면 그것들은 pH-의존성 결합, 예컨대 중성 pH에 비해 산성 pH에서 항원에 대한 감소된 결합을 나타내는 보편적 경쇄 방식을 토대로 하여 고친화성 항체를 생성할 수 있기 때문이다.

[0707] 그러므로 한 구체예에서, 그것의 계놈, 예컨대 생식선에 사람 경쇄 가변 유전자 절편의 제한된 레퍼토리로부터의 제한된 레퍼토리의 사람 경쇄 가변 영역, 또는 단일한 사람 경쇄 가변 영역을 포함하는 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 마우스 또는 쥐)이 본원에 제공되는데, 이때 사람 경쇄 가변 영역(들)은 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 적어도 하나의 치환을 포함한다. 어떤 구체예에서, 단일 경쇄를 발현하는(또는 두 개의 경쇄 중 어느 하나 또는 둘 다를 발현하는) 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자(또는 두 개의 재배열된 경쇄 가변 영역 유전자)를 형성하도록 재배열하는 단일한 재배열되지 않은 사람 경쇄 가변 영역 유전자 절편(또는 두 개의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 절편)을 포함하도록 유전자 공학처리된 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 경쇄 가변 영역 유전자(들)은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 이들 히스티딘-치환된 경쇄 가변 영역 유전자(들)에 의해 코드화된 재배열된 사람 경쇄 가변 도메인은 동물에 의해 선택된 다수의 친화성-성숙된 사람 중쇄와 짹을 이를 수 있고, 이때 중쇄 가변 영역은 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 다양한 구체예에서 비-히스티딘 잔기의 히스티딘 잔기로의 적어도 하나의 치환은, 동족의 중쇄와 함께 발현될 때 pH-의존성 방식으로 그것의 항원에 결합하는 재배열된 사람 경쇄를 유발한다.

[0708] 제한된 레퍼토리의 사람 경쇄 가변 도메인, 또는 단일한 사람 경쇄 가변 도메인을 제한된 레퍼토리의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열로부터 발현하는 유전자 공학처리된 동물이 제공되는데, 이때 가변 영역 유전자 서열은 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 적어도 하나의 치환을 포함한다. 어떤 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 단일한 경쇄의 가변 영역을 발현하는(또는 두 개의 가변 영역 중 어느 하나 또는 둘 다를 발현하는) 단일한 V/J 사람 경쇄 서열(또는 두 개의 V/J 서열)을 포함하도록 유전자 공학처리된 동물이 제공된다. 한 측면으로, 가변 서열을 포함하는 경쇄는 동물에 의해 클론적으로 선택된 다수의 친화성-성숙된 사람 중쇄와 짹을 이를 수 있고, 이때 중쇄 가변 영역은 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 한 구체예에서, 항체는 그것의 항원(들)에 pH-의존성 방식으로 결합한다. 한 구체예에서, 단일 V/J 사람 경쇄 서열은 V_k 1-39J_k 5 및 V_k 3-20J_k 1로부터 선택된다. 한 구체예에서, 두 개의 V/J 서열은 V_k 1-39J_k 5 및 V_k 3-20J_k 1이다. 한 구체예에서, V_k 1-39J_k 5 및 V_k 3-20J_k 1 서열은 재배열된 V/J 서열이다.

[0709] 한 측면으로, 사람 J_L 유전자 절편(하나 또는 다수의 J_L 절편으로부터 선택됨)과 재배열될 수 있고 면역글로불린 경쇄의 사람 가변 도메인을 코드화할 수 있는 단일한 사람 면역글로불린 경쇄 V_L 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 단일한 사람 면역글로불린 경쇄 V_L 유전자 절편 및/또는 사람 J_L 유전자 절편은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 다른 측면으로, 둘 이하의 사람 V_L 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이것들은 각각 사람 J_L 유전자 절편(하나 또는 다수의 J_L 절편으로부터 선택됨)과 재배열될 수 있고 면역글로불린 경쇄의 사람 가변 도메인을 코드화할 수 있으며, 이때 둘 이하의 V_L 유전자 절편 및/또는 J_L 유전자 절편의 각각은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.

[0710] 본원에는 또한 그것의 계놈, 예컨대 생식선에 사람 V_L 및 J_L 서열을 포함하는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공되는데, 이때 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 측면으로, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 사람 생식선 V_L 및 J_L 유전자 서열로부터 유도되지만, 히스티딘 치환(들)에 대해서는 그렇지 않다. 한 구체예에서, 사람 면역글로불린 경쇄는 사람 면역글로불린 κ 사슬이다. 그러므로 한 구체예에서, 사람 V_L 유전자 서열은 V_k 1-39 및 V_k 3-20으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 재배열된 V_k 1-39/J 또는 V_k 3-20/J 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 사람 J_L 유전자 서열은 J_k 1, J_k 2, J_k 3, J_k 4 및 J_k 5로부터 선택된다. 한 구체예에서, 사람 J_L 서열은 J_k 1 및 J_k 5로부터 선택된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린

경쇄 가변 영역 서열은 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 및 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 으로부터 선택된다(예컨대 그러나 히스티딘 치환(들)에 대해서는 그렇지 않다). 대체 구체예에서, 사람 면역글로불린 경쇄는 사람 λ 사슬이다.

[0711] 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환은 경쇄 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에서 일어난다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환은 경쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 또는 CDR3를 코드화하는 뉴클레오티드 서열에서 일어난다. 한 특정 구체예에서, 치환은 CDR3를 코드화하는 뉴클레오티드 서열에서 일어난다.

[0712] 한 측면으로, 치환은 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열의 CDR3 코돈에서 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환이다. 한 구체예에서, 그 치환은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 CDR3 코돈의 치환이다. 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 가변 영역인 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체는 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 CDR3를 코드화하는 면역글로불린 경쇄 유전자 서열의 위치에서의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 106에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 108에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 108에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 108에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 107 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 히스티딘-치환된 영역의 핵산 및 아미노산 서열은 도 16의 서열 배열에 도시되고 SEQ ID NO:327 내지 357에 표시된다.

[0713] 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 가변 영역인 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체는 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된 CDR3 영역을 코드화하는 면역글로불린 경쇄 유전자 서열의 위치에서의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 106에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 107 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 또 다른 구체예에서, 대체는 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 대체는 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 히스티딘-치환된 영역의 핵산 및 아미노산 서열은 도 27의 서열 배열에 도시되고 SEQ ID NO:398 내지 403에 표시된다.

[0714] 아미노산 위치(105, 106 등)는 Lefranc et al. (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77에 기술된 독특한 넘버링을 토대로 하고, 또한 www.imgt.org 상에서도 볼 수 있다.

[0715] 한 구체예에서, 사람 V_L 유전자 절편은 사람 또는 비-사람 리더 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 리더 서열은 비-사람 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 비-사람 리더 서열은 마우스 $V\kappa 3-7$ 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 리더 서열은 재배열되지 않은 사람 V_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 리더 서열은 재배열된 사람 V_L/J_L 서열에 작동가능하게 연결된다. 그러므로 한 특정 구체예에서, 적어도 하나의 히스틴 치환을 포함하고 있는 단일한 재배열된 $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ 또는 $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ 가변 영역 유전자 서열은 마우스 $V\kappa 3-7$ 리더 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0716] 한 구체예에서, V_L 유전자 절편은 면역글로불린 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 프로모터 서열은 사람 프로모터 서열이다. 특정 구체예에서, 사람 면역글로불린 프로모터는 사람 $V\kappa 3-15$ 프로모터이다. 특정 구체예에서, 프로모터는 재배열되지 않은 사람 V_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 프로모터는 재배열된 사람 V_L/J_L 서열에 작동가능하게 연결된다. 그러므로 한 특정 구체예에서, 적어도 하

나의 히스틴 치환을 포함하고 있는 단일한 재배열된 $V_K 1-39/J_K 5$ 또는 $V_K 3-20/J_K 1$ 가변 영역 유전자 서열은 사람 $V_K 3-15$ 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0717] 한 구체예에서, 경쇄 유전자좌는 5'(V_L 유전자 절편의 전사 방향과 관련하여)의 옆에 사람 면역글로불린 프로모터와 3' 옆에 사람 J_L 절편과 재배열되고 내인성 비-사람 경쇄 불변 영역(C_L)을 포함하는 역 키메릭 경쇄의 가변 도메인을 코드화하는 사람 V_L 유전자 절편이 있는 리더 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, V_L 및 J_L 유전자 절편은 비-사람 V_K 유전자좌에 있고, 비-사람 C_L 은 비-사람 C_K (예컨대 마우스 C_K)에 있다. 한 특정 구체예에서, 가변 영역 서열은 비-사람 불변 영역 서열, 예컨대 비-사람 C_K 유전자 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0718] 한 구체예에서, 경쇄 유전자좌는 5'(V_L 유전자 절편의 전사 방향과 관련하여)의 옆에 사람 면역글로불린 프로모터와 3' 옆에 재배열된 사람 가변 영역 서열(V_L/J_L 서열)을 포함하고 내인성 비-사람 경쇄 불변 영역(C_L)을 포함하는 역 키메릭 경쇄의 가변 도메인을 코드화하는 리더 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 재배열된 사람 V_L/J_L 서열은 비-사람 카파(κ) 유전자좌에 있고, 비-사람 C_L 은 비-사람 C_K 에 있다. 한 특정 구체예에서, 재배열된 사람 가변 영역 서열은 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열, 예컨대 비-사람 C_K 유전자 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 비-사람 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열은 내인성 비-사람 서열이다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 마우스이고 C_K 유전자 서열은 마우스 C_K 유전자 서열이다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 내인성 비-사람(예컨대 마우스) 면역글로불린 경쇄 유전자좌(κ 유전자좌)에 있다. 유전자좌의 예시적인 구체예는 도 23c, 도 23e, 도 29c 및 도 29d에 도시된다.

[0719] 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물은 마우스이고, 마우스의 가변 영역 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이며, κ 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 인트로닉 인핸서, 마우스 $\kappa 3'$ 인핸서 또는 인트로닉 인핸서와 3' 인핸서 둘다를 포함한다.

[0720] 한 구체예에서, 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 쥐 또는 마우스)은 비기능성 면역글로불린 람다(λ) 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구체예에서, λ 경쇄 유전자좌는 유전자좌의 하나 또는 그 이상의 서열의 결실을 포함하는데, 그 하나 또는 그 이상의 결실은 λ 경쇄 유전자좌를 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열하지 못하도록 만든다. 다른 구체예에서, λ 경쇄 유전자좌의 모든 또는 실질적으로 모든 V_L 유전자 절편이 결실된다. 한 구체예에서, 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 쥐 또는 마우스)은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고, 재배열되지 않은 기능성 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 예컨대 재배열되지 않은 내인성 경쇄 가변 영역이 결핍되어 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 재배열되고 히스티딘-치환된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 재배열되지 않은 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 대체한다.

[0721] 한 구체예에서, 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 가변 영역 서열로부터 유도된 체세포성 돌연변이된 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 만든다. 한 구체예에서, 경쇄는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 가변 영역 서열로부터 유도된 체세포성 돌연변이된 가변 도메인과, 비-사람 C_K 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 λ 경쇄를 발현하지 않는다.

[0722] 해당 기술분야의 숙련자는 비록 적어도 하나의 비-히스티딘 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환(들)이 체세포성 과돌연변이로 인해 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역안으로 유전자 공학적으로 도입되긴 하지만, 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 모든 항체가 공학적으로 처리된 위치(들)에 히스티딘 잔기(들)을 은鄙하지 않을 것임을 인지할 것이다. 그러나, 비-사람 동물에서 광범위한 레퍼토리의 항체의 생성은 생체 내에서 관심의 항원에 대해 고친화성을 나타내는 한편 생식선안에 도입된 히스티딘 변형을 보유하고, 그로써 pH-의존성 항원 결합을 나타내는 항원-특이적 항체의 생성에 대한 선택을 허용할 것이다.

[0723] 그러므로 한 구체예에서, 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 아미노산의 히스티딘으로의 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 동물은 그것의 가변 영역 유전자 안으로 도입된 체세포성 돌연변이된 경쇄 가변 도메인에 모든 또는 실질적으로 모든 히스티딘 치환을 보유한다.

[0724] 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물은 또한 그것의 계놈, 예컨대 생식선에 V_H , D_H 및 J_H

유전자 절편 서열을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편 서열은 사람 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편 서열이고, 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 사람 중쇄 가변 영역이다. 한 구체예에서, 사람 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편 서열은 비-사람 중쇄 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 비-사람 중쇄 불변 영역 서열은 내인성 비-사람 중쇄 불변 영역 서열이다. 한 구체예에서, 사람 중쇄 유전자 절편 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 있다. 한 구체예에서, 비-사람 동물에 포함된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열은 또한 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈에 대한 치환을 포함한다.

[0725] 한 구체예에서, 본원에 기술된 비-사람 동물은 비-사람 경쇄 불변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 사람 경쇄 불변 영역 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

[0726] 한 구체예에서, 본원에 기술된 비-사람 동물은 C_H1 서열, 헌지 서열, C_H2 서열, C_H3 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 비-사람 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 발현한다.

[0727] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 C_H1 서열, 헌지 서열, C_H2 서열, C_H3 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 발현한다.

[0728] 동물이 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 구체예에서, 동물의 생식선의 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있다. 특정 구체예에서, 동물의 생식선에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 내인성 비-사람 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 비-사람 경쇄 V 및 J 절편 서열을 대체한다.

[0729] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 내인성 V_H 유전자 절편의 하나 또는 그 이상의 사람 V_H 유전자 절편으로의 대체를 포함하는데, 이때 사람 V_H 유전자 절편은 비-사람 C_H 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어서 비-사람 동물이 사람 V_H 유전자 절편을 재배열하고, 사람 V_H 도메인과 비-사람 C_H 를 포함하는 역 키메릭 면역글로불린 중쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 90 내지 100%의 재배열되지 않은 비-사람 V_H 유전자 절편이 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든(예컨대 90 내지 100%) 내인성 비-사람 V_H 유전자 절편은 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 19, 적어도 39 또는 적어도 80 또는 81의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 일어난다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로, 적어도 25개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 또는 적어도 43개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 일어난다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 모든 비-사람 D_H 및 J_H 절편의 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 D_H 절편 및 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 J_H 절편으로의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 모든 비-사람 D_H 및 J_H 절편의 모든 재배열되지 않은 사람 D_H 절편 및 모든 재배열되지 않은 사람 J_H 절편으로의 대체를 포함한다.

[0730] 그것의 계놈, 예컨대 생식선에, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환 및 다양한 레퍼토리의 재배열되지 않은 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편을 가지는, 제한된 레퍼토리의 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 예컨대 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역(예컨대 $V_{K1}-39/J_{K5}$ 또는 $V_{K3}-20/J_{K1}$)을 포함하고 있는 비-사람 동물, 예컨대 마우스는 재배열되지 않은 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편의 다양한 과돌연변이로부터 유도된 중쇄 가변 영역 서열에 의해 코드화된 항원 결합 단백질을 생성할 수 있는데, 이때 중쇄 가변 서열에 존재하는 V_H , D_H 및 J_H 절편은 동물의 계놈에 존재하는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 V_H , D_H 및 J_H 절편으로부터 유도된다. 본원에서 기술된(즉 다양한 기능성 사람 V, D 및 J 절편의 조합으로부터 유도된) 유전자 변형된 동물의 세포, 예컨대 B 세포에서 발현된 중쇄 가변 도메인 서열에 대한 다양한 활용가능한 가능성은 미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/192300 및 2013/0045492에 기술된다. 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(들) 및 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열을 포함하고 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열은 비-사람 동물의 생식선에 포

함된다.

[0731] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(들) 및 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열을 포함하고 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열의 하나 또는 둘 다의 하나의 복사물을 포함한다. 다른 구체예에서, 비-사람 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(들) 및 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열을 포함하고 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열의 하나 또는 둘 다의 복사물을 포함한다. 그러므로 비-사람 동물은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(들) 및 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열을 포함하고 있는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열의 하나 또는 둘 다에 대해 동형접합성이거나 이형접합성이 될 수 있다.

[0732] 그들의 게놈에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는(예컨대 경쇄의 CDR3에) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열(예컨대 단일한 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열)을 포함하고 있는 유전자 변형된 비-사람 동물 외에, 본원에는 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈(들)이 첨가된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하고 있어서, 발현된 가변 도메인이 만약 체세포성 과돌연변이가 일어나지 않는다면 히스티딘일 추가의 아미노산(들)을 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물이 제공된다.

[0733] 본원에서 기술된 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하고 있는 유전자 변형된 비-사람 동물은 마우스, 쥐, 토끼, 돼지, 소(예컨대 젖소, 황소, 물소), 양, 사슴, 염소, 닭, 고양이, 개, 페럿, 영장류(예컨대 마모셋, 붉은털 원숭이)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적당한 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 구할 수 없는 비-사람 동물인 경우에 본원에 기술된 것과 다른 방법들이 유전자 변형을 포함하는 비-사람 동물을 제조하기 위하여 사용된다. 그러한 방법으로는 예를 들면 비-ES 세포 게놈(예컨대 섬유아세포 또는 유도된 다능성 세포)을 변형시키고, 변형된 게놈을 적당한 세포, 예컨대 난모세포에 전달하기 위해 혜전달을 사용하며, 변형된 세포(예컨대 변형된 난모세포)를 배(embryo)를 형성하기에 적당한 조건 하에서 비-사람 동물에 임태시키는 것을 포함한다.

[0734] 한 측면으로, 비-사람 동물은 포유류이다. 한 측면으로, 비-사람 동물은 작은 포유류, 예컨대 다이포도이데아 또는 뮤로이데아 슈퍼페밀리의 포유류이다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다. 한 구체예에서, 설치류는 뮤로이데아 슈퍼페밀리로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 칼로마이시다에(예컨대 마우스-유사 햄스터), 크리세티다에(예컨대 햄스터, 신세계 쥐 및 마우스, 들쥐), 뮤리다에(트루 마우스 및 쥐, 게르빌루스 쥐, 아프리카 가시쥐 및 크레스트 쥐), 네소마이다에(클라이밍 마우스, 락 마우스, 꼬리가 달린 쥐, 마다가스카라 쥐 및 마우스), 플라타칸토 마이다에(예컨대 가시가 있는 동면쥐류) 및 스팔라시다에(예컨대 두더지, 대나무 쥐 및 조코)로부터 선택된 패밀리로부터 유래된다. 특정 구체예에서, 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 쥐(뮤리다에 패밀리), 게르빌루스 쥐, 아프리카 가시쥐 및 크레스트 쥐로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 뮤리다에 패밀리의 구성원으로부터 유래한다. 한 구체예에서, 동물은 설치류이다. 특정 구체예에서, 설치류는 마우스와 쥐로부터 선택된다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 마우스이다.

[0735] 한 구체예에서, 비-사람 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/01a로부터 선택된 C58BL 계통의 마우스이다. 다른 구체예에서, 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예컨대 129S1/SV, 129S1/Sv1m), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/ScEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2로 이루어진 군으로부터 선택된 129 계통이다(예컨대 Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, Auerbach et al. (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). 특정 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL/6 계통의 혼합이다. 다른 특정 구체예에서, 마우스는 상기언급된 129 계통끼리의 혼합, 또는 상기 언급된 BL/6 계통의 혼합이다. 특정 구체예에서, 혼합의 129 계통은 129S6(129/ScEvTac) 계통이다. 다른 구체예에서, 마우스는 BALB 계통, 예컨대 BALB/c 계통이다. 또 다른 구체예에서, 마우스는 BALB 계통과 다른 상기 언급된 계통의 혼합이다.

[0736] 한 구체예에서, 비-사람 동물은 쥐이다. 한 구체예에서, 쥐는 위스타 쥐, LEA 계통, 스프라그 도울리 계통, 피셔 계통, F344, F6 및 검은 아구터로부터 선택된다. 한 구체예에서, 쥐 계통은 위스타, LEA, 스프라그 도울리, 피셔, F344, F6 및 검은 아구터로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 또는 그 이상의 계통의 혼합이다.

[0737]

그러므로 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물은 쥐 또는 마우스이다. 한 구체예에서, 동물은 마우스이다. 그러므로, 한 구체예에서, 본원에는 그것의 게놈, 예컨대 생식선에 사람 V_L 및 J_L 유전자 서열을 포함하고 있는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하고 있는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 적어도 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 마우스는 재배열되지 않은 기능성 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 결핍되어 있다(예컨대 재배열되지 않은 기능성 V 및 J 유전자 절편 서열이 결핍되어 있다). 한 구체예에서, 히스티딘 코돈의 치환(들)이 포함된 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 V_{k1-39}/J_{k5} 또는 V_{k3-20}/J_{k5} 가변 영역이다. 한 구체예에서, J 절편 서열은 $J_{k1}, J_{k2}, J_{k3}, J_{k4}$ 및 J_{k5} 로부터 선택된다. J 절편 서열은 J_{k1} 또는 J_{k5} 이다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 CDR3 영역을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 있다. 한 구체예에서, 재배열된 가변 영역 서열이 V_{k1-39}/K_{k5} 인 경우, 히스티딘 치환(들)은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 발현되도록 디자인된다. 다른 구체예에서, 재배열된 가변 영역 서열이 V_{k3-20}/J_{k1} 서열인 경우, 히스티딘 치환(들)은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 발현되도록 디자인된다. 한 구체예에서, 치환된 히스티딘 코돈(들)을 가지는 재배열된 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 내인성 마우스 면역글로불린 불변 영역 유전자 서열(예컨대 C_k 유전자 서열)에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 마우스는 추가로 그것의 게놈, 예컨대 생식선에 사람 V_H, D_H 및 J_H 절편을 포함하는 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 사람 V_H, D_H 및 J_H 절편은 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결된다. 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(들)을 포함하는 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열과 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열은 마우스의 생식선에 포함된다.

[0738]

또한 본원에는 본원에서 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물, 예컨대 마우스를 제조하기 위한 표적화 벡터가 제공된다. 한 측면으로, 벡터의 5'과 3' 마우스 상동성 아암의 서열과 관련하여 전사 방향으로 5'에서 3' 방향으로, 5' 마우스 상동성 아암, 사람 또는 마우스 면역글로불린 프로모터, 사람 또는 마우스 리더 서열, 재배열된 사람 V_{k1-39}/J_{k5} 또는 재배열된 사람 V_{k3-20}/J_{k1} 로부터 선택되고 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 가변 영역 및 3' 마우스 상동성 아암을 포함하는 표적화 벡터가 제공된다. 한 구체예에서, 5' 및 3' 상동성 아암은 5'에 및 마우스 C_k 유전자 가까이에 존재하는 인핸서 서열과 관련하여 서열 5'에 벡터를 표적화한다. 다른 구체예에서, 표적화 벡터는 5' 마우스 상동성 아암과 이어서 양옆에 재조합 부위가 있는 선택 카세트, 사람 또는 마우스 면역글로불린 프로모터, 사람 또는 마우스 리더 서열, 재배열된 사람 V_{k1-39}/J_{k5} 또는 재배열된 사람 V_{k3-20}/J_{k1} 로부터 선택되고 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 가변 영역과, 이어서 마우스 인핸서 및 불변 영역(C_k) 서열을 포함하는 3' 마우스 상동성 아암을 포함한다.

[0739]

선택 카세트는 관심의 구성물이 통합되어 있는 세포(예컨대 ES 세포)의 선택을 용이하게 하기 위해 표적화 구성물 안에 도입된 뉴클레오티드 서열이다. 많은 적당한 선택 카세트가 해당 기술분야에 공지되어 있다. 통상적으로, 선택 카세트는 특정 항생물질(예컨대 Neo, Hyg, Pur, CM, Spec 등)의 존재하에 포지티브 선택을 가능하게 한다. 또한 선택 카세트는 양옆에 재조합 부위가 있을 수 있는데, 그것은 재조합 효소로 처리될 때 선택 카세트의 결실을 가능하게 한다. 통상적으로 사용되는 제한 부위는 Cre와 FIP 효소에 의해 인지되는 loxP와 Frt이지만, 다른 것들도 해당 기술분야에 알려져 있다.

[0740]

한 구체예에서, 프로모터는 사람 면역글로불린 가변 영역 유전자 절편 프로모터이다. 특정 구체예에서, 프로모터는 사람 V_{k3-15} 프로모터이다. 한 구체예에서, 리더 서열은 마우스 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스 리더 서열은 마우스 V_{k3-7} 리더 서열이다. 표적화 벡터의 예시적인 구체예는 도 23b와 도 29b에 제시된다.

[0741]

한 측면으로 상기에서 기술된 것과 같은 표적화 벡터가 제공되지만, 5' 마우스 상동성 아암 대신 사람 또는 마우스 프로모터가 부위-특정 재조합효소 인지 부위(SRRS)와 함께 5' 옆에 있고, 3' 마우스 상동성 아암 대신 사람 V_L 영역이 SRRS와 함께 3' 옆에 있다.

[0742]

또한 본원에는 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 마우스 또는 쥐)을 제조하는 방법이 제공된다. 한 측면으로, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조방법은 VELOCIGENE® 기술을 사용하여, 실시예에서 기술되는 것과 같이, 구성물을 ES 세포 안에 도입시키고, 표적화된 ES 세포를 VELOCIMOUSE® 기술을 사용하여 마우스 배 안에 도입시키는 표적화 벡터를 활용한다. 히스티딘 변형은 다양한

분자 생물학 기법, 예컨대 부위 특정 돌연변이생성 또는 새로운 DNA 합성을 사용하여 표적화 벡터 안에 도입될 수 있다. 유전자 표적화가 완료되면, 유전자 변형된 비-사람 동물의 ES 세포가 선별되어 관심의 외인성 뉴클레오티드 서열의 성공적인 통합 또는 외인성 폴리펩티드의 발현이 확인된다. 많은 기법들이 해당 기술분야의 숙련자들에게 공지되어 있는데, 예를 들면 (그것들에 한정되는 것은 아니지만) 서던 블롯팅, 긴 PCR, 정량적 PCT(예컨대 TAQMAN®을 사용하는 실시간 PCR), 형광 제자리 흔성화, 노던 블롯팅, 유동세포 분석, 웨스턴 분석, 면역세포 화학, 면역조직학 등을 포함한다. 한 실시예에서, 관심의 유전자 변형을 포함하고 있는 비-사람 동물(예컨대 마우스)은 문헌(Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659)에서 기술된 대립유전자 분석의 변형을 사용하여 마우스 대립유전자의 손실 및/또는 사람 대립유전자의 획득에 대해 선별됨으로써 확인될 수 있다. 유전자 변형된 동물에서 특정 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 확인하는 다른 분석은 해당 기술분야의 숙련자들에게 공지되어 있다.

[0743] 그러므로 한 구체예에서, 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법은 동물의 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열(사람 V_L 및 J_L 유전자 절편을 포함한다)로 대체하는 것을 포함하고, 이때 사람 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 CDR 영역, 예컨대 CDR3 영역을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 있다.

[0744] 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법은 동물의 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 사람 V_L 및 J_L 유전자 절편 서열을 포함하고 있는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열로 대체하는 것을 포함하는데, 이때 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 치환은 CDR 코돈에 있다. 한 구체예에서, 치환은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 CDR3 코돈(들)의 치환이다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 V_K1-39/J_K5 및 V_K3-20/J_K1로부터 선택된 사람 생식선 재배열된 경쇄 가변 영역 서열을 토대로 한다. 그러므로 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열이 V_K1-39J_K5로부터 유도된 경우, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체는 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열이 V_K3-20J_K1로부터 유도된 경우, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 대체는 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘을 발현하도록 디자인된다.

[0745] 다른 구체예에서, 본원에 기술된 비-사람 동물(즉 본원에 기술된 유전자 변형된 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하는)의 제조 방법은 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있는 비-기능성 내인성 면역글로불린 경쇄 V 및 J 절편을 결실시키거나 비-기능성으로 만들기 위하여 비-사람 동물의 게놈을 변형시키고, 게놈에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 위치시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 관심의 항원에 대해 pH 의존성 결합을 나타내는 항체에 대해 풍부해진 B 세포 집단을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 유발한다.

[0746] 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법은 상기에서 설명된 것과 같이, 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열이 사람 V_H, D_H 및 J_H 서열의 각각 또는 레퍼토리의 적어도 하나를 포함하고 있는 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열로 대체되어 있는 동물에서 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 사람 서열로 대체하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열로 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 대체하는 것과 내인성 비-사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열의 사람 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열로의 대체를 포함하고 있는 비-사람 동물을 제조하기 위하여, 경쇄 가변 영역 유전자 서열의 대체를 포함하는 동물은 중쇄 가변 영역 유전자 서열의 대체를 포함하는 동물로 사육된다.

[0747] 본 발명자들은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 변형을 포함하는 보편적 경쇄, 예컨대 사람 보편적 경쇄(예컨대 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역으로부터 유도된 경쇄)를 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 발현하는 유전자 공학처리된 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예를 들면 쥐 또는 마우스)을 제공하는데, 이때 항원-결합 단백질은 표적 항원의 pH-의존성 항원 결합을 나타낸다. 동물은 하나 또는 그 이상의 히스티딘 변형을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하도록 유전자 공학처리된다. 다양한 구체예에서, 경쇄 CDR3는 클러스터로 2, 3 또는 4 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함한다.

[0748]

한 구체예에서, 본원에는 경쇄 가변 영역 유전자 서열의 코돈 변형의 결과로서 히스티딘 잔기(들)를 발현하는 항원-특이적 항체 집단을 포함하고 표적 항원의 pH-의존성 결합을 나타내는 유전자 공학제조된 비-사람 동물이 제공된다. 한 구체예에서, 이들 동물은 항체, 예컨대 항원-특이적 항체에 대해 풍부해지고, 본원에 기술된 면역 글로불린 경쇄 가변 영역에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하지 않은 동물에서 생성된 항원-특이적 항체의 집단에 비교하여 pH-의존성 결합 특성(예컨대 산성 pH 대 중성 pH에서 감소된 해리성 반감기($t_{1/2}$))을 나타내는 B 세포 집단을 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 영역에 히스티딘 치환을 포함하는 유사한 동물에 비교하여 본원에서 기술된 유전자 공학제조된 동물에서 생성된 pH-의존성 항원 결합 특성을 나타내는 항원-특이적 항체의 풍부화는 약 2배 이상, 예컨대 약 5배 이상, 예를 들면 약 10배 이상 더 크다. 그러므로 본 발명의 유전자 변형된 동물은 개선된 항체 재순환 특성을 가지는 항체에 대해 풍부해하는데, 그런 항체는 표적-중재된 소멸을 감소시키기 위해서뿐 아니라 그러한 생체 내 생성된 항체 형식을 토대로 개발된 치료적 항원-결합 단백질의 용량 및/또는 투약 빈도를 감소시키기 위해서 바람직하다.

[0749]

그러므로 본원에는 본원에서 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질이 제공되는데, 그 항원-결합 단백질은 pH-의존성 항원 결합을 나타낸다. 한 구체예에서 항원-결합 단백질은 항체, 예컨대 항원-특이적 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 생식선 유전자 서열에서 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈이 히스티딘 코돈에 대해 치환되어 있고, 항체가 그것의 발현된 사람 경쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유하고 있는 사람 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 절편의 재배열로부터 유도된 사람 경쇄 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열로부터 유도된 사람 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 이때 단일한 재배열된 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고, 항체는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 비-히스티딘 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 항체는 사람 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 또는 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하는데, 사람 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 또는 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 유전자 서열은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고, 항체는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유한다. 어떤 구체예에서, 항체는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 모든 또는 실질적으로 모든 히스티딘 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 치환은 경쇄 가변 영역 유전자 서열의 CDR3를 코드화하는 뉴클레오티드 서열에서 세 개의 비-히스티딘 코돈의 세 개의 히스티딘 코돈으로의 치환이고, 항체는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 세 개의 모든 히스티딘 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 치환은 경쇄 가변 영역 유전자 서열의 CDR3를 코드화하는 뉴클레오티드 서열에서 네 개의 비-히스티딘 코돈의 세 개의 히스티딘 코돈으로의 치환이고, 항체는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 세 개 또는 네 개의 히스티딘 치환을 보유한다.

[0750]

한 구체예에서, 항체의 경쇄는 추가로 비-사람 경쇄 불변 영역 아미노산 서열, 예컨대 내인성 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 또한 본원에서 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항체, 예컨대 항원-특이적 항체는 사람 중쇄 V, D 및 J 절편의 재배열로부터 유도된 사람 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 사람 중쇄 V, D 및 J 절편은 내인성 비-사람 중쇄 유전자좌에 존재하는 사람 중쇄 절편의 레퍼토리, 예컨대 적어도 하나의 기능성 V, 적어도 하나의 기능성 D 및 적어도 하나의 기능성 J 절편, 예를 들면 거의 완전한 레퍼토리의 기능성 사람 V, D 및 J 절편으로부터 선택될 수 있다. 사람 중쇄 가변 절편의 예시적인 가능한 재배열은 IMGT 데이터베이스의 기능성 사람 V, D 및 J 절편의 목록으로부터, 및 미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192309 및 2013/0045492로부터 얻을 수 있다. 나아가 한 구체예에서, 항체의 중쇄는 비-사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열, 예컨대 내인성 비-사람 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 비-사람 중쇄 불변 영역은 C_H1, 헌지, C_H2 및 C_H3 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 IgG, IgE, IgD, IgM 또는 IgA 아이소타입이다.

[0751]

그러므로, 한 구체예에서, 본원에는 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 결합 단백질이 제공되며, 그 결합 단백질은 (a) 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 사람 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 재배열로부터 유도된 경쇄 가변 도메인, 이때 경쇄는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유하고, 및 (b) 비-사람, 예컨대 마우스 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 역 키메릭 경쇄를 포함하는데, 이때 경쇄는 (a) 동물에 존재하는 사람 V, D 및 J 절편의 레퍼토리로부터 선택된 사람 V, D 및 J 절편의 재배열로부터 유도된 중쇄 가변 도메인 및 (b) 비-사람, 예컨대 마우스 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 역 키메릭 중쇄와 결합된다. 한 구체예에서, 사람 V, D 및 J 절편의 레퍼토리는 적어도 하나의 기능성 V, 적어도 하나의 기능성 D 및 적어도 하나의 기능성 J 절편, 예컨대 기능성 사람 V, D 및 J 절편의 거의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 불변 도메인은 내인성 중쇄 및 경쇄 불변 영역이다. 한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 체세포성 돌연변이된 도메인이다. 한 구체예에서, 체

세포성 돌연변이된 경쇄 도메인은 생식선 서열 안에 도입된 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유한다. 어떤 구체예에서, 체세포성 돌연변이된 경쇄 도메인은 생식선 서열 안에 도입된 모든 또는 실질적으로 모든 히스티딘 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 pH-의존성 항원 결합 특성을 나타낸다.

[0752] 다른 구체예에서, 본원에는 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 결합 단백질이 제공되며, 그 결합 단백질은 (a) 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 사람 V_{K3-20J} k₁ 재배열로부터 유도된 경쇄 가변 도메인, 이때 경쇄는 그것의 발현된 경쇄 가변 도메인에 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유하고, 및 (b) 비-사람, 예컨대 마우스 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 역 키메릭 경쇄를 포함하는데, 이때 경쇄는 (a) 동물에 존재하는 사람 V, D 및 J 절편의 레퍼토리로부터 선택된 사람 V, D 및 J 절편의 재배열로부터 유도된 중쇄 가변 도메인 및 (b) 비-사람, 예컨대 마우스 중쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 역 키메릭 중쇄와 결합된다. 한 구체예에서, 사람 V, D 및 J 절편의 레퍼토리는 적어도 하나의 기능성 V, 적어도 하나의 기능성 D 및 적어도 하나의 기능성 J 절편, 예컨대 기능성 사람 V, D 및 J 절편의 거의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 불변 도메인은 내인성 중쇄 및 경쇄 불변 영역이다. 한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 체세포성 돌연변이된 도메인이다. 한 구체예에서, 체세포성 돌연변이된 경쇄 도메인은 생식선 서열 안에 도입된 적어도 하나의 히스티딘 치환을 보유한다. 어떤 구체예에서, 체세포성 돌연변이된 경쇄 도메인은 생식선 서열 안에 도입된 모든 또는 실질적으로 모든 히스티딘 치환을 보유한다. 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 pH-의존성 항원 결합 특성을 나타낸다.

[0753] 한 구체예에서, 본원에는 또한 그것의 생식선에 히스티딘-변형된 사람 경쇄 가변 영역 서열, 예컨대 본원에 기술된 히스티딘-변형된 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열을 포함하고 본원에 기술된 항원-결합 단백질을 발현하는, 본원에 기술된 유전자 변형된 동물의 B 세포가 제공된다. 한 구체예에서, B 세포에서 발현된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 생식선에 도입된 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 보유하고, pH-의존성 항원-결합 특성을 나타낸다. 어떤 구체예에서, B 세포에서 발현된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 생식선 안에 도입된 모든 또는 실질적으로 모든 히스티딘 잔기를 보유하고, pH-의존성 항원-결합 특성을 나타낸다.

[0754] 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자-변형된 비-사람 동물은 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열, 예컨대 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환(또는 히스티딘 코돈의 생식선 서열 안으로의 첨가)을 포함하는 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열(예컨대 V_{K1-39J} k₅ 또는 V_{K3-20J} k₁ 서열)을 포함한다. 이를 첨가 또는 치환은 그것들의 항원에 대해 pH 의존성 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질에 대해 풍부해진 B 세포 집단을 포함하는 비-사람 동물을 유발한다. 한 구체예에서, 항원 자극에 대한 반응으로 본원에 기술된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 pH 의존성 항원 결합을 나타내는 한편, 혈액과 같은 체액의 중성 pH, 예컨대 약 7.0 내지 약 8.0의 pH, 예를 들면 약 7.0 내지 약 7.4의 pH, 예컨대 약 7.2 내지 약 7.4의 pH에서 항원에 대해 고친화성을 나타낸다. 한 구체예에서, 중성 pH에서 해리 상수(K_D)로서 표시되는 항원-결합 단백질의 그것의 항원에 대한 친화성은 $10^{-6} M$ 미만, 예컨대 $10^{-8} M$ 미만, 예컨대 $10^{-9} M$ 미만, 예컨대 $10^{-10} M$ 미만, 예컨대 $10^{-11} M$ 미만, 예컨대 $10^{-12} M$ 미만이다.

[0755] 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 중성 pH에 비교하여 산성 pH(예컨대 6.0 또는 그 이하의 pH, 예컨대 약 5.0 내지 약 6.0의 pH, 약 5.75 내지 약 6.0의 pH, 예컨대 엔도솜 또는 리소좀 구획의 pH)에서 그것의 항원에 대해 감소된 결합을 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 산성 pH에서 항원에 해한 결합을 나타내지 않는 반면, 중성 pH에서는 항원에 대한 결합을 보유한다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질은 중성 pH에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배의 해리성 반감기($t_{1/2}$)의 감소를 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 발현된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 37°C에서 약 2분 또는 그 이하의 $t_{1/2}$ 를 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 발현된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 37°C에서 약 1분 또는 그 이하의 $t_{1/2}$ 를 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 발현된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 25°C에서 약 2분 또는 그 이하의 $t_{1/2}$ 를 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 발현된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 25°C에서 약 1분 또는 그 이하의 $t_{1/2}$ 를 나타낸다.

- [0756] 동역학적 매개변수, 예컨대 평형 해리 상수(K_D) 및 해리성 반감기($t_{1/2}$)는 다음 식과 같이 동역학 속도 상수로부터 계산될 수 있다: $K_D(M) = k_d/k_a$; 및 $t_{1/2}(\text{분}) = \ln 2 / (60 * k_d)$.
- [0757] 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 FcRn 분자에 대해 증가된 결합을 나타낸다. 상기에서 기술된 것과 같이, FcRn은 산성 pH에서 면역글로불린에 결합할 수 있고 그것들을 표면으로 되돌려보낼 수 있는, 엔도솜 구획 내부에 존재하는 수용체이다. 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 항체 분자를 선별하는 것은 다음의 세 가지 유익한 매개변수를 가지는 항체에 대한 독특한 선택의 기회를 제공한다: 항원에 대한 높은 친화성, pH-의존성 항원 결합(산성 pH에서는 보다 더 약하게 항원에 결합한다) 및 FcRn에 대한 증가된 결합.
- [0758] 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물은, 생성되고, 치료제 안에 재구성될 때, 그것의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열에 히스티딘 변형(들)을 포함하지 않은 비-사람 동물에서 동일한 항원에 대한 반응으로 생성된 동등한 B 세포 집단을 능가하는 치료적 용량으로 대상에게 투여될 때 증가된 혈청 반감기를 나타내는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체에 대해 풍부해지는, 항원에 대한 반응인 B 세포 집단을 포함한다. 그러므로 한 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 관심의 항원에 대한 반응으로 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 치료제 안에 재구성될 때, 그것의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열에 히스티딘 변형(들)을 포함하지 않는 비-사람 동물에서 동일한 항원에 대한 반응으로 생성된 항원-결합 단백질(치료제 안에 재구성되고 동일한 치료 용량으로 투여될 때)의 혈청 반감기를 능가하는 치료제 용량으로 대상에게 투여될 때 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 혈청 반감기의 증가는 약 2배, 예컨대 약 5배, 예컨대 약 10배, 예컨대 약 15배, 예컨대 약 20배 또는 그 이상이다.
- [0759] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같이 비-사람으로부터 유도된 다능성, 유도된 다능성 또는 분화전능성 세포가 제공된다. 특정 구체예에서, 세포는 배 줄기(ES) 세포이다.
- [0760] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물로부터 유도된 조직이 제공된다. 한 구체예에서, 조직은 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물의 비장, 림프절 또는 골수로부터 유도된다.
- [0761] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물로부터 유도된 핵이 제공된다. 한 구체예에서, 핵은 B 세포가 아닌 2배체 세포로부터 유래한다.
- [0762] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같이 비-사람 동물(예컨대 설치류, 예컨대 마우스 또는 쥐)로부터 분리된 비-사람 세포가 제공된다. 한 구체예에서, 세포는 ES 세포이다. 한 구체예에서, 세포는 림프구이다. 한 구체예에서, 림프구는 B 세포이다. 한 구체예에서, B 세포는 사람 유전자 절편으로부터 유도된 가변 도메인과; 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 재배열된 사람 V_k 1-39/J 서열, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 재배열된 사람 V_k 3-20/J 서열 및 그것들의 조합으로부터 유도된 경쇄를 포함하고 추가로 히스티딘에 대해 생식선에 코드화된 적어도 하나의 아미노산의 치환을 포함하는 키메릭 중쇄를 발현하며, 이때 중쇄 가변 도메인은 비-사람 불변 영역에 융합되고 경쇄 가변 도메인은 비-사람 또는 사람 불변 영역에 융합된다.
- [0763] 한 측면으로, 하이브리도마가 제공되는데, 그 하이브리도마는 본원에서 기술된 것과 같은 비-사람 동물의 B 세포로 제조된다. 특정 구체예에서, B 세포는 관심의 에피토프를 포함하는 면역원으로 면역된 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유래하며, B 세포는 관심의 에피토프에 결합하는 결합 단백질을 발현하고, 결합 단백질은 체세포성 돌연변이된 사람 가변 중쇄 도메인과 마우스 C_H를 가지며, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 재배열된 사람 V_k 1-39J κ 5 또는 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 재배열된 사람 V_k 3-20J κ 1로부터 유도된 사람 가변 경쇄 도메인 및 마우스 C_L을 가지고, 이때 사람 경쇄 도메인은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함한다.
- [0764] 또한 본원에 기술된 비-사람 동물에서 생성된 항원-결합 단백질을 발현하는 세포가 제공된다. 한 구체예에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예컨대 PERC.6TM 세포)로부터 선택된다.
- [0765] 한 측면으로, 비-사람 배(embryo)가 제공되는데, 그 배는 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물로부터 유도된 공여 ES 세포를 포함한다.
- [0766] 본원에 기술된 비-사람 동물은 CDR3에 히스티딘을 가지는 항체를 발현하는 B 세포를 생성하기에 유용하다. 히스

티딘을 CDR3에 넣는 동물은 일반적으로 항체의 제조에 유용하고, 특히 중성 pH 주변에서 충분한 친화성으로 표적에 결합하지만 산성 pH에서는 동일한 표적에 결합하지 않거나 더 약하게 결합하는 항체를 개발하는 데에 유용하다.

[0767] 비-사람 동물은 예컨대 CDR3에 히스티딘을 포함하는 사람 면역글로불린 가변 도메인에 의해 그것의 표적에 결합하는 사람 치료적 결합 단백질을 제조하기 위해 사용될 수 있는 항체의 가변 영역을 생성하는 데 유용하다. 더 낮은 pH에서의 변경된 결합은 어떤 상황에서는 더 빠른 전환을 허용하는데, 왜냐하면 치료제는 세포 표면의 표적에 결합하고, 엔도솜에 내재화되며, 더 쉽게 또는 더 신속하게 엔도솜의 표적으로부터 해리되어서, 치료제가 재순환되어 표적의 또 다른 문자(예컨대 다른 세포 상의 또는 동일한 세포 상의)에 결합할 수 있게 되기 때문이다. 어떤 상황에서는 이것은 더 낮은 용량으로 치료제를 투약하거나 덜 빈번하게 치료제를 투약하는 능력을 유발할 것이다. 이것은 특히 안전성 또는 독성의 이유로 빈번하게 투여하거나, 또는 특정 단위용량 이상으로 투여하는 것이 바람직하지 않은 경우에 유용하다. 그 결과로서, 항체 치료제의 혈청 반감기는 대상에게 투여될 때 증가될 것이다.

[0768] 비-사람 동물, 예컨대 설치류, 예컨대 마우스 또는 쥐는 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 그 안에 포함하는 CDR3를 가지는 항체 가변 영역을 나타내는 동물에서 B 세포의 수를 증가시키기 위한 방법에 유용하다. 비-사람 동물은 pH-의존성 항원 결합을 나타낼 항체 서열을 생성하는 데 유용하다. 비-사람 동물은 단일 면역화로부터 유발되는 항체 서열의 더 많은 수를 생성하는 데 유용한데, 이때 항체는 pH-의존성 항원 결합을 나타낼 것이다.

항원-결합 단백질 및 그것의 제조 방법

[0770] 한 측면으로, 본원에는 또한 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물로부터, 해당 기술분야에 사용된 표준 방법들을 사용하여, pH-의존성 항원 결합을 나타내는 사람 항원-결합 단백질, 예컨대 항체의 제조 방법이 제공된다.

[0771] 항체를 제조하는 여러 가지 기법들이 기술되어 있다. 예를 들어 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같이 마우스에서 키메릭 항체가 제조된다. 항체는 면역된 마우스의 B 세포로부터 직접 분리되거나(예컨대 U.S. 2007/0280945A1) 및/또는 면역된 마우스의 B 세포는 하이브리도마를 제조하기 위하여 사용될 수 있다(Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497). 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물로부터의 항체(사람 중쇄 및/또는 경쇄)를 코드화하는 DNA는 종래 기법들을 사용하여 쉽게 분리되고 서열화된다. 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물로부터 유도된 하이브리도마 및/또는 B 세포는 그런 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 분리되면 DNA는 발현 벡터에 도입될 수 있고, 그런 다음 그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생성하는 숙주 세포 안에 형질전환되어 재조합 숙주 세포에서 단클론성 항체의 합성을 얻을 수 있다. DNA는 또한 예를 들면 비-사람 서열 대신 사람 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대해 코딩 서열을 치환함으로써 변형될 수 있다. 그러므로 일단 원하는 특징, 예컨대 친화성, 에피토프, pH-의존성 항원 결합 등을 가지는 항체의 핵산 서열이 결정되면, 비-사람 불변 영역 유전자 서열은 원하는 사람 불변 영역 서열로 대체되어 비-IgM 아이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 함유하는 전체 사람 항체가 생성된다.

[0772] 그러므로 한 구체예에서, 본원에는 본원에 기술된 것과 같은 비-사람 동물(예컨대 마우스)을 제조하고, 마우스를 관심의 항원으로 면역시켜서 비-사람 동물이 항원에 대한 면역 반응을 시작하도록 허용하며, 비-사람 동물에서 pH 의존성 항원 결합 특성을 나타내는, 예컨대 중성 pH에서보다 산성 pH에서 더 약한 결합을 나타내는 항원-특이적 항체를 선택하는 것으로 이루어지는, pH-의존성 항원 결합 특성을 나타내는 항체의 제조 방법이 제공된다.

[0773] 또한 본원에는 다중-특이성 항원 결합 단백질, 예컨대 이중특이성 항원-결합 단백질의 제조 방법이 제공된다. 이것들은 높은 친화성으로 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 문자이다. 본 발명의 장점은 각각이 단일 경쇄에 결합할 적당하게 높은 결합(예컨대 친화성 성숙된) 중쇄 면역글로불린 사슬을 선택하는 능력을 포함한다. 또한 본 발명의 장점은 pH-의존성 항원 결합을 나타내는 다중-특이성, 예컨대 이중특이성 항원-결합 단백질을 생성하는 능력을 포함한다.

[0774] 이중특이성 항체의 이중 성질(즉 하나의 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 대해 특이적이거나 하나 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원-결합 도메인을 함유할 수 있다, 예컨대 Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244) 때문에, 이중특이성 항체는 치료 용도에 많은 유용한 장점을 제공한다. 예를 들어 이중특이성 항체는 재지시된 세포독성(예컨대 종양 세포를 사멸하기 위한)에 대해, 백신 보조제로서, 혈전에 혈전 용해제를 전달하기 위하여, 표적 부위(예컨대 종양)에서 효소 활성화된 선구

약물을 전환시키기 위하여, 감염성 질병을 치료하기 위하여, 세포표면 수용체에 면역 복합체를 표적화하기 위하여, 또는 면역독소를 종양 세포에 전달하기 위하여 사용될 수 있다.

[0775] 본원에 기술된 이중특이성 항체는 또한 여러 치료적 및 비-치료적 및/또는 진단적 분석 방법, 예컨대 효소 면역 분석, 2-부위 면역분석, 여러 질병(예컨대 암)의 시험관 내 또는 생체 내 면역진단, 경합성 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석에 사용될 수 있다. 이중특이성 항체에 대한 다른 용도들은 당업자들에게 드러날 것이다.

[0776] 재조합 세포 배양물로부터 이중특이성 항체 단편을 제조하기 위한 여러 가지 기법들이 보고되어 있다. 그러나 이중특이성 결합 단백질의 합성 및 발현은 부분적으로는 두 개의 상이한 중쇄와 결합하고 그것들을 발현할 수 있는 적당한 경쇄를 확인하는 것과 관련된 문제들로 인해, 그리고 부분적으로는 분리 문제로 인해 문제가 되어 왔다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 성분들의 안정성/상호작용을 증가시킴으로써 관례적인 면역글로불린 구조를 유지하기 위해 특수한 변형(들)을 필요로 하지 않는 전체 길이의 이중특이성 항체의 장점을 제공한다. 다양한 구체예에서, 그런 변형(들)은 번잡하고 이중특이성 항체 기법의 개발 및 사람 질병에 대한 치료에 사용되는 그것들의 잠재적 사용에 대한 장애물로 작용하는 것으로 증명되었다. 그러므로 다양한 구체예에서, 다중 특이성의 첨가된 특성을 가지는 천연 면역글로불린 구조(즉 전체 길이)를 제공하는 것을 통하여 전체 길이의 이중특이성 항체는 이전의 이중특이성 단편들에 결핍되어 있던 그것들의 결정적인 이펙터 기능을 유지하고, 나아가 더 긴 반감기의 중요한 약물동력학적 매개변수를 증명하는 치료제를 제공한다.

[0777] 본원에 기술된 방법 및 조성물은 유전자 변형된 마우스가 그렇지 않은 경우 천연 과정들을 통하여, 하나 이상의 중쇄, 이를테면 체세포성 돌연변이된(예컨대 친화성 성숙된) 중쇄를 포함한 중쇄와 결합하여 그것을 발현할 수 있는 적당한 경쇄를 선택하는 것을 가능하게 하는데, 이때 경쇄는 추가로 그것의 pH-의존성 결합 특성을 항원-결합 단백질에 부여한다. 역 키메릭 중쇄를 가지는 친화성 성숙된 항체(즉 사람 가변 및 마우스 불변)를 발현하는, 본원에 기술된 것과 같은 면역된 마우스의 적당한 B 세포로부터의 사람 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 적당한 사람 불변 영역 유전자 서열(예컨대 사람 IgG1)을 가지는 발현 벡터에서 확인되고 한 프레임으로(in frame) 클론될 수 있다. 그러한 두 개의 구성물, 즉 각각의 구성물이 상이한 에피토프에 결합하는 사람 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 구성물이 제조될 수 있다. 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는, 사람 경쇄 가변 영역(예컨대 사람 V_K1-39J_K5 또는 사람 V_K3-20J_K1) 중 하나는 적당한 사람 경쇄 불변 영역 유전자(예컨대 사람 κ 불변 유전자)에 한 프레임으로 융합될 수 있다. 이들 세 개의 전체 사람 중쇄 및 경쇄 구성물은 적당한 세포에 발현을 위해 도입될 수 있다. 세포는 두 개의 주요 종을 발현할 것이다: 동일한 경쇄를 가지는 단일이량체 중쇄, 및 동일한 경쇄를 가지는 이종이량체 중쇄. 이들 주요 종의 용이한 분리를 가능하게 하기 위해 중쇄 중 하나는 단백질 A-결합 결정기를 생략하도록 변형되어, 그 결과 이종이량체 결합 단백질과는 다른 단일이량체 결합 단백질의 친화성이 유발된다. 이런 문제를 해결하는 조성물 및 방법은 2010년 6월 25일에 USSN 12/832,838로 출원되고, "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format"의 제목으로 공개된 US 2010/0331527A1에 기술되어 있다. 일단 동일한 경쇄를 가지는 이종이량체 중쇄를 포함하는 종이 선택되면, 이 이중특이성 항원 결합 단백질은 그것의 pH-의존성 항원 결합 특성의 보유를 확인하기 위해 선별될 수 있다.

[0778] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 에피토프-결합 단백질이 제공되는데, 이때 사람 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열은 관심의 에피토프를 포함하는 항원으로 면역된 본원에 기술된 동물로부터 유도된다.

[0779] 한 구체예에서, 첫 번째 및 두 번째 폴리펩티드를 포함하는 에피토프-결합 단백질이 제공되는데, 첫 번째 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단쪽으로 첫 번째 에피토프에 선택적으로 결합하는 첫 번째 에피토프-결합 영역과 이어서 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 첫 번째 C_H3 영역을 포함하는 불변 영역을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단 쪽으로 두 번째 에피토프에 선택적으로 결합하는 두 번째 에피토프-결합 영역과 이어서 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 사람 IgG의 두 번째 C_H3 영역을 포함하는 불변 영역을 포함하며, 이때 두 번째 C_H3 영역은 단백질 A에 대한 두 번째 C_H3 도메인의 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함한다. 다양한 그런 변형은 예컨대 미국 출원 공개 번호 2010/0331527 및 2011/0195454에 기술되어 있다.

[0780] 하나 이상의 에피토프에 결합하고 pH-의존성 에피토프 결합 특성을 나타내는 에피토프-결합 단백질을 제조하기 위한 한 가지 방법은 본 발명에 따르는 첫 번째 마우스를 관심의 첫 번째 에피토프를 포함하는 항원으로 면역시키는 것이고, 이때 마우스는 (1) 경쇄를 재배열하고 형성할 수 있는 내인성 마우스 경쇄 가변 영역 유전자 서열

을 함유하지 않는 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌를 함유하며, 그 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌는 마우스 내인성 경쇄 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역이고, 재배열된 사람 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 사람 V_k 1-39J_k 5 및 사람 V_k 3-20J_k 1으로부터 선택되며, (2) 전체적으로 또는 부분적으로 사람 V_H 유전자 절편으로 대체된 내인성 마우스 V_H 유전자 절편을 포함함으로써 마우스에 의해 생성된 면역글로불린 중쇄가 단독으로 또는 실질적으로 사람 가변 도메인과 마우스 불변 도메인을 포함하는 중쇄가 된다. 그런 마우스는 면역될 때 두 개의 사람 경쇄 가변 도메인 중 단지 하나(예컨대 사람 V_k 1-39J_k 5 또는 사람 V_k 3-20J_k 1 중 하나, 예컨대 적어도 하나의 아미노산의 히스티딘으로의 치환을 포함하고 있음)를 포함하는 역 키메릭 항체를 생성할 것이다. 통상적으로, 생식선 서열 안에 도입된 치환된 히스티딘 잔기의 적어도 일부는 역 키메릭 항체에 보유될 것이다. 일단 B 세포가 관심의 에피토프에 결합하고 pH-의존성 항원 결합 특성을 나타내는 항체를 발현하는 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 것으로 확인되면, 중쇄 가변 영역(몇 임의로, 경쇄 가변 영역)의 뉴클레오티드 서열은 회복되고(예컨대 PCR에 의해), 발현 벡터 구성물 안에 적당한 사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열과 한 프레임으로 클론될 수 있다. 이 과정은 두 번째 에피토프에 결합하는 두 번째 중쇄 가변 도메인을 확인하기 위해 반복될 수 있고, 두 번째 중쇄 가변 영역 유전자 서열은 회복되어 발현 벡터 안에 두 번째의 적당한 사람 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열과 한 프레임으로 클론될 수 있다. 불변 영역 유전자 서열에 의해 코드화된 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린 불변 도메인은 동일하거나 상이한 아이소타입일 수 있고, 면역글로불린 불변 도메인 중 하나(그러나 다른 것은 아님)는 본원에 또는 US 2010/0331527A1에 기술된 것과 같이 변형될 수 있으며, 에피토프-결합 단백질은 적당한 세포에서 발현될 수 있고, US 2010/0331527A1에 기술된 것과 같이 동종이량체 에피토프-결합 단백질에 비교하여 그것의 단백질 A에 대한 상이한 친화성을 토대로 분리될 수 있다.

[0781] 그러므로 다양한 구체예에서, DNA의 분리와 원하는 특이성/친화성을 가지는 첫 번째 및 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 첫 번째 및 두 번째 핵산 서열, 및 사람 경쇄 도메인(본원에 기술된 것과 같이 비-사람 동물로부터 분리된 생식선 재배열된 서열 또는 경쇄 서열)을 코드화하고 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 세 번째 핵산 서열의 선택에 이어서, 해당 기술분야에서 광범위하게 사용되는 재조합 기법을 사용하여 이중특이성 항체를 형성하기 위하여 분자들을 코드화하는 세 개의 핵산 서열이 발현된다. 때로 선택된 발현 시스템은 포유류 세포 발현 벡터 및 숙주를 포함하여서 이중특이성 항체가 적절하게 글리코실화된다(예컨대 글리코실화된 항체 도메인을 포함하는 이중특이성 항체의 경우). 그러나 분자는 또한 원핵 발현 시스템에서도 생성될 수 있다. 정상적으로, 숙주 세포는 첫 번째 사람 중쇄 가변 도메인, 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인 둘 다와, 사람 경쇄 도메인을 단일 벡터 또는 독립적인 벡터 상에서 코드화하는 DNA로 형질전환될 것이다. 그러나 독립적인 발현 시스템에서 첫 번째 사람 중쇄 가변 도메인, 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인 및 사람 경쇄 도메인(이중특이성 항체 성분들)을 발현하고, 시험관 내에서 발현된 폴리펩티드들을 결합시키는 것이 가능하다. 다양한 구체예에서, 사람 경쇄 도메인은 예컨대 CDR 코돈에 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환에 대해 생식선 서열로부터 유도된다. 다양한 구체예에서, 사람 경쇄 도메인은 경쇄 도메인의 경쇄 가변 서열 내에 하나 이하의, 2 이하의, 3 이하의, 4 이하의 또는 5 이하의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 어떤 구체예에서, 체세포성 과돌연변이는 경쇄 가변 영역의 생식선 서열 안에 도입된 적어도 하나의 히스티딘 잔기의 존재를 변경시키지 않는다.

[0782] 다양한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 두 개의 중쇄 및 단일 사람 경쇄를 코드화하는 핵산(들)(예컨대 cDNA 또는 게놈 DNA)은 추가의 클로닝(DNA의 증폭) 및/또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 안에 삽입된다. 많은 벡터가 활용가능하고, 일반적으로는 그것들에 제한되는 것은 아니지만, 하나 또는 그 이상의 다음의 것들을 포함한다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 또는 그 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열. 각각의 성분은 개별적으로 선택되거나 또는 선택된 숙주 세포 또는 실험적으로 결정된 다른 기준을 토대로 선택될 수 있다. 각 성분의 여러 실례들은 해당 기술분야에 공지되어 있다.

[0783] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인지되고 이중특이성 항체의 각각의 또는 모든 성분을 코드화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 강력한 숙주 세포에 의해 인지되는 대다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 이들 프로모터는 공급원 DNA로부터 제한 효소 소화에 의해 프로모터를 제거하고 분리된 프로모터 서열을 벡터에 삽입함으로써 이중특이성 항체-코드화 DNA에 작동가능하게 연결된다.

[0784] 진핵 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 사람 또는 다른 다세포 유기체로부터의 핵화 세포)에서 사용된 발현 벡터는 또한 전사 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 수 있다. 그런 서열은 통상적으로 진핵

또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및, 임의로 3' 미번역 영역으로부터 활용될 수 있다. 이들 영역은 이중특이성 항체 성분을 코드화하는 mRNA의 미번역 부분에 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 다양한 구체예에 적당한 발현 벡터로는 이중특이성 항체를 코드화하는 DNA의 포유류 세포에서의 일과성 발현을 제공하는 것들을 포함한다. 일반적으로 일과성 발현은 숙주 세포에서 효과적으로 복제할 수 있는 발현 벡터의 사용을 포함함으로써, 숙주 세포가 발현 벡터의 많은 복사물을 축적하고, 계속해서 발현 벡터에 의해 코드화된 원하는 폴리펩티드가 고수준으로 합성된다. 적당한 발현 벡터와 숙주 세포를 포함하는 일과성 발현 시스템은 크론된 DNA에 의해 코드화된 폴리펩티드의 편리한 포지티브 확인뿐만 아니라, 첫 번째 또는 두 번째 사람 중쇄 가변 도메인의 동종이량체를 가지는 원래의 항체에 비교하여, 원하는 결합 특이성/친화성 또는 원하는 젤 이동 특징을 가지는 이중특이성 항체의 신속한 선별을 가능하게 한다.

[0785] 다양한 구체예에서, 일단 이중특이성 항체의 성분을 코드화하는 DNA가 상기에서 기술된 것과 같은 원하는 벡터(들)에 조립되면, 그것들은 발현 및 회수를 위해 적당한 숙주 세포 안에 도입된다. 숙주세포를 형질전환시키는 것은 선택된 숙주 세포에 대해 적절한 해당 기술분야에서 공지되어 있는 표준 기법들(예컨대 일렉트로포레이션, 핵 마이크로주사, 박테리아 원형질의 무상세포, 또는 다가 양이온, 예컨대 폴리브렌, 폴리오르니틴과의 융합 등)을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0786] 다양한 구체예에서, 성분들을 함유하는 발현 벡터와 가장 잘 맞고 이중특이성 항체 종의 가장 효과적이고 선호 할 수 있는 생성을 허용하는 숙주 세포가 선택된다. 발현을 위한 예시적인 숙주 세포로는 원핵 및 진핵 세포(단일 세포 또는 다중 세포), 박테리아 세포(예컨대 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예컨대 맥주효모균, S. 품베, P. 파스토리스, P. 메탄올리카 등), 식물 세포, 곤충 세포(예컨대 SF-9, SF-21, 배클로바이러스-감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니 등), 비-사람 동물 세포, 사람 세포 또는 세포 융합물, 예컨대 하이브리도마 또는 콰드로마를 포함한다. 다양한 구체예에서, 세포는 사람, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포이다. 다양한 구체예에서, 세포는 CHO(예컨대 CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예컨대 COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예컨대 HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB8065, HL-60(예컨대 BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포 및 상기 언급된 세포로부터 유도된 셀라인으로부터 선택된 진핵 세포이다. 다양한 구체예에서, 세포는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자를 포함하는데, 예를 들면바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예컨대 PER.C6TM 세포)를 포함한다.

[0787] 이중특이성 항체를 생성하기 위해 사용된 포유류 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 활용 가능한 배지, 예컨대 Ham's F10(Sigma), 최소 필수 배지((MEM), Sigma), RPMI-1640(Sigma) 및 둘레코 변형 이글스 배지((DMEM), Sigma)가 숙주 세포의 배양에 적당하다. 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염(예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제(예컨대 HEPES), 뉴클레오시드(예컨대 아데노신 및 싸이미딘), 항생물질(예컨대 GENTAMYCINTM), 미량 원소(통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 규정됨), 및 글루코스 또는 동등한 에너지 공급원이 첨가될 수 있다. 어떠한 다른 첨가물이 또한 해당 기술분야의 숙련자들에게 공지되어 있는 것과 같이 적절한 농도로 포함될 수 있다. 다양한 구체예에서, 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 앞서 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 사용된 것들이고, 당업자들에게 명백해질 것이다.

[0788] 이중특이성 항체는 배양 배지로부터 분비된 폴리펩티드로부터 회수될 수 있지만, 또한 분비 신호 없이 직접 생성될 때 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 만약 이중특이성 항체가 막-결합된다면, 적당한 계면활성제 용액(예컨대 트리톤-X 100)을 사용하여 막으로부터 방출될 수 있다.

[0789] 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하는 V_k1-39J_k5 및 V_k3-20J_k1 서열로부터 선택된 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열로부터 유도된 두 개의 사람 중쇄 및 단일한 사람 경쇄를 포함하고 있는 이중특이성 항체는 분리된 후에 그것의 항원 중 하나, 바람직하게는 둘 다에 대한 pH 의존성 결합을 나타내는 능력에 대해 선별된다. 중성 및 산성 pH에서 이중특이성 항체의 그것의 항원에 상이하게 결합하는 능력(예컨대 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 감소된 t_{1/2}를 증명하는 능력)은 해당 기술분야에서 활용되고 다음의 실시예에서 기술되는 다양한 기법, 예컨대 BIACORETM 분석에 의해 측정될 수 있다.

pH-의존성 항원 결합을 가지는 항원-결합 단백질의 추가의 제조 방법

[0791] 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물에서 pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질을 제조하

는 다양한 방법이 제공된다. 또한 시험관 내에서 pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원 결합 단백질의 제조 방법에 제공된다. 그런 방법은 유전자 변형된 비-사람 동물에서 생체 내에서 항원-결합 단백질의 다양한 성분을 생성시키고, 그런 다음 그것들을 변형시킨 후 포유류 세포 배양물에서 발현된 단백질 복합체로서 유기체 외부에서 시험관 내로 재조립하는 것을 포함할 수 있다.

[0792] 한 구체예에서, pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질의 제조 방법은 경쇄 가변 영역 V 및 J 절편의 제한된 레퍼토리, 예컨대 사람 경쇄 가변 영역 V 및 J 절편을 포함하는 마우스, "보편적 경쇄" 또는 "통상적인 경쇄" 마우스("ULC" 마우스), 예컨대 미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 및 2013/0045492에 기술되어 있는 마우스에서 생성된 항원-결합 단백질 서열, 예컨대 항체 서열을 활용한다. 한 구체예에서, pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질의 제조 방법은 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하고 있는 마우스에서 생성된 항원 결합 단백질 서열을 활용한다. 한 구체예에서, 방법은 사람 V_k 1-39J_k 5 및 사람 V_k 3-20J_k 1로부터 선택된 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하고 있는 마우스에서 생성된 항원 결합 단백질을 활용한다.

[0793] 한 구체예에서, pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체의 제조 방법은 관심의 항원에 결합하는(예컨대 원하는 친화성으로 관심의 항원에 결합하는) 첫 번째 항체를 선택하고, 첫 번째 항체의 면역글로불린 경쇄 뉴클레오티드 서열을 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하도록 변형시키며, 첫 번째 항체의 면역글로불린 중쇄 및 변형된 면역글로불린 경쇄를 세포에서 발현시키고, 중성 pH에서 관심의 항원에 대한 결합을 보유하고(예컨대 관심의 항원에 대한 원하는 친화성을 보유하고) 산성 pH에서 관심의 항원에 대해 감소된 결합을 나타내는, 세포에서 발현된 두 번째 항체를 선택하는 것을 포함한다.

[0794] 한 구체예에서, pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체의 제조 방법은, 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 가지는 면역글로불린 경쇄를 포함하며, 항체가 관심의 항원에 결합하는(예컨대 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는) 항체로부터 면역글로불린 중쇄를 선택하고(예컨대 비-사람 동물, 예를 들면 마우스, 예컨대 ULC 마우스로부터 얻고); 면역글로불린 경쇄의 핵산 서열을 변형시켜서 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열이 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하도록 하며; 그것의 가변 도메인에 적어도 하나의 아미노산의 히스티딘으로의 치환을 포함하고 있는 선택된 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 발현시키고; 그리고 중성 pH에서 관심의 항원에 대한 결합을 보유하고(예컨대 관심의 항원에 대한 원하는 친화성을 보유하고) 한편으로 산성 pH에서 관심의 항원에 대해 감소된 결합을 나타내는 항체를 선택하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄는 사람 중쇄 가변 유전자 절편(사람 V, D 및 J 절편)으로부터 유도된다.

[0795] 한 구체예에서, pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 제조하는 방법은 (1) 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열과 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 유전자 절편(V, D 및 J 절편)의 레퍼토리를 포함하고 있는 비-사람 동물, 예컨대 마우스를 관심의 항원으로 면역시키고, 마우스가 상기 항원에 대한 면역 반응을 시작하도록 허용하며, (2) 비-사람 동물에서, 예컨대 마우스에서 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는 항체를 선택하고, (3) 비-사람 동물로부터, 예컨대 마우스로부터 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는 항체의 면역글로불린 중쇄의 뉴클레오티드 서열을 분리하며, (4) 상기 중쇄의 뉴클레오티드 서열을 측정하고, (5) 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 함유하는 면역글로불린 경쇄의 뉴클레오티드 서열을 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하도록 변형시키며, (6) 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는 항체의 면역글로불린 중쇄 및 히스티딘 변형을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 세포에서 발현시키고, 그리고 (7) 세포에서 발현된 항체가 중성 pH에서 항원에 대한 결합을 유지하는 한편 산성 pH에서 감소된 결합을 나타내는지를 측정하는 것으로 이루어진다. 한 구체예에서, 세포에서 발현된 항체는 중성 pH에서 항원에 대한 원하는 친화성을 나타낸다. 다양한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄는 사람 중쇄 가변 유전자 절편(사람 V, D 및 J 절편)의 재배열로부터 유도된다.

[0796] 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하고 있는 마우스는 예컨대 미국 출원 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 및 2013/0045492에 기술되어 있는 보편적 경쇄 또는 통상적인 경쇄 "ULC" 마우스이다. 한 구체예에서, 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 사람 V_k 1-39J_k 5 및 사람 V_k 3-20J_k 1 서열로부터 선택된다.

[0797] 한 구체예에서, 관심의 항원은 가용성 항원, 세포 표면 항원(예컨대 종양 항원) 및 세포 표면 수용체로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 세포 표면 수용체는 면역글로불린 수용체이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 수용체는 Fc 수용체이다.

- [0798] 한 구체예에서, 중성 pH에서 해리 상수(K_D)로서 표시되는 항원에 대한 항체의 원하는 친화성은 10^{-6} M 미만, 예컨대 10^{-8} M 미만, 예컨대 10^{-9} M 미만, 예컨대 10^{-10} M 미만, 예컨대 10^{-11} M 미만, 예컨대 10^{-12} M 미만이다.
- [0799] 상기에서 설명된 것과 같이, 한 구체예에서, ULC 마우스는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 유전자 서열을 포함하고, 항원에 대한 반응으로 항체를 발현하는데, 항원에 대한 항체의 친화성은 주로 그것들의 항체의 중쇄를 통해 중재된다. 이들 마우스는 항체의 사람 중쇄 가변 도메인을 코드화하도록 재배열되고 또한 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 서열로부터 유도된 경쇄를 포함하는 사람 중쇄 가변(V, D 및 J) 절편의 레퍼토리를 포함한다. 한 구체예에서, 이들 마우스는 항원에 노출될 때, 항원에 대한 친화성 및 특이성으로 항체를 생성하기 위하여 사람 중쇄 가변(V, D 및 J) 절편의 다양한 레퍼토리를 활용한다. 그러므로, 항원에 노출될 때 ULC 마우스에서 생성된 항체의 면역글로불린 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 또한 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열(예컨대 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 가지는 단일한 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열)로부터 유도된 면역글로불린 경쇄를 포함하는 원하는 결합 단백질을 생성하기 위하여 분리되고 활용될 수 있다.
- [0800] ULC 마우스의 한 구체예에서, 90 내지 100%의 재배열되지 않은 비-사람 V_H 유전자 절편은 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든(예컨대 90 내지 100%) 내인성 비-사람 V_H 유전자 절편이 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 19, 적어도 30, 또는 적어도 80 또는 81개의 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 이루어진다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편, 적어도 25개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편 또는 적어도 43개의 기능성 재배열되지 않은 사람 V_H 유전자 절편으로 이루어진다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 모든 비-사람 D_H 및 J_H 절편의 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 D_H 절편 및 적어도 하나의 재배열되지 않은 사람 J_H 절편으로의 대체를 포함한다. 한 구체예에서, 비-사람 동물은 모든 비-사람 D_H 및 J_H 절편의 모든 재배열되지 않은 사람 D_H 절편 및 모든 재배열되지 않은 사람 J_H 절편으로의 대체를 포함한다. 그로써, ULC 마우스는 관심의 항원에 대한 반응으로 항체를 생성하기 위하여 다양한 레퍼토리의 사람 가변 영역 유전자 절편(V, D 및 J 절편)을 활용한다.
- [0801] 일단 관심의 항원에 원하는 친화성으로 결합하는 항체의 중쇄가 결정되면, 중쇄의 뉴클레오티드 서열이 분리되고 서열화된다. 그 서열은 발현을 위해 적당한 숙주 세포, 예컨대 진핵 세포, 예를 들면 CHO 세포에 클론된다. 한 구체예에서, 사람 중쇄 불변 영역의 서열은 마우스(예컨대 ULC 마우스)로부터 분리된 사람 중쇄 가변 영역 서열의 하류에 클론된다.
- [0802] 한 구체예에서, pH-의존성 항원-결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질을 제조하는 것은 면역글로불린 경쇄의 뉴클레오티드 서열, 특히 단일 재배열된 사람 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 서열을 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하도록 변형시키는 것을 포함한다. 뉴클레오티드 서열을 변형시키기 위한 다양한 기법들이 해당 기술분야에 공지되어 있는데, 예를 들면 부위 특정 돌연변이 생성이 있다. 또한 원하는 히스티딘 치환을 포함하는 뉴클레오티드 서열은 새롭게 합성될 수 있다.
- [0803] 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 히스티딘 잔기의 발현을 유발하는 치환을 포함한다. 한 구체예에서, 치환(들)은 3 또는 4개의 히스티딘 잔기의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환(들)은 면역글로불린 경쇄 가변 영역에 있다. 한 구체예에서, 치환(들)은 CDR 코돈, 예컨대 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에 있다. 한 구체예에서, 치환(들)은 CDR3 코돈에 있다.
- [0804] 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 핵산 서열이 $V_{κ} 1-39J_{κ} 5$ 유전자 서열을 포함하고, 치환(들)이 CDR3 코돈에 있는 경우, 치환은 105, 106, 108, 111 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106, 108 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 106에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 108에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106 및 108에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 108에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 108에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다.

및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 108 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106, 108 및 111에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 다양한 히스티딘 치환을 포함하는 V_k 1-39J_k 5 CDR3 영역의 아미노산 및 핵산 서열은 도 16에 도시되고, 서열 목록에 포함된다.

[0805] 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 핵산 서열이 V_k 3-20J_k 1 유전자 서열을 포함하고, 치환(들)이 CDR3 코돈에 있는 경우, 치환은 105, 106, 107, 109 및 그것들의 조합으로부터 선택된 위치에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106, 107 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 106에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 107에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106 및 107에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 107 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 107에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 106 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 105, 107 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 106, 107 및 109에서 히스티딘의 발현을 유발한다. 다양한 히스티딘 치환을 포함하는 V_k 3-20J_k 1 CDR3 영역의 아미노산 및 핵산 서열은 도 27에 도시되고, 서열 목록에 포함된다.

[0806] 일단 면역글로불린 경쇄, 예컨대 사람 면역글로불린 경쇄 가변 도메인의 서열이 원하는 위치에서 히스티딘 잔기를 포함하도록 변형되면, 경쇄의 뉴클레오티드 서열은 적당한 숙주 세포, 예컨대 진핵 세포, 예를 들면 CHO 세포에서 발현을 위한 벡터 안에 클론된다. 한 구체예에서, 사람 경쇄 불변 영역의 서열은 사람 가변 영역의 변형된 뉴클레오티드 서열의 하류에 클론된다.

[0807] 한 구체예에서, 변형된 사람 면역글로불린 경쇄 및 선택된 사람 면역글로불린 종쇄를 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 적당한 숙주 세포, 예컨대 진핵 세포, 예를 들면 CHO 세포에서 항원-결합 단백질을 생성하기 위해 공동-발현된다. 발현을 위해 사용될 수 있는 다양한 숙주 세포가 해당 기술분야에 공지되어 있고, 본 명세서를 통해 언급된다.

[0808] 숙주 세포에서 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 세포 상층액에 분비될 수 있고, 그것은 적절한 발현 및 중성 pH에서 원래의 항원에 대한 친화성에 대해 선별된다. 항원-결합 단백질은 또한 세포 용해물로부터 회수되거나, 또는 만약 막에 결합되어 있다면 적당한 계면활성제(예컨대 트리톤-X)를 사용하여 막으로부터 방출될 수 있다. 원하는 특징을 가지는 항원-결합 단백질은 정제될 수 있다.

[0809] 한 구체예에서, 히스티딘 변형(들)을 가지는 항원-결합 단백질은 히스티딘 변형(들)을 포함하지 않은 동일한(원래의) 항원-결합 단백질의 항원에 대한 친화성에 비교할만한 항원에 대한 친화성을 보유한다. 한 구체예에서, 중성 pH에서 해리 상수(K_d)로서 표시된 관심의 항원에 대한 히스티딘-변형된 항원-결합 단백질의 친화성은 $10^{-6} M$ 미만, 예컨대 $10^{-8} M$ 미만, 예컨대 $10^{-9} M$ 미만, 예컨대 $10^{-10} M$ 미만, 예컨대 $10^{-11} M$ 미만, 예컨대 $10^{-12} M$ 미만이다.

[0810] 한 구체예에서, 본원에 기술된 히스티딘 변형을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 pH 의존성 항원 결합 특성을 나타낸다. 한 구체예에서, 히스티딘 변형을 포함하는 항원-결합 단백질은 히스티딘 변형을 포함하지 않은 동등한 항원-결합 단백질(동일한 아미노산 서열을 갖지만 히스티딘 변형이 없는 항원-결합 단백질)을 능가하는 증강된 pH-의존성 특성을 가지고 있다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중성 pH에서 항원에 대한 결합을 보유하는(예컨대 중성 pH에서 항원에 대한 원하는 친화성을 보유한다) 한편, 산성 pH에서 감소된 결합을 나타낸다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 산성 pH에서 항원에 대한 결합을 나타내지 않는 한편, 중성 pH에서 항원에 대한 결합을 보유한다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 중성 pH에서의 항원-결합 단백질의 해리성 반감기($t_{1/2}$)에 비교하여 산성 pH에서 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배 또는 적어도 약 30-배 감소된 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 가진다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 37°C에서 약 2분 또는 그 미만의 $t_{1/2}$ 를 가진다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 37°C에서 약 1분 미만의 $t_{1/2}$ 를 가진다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 25°C에서 약 2분 또는 그 미만의 $t_{1/2}$ 를 가진다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 항원-결합 단백질은 산성 pH 및 25°C에서 약 1분 미만의 $t_{1/2}$ 를 가진다.

[0811] 한 구체예에서, 본원에 기술된 히스티딘 변형을 포함하는 항원-결합 단백질, 예컨대 항체는 대상에 치료적 용량

으로 투여될 때, 히스티딘 변형을 포함하지 않은 항원-결합 단백질(예컨대 히스티딘 변형을 포함하지 않은 원래의 항원-결합 단백질)의 동등한 치료적 용량이 투여될 때의 혈청 반감기에 비교하여 증가된 혈청 반감기를 나타낸다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 히스티딘 변형을 포함하는 항원-결합 단백질의 용량의 투여시, 히스티딘 변형을 포함하지 않은 항원-결합 단백질의 동일한 용량의 투여시 혈청 반감기를 능가하는 혈청 반감기의 증가는 약 2배, 예컨대 약 5배, 예컨대 약 10배, 예컨대 약 15배, 예컨대 약 20배 또는 그 이상이다. 한 구체예에서, 혈청 반감기는 적어도 약 1일, 예컨대 적어도 약 2일, 예컨대 적어도 약 7일, 예컨대 적어도 약 14일, 예컨대 적어도 약 30일, 예컨대 적어도 약 60일이다.

[0812] 상기에서 기술된 pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 항원-결합 단백질의 시험관 내 제조 방법 외에, 본원에는 또한 상기 방법에 의해 생성된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체가 제공된다. 또한 상기 방법은 마우스에서 통상적인(보편적인) 경쇄에 결합하는 두 개의 상이한 사람 면역글로불린 중쇄를 선택하고, 보편적 경쇄를 상기에서 기술된 것과 같은 히스티딘 치환을 포함하도록 변형시키며, 단일 히스티딘-변형된 보편적 경쇄를 가지는 두 개의 사람 중쇄를 숙주 세포에서 공동 발현시킴으로써 다중-특이성, 예컨대 이중특이성 항원-결합 단백질을 생성하기 위해 활용될 수 있다. 상기에서 기술된 항원-결합 단백질을 생성하기 위한 다양한 단계는 이중특이성 항원-결합 단백질을 제조하는 방법에도 적용될 수 있다. 항원(들)에 대한 원하는 친화성 및 pH-의존성 항원 결합 특성을 가지는 것으로 확인된 이중특이성 항원 결합 단백질은 정제될 수 있다. 그러므로 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 히스티딘 코돈으로의 치환을 포함하고 있는 사람 가변 영역 유전자, 예컨대 V_k 1-39J_k 5 또는 V_k 3-20J_k 5 가변 영역 유전자에 의해 코드화된 사람 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하고 있는 두 개의 사람 중쇄 및 단일한 사람 경쇄를 포함하는 이중특이성 항체가 제공된다.

[0813] 또한 히스티딘 치환을 포함하고 있는 사람 면역글로불린 중쇄 및 사람 면역글로불린 경쇄를 포함하는 항원-결합 단백질의 제조에 활용되는 구성물이 제공된다. 본원에 기술된 항원-결합 단백질, 예컨대 항체를 발현하는 숙주 세포 또한 제공된다.

실시예

[0815] 다음의 실시예는 본 발명의 제조 및 사용 방법의 완전한 개시 및 설명을 해당 기술분야의 숙련자들에게 제공하기 위해 제공되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범주를 제한하려고 의도하거나 아래의 실험이 전부이거나 유일하게 수행된 실험인 것을 나타내려고 의도한 것은 아니다. 사용된 수치(예컨대 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력이 기울여졌지만, 일부 실험적 에러와 편차는 해명될 것이다. 다른 표시가 없는 한, 부는 중량부이고, 문자량은 평균 문자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

실시예 1. 히스티딘-치환된 D 유전자 절편을 포함하고 있는 인간화된 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 구성

[0817] 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 포함하고 있는 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 구성을, 박테리아 인공 염색체(BAC) DNA를 사용하여 박테리아 세포에서 일련의 동종 재조합 반응(BHR)에 의하여 수행하였다. 하나 또는 그 이상의 히스티딘 잔기를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 발현하는 유전자 공학처리된 마우스의 제조를 위해 여러 개의 표적화 구성물을 VELOCIGENE® 유전자 공학 기법을 사용하여 제조하였다(예컨대 미국 특허 6,586,251호 및 Valenzuela, D. M. et al. (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotechnology* 21(6):652-659 참조).

[0818] 처음에, 사람 D 유전자 절편을 4개의 조각(4개의 반복부)으로서 모의로 합성하였는데, 즉 친수성 프레임에 티로신(Y), 아스파라긴(N), 세린(S), 글리신(G) 및 아스파테이트(D)를 코드화하는 코돈을 히스티딘 코돈으로 치환하였다(이하 "히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편", 즉 HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))(도 3). 4개의 반복부는 또한 그것들을 다시 함께 결찰하기 위하여 단부에 독특한 제한 효소 부위를 함유하였다. 각각의 사람 D 유전자 절편의 히스티딘 치환의 특이한 위치(고딕체로 표시됨)는 도 1a와 도 1b에서 "친수성"으로 표시된 열에 도시된다. 도 1에서 알 수 있는 것과 같이, 변형은 친수성 리딩 프레임에 히스티딘 코돈을 도입한 한편, 변형은 또한 "중지" 리딩 프레임에서 일부 중지 코돈을 세린 코돈으로 변경시켰다. 그러나 변형은 "소수성" 리딩 프레임에 소수의 변화를 유발하였다. 4개의 합성된 D 절편 반복부를 결찰하기 위한 상세한 과정은 도 3에 도시된다(순차적 결찰). 그 결과 생성된 클론은 5'에서 3' 쪽으로 5'마우스 상동성 아암, 플록스트 네오마이신 카세트, 히스티딘 치환을 포함하는 사람 D 유전자 절편(즉 HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4)), 클로르암페니콜 선택 카세트 및 3' 상동성 아암을 함유하였다.

- [0819] 다음에 VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스에서 내인성 사람 D 유전자 절편을 상기에서 기술된 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편으로 대체하기 위하여 6개의 유전자 변형을 수행하였다.
- [0820] 먼저, 스펙티노마이신 선택 카세트와 AsISI 제한 부위를 함유하고 있는 pLMa0174를 MAID 1116 클론의 5' 단부 안으로 표적화하였다(단계 1. BHR(Spec); 도 2). 단계 1 동안, 모두 hV_H6-1의 5' 하류에 위치한 클로르암페니콜 선택 카세트, 네오마이신 선택 카세트, loxP 부위, 두 개의 V_H 유전자 절편(hV_H1-3 및 hV_H1-2) 및 사람 Adam6p 유전자를 MAID 1116 클론으로부터 결실시키고, 스펙티노마이신 카세트에 의해 대체시켜서 VI433 클론을 제조하였다.
- [0821] 두 번째로, 단계 2(BHR (Hyg+Spec); 도 2)에서, 양옆에 FRT 부위가 있는 하이그로마이신 카세트를 함유하고 있는 pNTu0002를 사람 면역글로불린 D_H 유전자 절편을 포함하고 있는 영역 안으로 표적화하였다. 단계 2 동안, 모든 사람 중쇄 D 유전자 절편을 VI433으로부터 결실시키고 하이그로마이신 카세트로 대체시켜서 MAID 6011 VI434(클론 1)를 제조하였다. 그 변형으로 또한 PI-SceI과 I-CeuI 제한 부위가 하이그로마이신 카세트의 5' 및 3' 단부에 도입되었다.
- [0822] 세 번째로, 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))을 포함하고 있는 게놈 영역을 MAID 6011 VI434의 PI-SceI과 I-CeuI 부위 사이의 영역으로 제한 소화 및 결찰(PI-SceI/I-CeuI 결찰 변형된 1116(Kan+Spec); 도 4)을 통해 도입시켰다. 이것으로 5'에서 3'쪽으로 스펙티노마이신 카세트, V_H6-1을 포함하고 있는 약 50kb의 게놈 영역, 플록스트 네오마이신 카세트, 약 40kb의 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4)) 및 사람 J_H 유전자 절편을 함유하고 있는 약 25kb의 게놈 영역과 이어서 마우스 E_i(mIgH 인트로닉 인핸서; SEQ ID NO:5), 마우스 스위칭 영역(SEQ ID NO:6) 및 마우스 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열(mIgM 엑손 1; SEQ ID NO:7)을 함유하고 있는 MAID6012 VI469가 제조되었다. 변형을 함유하고 있는 박테리아 세포를 카나마이신과 스펙티노마이신 선택을 토대로 선택하였다.
- [0823] 네 번째로, MAID 1460 이형접합성 마우스 ES 세포를, MAID 1460 클론으로부터 모든 내인성 사람 D 유전자 절편을 제거하기 위해 도 5에 예시된 것과 같이 일렉트로포레이션을 통해 MAID 6011 VI434로 표적화하였다. 이것으로 그것의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에(129 균주-유도된 염색체에) 5'에서 3'쪽으로 FRT 부위, 사람 V_H 유전자 절편, adam6a/b 유전자를 포함하고 있는 마우스 게놈 영역, 양옆에 FRT 부위가 있는 하이그로마이신 카세트 및 사람 J_H 절편과, 이어서 마우스 E_i 서열 및 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열을 포함하는 MAID 6011 이형접합성 마우스 ES 세포를 제조하였다. MAID 6011의 유전자 변형(대립유전자의 상실, 대립유전자의 획득 및 원래의 대립유전자의 존재)을 도 6에 도시된 것과 같이 프로브와 프라이머를 사용하여 확인하였다.
- [0824] 다섯 번째로, 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(즉 HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))을 MAID 6011에 도입하기 위하여 MAID 6011 이형접합성 마우스 ES 세포를 MAID 6012 VI469로 일렉트로포레이션하였다. 표적화 단계로 MAID 6011로부터 플록스트 하이그로마이신 선택 카세트를 제거하였고, 그 서열을 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편으로 대체하였다. 이것으로 야생형 C57BL/6 계통-유도된 염색체 및 사람 야생형 V_H 및 J_H 유전자 절편과 본원에 기술된 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편을 포함하고 있는 유전자 변형된 129 계통-유도된 염색체를 포함하는 MAID 이형접합성 ES 세포를 유발하였다. 또한 ES 세포는 adam6a/b 유전자와 V_H와 D 절편 사이에 플록스트 네오마이신 카세트를 아우르는 마우스 게놈 영역을 함유하였다(도 7). MAID 6012의 유전자 변형(대립유전자의 상실, 대립유전자의 획득 및 원래의 대립유전자의 존재)을 도 8에 도시된 것과 같이 프로브와 프라이머를 사용하여 확인하였다.
- [0825] 마지막으로, MAID 6012 ES 세포로부터 네오마이신 선택 카세트를 제거하기 위하여 Cre 재조합효소를 발현하는 플라스미드로 MAID 6012 ES 세포를 일렉트로포레이션하여 MAID 6013 이형접합성 ES 세포를 얻었다(도 9). 최종 MAID 6013 이형접합성("MAID 6013 het") ES 세포는 야생형 C57BL/6 계통-유도된 염색체 및 도 9에 도시된 것과 같이 그것의 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 5'에서 3'쪽으로 (1) FRT 부위; (2) 사람 V_H 유전자 절편; (3) adam6a/b 유전자를 아우르는 마우스 게놈 영역; (4) 플록스트 네오마이신 선택 카세트; (5) 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-

6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4)); (6) 사람 J_H 유전자 절편; 이어서 (7) 마우스 E_i 서열(mIgH 인트로닉 인핸서; SEQ ID NO:5); (8) 스위칭 영역(SEQ ID NO:6); 및 (9) 마우스 IgM 불변 영역 뉴클레오티드 서열(mIgM 엑손 1: SEQ ID NO:7)을 포함하고 있는 유전자 변형된 129 계통-유도된 염색체를 함유한다.

[0826] 상기에서 기술된 표적화된 ES 세포(MAID 6013)를 공여 ES 세포로서 사용하여 8-세포 단계 마우스 배(embryo)에 VELOCIMOUSE® 방법에 의하여 도입하였다(US 7,576,259, US 7,659,442, US 7,294,754, US 2008-0078000 A1 참조). 상기에서 기술된 히스티딘-치환된 사람 중쇄 D 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 내포하는 마우스를 도 8에 도시된 프라미어 및 프로브를 사용하여 유전자형 분류에 의해 확인하였다. 그 결과의 유전자 변형된 F0 마우스를 야생형 마우스와 교배시켜서 F1 자손을 얻었다. F1 새끼를 유전자형 분류하고, 히스티딘-치환된 사람 중쇄 D 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌에 대해 이형접합성인 F1 새끼를 추가의 특성확인을 위하여 선택하였다.

실시예 2. 재배열된 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열의 분석

[0828] 다음으로, 본원에서 기술된, 그것의 생식선에 사람 V_H, J_H 유전자 절편과 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편(HD 1.1-6.6(9586bp; SEQ ID NO:1), HD 1.7-6.13(9268bp; SEQ ID NO:2), HD 1.14-6.19(9441bp; SEQ ID NO:3) 및 HD 1.20-6.25, 1.26(11592bp; SEQ ID NO:4))을 포함하는 129 계통-유도된 염색체 히스티딘-치환된 사람 중쇄 D 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 마우스, 예컨대 6013 F0 이형접합성 마우스가 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 유도된 하나 또는 그 이상의 히스티딘을 포함하는 재배열된 중쇄 V(D)J 서열을 발현할 수 있는지의 여부를 조사하였다.

[0829] 이 목적을 위해, 6013 F0 이형접합성 마우스의 비장 B 세포로부터 분리한 mRNA를 역-전사효소 중합효소 사슬 반응(RT-PCR)에 의해 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편으로부터 유도된 IgM CDR3 서열의 존재에 대해 분석하였다.

[0830] 간단히 설명하자면, 비장을 수득하고 1×PBS(Gibco)에서 유리 슬라이드를 사용하여 균등화하였다. 세포를 원심 분리(500×g, 5분)로 펠릿화하고, 적혈구를 ACK 용해 완충액(Gibco)에서 3분 동안 용해시켰다. 세포를 1×PBS로 세척하고 0.7μm 세포 여과기를 사용하여 여과하였다. 비장 세포로부터 CD19에 대하여 MACS 자기 포지티브 선택을 사용하여(Miltenyi Biotech) B-세포를 분리하였다. 총 RNA를 펠릿화된 B-세포로부터 RNeasy Plus 키트(Qiagen)를 사용하여 분리하였다. 폴리A+mRNA를 총 RNA로부터 Oligotex® 다이렉트 mRNA 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 분리하였다.

[0831] 이중 가닥의 cDNA를 비장 B 세포 mRNA로부터 5' RACE에 의하여 SMARTer™ Pico cDNA 합성 키트(Clontech)를 사용하여 제조하였다. Clontech 역전사효소 및 dNTP를 Invitrogen사의 Superscript II 및 dNTP로 바꾸었다. 중쇄 가변 영역(V_H) 항체 레퍼토리를 IgM 불변 영역에 특이적인 프라이머와 SMARTer™ 5' RACE 프라이머를 사용하여 cDNA로부터 증폭시켰다(표 1). PCR 생성물을 QIAquick® PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 세정하였다. 두 번째 회기의 PCR을 동일한 5' RACE 프라이머와 IgM 불변 영역에 특이적인 재생 3' 프라이머를 사용하여 수행하였다(표 2). 두 번째 회기 PCR 생성물을 SizeSelect™ E-gel® 시스템(Invitrogen)을 사용하여 정제하였다. 세 번째 PCR을 454 어댑터와 바코드를 첨가한 프라이머를 사용하여 수행하였다. 세 번째 회기의 PCR 생성물을 Agencourt® AMPure® XP 비즈를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 생성물들을 SYBR®-qPCR에 의하여 KAPA 라이브러리 정량 키트(KAPA Biosystems)를 사용하여 정량하였다. 모아진 라이브러리를 454 GS 쥬니어 티타늄 시리즈 Lib-A emPCR 키트(Roche Diagnostics)를 사용하여 emPCR을 수행하고, Roche 454 GS 쥬니어 기구를 사용하여 제조업체의 프로토콜을 따라 2방향으로 서열화하였다.

표 1

명칭	서열
3' mIgM CH1 외부	TCTTATCAGACAGGGGCTCTC (SEQ ID NO:318)

표 2

명칭	서열
3' mIgM CH1 내부	GGAAGACATTTGGGAAGGACTG (SEQ ID NO:319)

생물정보 분석

[0835] 454 서열을 샘플 바코드 완전 매치를 토대로 분류하고 품질에 대해 정돈하였다. 서열을 사람 생식선 V, D 및 J 절편 데이터베이스에 대한 재배열된 Ig 서열의 배열을 토대로 ig블라스트의 국소 설치(NCBI, v2.2.25+)를 사용하여 주석을 달았다. 동일한 스코어를 가지는 다수의 최상 히트가 검출되었을 때 서열을 모호한 것으로서 표시하고 분석으로부터 제거하였다. 결과를 분석하고 mysql 데이터베이스에 저장하기 위하여 일련의 펌 스크립트를 개발하였다. CDR3 영역을 경쇄에 대해서는 보존된 C 코돈과 FGXG 모티브 사이로 규정하고(SEQ ID NO:320) 중쇄에 대해서는 보존된 C 코돈과 WGXG 모티브 사이로 규정한다(SEQ ID NO:321). CDR3 길이를 유일한 생산성 항체를 사용하여 측정하였다.

[0836] 도 11 내지 도 13에서 알 수 있는 것과 같이, 6013 F0 이형접합성 마우스는 CDR3의 하나 또는 그 이상의 히스티딘 코돈을 코드화하는 재배열된 중쇄 가변 영역 mRNA 서열(재배열된 V-D-J 서열)의 다양한 레퍼토리를 발현하였다. 그 서열화 데이터는 CDR3에 나타난 히스티딘 코돈이 본원에 기술된 6013 마우스의 유전자 변형된 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 존재하는 다양한 히스티딘-치환된 사람 D 유전자 절편으로부터 유도되었음을 나타낸다.

실시예 3. 항원-특이적 사람 경쇄에서 히스티딘의 이용

[0838] 항원-특이적 사람 항체로부터 선택된 경쇄의 아미노산 서열을 배열하였다. 선택된 수의 항원-특이적 사람 항체에 대한 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄의 CDR에서 히스티딘 돌연변이를 확인하였다(도 15). 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄를 단일한 재배열된 사람 V_k 1-39 경쇄를 함유하고, 마우스의 항체 레퍼토리에서 생성된 것과 같은 체세포성 과돌연변이를 포함하도록 공학처리된 면역화된 마우스로부터 분리하였다(US 2011/0195454 A1 참조).

[0839] 히스티딘 잔기를 재배열된 사람 V_k 1-39 경쇄 안에, 해당 기술분야에 공지되어 있는 문자 돌연변이 생성 기법을 사용하여 공학적으로 도입하였다. 공학처리된 잔기의 위치는 도 16에 도시한다.

[0840] 공학처리된 히스티딘 잔기를 함유하는 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄 가변 영역을 구성하였고, CHO 세포에서의 발현을 분석하기 위하여, 사람 세포 표면 수용체에 특이적인 항체 방식으로 다양한 사람 중쇄 가변 영역과 짹을 이루었다.

[0841] 표시된 his 변형(예컨대 105, 106, 108, 111)을 가지는 특별한 중쇄 및 경쇄를 가지는 CHO 세포를 48-웰 플레이트의 웰 안에 시팅하였다. 다음날, 동등한 중량(400ng)의, 중쇄 및 경쇄에 해당하는 DNA를 형질전환 시약(리포펙틴 2000)과 혼합하고, 인큐베이션에 의해 복합체를 형성하도록 허용한 다음, 그 복합체를 플레이트의 세포에 첨가하였다. 4일 후에 배지를 수집하였다. 배지는 발현된 항체를 함유하였다.

[0842] 상이한 중쇄를 가지는 CHO 세포는 CDR3 발현 웰에서 하나 또는 그 이상의 his 치환을 가지는 동일한 경쇄와 짹을 이루었다. 경쇄의 CDR3의 선택된 위치에서 공학적으로 도입된 히스티딘 잔기를 가지는 항체 유전자로 형질전환된 CHO 세포의 상층액에서 검출된 ng/mL의 항체 빌현 수준(ng/mL)을 측정하였다.

[0843] 단배질 블롯에 의해 측정된, 선택된 중쇄를 사용하여 히스티딘 공학처리된 경쇄와 짹을 이룬 항원-특이적 중쇄의 CHO 세포의 상층액 중에서의 발현을 도 18에 도시한다. ULC는 재배열된 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄를 나타낸다.

[0844] 일정액의 배지를 BIACORE™ 기구 상에서 항체(세포 표면 수용체 서열)에 대한 표적 항원을 사용하여 분석하였다. 항체를 칩 상에서 포획하였다. 항체 포획 수준은 도 19a 내지 도 19j에서 RU로서 나타낸다. BIACORE™ 칩 상에 포획된 항체에 표적 항원의 서열을 함유하고 있는 흐름을 지나가게 하였다. 표적 항원의 항체 포획을 측정하였고, 또한 도시된 것과 같이 결합 속도 및 다른 매개변수들을 측정하였다. 항원 흐름을 중단하고 해리 속도를 결합된 항체로부터 분리된 항원으로서 측정하였다.

[0845] 선택된 항체 상층액에 대한 평형 해리 상수(K_D)(외관상)를 SPR(표면 플라스몬 공명)에 의하여 BIACORE™ T100 기구(GE Healthcare)를 사용하여 측정하였다. 동역학을 pH 7.4와 pH 5.75에서 측정하였다. 그 결과를 도 19a 내지

도 19j에 도시한다.

[0846] 도 19a 내지 도 19j에서 알 수 있는 것과 같이, 표시된 종쇄와 짹을 이룬 V_k 1-30/J_k 5 경쇄에 대해, 경쇄가 CDR의 특정 위치에서 히스티딘 잔기를 코드화하기 위해 변형되어 있는, 세포 표면 수용체에 대한 항체 결합에 대한 데이터는 히스티딘 변형이 pH 7.4와 pH 5.75에서 상이한 친화성으로 직접적으로 항원(예컨대 세포 표면 수용체)의 결합에 영향을 미친다는 것을 증명한다. pH 7.4에서 결합을 보유하지만, pH 5.75에서는 느린 결합을 나타내거나 검출가능한 결합이 없는 히스티딘 변형이 바람직하다.

실시예 4. 항원-특이적 사람 경쇄에서 히스티딘 잔기의 확인

[0848] 통상적 경쇄 마우스(예컨대 V_k 1-39 또는 V_k 3-20 통상적 경쇄 마우스) 및 그런 마우스에서의 항원-특이적 항체의 제조는 미국 특허 출원 13/022,759, 13/093,156 및 13/412,936(각각 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409 및 2012/0192300)에 기술되어 있다. 간단히 설명하면, 재배열된 사람 생식선 경쇄 표적화 백터를 VELOCIGENE® 기법(예컨대 미국 특허 6,586,251호 및 Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조)을 사용하여 만들어서 마우스 게놈 박테리아 인공 염색체(BAC) 클론을 변형시키고, 게놈 구성을 단일 재배열된 사람 생식선 경쇄 영역을 함유하도록 공학처리하여, 앞서 내인성 κ 가변 및 연결용 유전자 절편을 결합시켜 놓은 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입하였다. 그런 다음 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 일렉트로포레이션하여, 재배열된 사람 생식선 V_k 1-39J_k 5 또는 V_k 3-20J_k 1 영역을 발현하는 키메릭 마우스를 제조하기 위하여 변형된 ES 세포를 만들었다. 표적화된 ES 세포를 공여 ES 세포로서 사용하여 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배안에 도입하였다(예컨대 미국 특허 7,294,754 및 Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotype analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). 공학적으로 도입된 사람 생식선 V_k 1-39J_k 5 또는 V_k 3-20J_k 1 경쇄 영역을 독립적으로 내포하는 VELOCIMICE®를 독특한 재배열된 사람 생식선 경쇄 영역의 존재를 검출하는 대립유전자 분석(Valenzuela et al., 상기 동일)을 변형시켜 사용하여 유전자형 분류에 의해 확인하였다.

[0849] 공학적으로 도입된 사람 생식선 경쇄 유전자좌를 내포하고 있는 마우스(ULC 마우스)를 내인성 마우스 종쇄 가변 유전자 유전자좌가 사람 종쇄 가변 유전자 유전자좌로 대체되어 있는 마우스(US 6,596,541 참조; VELOCIMUNE® 마우스, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)로 사육하였다.

[0850] 단일 재배열된 사람 생식선 경쇄 영역을 함유하고 있는 VELOCIMUNE® 마우스를 관심의 항원으로 도전하고, 보편적 경쇄를 포함하는 항체(예컨대 V_k 1-39J_k 5)를 분리하고 서열화하였다. 통상적인 V_k 1-39J_k 5 경쇄 마우스에서 생성된 항원-특이적 사람 항체로부터 선택된 경쇄(A 내지 K)의 아미노산 서열을 일렬 배열하였다. 항원-특이적 사람 항체의 선택된 번호에 대한 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄의 CDR의 히스티딘 돌연변이를 확인하였다(도 15). 생식선 V_k 1-39J_k 5 가변 도메인의 부분 아미노산 서열을 배열 위에 도시하고 SEQ ID NO:325로 표시하며, 완전한 가변 도메인 아미노산 서열을 SEQ ID NO:404에 표시한다.

실시예 5. 히스티딘-치환된 사람 보편적 경쇄 항체의 공학적 제조 및 특성 확인

실시예 5.1. 생식선 사람 재배열된 경쇄 안으로의 히스티딘 잔기의 공학적 도입

[0853] 히스티딘 잔기를, 사람 V_k 1-39J_k 5 경쇄의 Q105, Q106, Y108 및 P111 위치에 공학적으로 처리된 히스티딘 잔기를 도입하기 위하여 특이하게 디자인된 부위 특정 돌연변이 생성 프라이머를 사용하여 재배열된 사람 V_k 1-39J_k 5 경쇄 안에 공학적으로 도입하였다. 부위 특정 돌연변이 생성을 해당 기술분야에 공지되어 있는 문자 기법을 사용하여 수행하였다(예컨대 QuikChange II XL 부위 특정 돌연변이 생성 키트, Agilent Technologies). 공학적으로 도입된 잔기의 CDR3 내 위치는 도 16에 도시하는데, 도 16에 도시된 히스티딘-치환된 CDR3의 핵산 서열은 SEQ ID NO:328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354 및 356에 표시된다(해당하는 아미노산 서열은 SEQ ID NO:329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355 및 357에 표시된다). 생식선 재배열된 V_k 1-39J_k 5 CDR3의 핵산 및 아미노산 서열은 SEQ ID NO:326 및 327에 각각 표시된다.

실시예 5.2. 히스티딘 공학처리된 경쇄의 구성 및 발현

[0855] 실시예 2에 따라 만들어진 생식선 공학처리된 히스티딘 잔기를 함유하고 있는 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄를 구성하고, CHO 세포에서의 발현을 분석하기 위하여 사람 세포 표면 수용체에 특이적인 다양한 사람 종쇄(1 내지 5로 표기함)와 짹을 이루었다. 히스티딘-치환된 V_k 1-39-유도된 경쇄와 짹을 이룬 사람 세포 표면 수용체에 특이적

인 5개의 사람 중쇄를 단일 재배열된 사람 경쇄(사람 V_k 1-39/J_k 5 재배열된 경쇄; US2011/0195454A1 참조)를 가지는 마우스로부터 얻었다.

[0856] 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA): CHO 세포로부터의 항체 분비를, 표시된 히스티딘 변형을 포함하는 경쇄에 대하여 Fc ELISA를 사용하여 5개의 상이한 중쇄를 사용하여 검출하였다. 경쇄 및 중쇄 서열(변형을 위한)을 단일 한 재배열 사람 경쇄(예컨대 사람 V_k 1-39/J_k 5 재배열된 경쇄; US2011/0195454A1 참조)를 가지는 마우스에서 제조하였다. 포획 항체는 염소 항-사람 IgG였고 검출 항체는 염소 항-사람 (Fc 감마-특이적)-HRP였다. 그 결과는 도 17에 도시한다. ULC+heavy: 특이한 중쇄 및 비변형 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄. 도 17에 도시된 것과 같이, 발현은 거의 모든 돌연변이에서 검출되었다.

[0857] 단백질 면역블롯. 히스티딘 공학처리된 경쇄와 짹을 이룬 항원-특이적 중쇄의 CHO 세포의 상층액 중에서의 발현을 추가로 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 샘플을 4 내지 12%의 트리스-글리신 겔 위에서 달리도록 하였다. 선택된 중쇄(중쇄 3)를 사용한 결과를 도 18에 도시한다. ULC는 재배열된 사람 V_k 1-39-유도된 경쇄를 말한다(상기 기술된 것과 같음).

실시예 5.3. 히스티딘 공학처리된 경쇄의 결합 친화성의 측정

[0859] 선택된 항체 상층액에 대한 평형 해리 상수(K_D), 해리성 반감기($t_{1/2}$) 및 다른 동역학적 매개변수를 BIACORE™ T200 기구(GE Healthcare)를 사용하여 SPR(표면 플라스몬 공명)에 의하여 측정하였다. 동역학을 pH 7.4 및 pH 5.75에서 측정하였다. 그 결과를 도 20a 내지 도 20e에 도시한다.

[0860] 중성 pH(pH 7.4) 및 산성 pH(pH 5.75)에서 면역원에 결합하는 항체의 동역학적 결합 특성(예컨대 k_a , k_d , K_D , $t_{1/2}$ 등)에 대한 수치는 실시간 표면 플라스몬 공명 바이오센서(Biacore T200)를 사용하여 얻었다. Biacore CM5 센서 칩을 마우스 항-사람 Fc 항체로 유도체화하여 상층액으로부터의 항체를 포획하였다. 그런 다음 단일 농도(50nM)의 면역원을 30μl/분의 유속으로 항체-포획된 표면 위로 주입하였다. 항체-항원 결합을 2.5분 동안 모니터한 후 포획된 항체로부터 항원의 해리를 8분 동안 모니터하였다. 동역학적 결합(k_a) 및 해리(k_d) 속도 상수를, Biacore T200 Evaluation 소프트웨어 버전 1.0을 사용하여 질량 수송 모델로 1:1 결합에 대한 데이터를 프로세싱하고 맞춤으로써 측정하였다. 평형 해리 상수(K_D) 및 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 동역학적 속도 상수로부터 계산하였다: $K_D(M)=k_d/k_a$; 및 $t_{1/2}(\text{분})=\ln 2(60^* k_d)$.

[0861] 도 20에서 알 수 있는 것과 같이, 세포 표면 수용체에 대한 항체의 결합 분석에서, 항원-특이적 사람 중쇄와 짹을 이룬 히스티딘-변형된 통상 경쇄(V_k 1-39/J_k 5 경쇄의 히스티딘 변형된 CDR3)를 포함하는 5개의 항체 중 2개가 pH 7.4 및 pH 5.75에서 상이한 친화성으로 항원(예컨대 세포 표면 수용체)에 대한 결합을 나타냈다. pH 7.4에서의 결합을 보유하지만, pH 5.75에서 낮은 결합을 보이거나 검출할만한 결합이 없는 히스티딘 변형을 가지는 항체들이 바람직하다. pH 7.4에 비교하여 pH 5.75에서 감소된 $t_{1/2}$ 를 나타내는 히스티딘 변형을 가지는 항체가 바람직하다.

[0862] 상이한 pH에서 히스티딘-변형된 통상 경쇄 및 3개의 항원-특이적 중쇄(2, 3 및 6으로 표지됨)를 포함하는 3개의 항체에 대한 항원 결합 데이터는 도 21에 추가로 요약한다. 이들 항체는 예컨대 pH 5.75에서 $t_{1/2}$ 의 감소 또는 검출된 결합이 없음에 의해 증명되는 것과 같이, pH 7.4에 비교하여 pH 5.75에서 항원 결합의 상당한 감소를 나타냈다.

실시예 6. 히스티딘-치환된 V_k 1-39J_k 5 보편적 경쇄를 포함하는 유전자 변형된 마우스의 공학적 제조 및 특성 확인

실시예 6.1. 재배열된 사람 경쇄 가변 영역에 히스티딘 잔기를 공학적으로 도입하기 위한 표적화 벡터의 구성

[0865] 사람 경쇄의 CDR 영역에 공학적으로 처리된 히스티딘 잔기를 가지고 있는 재배열된 사람 경쇄 유전자를 함유하는 유전자 변형된 마우스를 해당 기술분야에 공지되어 있는 표준 분자 클로닝 기술에 의해 제조한 표적화 벡터를 사용하여 제조한다.

[0866] 간단히 설명하면, 다양한 재배열된 사람 생식선 경쇄 표적화 벡터를, 단일 재배열된 사람 생식선 경쇄 영역을 함유하도록 VELOCIGENE® 기법(예컨대 미국 특허 6,586,251호 및 Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조)을 사용하여 마우스 게놈 박테리아 인공 염색체(BAC) DNA를 변형시켜 만들어서, 앞서 내인

성 κ 가변 및 연결용 유전자 절편을 결실시켜 놓은 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입하였다. 재배열된 사람 생식선 경쇄 영역을, 경쇄의 서열 내 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 위치에서 생식선 서열의 각각의 위치에서 정상적으로 존재하지 않는 히스티딘 잔기를 코드화하도록 변형시킨다. 표적화 벡터를 마우스 배 줄기(ES) 세포 안에 일렉트로포레이션시켜서 제조하고 정량 PCR 분석(예컨대 TAQMANTM)을 사용하여 확인하였다.

[0867] 구체적으로, 이들 표적화 벡터를 구성하기 위한 전략을 도 23a 내지 도 23f에 도시한다. pBS+FRT-Ub-Hyg-FRT+마우스 Vκ3-7 리더+사람 Vκ1-39Jκ5를 함유하고 있는 통상적인(보편적인) 경쇄 마우스("ULC 마우스", 예컨대 US2011/0195454A1에 기술됨)를 Q105, Q106, Y108 및 P111 또는 Q106, Y108 및 P111을 CDR3 영역의 히스티딘 잔기로 대체하기 위하여 도 22에 표시된(이 공학처리 단계에 대해서는 도 23a 참조) 부위-특정 돌연변이 생성 프라이머를 사용하여 부위 특정 돌연변이 생성(QuickChange II XL 키트)에 의해 변형시켰다. 그 결과 생성된 벡터(H105/106/108/111 및 H106/108/111)를 추가로 변형시키고, 마우스 Igκ 불변 영역, 마우스 인핸서, 마우스 3' 상동성 아암 및 SPEC 카세트를 포함하고 있는 벡터 안에 결찰시켰다(도 23b). 추가의 변형은 5' 마우스 아암을 운반하고 Frt-Ub-NEO-Frt 카세트를 포함하고 있는 벡터 안으로의 결찰을 포함하였다(도 23b). 그 결과 생성된 표적화 벡터를 마우스 Igκ 가변 유전자좌(κ 가변 및 연결용 유전자 절편을 포함함)의 결실을 포함하고 있는 ES 세포 안으로 일렉트로포레이션시켰다(도 23c 내지 도 23f).

[0868] 포지티브 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입된 공학처리된 Vκ1-39Jκ5 경쇄에 특이적인 프로브를 사용하여 대립유전자 분석(Valenzuela et al.)을 변형시켜 사용함으로써 확인하였다. 분석에 사용한 프라이머와 프로브를 아래의 표 3에 제시하고, 서열 목록에 나타낸다; 프로브의 위치는 도 23c 내지 도 23f에 도시된다.

표 3

ES 세포 선별에 사용된 프라이머 및 프로브

프로브 명칭	분석	프로브 서열	5' 프라이머	3' 프라이머
Neo	GOA	TGGGCACAACAGACAATCGGC TG (SEQ ID NO:362)	GGTGGAGAGGCTATTCCGC (SEQ ID NO:363)	GAACACGGCGGCATCAG (SEQ ID NO:364)
ULC-m1	GOA	CCATTATGATGCTCCATGCCT CTCTGTTC (SEQ ID NO:365)	AGGTGAGGGTACAGATAAGTG TTATGAG (SEQ ID NO:366)	TGACAAATGCCCTAATTATAG TGATCA (SEQ ID NO:367)
1633h2 (Vκ1-39Jκ5-특 이적)	GOA	ATCAGCAGAACACCAGGGAAAG CCCCT (SEQ ID NO:368)	GGGCAAGTCAGAGCATTAGCA (SEQ ID NO:369)	TGCAAACCTGGATGCAGCATAG (SEQ ID NO:370)
mIgKd2	보유	GGCCACATTCCATGGGTT (SEQ ID NO:371)	GCAAACAAAACCACTGGCC (SEQ ID NO:372)	CTGTTCCCTAAACTGGACT CCACAGTAAATGGAAA (SEQ ID NO:373)
mIgKp15	보유	GGGCACTGGATACGATGTATG G (SEQ ID NO:374)	CACAGCTTGTGCAGCCTCC (SEQ ID NO:375)	AGAAGAAGCCTGTACTACAGC ATCCGTTTACAGTCA (SEQ ID NO:376)

[0870] 표적화 구성물에 의해 도입된 NEO 선택 카세트를, FLP를 발현하는 플라스미드로 ES 세포를 형질전환시킴으로써 결실시켰다(도 23c 및 도 23e). 임의로, 네오마이신 카세트를 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스로 사용함으로써 제거할 수 있다(예컨대 US 6,774,279). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에서 보유된다.

[0871] 상기에서 기술된 표적화된 ES 세포를 공여 ES 세포로서 사용하고 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배에 도입하였다(예컨대 미국 특허 7,294,754 및 Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotype analyses *Nature Biotech.* 25(1):91-99). 서열을 따라 하나 또는 그 이상의 위치에 돌연변이된 히스티딘 잔기를 함유하는 공학처리된 사람 경쇄 유전자를 독립적으로 내포하고 있는 VELOCIMICE®를 상기 기술된 표적화된 ES 세포로부터 만들었다.

[0872] 새끼를 유전형 분류하고 공학처리된 히스티딘-변형된 사람 경쇄에 대해 이형접합성인 새끼를 선택하여 발현된 항체의 경쇄의 발현 및 결합 능력의 특성을 확인하였다. 3개(H106/108/111; "1930") 또는 4개(H105/106/108/111; "1927")의 히스티딘 변형을 가지는 보편적 경쇄 유전자를 특이하게 포함하고 있는 마우스의

유전형 분류에 대한 프라이머 및 프로브는 아래의 표 4에 열거하고, 서열 목록에 나타낸다. 그것들의 보편적 경쇄에 히스티딘 변형을 함유하고 있는 마우스를 본원에서는 "HULC" 마우스(히스티딘 보편적 경쇄 마우스)로 언급한다.

표 4

유전형 분류에 사용된 프라이머 및 프로브

[0873]

프로브 명칭	분석	프로브 서열	5' 프라이머	3' 프라이머
1927jxn3	GOA 1927 (4 His) 마우스-특이적	ACCATAGTCACAGTACCC A (SEQ ID NO: 377)	AGCAGTCTGCAACCTGAA GATT (SEQ ID NO:378)	CCCTTGCGCGAAGGTGAT (SEQ ID NO:379)
1930jxn3	GOA 1930 (3 His) 마우스-특이적	ATAGTCACAGTACCCATC C (SEQ ID NO: 380)	GTCTGCAACCTGAAGATT TTGC (SEQ ID NO:381)	CCCTTGCGCGAAGGTGAT (SEQ ID NO:382)

실시예 6.2. 히스티딘-치환된 보편적 경쇄를 가지는 마우스에서 항원에 대한 면역반응의 분석

[0875]

세포 표면 수용체("항원 A")를 면역원으로서 사용하여 CDR3에 4개의 히스티딘 치환을 가지는 Vk1-39 및 Jk5를 활용하여 사전-배열된 사람 카파 경쇄의 발현에 대해 이형접합성(이하 "HULC 1927")이거나 CDR3에 3개의 히스티딘 치환을 가지는 Vk1-39 및 Jk5를 활용하여 사전-배열된 사람 카파 경쇄의 발현에 대해 이형접합성(이하 "HULC 1930")인 마우스, 또는 동종접합성 WT 마우스를 면역화하였다. 사전-면역 혈청을 면역화 개시 전에 마우스들로부터 수집하였다. 면역원을 초기 프라이밍 면역화를 위해 보조제(Invivogen)로서 10 μ g의 CpG 올리고뉴클레오티드와 혼합된 2.35 μ g의 단백질로 25 μ l의 부피로 발바닥(f.p.)을 통해 투여하였다. 계속해서 마우스를 동일한 경로를 통해, 2.35 μ g의 항원 A를 보조제로서 10 μ g의 CpG 및 25 μ g의 Adju-Phos(Brenntag)와 함께 제 3, 6, 11, 13, 17, 20일에 총 6회의 추가면역을 위해 부스팅하였다. 마우스를 4번째와 6번째의 추가면역 후에 각각 15일과 22일 후에 출혈시켰다. 마우스들의 항혈청을 항원 A에 대한 항체 역가에 대해 분석하였다.

[0876]

면역원에 대한 항체 혈청 역가를 표준 ELISA에 의해 측정하였다. ELISA를 수행하기 위하여, 96-웰 미세역가 플레이트(Thermo Scientific)를 2 μ g/ml의 인산염-완충된 식염수(PBS, Irvine Scientific) 중의 항원 A로 4°C에서 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 0.05%의 트윈 20을 함유하고 있는 인산염-완충된 식염수(PBS-T, Sigma-Aldrich)로 플레이트 세척기(Molecular Devices)를 사용하여 4회 세척하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS 중의 250 μ l의 0.5% 소혈청 알부민(BSA, Sigma-Aldrich)으로 차단하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS-T로 4회 세척하였다. 면역된 마우스로부터의 혈청과 면역-전 혈청을 연속적으로 1:300 또는 1:1000에서 시작하여 0.5% BSA-PBS로 3-배 희석하여 차단된 플레이트에 이중으로 첨가한 후, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 마지막 2개의 웰을 블랭크로 남겨서 이차 항체 대조표준(바탕값 대조표준)으로서 사용하였다. 플레이트를 다시 PBS-T로 플레이트 세척기에서 4회 세척하였다. 그런 다음 염소 항-마우스 IgG-Fc-서양고추냉이 과산화효소(HRP) 포함된 이차 항체(Jackson Immunoresearch)를 1:5000/1:10,000 희석률로 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS-T로 8회 세척하고, 기질로서 TMB/H₂O₂를 사용하여 전개시켰다. 기질을 20분 동안 인큐ベ이션하고, 반응을 2N 황산(H₂SO₄, VWR, cat# BDH3500-1) 또는 1N 인산(JT Baker, Cat# 7664-38-2)을 사용하여 중단시켰다. 플레이트를 분광계(Victor, Perkin Elmer) 상에서 450nm에서 판독하였다. 항체 역가를 Graphpad PRISM 소프트웨어를 사용하여 컴퓨터화하였다.

[0877]

주입된 면역원에 대하여 마우스에서 유도된 면역반응을 항체 역가로서 표시하고, 그것을 가장 높은 혈청 희석률의 역수로 규정하고, 가장 높은 혈청 희석률에서 항원 결합 흡광도는 바탕값보다 2-배 더 높았다. 그러므로 수가 클수록 면역원에 대한 체액성 면역반응은 더 크다. 면역원에 대해 유도된 항체 역가는 HULC 마우스의 두 계통과 WT 마우스에서 매우 높았고, 계통 간에 관찰된 유의미한 차이는 없었다(도 24).

[0878]

실시예 6.3. pH-민감성 단클론성 항체의 제조

[0879]

면역원에 대한 원하는 면역반응이 HULC 마우스의 두 계통 및 WT 마우스에서 이루어졌을 때, 각 마우스 계통으로부터 비장 세포를 수득하고 마우스 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 제조하고, 그것을 96-웰 플레이트에서 성장시켰다. 10일 동안 성장시킨 후, 각 하이브리도마 세포-함유 웰로부터의 상층액을 면역원-특이적 ELISA를 통해 선별하여 포지티브 항원 결합 샘플을 확인하였다. ELISA에 대해서는, 96 웰 미세 역가 플레이트를 1 μ g/ml의 항-myc 단클론성 항체(Novus Biologicals, #NB600-34)로 밤새 4°C에서 코팅하여 myc-태그 항원을 고

정시킨 후 PBS 중의 0.5%(w/v) BSA 용액으로 차단하였다. 플레이트를 세척하고, 항원 용액을 플레이트에 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 코팅된 플레이트에 결합하도록 1시간 동안 실온에서 놓아두었다. 계속해서, 하이브리도마 웰로부터의 상층액을 웰에 1:50의 희석률로 첨가하고, 결합되도록 1시간 동안 실온에 놓아두었다. 플레이트 결합된 항체를 HRP에 포함된 항-마우스 IgG 다클론성 항체(Jackson Immunoresearch, #115-035-164)를 사용하여 검출하였다. TMB 기질을 플레이트에 첨가하고(BD Biosciences, #51-2606KC/51-2607KC), 비색 신호를 제조업체의 권장된 프로토콜을 따라 전개시켰다. 흡광도를 Victor Wallac 플레이트 판독기 상에서 450nm에서 기록하였다. 0.5보다 크거나 같은 OD를 가지는 것으로 규정된 항원 포지티브 샘플(기준선은 약 0.1의 OD를 가짐)에 대해 실시간 표면 플라스몬 공명 바이오센서(Biacore 4000)를 사용하여 친화성 선별을 수행하였다.

[0880]

중성 pH(pH 7.4) 및 산성 pH(pH 6.0)에서의 면역원에 대한 항체 결합에 대한 동역학적 결합 매개변수(예컨대 k_a , k_d , K_D , $t_{1/2}$ 등)를 기록하였다. Biacore CM4 센서 칩을 다클론성 염소 항-마우스 Fc 항체로 유도체화하여 상층액으로부터의 항체를 포획하였다. 그런 다음 단일 농도(100nM)의 면역원을 항체-포획된 표면 위로 $30\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 주입하였다. 항체-항원 결합을 1.5분 동안 모니터한 후 포획된 항체로부터의 항원의 해리를 2.5분 동안 모니터하였다. 동역학적 결합(k_a) 및 해리(k_d) 속도 상수를, Biacore 4000 Evaluation 소프트웨어 버전 1.0 을 사용하여 질량 수송 모델로 1:1 결합에 대한 데이터를 프로세싱하고 맞춤으로써 측정하였다. 평형 해리 상수(K_D) 및 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 동역학적 속도 상수로부터 다음과 같이 계산하였다: $K_D(\text{M})=k_d/k_a$; 및 $t_{1/2}(\text{분})=\ln 2/(60^*k_d)$. pH 7.4에서의 결합과 비교하여 pH 6.0에서 감소된 결합을 나타내는 샘플 세트(pH 민감성)뿐 아니라 pH 7.4와 pH 6.0 사이에서 유의미한 속도 변화를 나타내지 않는 대조표준 샘플 세트(pH 둔감성 대조표준)를 선택하여 클론에 의해 제조하였다. 도 25는 총 항원 포지티브의 수와 HULC 및 WT 마우스로부터의 pH-민감성 항원 결합을 나타내는 항원 포티지브의 수를 비교한 것을 도시한다.

[0881]

항원 포지티브 중에서 두 개의 이형접합성 HULC 1927 마우스와 두 개의 HULC 1930으로부터 각각 분리된 18 및 7 개의 클론과, WT 마우스로부터의 1개의 클론을 단클론으로 제조하였다. 단클론성 하이브리도마의 상층액에 대해 중성 및 낮은 pH 항원 해리 속도(오프-속도) 분석을 수행하였고, 세포 펠릿을 경쇄 가변 도메인 DNA 서열화에 대해 사용하였다.

[0882]

실시예 6.4. V κ 1-39J κ 5-기초 히스티딘 보편적 경쇄 마우스의 CDR3 영역에서의 서열화 및 체세포성 과돌연변이

[0883]

HULC 및 WT 마우스로부터의 단클론성 하이브리도마로부터의 세포 펠릿을 경쇄 가변 도메인 DNA 서열화를 위해 사용하였다. 26개의 클론으로부터 단클론을 만들고(상기 실시예 3.3 참조) 서열화를 수행하여, 15개가 HULC 또는 WT 마우스 경쇄(MM 및 NN, 표 4 참조)를 사용하는 것으로 확인하였다. 14개의 클론을 HULC 이형접합성 마우스(1927 또는 1930 마우스)로부터 유도하였고, 1개를 WT 마우스로부터 유도하였다.

[0884]

HULC 이형접합성 마우스로부터 유도된 14개의 항원 포지티브 샘플 중에서, 12개의 단클론성 항체가 그것들의 해당하는 HULC 경쇄를 활용한 반면, 2개는 WT 마우스 경쇄를 활용하였다. HULC를 활용하는 항체들은 하나를 제외한 전부가 표 3에서 알 수 있는 것과 같이 도입된 히스티딘 돌연변이를 모두 보유하였다(이탈릭체로 표시된 항체). 클론 AA의 서열화로 2개의 상이한 HULC 서열이 생성되었는데, 그것은 아래의 표 5에 두 개의 엔트리에 의해 반영된다.

표 5

[0885]

HULC 경쇄를 활용하는 클론으로부터의 경쇄 서열의 보존된 히스티딘 삽입 및 체세포성 과돌연변이의 수

HULC를 활용하는 마우스로부터의 경쇄 서열				
클론 명칭	마우스 계통	CDR3의 보존된 His 돌연변이의 수	프레임워크의 체세포성 과돌연변이의 수	CDR의 체세포성 과돌연변이의 수
AA (서열 1)	1927	4	3	0
AA (서열 2)	1927	4	1	1
BB	1927	4	3	3
CC	1927	4	0	0
DD	1927	3	1	1
EE	1927	4	2	2
FF	1927	4	0	1

GG	1927	4	1	1
HH	1927	4	2	0
II	1930	3	1	1
JJ	1930	3	4	5
KK	1930	3	1	2
LL	1930	3	1	0

[0886] 실시예 6.5. V κ 1-39J κ 5-기초 히스티딘 보편적 경쇄 마우스에서 생성된 단클론성 항체의 pH-의존성 결합

[0887] 추가로 HULC 및 WT 마우스로부터 분리된 단클론성 항체의 pH-의존성 결합 특성을 평가하기 위하여, 항체/항원 결합 단계를 중성 pH에서 관찰하고 항체/항원 해리 단계를 중성 또는 산성 pH에서 관찰하는 결합 실험을 수행하였다.

[0888] Biacore CM4 센서 칩을 다클론성 토끼 항-마우스 Fc 항체를 사용하여 유도체화하였다. 단클론성 항체 상층액이 항-마우스 Fc 센서 표면 위에 포획되었다. 두 개의 농도, 즉 50nM(이중으로) 및 16.7nM의 면역원을 단클론성 항체가 포획되어 있는 표면 위로 30μl/분의 유속으로 주입하였다. 항체-항원 결합을 pH 7.4에서 4분 동안 모니터한 후, 포획된 단클론성 항체로부터 항원의 해리를 pH 7.4 또는 6.0에서 15분 동안 모니터하였다. 해리(k_d) 속도 상수를 Scrubber 버전 2.0 곡선 맞춤 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하고 맞춤으로써 측정하였고, 그 결과를 표 6에 나타낸다. 해리성 반감기($t_{1/2}$)를 다음: $t_{1/2}(\text{분}) = (\ln 2 / k_d) / 60$ 과 같이 해리 속도 상수로부터 계산하고, 그 결과를 표 6에 나타낸다. 표 4에서 다양한 pH 조건 하에서 열거한 여러 항체의 결합/해리 특성을 나타내는 센서그램을 도 26에 그래프로 도시한다. 각 그래프에서 개별적인 라인들은 각각의 항체의 상이한 농도에서의 결합 반응을 나타낸다. 모든 실험은 25°C에서 수행하였다. 해리성 반감기($t_{1/2}$)는 각각의 센서그램 위에 표시한다. 반응은 RU로 측정한다.

표 6

[0889] 중성 및 낮은 pH에서 그것들의 면역원에 결합하는 단클론성 HULC 또는 WT 항체의 결합(k_d) 속도 상수 및 해리성 반감기($t_{1/2}$)

클론 명칭	사용된 경 쇄	pH 7.4 결합/pH 7.4 해리				pH 7.4 결합/pH 6.0 해리				pH 6.0/pH7.4 비 율	
		중성 mAb 포 획	결합된 50nM 면 역원 (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (분)	낮은 mab 포 획	결합된 50nM 면역 원 (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (분)	k_d	$t_{1/2}$
AA	HULC (1927)	129	70	5.60E-0 5	206	122	73	2.18E-0 4	53	3.9	0.3
BB	HULC (1927)	350	165	6.00E-0 4	19	378	185	2.20E-0 3	5	3.7	0.3
CC	HULC (1927)	611	251	2.03E-0 4	57	545	226	6.68E-0 3	2	33.0	0.03
DD	HULC (1927)	182	75	3.55E-0 4	33	168	74	6.44E-0 4	18	1.8	0.6
HH	HULC (1927)	268	92	1.36E-0 4	85	251	91	5.39E-0 4	21	4.0	0.3
GG	HULC (1927)	353	110	2.78E-0 4	42	328	102	8.97E-0 4	13	3.2	0.3
FF	HULC (1927)	334	202	4.79E-0 5	241	364	220	6.90E-0 5	167	1.4	0.7
EE	HULC (1927)	339	124	5.08E-0 4	23	299	120	4.66E-0 4	25	0.9	1.1
II	HULC (1930)	387	174	1.22E-0 4	95	334	147	2.14E-0 4	54	1.8	0.6
JJ	HULC (1930)	363	14	9.83E-0 4	12	333	12	5.30E-0 4	22	0.5	1.9
KK	HULC (1930)	490	303	7.41E-0 5	156	484	295	1.29E-0 4	90	1.7	0.6

LL	HULC (1930)	636	41	3.09E-0 4	37	597	36	5.77E-0 4	20	1.9	0.5
MM*	WT (1927 마우스)	245	6	NA	NA	203	6	NA	NA	NA	NA
NN	WT (1927 마 우스)	394	231	5.26E-0 4	22	378	231	9.35E-0 4	12	1.8	0.6
OO	WT	413	89	2.94E-0 4	39	400	83	3.57E-0 4	32	1.2	0.8

[0890] * k_d 와 $t_{1/2}$ 같은 낮은 항원 결합 신호로 인해 측정할 수 없었다.

실시예 7. 히스티딘-치환된 V κ 3-20J κ 1 보편적 경쇄를 포함하는 유전자 변형된 마우스의 공학적 제조

[0892] 통상적인 V κ 3-20J κ 1 경쇄를 포함하는 마우스를 예컨대 미국 특히 출원 13/022,759, 13/093,156, 13/412,936 및 13/488,628(각각 공개 번호 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 및 2013/0045492), 및 상기 실시예 1에 기술된 것과 같이 제조하였다. 생식선 보편적 V κ 3-20J κ 1 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 SEQ ID NO:383에 표시한다.

[0893] 히스티딘 치환을 V κ 3-20J κ 1 보편적 경쇄 표적화 벡터 안에 도입하고, V κ 1-39J κ 5 히스티딘 변형된 보편적 경쇄 마우스(HULC 1927 및 1930)에 대해 실시예 3에서 상술된 것과 유사한 전략을 사용하여 그 표적화 벡터로부터 마우스를 제조하였다.

[0894] 간단히 설명하면, 히스티딘-변형된 V κ 3-20J κ 1 보편적 경쇄 표적화 벡터를 제조하기 위한 전략은 도 29a 내지 도 29d에 요약되어 있다. pBS+FRT-Ub-Hyg-FRT+마우스 V κ 3-7 리더+사람 V κ 3-20J κ 1을 함유하고 있는 통상적(보편적) 경쇄 마우스("ULC 마우스", 예컨대 US2011/0195454A1)를 제조하기 위해 사용된 플라스미드를 부위 특정 돌연변이 생성(QuickChange Lightning 키트)에 의하여 Q105, Q106, Y107 및 S109 또는 Q105, Q106 및 S109(도 27의 배열 참조)를 CDR3의 히스티딘 잔기로 대체하기 위하여 도 28에 도시된 부위-특정 돌연변이 생성 프라이머를 사용하여 변형시켰다(이 공학처리 단계에 대해서는 도 29a 참조). 그 결과의 벡터(H105/106/107/109 및 H105/106/109)를 추가로 변형시키고 마우스 Ig κ 불변 영역, 마우스 인핸서, 마우스 3' 상동성 아암 및 SPEC 카세트를 포함하는 벡터에 결찰시켰다(도 29b). 추가의 변형은 5' 마우스 아암을 운반하고 Frt-UB-NEO-Frt 카세트를 포함하고 있는 벡터 안으로의 결찰을 포함하였다(도 29b). 그 결과의 표적화 벡터를 마우스 Ig κ 가변 유전자좌(κ 가변 및 연결용 유전자 절편을 포함함)의 결실을 포함하는 ES 세포 안에 일렉트로포레이션시켰다(도 29c 내지 29d).

[0895] 포지티브 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입된 공학처리된 V κ 3-20J κ 1 경쇄 영역에 특이적인 프로브를 사용하여 대립유전자 분석(Valenzuela et al.)을 변형시켜 사용함으로써 확인하였다. 분석에 사용한 프라이머와 프로브를 아래의 표 7에 제시하고, 서열 목록에 나타낸다; 프로브의 위치는 도 29c 내지 도 29d에 도시된다.

표 7

ES 세포 선별에 사용된 프라이머 및 프로브

프로브 명칭	분석	프로브 서열	5' 프라이머	3' 프라이머
Neo	GOA	TGGGCACAAACAGACAATCG GCTG (SEQ ID NO:362)	GGTGAGAGGCTATTCCGGC (SEQ ID NO:363)	GAACACGGCGGCATCAG (SEQ ID NO:364)
ULC-m1	GOA	CCATTATGATGCTCCATGC CTCTCTGTTC (SEQ ID NO:365)	AGGTGAGGGTACAGATAAGT GTATGAG (SEQ ID NO:366)	TGACAAATGCCCTAAATTATAAGT GATCA (SEQ ID NO:367)
1635h2 (V κ 3-20J κ 1 특이 적)	GOA	AAAGAGCCACCCCTCTCCTG CAGGG (SEQ ID NO:389)	TCCAGGCACCCCTGTCTTTG (SEQ ID NO:390)	AAGTAGCTGCTGCTAACACTCT GACT (SEQ ID NO:391)
mIgKd2	보유	GGCACATTCCATGGGTTTC (SEQ ID NO:371)	GCAAACAAAAACCACTGGCC (SEQ ID NO:372)	CTGTTCCCTCTAAACTGGACTC CACAGTAAATGGAAA (SEQ ID NO:373)

mIgKp15	보유	GGGCACTGGATACGATGTA TGG (SEQ ID NO:374)	CACAGCTTGTGCAGCCTCC (SEQ ID NO:375)	AGAAGAAGCCTGTACTACAGCA TCCGTTTACAGTCA (SEQ ID NO:376)
---------	----	---	--	---

[0897] 표적화 구성물에 의해 도입된 NEO 선택 카세트는 FLP를 발현하는 플라스미드로 ES 세포를 형질전환시킴으로써 결실된다(도 29c 및 도 29d). 임의로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스로 사육함으로써 제거될 수 있다(예컨대 US 6,774,279). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

[0898] 상기에서 기술된 표적화된 ES 세포를 공여 ES 세포로서 사용하여 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배에 도입하였다(예컨대 미국 특허 7,294,754 및 Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotype analyses *Nature Biotech.* 25(1):91-99). 서열을 따라 하나 또는 그 이상의 위치에 돌연변이된 히스티딘 잔기를 함유하는 공학처리된 사람 경쇄 유전자를 독립적으로 내포하고 있는 VELOCIMICE®를 상기 기술된 표적화된 ES 세포로부터 만들었다.

[0899] 새끼를 유전형 분류하고 공학처리된 히스티딘-변형된 사람 경쇄에 대해 이형접합성인 새끼를 선택하여 발현된 항체의 경쇄의 발현 및 결합 능력의 특성을 확인하였다. 3개(H105/106/109; "6183") 또는 4개 (H105/106/108/111; "6181")의 히스티딘 변형을 가지는 보편적 경쇄 유전자를 특이하게 포함하고 있는 마우스의 유전형 분류에 대한 프라이머 및 프로브는 표 8에 열거하고, 서열 목록에 나타낸다. 그것들의 보편적 경쇄에 히스티딘 변형을 함유하고 있는 마우스를 본원에서는 "HULC" 마우스(히스티딘 보편적 경쇄 마우스)로 언급한다.

표 8

유전형 분류에 사용된 프라이머 및 프로브

프로브 명칭	분석	프로브 서열	5' 프라이머	3' 프라이머
hVI494-1	GOA 6181 (4 His) 마우스-특이적	CTGTCATCACCATGG (SEQ ID NO:392)	GCAGACTGGAGCCTGAAG ATTTT (SEQ ID NO:393)	CCGAACGTCCAAGGTGAGTG (SEQ ID NO:394)
hVI495-1	GOA 6183 (3 His) 마우스-특이적	TACTGTCATCACTATGG (SEQ ID NO:395)	GCAGACTGGAGCCTGAAG ATTT (SEQ ID NO:396)	CCGAACGTCCAAGGTGAGTG (SEQ ID NO:397)

[0900] 마우스를 관심의 항원으로 면역시키고, pH-의존성 결합을 가지는 항체를 생성하는 능력에 대해 시험한다.

[0901] 실시예 8. 히스티딘-치환된 단일 재배열된 사람 보편적 경쇄 마우스(HULC)를 포함하고 있는 마우스의 사육

[0902] [0903] 이 실시예는 여러 다른 유전자 변형된 마우스가 다수의 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 은닉하고 있는 다수의 유전자 변형된 마우스 계통을 제조하기 위하여 본원에 기술된 HULC 마우스 중 어떠한 하나로 사육될 수 있다는 것을 설명한다.

[0904] 내인성 Igλ 농아웃(KO). 공학처리된 경쇄 유전자좌의 이용을 최대화하기 위하여, 상기 기술된 HULC 동물들(예컨대 Vκ 1-39J κ 5 또는 Vκ 3-20J κ 1 히스티딘-치환된 보편적 경쇄를 포함함) 중 어느 것이든지 내인성 λ 경쇄 유전자좌가 결실되어 있는 다른 마우스로 사육될 수 있다. 이런 방식으로, 얻어진 자손은 그것의 유일한 경쇄로서, 상기 실시예 3 및 4에서 설명된 것과 같이, 재배열된 히스티딘-치환된 사람 생식선 경쇄 영역을 발현할 것이다. 사육은 해당 기술분야에 인지되어 있는 표준 기법에 의해 수행되고, 또는 다르게는 상업적인 사육자(예컨대 The Jackson Laboratory)에 의해 수행된다. 공학처리된 히스티딘-치환된 경쇄 유전자좌와 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 결실을 내포하고 있는 마우스 계통을 독특한 경쇄 영역의 존재 및 내인성 마우스 λ 경쇄의 부재에 대해 선별한다.

[0905] 인간화된 내인성 중쇄 유전자좌. 공학처리된 사람 생식선 경쇄 유전자좌를 내포하고 있는 마우스(HULC 마우스)를 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자 유전자좌가 사람 중쇄 가변 유전자 유전자좌로 대체되어 있는 마우스와 교배시켰다(US 6,596,541; VELOCIMMUNE® 마우스, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). VELOCIMMUNE® 마우스는 내인성 마우스 불변 영역 유전자좌에 작동가능하게 연결된 사람 중쇄 가변 영역을 포함함으로써 마우스가 항원 자극에 대한 반응으로 사람 중쇄 가변 도메인과 마우스 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 생성하게 되는 계놈을 포함한다.

[0906] 내인성 마우스 중쇄 가변 영역 유전자좌가 사람 중쇄 가변 영역 유전자좌로 대체되어 있고 히스티딘-치환된 단일 재배열된 사람 경쇄 가변 영역을 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 내포하고 있는 마우스가 얻어진다. 히스티딘-치환된 단일 사람 경쇄(HULC, 사람 경쇄 가변 도메인과 마우스 C_L)를 포함하는 체세포성 돌연변이된 중쇄(사람 중쇄 가변 도메인 및 마우스 C_H)를 함유하는 역 키메릭 항체는 관심의 항원으로 면역화할 때 얻어진다. 그런 마우스에서 생성된 pH-의존성 사람 항체는 해당 기술분야에 공지되어 있거나 상기 기술된 항체 분리 및 선별 방법을 사용하여 확인된다. 항체, 예컨대 pH-민감성 항체를 발현하는 B 세포의 가변 경쇄 및 중쇄 영역 뉴클레오티드 서열을 확인하고, 전체 사람 항체는 적당한 발현 시스템에서 가변 중쇄 및 경쇄 영역 뉴클레오티드 서열을 각각 사람 C_H 및 C_L 뉴클레오티드 서열과 융합함으로써 만들어진다.

[0907] 실시예 9. 유전자 변형된 마우스의 자손

[0908] 상기 기술된, 한정된 레퍼토리의 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열 또는 단일한 재배열된 사람 경쇄 가변 영역 서열을 포함하고 있는 공학처리된 사람 생식선 경쇄 유전자좌를 내포하고 있는 마우스(HULC 마우스)를 본원에서 기술된 히스티딘-변형된 사람 중쇄 가변 유전자 유전자좌를 함유하는 마우스와 교배한다. 마우스가 얻어지고, 히스티딘-변형된 사람 경쇄 가변 영역을 함유하고 있는 경쇄 서열과 히스티딘-변형된 사람 중쇄 가변 영역을 함유하고 있는 중쇄 서열의 존재는 유전형 분류에 의해 확인된다.

[0909] 히스티딘-변형된 중쇄(사람 히스티딘-변형된 중쇄 가변 도메인 및 마우스 C_H) 및 히스티딘-변형된 단일 사람 경쇄(HULC, 사람 히스티딘-변형된 경쇄 가변 도메인 및 마우스 C_L)을 함유하고 있는 역 키메릭 항체는 관심의 항원으로 면역화할 때 얻어진다. 그런 마우스에서 생성된 pH-의존성 사람 항체는 해당 기술분야에 공지되거나 상기에서 기술된 항체 분리 및 선별 방법을 사용하여 확인한다. 항체, 예컨대 pH-민감성 항체를 발현하는 B 세포의 가변 경쇄 및 중쇄 영역 뉴클레오티드 서열을 확인하고, 전체 사람 항체는 적당한 발현 시스템에서 가변 중쇄 및 경쇄 영역 뉴클레오티드 서열을 사람 C_H 및 C_L 뉴클레오티드 서열에 각각 융합시킴으로써 만든다.

[0910] 동등물

[0911] 당업자들은 기본적인 실험 이상의 것을 사용하지 않아도 본원에 기술된 본 발명의 특정 구체예의 많은 동등물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 그런 동등물은 다음의 청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다. 기술된 발명은 그것의 특정 구체예와 관련하여 기술되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고 다양한 변화가 이루어질 수 있으며 동등물이 치환될 수 있다는 것이 당업자들에게 인지되어야 한다. 또한, 많은 변형이 특정 상황, 재료, 물질의 조성, 과정, 과정의 단계 또는 단계들을 기술된 발명의 객관적인 사상 및 범주에 채택시키기 위하여 이루어질 수 있다. 그런 모든 변형은 첨부되는 청구범위의 범주 내에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

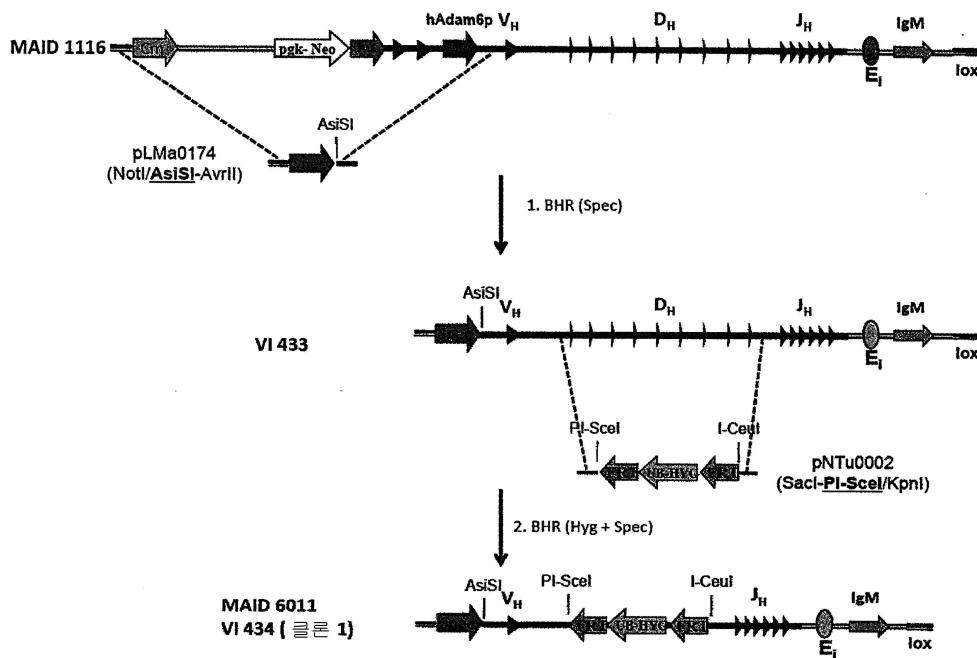
도면 1a

	종지	SEQ ID NO.	친수성	SEQ ID NO.	소수성	SEQ ID NO.
D1-1	VQLER	8	YNWND	45	GTTGT	88
HD1-1	VPLAR	9	YHWHD	46	GTTGT	88
D1-7	V*LEL	-	YNWNY	47	GITGT	89
HD1-7	VSLAL	10	YHWHY	48	GITGT	89
D1-20	V*LER	-	YNWND	45	GITGT	89
HD1-20	VSLAR	11	YHWHD	46	GITGT	89
D1-26	V*WELL	12	YSGSY	49	GIVGAT	90
HD1-26	VSWEPL	13	YHGS HY	50	GIMGAT	91
D2-2*02	RIL**YQLLY	14	GYCSSTSCYT	51	DIVVPAAI	92
HD2-2*02	RTL*SYQLPY	15	GHCSHTSCHT	52	DIVVIPAAI	93
D2-8*01	RILY*WCMLY	16, 17	GYCTNGVCYT	53	DIVLMVYAI	94
HD2-8*01	RTLYSWCMPPY	18	GHCTHGVCHT	54	DIVLMVYAI	94
D2-15	RIL*WW*LLL	-	GYCSGGSCYS	55	DIVVVVAAT	95
HD2-15	RTL*SW*LPL	-	GHCSHGSCHS	56	DIVVMAAT	96
D2-21*02	SILWW*LLF	19	AYCGGDYCYS	57	HIVVTAI	97
HD2-21*02	STLWWSLPF	20	AHC GGHC HS	58	HIVVTAI	97
D3-3*01	VLRFLEWL LY	21	YYDFWSGYYT	59	ITIFGVII	98
HD3-3*01	VSPFLEWSLY	22	YHHFWSGHYT	60	ITIFGVII	98
D3-9	VLRYFDWLL*	23	YYDILTGYN	61	ITIP*LVII	99, 100
HD3-9	VSPYFDWSL*	24	YHHILTGHYN	62	ITIP*LVII	99, 100
D3-10*01	VLLWFGELL*	25	YYYGSGSYNN	63	ITMVRGVII	101
HD3-10*01	VSPWFGEGL*	26	YHHGSGSHYN	64	ITMVRGVII	101
D3-16*02	VL*LRLGELSLY	27	YYDYWGGSYRT	65	IMITFGGVIVI	102
HD3-16*02	VS*SRLGESSLY	28	YHHDHWGSHRYT	66	IMITFGGVIVI	102
D3-22	VLL***WLL	29	YYYDSSGYYY	67	ITMIVVIT	103
HD3-22	VSLS**WSLL	30, 31	YHYHSSGHHY	68	ITIVVIT	104
D4-4	*LQ*L	-	DYSNY	69	TTVT	105
HD4-4	*PQSL	32	DHSHY	70	TTVT	105
HD4-11p	*LQ*L	-	DYSNY	69	TTVT	105

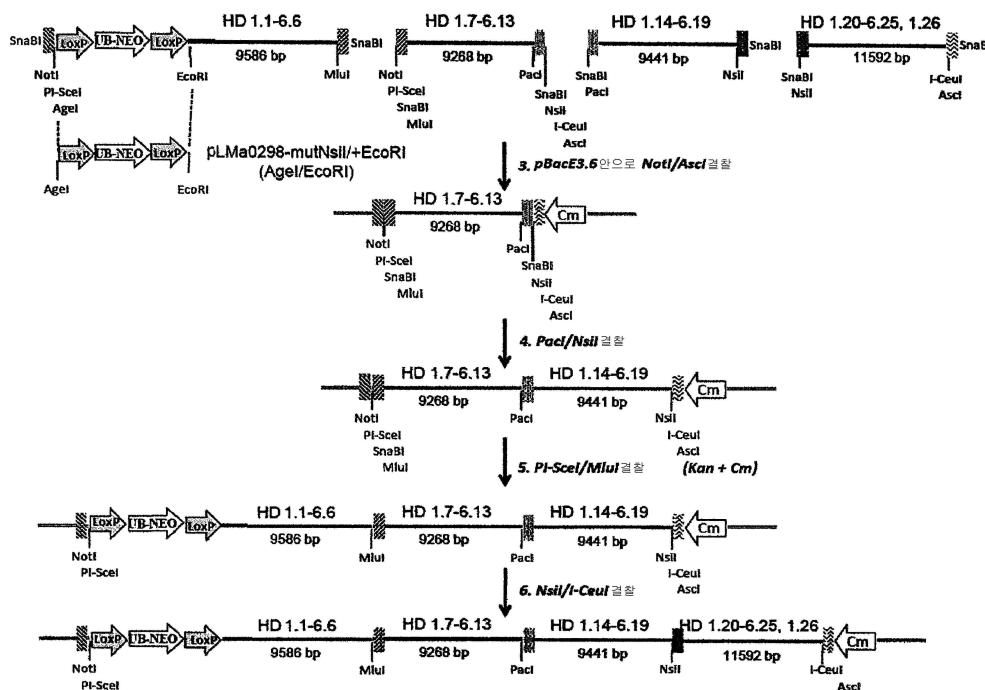
도면 1b

	종지	SEQ ID NO.	친수성	SEQ ID NO.	소수성	SEQ ID NO.
HD4-11p	*PQSL	32	DHSHY	70	TTVT	105
D4-17	*LR*L	-	DYGDY	71	TTVT	105
HD4-17	*PRSL	33	DHGHY	72	TTVT	105
D4-23p	*LRW*L	-	DYGGNS	73	TTVVT	106
HD4-23p	*PRWSL	34	DHGGHS	74	TTVVT	106
D5-5	WIQLWL	35	GYSYGY	75	VDTAMV	107
HD5-5	WTQPWL	36	GHSHGY	76	VDTAMV	107
D5-12	WI*WLRL	37	GYSGYDY	77	VDIVATI	108
HD5-12	WT*WPPL	38	GHSGHHY	78	VDIVATI	108
D5-18	WIQLWL	35	GYSYGY	75	VDTAMV	107
HD5-18	WTQPWL	36	GHSHGY	76	VDTAMV	107
D5-24p	*RWLQL	39	RDGYN Y	79	VEMATI	109
HD5-24p	*TWPPPL	40	RHGHHY	80	VDMATI	110
D6-6	V*QLV	-	EYSSSS	81	SIAAR	111
HD6-6	A*PLV	-	EHSHSS	82	SIATR	112
D6-13	V*QQLV	41	GYSSSWY	83	GIAAG	113
HD6-13	A*PQLV	42	GHSHSWY	84	GIATAG	114
D6-19	V*QWLV	43	GYSSGWY	85	GIAVAG	115
HD6-19	A*PWLV	44	GHSHGHWY	86	GIAMAG	116
D6-25	V*QRL	-	GYSSGY	87	GIAAA	117
HD6-25	A*PRL	-	GHSHGY	76	GIATA	118

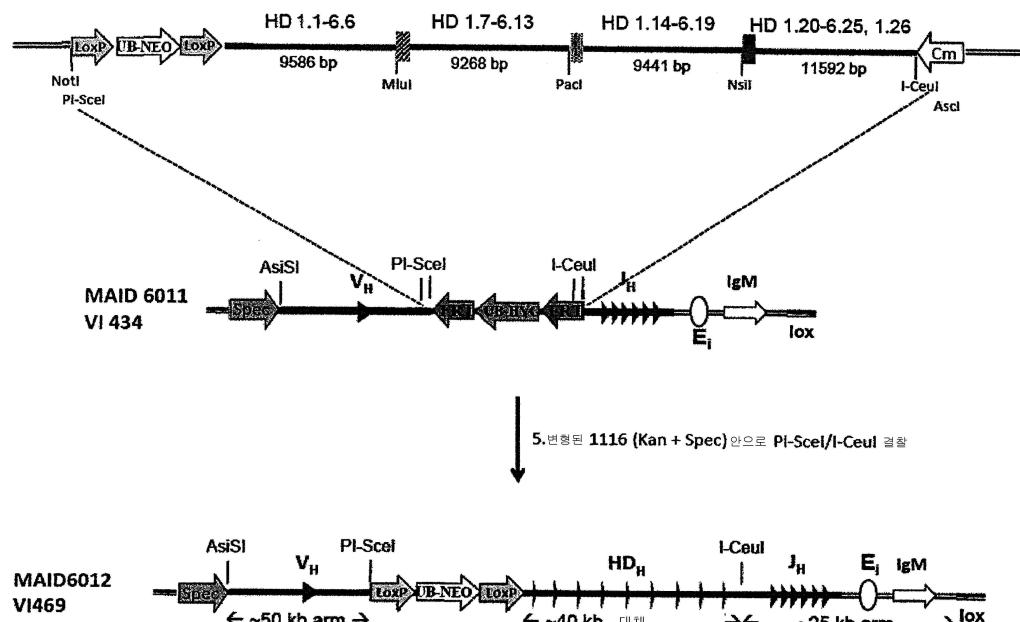
도면2



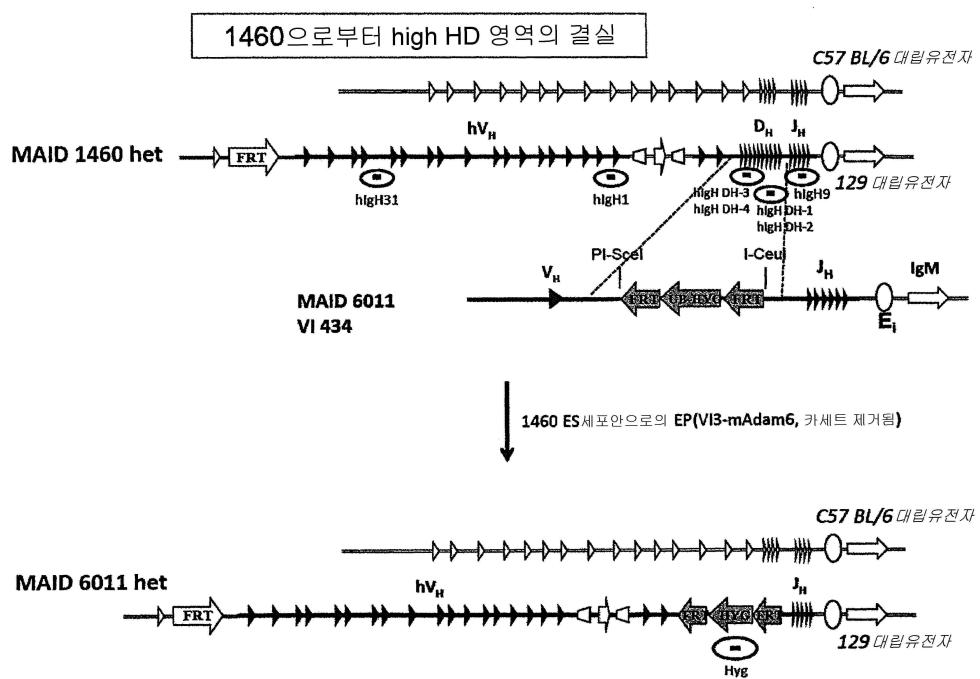
도면3



도면4



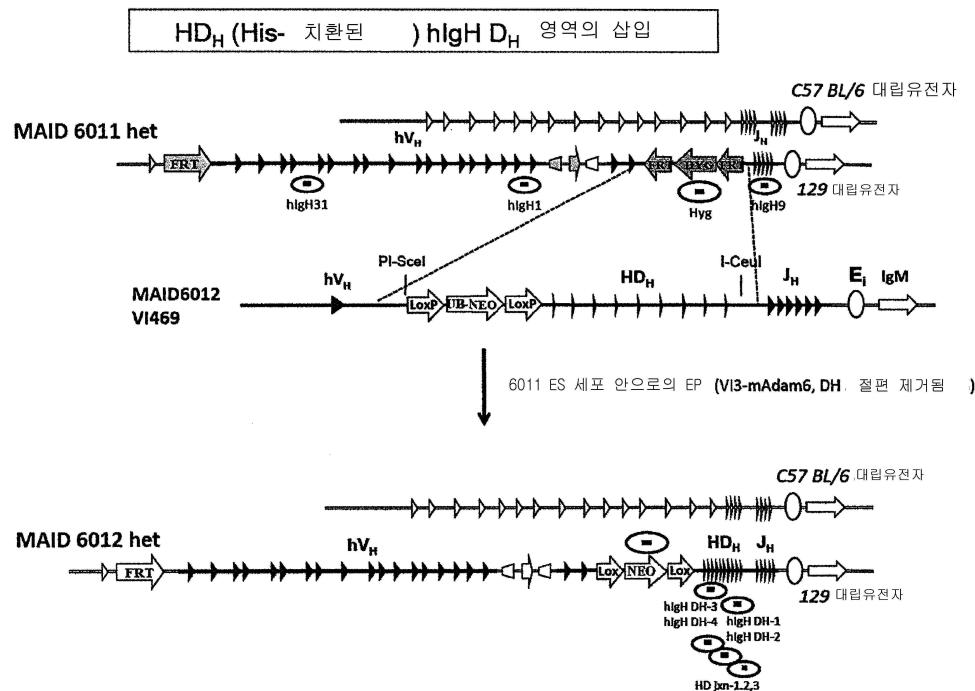
도면5



도면6

MAID 6011에 대한 프로브 (MAID 1460에 서 hIgHD 절편의 결합)						
명칭	전방 프라이머	프로브	역 프라이머	유형	표지	
hIgH DH-1	CGGGTCACTGCCATTCTG (SEQ ID NO: 119)	TCTGCATTCGCTCCAGCGC (SEQ ID NO: 120)	TCTGGGCATGAACCCAAT (SEQ ID NO: 121)	LOA	FAM-BHQ 1	hIgHD 절편
hIgH DH-2	GTGCAGGGAGGACCTTCTG (SEQ ID NO: 122)	AGTCACCAAGCACAGAGCCCTGAC (SEQ ID NO: 123)	GCCAGGGAGTTGCCTAGTG (SEQ ID NO: 124)	LOA	FAM-BHQ 1	hIgHD 절편
hIgH DH-3	GTGGCCCCACTTCCCTTCCT (SEQ ID NO: 125)	CAGCTGGAACCCACCATGACCT (SEQ ID NO: 126)	GACCTGCCTCGGATGACA (SEQ ID NO: 127)	LOA	FAM-BHQ 1	hIgHD 절편
hIgH DH-4	TGGCCAGAACTGACCCTAC (SEQ ID NO: 128)	ACCGACAAGAGTCCCCTCAGG (SEQ ID NO: 129)	GGAGTCGGCTCTGGATGTG (SEQ ID NO: 130)	LOA	BHQ-plus	hIgHD 절편
hyg	TGCGGGCGATCTTAGCC (SEQ ID NO: 131)	ACGAGCGGGTTGGCCCATTC (SEQ ID NO: 132)	TTGACCGATTCTTGGCGG (SEQ ID NO: 133)	GOA	FA-BHQ 1	
hIgH1	CAGTCCC GTT GAT CCAGCC (SEQ ID NO: 134)	CCCATCAGGGATT TGT ATCT GT GGACG (SEQ ID NO: 135)	GGATATGCAGC ACT GTGCCAC (SEQ ID NO: 136)	AR		hIgH
hIgH9	T CCT CCAACGACAGGTCCC (SEQ ID NO: 137)	TCCCTGGAAC TCT GCCCCGACACA (SEQ ID NO: 138)	GATGAACTGACGGGCACAGG (SEQ ID NO: 139)	AR		hIgH
hIgH31	ATCACACTCATCCCATCCCC (SEQ ID NO: 140)	CCCTTCCC TAAGTACCA CAGAGTGG GCTC (SEQ ID NO: 141)	CACAGGGAA GCAGCAGGA CTGC (SEQ ID NO: 142)	AR		hIgH

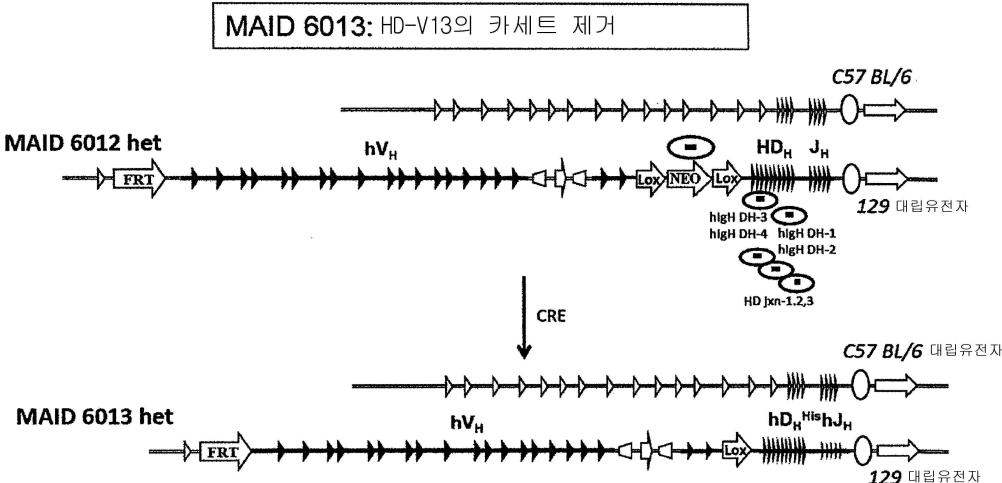
도면7



도면8

MAID 6012에 대한 프로브 (HD의 삽입, His-치환된 hIgH DH 절편)						
영칭	전방 프라이머	프로브	역 프라이머	유형	표지	위치
hys	TGCGGCCGATCTTAGCC (SEQ ID NO: 131)	ACGAGCGGGTTGGCCCCATTG (SEQ ID NO: 132)	TTGACCGATTCCTTGCGG (SEQ ID NO: 133)	LOA	FAM-BHQ1	
HD jxn-1	GGAGCCAGGCAGGACACA (SEQ ID NO: 143)	TGGGCTCGTAGTTGACGT (SEQ ID NO: 144)	GGGACTTCTAACCCACA CTTCA (SEQ ID NO: 145)	GOA	MGB	HD 절편의 합성 링커-1
HD jxn-2	GGTCCCAGGCACTTTAATTAAA C (SEQ ID NO: 146)	CCTCGAAATGGAACCTAC (SEQ ID NO: 147)	GGGAGAGCAACCATTCG TTGT (SEQ ID NO: 148)	GOA	MGB	HD 절편의 합성 링커-2
HD jxn-3	CCGAGCACCGATGCACTCA (SEQ ID NO: 149)	CGCAGTCATGTAATGC (SEQ ID NO: 150)	GGGAGGCGAAGTGAAGCTG TCA (SEQ ID NO: 151)	GOA	MGB	HD 절편의 합성 링커-3
hIgH DH-1	CGGGTCACTGCCATTCTG (SEQ ID NO: 119)	TCTGCATTGCTCCCAGCGC (SEQ ID NO: 120)	TCTGCAGCATGAAACCAA T (SEQ ID NO: 121)	GOA	FAM-BHQ1	hIgH D 절편
hIgH DH-2	TGTCAGGGAGGACCTCTG (SEQ ID NO: 122)	AGTCACCAAGCACAGAGCCCTGA C (SEQ ID NO: 123)	GCCAGGGAGTTGCCTAG TG (SEQ ID NO: 124)	GOA	FAM-BHQ1	hIgH D 절편
hIgH DH-3	GTGGCCCCACTCCCTTCCT (SEQ ID NO: 125)	CAGCTGAAACCCACATGACCT (SEQ ID NO: 126)	GACCTGCTCGGATGACA (SEQ ID NO: 127)	GOA	FAM-BHQ1	hIgH D 절편
hIgH DH-4	TGCCCCAGAACTGACCCCTAC (SEQ ID NO: 128)	ACCGACAAGAGTCCCAGG (SEQ ID NO: 129)	GGAGTCGGCTCTGGATGTG (SEQ ID NO: 130)	GOA	BHQ-plus	hIgH D 절편
neo	GGTGGAGAGGCTATTGGC (SEQ ID NO: 152)	TGGGCACAAACAGACAATCGGCTG (SEQ ID NO: 153)	GAACACGGCGGCATCG (SEQ ID NO: 154)	GOA	FAM-BHQ1	
hIgH1	CAGTCCCGTTGATCCAGCC (SEQ ID NO: 134)	CCCATCAGGGATTGTATCTC TGTTGGACG (SEQ ID NO: 135)	GGATATGCGACTGTGCC AC (SEQ ID NO: 136)	AR		hIgH
hIgH9	TCTCTAACGACAGGTCCC (SEQ ID NO: 137)	TCCCTGAACTGCCCCGACACA (SEQ ID NO: 138)	GATGAAGTACGGGCACA GG (SEQ ID NO: 139)	AR		hIgH
hIgH91	ATCACACTCATCCCATCCCC (SEQ ID NO: 140)	CCCTTCCCTAACGTACCAAGAGTG GGCTC (SEQ ID NO: 141)	CACAGGGAAGCAGGAAC TC (SEQ ID NO: 142)	AR		hIgH

도면9



도면10a

사람 D 유전자 절편		직접 5'-3' 방향	SEQ ID NO.	반전된 방향	SEQ ID NO.
IGHD1-1	X97051, IGHD1-1*01	ggataactggaaacgac G T T G T V Q L E R Y N W N D	155 88 8 45	gtcggtccaggatgttacc V V P V V S F Q L Y R S S C T	206 207 208 209
IGHD1-7	X13972, IGHD1-7*01	ggataactggaaactac G I T G T V * L E L Y N W N Y	156 89 - 47	gtatgtttccaggatatacc V V P V I * F Q L Y S S S Y T	210 211 212 213
IGHD 1-20	X13972, IGHD1-14*01	ggataacccggaaaccac G I T G T V * P E P Y N R N H	157 89 - 158	gigggtttccgggttatacc V V P V I W F R L Y G S G Y T	214 211 215 216
IGHD 1-20	X97501, IGHD1-20*01	ggataactggaaacgac G I T G T V * L E R Y N W N D	159 89 - 45	gtcggtccaggatatacc V V P V I S F Q L Y R S S Y T	217 211 208 218
IGHD1-26	X97501, IGHD1-26*01	ggatagtggtggaggtactac G I V G A T V * W E L L Y S G S Y Y	160 90 12 49	gtatgttagctccactatacc V V A P T I * * L P L Y S S S H Y T	219 220 221 222
IGHD2-2	J00232, IGHD2-2*01	aggatatgttagatgttaccatcgatgttacc R I L * Y Q L L C G Y C S S T S C Y A D I V V V V P A A M	161 162 163 164	ggcatagcagtcgtgttaccatataatcc G I A A G T T T I S A * Q L V L L Q Y P H S S W Y Y Y N I	223 224 225 226

도면10b

사람 D 유전자 절편		직접 5'-3' 방향	SEQ ID NO.	반전된 방향	SEQ ID NO.
IGHD2-2	X97051, IGHD2-2*02	aggatatgttagatgttaccatcgatgttacc R I L * Y Q L L C G Y C S S T S C Y T D I V V V V P A I	165 14 51 92	ggatagcagtcgtgttaccatataatcc G I A A G T T T I S V * Q L V L L Q Y P Y S S W Y Y Y N I	227 224 225 226
	M35648, IGHD2-2*03	ggatatgttagatgttaccatcgatgttacc W I L * Y Q L L C G Y C S S T S C Y A D I V V V V P A M	166 167 168 169	ggatagcagtcgtgttaccatataatcc G I A A G T T T I S A * Q L V L L Q Y P H S S W Y Y Y N I	228 224 225 226
IGHD2-8	X13972, IGHD2-8*01	aggatatgttaccatgttgtatgttacc R I L Y W C M L Y G Y C T N G V C Y T D I V L M V Y A I	170 16, 17 53 94	ggatagcatacaccatgttaccatataatcc G I A Y T I S T I S V * H T P L V Q Y P Y S I H H * Y N I	229 230 231 232
	J00233, IGHD2-8*02	aggatatgttaccatgttgtatgttacc R I L Y W W C M L Y G Y C T G G V C Y T D I V L V V Y A I	171 172 173 174	ggatagcatacaccatgttaccatataatcc G I A Y T T S T I S V * H T P P V Q Y L Y S I H H Q Y N I	233 234 235 236
IGHD2-15	J00234, IGHD2-15*01	aggatatgttagtggttaccatcgatctcc R I L * W W * L L L G Y C S G G S C Y S D I V V V V A A T	175 - 55 95	ggatagcagtcgttaccatataatcc G V A A T T T T I S E * Q L P P L Q Y P S S S Y H H Y N I	237 238 239 240
IGHD2-21	J00235, IGHD2-21*01	aggatatgttggttaccatcgatctcc S I L W W * L L F A Y C G G D C Y S H I V V V I A I	176 19 57 177	ggatagcaatcaccatccatataatcc G I A I T T T I C E * Q S P P Q Y A N S N H H H N M	241 242 243 244
	X97051, IGHD2-21*02	aggatatgttggttaccatcgatctcc S I L W W * L L F A Y C G G D C Y S H I V V V T A I	178 19 57 97	ggatagcagtcgttaccatataatcc G I A V T T T I C E * Q S P P Q Y A N S S H H H N M	245 246 247 248

도면10c

사람 D 유전자 절편		직접 5'-3' 방향	SEQ ID NO.	반전된 방향	SEQ ID NO.
IGHD3-3	X13972, IGHD3-3'01	gtatcacgttttgggggtttataacc V L R F L E W L L Y Y Y D F W S G Y Y T I T I F G V V I I	179 21 59 98	ggtaataaaaccacccaaaaatcgtaatac G I I T T P K I V I V * * P L Q K S * Y Y N N H S K N R N	249 250 251 252
	X93618, IGHD3-3'02	gtatcacgttttgggggtttataacc V L A F L E W L L Y Y Y H F W S G Y Y T I S I F G V V I I	180 181 182 183	ggtaataaaaccacccaaaaatcgtaatac G I I T T P K M L I V * * P L Q K C * Y Y N N H S K N A N	253 254 255 256
IGHD3-8	X13972, IGHD3-9'01	gtatcacgttttgggggtttataacc V L R Y F D W L L * Y Y D I L T G Y Y N I T I F * L V I I	184 23 61 99, 100	gtatataaccaggccaaaatcgtaatac V I I T S Q N I V I L * * P V K I S * Y Y N N Q S K Y R N	257 258 259 260
	X13972, IGHD3-10'01	gtatcacgttttgggggtttataacc V L L W F G E L L * Y Y Y G S G Y Y N I T M V R G V I I	185 25 63 101	gtatataactccccgaaccatcgtaatac V I I T P R T I V I L * * L P E P * * Y Y N N S P N H S N	261 262 263 264
IGHD3-10	X93615, IGHD3-10'02	gtatcacgttttgggggtttataacc V L L C S G S Y Y N Y Y Y V R G V I I I T M F G R L L *	186 187 188 189	gtatataactccccgaaccatcgtaatac V I I T P R T * * Y L * * L P E H S N Y N N S P N I V I	265 266 267 268
	X93614, IGHD3-16'01	gtatataactccccgaaccatcgtaatac V L L T R L G E L C L Y Y Y D Y V W G S Y A Y T I M I T F G G V M L I	190 191 192 193	gtatataagcataaactccccaaacgttaatcgtaatac G I S I T P P N V I I I V * A * L P Q T * S * Y Y K H N S P K R N H N	269 270 271 272
IGHD3-16	X93616, IGHD3-22'01	gtatataactccccgaaccatcgtaatac V L L * * W L L L Y Y Y D S S G Y Y Y I T M I V V V I T	194 29 67 103	gtatataaccactatactatcgtaatac V V I I T T I I V I * * * P L L S * * Y S N N H Y Y H S N	273 274 275 276

도면10d

사람 D 유전자 절편		직접 5'-3' 방향	SEQ ID NO.	반전된 방향	SEQ ID NO.
IGHD4-4	X13972, IGHD4-4'01	tgactacagtaactac * L Q * L D Y S N Y T T V T	195 - 69 105	gtatgtatcgtagtc V V T V V * L L * S S Y C S	277 278 - 279
	X13972, IGHD4-11'01	tgactacagtaactac * L Q * L D Y S N Y T T V T	195 - 69 105	gtatgtatcgtagtc V V T V V * L L * S S Y C S	277 278 - 279
IGHD4-17	X97501, IGHD4-17'01	tgactacggtgactac * L R * L D Y G D Y T T V T	196 - 71 105	gtatgtatcgtagtc V V T V V * S P * S S H R S	280 278 - 281
	X97501, IGHD4-23'01	tgactacggtgactac * L R W * L D Y G G N S T T V V T	197 - 73 106	ggagttaccacccgtatcg G V T T V V E L P P * S S Y H R S	282 278 283 284 285
IGHD5-5	X13972, IGHD5-5'01	gtggatacagctatcgatc V D T A M V W I Q L W L G Y S Y G Y	198 107 35 75	gtatccatagcgatccac V T I A V S * P * L Y P N H S C I H	286 287 - 288
IGHD5-12	X13972, IGHD5-12'01	gtggatacagctatcgatc V D I V A T I W I * W L R L G Y S G Y D Y	199 108 37 77	gtatcgtagccactatacc V I V A T I S * S * P L Y P N R S H Y I H	289 290 291 292
IGHD5-18	X97051, IGHD5-18'01	gtggatacagctatcgatc V D T A M V W I Q L W L G Y S Y G Y	198 107 35 75	gtatccatagcgatccac V T I A V S * P * L Y P N H S C I H	286 287 - 288

도면 10e

사람 D 유전자 절편		직접 5'-3' 방향	SEQ ID NO.	반전된 방향	SEQ ID NO.
IGHD5-24	X97051, IGHD5- 24'01	gttagagatggctacaattac V E M A T I * R W L Q L R D G Y N Y	200 110 39 79	gtaaatgtggccatctcac V V I V A I S * L * P S L N C S H L Y	293 294 - 295
IGHD6-6	X13972, IGHD6-6'01	gatgtatagcagcgctcgcc E Y S S S S S I A A R V * Q L V	201 81 112 -	ggacgaggctgcataactc G R A A I L D E L L Y T S C Y T	296 297 298 299
IGHD6-13	X13972, IGHD6- 13'01	gggtatagcagcgctggtaac G Y S S S W Y G I A A A G V * Q Q L V	202 83 114 41	gtaccaggctgcataacc V P A A A I P Y Q L L L Y T S C C Y T	300 301 302 303
IGHD6-19	X97051, IGHD6- 19'01	gggtatagcagtggtggtaac G Y S S G W Y G I A V A G V * Q W L V	203 85 116 44	gtaccaggccatgcataacc V P A T A I P Y Q P L L Y T S H C Y T	304 305 306 307
IGHD6-25	X97051, IGHD6- 25'01	gggtatagcagcgccatc G Y S S G Y G I A A A V * Q R L	204 87 116 -	gtaccggcgtgcataacc V A A A I P * P L L Y S R C Y T	308 309 310 311
IGHD7-27	J00256, IGHD7- 27'01	ctaactggggaa L T G * L G N W G	205 - - -	tccccagttag S P V P Q L P S *	312 - - -

도면11

항체 서열 1

```

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-34*01
><-----PWR1-----><-----CDR1----->
Q V Q L Q Q W G A G L L K P S D T L S L T C A V Y G G S F S
CAGGTGCACTACAGCAGTGGGCCGAGAACGTTGTCAGCTCCGGATACCCTGTGCTCCTACACTGGCGCTGTCATAEggTGGTGGGCTCTCAGT
.....G.....
Q V Q L Q Q W G A G L L K P S D T L S L T C A V Y G G S F S

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-34*01
-----><-----PWR2-----><-----CDR2-----><----->
G Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I G E B I N H S G S T N Y N
GGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGAATTCATCATAGTGGAAAGCACCAACTACACAC
.....G.....
G Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I G E B I N H S G S T N Y N

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-34*01
-----><-----PWR3----->
P S L K S R V T I S V D T S K N O F S L K L S S V T A A D T
CCGTCCTCTCAAGAAGTCGAGTCACCATATTCAGTAGACACGTCACAGTCAGTCTCCCTGAGCTGAGCTCTGTGACCCCGACAGCAGC
.....P.....
P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-34*01
----->
A V V Y C A G H S H G W Y Y Y Y G H D V W G Q G T T T V T V
GCTGGGGATTACTGGCGGGCAATACCGCTGGTACTACGACTACTACGGTGGACGCTCTGGGCCAAGGGACCAACGGTACACCGC
.....A.....
A V V Y C A (SEQ ID NO:314)

lcl|Query_1_reversed
IGHV6*02
----->
S S (SEQ ID NO:313)
TCCCTCA 473 (SEQ ID NO:312)
.....62.....

```

D 유전자 절편	친수성	SEQ ID NO.
D6-19	GYSSGKY	85
HD6-19	GHSHGKY	86

도면12

항체 서열 2

(SEQ ID NO:316) Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S
 (SEQ ID NO:315) CAGGTGCAGCTCCAGGACTCGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACACACCCCTCACCCTGCACACTGTCCTCGGCTCCATCAGC

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S

DR1-----><-----FWR1-----><-----C
S G G Y Y W S W I R Q H P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T Y
AGTCGCGGTTACTACTGGACCTGGATCGGCCAGCACCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGAATTGGGTACATCTATTACACTGGGACCACTAC

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

S G G Y Y W S W I R Q H P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T Y

-----FWR2-----><-----CDR2-----><
Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A
TACACCCGTCCTCAAGAGTCAGTTACCATATCGACAGTCAGAACCCAGCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGGCGC

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A

-----FWR3----->
D T A V Y Y C A R G D H G H Y D Y W G Q G T L V T V S S
GACACGCCGCTGTATTACTGTGCGAGGGGGCACCAAGGTCACTACGACTACTGGGCCAGGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCAG 471
D T A V Y Y C A (SEQ ID NO:317) 296

lcl|Query_1_reversed
IGHJ5*02

----->.....16
.....48

D 유전자 절편	친수성	SEQ ID NO.
D4-17	DYGDY	71
HD4-17	DHGHY	72

도면13

항체 서열 3

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S
CAGGTGCAGCTCCAGGACTCGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACACACCCCTCACCCTGCACACTGTCCTCGGCTCCATCAGC

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S

DR1-----><-----FWR1-----><-----CDR2-----><
S S S Y Y W G W I R Q P P G K G L E W I G S I Y Y S G S T Y
AGTAGACTACTGTGGCTGGATCGGCCAGCCCAGGGAGGGCTGGAGTGGAGTATCTATAGTGGAGCACCTAC

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

S S S Y Y W G W I R Q P P G K G L E W I G S I Y Y S G S T Y

-----FWR2----->
Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A
TACACCCGTCCTCAAGAGTCAGACTCCATATCGCTAGACAGTCAGAACCCAGCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCGCCA

lcl|Query_1_reversed
IGHV4-39*01

Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A

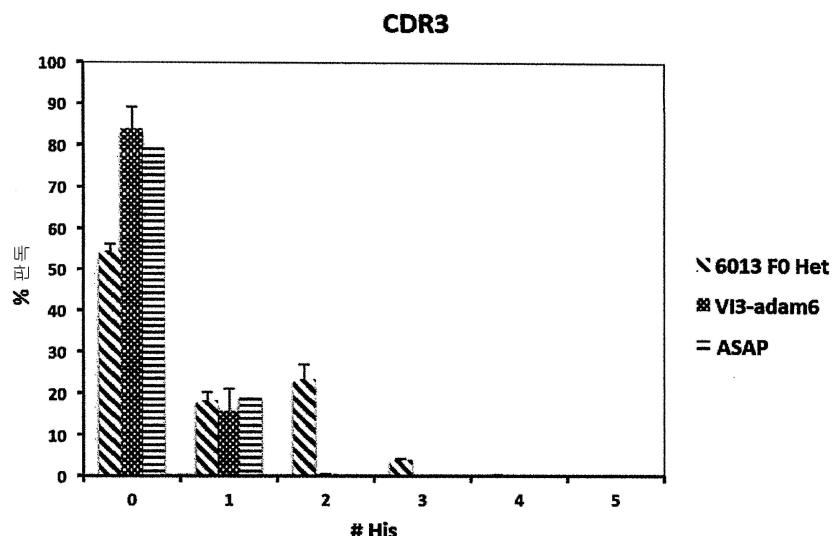
-----FWR3----->
D T A V Y Y C A R H E G H S H L N N F D P W G Q G G G T L V T
GACACGCCGCTGTATTACTGTGCGAGACAGAACGGGCTAACCCACTTAAGTGGTTGACCCCTGGGCCAGGGGGAAACCCCTGGCAC
D T A V Y Y C A R (SEQ ID NO:320)

lcl|Query_1_reversed
IGHJ5*02

V S S (SEQ ID NO:319)
GTCCTCCAG 471 (SEQ ID NO:318)
..... 51

D 유전자 절편	친수성	SEQ ID NO.
D6-13	GYSSSWY	83
HD6-13	GHSHSWY	84

도면14



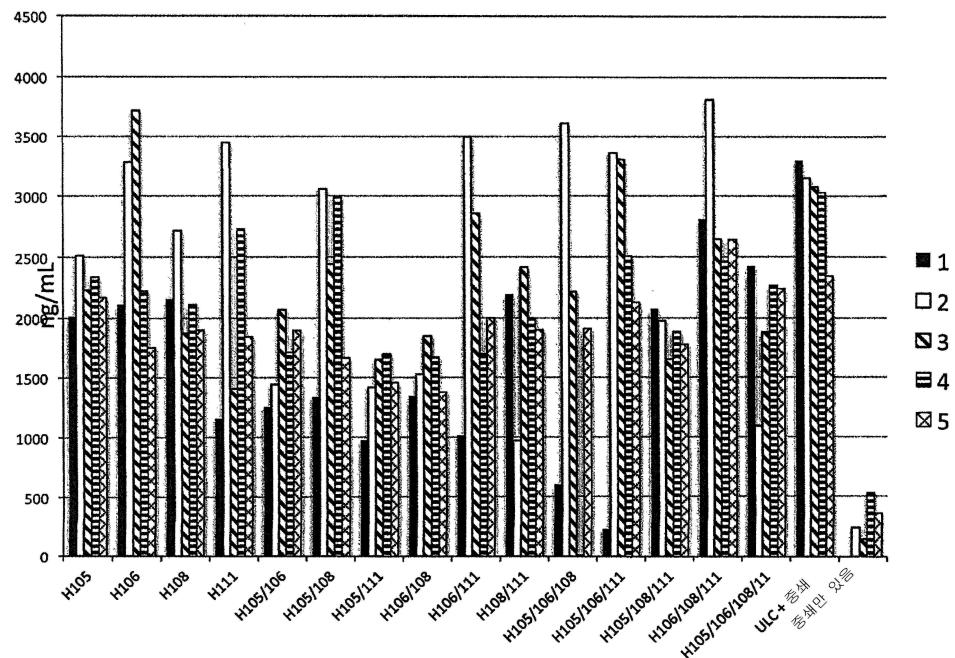
도면15

IGKV1-39*01 | -----FR1-IMGT----- || CDR1 || -----FR2-IMGT--- || C || -----
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQSISYYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 AF...T.H.....I....V....YT....
 BA.....I..NF.....G.YN....
 CHN.NN.....H.....N....
 D
 EA....T....N.....N....D....
 F
 GA..L.....N....D.....
 HA.....N.N..H.....D..F....
 IA..L.....
 JA.....M.....
 KA..L.....
 -----FR3-IMGT----- || CDR3-|| SEQ ID NO:325
 IGKV1-39*01 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST-P-----
 AA.....T.....NI..FTFGPGTKVDIKR
 BI....H----.LTFGGGTTKVEIKR
 CY....T.H....GN.....SMYTFGQGTTQLEIKR
 DH.....I..ITFGQGTRLEIKR
 EH..I..ITFGQGTRLEIKR
 FT..H.....H..ITFGQGTRLEIKR
 GT.....H..ITFGQGTRLEIKR
 HP.ITFGQGTRVEIKR
 IK.....IH.ITFGQGTTKLEIKR
 JH.IP.ITFGQGTRLEIK.
 KT.....R.....H..P.ITFGQGTTKVEIKR

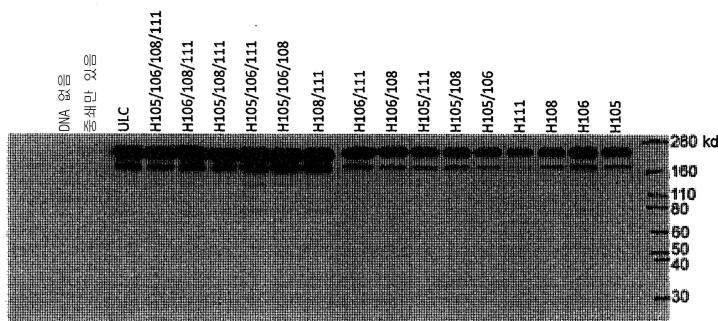
도면16

	105	106	108		111		
	Q	Q	S	Y	S	T	P
WT	CAG	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:327
							SEQ ID NO:326
H105/106/108/111	H	H	S	H	S	T	H
	CAC	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:329
							SEQ ID NO:328
H105	CAC	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
H106	CAG	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
H108	CAG	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
H111	CAG	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
H105/106	CAC	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
H105/108	CAC	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
H105/111	CAC	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
H106/108	CAG	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
H106/111	CAG	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
H108/111	CAG	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
H105/106/108	CAC	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
H105/106/111	CAC	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
H105/108/111	CAC	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
H106/108/111	CAG	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC

도면17



도면18



도면19a

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.7에서의 동역학						pH			
		mAb 포획 수준 (RU)	결합률 100nM 환경 (RU)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	% (%)	mAb 포획 수준 (RU)	결합률 100nM 환경 (RU)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	% (%)	k _a	k _d	KD	
H4H606	H105	44	11	4.25E+05	1.18E-03	2.77E-09	10	32	5	1.27E+06	2.05E-03	1.61E-09	6	3.0	1.7	0.8	
	H106	46	12	4.42E+05	9.52E-04	2.11E-09	12	27	4	1.35E+06	1.72E-03	1.10E-09	7	3.5	1.8	0.5	
	H108	46	12	4.51E+05	9.02E-04	2.00E-09	13	33	5	1.35E+06	1.47E-03	1.28E-09	8	2.5	1.6	0.6	
	H111	47	13	3.86E+05	9.54E-04	2.47E-09	12	36	5	8.81E+05	1.52E-03	1.73E-09	8	2.3	1.6	0.7	
	H105	16	1	NB	NB	NB	6	-4	NB	NB	NB	NB					
	H105	108	40	11	4.83E+05	8.73E-04	1.81E-09	13	30	4	1.54E+06	1.26E-03	8.20E-10	9	3.1	1.4	0.5
	H105	108	22	4	3.81E+05	1.32E-03	3.45E-09	9	16	-2	NB	NB	NB				
	H106	108	51	15	4.87E+05	7.60E-04	1.56E-09	15	40	8	1.16E+06	1.04E-03	8.96E-10	11	2.4	1.4	0.6
	H106	111	38	9	3.94E+05	9.00E-04	2.28E-09	13	29	2	1.55E+06	1.60E-03	1.09E-09	7	3.9	1.8	0.5
	H108	111	51	14	3.98E+05	8.29E-04	2.08E-09	14	40	6	8.42E+05	1.19E-03	1.42E-09	10	2.1	1.4	0.7
	H105	108	14	1	NB	NB	NB	9	-5	NB	NB	NB					
	H105	108	15	1	NB	NB	NB	10	-5	NB	NB	NB					
	H105	108	111	15	1	NB	NB	NB									
	H105	108	17	2	4.38E+05	9.60E-04	2.19E-09	12	12	-5	NB	NB	NB				
	H10	108	40	10	3.72E+05	7.42E-04	2.00E-09	16	30	2	NB	NB	NB				
	H105	108	108	15	1	NB	NB	NB	9	-6	NB	NB	NB				
	I-39	ULC	72	22	3.90E+05	1.18E-03	3.03E-09	10	56	11	7.89E+05	1.84E-03	2.39E-09	6	2.0	1.6	0.8

도면19b

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.7에서의 동역학						pH			
		mAb 포획 수준 (RU)	결합률 100nM 환경 (RU)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	% (%)	mAb 포획 수준 (RU)	결합률 100nM 환경 (RU)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	% (%)	k _a	k _d	KD	
H4H608	H105	79	21	3.47E+05	1.09E-03	3.15E-09	11	62	8	5.15E+05	3.54E-03	6.87E-09	3	1.5	3.2	2.2	
	H106	60	13	3.19E+05	1.92E-03	6.02E-09	6	48	2	1.92E+06	2.48E-02	1.29E-08	0	6.0	12.9	2.1	
	H108	84	20	2.89E+05	2.66E-03	9.17E-09	4	1	-5	NB	NB	NB	NB				
	H111	77	19	3.28E+05	1.54E-03	4.69E-09	8	60	5	4.96E+05	7.85E-03	1.58E-08	1	1.5	5.1	3.4	
	H105	106	30	4	3.39E+05	9.91E-04	2.92E-09	12	-1	-7	NB	NB	NB				
	H105	106	77	20	3.16E+05	1.40E-03	4.45E-09	8	62	6	4.76E+05	5.41E-03	1.14E-08	2	1.5	3.9	2.6
	H105	108	44	11	3.51E+05	4.10E-04	1.17E-09	28	34	0	NB	NB	NB				
	H106	108	81	18	2.99E+05	2.20E-03	7.34E-09	5	66	4	3.87E+05	1.16E-02	3.01E-08	1	1.3	5.3	4.1
	H108	111	87	19	3.05E+05	1.64E-03	5.38E-09	7	73	5	4.34E+05	6.96E-03	1.60E-08	2	1.4	4.2	3.0
	H105	111	85	22	3.42E+05	1.63E-03	4.76E-09	7	70	5	3.94E+05	8.00E-03	2.03E-08	1	1.2	4.9	4.3
	H105	106	29	4	3.53E+05	9.63E-04	2.73E-09	12	24	-5	NB	NB	NB				
	H105	106	32	5	2.87E+05	9.83E-04	3.43E-09	12	26	-5	NB	NB	NB				
	H105	108	39	9	3.47E+05	3.26E-04	9.38E-10	35	32	-2	NB	NB	NB				
	H106	108	57	11	2.72E+05	1.63E-03	5.99E-09	7	46	-1	NB	NB	NB				
	H105	106	36	6	2.93E+05	1.05E-03	3.58E-09	11	29	-5	NB	NB	NB				
	I-39	ULC	128	33	3.02E+05	1.86E-03	6.15E-09	6	103	13	3.24E+05	5.67E-03	1.75E-08	2	1.1	3.1	2.8

도면 19c

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.7에서의 동역학						낮은/중성 pH		
		mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
H105	73	0	NB	NB	NB	NB	62	-8	NB	NB	NB	NB				
H106	64	0	NB	NB	NB	NB	54	-9	NB	NB	NB	NB				
H108	75	1	NB	NB	NB	NB	64	-8	NB	NB	NB	NB				
H111	73	0	NB	NB	NB	NB	62	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 106	45	0	NB	NB	NB	NB	38	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 108	65	0	NB	NB	NB	NB	56	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 111	34	0	NB	NB	NB	NB	27	-9	NB	NB	NB	NB				
H106 108	77	0	NB	NB	NB	NB	67	-9	NB	NB	NB	NB				
H106 111	75	0	NB	NB	NB	NB	67	-9	NB	NB	NB	NB				
H108 111	66	0	NB	NB	NB	NB	56	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 106 108	54	0	NB	NB	NB	NB	46	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 106 111	47	0	NB	NB	NB	NB	41	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 108 111	37	0	NB	NB	NB	NB	31	-9	NB	NB	NB	NB				
H106 108 111	69	0	NB	NB	NB	NB	59	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 106 108 111	54	0	NB	NB	NB	NB	49	-9	NB	NB	NB	NB				
1-39 ULC	97	0	NB	NB	NB	NB	88	-9	NB	NB	NB	NB				

도면 19d

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.7에서의 동역학						낮은/중성 pH		
		mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
H105	327	23	1.43E+05	8.40E-03	5.89E-08	1	318	2	IC	IC	IC	IC				
H106	303	26	9.67E+04	3.40E-03	3.52E-08	3	289	11	9.46E+04	2.08E-02	2.20E-07	1	1.0	6.1	6.3	
H108	287	29	1.37E+05	2.46E-03	1.80E-08	5	268	12	7.69E+04	1.32E-02	1.71E-07	1	0.6	5.4	9.5	
H111	311	21	1.31E+05	6.83E-03	5.20E-08	2	292	0	NB	NB	NB	NB				
H105 106	285	17	9.65E+04	6.20E-03	6.43E-08	2	262	-3	NB	NB	NB	NB				
H105 108	271	21	1.23E+05	9.82E-03	7.99E-08	1	262	-3	NB	NB	NB	NB				
H105 111	221	11	2.37E+05	2.11E-02	8.88E-08	1	216	-6	NB	NB	NB	NB				
H105 108	344	28	1.04E+05	6.66E-03	6.38E-08	2	316	3	IC	IC	IC	IC				
H105 111	341	25	1.16E+05	9.09E-03	7.81E-08	1	321	2	IC	IC	IC	IC				
H108	300	20	9.64E+04	1.01E-02	1.05E-07	1	274	-4	NB	NB	NB	NB				
H105 106 108	269	10	1.31E+05	2.52E-02	1.93E-07	0	243	-8	NB	NB	NB	NB				
H105 106 111	286	5	6.34E+04	5.06E-02	7.99E-07	0	265	-9	NB	NB	NB	NB				
H105 108 111	309	13	3.26E+05	3.47E-02	1.06E-07	0	279	-8	NB	NB	NB	NB				
H105 108 111	315	9	1.55E+05	5.89E-02	3.81E-07	0	279	-8	NB	NB	NB	NB				
H105 106 108 111	260	0	NB	NB	NB	NB	238	-10	NB	NB	NB	NB				
1-39 ULC	386	32	1.30E+05	2.05E-03	1.58E-08	6	362	17	7.58E+04	7.97E-03	1.05E-07	1	0.6	3.9	6.6	

도면19e

HC	VK mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은/중성 pH		
		mAb 포획 항원 (RU)	결합된 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t½ (분)	mAb 포획 항원 (RU)	결합된 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD	
H4H3010	H105	52	8	1.06E+05	7.43E-04	7.04E-09	16	43	-1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	50	9	1.26E+05	3.54E-04	2.82E-09	33	40	0	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	50	8	9.29E+04	2.43E-04	2.62E-09	48	42	-1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H111	55	11	1.53E+05	1.66E-04	1.09E-09	69	48	2	IC	IC	IC	IC	IC		
	H105	55	10	1.31E+05	5.18E-04	3.94E-09	22	45	1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	48	8	8.96E+04	4.58E-04	5.12E-09	25	41	-1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	38	6	8.85E+04	1.64E-04	1.85E-09	70	32	-3	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	59	11	1.06E+05	1.61E-04	1.52E-09	72	52	2	4.79E+05	1.00E-06	2.09E-12	11550	4.5	0.0	0.0
	H106	76	7	6.81E+04	5.23E-04	7.68E-09	22	72	0	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	58	11	1.17E+05	9.26E-05	7.92E-10	125	52	2	IC	IC	IC	IC	IC		
	H105	67	13	1.11E+05	3.17E-04	2.86E-09	36	58	4	IC	IC	IC	IC	IC		
	H105	70	8	6.45E+04	9.94E-04	1.54E-08	12	57	-1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	49	8	8.52E+04	1.10E-04	1.29E-09	105	44	-1	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	54	3	1.02E+04	1.46E-03	1.44E-07	8	46	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	70	6	7.28E+04	5.55E-03	7.61E-08	2	62	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	I-39	ULC	83	15	1.02E+05	1.79E-04	1.77E-09	64	77	7	2.11E+05	1.00E-06	4.74E-12	11550	2.1	0.0

도면19f

HC	VK mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은/중성 pH		
		mAb 포획 항원 (RU)	결합된 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t½ (분)	mAb 포획 항원 (RU)	결합된 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD	
H4H3029	H105	71	8	1.41E+05	2.96E-04	2.10E-09	39	60	-3	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	72	8	1.50E+05	2.39E-04	1.59E-09	48	64	-2	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	68	7	1.19E+05	7.97E-05	6.70E-10	145	61	-2	NB	NB	NB	NB	NB		
	H111	69	8	1.50E+05	1.78E-04	1.19E-09	65	63	-2	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	88	10	1.60E+05	2.45E-04	1.53E-09	47	77	0	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	67	8	1.45E+05	1.14E-04	7.84E-10	102	59	-3	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	13	0	NB	NB	NB	14	-11	NB	NB	NB	NB	NB			
	H106	92	10	1.34E+05	1.34E-04	9.98E-10	86	82	0	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	85	5	5.82E+04	1.10E-03	1.89E-08	10	78	-4	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	62	7	1.48E+05	1.73E-04	1.17E-09	67	55	-4	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	85	10	1.36E+05	1.97E-04	1.46E-09	59	75	0	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	78	6	1.35E+05	2.18E-03	1.61E-08	5	70	-4	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	55	6	1.50E+05	2.48E-04	1.65E-09	47	48	-5	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	73	4	8.60E+04	1.59E-03	1.85E-08	7	66	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	95	7	1.19E+05	6.71E-03	5.66E-08	2	85	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	I-39	ULC	108	12	1.34E+05	1.65E-04	1.23E-09	70	98	2	IC	IC	IC	IC		

도면 19g

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						% 차이/증정 pH			
		mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 활원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t _{1/2} (분)	mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 활원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t _{1/2} (분)	ka	kd	KD	
H445978	H105	44	7	3.88E+05	5.73E-03	1.48E-08	2	41	-5	NB	NB	NB	NB	NB			
	H106	36	7	3.15E+05	3.03E-03	9.62E-09	4	34	-5	NB	NB	NB	NB	NB			
	H108	38	8	3.18E+05	9.61E-04	3.02E-09	12	32	-4	NB	NB	NB	NB	NB			
	H111	43	8	3.19E+05	2.32E-03	7.40E-09	5	40	-5	NB	NB	NB	NB	NB			
	H105	106	33	4	2.69E+05	5.41E-03	2.01E-08	2	29	-9	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	108	34	7	2.13E+05	2.15E-03	1.01E-08	5	30	-7	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	111	32	5	3.47E+05	6.27E-03	1.81E-08	2	30	-8	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	108	50	10	3.67E+05	3.09E-03	8.42E-09	4	46	-4	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	111	62	12	2.88E+05	4.47E-03	1.55E-08	3	56	-2	NB	NB	NB	NB	NB		
	H108	111	45	9	3.22E+05	2.05E-03	6.37E-09	6	43	-4	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	106	36	5	3.57E+05	7.48E-03	2.10E-08	2	35	-8	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	106	39	7	3.37E+05	8.35E-03	2.48E-08	1	35	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	108	29	4	2.94E+05	4.52E-03	1.54E-08	3	28	-8	NB	NB	NB	NB	NB		
	H106	108	41	7	3.12E+05	6.37E-03	2.04E-08	2	39	-6	NB	NB	NB	NB	NB		
	H105	106	50	9	2.97E+05	6.83E-03	2.30E-08	2	45	-5	NB	NB	NB	NB	NB		
	1-39	ULC	74	16	2.92E+05	1.73E-03	5.91E-09	7	67	3	1.20E+06	9.67E-03	8.05E-09	1	4.1	5.6	1.4

도면 19h

HC	V _k mut	pH 7.2에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						% 차이/증정 pH				
		mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 활원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t _{1/2} (분)	mAb 포획 활원 (RU)	결합된 100nM 활원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t _{1/2} (분)	ka	kd	KD		
H445981	H105	121	24	3.04E+05	8.81E-03	2.90E-08	1	112	7	4.47E+05	6.21E-02	1.39E-07	0	1.5	7.1	4.8		
	H106	113	29	2.41E+05	2.99E-03	1.24E-08	4	103	10	6.84E+05	1.89E-02	2.76E-08	1	2.8	6.3	2.2		
	H108	114	31	3.09E+05	2.83E-03	9.16E-09	4	104	11	5.06E+05	1.33E-02	2.65E-08	1	1.6	4.7	2.9		
	H111	104	26	3.45E+05	3.98E-03	1.15E-08	3	96	4	4.54E+05	6.26E-02	1.38E-07	0	1.3	15.8	12.0		
	H105	109	26	2.39E+05	3.10E-03	1.29E-08	4	103	9	5.00E+05	1.77E-02	3.53E-08	1	2.1	5.7	2.7		
	H105	108	109	27	2.91E+05	4.48E-03	1.54E-08	3	97	7	1.00E+06	9.77E-02	9.76E-08	0	3.4	21.8	6.3	
	H105	111	85	16	2.62E+05	7.59E-03	2.90E-08	2	80	-1	NB	NB	NB	NB				
	H106	108	121	33	2.33E+05	2.71E-03	1.16E-08	4	115	14	3.88E+05	1.19E-02	3.07E-08	1	1.7	4.4	2.6	
	H106	111	117	32	2.29E+05	2.28E-03	9.97E-09	5	113	13	3.71E+05	8.88E-03	2.40E-08	1	1.6	3.9	2.4	
	H108	111	93	24	3.39E+05	4.04E-03	1.19E-08	3	87	3	4.54E+05	5.11E-02	1.12E-07	0	1.3	12.7	9.4	
	H105	106	108	94	25	2.24E+05	1.23E-03	5.47E-09	9	85	8	4.94E+05	3.02E-03	6.12E-09	4	2.2	2.5	1.1
	H105	106	111	24	2.31E+05	4.65E-03	2.01E-08	2	100	4	1.94E+05	8.05E-02	4.15E-07	0	0.8	17.3	20.6	
	H105	108	111	83	21	2.60E+05	5.20E-03	2.00E-08	2	79	1	NB	NB	NB				
	H106	108	100	28	2.11E+05	2.23E-03	1.05E-08	5	93	6	4.26E+05	1.83E-02	4.29E-08	1	2.0	8.2	4.1	
	H105	106	108	104	24	2.46E+05	5.05E-03	2.05E-08	2	98	2	IC	IC	IC	IC			
	1-39	ULC	133	34	2.80E+05	3.40E-03	1.22E-08	3	124	13	4.29E+05	1.42E-02	3.30E-08	1	1.5	4.2	2.7	

도면19i

HC	Vκ mut	pH 7.20에서의 동역학					pH 5.75에서의 동역학					낮은/증설 pH				
		mAb 포획 항원(RU)	결합 100nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t½ (분)	mAb 포획 항원(RU)	결합 100nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD	
H4H5999	H105	87	8	5.04E+04	1.18E-03	2.34E-08	10	78	-5	NB	NB	NB	NB	-	-	
	H106	72	7	1.04E+05	6.40E-04	6.17E-09	18	66	-7	NB	NB	NB	NB	-	-	
	H108	77	6	3.47E+04	1.47E-03	4.23E-08	8	72	-8	NB	NB	NB	NB	-	-	
	H111	77	6	1.39E+05	4.59E-03	3.31E-08	3	71	-8	NB	NB	NB	NB	-	-	
	H105	105	85	8	9.95E+04	3.69E-04	3.71E-09	31	77	-6	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	108	71	6	2.60E+03	8.63E-04	3.32E-07	13	63	-7	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	111	51	3	9.81E+03	7.03E-03	7.16E-07	2	47	-10	NB	NB	NB	NB	-	-
	H106	108	80	6	4.81E+04	4.78E-04	9.94E-09	24	71	-10	NB	NB	NB	NB	-	-
	H106	111	91	9	3.28E+04	6.44E-04	1.96E-08	18	85	-6	NB	NB	NB	NB	-	-
	H108	111	70	6	3.98E+04	2.01E-03	5.05E-08	6	65	-9	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	106	79	5	4.95E+04	5.53E-04	1.12E-08	21	74	-10	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	106	74	8	1.92E+04	4.59E-04	2.39E-08	25	68	-6	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	108	56	4	1.03E+03	4.18E-03	4.04E-06	3	52	-10	NB	NB	NB	NB	-	-
	H106	108	74	5	8.96E+03	1.66E-03	1.86E-07	7	66	-9	NB	NB	NB	NB	-	-
	H105	106	79	7	1.73E+04	9.49E-04	5.50E-08	12	75	-9	NB	NB	NB	NB	-	-
	I-39	ULC	110	10	5.01E+05	4.02E-03	8.02E-09	3	100	-5	NB	NB	NB	NB	-	-

도면19j

HC	Vκ mut	pH 7.20에서의 동역학					pH 5.75에서의 동역학					낮은/증설 pH					
		mAb 포획 항원(RU)	결합 100nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t½ (분)	mAb 포획 항원(RU)	결합 100nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD		
H4H6011	H105	150	22	1.15E+05	3.17E-04	2.77E-09	36	147	6	7.61E+04	1.00E-06	1.31E-11	11550	0.7	0.0	0.0	
	H106	127	17	8.73E+04	3.46E-04	3.96E-09	33	119	2	4.89E+04	1.00E-06	2.05E-11	11550	0.6	0.0	0.0	
	H108	124	15	7.56E+04	5.90E-04	7.80E-09	20	112	-4	NB	NB	NB	NB	-	-	-	
	H111	135	17	1.08E+05	5.59E-04	5.19E-09	21	128	0	NB	NB	NB	NB	-	-	-	
	H105	106	130	18	1.03E+05	3.91E-04	3.81E-09	30	123	3	1.89E+05	2.33E-04	1.23E-09	49	1.8	0.6	0.3
	H105	108	117	16	9.29E+04	5.24E-04	5.64E-09	22	110	-2	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H105	111	109	16	1.06E+05	4.39E-04	4.15E-09	26	105	0	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H106	108	105	8	6.95E+04	4.86E-04	7.00E-09	24	100	-8	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H106	111	171	16	3.07E+05	1.44E-03	4.69E-09	8	163	0	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H108	111	133	16	9.17E+04	6.20E-04	6.76E-09	19	126	-3	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H105	106	135	10	6.11E+04	6.93E-04	1.13E-08	17	132	-8	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H105	106	117	12	6.52E+04	8.99E-04	1.38E-08	13	111	-3	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H105	108	129	16	9.95E+04	5.82E-04	5.85E-09	20	121	-3	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H106	108	124	11	2.36E+04	8.53E-04	3.62E-08	14	118	-6	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	H105	106	144	14	3.65E+04	9.51E-04	2.60E-08	12	140	-6	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	I-39	ULC	198	25	1.13E+05	4.36E-04	3.85E-09	27	181	6	6.02E+04	2.02E-04	3.36E-09	57	0.5	0.5	0.9
	연결제	2	1	NB	NB	NB	NB	NB	-2	-11	NB	NB	NB	NB	-	-	-
	연결제	3	1	NB	NB	NB	NB	NB	0	-10	NB	NB	NB	NB	-	-	-

도면20a

종쇄	경쇄 돌연변이	pH 7.4에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은 pH/중성 pH의 비율		
		포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/ Ms)	kd (1/ s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
1	H105	488	47.2	3.62E+05	9.30E-03	2.64E-08	1.2	378	37.8	4.24E+05	1.38E-02	3.24E-08	0.8	1.2	1.5	1.2
	H106	620	73.7	3.22E+05	3.67E-03	1.14E-08	3.1	505	65.4	3.66E+05	4.86E-03	1.33E-08	2.4	1.1	1.3	1.2
	H108	648	99.0	3.17E+05	2.07E-03	6.54E-09	5.6	496	80.7	3.59E+05	3.02E-03	8.41E-09	3.8	1.1	1.5	1.3
	H111	669	81.0	3.01E+05	3.81E-03	1.27E-08	3.0	536	62.8	3.32E+05	5.41E-03	1.63E-08	2.1	1.1	1.4	1.3
	H105/106	492	55.6	3.74E+05	6.44E-03	1.72E-08	1.8	404	45.7	4.30E+05	1.01E-02	2.34E-08	1.1	1.2	1.6	1.4
	H105/108	538	75.2	3.28E+05	4.17E-03	1.27E-08	2.8	416	56.3	3.87E+05	7.43E-03	1.92E-08	1.6	1.2	1.8	1.5
	H105/111	501	44.6	3.44E+05	9.77E-03	2.84E-08	1.2	402	31.9	4.06E+05	1.70E-02	4.19E-08	0.7	1.2	1.7	1.5
	H106/108	494	64.9	3.36E+05	4.14E-03	1.23E-08	2.8	407	43.0	4.07E+05	1.17E-02	2.88E-08	1.0	1.2	2.8	2.3
	H106/111	536	78.2	3.09E+05	3.10E-03	1.00E-08	3.7	423	61.4	3.62E+05	4.68E-03	1.29E-08	2.5	1.2	1.5	1.3
	H108/111	584	78.5	3.11E+05	3.80E-03	1.22E-08	3.0	473	59.0	3.50E+05	6.13E-03	1.75E-08	1.9	1.1	1.6	1.4
	H105/106/108	442	51.2	3.72E+05	6.38E-03	1.71E-08	1.8	370	28.4	4.26E+05	2.13E-02	5.00E-08	0.5	1.1	3.3	2.9
	H105/106/111	473	62.8	3.40E+05	4.56E-03	1.34E-08	2.5	378	47.6	4.07E+05	7.42E-03	1.82E-08	1.6	1.2	1.6	1.4
	H105/108/111	433	49.5	3.57E+05	7.42E-03	2.08E-08	1.6	354	31.3	4.09E+05	1.73E-02	4.23E-08	0.7	1.1	2.3	2.0
	H106/108/111	491	66.6	3.44E+05	3.82E-03	1.11E-08	3.0	415	43.3	3.91E+05	1.06E-02	2.72E-08	1.1	1.1	2.8	2.5
	H105/106/108/111	454	57.9	3.51E+05	5.77E-03	1.64E-08	2.0	368	36.8	4.06E+05	1.35E-02	3.32E-08	0.9	1.2	2.3	2.0
	ULC + 종쇄	586	76.0	3.16E+05	3.86E-03	1.22E-08	3.0	483	66.5	3.45E+05	4.58E-03	1.33E-08	2.5	1.1	1.2	1.1
	종쇄만 있음	141	-1.3	NB	NB	NB	NB	107	-6.7	NB	NB	NB	NB			
	DNA 없음	60	-1.5	NB	NB	NB	NB	26	-7.2	NB	NB	NB	NB			
														네거티브 대조표준		

도면20b

종쇄	경쇄 돌연변이	pH 7.4에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은 pH/중성 pH의 비율		
		포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/ Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/ Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
2	H105	720	33.7	1.02E+05	9.10E-04	8.89E-09	12.7	595	0.3	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106	735	32.9	9.11E+04	4.47E-04	4.91E-09	25.8	623	4.3	2.27E+04	6.41E-03	2.82E-09	1.8	0.2	14.3	57.4
	H108	728	32.2	8.48E+04	2.67E-04	3.14E-09	43.3	598	3.6	1.16E+04	3.41E-03	2.93E-09	3.4	0.0	12.8	933.1
	H111	802	42.4	1.17E+05	1.15E-04	9.88E-10	100.3	670	14.1	3.01E+04	7.08E-04	2.35E-09	16.3	0.3	6.1	23.8
	H105/106	570	24.9	8.51E+04	2.92E-04	3.43E-09	39.5	484	2.4	1.14E+04	6.47E-03	5.69E-09	1.8	0.1	22.1	165.9
	H105/108	723	28.4	8.73E+04	1.30E-03	1.49E-09	8.9	603	-2.6	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/111	627	28.5	8.82E+04	3.60E-04	4.08E-09	32.1	519	2.3	1.02E+04	1.30E-02	1.27E-09	0.9	0.1	36.2	311.3
	H106/108	550	21.1	6.75E+04	9.12E-04	1.35E-09	12.7	470	-1.9	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106/111	808	32.7	9.01E+04	6.78E-04	7.52E-09	17.0	678	0.9	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H108/111	801	40.5	1.17E+05	9.80E-05	8.40E-10	117.8	676	10.6	1.87E+04	5.84E-04	3.12E-09	19.8	0.2	6.0	37.1
	H105/106/108	409	13.0	8.21E+04	4.29E-04	5.22E-09	26.9	345	-4.4	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/106/111	767	9.3	4.84E+04	1.25E-03	2.58E-09	9.3	645	-6.1	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/108/111	578	24.5	8.99E+04	2.87E-04	3.19E-09	40.2	479	-0.7	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106/108/111	765	15.1	5.04E+04	1.65E-03	3.27E-09	7.0	661	-5.9	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/106/108/111	723	0.3	NB	NB	NB	NB	611	-7.0	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음		
	ULC + 종쇄	781	39.8	1.13E+05	1.78E-04	1.57E-09	64.9	665	11.7	2.04E+04	1.22E-03	6.00E-09	9.4	0.2	6.9	38.2
	종쇄만 있음	143	-1.8	NB	NB	NB	NB	115	-6.1	NB	NB	NB	NB			
	DNA 없음	63	-2.1	NB	NB	NB	NB	35	-6.4	NB	NB	NB	NB			
														네거티브 대조표준		

도면20c

종쇄	경쇄 돌연변이	pH 7.4에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은 pH중성 pH의 비율		
		포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/ Ms)	kd (1/ s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
3	H105	574	12.4	5.64E+04	1.21E-03	2.15E-08	9.5	496	0.1	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106	662	16.1	7.37E+04	5.36E-04	7.27E-09	21.5	584	3.0	3.00E +04	4.79E-03	1.58E-07	2.4	0.4	8.9	21.7
	H108	518	12.3	4.82E+04	2.15E-04	4.46E-09	53.7	440	2.2	3.70E +04	1.25E-03	3.40E-08	9.3	0.8	5.8	7.6
	H111	480	9.1	1.82E+04	4.16E-04	2.28E-08	27.7	406	0.4	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/106	487	7.4	1.82E+04	7.45E-03	4.10E-07	1.6	423	-4.1	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/108	548	11.8	3.25E+04	5.25E-04	1.62E-08	22.0	468	0.0	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/111	504	7.9	1.06E+04	1.66E-03	1.57E-07	7.0	430	-1.6	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H106/108	487	10.7	6.64E+04	2.91E-04	4.38E-09	39.7	424	-4.2	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106/111	563	10.5	2.75E+04	3.71E-04	1.35E-08	31.2	482	-1.9	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H108/111	528	10.1	1.10E+04	8.01E-05	7.27E-09	144.2	449	-0.5	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H105/106/108	470	6.4	2.64E+04	5.40E-03	2.04E-07	2.1	412	-5.3	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/106/111	539	0.8	NB	NB	NB	NB	462	-5.6	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음		
	H105/108/111	419	6.5	1.76E+04	4.01E-04	2.27E-08	28.8	354	-3.8	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	H106/108/111	509	3.3	5.47E+04	9.07E-04	1.66E-08	12.7	443	-5.9	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/106/108/111	450	-1.1	NB	NB	NB	NB	382	-6.4	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음		
	ULC + 종쇄	688	16.9	3.54E+04	3.57E-04	1.01E-08	32.3	598	5.0	1.16E +04	1.76E-03	1.52E-07	6.6	0.3	4.9	15.0
	종쇄만 있음	152	-1.6	NB	NB	NB	NB	127	-5.4	NB	NB	NB	NB			
	DNA 없음	54	-1.7	NB	NB	NB	NB	30	-5.6	NB	NB	NB	NB	네거티브 대조표준		

도면20d

종쇄	경쇄 돌연변이	pH 7.4에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은 pH/중성 pH의 비율		
		포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (분)	포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/ Ms)	kd (1/ s)	KD (M)	t½ (분)	ka	kd	KD
4	H105	598	4.9	2.80E+04	1.38E-03	4.91E-08	8.4	512	-0.2	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H106	569	7.1	1.49E+04	9.67E-04	6.49E-08	11.9	494	1.2	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H108	587	6.3	2.25E+04	2.02E-03	8.96E-08	5.7	500	-0.9	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H111	606	5.6	3.46E+04	2.19E-03	6.33E-08	5.3	521	-0.9	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/106	517	3.1	2.00E+04	2.05E-03	1.03E-07	5.6	460	-1.1	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/108	581	2.5	1.61E+05	2.30E-03	1.43E-08	5.0	506	-2.7	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/111	575	3.8	1.01E+04	1.70E-03	1.68E-07	6.8	504	-2.0	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H106/108	498	2.5	4.01E+04	6.07E-04	1.51E-08	19.0	447	-3.9	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H106/111	587	3.0	7.85E+04	9.20E-04	1.17E-08	12.6	509	-2.6	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H108/111	599	4.0	9.68E+04	2.02E-03	2.09E-08	5.7	528	-2.6	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H105/106/108	64	-1.7	NB	NB	NB	NB	46	-5.4	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 있음		
	H105/106/111	561	1.1	NB	NB	NB	NB	493	-2.8	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음		
	H105/108/111	521	2.7	7.66E+04	1.29E-03	1.68E-08	9.0	461	-3.2	NB	NB	NB	NB	중성 pH에서 결합 없음		
	H106/108/111	577	1.3	NB	NB	NB	NB	514	-4.2	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음		
	H105/106/108/111	554	0.6	NB	NB	NB	NB	495	-4.8	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	ULC + 종쇄	685	7.4	5.69E+04	2.01E-03	3.53E-08	5.7	527	1.9	NB	NB	NB	NB	낮은 pH에서 결합 없음		
	종쇄만 있음	187	-2.4	NB	NB	NB	NB	161	-5.4	NB	NB	NB	NB			
	DNA 없음	49	-2.6	NB	NB	NB	NB	25	-5.6	NB	NB	NB	NB	네거티브 대조표준		

도면20e

종쇄	경쇄 둘연변이	pH 7.4에서의 동역학						pH 5.75에서의 동역학						낮은 pH/중성 pH의 비율		
		포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (%)	포획된 mAb (RU)	50nM 항원 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (%)	ka	kd	KD
5	H105	522	3.2	5.05E+04	9.48E-03	1.88E-07	1.2	463	-4.3	NB	NB	NB	NB	증강 pH에서 반 약한 결합, pH에서 결합 없음		
	H106	496	0.3	NB	NB	NB	437	-5.2	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H108	475	-0.1	NB	NB	NB	415	-5.7	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H111	523	1.6	NB	NB	NB	463	-4.7	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H105/106	534	-0.6	NB	NB	NB	472	-5.5	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H105/108	499	2.0	5.80E+04	1.16E-02	1.99E-07	1.0	433	-5.5	NB	NB	NB	NB	증강 pH에서 반 약한 결합, pH에서 결합 없음		
	H105/111	489	0.1	NB	NB	NB	426	-4.7	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H106/108	441	-0.5	NB	NB	NB	386	-4.2	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H106/111	529	-0.8	NB	NB	NB	461	-6.3	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H108/111	495	4.1	1.73E+05	1.06E-02	6.11E-08	1.1	435	-4.0	NB	NB	NB	NB	증강 pH에서 반 약한 결합, pH에서 결합 없음		
	H105/106/108	505	-1.1	NB	NB	NB	444	-5.5	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H105/106/111	499	-1.7	NB	NB	NB	438	-5.8	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H105/108/111	436	0.8	NB	NB	NB	388	-3.7	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H106/108/111	539	-1.4	NB	NB	NB	477	-4.0	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	H105/106/108/111	556	-1.6	NB	NB	NB	490	-4.4	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	ULC + 종쇄	516	0.6	NB	NB	NB	451	-5.0	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	종쇄만 있음	144	-1.3	NB	NB	NB	122	-5.7	NB	NB	NB	NB	시험된 어떤 pH에서도 결합 없음			
	DNA 없음	47	-1.4	NB	NB	NB	25	-5.8	NB	NB	NB	NB	네거티브 대조표준			

도면21

V _H	V _K	K _D at pH7.4 (nM)	K _D at pH5.75 (nM)	T _{1/2} at pH7.4 (min)	T _{1/2} at pH5.75 (min)
2	원래의 ULC	1.6	60	65	9.4
2	ULC (His105,106)	3.4	570	39	1.8
2	ULC (His105,111)	4.1	1270	32	0.9
2	ULC (His105,108,111)	3.2	NB	40	NB
2	ULC (His105,106,108)	5.2	NB	27	NB
3	원래의 ULC	10.1	152	32	6.6
3	ULC (His106,108)	4.4	NB	40	NB
3	ULC (His108,111)	7.3	NB	144	NB
6	원래의 ULC	3.0	2.4	10	6
6	ULC (His105,111)	3.5	NB	9	NB
6	ULC (His106, 108,111)	2.0	NB	16	NB

도면22

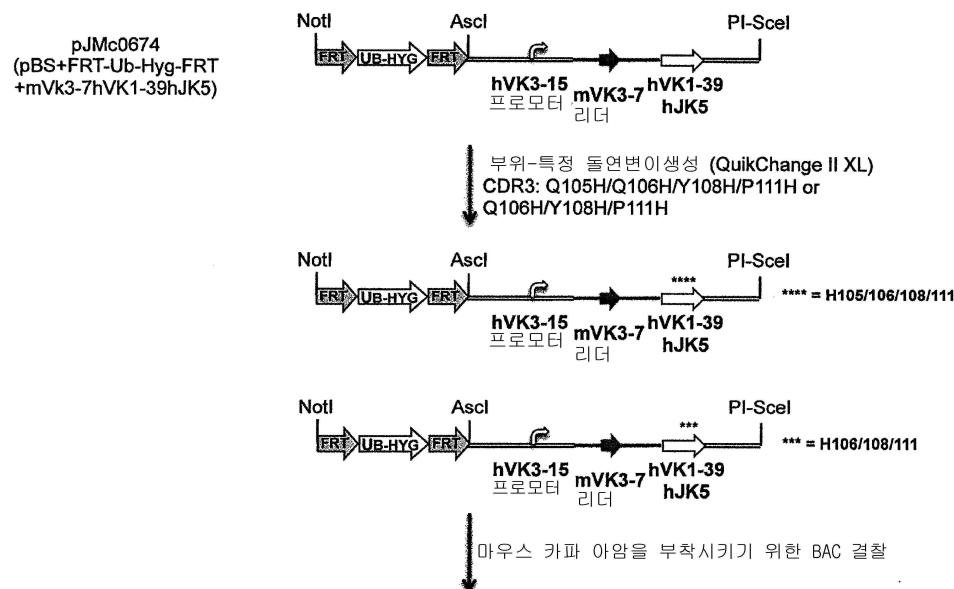
hVK1-39JK5의 보편적 경쇄의 CDR3의 히스티딘 치환을 위한 부위-특정 돌연변이생성 프라이머

프라이머 명칭	서열	%GC	N	% 미스매치	Tm
생식선 hVK1-39/JK5	CAACTTACTACTGTCAACAGAGT TACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC				
1633-H106/108/111 F	CTTACTACTGTCAACATAGTCACAGTACCCATCCGATCACCTTCGG	47.0	45	6.7	79.0
1633-H105/106/108/111 F	CAACTTACTACTGTCAACCATAGTCACAGTACCCATCCGATCACCTTCGGC	50.0	50	8.0	80.5
1633-H106/108/111 R	CGAAGGTGATCGGATGGGTACTGTGACTATGTTGACAGTAGTAAG	47.0	45	6.7	79.0
1633-H105/106/108/111 R	GCCGAAGGTGATCGGATGGGTACTGTGACTATGGTGACAGTAGTAAGTTG	50.0	50	8.0	80.5

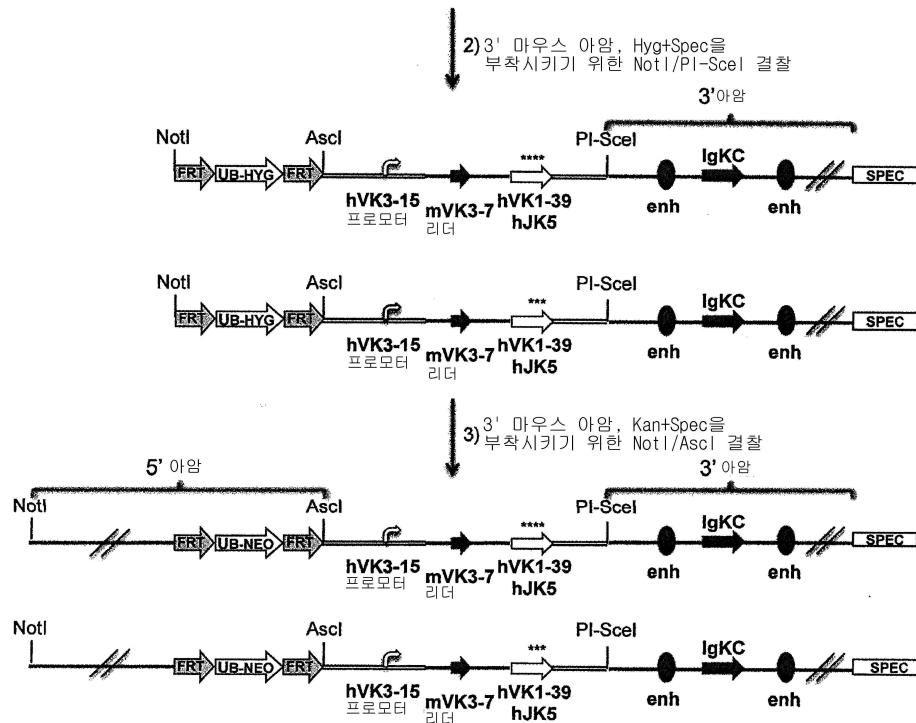
프라이머	SEQ ID NO
생식선 hVK1-39/JK5	405
1633-H106/108/111 F	358
1633-H105/106/108/111 F	359
1633-H106/108/111 R	360
1633-H105/106/108/111 R	361

도면23a

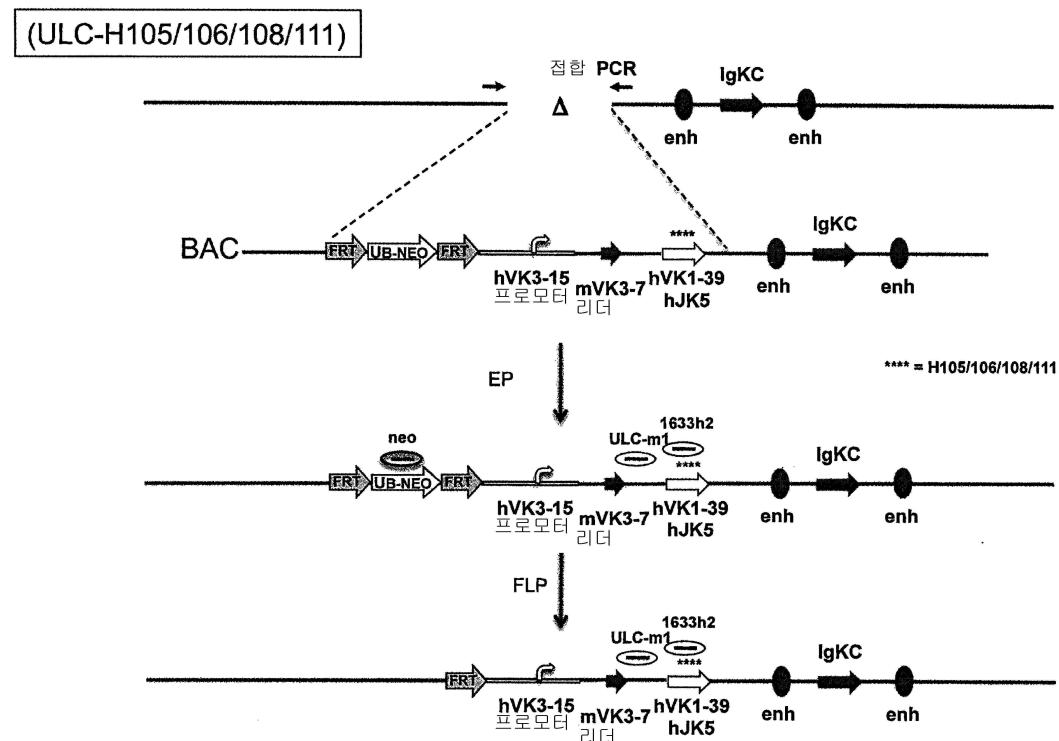
VK1-39 HULC LTVECs 의 구성



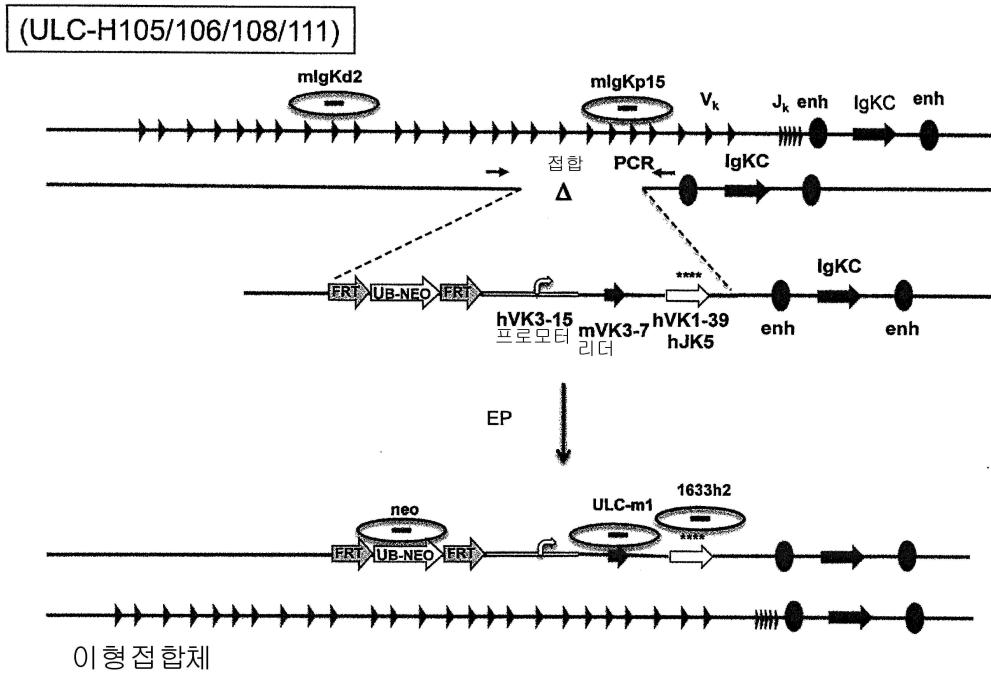
도면23b



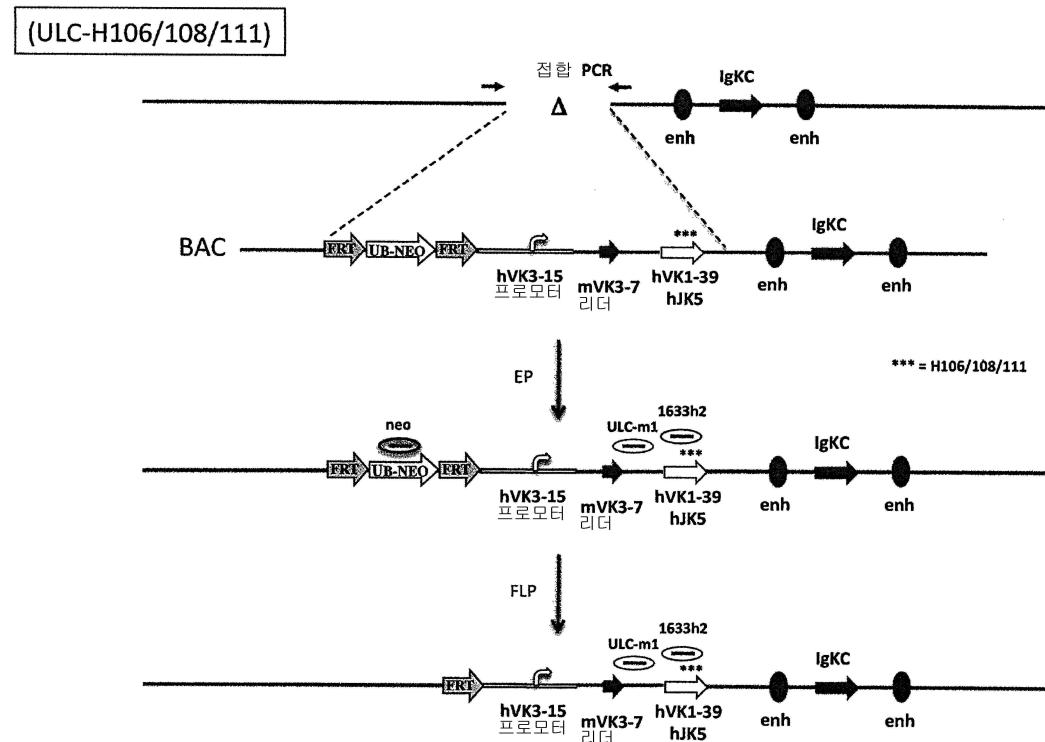
도면23c



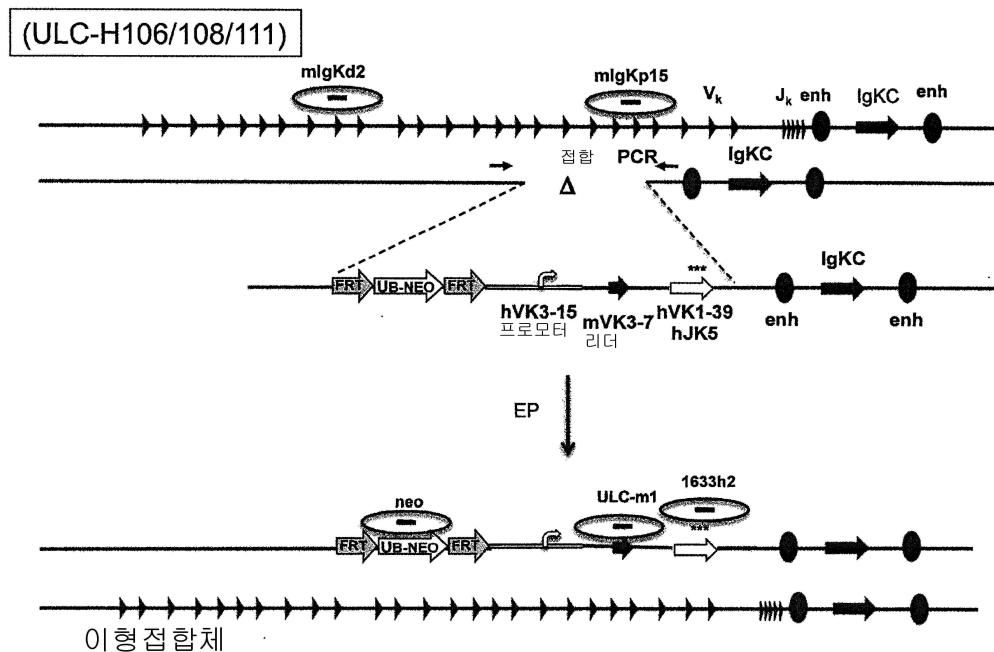
도면23d



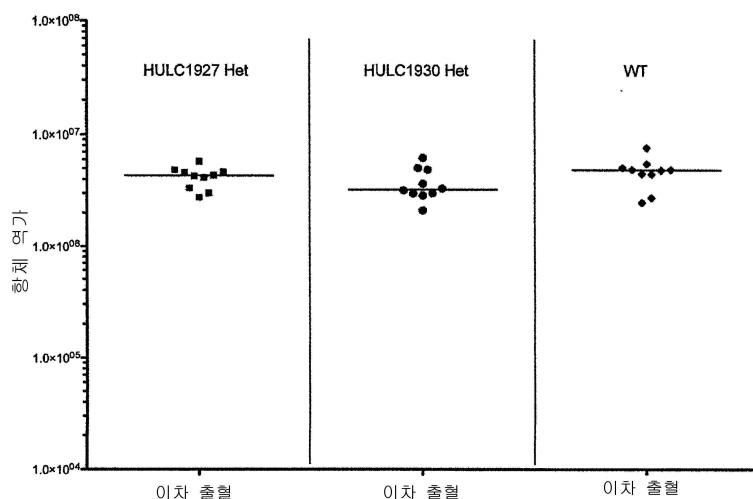
도면23e



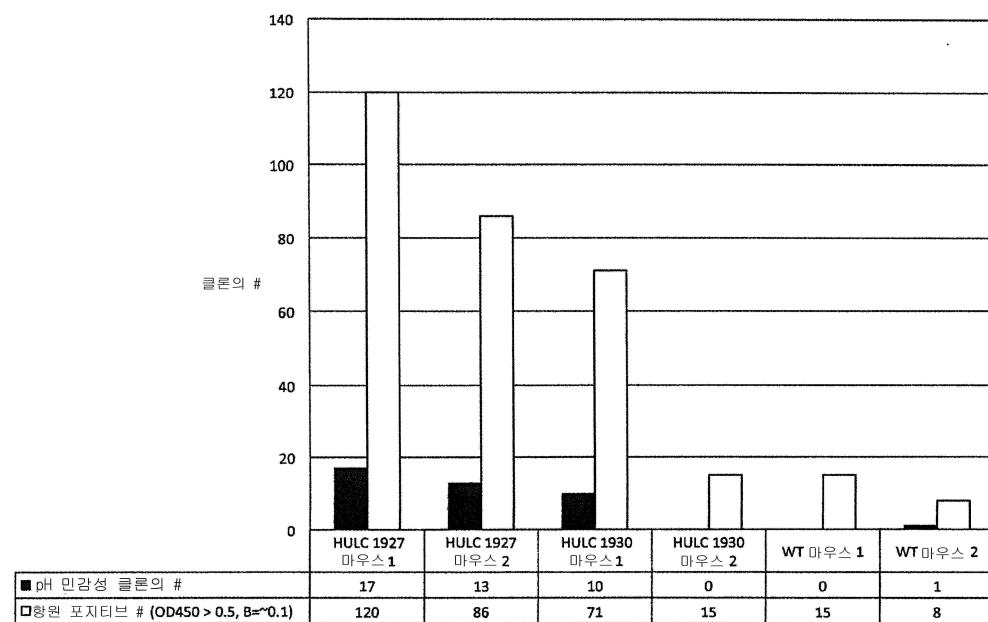
도면23f



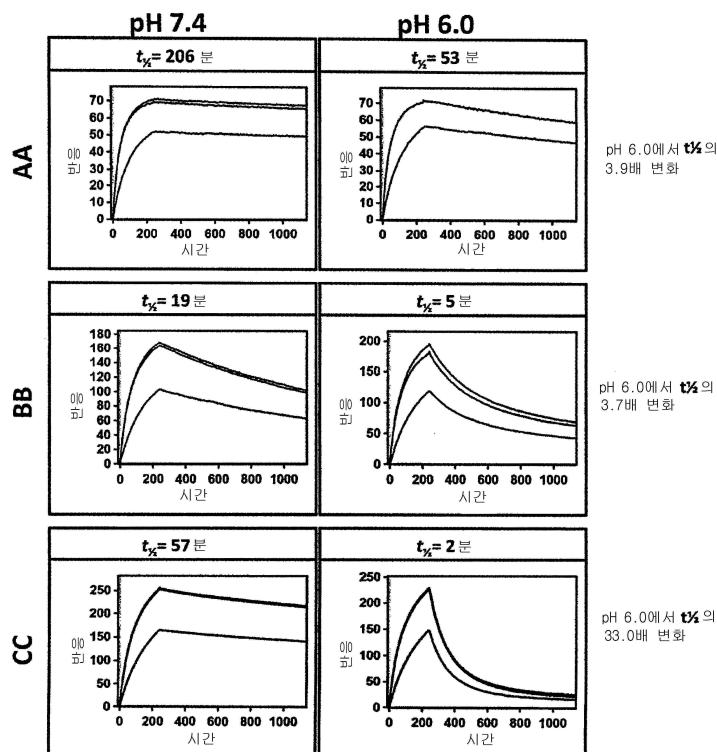
도면24



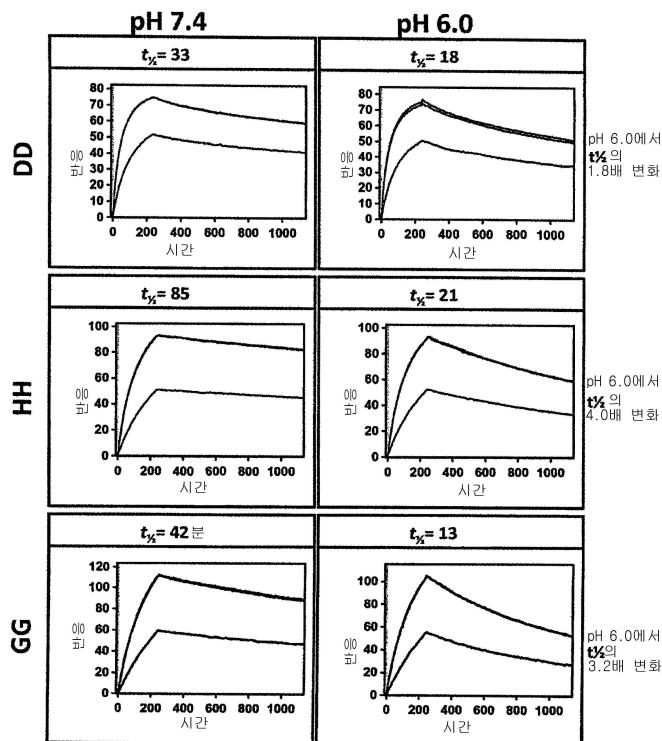
도면25



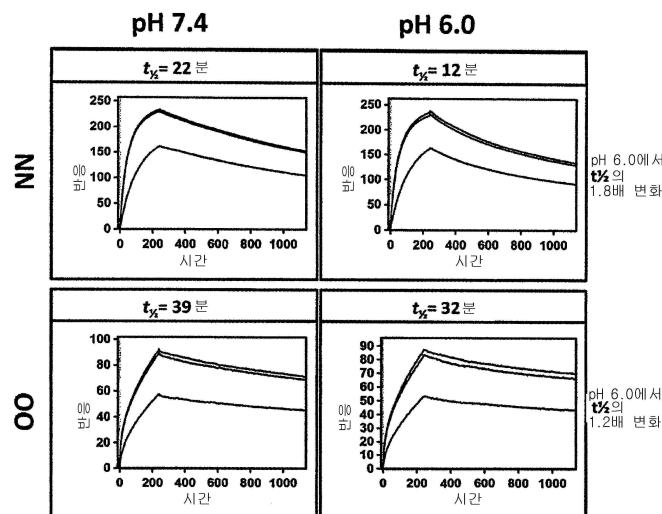
도면26a



도면26b



도면26c



도면27

105 106 107 108 109 110 111

WT

Q Q Y G S S P SEQ ID NO:399
CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT SEQ ID NO:398

H105/106/107/109

H H H G H S P SEQ ID NO:401
CAT CAC CAT GGT CAC TCA CCT SEQ ID NO:400

H105/106/109

H H Y G H S P SEQ ID NO:403
CAT CAC TAT GGT CAC TCA CCT SEQ ID NO:402

도면28

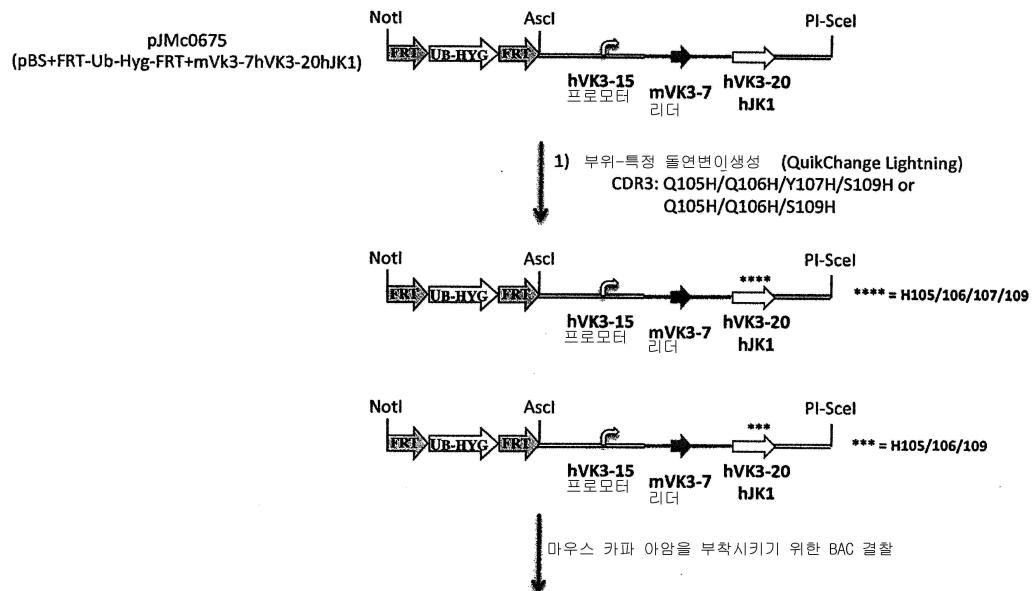
VK3-20JK1 ULC 플라스미드의 CDR3의 히스티딘 치환을 위한 부위-특정 돌연변이 생성 프라이머

프라이머 명칭	서열	%GC	N	미스매치	Tm
생식선 hVK3-20	GATTGGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAGGGTACGTCACCTGGACGTTCCGGC	48	54	5	79.5
hVK3-20 (H105/106/107/109) F	GATTTTGCAAGGTGAGTGACGATGGTGTGATGACAGTAATACTGCAAATC	48	54	5	79.5
hVK3-20 (H105/106/109) R	GCAGTGTATTACTGTCATCACTATGGTCACTCACCTGGACGTTCCGG	49	47	4	78.7
hVK3-20 (H105/106/109) F	CCGAACGTCCAAGGTGAGTGACCATAGTGATGACAGTAATACTGC	49	47	4	79.7
hVK3-20 (H105/106/109) R					

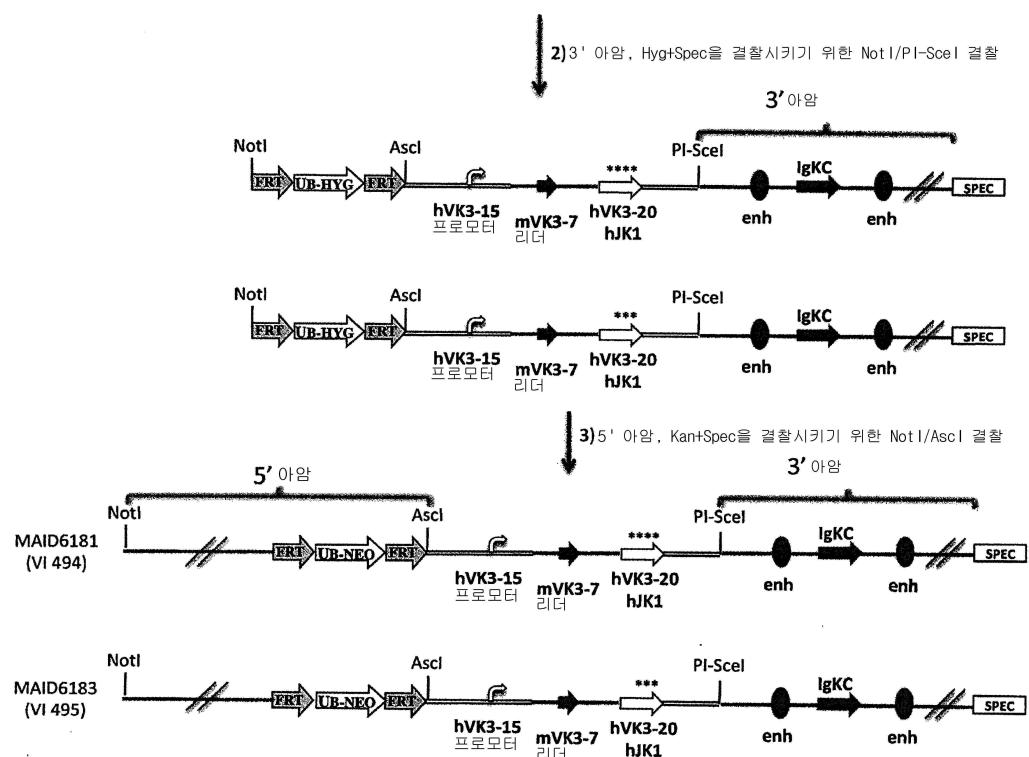
프라이머	SEQ ID NO
생식선 hVK3-20/JK1	384
hVK3-20 H105/106/107/109 F	385
hVK3-20 H105/106/107/109 R	386
hVK3-20 H105/106/109 F	387
hVK3-20 H105/106/109 R	388

도면29a

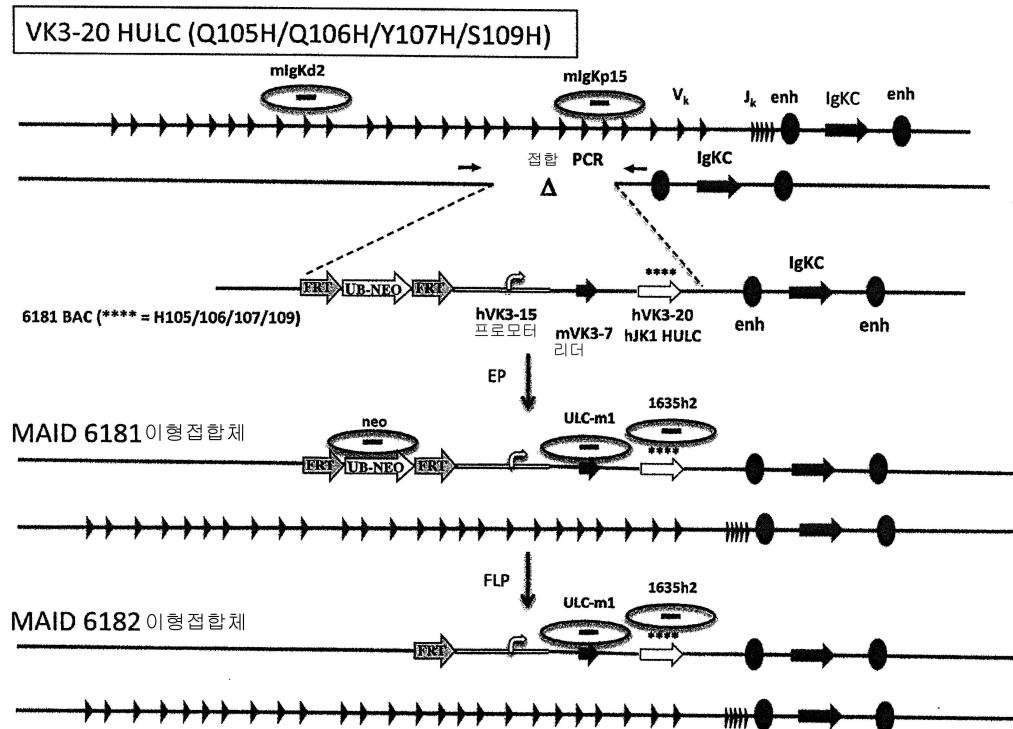
VK3-20 HULC LTVECs의 구성



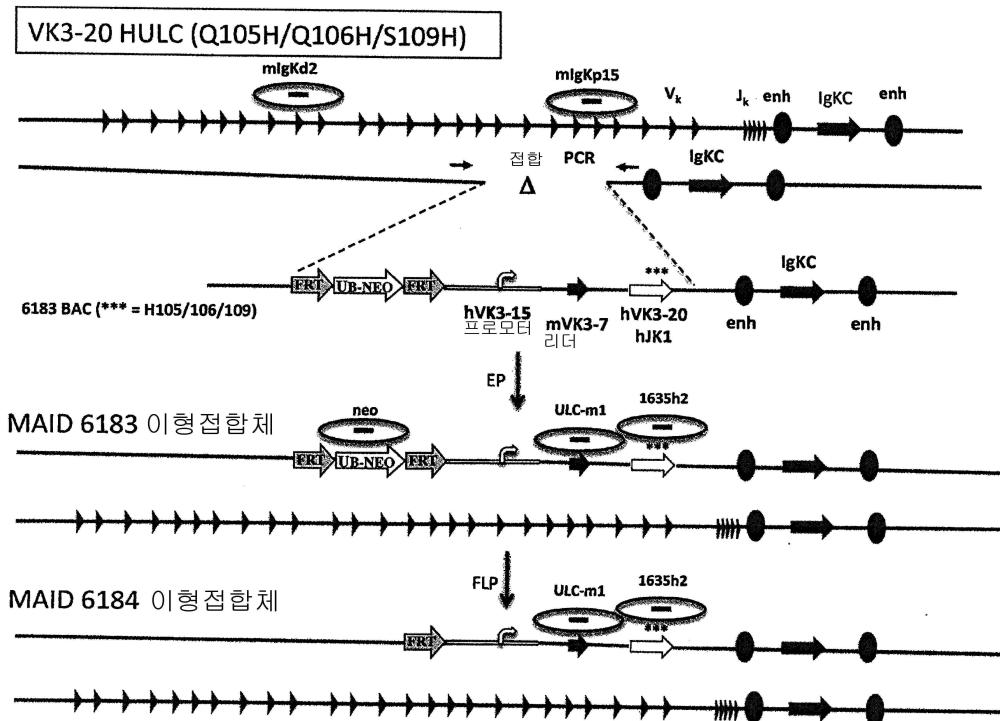
도면29b



도면29c



도면29d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> REGGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

McWhirter, John

Macdonald, Lynn

Martin, Joel

Murphy, Andrew J.

<120> Non-Human Animals Expressing pH-Sensitive Immunoglobulin

Sequences

<130> 1900A-W0

<150> 61/611,950

<151> 2012-03-16

<150> 61/613,352

<151> 2012-03-20

<150> 61/736,930

<151> 2012-12-13

<150> 61/612,126

<151> 2012-03-16

<160> 405

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9586

<212> DNA

<213

> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9586)

<223> HD 1.1-6.6

<400> 1

tccccgttga agctgacactg cccagagggg cctgggccca ccccacacac cggggcggaa	60
tgtgtacagg ccccggtctc tgtgggttt ccgctaactg gggctccag tgctcacccc	120
acaactaaag cgagccccag cctccagagc ccccgaagga gatgccgcc acaagcccag	180
cccccatcca ggaggcccca gagctcaggg cgccgggca gattctgaac agccccgagt	240
cacggtgtggt accactggca cgaccacgt gagaaaaact gtgtccaaaa ctgtctctg	300
gcccctgctg gaggccgcgc cagagagggg agcagccgcc ccgaacctag gtccctgctca	360

gctcacacga cccccagcac ccagagcaca acggagtccc cattgaatgg tgaggacggg	420
---	-----

gaccagggtc ccaggggtc atggaaggg ctggaccca tcctactgct atggtcccag	480
tgctcctggc cagaactgac cctaccacgc acaagagtcc cttagggaaa cgggggtcac	540
tggcacctcc cagcatcaac cccaggcagc acaggcataa accccacatc cagagccac	600
tccaggagca gagacacccc agtaccctgg gggacacccga ccctgatgac tccccactgg	660
aatccacccc agagtccacc aggaccaaag accccgcccc tgtctctgac cctcactcag	720
gacctgtgc gggcgccgc atgagaccag actcgggctt aggaaacacc actgtggcc	780
caacctcgac caggccacag gcccttcctt cctgccctgc ggcagcacag actttgggt	840
ctgtcagag aggaatcaca gaggccccag gctgaggtgg tgggggtgga agaccccccag	900
gagggtggcc acttcccttc ctcccagctg gaacccacca tgaccttctt aagataggg	960
tgtcatccga ggcaggctt ccatggagct cccttcaggc tcctcccccgg tcctcactag	1020
gcctcagtcc cggtgcggg aatgcageca ccacaggcac accaggcage ccagacccag	1080
ccagcctgca gtgcctaagc ccacattctg gagcagagca ggctgtgtct gggagagtct	1140
gggctccccca ccgcggggcc gcacacccca cccacccctg tccaggccct atgcaggagg	1200
gtcagagccc cccatgggt atggacttag ggtctactc acgtggctcc cctcctgggt	1260
gaaggggtct catgcccaga tccccacagc agagctggtc aaaggtggag gcagtggccc	1320
cagggccacc ctgacctgga ccctcagget cctctagccc tggctgccct gctgtccctg	1380
ggaggcctgg actccaccag accacagggtc cagggcaccg cccataggtg ctgcccacac	1440
tcagttcaca ggaagaagat aagctccaga ccccaagac tgggacctgc cttctgcca	1500
ccgcttgttag ctccagacct ccgtgcctcc cccgaccact tacacacggg ccagggagct	1560
gttccacaaa gateaacccc aaacccggac cgcctggcac tcggccgct gccacttccc	1620
tctccatttgc ttcccgacac ctctgtgctc cctccctctt ccctccttca gggaaacagc	1680
ctgtcagcc cctccctgca ccccacaccc tggggaggcc caaccctgcc tccagccctt	1740
tctccccgc tgctcttctt cccatccag acaaccctgg ggtcccatcc ctgcagccata	1800
caccctggtc tccacccaga cccctgtctc tccctcaga caccctccc aggccaaccc	1860
tgcacatgca gcccctcccc tttctgctg ccagagccctc agtttctacc ctctgtgcct	1920
acccctgcc tccctctgccc cacaactcga gctttccctc tccctggggcc cctgagccat	1980
ggcactgacc gtgcactccc accccacac tgcctatgcc ctacccctcc tcctggacac	2040
tctgaccccg ctccccctt ggacccagcc ctggatttc caggacaaag gtcacccaa	2100
gtctccccca tgcaggccct tgccctact gcccggttac acggcagcct cctgtgcaca	2160
gaagcaggga gtcagccct tccacaggca gaaggcactg aaagaaatcg gcctccagca	2220
ccctgatgca cgtccgcctg tgtctctcac tgcccgacc tgcagggagg ctcggcactc	2280

cctgtaaaga cgagggatcc aggcagcaac atcatggag aatgcaggc tcccagacag	2340
cccagccctc tcgcaggcct ctctggaa gagacctgca gccaccactg aacagccacg	2400
gagcccctg gatagtaact gagtcagtga ccgacctgga gggcagggga gcagtgaacc	2460
ggagcccaga ccatagggac agagaccagc cgctgacatc ccgagccct cactggcggc	2520
cccagaacac cgcgtgaaa cagaacagac ccacattcc acctgaaaca gggcagacac	2580
tgctgagccc ccagcaccag ccctgagaaa caccaggcaa cggcatcaga ggggctcct	2640
gagaaagaaa ggaggggagg ttccttac cagcaagtac ttcccttgac caaaaacagg	2700
gtccacgcaa ctccccagg acaaaggagg agccccctgt acagcactgg gtcagatgc	2760
ctctccaca caccctgagt ttcaaaaaa aacccctgg aaatcatagt atcagcagga	2820
gaactagcca gagacagcaa gaggggactc agtgactccc gcggggacag gaggatgg	2880
tggggctcg tgtcaactgtg aggacattgt agtcatacca gtcgcatacc ccacagtgc	2940
acagccccat tccaaagcc ctgctgtaaa cgcttccact tctggagctg aggggctggg	3000
gggagcgtct gggaaatggg gccttagggt ggccatcaat gcccääacg caccagactc	3060
ccccccagac atcacccac tggccagtga gcagagtaaa cagaaaatga gaagcagtg	3120
ggaagcttgc acaggccccca agggaaagagc tttggcggt gtcaagagg ggtgcgggc	3180
agagcctgag cagggcttt tgctgtttct gcttcctgt gcagatagtt ccataaactg	3240
gtgtcaaga tcgatggctg ggagtgagcc caggaggaca gtgtggaaag ggcacaggaa	3300
aggagaagca gcccgtatcc tacactgtca tcttcaaga gttgcctg tgcccaaat	3360
gctgcatacat gggatgctta acagctgtatg tagacacagc taaagagaga atcagtgaaa	3420
tggatttgca gcacagatct gaataaattc tccagaatgt ggagccacac agaagcaagc	3480
acaaggaaag tgcctgtatgc aaggcggaaag tacagtgtt acttcaggc tggcacaga	3540
cactctgaaa agccttggca ggaactccct gcaacaaagc agagccctgc aggcaatgcc	3600
agctccagag ccctccctga gaggctcatg ggcaaaatgt tgccaaacag gtgtttctca	3660
tagccccaaa ctgagaatga agcaaacagc catctgaagg aaaacaggca aataaacat	3720
ggcaggttca tggaaatgcaa acccagacag ccagaaggac aacagtgagg gttacagggt	3780
actctgttgt tgagttcatg acaatgctga gtaattggag taacaaagga aagtccaaaa	3840
aatactttca atgtgatttc ttctaaataa aatttacagc cggcaaaatg aactatttc	3900
ttaagggata aacttccac tagggaaaact ataaggaaaa tcaagaaaag gatgtatcaca	3960
taaacacagt ggtcgtaact tctactgggg aaggaagagg gtatgaactg agacacacag	4020
gttggcaag tctctaaca agaacagaac aaatacatca cagttacccaaaacagcag	4080

ttaaaattct aaattgcaag aagaggaaaa tgcacacagc tgtgtttaga aaattctcag	4140
tccagcactg ttcatatag caaagacatt aaccagggtt ggataaataa acgatgacac	4200
aggcaattgc acaatgatac agacatacat tcagtatatg agacattgtat gatgtatccc	4260
caaagaaatg actttaaga gaaaaggcct gatatgttgtt ggcactcacc tccctggca	4320
tccccggaca ggctgcaggc acactgtgt gcagggcagg ctggcacctg ctggcagctc	4380
ctggggcctg atgtggagca ggcacagagc cgtatcccc cgaggacata taccccaag	4440
gacggcacag ttggcacatt ccggagacaa gcaactcagc cacactccca ggccagagcc	4500
cgagagggac gcccatgcac agggaggcag agcccatc tcacacagcc agcagcaccc	4560
gtgcaggggc cgccatctgg cagggcacaga gcatggcgtt ggaggagggg cagggacacc	4620
aggcagggtt ggccaccaact gaaaattaca gaagtctcat acatctacct cagccttgcc	4680
tgacctggc ctcacctgac ctggacactca cctggcctgg acctcacctg gccttagacct	4740
cacctctggg cttcacctga gtcggcctc acctgacttg gaccttgccct gtcctgagct	4800
cacatgatct gggcctcacc tgacctgggt ttcacctgac ctggccttca cctgacccctgg	4860
gcctcatctg acctggcct cactggcctg gacctcacct ggctggct tcacctggcc	4920
tcaggcctca tctgcacctg ctccaggctc tgctggaaacc tcagtagcac tgaggctgca	4980
ggggctcatc cagggttgca gaatgactt agaacctccc acatctcagc tttctgggt	5040
gaggcacctg gtggccagg gaatataaaa agccigaatg atgcctgcgt gatttgggg	5100
caatttataa accaaaagg acatggccat gcagcggta gggacaatac agacagatata	5160
cagcctgaaa tggacactca gggcacagggt gggcacggac actgtccacc taagccagg	5220
gcagacccga gtgtccccgc agtagacctg agagcgctgg gcccacagcc tcccctcggt	5280
gccctgctac ctccctcaggat cagccctggaa catccgggt ttccccaggc ctggcggttag	5340
gtttgggttgg aggtctgtgt cactgtggta tcaccatttt tggagtggtc attataccca	5400
cagtgtcaca gagtccatca aaaacccatc cctggaaacc ttctgccaca gccctccctg	5460
tggggcaccg ccgegtgcca tggtaggatt ttgactgagg acacagcacc atggatgg	5520
tggctaccgc agcagtgcag cccgtgaccc aaacacacag ggcagcaggc acaacagaca	5580
agcccaacaag tgaccaccct gagctcctgc ctggcagccc tggagaccat gaaacagatg	5640
gccaggatta tcccataggt cagccagacc tcagtcacac aggtctgcac cgctgctgcc	5700
ctccaaatacc agtccggatg gggacaggc tggccacat taccattgc tgccatccgg	5760
ccaacagtcc cagaagcccc tccctcaagg ctggccaca tgggtggacc ctgagagccc	5820

cccatgtctg agtagggca ccaggaagg ggggctggc ctgtgcactg tccctgcc	5880
tgtggtcctt ggcctgcctg gccctgacac ctgggcctct cctgggtcat ttccaagaca	5940
gaagacattc ccaggacagc tggagctgg agtccatcat cctgcctggc cgtcctgagt	6000
cctgcgcctt tccaaacctc acccggaag ccaacagagg aatcacctcc cacaggcaga	6060
gacaaagacc ttccagaaat ctctgtctct ctccccagtg ggacccctct tccagggcag	6120
tcctcagtga tatcacagtg ggaacccaca tctggatcg gactgcccc agaacacaag	6180
atggcccaca gggacagccc cacagccag ccctccag accctaaaa ggcgtccac	6240
ccccgtcatc tgccccaggg ctcaaactcc aggaggactg actcctgcac accctctgc	6300
cagacatcac cttagccccct cctggaaagg acaggagcgc gcaagggtga gtcagaccct	6360
cctgcctcg atggcaggcg gagaagattc agaaaggctt gagatcccc ggacgcagca	6420
ccactgtcaa tggggggccc agacgcctgg accaggcct gcgtggaaa ggcctctgg	6480
cacactcagg ggcttttgt gaagggtctt cctactgtgt gaccacagtc actaccacag	6540
tgtatgaaccc agcagcaaaa actgaccgga ctcccaaggt ttatgcacac ttctccgctc	6600
agagctctcc aggatcagaa gagccgggcc caagggttc tgccagacc ctcggctct	6660
aggcacatct tggccatgac agcccatggg ctgggtcccc acacatcgta tgcctcaaa	6720
caagggttc agagggtctt gaggtgaccc cactgatgac cacaggtgcc ctggccctt	6780
ccccaccagc tgcaccagac cccgtcatga cagatcccc gattccaaca gccaattct	6840
ggggccagga atcgctgttag acaccagct ctttccaaca cctcctgcca attgcctgga	6900
ttcccatccc gtttgaatc aagaggacag catccccag gtttccaaca ggcaggactc	6960
ccacaccctc ctctgagagg ccgtgtgtt ccgttagggc aggctgcaga cagtccccct	7020
cacctgccac tagacaaatg cctgctgttag atgtccccac ctggaaaata ccactcatgg	7080
agccccccagc cccaggtaca gctgttagaga gagtctctga ggcccctaag aagttagccat	7140
gcccagtctt gccgggaccc tcggccaggg tgacaggagt ggacgctgga gctggccca	7200
tactgggcca cataggagct caccagttag ggcaggagag cacatgccgg ggaggcaccca	7260
gcctcctgct gaccagaggg ccgtcccaga gcccaggagg ctgcagaggc ctctccaggg	7320
ggacactgtg catgtctggt ccctgagcag ccccccacgt cccagtcct gggggccctt	7380
ggcacagctg tctggaccct ctctattccc tggaaagctc ctctgacag cccgcctcc	7440
agtccaggt gtggttatttgc tcaagggttg tcagactgtg gtggacacag ccatggttac	7500
cacagtggtg ctgccatag cagcaaccag gccaagttaga caggccctg ctgtgcagcc	7560
ccagggctcc agtcacactg cttctctgg ggctctcaag gctgctgttt tctgcactct	7620
ccctctgtg gggagggttc ctcagtggg agatctgttc tcaacatccc acggcctcat	7680

tcctgcaagg aaggccaatg gatggcaac ctcacatgcc gcggctaaga tagggtgcc	7740
agcctggcg ggacaggaca tcctgctgg gtatctgtca ctgtgcctag tgggcactg	7800
gctccaaac aacgcagtcc ttgccaaaat ccccacggcc tccccgcta gggctggcc	7860
tgatctccctg cagtccctagg aggctgcata cctccagaat ggctccgtcc ccagttccag	7920
ggcgagagca gatcccgaggc cggtgcaga ctggggaggcc accccctcct tcccagggtt	7980
cactgcagggt gaccaggcga gaaaaatggcc tgaacacagg gataaccggg ccatccccca	8040
acagagtcca cccctccctg ctctgtaccc cgaccccccc agggcagccccc atgacatccg	8100
acaacccac accagagtca ctgcccggtg ctgcccctagg gaggacccct cagccccac	8160
cctgtctaga ggactgggga ggacaggaca cgccctctcc ttatggttcc cccacctggc	8220
tctggctggg acccttgggg tgtggacaga aaggacgctt gcctgattgg cccccaggag	8280
cccgagaacct ctctccaggc accccagecc gaggcccccc ttacccagga cccagccctg	8340
ccccctccct cctctgctct cctctcatca ccccatggga atccagaatc cccaggaagc	8400
catcaggaag ggctgaggga ggaagtgggg ccactgcacc accaggcagg aggctctgtc	8460
tttgtgaacc cagggaggtg ccagcctctt agagggtatg gtccacccctg cctatggctc	8520
ccacagtggc aggtgcagg gaaggaccag ggacgggtgtg ggggagggtc cagggccccg	8580
cgggtgtcc atttggatg agcctatctc tctcacccac ggactcgccc acctccctt	8640
caccctggcc acacgtcgtc cacaccatcc taagtccac ctacaccaga gccggcacag	8700
ccagtgcaga cagaggctgg ggtgcagggg ggccgactgg gcagctcgg ggagggagga	8760
atggaggaag gggagttcag tgaagaggcc cccctccctt gggtccagga tcctcccttg	8820
ggaccccccgg atcccatccc ctccaggctc tgggaggaga agcaggatgg gagaatctgt	8880
gcgggaccct ctcacagtgg aatacctcca cagcggctca ggccagatac aaaagccccct	8940
cagtgagccc tccactgcag tgctggcctt gggggcagcc gctccacac aggatgaacc	9000
cagcaccccg aggtgtcctt gccaggggga gctcagagcc atgaaggagc aggatatggg	9060
accccccata caggcacaga cctcagctcc attcaggact gccacgtctt gcccctgggag	9120
gaaccccttt ctctagtcctc tgcaggccag gaggcagctg actcctgact tggacgccta	9180
ttccagacac cagacagagg ggcaggcccc ccagaaccag ggatgaggac gcccgtcaa	9240
ggccagaaaa gaccaagtgt cgctgagccc agcaaggaa ggtccccaaa caaaccagga	9300
agttctigaa ggtgtctgtc tcacagtggta gcatagccac tgcgtccaca gtgacactcg	9360
ccagggccaga aaccccatcc caagtcagcg gaatgcagag agagcaggga ggacatgttt	9420
aggatctgag gccgcacccctg acacccaggc cagcagacgt ctctgtccca cggcacccctg	9480
ccatgtccctg catttctgga agaacaaggc caggctgaag ggggtccagg accaggagat	9540

gggtccgctc tacccagaga aggagccagg caggacacaa gcccc 9586

<210> 2

<211> 9268

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9268)

<223> HD 1.7-6.13

<400> 2

tccccattga ggctgacctg cccagagggt cctgggccca cccaacacac cggggcgaa	60
tgtgtgcagg cctcggtctc tgtgggttt ccgcgtacatg gggctcacag tgctcacccc	120
acacctaaaa cgagccacag cctccggagc ccctgaagga gacccgcac acaagccag	180
cccccaccca ggaggccccca gagcacaggg cgcccccgtcg gattctgaac agcccccagt	240
cacagtgggt atcactggca ctaccactgt gagaaaagct tctccaaaaa cggtctcctg	300

gccacagtgc gaggccccgc cagagagggg agcagccacc ccaaaccat gttctgcgg	360
ctcccatgac cccgtgcacc tggagccca cgggtgtcccc actggatggg aggacaagg	420
ccgggggctc cggcgggtcg gggcaggggc ttgatggctt cttctgcgc tgcccccatt	480
gcccctggct ggagttgacc cttctgacaa gtgtctcag agagttaggg atcagtggca	540
cctcccaaca tcaacccac gcagcccagg cacaaacccc acatccaggg ccaactccag	600
gaacagagac accccaatac cttgggggac cccgaccctg atgactcccg tcccatctc	660
gtccctcaact tggggcctgc tgcggggcga gcacttgga gcaaactcag gcttagggga	720

caccactgtg ggcctgaccc cgagcaggcc acagaccctt ccctcctgcc ctgggtgcagc	780
acagactttg gggctgtggc agggagggaaac ttctggcagg tcaccaagca cagagcccc	840
aggctgaggt gggcccccagg ggaacccagg caggtggccc actacccttc ctcccagctg	900
gaccctatgt ctcccccaag ataggggtgc catccaagcc aggtccctca tggagcccc	960
ttcaggetcc tctccagacc ccactggcc tcagttccca ctcttagaat gcagccacca	1020
cgggcacacc aggcagccca ggcccagcca ccctgcagg cccaaacccca caccctggag	1080
gagagcaggg tgcgtctggg agggctggg ctccccaccc ccacccaccc ctgcacaccc	1140

caccacccct tgccgggcc ccctgcagga gggtcagac cccatggta tatggactta	1200
gggtctcaact cacgcaccc tcctcctggg agaagggttc tcatgcccag atccccccag	1260
cagcgctggt cacaggtaga ggcagtggcc ccagggccac cctgacccctgg cccctcaggc	1320

tcctctagcc ctggctgccct tgctgtccct gggaggcctg ggctccacca gaccacaggt	1380
ctagggcacc gcccacactg gggccgcccc cacacagctc acaggaagaa gataagctcc	1440
agaccccccag gcccgccacc tgccttgctg ctacgacttc ctgccccaga cctcggtgcc	1500
ctccccgtc cacttacaca caggccagga agctgtccc acacagacca accccagacg	1560
gggaccacct ggcactcagg tcactgccat ttccctctcc attcaattcc aatgcctcg	1620
tgcttcctcc ctccctcttc ctgcggggga gcaccctgtg cagctccctcc ctgcagtcca	1680
caccctgggg agacccgacc ctgcagccca caccctgggg agacctgacc ctcctccagc	1740
ccttctccc ccgtgtctct tgccacccac caagacagcc ctgggtctt gtccctacag	1800
ccccaccca gtctctacc tagaccgtc ttccctcc taaacacccctc tcccaggcca	1860
accctacacc tgcaaggccct cccctccact gccaaagacc ctcatgttct cttgcctgtg	1920
cccaaaaaaa tgcttcctct gccccacagct cgagctcttc ctctccttagg gcccctgagg	1980
gatggcattg accgtgccct cgcacccaca cactgccat gccctcacat tcctcctggc	2040
cactccagcc ccactccct ctcaggccgt gctctggtat ttctgggaca aagccttacc	2100
caagtcttc ccatgcaggc ctggccctt accctactg cccggttaca gggcagcctc	2160
ctgtgcacag aagcagggag ctcagccctt ccacaggcag aaggcactga aagaaatcg	2220
cctccagcgc ctgtacacac gtctgcctgt gtctctact gccgcacccct gcagggaggc	2280
tcggcactcc ctctaaagac gagggatcca ggcagcagca tcacaggaga atgcagggt	2340
accagacatc ccagtccctc cacaggccctc tcctggaaag agacctgaag acgcccagtc	2400
aacggagtct aacaccaaacccttccctggag gccgatgggt agtaacggag tcattgccag	2460
acctggaggc aggggagcag tgagcccgag cccacaccat agggccagag gacagccact	2520
gacatccaa gccactcaact ggtgtccca caacacccca tggaaagagg acagacccac	2580
agtcccacct ggaccaggc agagactgct gagaccgc accagaacca accaagaaac	2640
accaggcaac agcatcagag gggctctgg cagaacagag gagggaggt ctcccttacc	2700
agcaggcgct tcccttgacc gaagacagga tccatgcaac tccccagga caaaggagga	2760
gcccctgtt cagcactggg ctcagagtcc tctccaagac acccagagtt tcagacaaaa	2820
accccttggaa atgcacagtc tcagcaggag agccagccag agccagcaag atggggctca	2880
gtgacaccccg cagggacagg aggatttgt gggggctcggt gtcaactgtga ggacattgt	2940
ctcatgggtt atgcataacc cacagtgaca cagccccatt cccaaagccc tactgcaaac	3000
gcattccact tctggggctg agggcttggg ggagcgtctg ggaaataggg ctcaggggt	3060
tccatcaatg cccaaaacgc accagactcc cttccatataca tcacacccac cagccagcga	3120
gcagagtaaa cagaaaatga gaagcaagct gggaaagctt gcacaggccc caagggaaaga	3180

gctttggcgg gtgtgtaaa ggggatgcgg gcagagccctg agcagggcct tttgctgttt	3240
ctgccttcct gtgcagagag ttccataaaac tggtgtcga gatcaatggc tgaggagttag cccaggagga cagcggtggaa agagcacagg gaaggaggag cagccgctat cctacactgt catcttcga aagttgcct tgtgccaca ctgctgcata atggatgtt taacagctga tgttagacaca gctaaagaga gaatcagtga gatggatttg cagcacagat ctgaataat tctccagaat gtggagcagc acagaagcaa gcacacagaa agtgcctgtat gcaaggacaa agttcagtgg gcacccctcag gcattgctgc tggcacaga cactctgaaa agccctggca ggaactccct gtgacaaagc agaaccctca ggcaatgccca gccccagagc cctccctgag	3300 3360 3420 3480 3540 3600 3660
agcctcatgg gcaaagatgt gcacaacagg tgttctcat agccccaaac tgagagcaaa gcaaacgtcc atctgaagga gaacaggcaataaacatg gcaggttcat gaaatgcaaa cccagacgc cacaaggcaca aaagtacagg gttataagcg actctggttt agttcatgac aatgctgagt aattggagta acaaagtaaa ctccaaaaaa tactttcaat gtgatttctt ctaaataaaa ttacaccct gcaaaatgaa ctgtttttt aaggataca ttcccagtt agaaaaccat aaagaaaacc aagaaaagga tgatcacata aacacagtgg tggttacttc tgctgggaa ggaagagggt atgaactgag atacacaggg tggcaagtc tcctaacaag	3720 3780 3840 3900 3960 4020 4080
aacagaacga atacattaca gtaccttcaa aacagcaggtaaacttctaa attgcaagaa gaggaaaatg cacacagttt tgtagaaa attctcagtc cagcactgtt cataatagca aagacattaa cccaggtcgataaataagc gatgacacag gcaattgcac aatgatacag acatatattt agtatatgag acatcgatga tttatccccaaataaacgac tttaaagaga taaaggcgtt atgtgtggtg gcattcacct ccctgggatc cccggacagg ttgcaggctc actgtgcagc agggcaggcg ggtacctgct ggcagttctt gggccctgtat gtggagcaag cgcaggccat tatatcccgaggacggcac agtcgtgaa ttccagagag aagcaactca	4140 4200 4260 4320 4380 4440 4500
gccacactcc ccagggcagag cccgagaggg acgcccacgc acagggaggc agagcccagc acctccgcag ccagcaccac ctgcgcacgg gccaccacct tgcaaggcaca gagtgggtgc tgagaggagg ggcaggagca ccagggcagg tgagcaccca gagaaaactg cagacgcctc acacatccac ctgcgcctcc cctgacctgg acctcactgg cctggccctc acttaacctg ggcttcacccat gacccgtggcc tcacctgact tggacctcgc ctgtcccaag cttaacctg cctggccctc aactcacctg aacgtctctt gacccgtggtt taacctgtcc tggactcac ctggccctgg ctccctgaa cctggacccctc atctggccctg ggcttcacccat ggcctggcc	4560 4620 4680 4740 4800 4860 4920

tcacctgacc tggacctcat ctggcctgga cctcacctgg cctggacttc acctggcctg	4980
ggcttcacct gacctggacc tcacctggcc tcgggcctca cctgcacctg ctccaggctt	5040
tgctggagcc ttagtagcac tgagggtgca gaagctcatc cagggttggg gaatgactct	5100
agaagtcacc cacatctgac ctttctgggt ggaggcact gggtggccctg ggaatataaa	5160
aatctccaga atgatgactc tgtgattgt gggcaactta tgaacccgaa aggacatggc	5220
catgggttgg gttagggacat agggacagat gccagctga ggtggagcct caggacacag	5280
gtggcacgg acactatcca cataagcgag ggatagaccc gagtgtcccc acagcagacc	5340
tgagagcgct gggcccacag cctccctca gagccctgct gcctccctcg gtcagccctg	5400
gacatcccgat gttcccccag gcctggcgtt aggttagaa tgaggtctgt gtcactgtgg	5460
tatcaccata ttttgactgg tcattataac cacagtgtca cagagtccat caaaaaccca	5520
tgccttggaaat cttcccgcca cagccctccc catggggccc tgcctgcctcc tcaggtcage	5580
cccgacatc ccgggttcc ccaggctggg cggttaggtt ggggtgaggt ctgtgtcact	5640
gtgttatcac catggttcgg ggagtcttta taaccacagt gtcacagagt ccatcaaaaa	5700
cccatccctg ggagcctccc gccacagccc tccctgcagg ggaccggta gtcgcattt	5760
aggatttga tcgaggagac agcaccatgg gtatggtggc taccacagca gtgcagccctg	5820
tgacccaaac ccgcaggca gcaggcacga tggacaggcc cgtgactgac cacgtggc	5880
tccagcctgc cagccctgga gatcatgaaa cagatggcca aggtcaccc acaggtcatc	5940
cagatctggc tccgagggtt ctgcatcgct gctgcctcc caacgcctgtt ccaaatggga	6000
cagggacggc ctacacgcac catctgctgc catcaggcca gcatcccag aagccctcc	6060
ctcaaggctg ggcacatgtg tggacactga gagccctcat atctgatgtt gggcaccagg	6120
agggaggggc tggccctgtg cactgtccct gcccctgtgg tccctggcct gcctggccct	6180
gacacctgag ccttcctgg gtcatttcca agacagaaga catttcctgg gacagccgga	6240
gctggcgctc gtcatcctg cccggccgtc ctgagtcctg ctcatcatttcca gacccatccg	6300
gggaagccaa cagaggactc gcctcccaca ttcaagagaca aagaaccttc cagaaatccc	6360
tgcctctctc cccagtgac accctttcc aggacagtcc tcagtggcat cacagccggcc	6420
ttagatcccc aggacgcagc accgctgtca atagggccccc caaatgcctg gaccaggccc	6480
tgcgtggaa aggctctgg ccacactcg gcttttctgt aagggccctc ctgcgtgtt	6540
accacagtca ctaccatagt gatgaaccca gtggcaaaaa ctggctggaa acccaggggc	6600
tgtgtgcacg cctcagcttg gagctctcca ggagcacaag agccggccccc aaggatgtt	6660
gcccgacacc tcagcctcta gggacacctg ggtcatctca gcctggcgtt gtgcctgc	6720
caccatcttc ctccaaatag gggcttcaga gggctctgag gtgacccatc tcatgaccac	6780

aggtgacctg gccctccct gccagctata ccagaccctg tcttgacaga tgccccatt	6840
ccaacagcca attcctggga ccctgaatag ctgttagacac cagcctcatt ccagtacctc	6900
ctgccaattg cctggattcc catcctggct ggaatcaaga aggcagcata cgccaggctc	6960
ccaacaggca ggactcccgc acaccctct ctgagaggcc gctgtttcc gcagggccag	7020
gccctggaca gtccccctca cctgccacta gagaaacacc tgccatgtc gtccccacct	7080
ggaaaagacc actcgtggag cccccagccc caggtacagc tgtagagaca gtcctcgagg	7140
ccccctaagaa ggagccatgc ccagttctgc cgggaccctc ggccaggccg acaggagtgg	7200
acgctggagc tggcccaaca ctggccaca taggagctca ccagtggaggg caggagagca	7260
catgccgggg agcacccagc ctccctgtca ccagaggccc gtcccagagc ccaggaggct	7320
gcagaggcct ctccaggag acactgtgca tgtctggta ctaagcagcc ccccacgtcc	7380
ccagtcctgg gggccctgg ctcaagtc tggccctcc ctgtccctg ggaagctct	7440
cctgacagcc ccgcctccag ttccaggtgt ggttattgtc aggcatgtc agactgtgg	7500
ggacatagtg gccaccatta ccacagtgtt gccgcccata gcagcaacca ggccaagtag	7560
acagggccct gctgcgcagc cccaggcatc cactcacct gttctctg gggctctcaa	7620
ggctgctgtc tgtctctgg ccctctgtgg ggagggttcc ctcaatggaa ggtctgtgt	7680
ccagggcagg gatgatttag atagaaatca aaggctggca gggaaaggca gttccccc	7740
ctgagaggtg caggcagcac cacggagcca cggagtca a gggccacgg a gccccattg	7800
tggcatttg agagtgtgt gccccggca ggcccgccc tggatgggaa gcctgtccca	7860
tcccacagcc cgggtccac gggcagcggg cacagaagct gccagggtgt cctctatgtat	7920
cctcatccct ccagcagcat cccctccaca gtggggaaac tgaggcttgg agcaccaccc	7980
ggccccctgg aaatgaggct gtgagccag acagtggcc cagagcactg tgagtacccc	8040
ggcagttaccc ggtgcaggg atcagccaga gatgccaaac cctgagttgac cagcctacag	8100
gaggatccgg ccccacccag gccactcgat taatgtcaa cccctggcc tggagaccc	8160
ttccagtacc accaggact cagttctca gggcctcatc cctgcaagga aggtcaaggg	8220
ctggcctgc cagaacacaca gcaccctcc tagccctggc taagacaggg tggcagacg	8280
gctgtggacg ggacatattt ctggggcatt tctcaactgtc acttctgggt ggttagctgt	8340
acaaaaacgc agaccctgcc aaaatcccc ctgcctcccg cttagggctg gcctggaatc	8400
ctgctgtcct aggaggctgc tgacactccag gatggctcg tccccagttc cagggcgaga	8460
gcagatccca ggcaggctgt aggctggag gccaccctg cccttggccgg ggttgaatgc	8520
aggtgcccaa ggcaggaaat ggcattgagca caggatgac cgggacatgc cccaccagag	8580
tgcgcctt cctgctgtc accctgcacc ccccaaggccca gcccacgacg tccaacaact	8640

gggcctgggt ggcagccca cccagacagg acagacccag caccctgagg aggtcctgcc	8700
agggggagct aagagccatg aaggagcaag atatgggcc cccgatacag gcacagatgt	8760
cagctccatc caggaccacc cagcccacac cctgagagga acgtctgtct ccagcctctg	8820
caggtcgaaa ggcagctgac ccctgacttg gaccctatt ccagacacca gacagaggcg	8880
caggcccccc agaaccagggt ttgagggacg ccccgtaaaa gccagacaaa accaagggt	8940
gtttagccca gcaaggaaag gccccaaac agaccaggag gttctgaag gtgtctgtgt	9000
cacagtgggg catagccaca gctggtagcca cagtacact cacccagcca gaaacccat	9060
tccaaatcag cgaaagcaga gagagcagg aggacacgtt taggatctga gactgcacct	9120
gacacccagg ccagcagacg tctccctcc agggcacccc accctgtcct gcatttcgc	9180
aagatcaggg gccccttag ggggggtcta gggtgaggag atgggtcccc tgtacaccaa	9240
ggaggagttt ggcaggccc gagcactc	9268
<210> 3	
<211> 9441	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(9441)	
<223> HD 1.14-6.19	
<400> 3	
tcccatgtt ggtgacctg cccagaggt cctggccca cccacacac cggggcgaa	60
tgtgtgcagg cctcggtctc tgtgggttt ccgctagctg gggctcacag tgctcacccc	120
acacctaataa tgagccacag cctccggagc cccgcagga gacccgcac acaagcccag	180
ccccaccca ggaggccca gagctcaggg cgcccggtcg gattccgaac agcccgagt	240
cacagcggtt ataaccggaa ccaccactgt cagaatagct acgtcaaaaa ctgtccagtg	300
gccactgccc gaggccccgc cagagaggc agcagccact ctgatccat gtcctgccgg	360
ctcccatgac cccagcacg cggagccca cagtgtcccc actggatgg aggacaagag	420
ctggggattc cggcggtcg gggcaggggc ttgatcgat cttctgccg tggctccagt	480
gcccctggct ggagttgacc cttctgacaa gtgtcctcag agagacaggc atcaccggcg	540
cctcccaaca tcaacccag gcagcacagg cacaacccc acatccagag ccaactccag	600
gagcagagac accccaatac cctggggac cccgaccctg atgacttccc actgaaattc	660
gccgtagagt ccaccaggac caaagaccct gcctctgcct ctgtccctca ctcaggacct	720

gctgccggc gaggccttg gagcagactt gggcttaggg gacaccagt tgaccccgac	780
cttggcagg acgcagacct ttccttcct tcctgggca gcacagactt tgggtctgg	840
gccaggagga acttctggca ggtcgccaag cacagaggcc acaggctgag gtggccctgg	900
aaagaccitcc aggaggtggc cactcccctt cctccagct ggaccatcg tcctcccaa	960
gataagggtg ccatccaagg caggtgctcc ttggagcccc attcagactc ctccctggac	1020
cccactggc ctcagtccta gctctggga tgaagccacc acaagcacac caggcagccc	1080
aggcccagcc accctgcagt gcccaagcac acactctgga gcagagcagg gtgcctctgg	1140
gaggggctga gctccccacc ccaccccccac ctgcacaccc cacccacccc tgccagcgg	1200
ctctgcagga ggttcagagc cccacatggg gtatggactt aggtctcac tcacgtggct	1260
cccatcatga gtgaagggc ctcaagccca ggttccaca gcagcgcctg tcgcaagtgg	1320
aggcagaggc cgagggcca ccctgacgt gtccctgagg ttctgcage ccaggtgcc	1380
ctgctgtccc tgggaggcct gggctccacc agaccacagg tccagggcac cgggtgcagg	1440
agccacccac acacagctca caggaagaag ataagtcctt gaccccccagg gccagaacct	1500
gccttcctgc tactgcttcc tgccccagac ctggcgccc tccccgtcc acttacacac	1560
aggccagggaa gctgttccca cacagaacaa cccaaacca ggaccgcctg gcactcaggt	1620
ggctgcatt tccttccttca tttgttccca ggcctctgt cctcccttgt tccttcctcg	1680
ggggaaacagc ctgtgcagcc agtccctgca gcccacaccc tggggagacc caaccctgcc	1740
tggggccctt ccaaccctgc tgctttact gcccacccag aaaactctgg ggtctgtcc	1800
ctgcagtccc taccctggtc tccacccaga cccctgtta tcactccaga cacccctccc	1860
aggcaaaccc tgacacgtca ggcctgtcc tcttctgtcg cttaggcctc agtttctccc	1920
ccctgtgccc acaccctacc tccttcctgca cacaactcta acttttttc tcctggagcc	1980
cctgagccat ggcattgacc ctgccttcacc accacccaca gccatgccc tcaccccttc	2040
cctggccact ccgaccccgcc cccctctcag gccaaggccct ggtatttcca ggacaaaggc	2100
tcacccaaagt ctttccagg caggcctggg ctctgcctt cactccgg ttacacggga	2160
gccttcgttgc cacagaagca gggagctcag cccttcaca ggcagaaggc actgaaagaa	2220
atcgccctcc agcaccttga cacacgtccg cccgtgtctc tcactgccc cacctgcagg	2280
gaggcctccgc actccctcta aagacaaggg atccaggcag cagcatcag ggagaatgca	2340
gggcctccag acatcccagt cctctcacag gccttcctcg ggaagagacc tgcaagccacc	2400
accaaacagc cacagaggct gctggatagt aactgagtc atgaccgacc tggagggcag	2460
gggagcagtg agccggagcc cataccatag ggacagagac cagccgctga catcccgagc	2520
tcctcaatgg tggccctata acacacccatg gaaacataac acacccacag ccccacctgg	2580

aacagggcag agactgctga gccccagca ccagcccaa gaaacaccag gcaacagtat	2640
cagagggggc tcccgagaaa gagaggaggg gagatctcct tcaccatcaa atgcttcct	2700
tgaccaaaaa cagggtccac gcaactcccc caggacaaag gaggagccc ctatacagca	2760
ctgggcttag agtctctct gagacaccct gagttcaga caacaacccg ctggaatgca	2820
cagtctcagc aggagaacag accaaagcca gcaaaggga cctcggtgac accagtaggg	2880
acaggaggat ttgtgggg ctcgtgtcac tgtgaggaca ttgtagtcat ggtagctgcc	2940
actcccacag tgacacagac ccattccaa agccctactg caaacacacc cactcctggg	3000
gctgaggggc tggggagcg tctggaaagt agggtccagg ggtgtctatc aatgtccaaa	3060
atgcaccaga ctcggcaca aacaccaccc caccagccag cgagcagggt aaacagaaaa	3120
ttagaggctc tggaaagctt gcacaggccc caagggaaaga gctttggcgg gtgtgcaaga	3180
ggggatgcag gcagagcctg agcaggccct tttgtgttt ctgcttcct gtgcagagag	3240
ttccataaac tgggttcaa gatcagtggc tggaatgag cccaggaggg cagtcgtgg	3300
gaagagcaca gggaggagg agcagccgt atcctacact gtcatcttc aaaagttgc	3360
cttgtgacca cactattgca tcatggatg cttaaagact gatgtagaca cagctaaga	3420
gagaatcagt gagatgaatt tgcagcatag atctgaataa actctccaga atgtggagca	3480
gtacagaagc aaacacacag aaagtgcctg atgcaaggac aaagttcagt gggcaccc	3540
aggcattgct gctggcaca gacactctga aaagccttg caggatctcc ctgcacaaa	3600
gcagaaccct caggcaatgc cagccccaga gccctccctg agagcgtcat gggaaagat	3660
gtgcagaaca gctgattatc atagactcaa actgagaaca gagcaaacgt ccatctgaag	3720
aacagtcaaa taagcaatgg taggttcatg caatgcaaac ccagacagcc agggacaac	3780
agttagaggc tacaggcggc tttcggttg agttcatgac aatgctgagt aattggagta	3840
acagaggaaa gccaaaaaaa tacttttaat gtgattctt ctaaataaaa tttacaccag	3900
gc当地atgaa ctgtttttt aaggataaa cttccctg gaaaaactac aaggaaaatt	3960
aagaaaaacga tgatcacata aacacagttt tggtacttc tactggggaa ggaagagggt	4020
atgagctgag acacacagag tcggcaagtc tccaagcaag cacagaacga atacattaca	4080
gtacattgaa tacagcgtt aaacttctaa atcgcaagaa cagggaaatg cacacagctg	4140
tgttagaaa attctcagtc cagcactatt cataatagca aagacattaa cccaggttgg	4200
ataaataaat gatgacacag gcaattgcac aatgatacag acatacattt agtacatgag	4260
acatcgatga tgtatcccc aagaaatgac tttaaagaga aaaggcctga tgtgtggtgg	4320

cactcacctc cctgggatcc ccggacaggt tgcaggcaca ctgtgtggca gggcaggctg	4380
gtacatgctg gcagctcctg gggcctgatg tggagcaagc gcagggctgt ataccccaa	4440
ggatggcaca gtcatgtaat tccagagaga agcagctcag ccacactgcc caggcagac	4500
ccgagaggga cgccccacgt aaggaggca gagcccagct cccacacgc caccaccacc	4560
tgtgcacggg ccaccaccc tcagggcacag agtgggtgct gagaggagg gcagggacac	4620
caggcagggt gagcacccag agaaaactgc agaagctca cacatccacc tcagcctccc	4680
ctgacacctgga ctcacactgg tctggaccc tcctggcctg ggcctcacct gacctggacc	4740
tcacctggcc tgggcttcac ctgacacctgga ctcacactgg ctcacccctt caccgtcacc	4800
tgctccaggt ctgtgtgaa cctgagtagc actgaggctg cagaagctca tccagggttg	4860
ggaaatgact ctggaactct cccacatctg acctttctgg gtggaggcat ctgggtggcc	4920
tggaaataa aaaggccccca gaatggtgcc tgcgtgattt gggggcaatt tatgaaccgg	4980
aaaggacatg gccatggggt gggtagggac atagggacag atgccagcct gaggtggagc	5040
ctcaggacac agttggacgc ggacactatc cacataagcg agggacagac ccgagtgttc	5100
ctgcagtaga ctcagagacg ctggccac acgcctccct cggcctctg ctgcctcctc	5160
aggtcagccc tggacatccc gggttcccc aggccagatg gtaggttga agtgaggct	5220
gtgtcactgt ggttatcatga tcacgttgg gggagtcatc gttataccca cagcatcaca	5280
cggccatca gaaacccatg ccacagccct cccgcagg gaccgcgc tgccatgtta	5340
cgatttgtat cgaggacaca gcccattggg tatggtgctt accacagcg tgccatgtt	5400
gaccCAAACA cacagggcag caggcacaat ggacaggct gtgagtgacc atgctggct	5460
ccagcccccc agccccggag accatgaaac agatggccaa ggtcacccca cagttcagcc	5520
agacatggct ccgtgggtc tgcattgtc ctgcctcta acaccagccc agatggggac	5580
aaggccaacc ccacattacc atctcctgt gtccacccag tggcccaga agcccccctcc	5640
tcatggctga gccacatgtg tgaacccatgaa gggccatggc tgcacccatg gttttcc	5700
aaggcgggg ctggccctgt gcactgtccc tgcacccatg gtccctggcc tgcctggccc	5760
tgacacactga gcctttctg agtcatttct aagatagaag acattccgg ggacagccgg	5820
agctggcgt cgctcatccc gcccggccgt cctgagtcct gttttcc agacccatcacc	5880
aggaaagcca acagaggact cacctcacac agtcagagac aaagaacctt ccagaaatcc	5940
ctgtctcaact ccccaactggg caccttctt caggacattc ctggcgtcgca tcacagcagg	6000
cacccacatc tggatcagga cggcccccag aacacaagat ggccatgg gacagccccca	6060
caacccagac ctccccagac ccctaaagg cgtcccaccc cctgcacctg cccagggt	6120
aaaaatccag gaggcttgac tcccgatac ctcctccacca gacatcacct cagccccctc	6180

ctggagggga caggagcccg ggagggttag tcagacccac ctgcctcga tggcaggcgg	6240
gaaagattca gaaaggcctg agatccccag gacgcagcac cactgtcaat gggggcccca	6300
gacgcctgga ccagggcctg cgtggaaag gccgctggc acactcaggg gcttttg	6360
aaggcccctc ctactgtgt accacggta ctaccacagt gaigaaacta gcagcaaaaa	6420
ctggccggac acccagggac catgcacact tctcagctt gagctctcca ggaccagaag	6480
agt caggctt gagggttgt agccagaccc tcggcctcta gggacaccct ggccatcaca	6540
cgggatggc tggtgccca catgccatct gctccaaaca gggccttcag aggctctga	6600
ggtgacttca ctcatgacca caggtgcctt ggcccttcc cgccagcta caccgaaccc	6660
tgtccaaaca gcgtccccag ttccaaacagg caatccctgg ggcccagaat tgctgttagac	6720
accagcctcg ttccagcacc tcctgcaat tgcctggatt cacatccctgg ctggaatcaa	6780
gagggeagca tccggcaggg tccaaacagg caggactccc gcacaccctc ctctgagg	6840
ccgcgtgttt ccgcaggggc aggccctgga cagttccctt caccgtccac tagagaaaca	6900
cctgccatttgc tctcccccac ctggaaaaga ccactcggtt agccccccagc cccaggtaca	6960
gctgttagaga gactccccga gggatctaag aaggagccat ggcgcgttctt gcccggaccc	7020
tcggccaggc cgacaggagt ggacacttgg gctggccca cactggccca cataggagct	7080
caccagttag ggcaggagag cacatgcccgg ggagcccca gcctctgtt gaccagaggc	7140
ccgtcccaaga gcccaggagg ctgcagaggc ctctccaggg ggacactgtt catgtcttgtt	7200
ccctgagcag ccccccacgt ccccaactt gggggccctt ggacacagctg tctggaccct	7260
ccctgttccc tggaaagctc ctcctgacag cccgcctcc agttccagg gtggttatttgc	7320
tcaggggttgc tcagactgtt gttggacacag ccatggttac cacagtgggtt ctgcccata	7380
cagcaaccag gccaagttaga caggcccctg ctgtgcagcc ccaggcctcc acttcacctg	7440
cttccctgg ggctctcaag gtcactgtt gtcacttgc tgcctctgtt gggagggttc	7500
cctcagtggg aggtctgttc tcaacatccc agggcctcat gtctgcacgg aaggccaatg	7560
gatggcaac ctcacatgcc gggctaaaga tagggtgccc agcctggcgg gggacagttac	7620
atactgtgg ggtgtctgtc actgtgcata gtggggact ggctccaaa caacgcgtt	7680
ctcgccaaaa tccccacaggc ctcccctgtt aggggctggc ctgtatcttgc gcaatcttgc	7740
gaggctgttgc acctccagaa tgtctccgtc cccagttcca gggcgagagc agatccagg	7800
ccggctgtcag actggggaggc cacccctcc ttcccagggtt tcactggagg tgaccaagg	7860
aggaaatggc cttaaacacag ggttgcactgc gccatcccc aacagagtca gccccctct	7920
gctctgttacc ccgcacccccc caggccagtc cacgaaaacc agggcccccac atcagagtca	7980
ctgcctggcc cggccctggg gggacccctt cagccccac cctgtctaga ggacttgggg	8040

ggacaggaca caggccctct ctttatggtt cccccacctg cctccggccg ggacccttgg	8100
ggtgtggaca gaaaggacac ctgcctaatt ggcccccagg aacccagaac ttctctccag	8160
ggaccccagc ccgagcaccc ctttacccag gaccagccc tgccctctt cccctctgct	8220
ctcctctcat cacccatgg gaatccgta tccccagga gccatcagga agggctgaag	8280
gaggaagcgg gcccgtgcac caccggcag gaggctcg ttcgtgaac ccaggaaagt	8340
gccagcctcc tagagggtat ggtccaccc gcctgggct cccaccgtgg caggctgcgg	8400
ggaaggacca gggacggtgt gggggaggc tcagggccct gcgggtgctc ctccatcttc	8460
ggtgagcctc ccccttacc accgtcccg cccacccctt ctccaccctg gtcgcacgtc	8520
ttccacacca tcctgagtcc tacctacacc agagccagca aagccagtgc agacaaaggc	8580
tggggtgcag ggggctgcc agggcagtt cggggaggaa agatggagg gaggggagggt	8640
cagtgaagag gcccccttcc cctgggtcca ggatccctt ctggacccccc cggatccat	8700
ccccctctgg ctctggagg agaagcagga tgggagaatc tgtgcggac cctctcacag	8760
tggaatatcc ccacagcggc tcagggcaga cccaaaagcc ctcagttag ccctccactg	8820
cagtcctgg cctggtagc agccctccc acagaggaca gacccagcac cccgaagaag	8880
tcctgccagg gggagcttag agccatgaaa gagcaggata tggggcccc gatacaggca	8940
cagacctcag ctccatccag gcccaccggg acccaccatg ggaggaacac ctgtctccgg	9000
tttgtaggt agtggcctc tgtctcgac cccactccag acaccagaca gagggcagg	9060
cccccaaaa ccagggttga gggatgatcc gtcaaggcag acaagaccaa gggcactga	9120
ccccagcaag ggaaggctcc caaacagacg aggaggttc tgaagctgtc tgtatcacag	9180
tggggcatag ccatggctgg taccacagt acactcgcca ggccagaaac cccgtccaa	9240
gtcagcggaa gcagagagag cagggaggac acgttagga tctgaggccg cacgtacac	9300
ccagggcagc agacgtctcc cttccaggc accctccacc gtctgcgtt tcttaagaa	9360
tagggcggc ctgaggggt ccagggccag gcgataggc ccctctaccc caaggaggag	9420
ccaggeagga cccgagcacc g	9441
<210> 4	
<211> 11592	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(11592)	
<223> HD 1.20-6.25, 1.26	

<400> 4

tccccatgga ggctgacactg cccagacggg cctggggcca ccccacacac cggggcggaa	60
tgtgtgcagg ccccagtctc tgtgggttt ccgcgtagctg gggcccccag tgcgtcaccc	120
acacctaag cgagccccag cctccagacgc cccctaagca ttccccggcc agcagccccag	180

ccccctgcccc cacccaggag gccccagagc tcagggcgcc tggtcggatt ctgaacagcc	240
ccgagtcaca gtgggtatca ctggcacgac caccgtgaga aaaactgtgt caaaaactga	300
ctcctggcag cagtggagg ccccggcaga gaggggagca gccggcctga acccatgtcc	360
tgcgggttcc catgaccccc agcacccaga gccccacggt gtcccccgttg gataatgagg	420
acaagggtct ggggctccgg tggttgcgg cagggacttg atcacatcct tctgctgtgg	480
ccccattgcc tctggctgga gttgaccctt ctgacaagtg tcctcagaaa gacagggtac	540
acggcacct cccaaatatca accccaggca gcacagacac aaaccccaaca tccagagcca	600

actccaggag cagagacacc ccaacactct gggggacccc aaccgtgata actccccact	660
ggaatccgcc ccagagtcta ccaggaccaa agggcctgcc ctgtcttgtt ccctcactca	720
gggcctctg cagggcgagc gtttggagc agactcggtc tttagggaca ccactgtggg	780
ccccaaacttt gatgaggcca ctgacccttc ctcccttcc tggggcagca cagactttgg	840
ggtctggca gggagaact actggcttgtt ggccaatcac agagccccca ggccgaggtg	900
ggcccaagaa ggccctcagg aggtggccac tccacttctt cccagctgga cccaggtcc	960
tccccaagat aggggtgccat tccaaaggcag gtccctccatg gagccccctt cagactctc	1020

ccgggacccc	actggacctc	agtccctgt	ctggaatgc	agccaccaca	agcacaccag	1080
gaagcccagg	cccagccacc	ctgcagtggg	caagccccaca	ctctggagca	gagcagggtg	1140
cgtctggag	gggctaacct	cccccccccc	caccccccatt	ctgcacacag	ccacccatcca	1200
ctgcccagac	cctctgcagg	agggccaagc	caccatgggg	tatggactta	gggtctca	1260
cacgtgcctc	ccctcctggg	agaaggggcc	tcatgcccag	atccctgcag	cactagacac	1320
agctggaggc	agtggccca	gggccacccct	gacctggcat	ctaaggctgc	tccagccag	1380
acagcactgc	cgttccctggg	aagccctggc	tccaccagac	cacaggtcca	gggcacagcc	1440

cacaggagcc acccacacac agtcacagg aagaagataa gctccagacc ccagggcggg	1500
acctgccttc ctgccaccac ttacacacag gccagggagc tttcccaca cagatcaacc	1560
ccaaaccggg actgcctggc actagggtca ctgcatttc ccttcattt ccctccagt	1620
gcctctgtgc tccctcccttc tgggaacac cctgtgcagc ccctccctgc ageccacacg	1680
ctggggagac cccacccctgc ctgggcctt ttctacctgc tgcaacttgcc gcccacccaa	1740
acaaccctgg gtacgtgacc ctgcagtc tccctgtacc tgcaaccaga cccctgtcccc	1800

tccctctaaa caccctccc aggccaactc tgcacctgca ggccctccgc tcttctgcc	1860
caagagcctc aggtttcct acctgtgcc acccccta ac ccctccgtcc cacaacttga	1920
gttcttcctc tcctggagcc cttaggcat ggcactgacc ctacactccc acccacacac	1980
tgcctatgcc atcaccttc tcctggacac tctgaccccg ctccccccc tctcagaccc	2040
ggccctggta ttccaggac aaaggctcac ccaagtcttc cccatgcagg cccttgcct	2100
cactgcctgg ttacacggga gcctcctgtg cgcaagaagca gggagctcag ctcttccaca	2160
ggcagaaggc actgaaagaa atcagcctcc agtgcctga cacacgtccg cctgtgtc	2220
tcactgcctg cacctgcagg gaggctccgc actcccccta aagatgaggg atccaggcag	2280
caacatcactgg gagaatgca gggctccag acagcccagc cctctcgag gcctctctg	2340
ggaagagacc tgccaccacc actgaacagc cacggaggc gctggatagt aaccgagtca	2400
gtgaccgacc tggagggcag gggagcagt aaccggagcc cataccatag ggacagagac	2460
cagccgctaa catcccgagc ccctcactgg cggcccccaga acacccctg gaaagagaac	2520
agacccacag tcccacctgg aacagggcag acactgctga gccccagca ccagcccaa	2580
gaaacactag gcaacagcat cagagggggc tcctgagaaa gagaggaggg gaggtctc	2640
tcaccatcaa atgttcct tgaccaaaaa cagggtccac gcaactcccc caggacaag	2700
gaggagcccc ctgtacagca ctgggctcag agtcctctt gagacaggct cagttcaga	2760
caacaacccg ctggaatgca cagtctcagc aggagagcca ggccagagcc agcaagagga	2820
gactcggta caccagtctc ctgttagggac aggaggattt tgtgggggtt cgtgtactg	2880
tgagcacatt gtgggtgtca ctgccattcc cacagtgaca caacccatt cctaaagccc	2940
tactgcaaac gcacccactc ctgggactga gggctgggg gagcgtctgg gaagtatggc	3000
ctaggggtgt ccatcaatgc caaaatgca ccagactctc cccaagacat caccacca	3060
gccagtgagc agagtaaaca gaaaatgaga agcagctggg aagcttgcac aggccccaa	3120
gaaagagctt tggcagggtgt gcaagagggg atgtgggcag agcctcagca gggccttttgc	3180
ctgtttctgc ttccctgtgc agagagttcc ataaactggt attcaagatc aatggctggg	3240
agtgagccca ggaggacagt gtggaaagag cacaggaaag gaggagcagc cgctatccta	3300
cactgtcata tttgaaagt ttgcctgtg cccacaatgc tgcatcatgg gatgcttaac	3360
agctgtatgt aacacagcta aagagagaat cagtgaaatg gattgcagc acagatctga	3420
ataaatcctc cagaatgtgg agcagcacag aagcaagcac acagaaatg cctgtatgca	3480
aggcaaagtt cagtggcac cttaggcat tgctgtggg cacagacact ctgaaaagca	3540

ctggcaggaa ctgcctgtga caaagcagaa ccctcaggca atgccagccc tagagccctt	3600
cctgagaacc tcatggcaa agatgtgcag aacagcttt tgtcatagcc ccaaactatg	3660
gggctggaca aagcaaacgt ccatctgaag gagaacagac aaataaacga tggcaggttc	3720
atgaaaatgca aactaggaca gccagaggac aacagttagag agctacaggc ggcttigcg	3780
tttagttcat gacaatgctg agtaatttga gtaacagagg aaagccaaa aaatacttt	3840
aatgtgattt ctctaaata aaatttacac ccggcaaaat gaactatctt cttaaggat	3900
aaactttccc ctggaaaaac tataaggaaa atcaagaaaa cgatgatcac ataaacacag	3960
tggtggttac ttctactggg gaaggaagag ggtatgagct gagacacaca gagtcggcaa	4020
gtctcctaac aagaacagaa caaatacatt acagttaccc taaaacacgc gttaaacttc	4080
taaatcgaa gaagaggaaa atgcacacac ctgtgttag aaaattctca gtccagcact	4140
gttcataata gcaaagacat taacccaggt tggataata agcgatgaca caggcaattg	4200
cacaatgata cagacatata ttcagttat gagacatcga tgatgtatcc ccaaagaaat	4260
gactttaag agaaaaggcc tgatgtgtgg tggcaatcac ctccctggc atccccggac	4320
aggctgcagg ctcaactgtgt ggcaggcag gcaggcacct gctggcagct cctgggcct	4380
gatgtggagc aggacacagag ctgtatatacc ccaaggaagg tacagtcagt gcattccaga	4440
gagaagcaac tcagccacac tccctggcca gaacccaaga tgcacacccca tgacaggga	4500
ggcagagccc agcacctccg cagccaccac cacctgcgcga cggccacca cttgcaggc	4560
acagagtggg tgcgtgaggagg agggcaggg acaccaggca gggtgacgcac ccagagaaaa	4620
ctgcagaagc ctacacatc ctcacaccc tggccatcc acctgacccg gacccacat	4680
ggcctcggc ctacacgtca ctcacccatgg gtctgtgg agcctgagta gcaactgaggc	4740
tgttagggact catccagggt tgggaatga ctctgcaact ctccacatc tgaccttct	4800
gggtggagc acctgggtgc ccagggata taaaaagccc cagaatgatg cctgtgtgat	4860
ttggggcaa ttatgaacc cgaaaggaca tggccatggg gtggtaggg acagtaggga	4920
cagatgtcag ctcacccatgg acgctcggc cacagggtgg catggacagt gtccacccaa	4980
gcggggaca gacccggatg tccctgcgtt agacccatgg gacccatggc cacacccccc	5040
cctcggggcc ctgcgtgcctc ctcacccatgg ccctggacat cccgggttc cccaggcctg	5100
gcggtaggtt tgaagtggg tctgtgtcac tggatccatca ctatcatagt agtggcatt	5160
actaccacag tgtcacagag tccatcaaaa actcatgcct gggagccctc caccacagcc	5220
ctccctgcgg gggaccgcgt catgccgtt taggatgg atcgaggaca cggccatg	5280
ggtaggtgg ctaccacagc agtgcagccc atgacccaaa cacacgggc agcagaaaca	5340
atggacaggc ccacaagtga ccatgtggg ctccagccca ccagccccag agaccatgaa	5400

acagatggcc aaggcaccc tacaggtcat ccagatctgg ctccaagggg tctgcacgc	5460
tgctgccctc ccaacgccaa accagatgga gacaggccg gcccatagc accatctgct	5520
gccgtccacc cagcagtccc ggaagccct ccctgaacgc tggccacgt gtgtgaaccc	5580
tgcgagcccc ccatgtcaga gtagggcag caggagggcg gggctggccc tgtgcacigt	5640
cactgcccct gtggccctg gcctgcctgg ccctgacacc tgagcctctc ctgggtcatt	5700
tccaagacat tcccaggac agccggagct gggagtcgct catcctgcct ggctgtcctg	5760
agtccctgctc atttccagac ctcaccagg aagccaacag aggactcacc tcacacagtc	5820
agagacaacg aaccttccag aaatccctgt ttctctcccc agtgagagaa accctttcc	5880
agggtttctc ttctctccca ccctcttcca ggacagtctt cagcagcatc acagcggaa	5940
cgcacatctg gatcaggacg gccccagaa cacgcgtatgg cccatgggaa cagcccagcc	6000
tttccctcagac ccctaaaagg tatccccacc ttgcacctgc cccagggtctc aaactccagg	6060
aggcctgact cctgcacacc ctccgtccag atatcacctc agccccctcc tggaggggac	6120
aggagcccg gagggtgagt cagacccacc tgccctaat ggcaggcggg gaagattcag	6180
aaaggcctga gatccccagg acgcagcacc actgtcaatg gggcccccag acgcctggac	6240
cagggcctgt gtggaaagg cctctggcca cactcagggg cttttgtga agggccctcc	6300
tgctgtgtga ccacgggtgtt cactcccaca gtgtgaaac cagcagcaaa aactgaccgg	6360
actcgcaggg ttatgcaca cttctcggtt cggagctctc caggagcaca agagccagggc	6420
ccgagggttt gtggccagac cctggccctc tagggacacc cggccatct tagccgtatgg	6480
gctgatgccc tgcacaccgt gtgctgccaa acaggggctt cagagggtct tgagggtact	6540
tcactcatga ccacaggtgc cctggccct tcactgcacat ccctgttccg	6600
agagatgccc cagtccaaa agccaattcc tggggccggg aattactgtt gacaccagcc	6660
tcatccagt acctcctgcc aattgcctgg attccatcc tggctgaaat caagaggcata	6720
gcatccgcca ggctccaaac aggcaggact cccacacacc ctccctgtt agggccgtgt	6780
tttcccgagg gcccaggccgc agacagttcc cctcacctgc ccatgttagaa acacctgcca	6840
tttgtcgtccc cacctggcaa agaccacttgg agggccatctt acagctgttag	6900
agagagtctt cgaggcccct aagaaggagc catgcccagt tctggggca ccctcgccca	6960
ggccgacagg agtggacgct ggagctggc ccacactggg ccacatagga gctcaccagt	7020
gagggcagga gacccatgc cggggagcac ccagccctt gctgaccaga gaccgtccc	7080
agagcccaagg aggctgcaga ggccttcca gggggacaca gtgcatttctt ggtccctgag	7140
cagccccccag gctctctac actggggcc cctggcacag ctgtctggac cctccctttt	7200
ccctgggaag ctccctctga cagccccggcc tccagttccaa ggtgtggta ttgtcagggg	7260

gtgccaggcc gtggtagaca tggccaccat taccacagtg gtgccccc tagcagcaac	7320
caggccaagt agacagaccc ctgccacgca gccccaggcc tccagctcac ctgcttctcc	7380
tggggctctc aaggctgctg tctgccctct ggccctctgt ggggagggtt ccctcagtgg	7440
gaggctgtg ctccagggca gggatgactg agatagaat caaaggctgg cagggaaagg	7500
cagttcccg ccctgagagg tgccaggcgc accacagagc catggagtca cagagccacg	7560
gagccccag tgtggcgtg tgagggtgt gggctccgg caggcccagc cctgtatgggg	7620
aagcctgccc cgtcccacag cccaggtccc cagggcagc aggacacagaa gctccaagc	7680
tgtgctctac gatcctcatc cttccagcag catccactcc acagtggga aactgagcct	7740
tggagaacca cccagccccc tggaaacaag gcggggagcc cagacagtgg gcccagagca	7800
ctgtgttat cctggacta ggtgcaggga ccacccggag atccccatca ctgagtgccc	7860
agcctgcaga aggacccaac cccaaccagg ccgcttgatt aagctccatc cccctgtcct	7920
gggaacctct tcccagcgcc accaacagct cggctccca ggcctcatac cctccaagga	7980
aggccaaagg ctgggcctgc cagggcaca gtaccctccc ttgcctggc taagacaggg	8040
tggcagacg gctcagata ggacatattg ctggggcatc ttgctctgtg actactgggt	8100
actggctctc aacgcagacc ctacccaaat cccactgcc tcccctgcta ggggctggcc	8160
tggctcctc ctgctgtcct aggaggctgc tgacccctcag gatggcttct gtccccagtt	8220
ctagggccag agcagatccc aggcaggctg taggctggga ggccacccct gtccttgcgc	8280
aggttcagtg caggcacca ggacaggaaa tggctgaac acaggatga ctgtgccatg	8340
ccctacctaa gtccgcccct ttctactctg caaccccccac tccccaggta agcccatgac	8400
gaccaacaac ccaacaccag agtcactgcc tggccctgcc ctggggagga cccctcagcc	8460
cccaccctgt cttagaggagt tggggggaca ggacacaggc tctctccta tggcccccc	8520
acctggctcc tggccggacc cttgggtgt ggacagaaaag gacgcctgcc taattggccc	8580
ccaggaaccc agaacttctc tccagggacc ccagcccgag cacccctta cccaggaccc	8640
agccctgccc ctctccct ctgctctct ctcatactc catggaaatc cagaatcccc	8700
aggaagccat caggaagggc tgaaggagga agcggggccg ctgcaccacc gggcaggagg	8760
ctccgtcttc gtgaacccag ggaagtgccca gcctctaga gggatggtc caccctgcct	8820
ggggctccca ccgtggcagg ctgcgggaa ggaccaggaa cggtgtgggg gagggctcag	8880
ggccctgcag gtgctccatc ttggatgagc ccattccct cacccaccga cccggccacc	8940
tcctctccac cctggccaca cgtcgccac accatctga gtcccaccta caccagagcc	9000

agcagagcca gtgcagacag aggctgggt gcagggggc cgccaggca gctttggga	9060
gggaggaatg gaggaagggg aggtcagtga agaggcccc ctcccctgg tctaggatcc	9120
acctttggga cccccggatc ccatcccctc caggctctgg gaggagaagc aggatggag	9180
attcttgtca ggaccctctc acagtggaaat acctccacag cggttcaggc cagataaaaa	9240
agcccttag tgagccctcc actgcagtgc agggcctggg ggcagccct cccacagagg	9300
acagacccag caccccgaaag aagtccctgcc agggggagct cagagccatg aaggagcaag	9360
atatgggac cccaaatactg gcacagacct cagctccatc caggcccacc aggacccacc	9420
atgggtggaa cacctgtctc cggccctgc tggctgtgag gcagctggcc tctgtctcg	9480
accccccattc cagacaccag acagagggac agggcccca gaaccagtgt tgagggacac	9540
ccctgtccag ggcagccaag tccaagaggc ggcgtgagcc cagcaaggaa aggccccaa	9600
acaaccagg aggttctga agctgtctgt gtcacagtgc ggcatacgca cggctaccac	9660
aatgacactg ggcaggacag aaacccatc ccaagtcagc cgaaggcaga gagagcaggc	9720
aggacacatt taggatctga ggccacacct gacactcaag ccaacagatg tctccctcc	9780
agggcgcctt gccctgttca gtgttccctga gaaaacaggg gcagccttag gggatccagg	9840
gccaggagat gggtccctc taccccgagg aggagccagg cggaaatccc agccccc	9900
ccattgaggc catcctgccc agaggggcc ggacccaccc cacacacccca ggcagaatgt	9960
gtgcaggcct caggctctgt gggtgccgct agctgggct ggcagtcctc accccacacc	10020
taagtgagc cacagccgcc agagcctcca caggagaccc cacccagcag cccagccct	10080
acccaggagg ccccagagct cagggcgcct gggtgattc tgaacagccc cgagtacgg	10140
tggtatcat gggagccact accactgtga gaaaagctat gtccaaact gtctccggc	10200
cactgctgga gcccagcca gagaaggac cagccgcggc aacatacgac cttcccgac	10260
ctcatgaccc ccagcacccatc gtgtccaca gtgtcccat tggatggta ggtatggggc	10320
cggggccatc tgacccctccc aacatcaccc ccaggcagca caggcacaaa ccccaaatcc	10380
agagccgaca ccaggaacac agacacccca ataccctggg ggaccctggc cctggtgact	10440
tcccaactggg atccacccccc gtgtccacct ggatcaaaga ccccaccgct gtctctgtcc	10500
ctcaactcagg gcctgctgag gggcggtgc ttggagcag actcaggatc agggccacc	10560
attgtgggc ccaacctcga ccaggacaca gattttctt tcctgccctg gggcaacaca	10620
gactttgggg tctgtgcagg gaggacccatc tggaaagtca ccaagcagac agccctgact	10680
gaggtggct caggaagacc cccaggaggg ggcttgc cttccctctc atgtggaccc	10740
catcccccc aagatagggg catcatgcag ggcaggctt ccatgcagcc accactaggc	10800
aactccctgg cccggctccc cactgcgcct ccatccggc tctggggatg cagccaccaat	10860

ggccacacca ggcagcccg gtccagcaac cctgcagtgc ccaagccctt ggcaggattc	10920
ccagaggctg gagcccaccc ctctcatcc cccccacacct gcacacacac acctacccc	10980
tgcctcgtcc ccctccagga gggttggagc cgcccatagg gtggggctc caggtctcac	11040
tcactcgctt ccctccctgg gcaaaggagc ctgcgtcccc ggtccccct gacggcgtg	11100
ggcacaggtg tgggtactgg gccccagggc tcctccagcc ccagctgccc tgctctccct	11160
gggaggcctg ggcaccacca gaccaccagt ccagggcaca gccccagggc gcccggccact	11220
gccagctcac aggaagaaga taagcttcag accctcaggg ccgggagctg cttccctgcc	11280
acccttcct gccccagacc tccatgcct ccccaacca cttacacaca agccagggag	11340
ctgttccac acagttcaac cccaaaccag gacggctgg cactcgggtc actgccattt	11400
ctgtctgeat tcgctccag cgccctgtg ttccctccct cctccctct tccttcttc	11460
ctgcattggg ttcatgccgc agagtgccag gtgcaggta gccctgagct tgggtcacc	11520
tcctcactga aggccgcctc agggtgccca gggcaggca gggtgggggt gaggcttcca	11580
gctccaaccg ct	11592
<210> 5	
<211> 689	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(689)	
<223> Mouse Ei (an intronic enhancer)	
<400> 5	
tctagagagg tctggtgtag cctgaaaag tccagtttc aaaggaacac agaagtatgt	60
gtatgaaata tttagaagatg ttgctttac tcttaagtgt gttcttagga aaaatagttt	120
aatactgtga cttaaatatg tgagagggtt ttcaagtact catttttta aatgtccaa	180
attcttgtca atcagttga ggtcttgttt gtgtagaact gatattactt aaagttaac	240
cggaaatgg gagtgaggct ctctcataac ctattcagaa ctgactttt acaataataa	300
attaagttc aaatattttt aaatgaattt agcaatgtt agttggagtc aagatggccg	360
atcagaacca gaacacctgc agcagctggc aggaaggcagg tcatgtggca aggctattt	420
ggaaaggaa aataaaacca ctagtaaac ttgttagctgt ggttgaaga agtggtttg	480
aaacactctg tccagccccca ccaaaccgaa agtccaggtc gagcaaaaca ccacctgggt	540
aattgcatt tctaaaataa gttgaggatt cagccgaaac tggagaggtc ctcttttaac	600

ttatttaggtt caaccttta attttagctt gagtagttct agttccccca aacttaagtt	660
tatcgacttc taaaatgtat tttagaattc	689
<210> 6	
<211> 3518	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(3518)	
<223> Mouse Switch Region	
<400> 6	
acttatttca gttaaacatg ctgggggtg gttgagagga cactcagtca gtcagtgacg	60
tgaaggcctt ctaagccagt ccacatgctc tgtgtgaact ccctctggcc ctgcatttg	120
ttgaatggc caaaggtctg agaccaggct gctgctgggt aggccctggac tttgggtctc	180
ccacccagac ctggaaatgt atgggggtgg cttctgccac ccatccacct ggctgctcat	240
ggaccagcca gcctcggtgg ctttgaagga acaattccac acaaagactc tggacctctc	300
cggaaaccagg cacccgcaaat ggtaagccag aggcagccac agctgtggct gctgcttta	360
aagcttgtaa actgtttctg cttaaagaggg actgagtctt cagtcattgc ttttagggga	420
gaaagagaca tttgtgtgtc ttttgagttac cggtgtctgg gtcactcaca tttaacttcc	480
cttggaaaaac tagtaaaaga aaaatgttgc ctgttaacca ataatcatag agctcatgg	540
actttgagga aatcttagaa agcgtgtata caattgtctg gaattatttc agttaagtgt	600
attagttgag gtactgatgc tgtctctact tcagttatac atgtgggttt gaattttgaa	660
tctattctgg ctcttcttaa gcagaaaatt tagataaaat ggataacctca gtgggtttta	720
atgggtggtt taatatagaa ggaattttaa ttggaaagcta atttagaattc agtaaggagg	780
gaccaggct aagaaggcaa tcctgggatt ctggaaagaaa agatgtttt agttttata	840
gaaaacacta ctacattctt gatctacaac tcaatgtggt ttaatgaatt tgaagttgcc	900
agtaaatgtt ctctctgggtt gttaaagaat ggtatcaaag gacagtgtt agatccgagg	960
tgagtgtgag aggacagggg ctggggatgt gatacgcaga aggaaggcca cagctgtaca	1020
gaattgagaa agaatagaga cctgcagttt aggccagcag gtcggctgga ctaactctcc	1080
agccacagta atgaccaga cagagaaagc cagactcata aagcttgcgt agcaaaatta	1140
aggaaacaag gttgagagcc ctagtaagcg aggctctaaa aagcacagct gagctgagat	1200
gggtggcctt ctctgagtgc ttctaaaatg cgctaaactg aggtgattac tctgaggtaa	1260
gcaaagctgg gcttgagcca aaatgaagta gactgtaatg aactggaatg agctggcccg	1320

ctaaagctaaa ctaggctggc ttaaccgaga tgagccaaac tggaatgaac ttcatataatc	1380
taggttgaat agagctaaac tctactgcct acactggact gttctgagct gagatgagct	1440
ggggtgagct cagctatgct acgctgtgtt ggggtgagct gatctgaaat gagatactct	1500
ggagtagctg agatgggtg agatgggtg agctgagctg ggctgagcta gactgagctg	1560
agctagggtg agctgagctg ggtgagctga gctaagctgg ggtgagctga gctgagcttg	1620
gctgagctag ggtgagctgg gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg ggtgagctgg	1680
gatgagctgg ggtgagctga gctgagctgg agtgagctga gctgggctga gctgggtga	1740
gctgggctga gctgggctga gctgggctga gctgggctga gctgagctgg ggtgagctga	1800
gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg ggtgagctgg ggtgagctga gctgggctga	1860
gctgagctga gctgggtga gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg ggtgagctga	1920
gctgagctga gctgagctga gctgggtga gctgagctga gctgagctgg ggtgagctgg	1980
ggtgagctga gctgagctgg agtgagctga gctgggctga gctgggctga gctgggctga	2040
gctgggctga gctgagctga gctgagctga gctgggctga gctgagctga gctgggctga	2100
gctgagctgg ggtgagctgg gctgagctga gctgagctga gctgagctga gctgagctga	2160
gctgagctga gctgagctga gctgagctga gctgagctga gctgagctgg ggtgagctga	2220
gctgagctgg gctgagctgg ggtgagctgg gctgagctgg gctgagctgg gctgagctgg	2280
ggtgagctga gctgggtga gctgagctga gctgggctga gctgagctga gctgggctga	2340
gctgagctga gctgggtga gctgagctga gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg	2400
gctgagcagg gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg ggtgagctgg gctgagctgg	2460
gctgagctga gctgagctgg gctgagctgg gctgagctgg gctgagctgg gctgagctgg	2520
gctgagctgg ggtgagctga gctgggtga gctgggctga gctgagctgg ggtgagctga	2580
gctgggctga gctgagctga gctgggctga gctgagctgg ggtgagctga gctgagctgg	2640
ggtgagctga gctgagctgg ggtgagctga gctagggtga actgggctgg gtgagctgga	2700
gtgagctgag ctgaggtgaa ctgggggtgag ccggatgtt ttgagttttag ctgggttaag	2760
atgagctgaa ctggggtaaa ctggatgag ctgtggtag cgagctgga ttgaacttag	2820
ctgtgtgagc tgagctgggg tcagctgagc aagagttagt agagctggct ggccagaacc	2880
agaatcaatt aggctaagtg agccagattg tgctggatc agctgtactc agatgagctg	2940
ggatgaggtt ggctggatg agctggctaa gctgacatgg attatgttag gctgagcttag	3000
catggctgg cctagctgat gagctaaat tgaatgagcg gggctgagct ggactcagat	3060

gtgctagact gagctgtact ggatgatctg gtgttagggtg atctggactc aactgggctg 3120

gctgatggga tgcgccagg tgaacttaggc tcagataagt taggctgagt agggcctggt 3180
 tgagatggtt cgggatgagc tggaaaaga tggactcgga ccatgaactg ggctgagctg 3240
 ggttgggaga ccatgaattt agctgaactg agtgcagctg ggataaaactg gggtgagcta 3300
 agaatagact acctgaattt tgccaaactc ggctgggatc aattgaaaat tatcaggatt 3360
 tagatgagcc ggactaaact atgctgagct ggactgggtg gatgtgttga actggcctgc 3420
 tgctgggctg gcatagctga gttgaactta aatgaggaag gctgagcaag gctagcctgc 3480
 ttgcataagag ctgaacctta gcctagcctg agctggac 3518

<210> 7

<211> 315

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(315)

<223> mouse IgM exon 1

<400> 7

agagtcagtc ctccccaaat gtctcccc tcgtctcctg cgagagcccc ctgtctgata 60
 agaatctgggt gcccatgggc tgcctggccc gggacttccct gcccagcacc atttccttca 120
 cctggaaacta ccagaacaac actgaagtca tccagggtat cagaaccttc ccaacactiga 180
 ggacaggggg caagtaccta gccacctcgc aggtgttgc gtctccaag agcatccttgc 240
 aagggtt caga tgaataacctg gtatgcaaaa tccactacgg aggcaaaaac aaagatctgc 300

atgtccccat tccag 315

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Gln Leu Glu Arg

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 9

Val Pro Leu Ala Arg

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 10

Val Ser Leu Ala Leu

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223>

Mammal

<400> 11

Val Ser Leu Ala Arg

1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Glu Leu Leu

1

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 13

Val Ser Trp Glu Pro Leu

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Gln Leu Leu Tyr

1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 15

Ser Tyr Gln Leu Pro Tyr

1 5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ile Leu Tyr

1

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Trp Cys Met Leu Tyr

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 18

Arg Thr Leu Tyr Ser Trp Cys Met Pro Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ile Leu Trp Trp

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 20

Ser Thr Leu Trp Trp Ser Leu Pro Phe

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Leu Arg Phe Leu Glu Trp Leu Leu Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 22

Val Ser Pro Phe Leu Glu Trp Ser Leu Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 24

Val Ser Pro Tyr Phe Asp Trp Ser Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Val Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Leu

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220

><223> Mammal

<400> 26

Val Ser Pro Trp Phe Gly Glu Ser Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Leu Arg Leu Gly Glu Leu Ser Leu Tyr

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 28

Ser Arg Leu Gly Glu Ser Ser Leu Tyr

1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Trp Leu Leu Leu

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 30

Val Ser Leu Ser

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 31

Trp Ser Leu Leu

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 32

Pro Gln Ser Leu

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 33

Pro Arg Ser Leu

1

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 34

Pro Arg Trp Ser Leu

1 5

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Trp Ile Gln Leu Trp Leu

1 5

<210> 36

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammal
 <400> 36

Trp Thr Gln Pro Trp Leu
 1 5

<210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

Trp Leu Arg Leu
 1

<210> 38
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Unknown
 <220><223> Mammal
 <400> 38

Trp Pro Pro Leu
 1

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 39

Arg Trp Leu Gln Leu
 1 5

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Mammal

<400> 40

Thr Trp Pro Pro Leu

1 5

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gln Gln Leu Val

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 42

Pro Gln Leu Val

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Trp Leu Val

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 44

Pro Trp Leu Val

1

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Tyr Asn Trp Asn Asp

1 5

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 46

Tyr His Trp His Asp

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Tyr Asn Trp Asn Tyr

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 48

Tyr His Trp His Tyr

1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 50

Tyr His Gly Ser His Tyr

1 5

<210>

51

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 52

Gly His Cys Ser His Thr Ser Cys His Thr

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 54

Gly His Cys Thr His Gly Val Cys His Thr

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 56

Gly His Cys Ser His Gly Ser Cys His Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 58

Ala His Cys Gly Gly His Cys His Ser

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 60

Tyr His His Phe Trp Ser Gly His Tyr Thr

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 62

Tyr His His Ile Leu Thr Gly His Tyr Asn

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 64

Tyr His His Gly Ser Gly Ser His Tyr Asn

1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Tyr Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 66

Tyr His Asp His Val Trp Gly Ser His Arg Tyr Thr

1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 68

Tyr His Tyr His Ser Ser Gly His Tyr Tyr
1 5 10

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asp Tyr Ser Asn Tyr

1 5

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 70

Pro Gln Ser Leu

1

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Asp Tyr Gly Asp Tyr

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 72

Asp His Gly His Tyr

1 5

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asp Tyr Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 74

Asp His Gly Gly His Ser

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr

1 5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 76

Gly His Ser His Gly Tyr

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 78

Gly His Ser Gly His His Tyr

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Asp Gly Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 80

Arg His Gly His His Tyr

1 5

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Glu Tyr Ser Ser Ser Ser

1 5

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 82

Glu His Ser His Ser Ser

1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 84

Gly His Ser His Ser Trp Tyr

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400

> 86

Gly His Ser His Gly Trp Tyr

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gly Tyr Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Thr Thr Gly Thr

1 5

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gly Ile Thr Gly Thr

1 5

<210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Gly Ile Val Gly Ala Thr

1 5

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 91

Gly Ile Met Gly Ala Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Asp Ile Val Val Val Pro Ala Ala Ile

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 93

Asp Ile Val Val Ile Pro Ala Ala Ile

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 94

Asp Ile Val Leu Met Val Tyr Ala Ile

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Asp Ile Val Val Val Ala Ala Thr

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 96

Asp Ile Val Val Met Val Ala Ala Thr

1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

His Ile Val Val Val Thr Ala Ile

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Ile Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Ile

1 5

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ile Thr Ile Phe

1

<210> 100

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Leu Val Ile Ile

1

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ile Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile

1

5

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Ile Met Ile Thr Phe Gly Gly Val Ile Val Ile

1

5

10

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ile Thr Met Ile Val Val Val Ile Thr

1

5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 104

Ile Thr Ile Val Val Val Ile Thr

1 5

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 105

Thr Thr Val Thr

1

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Thr Thr Val Val Thr

1 5

<210> 107

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Val Asp Thr Ala Met Val

1 5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Val Asp Ile Val Ala Thr Ile

1 5

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Val Glu Met Ala Thr Ile

1 5

<210> 110

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 110

Val Asp Met Ala Thr Ile

1 5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ser Ile Ala Ala Arg

1 5

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 112

Ser Ile Ala Thr Arg

1 5

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Gly Ile Ala Ala Ala Gly

1 5

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 114

Gly Ile Ala Thr Ala Gly

1 5

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Gly Ile Ala Val Ala Gly

1 5

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 116

Gly Ile Ala Met Ala Gly

1 5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Gly Ile Ala Ala Ala

1 5

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 118

Gly Ile Ala Thr Ala

1 5

<210> 119
<211> 19
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 119

cgggtcactg ccatttctg

19

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 120

tctgcattcg ctcccagcgc

20

<210> 121
<211> 19
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 121

tctgcggcat gaacccaat

19

<210> 122
<211> 19
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Mammal

<400>	122	
gtgcagggag gacccctcg		19
<210>	123	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Mammal	
<400>	123	
agt caccaag cacagagccc tgac		24
<210>	124	
<211>		
>	19	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Mammal	
<400>	124	
gccaggagtg tgcctagtg		19
<210>	125	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Mammal	
<400>	125	
gtggccact tcccttcct		19
<210>	126	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Mammal	
<400>	126	
cagctgaaac ccaccatgac ct		22
<210>	127	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 127

gacctgcctc ggatgaca

18

<210> 128

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 128

tggccagaac tgaccctac

19

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 129

accgacaaga gtccctcagg

20

<210> 130

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 130

ggagtccgct ctggatgtg

19

<210> 131

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 131

tgcggccgat cttagcc

17

<210> 132

<211> 21

<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 132	
acgagcgggt tcggccatt c	21
<210> 133	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 133	
ttgaccgatt ccttgcgg	18
<210> 134	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 134	
cagtcccggt gatccagcc	19
<210> 135	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 135	
cccatcaggg attttgtatc tctgtggacg	30
<210> 136	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 136	
ggatatgcag cactgtgccca c	21

<210> 137	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 137	
tcctccaacg acaggtccc	19
<210> 138	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 138	
tccctggaac tctgccccga caca	24
<210> 139	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 139	
gatgaactga cgggcacagg	20
<210> 140	
<211>	
> 20	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 140	
atcacactca tcccatcccc	20
<210> 141	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 141	

cccttccta agtaccacag agtgggctc	29
<210> 142	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 142	
 cacagggaaag caggaactgc	20
<210> 143	
<211> 18	
<212> DNA	
 <213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 143	
 ggagccaggc aggacaca	18
<210> 144	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 144	
 tgggctcgta gtttgacgt	19
<210> 145	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 145	
 gggactttct tacccacact tca	23
<210> 146	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Unknown	

<220><223> Mammal

<400> 146

ggtcccgagc actcttaatt aaac 24

<210> 147

<211> 16

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 147

cctcgaatgg aactac 16

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 148

gggagagcaa ccattcgttg t 21

<210> 149

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 149

ccgagcaccc atgcata 19

<210> 150

<211> 16

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 150

cgcagtcatg taatgc 16

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 151	
gggaggcgaa ctgactgtca	20
<210> 152	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 152	
ggtggagagg ctattcggc	19
<210> 153	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 153	
tgggcacaac agacaatcg ctg	23
<210> 154	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 154	
gaacacggcg gcat cag	17
<210> 155	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 155	
ggtacaactg gaacgac	17
<210> 156	
<211> 17	

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 156

ggtataactg gaactac

17

<210> 157

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 157

ggtataaccg gaaccac

17

<210> 158

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Tyr Asn Arg Asn His

1 5

<210> 159

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 159

ggtataactg gaacgac

17

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 160

ggtatagtg ggctactac

20

<210> 161

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 161

aggatattgt agtagtacca gctgctatgc c 31

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Tyr Gln Leu Leu Cys

1 5

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala

1 5 10

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Asp Ile Val Val Val Pro Ala Ala Met

1 5

<210> 165

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 165

aggatattgt agtagtacca gctgctatac c 31

<210> 166

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 166

tggatattgt agtagtacca gctgctatgc c 31

<210> 167

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Tyr Gln Leu Leu Cys

1 5

<210> 168

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala

1 5 10

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Asp Ile Val Val Val Pro Ala Ala Met

1 5

<210> 170

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 170

aggatattgt actaatggtg tatgctatac c 31

<210> 171

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 171

aagatattgt actggtggtg tatgctatac c	31	
<210> 172		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 172		
Arg Ile Leu Tyr Trp Trp Cys Met Leu Tyr		
1	5	10
<210> 173		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 173		
Gly Tyr Cys Thr Gly Gly Val Cys Tyr Thr		
1	5	10
<210> 174		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 174		
Asp Ile Val Leu Val Val Tyr Ala Ile		
1	5	
<210> 175		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 175		
aggatattgt agtggtgta gctgctactc c	31	
<210> 176		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 176		
agcatattgt ggtggtgatt gctattcc	28	

<210> 177
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177
His Ile Val Val Val Ile Ala Ile
1 5

<210> 178
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 178
agcatattgt ggtggtgact gctattcc 28
<210> 179
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 179
gtttagcat tttggagtg gttattatac c 31
<210> 180
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 180
gtttagcat tttggagtg gttattatac c 31
<210> 181
<211> 10
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223
> Mammal
<400> 181
Val Leu Ala Phe Leu Glu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

His Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr

1 5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Ile Ser Ile Phe Gly Val Val Ile Ile

1 5

<210> 184

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 184

gtttagat atttgactg gttattataa c 31

<210> 185

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 185

gtttagat gttcgggga gttattataa c 31

<210> 186

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 186

gtttagat gttcgggag ttattataac 30

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Val Leu Leu Cys Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn

1 5 10

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Tyr Tyr Tyr Val Arg Gly Val Ile Ile

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Ile Thr Met Phe Gly Arg Leu Leu

1 5

<210> 190

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 190

gtattatgt tacgttggg ggagttatgc ttatacc

37

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Leu Arg Leu Gly Glu Leu Cys Leu Tyr

1 5

<210> 192

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Tyr Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Ala Tyr Thr

1 5 10

<210> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Ile Met Ile Thr Phe Gly Gly Val Met Leu Ile

1 5 10

<210> 194

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 194

gttattactat gatagtagtg gttattacta c 31

<210> 195

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 195

tgactacagt aactac 16

<210> 196

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 196

tgactacggt gactac 16

<210> 197

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens	
<400> 197	
tgactacggt ggtaactcc	19
<210> 198	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 198	
gtggatacag ctatggttac	20
<210> 199	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 199	
gtggatatag tggctacgat tac	23
<210> 200	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 200	
gttagatagg ctacaattac	20
<210> 201	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 201	
gagtatagca gctcggtcc	18
<210> 202	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400>	
> 202	
gggtatagca gcagctggta c	21

<210> 203	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 203	
gggtatagca gtggctggta c	21
<210> 204	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 204	
gggtatagca gcggtac	18
<210> 205	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 205	
ctaactgggg a	11
<210> 206	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 206	
gtcggtccag ttgtacc	17
<210> 207	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> Unknown	
<220><223> Mammal	
<400> 207	
Val Val Pro Val Val	
1	5
<210> 208	

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 208

Ser Phe Gln Leu Tyr

1 5

<210> 209

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 209

Arg Ser Ser Cys Thr

1 5

<210> 210

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 210

gttagttccag ttataacc

17

<210> 211

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 211

Val Val Pro Val Ile

1 5

<210> 212

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 212

Phe Gln Leu Tyr

1

<210> 213

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 213

Ser Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 214

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 214

gtggttccgg ttatacc

17

<210> 215

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 215

Trp Phe Arg Leu Tyr

1 5

<210> 216

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 216

Gly Ser Gly Tyr Thr

1 5

<210>

> 217

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 217

gtcggtccag ttatacc

17

<210> 218

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 218

Arg Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 219

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 219

gttagtagctc ccactatacc

20

<210> 220

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 220

Val Val Ala Pro Thr Ile

1 5

<210> 221

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 221

Leu Pro Leu Tyr

1

<210> 222

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 222

Ser Ser Ser His Tyr Thr

1 5

<210> 223

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 223

ggcatagcag ctggtaactac tacaatatcc t

31

<210> 224

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 224

Gly Ile Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ile Ser

1 5 10

<210> 225

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 225

Gln Leu Val Leu Leu Gln Tyr Pro

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 226

His Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Asn Ile

1 5

<210> 227

<211

> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 227

ggtagatcgac ctggtaactac tacaatatcc t 31

<210> 228

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 228

ggcatagcag ctggtaactac tacaatatcc a 31

<210> 229

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 229

ggtagatcgat acaccattag tacaatatcc t 31

<210> 230

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 230

Gly Ile Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Ile Ser

1 5 10

<210> 231

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 231

His Thr Pro Leu Val Gln Tyr Pro

1 5

<210> 232

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 232

Tyr Ser Ile His His

1 5

<210> 233

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 233

ggtagatcat acaccaccag tacaatatct t

31

<210> 234

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 234

Gly Ile Ala Tyr Thr Thr Ser Thr Ile Ser

1 5 10

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 235

His Thr Pro Pro Val Gln Tyr Leu

1 5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 236

Tyr Ser Ile His His Gln Tyr Asn Ile

1 5

<210> 237

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 237

ggagtagcag ctaccaccac tacaatatcc t 31

<210> 238

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 238

Gly Val Ala Ala Thr Thr Thr Thr Ile Ser

1 5 10

<210> 239

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 239

Gln Leu Pro Pro Leu Gln Tyr Pro

1 5

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 240

Ser Ser Ser Tyr His His Tyr Asn Ile

1 5

<210> 241

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 241

ggaatagcaa tcaccaccac aatatgct 28

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 242

Gly Ile Ala Ile Thr Thr Thr Ile Cys

1 5

<210> 243

<211>

> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 243

Gln Ser Pro Pro Gln Tyr Ala

1 5

<210> 244

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 244

Asn Ser Asn His His His Asn Met

1 5

<210> 245

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 245

ggaatagcag tcaccaccac aatatgct 28

<210> 246

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

><223> Mammal

<400> 246

Gly Ile Ala Val Thr Thr Thr Ile Cys

1 5

<210> 247

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 247

Gln Ser Pro Pro Gln Tyr Ala

1 5

<210> 248

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 248

Asn Ser Ser His His His Asn Met

1 5

<210> 249

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 249

ggtataataa ccactccaaa aatcgtaata c 31

<210> 250

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 250

Gly Ile Ile Thr Thr Pro Lys Ile Val Ile

1 5 10

<210> 251

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 251

Pro Leu Gln Lys Ser

1 5
<210> 252
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 252

Tyr Asn Asn His Ser Lys Asn Arg Asn

1 5

<210> 253
<211> 31
<212> DNA
<213>
> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 253

ggtataataa ccactccaaa aatgctaata c 31

<210> 254
<211> 10
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 254

Gly Ile Ile Thr Thr Pro Lys Met Leu Ile

1 5 10

<210> 255
<211> 5
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Mammal
<400> 255

Pro Leu Gln Lys Cys

1 5

<210> 256
<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 256

Tyr Asn Asn His Ser Lys Asn Ala Asn

1 5

<210> 257

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 257

gttataataa ccagtcaaaa tatcgtataa c 31

<210> 258

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 258

Val Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile Val Ile

1 5 10

<210> 259

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 259

Pro Val Lys Ile Ser

1 5

<210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 260

Tyr Asn Asn Gln Ser Lys Tyr Arg Asn

1 5

<210> 261

<211> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 261

gttataataa ctcccccgaac catagtaata c 31

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 262

Val Ile Ile Thr Pro Arg Thr Ile Val Ile

1 5 10

<210> 263

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 263

Leu Pro Glu Pro

1

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 264

Tyr Asn Asn Ser Pro Asn His Ser Asn

1 5

<210> 265

<211> 30

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 265

gttataataa ctccccgaac atagtaatac 30

<210> 266

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

><223> Mammal

<400> 266

Val Ile Ile Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 267

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 267

Leu Pro Glu His Ser Asn

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 268

Tyr Asn Asn Ser Pro Asn Ile Val Ile

1 5

<210> 269

<211> 37

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 269

ggtataagca taactccccc aaacgttaatc ataatac

37

<210> 270

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 270

Gly Ile Ser Ile Thr Pro Pro Asn Val Ile Ile Ile

1	5	10
---	---	----

<210> 271

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 271

Leu Pro Gln Thr

1

<210> 272

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 272

Tyr Lys His Asn Ser Pro Lys Arg Asn His Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 273

<211

> 31

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 273

gtagtaataa ccactactat catagtaata c 31

<210> 274

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 274

Val Val Ile Thr Thr Ile Ile Val Ile

1 5 10

<210> 275

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 275

Pro Leu Leu Ser

1

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 276

Ser Asn Asn His Tyr Tyr His Ser Asn

1 5

<210> 277

<211> 16

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 277

gtagttactg tagtca 16

<210> 278

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 278

Val Val Thr Val Val

1 5

<210> 279

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 279

Ser Tyr Cys Ser

1

<210> 280

<211> 16

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 280

gtagt caccg tagtca

16

<210> 281

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 281

Ser His Arg Ser

1

<210> 282

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 282

ggaggtaacca ccgttagtca

19

<210> 283

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

><223> Mammal

<400> 283

Gly Val Thr Thr Val Val

1 5

<210> 284

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 284

Glu Leu Pro Pro

1

<210> 285

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 285

Ser Tyr His Arg Ser

1 5

<210> 286

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 286

gtaaccatag ctgtatccac

20

<210> 287

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 287

Val Thr Ile Ala Val Ser

1 5

<210> 288

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 288

Asn His Ser Cys Ile His

1 5

<210> 289

<211> 23

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 289

gtaatcgtag ccactatac cac

23

<210> 290

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400>

> 290

Val Ile Val Ala Thr Ile Ser

1 5

<210> 291

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 291

Pro Leu Tyr Pro

1

<210> 292

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 292

Asn Arg Ser His Tyr Ile His

1 5

<210> 293

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 293

gttaattttag ccatctctac 20

<210

> 294

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 294

Val Ile Val Ala Ile Ser

1 5

<210> 295

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 295

Asn Cys Ser His Leu Tyr

1 5

<210> 296

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 296

ggacgagctg ctataactc 18

<210> 297

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 297

Gly Arg Ala Ala Ile Leu

1 5

<210> 298

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 298

Asp Glu Leu Leu Tyr

1 5

<210> 299

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 299

Thr Ser Cys Tyr Thr

1 5

<210> 300

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 300

gtaccagctg ctgctatacc c

21

<210> 301

<211>

> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 301

Val Pro Ala Ala Ala Ile Pro

1 5

<210> 302

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 302

Tyr Gln Leu Leu Leu Tyr

1 5

<210> 303

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 303

Thr Ser Cys Cys Tyr Thr

1 5

<210> 304

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 304

gtaccagcca ctgctatacc c

21

<210> 305

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal'

<400> 305

Val Pro Ala Thr Ala Ile Pro

1 5

<210> 306

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 306

Tyr Gln Pro Leu Leu Tyr

1 5

<210> 307

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 307

Thr Ser His Cys Tyr Thr

1 5

<210> 308

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400>

308

gttagccgctg ctataccc 18

<210> 309

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 309

Val Ala Ala Ala Ile Pro

1 5

<210> 310

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 310

Pro Leu Leu Tyr

1

<210> 311

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 311

Ser Arg Cys Tyr Thr

1 5

<210> 312

<211> 366

<212>

> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 312

caggtgcagc tacagcagtg gggcgccagga ctgttgaagc cttcgatatac cctgtccctc 60

acctgcgtg tctatggtg ggcccttcagg gtgtactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccagggagg ggctggagt gattgggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac	180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttccctg	240
aagctgagct ctgtgaccgc cgccgacacg gctgtgtatt actgtgcggg gcatagccat	300
ggctggtaact actactacta cggtatggac gtcggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360
tcctca	366

<210> 313

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 313

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Asp

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly His Ser His Gly Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 314

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 314

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1	5	10	15												
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
20	25	30													
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
35	40	45													
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys

50	55	60													
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65	70	75	80												
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
85	90	95													

<210> 315

<211> 355

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 315

caggtgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtaagc	cttacagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtggtggtt	actactggag	ctggatccgc	120

cagcacccag	ggaaggccct	ggagtggatt	gggtacatct	attacagtgg	gagcacctac	180
tacaaccgt	ccctaagag	tcgagttacc	atatcgtag	acacgtctaa	gaaccaggtc	240
tccctgaagc	tgagctctgt	gactgccg	gacacggccg	tgtattactg	tgcgaggggg	300
gaccacggtc	actacgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctcag	355

<210> 316

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 316

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1	5	10	15												
---	---	----	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20	25	30													
Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp His Gly His Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 317

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 317

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala

<210> 318

<211> 370

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 318

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggigaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc	120
cagccccag ggaaggggct ggagtgatt gggagtatct attatagtgg gagcacctac	180
tacaaccgt ccctaagag tcgagtacc atatccgtac acacgtccaa gaaccagtcc	240

tccctgaagc tgagctctgt gaccggcga gacacggctg tgtattactg tgcgagacat	300
gaagggcata gccacctaa ctggttcgac ccctggggcc agggggAAC cctggtcacc	360
gtctcctcag	370

<210> 319

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 319

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser			
20	25	30	

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser			
50	55	60	

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	

Cys Ala Arg His Glu Gly His Ser His Leu Asn Trp Phe Asp Pro Trp			
100	105	110	

Gly Gln Gly Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115	120	
-----	-----	--

<210> 320

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 320

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 321

<211> 22

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 321

tcttatcaga cagggggctc tc 22

<210> 322

<211> 22

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<400> 322

ggaagacatt tggaaaggac tg 22

<210> 323

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> wherin the "Xaa" represents any amino acid

<400> 323

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 324

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> wherein the "Xaa" represents any amino acid

<400> 324

Trp Gly Xaa Gly

1

<210> 325

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 325

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

85 90 95

<210> 326

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 326

cag cag agc tac agc acc ccc 21

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 327

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 327

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 328

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 328

cac cat agc cac agc acc cac

21

His His Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 329

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 329

His His Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 330

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 330

cac cag agc tac agc acc ccc

21

His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 331

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 331

His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 332

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 332

cag cat agc tac agc acc ccc

21

Gln His Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 333

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 333

Gln His Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 334

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 334

cag cag agc cac agc acc ccc

21

Gln Gln Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 335

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 335

Gln Gln Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 336

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 336

cag cag agc tac agc acc cac

21

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 337

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 337

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 338

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 338

cac cat agc tac agc acc ccc

21

His His Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 339

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 339

His His Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 340

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 340

cac cag agc cac agc acc ccc

21

His Gln Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 341

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 341

His Gln Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 342

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 342

cac cag agc tac agc acc cac

21

His Gln Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 343

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 343

His Gln Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 344

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 344

cag cat agc cac agc acc ccc

21

Gln His Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 345

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 345

Gln His Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 346

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 346

cag cat agc tac agc acc cac

21

Gln His Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 347

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 347

Gln His Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 348

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 348

cag cag agc cac agc acc cac

21

Gln Gln Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 349

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 349

Gln Gln Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 350

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 350

cac cat agc cac agc acc ccc

21

His His Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 351

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 351

His His Ser His Ser Thr Pro

1 5

<210> 352

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 352

cac cat agc tac agc acc cac

21

His His Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 353

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 353

His His Ser Tyr Ser Thr His

1 5

<210> 354

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 354

cac cag agc cac agc acc cac

21

His Gln Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 355

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 355

His Gln Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 356

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 356

cag cat agc cac agc acc cac

21

Gln His Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 357

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 357

Gln His Ser His Ser Thr His

1 5

<210> 358

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 358

cttactactg tcaacatagt cacagttaccc atccgatcac cttcg

45

<210> 359

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 359

caacttacta ctgtcaccat agtacagta cccatccgat cacttcg

50

<210> 360

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 360

cgaagggtat cgatgggta ctgtgactat gttgacagta gtaag

45

<210> 361

<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic	
<400>	361	
gccgaaggta atcgatgg tactgtgact atggtgacag tagtaagtt		50
<210>	362	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic	
<400>	362	
tgggcacaac agacaatcg ctg		23
<210>	363	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic	
<400>	363	
ggtgagagg ctattcgcc		19
<210>	364	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic	
<400>	364	
gaacacggcg gcatcag		17
<210>	365	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic	
<400>	365	
ccattatgat gctccatgcc tctctgttc		29

<210> 366
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic
<400> 366

aggtgagggt acagataagt gttatgag 28

<210> 367
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic
<400> 367

tgacaaatgc cctaattata gtgatca 27

<210> 368
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic
<400> 368

atcagcagaa accaggaaaa gcccct 26

<210> 369
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic
<400> 369

ggccaagtca gagcattagc a 21

<210> 370
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic

<400> 370	
tgcaaactgg atgcagcata g	21
<210> 371	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 371	
ggccacatcc catgggttc	19
<210> 372	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 372	
 gcaaacaaaa accactggcc	20
<210> 373	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 373	
ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa	37
<210> 374	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 374	
ggcactgga tacgatgtat gg	22
<210> 375	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic

<400> 375

cacagcttgt gcagcctcc 19

<210> 376

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 376

agaagaagcc tgtactacag catccgttt acagtca 37

<210> 377

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 377

accatagtca cagtaccca 19

<210> 378

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 378

agcagtctgc aacctgaaga ttt 23

<210> 379

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 379

ccctggccg aaggtgat 18

<210> 380

<211> 19

<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic
<400> 380

atagt cacag taccatcc 19

<210> 381

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 381

agtctgcaac ctgaagattt tgc 23

<210> 382

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 382

cccttggccg aaggtgat 18

<210> 383

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 383

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 384

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 384

gattttcag tgtattactg tcagcagtat ggttagctcac ctggacgtt cggc 54

<210> 385

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 385

gattttcag tgtattactg tcatcaccat ggtcaactcac ctggacgtt cggc 54

<

210> 386

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 386

gccgaacgtc caaggtgagt gaccatggtg atgacagtaa tacactgcaa aatc 54

<210> 387

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 387

gcagtgatt actgtcatca ctatggcac tcaccttggc cgttcg	47
<210> 388	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 388	
ccgaacgtcc aaggtagtg accatagtga tgacagtaat acactgc	47
<210> 389	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 389	
aaagagccac ccttcctgc aggg	24
<210> 390	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 390	
tccaggcacc ctgtctttg	19
<210> 391	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 391	
aagtagctgc tgctaacaact ctgact	26
<210> 392	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic	
<400> 392	
ctgtcatcac catgg	15
<210> 393	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 393	
gcagactgga gcctgaagat ttt	23
<210> 394	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 394	
ccgaacgtcc aaggtagtg	20
<210> 395	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 395	
tactgtcatc actatgg	17
<210> 396	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 396	
gcagactgga gcctgaagat tt	22
<210> 397	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 397

ccgaacgtcc aaggtgagtg

20

<210> 398

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 398

cag cag tat ggt agc tca cct

21

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

1 5

<210> 399

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 399

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

1 5

<210> 400

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 400

cat cac cat ggt cac tca cct

21

His His His Gly His Ser Pro

1 5

<210> 401

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 401

His His His Gly His Ser Pro

1 5

<210> 402

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 402

cat cac tat ggt cac tca cct

21

His His Tyr Gly His Ser Pro

1 5

<210> 403

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 403

His His Tyr Gly His Ser Pro

1 5

<210> 404

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 404

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 405

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 405

caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat cacttcggc 50