(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0116490
(43) 공개일자 2022년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7024093
(22) 출원일자(국제) 2020년12월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/065450
(87) 국제공개번호 WO 2021/127068
국제공개일자 2021년06월24일
(30) 우선권주장
62/949,707 2019년12월18일 미국(US)

(71) 출원인
브리스톨-마이어스 스퀴브 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
반스, 랠스턴 엠.
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 베이 로드 700 브리스톨-마이어스 스퀴브 컴퍼니 내
라즈팔, 아르빈드
미국 94127 캘리포니아주 샌프란시스코 그랜빌 웨이 150
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

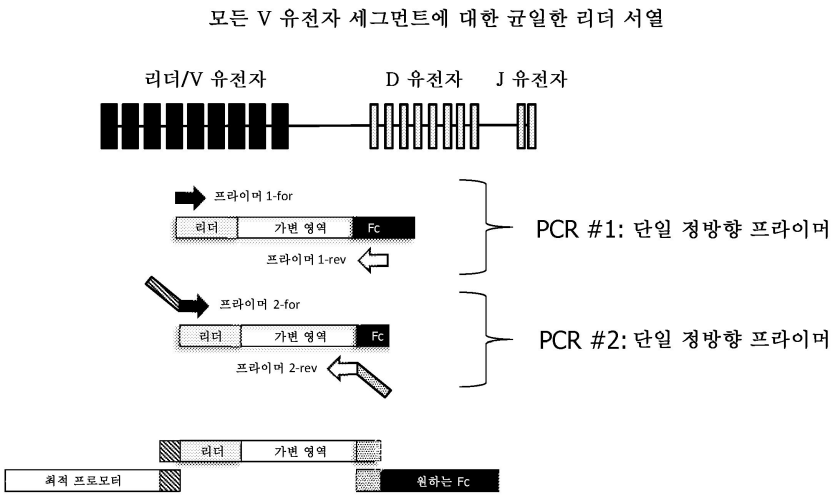
전체 청구항 수 : 총 83 항

(54) 발명의 명칭 **공통 리더 서열을 갖는 BCR 트랜스제닉 마우스**

(57) 요 약

본 발명은 인간 중쇄 및/또는 경쇄 이뮤노글로불린 가변 영역 로커스의 일부 또는 구성요소를 포함하는 트랜스제닉 동물, 상기 동물을 제조하는 방법, 상기 동물을 사용하여 인간 항체를 생산하는 방법, 및 상기 동물에서 제조된 인간 항체를 사용하는 치료 방법으로서, 여기서 동물은 그의 게놈에, 모두가 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 바로 앞에 선행하는 복수의 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트, 및/또는 모두가 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 바로 앞에 선행하는 복수의 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트, 또는 그들 둘 다를 포함하는 것인 상기 동물, 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 2개 이상의 인간 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구축물을 제공한다. 상기 동물, 구축물 및 방법은 관심 항원, 예컨대 치료상 관심 항원에 대한 최적으로 다양한 항체 집단의 효율적인 생성에 사용된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
(72) 발명자
루, 아일란
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 베이 로드 700 브리스톨-마이어스 스퀴 컴퍼니 내
우, 가브리엘
미국 94560 캘리포니아주 뉴어크 리워드 웨이 8559
마제르카크, 존 엠.
미국 19087 펜실베이니아주 웨인 랜스돈 애비뉴 230
프리트버거, 아나스타샤
미국 94043 캘리포니아주 마운틴 뷰 시에라 비스타 애비뉴 465

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 이뮤노글로불린 가변 영역 로커스를 갖는 비-인간 트랜스제닉 동물을 제조하는 방법으로서, 비-인간 동물의 게놈 내로 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하며, 여기서 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 이외에는 어떠한 추가 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트도 비-인간 동물의 게놈에 도입되지 않거나 또는 그에 존재하지 않는 것인 방법.

청구항 3

인간 이뮤노글로불린 가변 영역 로커스를 갖는 비-인간 트랜스제닉 동물을 제조하는 방법으로서, 비-인간 동물의 게놈 내로 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하며, 여기서 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 이외에는 어떠한 추가 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트도 비-인간 동물의 게놈에 도입되지 않거나 또는 그에 존재하지 않는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 비-인간 동물의 게놈 내로 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 비-인간 동물의 게놈 내로 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 제2 리더 펩티드-코딩 서열과 동일한 것이 아닌 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 71, 85, 86 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택되는

것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1, 15, 16, 27 및 136으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 86인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 16 또는 136인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 136인 방법.

청구항 15

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 104 및 112로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 39, 49 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 112인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 49 또는 137인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 137인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물이 마우스, 래트 또는 소인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 비-인간 동물이 마우스인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물 내로 2개 이상의 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 비-인간 동물 내로 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트 IGHV 3-23; IGHV 5-51; IGHV3-7; IGHV 1-2; IGHV 1-69-1; IGHV 3-48; IGHV 1-18; IGHV 1-46; IGHV 3-21; IGHV 3-30; IGHV 3-74; IGHV 4-39; IGHV 3-9; IGHV 2-5; IGHV 1-3; IGHV 4-4; IGHV 7-4-1; IGHV 3-66; 및 IGHV 1-24를 도입하며, 다른 중쇄 V 유전자 세그먼트는 도입하지 않는 것을 포함하는 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 비-인간 동물 내로 모든 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물 내로 하나 이상의 인간 중쇄 D 유전자 세그먼트 및 하나 이상의 인간 J 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 비-인간 동물 내로 모든 자연 발생 인간 중쇄 D 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 비-인간 동물 내로 모든 자연 발생 인간 중쇄 J 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물 내로 2개 이상의 자연 발생 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 비-인간 동물 내로 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트 IGKV 1-39; IGKV 3-11; IGKV 1-33; IGKV 3-20; IGKV 4-1; IGKV 1-27; IGKV 1-5; IGKV 1-16; IGKV 1-12; IGKV 2-30; IGKV 3-15; IGKV 2-28; IGKV 1D-13; IGKV 1-17; IGKV 6-21; IGKV 1-9; 및 IGKV 1D-43을 도입하며, 다른 경쇄 V 유전자 세그먼트는 도입하지 않는 것을 포함하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 비-인간 동물 내로 모든 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 33

제3항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물 내로 하나 이상의 인간 경쇄 J 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 비-인간 동물 내로 모든 자연 발생 인간 경쇄 J 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물 내로 하나 이상의 인간 불변 도메인 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 비-인간 동물 내로 하나 이상의 인간 IgG 불변 도메인 유전자 세그먼트를 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 37

트랜스제닉 비-인간 동물로서, 그의 게놈에 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하며, 여기서 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 38

제37항에 있어서, 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 이외에는 어떠한 추가 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트도 비-인간 트랜스제닉 동물의 게놈에 존재하지 않는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 39

트랜스제닉 비-인간 동물로서, 그의 게놈에 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하며, 여기서 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 40

제39항에 있어서, 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 이외에는 어떠한 추가 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트도 비-인간 트랜스제닉 동물의 게놈에 존재하지 않는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 그의 게놈에 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 추가로 포함하며, 여기서 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트 각각이 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 42

제41항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 제2 리더 펩티드-코딩 서열과 동일한 것이 아닌 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 44

제43항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 45

제43항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 71, 85, 86 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 46

제44항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1, 15, 16, 27 및 136으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 47

제43항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 86인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 48

제44항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 16 또는 136인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 49

제48항에 있어서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 136인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 50

제37항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 51

제50항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 52

제50항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 104 및 112로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 53

제51항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 39, 49 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 54

제52항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 112인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 55

제53항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 49 또는 137인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 56

제53항에 있어서, 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 137인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 57

제37항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스제닉 비-인간 동물이 마우스, 래트 또는 소인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 58

제57항에 있어서, 트랜스제닉 비-인간 동물이 마우스인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 59

제37항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 게놈에 2개 이상의 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하는 것인 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 60

제59항에 있어서, 비-인간 동물에서의 그의 게놈에 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트 IGHV 3-23; IGHV 5-51; IGHV3-7; IGHV 1-2; IGHV 1-69-1; IGHV 3-48; IGHV 1-18; IGHV 1-46; IGHV 3-21; IGHV 3-30; IGHV 3-74; IGHV 4-39; IGHV 3-9; IGHV 2-5; IGHV 1-3; IGHV 4-4; IGHV 7-4-1; IGHV 3-66; 및 IGHV 1-24를 포함하며, 다른 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트는 포함하지 않는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 61

제59항에 있어서, 그의 게놈에 모든 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 62

제37항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 게놈에 하나 이상의 인간 중쇄 D 유전자 세그먼트 및 하나 이상의 인간 J 유전자 세그먼트를 추가로 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 63

제62항에 있어서, 그의 게놈에 모든 자연 발생 인간 중쇄 D 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 그의 게놈에 모든 자연 발생 인간 중쇄 J 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 65

제39항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 게놈에 2개 이상의 자연 발생 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 66

제65항에 있어서, 그의 게놈에 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트 IGKV 1-39; IGKV 3-11; IGKV 1-33; IGKV 3-20; IGKV 4-1; IGKV 1-27; IGKV 1-5; IGKV 1-16; IGKV 1-12; IGKV 2-30; IGKV 3-15; IGKV 2-28; IGKV 1D-13; IGKV 1-17; IGKV 6-21; IGKV 1-9; 및 IGKV 1D-43을 포함하며, 다른 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트는 포함하지 않는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 67

제65항에 있어서, 비-인간 동물에서의 그의 게놈에 모든 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 68

제39항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 게놈에 하나 이상의 인간 경쇄 J 유전자 세그먼트를 추가로 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 69

제68항에 있어서, 그의 게놈에 모든 자연 발생 인간 경쇄 J 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 70

제37항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 게놈에 하나 이상의 인간 중쇄 불변 도메인 유전자 세그먼트를 추가로 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 71

제70항에 있어서, 그의 게놈에 하나 이상의 인간 IgG 중쇄 불변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물.

청구항 72

하기 단계를 포함하는, 인간 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 제조하는 방법:

a. 제39항 내지 제71항 중 어느 한 항의 트랜스제닉 비-인간 동물에게 관심 항원을 투여하는 단계;

b. 단계 (a) 후에 트랜스제닉 비-인간 동물에 의해 생산된, 항원에 대해 특이적인 항체의 중쇄 및 경쇄의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 수득하는 단계;

c. 단계 (b)에서 수득된 핵산 서열 중 하나 또는 그들 둘 다를 포함하는 유전적 구축물로부터 항원에 대해 특이적인 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 발현하는 단계; 및

d. 단계 (c)에서 발현된 항체 또는 항원 결합 단편을 단리하거나 또는 정제하는 단계.

청구항 73

제72항에 있어서, 비-인간 트랜스제닉 동물이 마우스인 방법.

청구항 74

질환을 앓는 대상체에게 제72항 또는 제73항의 방법에 의해 생산된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 포함하는, 질환을 앓는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 질환이 자가면역 질환, 감염성 질환, 심혈관 질환, 또는 암인 방법.

청구항 77

동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 2개 이상의 인간 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 78

제77항에 있어서, 2개 이상의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트가 2개 이상의 상이한 자연 발생 인간 V 유전자 세그먼트를 포함하며, 추가로 여기서 각각의 리더/V 유전자 세그먼트가 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하고, 추가로 여기서 상기 제1 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 79

제78항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 71, 85, 86 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 80

제79항에 있어서, 제1 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 86인 폴리뉴클레오티드.

청구항 81

제80항에 있어서, 2개 이상의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트가 2개 이상의 상이한 자연 발생 인간 V 유전자 세그먼트를 포함하며, 추가로 여기서 각각의 리더/V 유전자 세그먼트가 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하고, 추가로 여기서 상기 제2 리더 펩티드-코딩 서열이 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 82

제81항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 104 및 112로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 83

제82항에 있어서, 제2 리더 펩티드 서열이 서열식별번호: 112인 폴리뉴클레오티드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 12월 18일에 출원된 미국 가출원 번호 62/949,707에 대한 우선권을 주장하며, 그의 개시내용은 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 함께 전자 출원된 서열 목록 또한 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다 (파일명: 20201120_SEQL_13330WOPCT_GB.txt; 작성일: 2020년 11월 20일; 파일 크기: 29 KB).

배 경 기 술

[0005] 항체는 자가면역 질환 및 암과 같은 인간 질환을 치료하는 의약으로서 점점 더 많이 사용되고 있다. 가장 초기의 이러한 치료 항체는 인간 항-약물 항체 반응 (예를 들어, 인간 항-마우스 항체 - HAMA 반응)을 유발한 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체였는 바, 이에 반복적으로 투여될 수 없었다. 후속 세대의 치료 항체는, 인간 불변 영역이 비-인간 불변 영역 대신으로 치환된 것인 "키메라" 형태의 비-인간, 전형적으로, 마우스 항체, 및 인간 대상체에서 면역원성을 최소화하기 위해 상보성 결정 영역 (CDR) 이외의 모든 서열이 인간 대응물로 전환된 것인 "인간화" 항체였다.

[0006] 가장 최근 세대의 치료 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열, 예를 들어, 생체내에서 이뮤노글로불린 로커스에서 인간화된 트랜스제닉 마우스로부터, 또는 시험관내에서 파지 디스플레이 라이브러리로부터 완전히 유래된 서열을 포함한다 (문헌 [Finlay & Almagro (2012) *Front. Immunol.* 3(342):1]). 인간 이뮤노글로불린 유전자 세그먼트를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 치료상 관심 표적에 대한 항체를 유도하도록 디자인된 항원으로 면역화시킨다. 최대 다수의 상이한 생식계열 서열로부터 유래된 항체를 비롯한, 폴리클로날 항-항원 항체의 생성된 풀에서 항체 서열의 다양한 선택은 우월한 특성, 예를 들어, 높은 표적 친화성 및 에피토프 다양성을 갖는 항체를 찾을 가능성을 최대화한다. 항체 서열 다양성은 중쇄 및 경쇄로의 도입을 위해 마우스 생식계열에서 이용가능한, 중쇄의 경우, V, D 및 J 유전자 세그먼트, 경쇄의 경우, V 및 J 유전자 세그먼트와 같은 상이한 서열 요소의 수 뿐만 아니라, 재배열 동안 CDR3에서의 뉴클레오티드의 부가/결실, 및 B 세포 발생 동안 항체의 친화성 성숙 동안 발생하는 체세포 과돌연변이에 의존한다. 그러나, 상이한 V, D 및 J 유전자 세그먼트는 상이한 빈도로 항체에 도입되어 항체 서열의 선호되는 생식계열 서열로의 왜곡을 초래하며, 서열 다양성을 제한한다 (문헌 [Finlay & Almagro (2012) *Front. Immunol.* 3:242]). 상이한 V 유전자 세그먼트와 회합된 상이한 리더 펩티드 또한 상기 서열로부터 유래된 특정한 항체의 번역 및 분비에 영향을 미칠 수 있으며, 추가로 항체 서열의 분포를 왜곡하고, 다양성을 제한할 수 있다.

[0007] 마우스에 의해 생성된 항체는 이어서 치료 후보와 같은 바람직한 항체의 선택을 위해 회수되어야 한다. 마우스에 의해 생성된 항체의 다양성과 상관없이, 예를 들어, 치료 후보로 선택하기 위해 효율적으로 회수되는 항체만이 이용가능할 것이다. 다른 항체는 잃어가면서 일부 항체로 편향된 임의의 단리 단계는 폴리클로날 항체 풀의 다양성을 추가로 낮출 것이다.

[0008] 가장 바람직한 것이 선택될 수 있는 항체의 다양성을 증진시키는 폴리클로날 항체의 풀을 수득하기 위한 개선된 방법, 및 상기 방법에 사용하기 위한 개선된 마우스가 요구되고 있다. 이상적으로, 상기 방법은 시험되기도 전에 우수한 후보를 잃지 않도록 하기 위해 초기 폴리클로날 항체 풀로부터의 항체의 생성, 단리 및 평가에서 편향을 피할 것이다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 인간 항체를 생산하는데 사용하기 위한 인간화 중쇄 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 비-인간 동물로서, 여기서 인간화 중쇄 이뮤노글로불린 로커스는, 모두가 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 것인 비-인간 동물을 제공한다. 본 발명은 또한 인간 항체를 생산하는데 사용하기 위한 인간화 경쇄 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 비-인간 동물로서, 여기서 인간화 이뮤노글로불린 경쇄 로커스는, 모두가 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자

세그먼트를 포함하는 것인 비-인간 동물을 제공한다. 본 발명은 추가로 인간화 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 비-인간 동물로서, 여기서 중쇄 로커스는, 모두가 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하고, 경쇄 로커스는, 모두가 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 것인 비-인간 동물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 리더 펩티드-코딩 서열은 제2 리더 펩티드-코딩 서열과 상이하고, 다른 실시양태에서, 이들은 동일한 서열이다. 다양한 실시양태에서, 동물은 마우스, 래트, 또는 소이다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단락의 트랜스제닉 비-인간 동물을 제조하는 방법으로서, 비-인간 동물의 게놈 내로, 모두가 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트, 및/또는 모두가 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 통합시키는 것을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 리더 펩티드-코딩 서열은 임의적으로 동일한 서열인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 이외의 다른 추가 인간 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 비-인간 동물의 게놈에 도입되지 않거나 또는 그에 존재하지 않는다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 비-인간 동물은, 모두가 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트, 및 모두가 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트 둘 다를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 리더 펩티드-코딩 서열은 임의적으로 동일한 서열이다. 다양한 실시양태에서, 동물은 마우스, 래트, 또는 소이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 관심 항원에 대한 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제조하는 방법으로서, 여기서 모든 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 제1 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하고, 모든 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 제2 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 인간화 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로불린 로커스를 갖는 마우스를 항원, 또는 그의 항원성 단편 또는 유도체로 면역화시키는 단계, 및 상기 마우스로부터 항원에 특이적으로 결합하는 인간 항체, 또는 항원에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열을 회수하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 회수는 하이브리도마 방법, 단일 B-세포 클로닝, 또는 항체를 발현하는 비-인간 동물의 세포로부터 항체 또는 그의 코딩 핵산 서열을 수득하는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트에 대한 리더 펩티드-코딩 서열은 표 2, 3 및 4에 열거된 서열로부터 선택된다.

[0012] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단락의 프로세스에 의해 제조된 인간 항체를 제공한다.

[0013] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단락의 방법에 의해 제조된 인간 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체, 예를 들어, 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시양태에서, 본 발명은 자가면역 질환, 감염성 질환, 심혈관 질환, 또는 암을 앓는 대상체의 치료를 제공한다.

[0014] 본 발명의 동물 및 방법의 다양한 실시양태에서, 중쇄 V 유전자 세그먼트에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 V 유전자 세그먼트에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 71 - 133 및 135로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 V 유전자 세그먼트 둘 다에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 각각 상기 두 문장에서 명시된 서열로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 중쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 71, 85, 86 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하고/거나 경쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 104 및 112로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열, 예컨대 서열식별번호: 86 (IGHV 3-23)의 중쇄 리더 펩티드 서열 및 서열식별번호: 112 (IGKV 3-20)의 경쇄 리더 펩티드 서열을 코딩한다.

[0015] 본 발명의 동물 및 방법의 다양한 실시양태에서, 중쇄 V 유전자 세그먼트에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 V 유전자 세그먼트에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 V 유전자 세그먼트 둘 다에 선행하는 리더 펩티드-코딩 서열은 각각 상기 두 문장에서 명시된 서열로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 중쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 1, 15, 16, 27 및 136으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나 경쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 39, 49, 및 137로 이루어진 군으로부터 선택되고, 예컨대 중쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 16 또는 136 (IGHV 3-23 또는 IGHV 3-23 게놈)의 것이고 경쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 49 또는 137 (IGKV 3-20 또는 IGKV 3-20 게놈)의 것이다. 바람직한 실시양태에서, IGHV 3-23 (서열식별번호: 136) 및 IGKV 3-20 (서열식별번호: 137)의 게놈 리더 펩티드-코딩 서열은 각각 중쇄 및 경

쇄 V 유전자 세그먼트에 사용된다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 공통 (동일한) 리더 펩티드-코딩 서열이 선행하는 복수의 (2개 이상의) 중쇄 또는 경쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 바로 상류에 서열식별번호: 71 - 133 및 135, 예컨대 서열식별번호: 71, 85, 86 또는 93으로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 단일 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 자연 발생 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 바로 상류에 서열식별번호: 71 - 133 및 135, 예컨대 서열식별번호: 104 또는 112로 이루어진 군으로부터 선택된 리더 펩티드 서열을 코딩하는 단일 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 자연 발생 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 합성이거나, 또는 더 긴 폴리뉴클레오티드 구축물, 예컨대 벡터 내로 통합되거나, 또는 염색체 내로 통합될 수 있다.

[0017] 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 포함시키기 위한 예시적인 중쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 1, 15, 16, 27 및 136, 예컨대 서열식별번호: 16 및 136, 및 더욱 구체적으로, 서열식별번호: 136을 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 포함시키기 위한 예시적인 경쇄 리더 펩티드-코딩 서열은 서열식별번호: 39, 49, 및 137, 상기 서열식별번호: 49 및 137, 및 더욱 구체적으로 서열식별번호: 137을 포함한다.

[0018] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물 또는 폴리뉴클레오티드는 모든 자연 발생 인간 V 유전자 세그먼트, 또는 그의 서브세트, 예컨대 인간 중쇄 V 유전자 세그먼트 IGHV 3-23; IGHV 5-51; IGHV3-7; IGHV 1-2; IGHV 1-69-1; IGHV 3-48; IGHV 1-18; IGHV 1-46; IGHV 3-21; IGHV 3-30; IGHV 3-74; IGHV 4-39; IGHV 3-9; IGHV 2-5; IGHV 1-3; IGHV 4-4; IGHV 7-4-1; IGHV 3-66; 및 IGHV 1-24 및/또는 인간 경쇄 V 유전자 세그먼트 IGKV 1-39; IGKV 3-11; IGKV 1-33; IGKV 3-20; IGKV 4-1; IGKV 1-27; IGKV 1-5; IGKV 1-16; IGKV 1-12; IGKV 2-30; IGKV 3-15; IGKV 2-28; IGKV 1D-13; IGKV 1-17; IGKV 6-21; IGKV 1-9; 및 IGKV 1D-43으로 이루어진 군으로부터 선택된 복수의 중쇄 및/또는 경쇄 V 유전자 세그먼트를 포함하거나, 또는 본 발명의 방법은 상기 복수의 중쇄 및/또는 경쇄 V 유전자 세그먼트의 사용을 수반한다. 다른 실시양태에서, 복수의 중쇄 및/또는 경쇄 인간 V 유전자 세그먼트는 하나 이상의 비-자연 발생 V 유전자 세그먼트, 예컨대 조작된 또는 돌연변이체 V 유전자 세그먼트를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 중쇄의 경우, 하나 이상의 인간 J 유전자 세그먼트, 및 하나 이상의 인간 D 유전자 세그먼트, 예컨대 모든 자연 발생 D 및/또는 J 유전자 세그먼트, 또는 그의 원하는 서브세트가 트랜스제닉 동물 또는 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 다른 실시양태에서, 비-자연 발생 D 및/또는 J 유전자 세그먼트, 예컨대 조작된 또는 돌연변이체 D 및/또는 J 유전자 세그먼트가 포함된다.

[0019] 상이한 측면에서, 본 발명은 인간화 중쇄 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 비-인간 동물, 및 상기 동물을 제조하는 방법으로서, 여기서 인간화 중쇄 이뮤노글로불린 로커스가 1개 초과이지만, 제한된 개수의 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 복수의 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 것인 방법을 제공한다. 상기 동물은 다양한 V 유전자 세그먼트와 회합된 2, 3개, 또는 그 초과의 상이한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함할 수 있지만, 리더/V 유전자 세그먼트 중 적어도 2개는 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함한다. 상기 실시양태는 모든 리더/V 유전자 세그먼트에 대해 단일 리더 펩티드-코딩 서열을 사용하는 최대 이점을 달성하지 못하고, 증폭을 위해 프라이머 혼합물의 사용을 필요로 할 수 있지만, 각 V 유전자 세그먼트와 자연적으로 회합된 상이한 리더 펩티드-코딩인 것을 사용하는 것에 비해 실질적인 이점을 여전히 나타낼 수 있다. 예를 들어, 단일 리더 펩티드-코딩 서열이 원하는 V 유전자 세그먼트 모두와 잘 작동하지 않는 경우라면, 1개 초과의 리더 펩티드 코딩 서열의 사용이 필요할 수 있다. 본 명세서의 대부분이 모든 중쇄 및/또는 경쇄 V 유전자 세그먼트에 대해 단일 인간 게놈 가변 영역 이뮤노글로불린 서열을 포함하는 실시양태에 관한 것이지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비록 1개 초과의 리더 펩티드-코딩 서열이 사용되더라도, 대부분은 본 발명의 이점이 달성될 수 있으며, 여기서 가장 적은 수의 리더 펩티드-코딩 서열이 바람직하다는 것을 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 인간 항체를 생성하는데 사용되는 현재 트랜스제닉 동물에서 발견되는 인간 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인 로커스의 개략도를 제공한다. 도 1은 본 발명의 어느 측면도 나타내지 않으며, 단지 현재 방법의 일부 결함을 예시하기 위해 제공된다. 중쇄 가변 도메인 로커스에 대한 유전자 세그먼트 어레이가 제시되어 있으며, 여기서 개별 리더/V, D 및 J 유전자 세그먼트는 직사각형 박스로 표시되어 있다. 모든 리더/V 유전자 세그먼트 박스는 V 유전자 서열 및 그의 바로 상류에 자연적으로 회합된 리더 펩티드-코딩 서열 둘 다를 나타낸다. 리더/V 유전자 세그먼트는 상이한 V 유전자 서열보다는 각각의 리더/V 유전자 세그먼트에 대한 상이한 리더 펩티드-코딩 서열을 나타내는 상이한 필 패턴을 갖는 박스로서 제시되어 있다. 직사각형 박스 개수가 리더/V, D, 및 J

유전자 세그먼트 중 임의의 것에 대한 특정 개수의 유전자 세그먼트를 나타내는 것은 아니다. 도 1은 추가로 두 PCR 반응 (PCR#1 및 PCR #2)을 나타낸 개략도를 제공한다. 단지 도면에서 예시하기 위한 목적으로, "Fc"는 단지 CH2 및 CH3 도메인만이 아니라, 전체 불변 영역 서열 (CH1, 힌지, CH2 및 CH3)을 지칭한다. "FR1"은 리더 펩티드-코딩 서열의 바로 하류에 있는 성숙한 중쇄 가변 영역의 아미노 말단의 프레임워크 1을 지칭한다. 프라이머는 그가 사용되는 PCR 반응 및 그가 정방향 ("for") 또는 역방향 ("rev") 프라이머인지 여부에 따라 명명된다. 프라이머 1-for 및 프라이머 2-for에 사용된 프라이머의 혼합물은 상이한 다른 라인 패턴을 가진 화살표의 혼합물로 예시되어 있다. "최적 프로모터 및 리더" 및 "원하는 Fc"는 증폭된 가변 영역 서열이 클로닝되는 벡터의 추가 유전적 요소를 지칭한다.

도 2는 인간 항체를 생성하기 위해 사용되는 트랜스제닉 동물에서 사용하기 위한 신규하고, 개선된 인간 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인 로커스의 개략도를 제공한다. 모든 리더/V 유전자 세그먼트 박스는 V 유전자 서열 및 그의 바로 상류의 공통 리더 펩티드-코딩 서열 둘 다를 나타낸다. 모든 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 색상 (흑색)으로, 심지어 각각의 리더/V 유전자 세그먼트가 상이한 V 유전자 서열을 포함하더라도, 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 도 1과 달리, 프라이머 1-for 및 프라이머 2-for는 프라이머의 혼합물이 아닌 단일 프라이머이고, 프라이머 2-for는 가변 영역 (FR1)이 아닌 리더 펩티드-코딩 영역의 서열에 상보적이다. 그 외 명칭은 도 1과 같다. 도 2의 세부사항은 본 발명을 제한하지 않으며, 도 2는 단지 본 발명의 원리를 개략적으로 그리고 그의 한 실시양태를 구체적으로 예시하기 위해 제공된다.

경쇄 구축물을 제외한, 즉, 간단하게, D 유전자 세그먼트를 생략한, 도 1 및 2와 유사한 개략도는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 바로 자명해질 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] *정의*

[0022] 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위해, 먼저 특정 용어를 정의한다. 본 출원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 달리 명백하게 제공되는 경우를 제외하고, 하기 용어들 각각은 하기 기재되는 의미를 가져야 한다. 추가 정의는 본 출원 전반에 걸쳐 설명된다.

[0023] "투여하는"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 항원 또는 치료제와 같은 작용제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "비경구 투여"라는 어구는 일반적으로 주사에 의한 장관 및 국소 투여 이외의 투여 모드를 의미하며, 제한 없이, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 림프내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 진피내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입 뿐만 아니라, 생체내 전기천공을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 항체는 비경구 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어, 비내로, 경구로, 질로, 직장으로, 설하로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 투여는 또한, 예를 들어, 1회, 수회 및/또는 1회 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다. 투여는 의사, 간호사, 또 다른 의료 제공자, 또는 환자 자신을 포함하나, 이에 제한되지 않는 1명 이상의 개체에 의해 수행될 수 있다.

[0024] 본 발명의 방법에 사용하기 위해 최적화된 인간 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 트랜스제닉 동물과 관련하여 본원에 사용된 "동물"은 인간 항체의 생산에 적합한 임의의 동물 종을 지칭한다. 인간 항체를 생산하는데 사용되는 예시적인 동물은 설치류, 예컨대 마우스 및 래트, 및 소를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Bruggemann *et al.* (2015) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 63:101] 참조한다. 다른 동물도 사용될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 마우스에 대한 구체적인 언급과 함께 본원에 제공된 방법 및 예는 다른 적합한 동물 종에도 동일하게 적용될 수 있을 것이다.

[0025] 본 개시내용의 목적을 위해, 동물의 생식계열 핵산 서열이 상이한 종으로부터 유래된 핵산 서열, 예컨대 인간 생식계열 서열로부터 유래된 서열, 또는 마우스 게놈에서 발견되지 않는 인공 서열을 포함하도록 변형되었다면, 동물은 "트랜스제닉" 동물인 것이다. 본 발명의 트랜스제닉 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스는 전형적으로 그의 게놈에 통합된 인간 이뮤노글로불린 서열을 포함할 것이다. 이종 핵산 서열은 임의의 로커스에, 예를 들어, 상응하는 동물 이뮤노글로불린 로커스에 도입될 수 있고, 임의의 방법에 의해 도입될 수 있다.

[0026] 동물, 예컨대 마우스로의 유전적 구축물의 "도입"은 원하는 형질을 가진 동물을 육종 또는 교배하여 형질 둘 다를 보유하는 자손을 생성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 트랜스제닉 인간 중쇄 가변 영역 로커스를 보

유하는 동물을 트랜스제닉 인간 경쇄 가변 영역 로커스를 보유하는 동물과 교배하여 인간 가변 도메인을 포함하는 항체를 생산할 수 있는 동물을 생성할 수 있다.

[0027] "항체" (Ab)는 제한 없이, 항원에 특이적으로 결합하고, 디술피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질 이뮤노글로불린, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하여야 한다. 각각의 H쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H로 약칭) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L로 약칭) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 명명되는, 보존성이 더 큰 영역이 산재되어 있는, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명되는 초가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각 V_H 및 V_L은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 가변 영역은 본원에서 "가변 도메인"으로 동등하게 지칭될 수 있고, 불변 영역은 본원에서 "불변 도메인"으로 동등하게 지칭될 수 있다.

[0028] "항체"는 문맥에 따라 복수 또는 제한된 수의 개별 항체 또는 폴리클로날 항체의 풀, 예컨대, 항원에 의한 면역화로부터 회수된 항-항원 항체의 풀을 지칭할 수 있다.

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, 및 통상적인 해석에 따라, "한" 중쇄 및/또는 "한" 경쇄를 포함하는 것으로 기재되는 항체는 언급된 중쇄 및/또는 경쇄 중 "적어도 하나"를 포함하는 항체를 지칭하고, 따라서, 2개 이상의 중쇄 및/또는 경쇄를 갖는 항체를 포함할 것이다. 구체적으로, 상기 기재된 바와 같은 항체는 2개의 실질적으로 동일한 중쇄 및 2개의 실질적으로 동일한 경쇄를 갖는 통상적인 항체를 포함할 것이다. 항체 쇄는 실질적으로 동일할 수 있지만, 번역 후 변형, 예컨대, 리신 잔기의 C-말단 절단, 대체 글리코실화 패턴 등으로 인해 상이할 경우, 완전히 동일하지 않을 수 있다.

[0030] 달리 명시되지 않거나 또는 문맥상 명확하지 않다면, 항체의 표적 특이성에 의해 정의된 항체 (예를 들어, "항-CTLA-4 항체")는 그의 인간 표적 (예를 들어, 인간 CTLA-4)에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 상기 항체는 다른 종의 CTLA-4에 결합하거나 또는 결합하지 않을 수 있다.

[0031] 이뮤노글로불린은 IgA, 분비 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 통상적으로 공지된 이소타입 중 임의의 것으로부터 유래할 수 있다. IgG 이소타입은 특정 종의 하위부류로 분류될 수 있다: 인간의 경우, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 마우스의 경우, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3. IgG 항체는 본원에서 기호 감마 (γ) 또는 간단하게 "G"로 지칭될 수 있으며, 예를 들어, IgG1은 문맥으로부터 명확하게 알 수 있는 바와 같이, "γ1" 또는 "G1"로 표현될 수 있다. "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 부류 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다. "항체"는, 예로서, 자연 발생 및 비-자연 발생 항체 둘 다; 모노클로날 및 폴리클로날 항체; 키메라 및 인간화 항체; 인간 또는 비인간 항체; 완전 합성 항체; 및 단일 쇄 항체를 포함한다.

[0032] "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다 (예를 들어, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 CTLA-4 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 상이한 종으로부터의 CTLA-4 분자와 같은 다른 항원과 교차 반응할 수 있다. 더욱이, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 이에 비해, "단리된" 핵산은 자연에 존재하는 핵산과 현저하게 상이한, 즉, 고유한 화학적 아이덴티티, 성질 및 유용성을 갖는 물질의 핵산 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 단리된 DNA는 천연 DNA와 달리 천연 DNA의 독립된 부분이며, 자연에서 발견되는 더 큰 구조적 복합체인 염색체의 필수적인 부분이 아니다. 추가로, 단리된 DNA는, 천연 DNA와 달리, 무엇보다도 특히, 질환을 진단하거나 또는 치료제의 효능을 예측하기 위해 유전자 발현을 측정하고, 바이오마커 유전자 또는 돌연변이를 검출하기 위한 PCR 프라이머 또는 하이브리드화 프로브로서 사용될 수 있다. 단리된 핵산은 또한 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 다른 세포 구성요소 또는 다른 오염물질, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질이 실질적으로 없도록 정제될 수 있다.

[0033] 용어 "모노클로날 항체" ("mAb")는 단일 분자 조성의 항체 분자, 즉, 1차 서열이 본질적으로 동일하고, 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 트랜스제닉 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 기술에 의해 생산될 수 있다.

[0034] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간" 항체 (또는 그의 항원 결합 단편)는 자연 발생 생식계열 서열 및 그의 변

이체, 예컨대, 본 발명에 따른 동일한 리더 펩티드-코딩 서열이 선행하는 V 유전자 세그먼트를 포함하는 변이체를 비롯한, 인간 게놈 가변 영역 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 항체 (또는 단편)를 지칭한다. 인간 게놈 가변 영역 이뮤노글로불린 서열의 유도체는, 예를 들어, 생성된 항체에서 잠재적 아미노산 서열 책임을 제거하기 위한 최소한의 서열 변화를 포함한다. "인간" 항체는 동물, 예를 들어, 마우스 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 항체와 구별되어야 한다. 리더 펩티드는 항체의 성숙한 중쇄 및 경쇄로부터 절단되기 때문에, 본 발명의 마우스에서 생성되거나, 또는 본 발명의 마우스로부터 생성된 항체는 사용된 리더 펩티드 서열의 기원 (인간, 비-인간, 인공)에 관계없이 오직 인간-유래 이뮤노글로불린 가변 영역 서열만을 포함할 것이다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 트랜스제닉 동물로부터 단리된 잠재적 인간 치료 항체와 관련하여, 불변 도메인은 어떻게든지 최종 치료 항체에서 인간 불변 도메인으로 변경될 것이기 때문에, 불변 도메인의 기원에 관계없이, 가변 도메인이 인간 기원이면, 항체는 인간 항체로 간주될 수 있다. "완전 인간" 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 도메인 및 불변 도메인 서열 둘 다를 포함한다.

[0035] "항체 단편"은 일반적으로 무손상 항체가 결합하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는 무손상 항체의 "항원-결합 부분" ("항원-결합 단편"), 또는 FcR 결합 능력을 보유하는 항체의 Fc 영역을 비롯한, 전체 항체의 부분을 지칭한다. 예시적인 항체 단편은 Fab 단편 및 단일 쇄 가변 도메인 (scFv) 단편을 포함한다.

[0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리더 펩티드 서열"은 전형적으로 단백질의 분비 이전에 또는 그와 동시에 절단되는 새로 합성된 폴리펩티드의 N-말단에 있는 아미노산 잔기의 스트레치를 지칭한다. 리더 펩티드 서열은 또한, 예를 들어, 리더 서열, 리더 펩티드, 신호 서열 및 신호 펩티드로도 지칭될 수 있다. 리더 펩티드 서열의 길이는 전형적으로 16 내지 30개의 아미노산 길이이다. 리더 펩티드를 갖는 단백질의 경우, 리더 펩티드 서열을 포함하는 전장 형태의 서열은 프로단백질로 지칭되는 반면, 리더 펩티드가 제거된 후 남은 서열은 성숙한 단백질로 지칭된다. 유전적 수준에서, 리더 펩티드-코딩 서열은 V 유전자 세그먼트의 5' 말단에서 발견되는 가변 도메인의 프레임워크 영역 1 (FR1)을 코딩하는 서열의 바로 상류에 존재한다.

[0037] "리더 펩티드-코딩 서열"은 리더 펩티드 서열을 코딩하는 핵산 서열, 전형적으로, 비-인간 동물의 게놈 내로의 통합을 위한, 또는 상기 게놈 내로 통합된 유전적 구축물을 언급할 경우, DNA 서열이다. 리더 펩티드-코딩 서열은, 예를 들어, 게놈의 리더 펩티드-코딩 서열에 자연적으로 존재할 수 있는 임의의 인트론 서열이 있거나 없는, 그의 기원 유기체에서 리더 펩티드 서열을 코딩하는 자연 발생 DNA 서열, 리더 펩티드 서열을 코딩하는 코돈 최적화된 DNA 서열, 또는 리더 펩티드 서열을 코딩하는 임의의 다른 DNA 서열일 수 있다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, "V 유전자 세그먼트"는 이뮤노글로불린 로커스에 위치할 때, 성숙한 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인의 아미노-말단 부분을 코딩하는 서열을 포함하도록 재배열될 수 있는 게놈 유전적 요소를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, "V 유전자 세그먼트"는 리더 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하지 않는, 자연 발생 인간 게놈 유전자 세그먼트를 지칭한다 (문헌 [Janeway *et al.* (2001) *Immunobiology*, 5th Ed. at Section 4.2 and Figure 4.2]). "D 유전자 영역" 및 "J 유전자 영역"은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인의 카르복시 말단 부분을 코딩하는 서열을 포함하도록 재배열될 수 있는 이뮤노글로불린 로커스 중의 추가 게놈 유전적 요소 (경쇄에서는 오직 "J 유전자 영역"만)를 지칭한다. 본 발명의 트랜스제닉 동물은 그의 게놈에 복수의 V 유전자 세그먼트 (2개 이상) 뿐만 아니라, 적어도 하나의 D 유전자 세그먼트 (중쇄의 경우) 및 적어도 하나의 J 유전자 세그먼트를 포함하는 하나 이상의 인간 이뮤노글로불린 로커스를 포함한다. "가변 영역 유전자 세그먼트"는 집합적으로 가변 영역 로커스에서 발견되는 바와 같이 V, D (중쇄의 경우) 및 J 유전자 세그먼트를 지칭한다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리더/V 유전자 세그먼트"는 리더 펩티드를 코딩하는 서열의 바로 하류에 V 유전자 세그먼트를 포함하는 유전적 요소를 지칭한다. 재배열된 이뮤노글로불린 로커스 내로 도입될 때, 리더/V 유전자 세그먼트는 RNA로 전사되고, 임의적으로 스플라이싱되어 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 mRNA의 5' 말단을 생성한다. 리더/V 유전자 세그먼트는 리더 펩티드, 및 프레임워크 1 (FR1), 상보성 결정 영역 1 (CDR1), FR2, CDR2, FR3 및 CDR3의 시작부를 포함하는 항체 쇄의 가변 도메인의 N-말단부를 코딩한다. 리더 펩티드는 성숙한 분비된 항체의 중쇄 및 경쇄로부터 절단된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 상기 리더/V 유전자 세그먼트에서 V 유전자 서열은 인간 생식계열 V 유전자 서열을 포함하는 반면, 리더 펩티드-코딩 서열은 인간, 비-

인간 또는 합성 기원의 것일 수 있다. 예를 들어, 표 2, 3 및 4를 참조한다. 본 발명의 실시양태에서, 주어진 중쇄 또는 경쇄 로커스의 경우, 상이한 리더/V 유전자 세그먼트는 각각 상이한 V 유전자 서열을 포함하지만, 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 주어진 리더/V 유전자 세그먼트의 바로 상류에 있는 전사된 핵산 서열은 인간과 같은 기원 종의 특정 V 유전자 세그먼트의 것과 자연적으로 회합된 5' UTR (비번역 영역)을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이뮤노글로불린 로커스", 예컨대 "인간 이뮤노글로불린 로커스"는 항체 중쇄 또는 경쇄를 생산하기 위한 재배열을 지원하는데 필요한 핵산 서열을 포함하는 게놈 위치를 지칭한다. 본 발명의 방법 또는 본 발명의 트랜스제닉 동물과 관련하여, 인간 중쇄 또는 경쇄 이뮤노글로불린 로커스는 동물 게놈에 각각 상응하는 인간 중쇄 또는 경쇄 동물 유전적 로커스에 또는 그 근처에, 예를 들어, 마우스 이뮤노글로불린 로커스 근처에 위치할 수 있다. 트랜스제닉 동물에서 인간 이뮤노글로불린 로커스는 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역에 대한 인간 유전적 요소 ("인간 이뮤노글로불린 가변 영역 로커스")를 포함하고, 임의적으로, 항체 쇄의 불변 영역에 대한 하나 이상의 인간 유전적 요소, 예를 들어, 중쇄 가변 영역의 경우, V, D 및 J 요소, 및 경쇄 가변 영역의 경우, V 및 J 요소를 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 로커스는 임의 개수의 V, D 또는 J 유전자 세그먼트, 1개 내지 최대 자연 발생 개수까지의 기능성 인간 유전자 세그먼트, 또는 그 초과를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시양태는 적어도 중쇄 또는 경쇄 로커스에 대해 적어도 2개의 V 유전자 세그먼트를 포함한다.

[0041] 달리 명시되지 않거나 또는 문맥상 명확하지 않다면, 본원에서 사용되는 "서열"은 핵산 서열, 예컨대 DNA 서열, 예컨대 게놈 DNA 서열을 지칭한다. 따라서, "동일한 서열"은 반드시 동일한 폴리펩티드 서열을 코딩할 것이다. 달리 명시되지 않거나, 또는 문맥상 명확하지 않다면, 본원에서 핵산 서열 (예컨대 유전자 또는 유전자 세그먼트) 또는 단백질에 대한 모든 언급은 해당 핵산 서열 또는 단백질의 인간 (호모 사피엔스(*Homo sapiens*)) 오르토로그에 관한 것이다.

[0042] 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트와 관련하여 본원에서 사용되는 바와 같이, "동일한 리더 펩티드-코딩 서열"은 각각 중쇄 또는 경쇄에서 모든 다른 리더/V 유전자 세그먼트 중 리더 펩티드-코딩 서열과 동일한 핵산 서열을 포함하는 복수의 리더/V 유전자 세그먼트 중의 N-말단 리더 펩티드-코딩 서열을 지칭한다. 리더 펩티드-코딩 서열은 특정 인간 V 유전자 세그먼트로부터 유래된 리더 펩티드에 대한 자연 코딩 서열과 같은 리더 펩티드에 대한 자연 코딩 서열일 수 있거나, 또는 동일한 리더 펩티드 아미노산 서열을 코딩하는, 최적화 (예컨대 코돈 최적화)되거나, 또는 달리 변경된 코딩 서열일 수 있으며, 단, 이는 모두 동일한 핵산 서열이다. 본 발명의 동물 및 방법에서, 모든 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 리더 펩티드-코딩 서열 ("제1" 리더 펩티드-코딩 서열로 지칭)을 포함할 것이며, 모든 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 리더 펩티드-코딩 서열 ("제2" 리더 펩티드-코딩 서열로 지칭)을 포함할 것이다. 제1 리더 펩티드-코딩 서열은 제2 리더 펩티드-코딩 서열과 동일한 것이거나 또는 동일하지 않은 것일 수 있다.

[0043] 서열 요소가 제2 서열보다 폴리뉴클레오티드의 코딩 가닥의 5' 말단에 더 가깝거나, 또는 폴리펩티드의 아미노 말단 (N-말단)에 더 가깝다면, 상기 서열 요소는 제2 서열 요소의 "상류"에 있는 것이다. 서열 요소가 연접부에 부가 또는 결실 없이 제2 서열 요소의 5' 말단 (또는 N-말단)에 직접 융합되어 있다면, 상기 서열 요소는 제2 서열 요소의 "바로 상류"에 있는 것이다. 유사하게, 서열 요소가 제2 서열 요소보다 폴리뉴클레오티드의 코딩 가닥의 3' 말단에 더 가깝거나, 또는 폴리펩티드의 카르복시 말단 (C-말단)에 더 가깝다면, 상기 서열 요소는 제2 서열 요소의 "하류"에 있는 것이고, 부가 또는 결실 없이 제2 서열 요소의 3' 말단 (또는 C-말단)에 직접 융합되어 있다면, "바로 하류"에 있는 것이다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, "게놈" 서열은 동물, 예컨대, 본 발명의 인간 (호모 사피엔스) 또는 비-인간 트랜스제닉 동물의 생식계열 세포의 염색체에서 발견되는 서열이다. 게놈 서열은 인트론을 포함하거나, 또는 포함하지 않을 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "인트론리스(intronless)" 서열은 인트론이 없고, 따라서, 스플라이싱할 필요 없이 단백질을 직접 코딩하고, 따라서, 해당 단백질에 대한 스플라이싱된 mRNA 서열 또는 동등하게 해당 단백질에 대한 cDNA 서열에 상응하는 서열이다. 서열은 하나 이상의 인트론을 포함하는 게놈 서열에서 유래된 경우 전형적으로 인트론리스로 지칭된다. 다양한 실시양태에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물, 방법 및 핵산에서 사용된 일부 또는 모든 리더 펩티드-코딩 서열 및 V 유전자 세그먼트는 인트론리스 서열이다. 다른 실시양태에서, 인트론은 리더 펩티드-코딩 서열 및/또는 V 유전자 세그먼트에 보유된다.

[0045] 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 서열 또는 유전자 세그먼트에 대한 논의는 반수체 게놈, 즉, 하나의 게놈 상보체에 있는 개별 염색체 상의 그의 카피수를 지칭한다. 유사하게, 본원에서 서열 또는 유전자 세그먼트에 대한 논의는 이형접합성을 고려하지 않는다. 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 동물은 주어진 서열 또는 유전자

요소에 대해 이형접합성 또는 동형접합성일 수 있다. 주어진 서열 또는 유전자 요소에 대해 이형접합성인 동물은, 예를 들어, 관심 항원에 대한 항체를 발생시키는데 사용하기 위해 동형접합성인 자손 동물을 생성하기 위해 선택적으로 육종될 수 있다.

[0046] "암"은 신체의 비정상적인 세포의 비제어된 성장을 특징으로 하는 광범위한 다양한 질환 군을 지칭한다. 조절되지 않은 세포 분열 및 성장 분열 및 성장은 악성 종양 또는 이웃 조직을 침범하는 세포의 형성을 초래하고, 림프계 또는 혈류를 통해 신체의 원위부로 전이될 수도 있다.

[0047] "세포 표면 수용체"는 신호를 수신하고, 세포의 원형질막을 가로질러 상기 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자 복합체를 지칭한다.

[0048] "이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고, 하나 이상의 이펙터 기능을 매개하는 면역계의 세포를 지칭한다. 바람직하게, 세포는, 예를 들어, 인간 FcγRIII과 같은 적어도 한 타입의 활성화 Fc 수용체를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), NK 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구 및 호산구를 포함한다.

[0049] "이펙터 기능"은 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드의 상호작용, 또는 그로부터 초래되는 생화학적 이벤트를 지칭한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성 (CDC), Fc 수용체 결합, FcγR 매개 이펙터 기능 예컨대 ADCC 및 항체 의존성 세포 매개 식균작용 (ADCP), 및 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합될 것을 요구한다.

[0050] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 결합하는 수용체이다. IgG 항체에 결합하는 FcR은 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함하는, FcγR 패밀리의 수용체를 포함한다. FcγR 패밀리는 3개의 활성화 (마우스의 경우, FcγRI, FcγRIII 및 FcγRIV; 인간의 경우, FcγRIA, FcγRIIA 및 FcγRIIIA) 수용체와 하나의 억제성 (FcγRIIB) 수용체로 이루어진다. 인간 FcγR의 다양한 특성이 표 1에 요약되어 있다. 대부분의 선천 이펙터 세포 유형은 하나 이상의 활성화 FcγR 및 억제성 FcγRIIB를 공동 발현하는 반면, 자연 살해 (NK) 세포는 하나의 활성화 Fc 수용체 (마우스에서, FcγRIII, 및 인간에서, FcγRIIIA)를 선택적으로 발현하지만, 마우스 및 인간에서 억제성 FcγRIIB는 발현하지 않는다.

[0051] "Fc 영역" (단편 결정화가능한 영역) 또는 "Fc 도메인" 또는 "Fc"는 도면에 사용된 경우를 제외하고, 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포)에 위치하는 Fc 수용체에의 결합, 또는 고전적 보체 시스템의 제1 구성요소 (C1q)에의 결합을 비롯한, 이뮤노글로불린의 숙주 조직 또는 인자에의 결합을 매개하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. 따라서, Fc 영역은 제1 불변 영역 이뮤노글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드이다. IgG, IgA 및 IgD 항체 이소타입에서, Fc 영역은 항체의 두 중쇄의 제2 (C_{H2}) 및 제3 (C_{H3}) 불변 도메인에서 유래된 2개의 동일한 단백질 단편으로 구성되고; IgM 및 IgE Fc 영역은 각 폴리펩티드 쇄에 3개의 중쇄 불변 도메인 (C_H 도메인 2-4)을 포함한다. IgG의 경우, Fc 영역은 이뮤노글로불린 도메인 Cγ2 및 Cγ3 및 Cγ1과 Cγ2 사이의 힌지를 포함한다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 C226 또는 P230의 아미노산 잔기에서부터 중쇄의 카르복시 말단까지 이어지는 것으로 정의되며, 여기서 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 인덱스에 따른다. 인간 IgG Fc 영역의 C_{H2} 도메인은 대략 아미노산 231에서부터 대략 아미노산 340까지 걸쳐 있는 반면, C_{H3} 도메인은 Fc 영역에서 C_{H2} 도메인의 C-말단 측에 위치하고, 즉, IgG의 대략 아미노산 341에서부터 대략 아미노산 447까지 걸쳐 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, Fc 영역은 천연 서열 Fc 또는 변이체 Fc일 수 있다. Fc는 또한 단리된 상기 영역, 또는 "Fc 융합 단백질"로도 지칭되는 "Fc 영역을 포함하는 결합 단백질" (예를 들어, 항체 또는 이뮤노어드헤신)과 같은 Fc 포함 단백질 폴리펩티드와 관련된 상기 영역을 지칭한다.

[0052] 표 1

[0053] 인간 FcγR의 특성

Fcγ	대립유전자 변이체	인간 IgG에 대한 친화성	이소타입 선호도	세포 분포
FcγRI	기재된 것 없음	높음 (K_D ~10 nM)	IgG1=3>4>>2	단핵구, 대식세포, 활성화된 호중구, 수지상 세포?
FcγRIIA	H131	낮음 내지 중간	IgG1>3>2>4	호중구, 단핵구, 대식세포, 호산구, 수지상 세포, 혈소판
	R131	낮음	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	중간	IgG1=3>>4>2	NK 세포, 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 호산구, 수지상 세포?
	F158	낮음	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	낮음	IgG1=3=4>2	B 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포
	T232	낮음	IgG1=3=4>2	

[0054]

[0055] "면역 반응"은 외부 인자에 대한 척추동물 내의 생물학적 반응으로서, 상기 반응은 상기 외부 인자 및 그에 의해 유발되는 질환으로부터 유기체를 보호하는 것을 지칭한다. 면역 반응은 면역계의 세포 (예를 들어, T 림프구, B 림프구, 자연 살해 (NK) 세포, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 수지상 세포 또는 호중구) 및 상기 세포 또는 간 중 임의의 것에 의해 생산된 가용성 거대분자 (항체, 시토카인 및 보체 포함)의 작용에 의해 매개되며, 이는 침입한 병원체, 상기 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암성 또는 다른 비정상적인 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우, 정상 인간 세포 또는 조직의 선택적 표적화, 그에의 결합, 그에 대한 손상, 그의 파괴, 및/또는 그의 척추동물의 체내로부터의 제거를 초래한다.

[0056] "면역조정인자" 또는 "면역조절인자"는 면역 반응을 조정, 조절 또는 변형시키는데 수반될 수 있는 신호전달 경로의 구성요소를 지칭한다. 면역 반응을 "조정하는," "조절하는" 또는 "변형시키는"이라는 것은 면역계의 세포 또는 상기 세포의 활성에서 임의의 변경을 지칭한다. 상기 조정은 다양한 세포 유형의 개수의 증가 또는 감소, 이들 세포의 활성 증가 또는 감소, 또는 면역계 내에서 발생할 수 있는 임의의 다른 변화에 의해 나타날 수 있는 면역계의 자극 또는 억제를 포함한다. 억제성 및 자극성 면역조정인자 둘 다가 확인되었으며, 그 중 일부는 종양 미세환경에서 증진된 기능을 가질 수 있다. 개시된 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 면역조정인자는 T 세포의 표면에 위치한다. "면역조정성 표적" 또는 "면역조절성 표적"은 물질, 작용제, 모이어티, 화합물 또는 분자에 의한 결합에 대해 표적화되고, 그의 활성이 상기 결합에 의해 변경되는 면역조정인자이다. 면역조정성 표적은, 예를 들어, 세포 표면의 수용체 ("면역조정성 수용체") 및 수용체 리간드 ("면역조정성 리간드")를 포함한다.

[0057] "면역요법"은 면역 반응을 유도, 증진, 억제 또는 다르게는 변형시키는 것을 포함하는 방법에 의해 질환을 앓거나, 질환에 걸릴, 또는 그가 재발할 위험이 있는 대상체를 치료하는 것을 지칭한다.

[0058] "내인성 면역 반응을 강화시키는 것"은 대상체에서 기존 면역 반응의 효과 또는 효능을 증가시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 내인성 숙주 면역 반응을 억제하는 메카니즘을 극복하거나, 또는 내인성 숙주 면역 반응을 증진시키는 메카니즘을 자극시킴으로써 상기 효과 및 효능 증가를 달성할 수 있다.

[0059] "단백질"은 쇄 길이에 대한 상한 없이, 연속적으로 연결된 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 쇄를 지칭한다. 단백질 중의 하나 이상의 아미노산 잔기는, 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 글리코실화, 인산화 또는 디술피드 결합 형성과 같은 변형을 함유할 수 있다. "단백질"이라는 용어는 본원에서 "폴리펩티드"와 상호교환가능하게 사용된다.

[0060] 달리 명시되지 않거나, 또는 문맥상 명확하지 않다면, "대상체"는 치료 물질이 투여되는 인간을 지칭한다. 용어 "비-인간 동물"은 척추동물 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 토끼, 설치류 예컨대 마우스, 래트, 및 기니피그, 조류 종 예컨대 닭, 양서류 및 파충류를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 포유동물 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 토끼, 페럿 또는 설치류이다. 본 개시된 발명의 임의의 측면의 더욱 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0061] 대상체의 "치료" 또는 "요법"은 질환과 연관된 증상, 합병증, 병태 또는 생화학적 징후의 발병, 진행, 발생, 중증도 또는 재발을 역전, 완화, 호전, 억제, 저속화 또는 예방할 목적으로 대상체에 대해 수행되거나, 또는 대상

체에게 활성제를 투여하는 임의 유형의 개입 또는 프로세스를 의미한다.

[0062] *공통 리더 펩티드 접근법*

[0063] 본 발명은, 예를 들어, 인간 치료제로서 사용하기 위한 항체를 선택하는 것과 같이, 인간 항체의 다양한 폴리클로날 풀을 생성하는데 사용하기 위한 트랜스제닉 동물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 인간 항체의 다양한 폴리클로날성 풀을 생성하는데 사용하기 위한 개선된 인공 인간 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 트랜스제닉 동물, 예컨대 마우스, 상기 트랜스제닉 동물을 사용하여 항체를 생산하는 방법, 상기 트랜스제닉 동물로부터 수득된 항체, 상기 트랜스제닉 동물로부터 수득된 항체를 사용하여 치료하는 방법, 및 관련된 폴리뉴클레오티드 구축물을 제공한다. 본 발명의 방법은 복수의 게놈 중쇄 및/또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 동물, 예를 들어, 마우스, 래트 또는 소 내로 도입하는 것을 수반하며, 여기서 주어진 쇄에 대한 모든 리더/V 유전자 세그먼트가 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함한다.

[0064] 인간 이뮤노글로불린 중쇄 로커스는 대략 45개의 기능성 V 유전자 세그먼트, 25개의 D 유전자 세그먼트 및 6개의 J 유전자 세그먼트를 포함하고, 카파 경쇄 로커스는 대략 40개의 기능성 V 유전자 세그먼트 및 5개의 J 유전자 세그먼트를 포함한다 (문헌 [Lucas (2003) *Encyclopedia of Life Science* 1-8]). 상기 생식계열 유전적 요소의 조합적 분류는 항체 서열 다양성의 기준선 수준으로 이어지며, 이는 연접부 돌연변이 (예를 들어, 결실, N- 및 P-뉴클레오티드 부가) 및 체세포 과돌연변이에 의해 증대되어 놀라울 정도로 많은 항체 서열 다양성을 생성한다. 이러한 서열 다양성은 다수의 잠재적 병원체에 대한 항체를 제공한다는 점에서는 유리하지만, 이는 이들 폴리클로날 항체 풀의 단리 및 정제에는 복잡성을 도입한다. 주어진 목적에 대해 우월한 특성을 가진 개별 항체를 찾고자 하는 기술자는 가능한 서열 다양성이 가장 큰 많은 항체 집단을 스크리닝하기를 원할 것이다. 이를 위해서는, 예를 들어, 트랜스제닉 동물 내에서 다양한 폴리클로날 항체 풀을 생성해야 할 뿐만 아니라, 동물에 의해 생산된 전 범위의 항체 집단을 회수하여야 한다. 항체 회수 프로세스는 특정 서열이 우선적으로 유지되거나, 손실되는 선택 단계를 부주의로 도입하여 회수된 폴리클로날 항체 풀의 서열 다양성을 감소시킬 수 있다. 이상적으로, 폴리클로날 항체 풀을 생성하고 회수하는 시스템은 후속 선택 단계에서 사용하기 위한 폴리클로날 항체 풀의 비편향된 생성 및 회수를 촉진시키기 위해 처음부터 디자인될 것이다.

[0065] 트랜스제닉 동물, 예컨대 마우스는 치료제로 사용하기 위한 인간 항체 항원-결합 도메인의 생성을 위해 인간 생식계열 이뮤노글로불린 유전자를 발현하도록 조작되었다. 상기 동물은 조합 다양성을 가능하게 하기 위해 복수의 인간 리더/V 유전자 세그먼트 뿐만 아니라, D 및 J 유전자 세그먼트도 포함한다. 이러한 마우스는 임의적으로 상기 마우스와 같은 숙주 동물에 대해 천연한 하나 이상의 불변 도메인 서열의 조합으로, 및 임의적으로는 내인성 마우스 로커스에서 이들 인간 가변 도메인 로커스를 발현할 수 있으며, 이로써, 효율적인 체세포 과돌연변이 및 이에 따른 숙주 동물에서의 발생 동안의 항체의 친화성 성숙을 증진시킬 수 있다 (문헌 [Murphy *et al.* (2014) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 111:5153]). 면역화 프로토콜에 따라 동물에 관심 항원을 1회 이상 주사하여 항-항원 항체의 생산을 유도한다. 이어서, 예를 들어, 면역화된 마우스로부터의 비장 세포와 골수종 세포의 융합에 의해 하이브리도마 세포를 형성하여 그로부터 항체를 단리함으로써 생성된 폴리클로날 항체 집단을 회수하고, 이를 연구한다. 그러나, 융합 프로세스 및 항체 생산 단계는 다른 항체는 잃어가면서, 일부 서열에 대해 생성되는 항체 풀은 강화시킴에 따라 항체 풀이 덜 다양해지는 사실상의 선택 단계가 될 수 있다.

[0066] 대안적으로, 면역화된 마우스로부터의 B 세포를 분리하고, 개별적으로 시퀀싱하여 단일 B 세포 클로닝으로 알려진 프로세스에서 직접 클로닝을 위한 항체 중쇄 및 경쇄 서열을 수득할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tiller *et al.* (2008) *J. Immunol. Meth.* 329:112]; [Wardemann & Busse (2019) Expression Cloning of Antibodies from Single Human B Cells. In: Kueppers R. (eds) *Lymphoma. Methods in Molecular Biology*, vol. 1956. Humana Press, New York, NY]을 참조한다. 단일 B 세포 항체 클로닝 및 시퀀싱은 동물에서 B 세포 집단을 직접 조사함으로써 면역화된 동물에서의 완전 항체 다양성과 최종 폴리클로날 항체 풀 사이의 단계 개수를 최소화한다.

[0067] 어느 경우에서든, 항체 가변 도메인 서열은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 서열 5' 및 3'에 하이브리드화하는 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 수득된다. PCR 프라이머는 가변 도메인에 플랭킹된 서열은 상이한 V 유전자 사용 및 이소타입으로 인해 풀의 항체 간에 다르다는 사실을 수용하도록 디자인되어야 한다. 주로 오직 IgG 항체에만 관심이 있는 경우, 서열 3' (역방향) 프라이머는, 예를 들어, 모든 IgG 불변 도메인의 CH1 도메인의 5' 말단에 보존된 서열을 기반으로 할 수 있다. 그러나, 5' 말단의 프라이머는 대략 45개의 리더/V 유전자 세그먼트 중 임의의 것으로부터 유래된 항체를 수용해야 하며, 이는 그에 상응하여 다양한 리더 펩티드-코딩 서열을 갖는다.

[0068] 한 접근법은 도 1에 예시되어 있는 바와 같이, 각각이 상이한 V 유전자 세그먼트와 자연적으로 회합된 리더 펩

티드-코딩 서열에 어닐링하는 프라이머의 혼합물을 사용하는 것이다. 도 1은 인간 항체를 생성하는데 사용되는 현재 트랜스제닉 동물에서 전형적으로 발견되는 인간 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인 로커스의 개략도를 제공한다. 도 1은 본 발명을 나타내지 않는다. 동물 게놈 중의 중쇄 가변 도메인 로커스에 대한 유전자 세그먼트 어레이가 제시되어 있으며, 여기서 각각의 리더/V 유전자 세그먼트는 그 특정 V 유전자 세그먼트와 회합된 별개의 리더 펩티드-코딩 서열을 포함한다. 도 1은 면역화된 동물의 B 세포로부터 완전히 재배열된 항체의 가변 영역 서열을 회수하기 위해 사용된 2개의 PCR 반응의 개략도를 추가로 제공한다. PCR#1에서는 정방향 프라이머 (프라이머 1-for)와 역방향 프라이머 (프라이머 1-rev)의 혼합물을 사용하여 가변 영역을 증폭시킨다. 리더/V 유전자 세그먼트에 대한 리더 펩티드-코딩 서열이 다르기 때문에, 정방향 프라이머로 사용하려면 프라이머 혼합물이 필요한다. V 유전자 세그먼트 사용의 다양성은 폴리클로날 항체 집단의 잠재적 결합 에피토프, 특이성 및 친화성을 다양화하는데 중요한 요소이다. 프라이머 1-for는 각각의 개별 리더/V 유전자 세그먼트에 대해 알려진 서열인 해당 리더/V 유전자 세그먼트의 리더 펩티드-코딩 서열의 5' 말단에 하이브리드화하여 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 리더/V 유전자 세그먼트를 증폭시킨다. 프라이머 1-rev는 모든 IgG 이소타입 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 사이에서 보존되는 CH1 도메인의 5' 영역에 있는 서열에 하이브리드화한다.

[0069] 이어서, 제2 (네스티드) PCR 단계 (PCR #2)를 PCR #1의 산물에 대해 수행한다. PCR#1과 같이, PCR #2는 정방향 프라이머 (프라이머 2-for) 및 역방향 프라이머 (프라이머 2-rev)의 혼합물, 또는 최대 몇 개의 역방향 프라이머의 혼합물을 사용하며, 각 프라이머는 가변 영역 바로 외부에 서열을 부가하기 위해 5' "테일" 영역을 갖는다. 프라이머 2-for는 프라이머 1-for와 같은 이유로, 즉, 그가 하이브리드화하는 서열 (FR1)이 V 유전자 세그먼트 간에 상이하고, 이에 존재하는 항체 서열의 완전한 다양성의 증폭을 보장하기 위해서는 모든 가능한 생식계열 FR1 서열에 대한 프라이머를 포함하여야 한다는 이유에서 프라이머의 혼합물이어야 한다. 프라이머 2-rev는 인간 V 유전자 세그먼트 중에서 다소 보존되는 가변 영역의 프레임워크 영역 4 (FR4)에 하이브리드화하는 바, 따라서, 프라이머 2-rev는 단일 서열 또는 서열의 작은 혼합물일 수 있다. PCR #2의 산물은 리더 펩티드-코딩 서열 대신 인공 5' "테일"을 포함하는 가변 영역, 및 불변 도메인/Fc 서열 대신 인공 3' "테일"을 포함하는 가변 영역이다. 상기 5' 및 3' 테일은 제시된 바와 같이, 각각 최적 프로모터 및 리더 펩티드-코딩 서열, 원하는 Fc 서열을 포함하는 상류 및 하류 구축물과 어닐링하도록 디자인된다.

[0070] 프라이머 1-for 및 프라이머 2-for에 대한 혼합물의 사용은 복잡성, 비용을 부가하고, 증폭 효율 및 특이성을 저해할 수 있다. 프라이머의 혼합물은 인간 리더/V 유전자 세그먼트의 완전 상보체의 효율적인 증폭을 보장하기 위해 필연적으로 다수의 상이한 올리고뉴클레오티드의 합성을 필요로 한다. 이어서, 덜 효율적으로 증폭된 서열의 손실을 유도할 수 있는 증폭의 편향성을 막기 위해, 상기 프라이머의 상대적 농도를 최적화하여 다양한 상이한 리더 펩티드-코딩 서열에 대해 동일한 증폭 효율이 보장되도록 하여야 한다.

[0071] 프라이머의 혼합물의 사용은 또한 열등한 증폭으로 이어질 수 있다. 예를 들어, 프라이머 1-for는 항체 서열의 수득 기점이 되는 숙주 세포의 모든 핵산 서열을 포함하는 복합 혼합물로부터의 가변 영역의 초기 증폭인 PCR#1에 사용된다. 프라이머 1-for에 다수의 상이한 프라이머 서열이 존재하면, 우연히 프라이머에 상보적이거나, 또는 거의 상보적이게 된 게놈 DNA 서열에서의 프라이밍으로 인해 가성 증폭 산물이 발생할 가능성이 증가하게 된다. PCR #2는 비교적 정제된 핵산, 즉, PCR #1의 산물에 대해 수행되지만, 그럼에도 불구하고, PCR #1과 동일한 비용 및 최적화 문제를 겪고 있다.

[0072] 도 2는 인간 항체를 생성하기 위해 사용되는 트랜스제닉 동물에서 사용하기 위한 신규하고, 개선된 유전적 요소 세트의 한 실시양태의 개략도를 제공한다. 각각의 리더/V 유전자 세그먼트가 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하기 때문에, 모든 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 색상 (흑색)이라는 점에서, 유전자 세그먼트 어레이는 도 1의 것과는 상이하다. 모든 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 갖기 때문에, PCR#1 및 PCR#2에서 각각 프라이머 1-for 및 프라이머 2-for에 대해 오직 단일 프라이머 서열만이 필요하다. 이를 통해 프라이머의 복합 혼합물의 필요성은 없어졌고, 모든 V 유전자 세그먼트의 균일한 증폭이 보장되고, 이로써, 수득된 폴리클로날 항-항원 항체 풀에서 서열의 다양성이 최대화된다.

[0073] 도 2에 예시된 바와 같이, PCR #2의 산물은 리더 펩티드-코딩 서열, 및 인공 5' 연장부 및 인공 3' 연장부를 갖는 가변 영역 서열을 포함한다. 상기 5' 및 3' 연장부는 각각 최적 프로모터 서열 및 원하는 Fc 서열을 포함하는 상류 및 하류 구축물과 어닐링하도록 디자인된다. 상기 유전적 구축물은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 트랜스제닉 동물을 위한 빌딩 블록이며, 그의 중요한 특징은 각 V 유전자 세그먼트와 회합된 공통 리더 펩티드-코딩 서열이다. 도 2의 예시적인 PCR 프로토콜의 구체적인 세부사항은 본 발명을 제한하지 않으며, 이는 각 V 유전자 세그먼트와 회합된 공통 리더 펩티드-코딩 서열의 존재를 이용하기에 적합한 임의의 PCR 증폭 방법에 의해

수행될 수 있다.

[0074] 폴리클로날 항체 풀 중의 모든 항체에 대한 공통 리더 펩티드 서열의 사용은 항체 생성의 모든 측면에 대해 상이한 V 유전자 세그먼트 서열 간의 균일성과 관련하여 추가적인 이점을 제공할 수 있다. 공통 생식계열 리더 펩티드-코딩 서열은 V 유전자 세그먼트 간의 유전적 재배열의 균일성을 증가시킬 수 있다. mRNA의 리더 펩티드-코딩 부분에 대한 균일한 서열은 번역의 균일성을 증진시킬 수 있고, 따라서, 예를 들어, 숙주 세포 내에서 친화성 성숙 동안 및 스크리닝을 위한 시험관내 일시적 발현에서 항체 발현을 증진시킬 수 있다. 초기 항체 쇄의 균일한 신호 펩티드는 단백질 프로세싱 및 분비의 균일성을 증가시킬 수 있다.

[0075] 균일한 폴리펩티드 서열을 사용함으로써만 발생하는 이점은 이를 코딩하는 DNA 서열과 상관없이, 및 리더 펩티드를 코딩하는 DNA 서열이 모든 또는 실질적으로 모든 리더/V 유전자 세그먼트에서 동일한지 여부와 상관없이 달성될 수 있다. 그러나, PCR 반응에서 단일 상류 프라이머를 사용하는 능력과 같은 균일한 DNA 서열의 사용으로 인해 발생하는 추가 이점을 위해서는 모든 또는 실질적으로 모든 리더/V 유전자 세그먼트에서 리더 펩티드를 코딩하는데 동일한 DNA 서열이 사용되어야 한다.

[0076] 본 발명의 이점은 주로 복수의 인간 V 유전자 세그먼트에 대해 공통 리더 펩티드-코딩 서열을 갖는 효율성에서 발생하지만, 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 공유하지 않는 추가 인간 리더/V 유전자 세그먼트 또한 트랜스제닉 비-인간 동물에 존재할 수 있다. 상기의 추가 V 유전자 세그먼트는 다른 V 유전자 세그먼트에 대한 공통 리더 펩티드-코딩 서열의 사용으로부터 발생하는 이점을 반드시 방해하지는 않을 것이다. 그럼에도 불구하고, 대부분의 실시양태에서, 공통 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것 이외의 다른 인간 리더/V 유전자 세그먼트는 존재하지 않는다.

[0077] *리더 펩티드*

[0078] 신호 펩티드로도 지칭되는 리더 펩티드는 소포체의 초기 폴리펩티드 쇄를 표적화하는 분비된 단백질의 N-말단에 있는 ~12 - 30개의 아미노산으로 이루어진 짧은 스트레치이다. 리더 펩티드는 분비 프로세스 동안 프로단백질에서 절단되어 성숙한 단백질을 생성하는 바, 이들 아미노산 서열은 분비 후 단백질의 활성에 영향을 미치지 않는다. 리더 펩티드는 일반적으로 서열이 다양하며, 여기서 고도로 다양한 N-말단 영역, 및 7 - 15개의 소수성 잔기로 이루어진 중앙 영역, 이어서, 약 2 - 9개의 작은 극성 잔기로 이루어진 스트레치가 신호 펩티다제에 의해 절단되는 모티프를 구성한다 (문헌 [Holden *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280:17172]).

[0079] 인간 리더 펩티드 서열 및 리더 펩티드-코딩 서열, 예컨대 인간 중쇄 및 경쇄 V 유전자 세그먼트와 회합된 것들은 공개 데이터베이스에서 이용가능하고, 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 표 2 및 3 및 서열 목록에 예시되어 있다. 일반적으로 사용되는 인간 V 유전자 세그먼트 회합된 리더 펩티드-코딩 서열은 특히 인간 세포에서 선택된 항체의 후속 생산이 고려되는 경우에 인간 항체 발현과 관련하여 잘 기능하는 것으로 알려져 있기 때문에 선택될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 둘 다에 대한 다수의 상기와 같은 인간 V 유전자 리더 펩티드-코딩 서열이 표 2 및 3에 제공되어 있다.

[0080] 대안적으로, 항체가 생성되는 트랜스제닉 숙주 동물, 예컨대 마우스로부터의 리더 펩티드 서열은 항체 발달 동안, 예컨대 친화성 성숙 동안 동물에서 상기 리더 펩티드가 작용할 것이라는 기대에서 선택될 수 있다. 예시적인 마우스 이뮤노글로불린 유전자 리더 펩티드 서열은 표 4에 제공되어 있다.

[0081] 추가로, 인간 비-이뮤노글로불린 단백질 리더 펩티드, 다른 종으로부터 리더 펩티드 및 인공/합성 리더 펩티드를 사용하여 그의 기원과 상관없이, 효율적인 리더 펩티드 서열을 이용할 수 있다. 예를 들어, 세크레콘 (서열 식별번호: 61 및 124)으로 지칭되는 인공 리더 펩티드 서열은 컴퓨터 모델링을 기반으로 생성되었다 (문헌 [Barash *et al.* (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:835]). 또 다른 리더 서열인 가우시아 루시페라제 리더 펩티드 (서열식별번호: 67 and 130)는 가우시아 프린셉스(*Gaussia princeps*)에 의해 생산된 루시페라제로부터 수득되었다 (WO 2017/068142). 누에나방, 바이러스 및 다양한 인간 비-이뮤노글로불린 유전자의 리더 펩티드 및 리더 펩티드-코딩 서열은 표 4 및 서열 목록에 제공되어 있다.

[0082] 한 측면에서, 본 발명은 리더 펩티드, 및 리더 펩티드-코딩 서열의 특정 선택과는 상관이 없고, 대신 단순히 모든 V 유전자 세그먼트에 대해 동일한 리더 펩티드-코딩 서열의 사용에 기반한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 트랜스제닉 동물에서의 사용을 위해 특정 리더 펩티드-코딩 서열은 효율적인 항체 유전자 증폭 및 원하는 발현 시스템, 예컨대 세포주, 예를 들어, 인간 배아 신장 (HEK) 세포 또는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 위해 항체의 생산이 이루어지는 트랜스제닉 동물에서의 후속 항체 생산과 같은 바람직한 특성에 기반하여 선택된다.

[0083] 본 발명의 다양한 실시양태에서 사용하기 위한 예시적인 리더 펩티드-코딩 서열은 하기 표 2, 3 및 4에 기술되어 있고, 함께 제출된 서열 목록에 제공되어 있으며, 이는 그의 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 예시적인 리더 펩티드-코딩 서열은 서열 번호: 서열식별번호: 1 - 70, 134, 136 및 137에 제공되어 있으며, 여기서 상응하는 아미노산 서열은 71 - 133 및 135에 제공되어 있다. 이들 표는 리더 서열이 수득 또는 유래 기점이 된 유전자의 명칭, 리더 펩티드 아미노산 서열 및 코딩 DNA 서열에 대한 서열 식별자 번호를 제공한다. 표 2 및 3은 또한 이뮤노진틱스(ImMunoGeneTics) (IMGT®) 이뮤노글로불린 서열 데이터베이스로부터의 상응하는 인간 게놈 서열을 입수하기 위한 서열 참조 번호를 제공한다. 리더 펩티드에 대한 코딩 서열 뿐만 아니라, 특정 인간 리더 펩티드 코딩 서열과 회합된 인트론도 포함하는, 선택된 리더 펩티드 코딩 서열, 즉, IGHV 3-23 (서열식별번호: 136) 및 IGKV 3-20 (서열식별번호: 137)에 대한 게놈 서열은 표 2에 제공되어 있다. 단지 코딩 서열만을 포함하기보다는 상기 인트론 함유 게놈 서열을 포함하는 것이 본 발명의 트랜스제닉 마우스에 포함될 때 유리할 수 있다.

[0084] 표 2

[0085] 예시적인 중쇄 V 유전자-유래 리더 펩티드 서열

유전자	코딩 서열 (SEQ ID NO:)	IMGT® 게놈 서열 참조	아미노산 서열 (SEQ ID NO:)
IGHV 1-2	1	X07448	71
IGHV 1-3	2	X62109	72
IGHV 1-18	3	M99641	73
IGHV 1-24	4	AB019439	74
IGHV 1-45	5	X92209	75
IGHV 1-46	6	X92343	76
IGHV 1-58	7	M29809	77
IGHV 1-69	8	L22582	78
IGHV 2-26	9	M99648	79
IGHV 2-70	10	L21969	80
IGHV 3-7	11	M99649	81
IGHV 3-11	12	M99652	82
IGHV 3-15	13	X92216	83
IGHV 3-20	14	M99657	84
IGHV 3-21	15	AB019439	85
IGHV 3-23	16	AC245166	86
IGHV 3-23-L8V	17	AC245166 기반	84
IGHV 3-23-C19S	18	AC245166 기반	87
IGHV 3-23 게놈	136	AC245166	86
IGHV 3-30	19	M83134	88
IGHV 3-30.3	19	AC244456	88
IGHV 3-33	19	AB019439	88
IGHV 3-48	20	M99675	89
IGHV 3-49	21	M99676	84
IGHV 3-53	22	M99679	90
IGHV 3-64	23	M99682	91
IGHV 3-66	14	X92218	84
IGHV 3-72	24	X92206	92
IGHV 3-73	14	X70197	84
IGHV 3-74	14	L33851	84
IGHV 4-28	25	X05714	93
IGHV 4-31	25	L10098	93
IGHV 4-34	26	AB019439	93
IGHV 4-39	27	AB019439	93
IGHV 4-39 장쇄	134	AB019439	135
IGHV 4-59	28	AB019438	93
IGHV 4-61	26	M29811	93
IGHV 5-51	29	M99686	94
IGHV 6-1	30	J04097	95

[0086]

[0087] 표 3

[0088] 예시적인 경쇄 V 유전자-유래 리더 펩티드 서열

유전자	코딩 서열 (SEQ ID NO:)	IMGT® 게놈 서열 참조	아미노산 서열 (SEQ ID NO:)
IGKV 1-5	31	Z00001	96
IGKV 1-6	32	M64858	97
IGKV 1-8	33	Z00014	98
IGKV 1-9	32	Z00013	97
IGKV 1-12	34	V01577	99
IGKV 1-16	35	J00248	100
IGKV 1-17	36	X72808	101
IGKV 1-27	37	X63398	102
IGKV 1-33	38	M64856	103
IGKV 1-39	39	X59315	104
IGKV 1D-8	32	Z00008	97
IGKV 1D-13	40	X17262	97
IGKV 1D-37	41	X71893	105
IGKV 1D-43	42	X72817	106
IGKV 2-24	43	X12684	107
IGKV 2-28	44	X63397	108
IGKV 2-29	45	X63396	109
IGKV 2-30	46	X63403	110
IGKV 3-11	47	X01668	111
IGKV 3-15	48	M23090	111
IGKV 3-20	49	X12686	112
IGKV 3-20 게놈	137	X12686	112
IGKV 3D-7	50	X72820	113
IGKV 4-1	51	Z00023	114
IGKV 5-2	52	X02485	115
IGKV 6-21	53	X63399	116

[0089]

[0090] 표 4

[0091] 다른 리더 펩티드 서열

유전자	코딩 서열 (SEQ ID NO:)	아미노산 서열 (SEQ ID NO:)
오스테오넥틴	54	117
H7	55	118
온코스타틴 M	56	119
수포성 구내염 바이러스-G	57	120
마우스 Ig 카파	58	121
IgG2	59	122
누에나방 (봄빅스 모리) 피브로인 LC	60	123
세크레콘	61	124
CD33	62	125
tPA (조직 플라스미노겐 활성인자)	63	126
키모트립시노겐 B2	64	127
트립시노겐-2	65	128
IL-2	66	129
가우시아 루시페라제	67	130
혈청 알부민	68	131
인플루엔자 헤마글루티닌	69	132
인슐린	70	133

[0092]

[0093] *V 유전자 세그먼트*

[0094] 인간 중쇄 리더/V 유전자 세그먼트는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호(Genbank Accession numbers) AB019437 - AB019441에서 이용가능하다 (문헌 [Matsuda *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 188:2151]). 문헌 [LeFranc (2001) *Exp. Clin. Immunogenet.* 18:100]을 또한 참조한다. 특별 관심 대상인 인

간 중쇄 V 유전자 세그먼트의 서브세트는 IGHV 유전자 1-2, 1-3, 1-18, 1-46, 1-69, 2-5, 2-26, 3-7, 3-9, 3-11, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-66, 3-72, 3-74, 4-4, 4-28, 4-31, 4-30-4, 4-34, 4-39, 4-59, 4-61, 5-51 및 7-4-1로 이루어진다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 방법 및 트랜스제닉 동물에서 사용하기 위한 상기 및 인간 중쇄 D 유전자 세그먼트 (IGHD), J 유전자 세그먼트 (IGHJ) 및 불변 영역 유전자 세그먼트 (IGHC)는 문헌 [LeFranc (2001) *Exp. Clin. Immunogenet*. 18:100]에 제공된 바와 같은 수탁 번호를 이용하여 공개 서열 데이터베이스로부터 입수할 수 있다. 가변 영역 V, D 및 J 유전자 세그먼트의 설명을 위해서는 OMIM #147070 (이뮤노글로불린 중쇄 가변 유전자 클러스터; IGHV), 및 예시적인 중쇄 C 유전자 세그먼트 (IgG)의 설명을 위해서는 OMIM #147100 (IgG 중쇄 로커스; IGHG1)을 또한 참조한다.

[0095] 인간 경쇄 카파 리더/V 유전자 세그먼트는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 진뱅크와 같은 공개 데이터베이스에서 이용가능하다. 카파 경쇄 로커스는 2p12의 인간 염색체 2 (게놈 좌표 2:74,800,000-83,100,000)에 있다. 관심 인간 경쇄 카파 V 유전자 세그먼트 (IGKV)는 문헌 [LeFranc (2001) *Exp. Clin. Immunogenet*. 18:161]에 개시된, 대략 40개의 자연 발생 카파 V 유전자 세그먼트를 포함한다. 특별 관심 대상인 인간 경쇄 카파 V 유전자 세그먼트의 서브세트는 IGKV 유전자 1-5, 1-9, 1-12, 1-16, 1-17, 1-27, 1-33, 1-39, 1D-13, 1D-43, 2-28, 2-29, 2-30, 3-11, 3-15, 3-20, 3D-7, 4-1 및 6-21로 이루어진다. 본 발명의 핵산, 방법 및 트랜스제닉 동물에서 사용하기 위한 상기 및 인간 경쇄 카파 J (IGKJ) 세그먼트 및 불변 영역 유전자 세그먼트 (IGKC)는 문헌 [LeFranc (2001) *Exp. Clin. Immunogenet*. 18:161]에 제공된 바와 같은 수탁 번호를 이용하여 공개 서열 데이터베이스로부터 입수할 수 있다. 가변 영역 카파 V 및 J 유전자 세그먼트의 설명을 위해서는 OMIM #146980 (이뮤노글로불린 카파 경쇄 가변 유전자 클러스터; IGKV), 및 카파 C 유전자 세그먼트의 설명을 위해서는 OMIM #147200 (이뮤노글로불린 카파 경쇄 불변 영역; IGKC)을 또한 참조한다.

[0096] 인간 V 유전자의 서열은 진뱅크 및 특히 이뮤노진틱스 (IMGT®) 이뮤노글로불린 서열 데이터베이스와 같은 공개 데이터베이스에서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 이용가능하다 (문헌 [Lefranc, M.-P. et al. (1999) Nucleic Acids Res., 27:209-212]; [Ruiz, M. et al. (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221]; [Lefranc, M.-P. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209]; [Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:307-310]; [Lefranc, M.-P. et al. (2004) *In Silico Biol.*, 5, 0006 [Epub], 5:45-60 (2005)]; [Lefranc, M.-P. et al. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:D593-597]; [Lefranc, M.-P. et al. (2009) *Nucleic Acids Res.*, 37:D1006-1012]; [Lefranc, M.-P. et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015)]). 상기 데이터베이스를 통해 관련 기술분야의 통상의 기술자는 모든 인간 V 유전자 세그먼트 및 자연적으로 회합된 리더 펩티드-코딩 서열에 대한 코딩 서열을 수득할 수 있을 것이다. 인트론을 포함한 게놈 서열 이외에도, 각각의 V 유전자 세그먼트에 대한 주석은 인접 프레임워크 및 CDR 코딩 서열로부터 리더 펩티드-코딩 서열의 분리를 가능하게 하고, 상기 서열이 요구되는 경우 간단한 코딩 서열 (인트론 결여)의 구축을 가능하게 할 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 리더 펩티드 서열의 C-말단을 코딩하는 서열에서 전형적으로 발견되는 인트론과 같은 인간 생식계열 서열로부터의 하나 이상의 인트론을 보유하는 인간 V 유전자 회합된 리더 펩티드-코딩 서열을 사용한다.

[0097] *서열 변이체*

[0098] 유전적 요소가 인간 유전자로부터 유래되거나, 또는 그에 기반한 일부 실시양태에서, 리더 펩티드-코딩 서열 및/또는 V 유전자 세그먼트 서열은 인트론을 포함하는 완전 인간 게놈 서열을 포함한다. 유전적 요소가 인간 유전자로부터 유래되거나, 또는 그에 기반한 대안적 실시양태에서, 게놈 리더 펩티드-코딩 서열 및/또는 V 유전자 세그먼트 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열만을 포함하고, 따라서, 자연적으로 스플라이싱된 mRNA (또는 해당 cDNA)의 서열에 상응한다. 상기 인트론리스 핵산 구축물의 사용은 본 발명의 가변 영역 로커스를 구축하는데 사용되는 유전적 요소의 크기를 감소시키는데 이롭다.

[0099] 리더 펩티드-코딩 서열에 대한 자연 발생 게놈 서열, 및 상기 서열의 자연 스플라이스 산물 이외에도, 본 발명의 핵산은 또한 리더 펩티드를 코딩하는 코돈 최적화된 DNA 서열을 포함한다. 상이한 유기체 및 상이한 세포는 주어진 아미노산 잔기를 코딩하는 특정 코돈을 우선적으로 사용하는 것으로 알려져 있다 (문헌 [Athey *et al.* (2017) *BMC Bioinform.*18:391]). 코돈 최적화된 서열은 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포의 인간 세포와 같이 발현이 이루어지게 되는 세포에서 단백질, 본 경우에서는 리더 펩티드의 발현을 최적화하도록 코돈이 변형된 핵산 서열이다. 예를 들어, 문헌 [Mauro (2018) *BioDrugs* 32:69]을 참조한다. 상기 코돈 최적화된 핵산 구축물은 아미노산 서열이 변하지 않기 때문에 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드에서 리더 펩티드 서열의 기능을 보유하면서 중쇄 또는 경쇄의 번역 효율을 개선시키는 이점이 있다. 오스테오넥틴 리더에 대한 리더 펩티드-코딩 서열 (서

열식별번호: 54)은 상기와 같은 코돈 최적화된 서열의 한 예이고, NG_042174.1 잔기 10728 - 10778에서 발견되는 게놈 서열과 비교하여 7개의 염기쌍 변이를 갖는다. 상기 코돈 최적화가 기능성 항체 쇄를 생성하는데 필요한 유전적 재배열을 방해하지 않거나, 또는 항체 가변 영역을 시퀀싱 프로세스 동안에서 허용할 수 없을 정도로 불량한 증폭을 일으키지 않는다는 것을 결정하는 실험을 수행하여야 한다.

[0100] *다양한 폴리클로날 항체 풀 생성을 위한 개선된 인간 이뮤노글로불린 로커스를 갖는 트랜스제닉 동물을 제조하는 방법*

[0101] 본 발명의 트랜스제닉 동물로서, 그의 게놈에 인간 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로불린 가변 도메인 로커스를 포함하며, 여기서 특정한 쇄에 대한 모든 리더/V 유전자 세그먼트가 공통된 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 트랜스제닉 동물은 본질적으로 하기와 같이 생성된다. 간략하면, 단일 또는 리더 세트의 선택 후, IGHV 및 IGKV 유전자에 대한 생식계열 서열은 프로모터, 5' UTR, 코딩, 재조합 서열 및 플랭킹 생식계열 서열을 포함하는 기능적 주석에 기반하여 선택한다. 리더 서열은 상류 또는 하류 서열 기능 파괴 없이 생식계열 서열의 맥락 내에서 교환된다. 가변 영역을 합성에 의해 생성하고, 재조합, 골든 게이트 어셈블리, 및 제한 효소-기반 라이게이션을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 단일 구축물로 어셈블리하여 가변 도메인 어레이를 생성한다. 이어서, 상기 어레이를 상기 언급된 기술에 의해 추가의 합성 또는 생식계열 IGH 또는 IGK 서열에서 어셈블리하여 표적화 벡터를 생성한다. 표적화 벡터는 양성 약물 선택, 상동성 아암 및/또는 재조합 서열을 포함하고, 레콤비나제 또는 뉴클레아제 구축물와 함께 배아 줄기 세포로 전기천공된다. 약물 선택은 표준 방법을 사용하여 수행되고, 개별 클론은 내부 및 외부 PCR, TLA 시퀀싱 또는 게놈 와이드 시퀀싱에 의해 스크리닝되어 부위 특이적 통합을 확인한다. 40XY g-밴드 핵형 분석을 위해 양성 클론을 추가로 스크리닝하고, 표준 배반포 주입에 의해 키메라를 주입하고, 가임신 암컷에게 전달한다. 통합을 확인하기 위해 하기 기술: PCR, 써던 블롯, TLA 시퀀싱 또는 게놈 와이드 시퀀싱 중 임의의 것에 의해 새끼의 유전자형을 분석하여 통합을 확인한다. 자손은 이형접합성 또는 동형접합성으로 유지되고, 하류에서 사용하기 위해 관련 대립유전자와 이종교배시킨다.

[0102] *다양한 폴리클로날 항체 풀 생성을 위한 개선된 인간 이뮤노글로불린 로커스를 갖는 트랜스제닉 동물*

[0103] 또 다른 측면에서, 본 발명은 트랜스제닉 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로서, 그의 게놈에, 모두가 주어진 쇄에 대해 공통 리더 펩티드-코딩 서열을 공유하는 복수의 상이한 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 로커스를 포함하는 트랜스제닉 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스를 제공한다. 상기 동물은 또한 리더/V 유전자 세그먼트와 재배열하여 재배열된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 형성할 수 있는 D 유전자 세그먼트 (중쇄의 경우) 및 J 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다. 본 발명의 트랜스제닉 동물에서 인간 가변 영역 유전자 세그먼트는 전형적으로, 알로타입 변이체를 비롯한, 자연 발생 서열이지만, 조작된 서열이 또한 사용될 수 있다. 인간 가변 영역 유전자 세그먼트는 상응하는 비-인간 가변 영역 유전자 세그먼트의 로커스에 위치할 수 있거나, 또는 외인성 로커스에 위치할 수 있다. 본 발명의 트랜스제닉 동물은 인간 가변 영역 유전자 세그먼트의 전체 레퍼토리, 예컨대 인간 V 유전자 세그먼트, 또는 상기 세그먼트의 서브세트의 전체 레퍼토리를 포함할 수 있다.

[0104] 상기 동물은 가변 영역과 재배열하여 전장 항체 중쇄 및 경쇄를 형성할 수 있는 불변 영역 유전자 세그먼트를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 유전자 세그먼트는 인간 생식계열 기원의 것이고, 다른 실시양태에서, 불변 영역 유전자 세그먼트는 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 마우스 불변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 마우스에 대해 천연인 것이다. 완전 인간화 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 트랜스제닉 동물은 완전 인간 항체를 직접 생산하는 이점이 있으며, 상기 항체는 서열 변형 없이 인간 치료제로서 사용하기 위해 선택될 수 있다. 인간화 가변 영역 로커스 및 내인성 불변 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물은 인간 치료제로서의 사용을 위해 적합화되기 전에 인간 불변 영역을 도입하도록 변형되어야 하는 키메라 항체를 생산하지만, 항체 상의 내인성 불변 영역은 트랜스제닉 동물에서의 면역 반응 동안 더욱 효율적인 클래스 변환 및 친화성 성숙을 지시할 수 있다는 이점이 있다 (문헌 [Murphy *et al.* (2014) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 111:5153]).

[0105] 본 발명의 트랜스제닉 동물은 인간 불변 영역 유전자 세그먼트, 또는 상기 세그먼트의 서브세트, 예컨대, 오직 IgG 불변 영역 유전자 세그먼트의 전체 레퍼토리를 포함할 수 있다. 본 발명의 트랜스제닉 동물의 인간 불변 영역 유전자 세그먼트는 전형적으로, 알로타입 변이체를 비롯한, 자연 발생 서열이지만, 활성화 Fcɣ 수용체와 같은 특정 Fcɣ 수용체에의 결합을 증가 또는 감소시키도록 조작된 변이체와 같은 조작된 서열 또한 사용될 수 있다.

[0106] 본 발명의 트랜스제닉 동물은 임의적으로 인간 가변 영역 로커스 이외에도, 트랜스제닉 숙주 동물의 내인성 이

뮤노글로불린 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다. 상기 비-인간 유전자 세그먼트는 트랜스제닉 동물에서 그의 본래 배향으로 있을 수 있고, 우선적으로 불활성화되거나, 또는 침묵할 수 있거나, 또는 그의 기능을 손상시키도록 역전될 수 있다 (문헌 [Lee *et al.* (2014) *Nat. Biotechnol.* 32:356]).

[0107] *본 발명의 트랜스제닉 동물을 사용하여 항체를 생성하는 방법*

[0108] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 동물을 사용하여 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 갖는 복수의 중쇄 및/또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트르를 포함하는 인간 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 이뮤노글로불린 로커스를 포함하는 본 발명의 트랜스제닉 동물을 관련 기술분야에 공지된 면역화 프로토콜에 따라 관심 항원으로 면역화시킬 수 있다 (문헌 [Chen & Murawsky (2018) *Front. Immunol.* 9:460]; [Asensio *et al.* (2019) *mAbs* 11:870]). 예를 들어, 단백질 항원은 가용성 단백질로서, 세포 표면 상에 발현된 펩티드 단편으로서, DNA 발현 구축물로서, 또는 상기의 시리즈 또는 조합으로서 제공될 수 있다. 항원은 1회 또는 연속 투여로, 예컨대 , 프라임 및 부스트 프로토콜 하에, 예컨대 , 4주 동안 매주 다회에 걸친 주사를 통해, 또는 12주 동안 매 4주마다 1회 주사를 통해 제공될 수 있다. 항원은, 예를 들어, 피하로 (예를 들어, 마우스 발바닥 또는 꼬리 기저부로) 또는 복강내로 투여될 수 있다. 항원은 아주반트, 예컨대 알룸, 완전 프로인트 아주반트 (CFA), 세픽 몬타니드(Seppic Montanide) ISA50, 또는 알히드로겔/뮤라밀 디펩티드 (ALD/MDP)와 함께, 또는 그의 부재 하에서 투여될 수 있다.

[0109] 항체 역가 상승 및 친화성 성숙을 위해 적절한 간격 후, 하이브리도마 형성 및 바람직한 특성을 갖는 항체를 생산하는 클론에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 시퀀싱, 또는 단일 B 세포 항체 클로닝 및 시퀀싱과 같은 통상적인 수단에 의해 마우스로부터 항체 서열을 수득한다.

[0110] 항체 인간에서 치료용으로 사용되는 것으로 의도되고, 동물-유래 불변 도메인 서열을 갖는 키메라 항체를 생산하는 마우스와 같은 동물에서 제조되었다면, 이때 인간 가변 도메인은 인간 불변 도메인 서열을 제공하는 구축물로 리포맷된다.

[0111] *본 발명의 트랜스제닉 동물을 사용항 제조된 항체*

[0112] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 동물을 생성하는 방법을 사용항 제조된 항체를 제공한다. 본 발명의 인간 항체는 가변 영역 및 불변 영역 둘 다에서 인간화된 이뮤노글로불린 로커스를 포함하여 직접 완전 인간 항체를 제공하는 트랜스제닉 동물로부터, 또는 오직 가변 영역에서만 인간화되어, 인간 치료제로서 사용하고자 하는 경우, 불변 영역이 인간 불변 영역으로 대체될 수 있는 키메라 인간/동물 항체를 제공하는 트랜스제닉 동물에서 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수득될 수 있다.

[0113] 본 발명의 트랜스제닉 동물의 면역화에 의해 수득된 항체는 초기에 상이한 서열의 폴리클로날 항체 풀을 포함할 것이며, 이로부터 개별 항체는 원하는 특성에 대해 선택될 수 있다. 본 발명의 폴리클로날 항체 풀은 각 V 유전자 세그먼트와 회합된 천연 리더 펩티드-코딩 서열을 갖는 종래 트랜스제닉 인간화 이뮤노글로불린 마우스로부터 수득된 항체 풀보다 더욱 다양한 V 유전자 세그먼트로부터 유래되고/거나, 임의의 주어진 상이한 V 유전자 세그먼트 세트로부터 더 균일하게 유래된 개별 항체를 포함할 것이다. 항체는 항체의 의도된 용도에 따라 다수의 원하는 특성 또는 특성의 조합에 대해 선택될 수 있다.

[0114] 증가된 V 유전자 사용량 및 회수는 증가된 서열 다양성을 제공하며, 이로써, 안정성, 개발가능성 및 생산 수율에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 서열 책임 없이 항체의 선택을 가능하게 한다. 예를 들어, 항체 안정성 및 균질성은 글리코실화 (예를 들어, N-x-S/T 및 N-x-C), 탈아미드화 (예를 들어, NG 및 NS 모티프), 이성질체화 (예를 들어, DG 및 DS 모티프) 및 산화 (예를 들어, W, F, M 또는 C 잔기)에 민감한 것으로 알려진 서열이 없는 항체를 선택함으로써 개선될 수 있다 (문헌 [Lu *et al.* (2019) *MAbs* 11:45]). 비록 상기 서열 책임은 선택되기보다는 항체로부터 조작될 수 있지만, 그러한 서열 변형은 항원 결합을 방해할 수 있고, 시험되어야 한다.

[0115] 증가된 V 유전자 사용량이 또한 에피토프 다양성을 개선시킬 수 있고, 즉, 항체의 발견 대상이 되는 항원에 대한 다양한 상이한 로커스를 증가시킬 수 있다. 증가된 에피토프 다양성을 통해 높은 친화성, pH 감수성 결합, 종 교차 반응성, 관련 항원 서열에 대한 교차 반응성, 특이적 결합 파트너 차단에 대한 특이성, 2개 이상의 결합 파트너의 결합 차단 능력, 하나 이상의 결합 파트너의 결합을 차단하지 않고 결합할 수 있는 능력 (소위 "비차단" 항체), 세포 표면에 발현될 때의 항원에의 결합, 막횡단 신호전달을 일으키지 않고 세포 표면 상의 항원에의 결합, 최대 막횡단 신호전달을 일으키면서, 세포 표면 상의 항원에의 결합, 제2 항-항원 항체와 동시에 항원에의 결합, 변성된 항원에의 결합, 조직 절편에서 항원에의 결합 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 개선된 특성을 갖는 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 인간 및 동물 항원에 대한 교차 반응성은 항체가 상기 동물

중 독성학 모델에서 직접 사용될 수 있기 때문에 치료 항체에 유용할 것이다. 비차단 항체는 치료 메카니즘이 결합 파트너에 대한 감소된 결합을 필요로 하지 않거나, 배제할 때, 치료 적용에 사용될 수 있다. 세포 표면 상의 항원에 결합할 수 있는 항체는 세포독성 페이로드 또는 막횡단 신호전달과 같이, 결합을 필요로 하는 치료 방법에 필요할 수 있다. 변성된 항원, 플레이트에 침착된 항원에 결합할 수 있거나, 또는 다른 항-항원 항체와 동일한 시점에 결합할 수 있는 항체는 ELISA, 면역조직화학법 (IHC) 및 유세포 분석법과 같은 다양한 검정법에서 사용될 수 있다. 단 하나의 상호작용만을 특이적으로 차단하는 항체, 또는 둘 이상의 상호작용을 차단하는 항체는 특정 차단 패턴이 메카니즘적으로 선호되는 치료 맥락에서 사용을 찾을 수 있다.

[0116] *본 발명의 트랜스제닉 동물을 사용하여 제조된 항체를 사용하는 치료 방법*

[0117] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 동물을 사용하여 수득된 치료 항체를 사용하는, 예를 들어, 인간 질환의 치료 방법을 제공한다. 치료 표적에 대해 생성된 본 발명의 항체는 상기 표적과 연관된 상응하는 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 염증성 시토카인을 사용하여 자가면역 및 염증성 장애를 치료하는데 사용될 수 있는 길항제 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Singh *et al.* (2018) *Curr. Clin. Pharmacol.* 13:85]을 참조한다. 상기 표적은 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-13, IL-12 (p40 서브유닛), IL-17, IL-23 (p19 서브유닛), TNF-α 또는 그의 수용체 중 임의의 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 전형적으로 종양에 대한 면역 반응의 매개에 수반되는 세포 표면 수용체인 면역 종양학 표적은 암 치료에 사용될 수 있는 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 상기 표적은 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, TIGIT, ICOS, CD27, KIRm 4-1BB (CD137), OX40 (CD134) 및 CD96을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 종양 항원 및 종양 특이적 세포 표면 마커를 사용하여 암 치료에 사용될 수 있는 항체를 생성할 수도 있다. 상기 표적은 HER-2, EGFR, VEGF, VEGFR2, 푸코실-GM1, 메조텔린, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD52 및 SLAMF7을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0118] 본 개시내용의 면역요법 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 두부경부암, 유방암, 폐암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 신장암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 결장암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 혈액 악성종양, 소아 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추신경계 (CNS) 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평 세포암, 석면에 의해 유도된 암을 포함하는 환경적으로 유도된 암, 전이성 암, 및 상기 암의 임의 조합을 포함한다.

[0119] 다른 암은, 예를 들어, 다발성 골수종, B 세포 림프종, 호지킨 림프종/원발성 종격동 B 세포 림프종, 비호지킨 림프종, 급성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 여포성 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 면역아세포성 대세포 림프종, 전구 B-림프아구성 림프종, 외투 세포 림프종, 급성 림프아구성 백혈병, 균상식육종, 역형성 대세포 림프종, T 세포 림프종 및 전구 T-림프아구성 림프종을 비롯한, 혈액 악성종양, 및 상기 암의 임의 조합을 포함한다.

[0120] *동일한 리더 펩티드-코딩 서열이 선행하는 복수의 인간 V 유전자 세그먼트를 포함하는 폴리뉴클레오티드*

[0121] 또 다른 측면에서, 본 발명은 복수의 (즉, 2개 이상의) 인간 중쇄 또는 경쇄 리더/V 유전자 세그먼트를 포함하는 폴리뉴클레오티드, 전형적으로, DNA 구축물로서, 여기서 각각의 리더/V 유전자 세그먼트는 동일한 리더 펩티드-코딩 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 D 유전자 세그먼트 (중쇄 가변 영역 구축물의 경우) 및 하나 이상의 J 유전자 세그먼트를 추가로 포함하는 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 수 있다. 중쇄 가변 영역 로커스는 하나 이상의 인간 불변 영역 유전자 세그먼트, 예컨대 인간 IgG 유전자 세그먼트, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 추가로 포함하는 훨씬 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 수 있다. 경쇄 가변 영역 로커스는 하나 이상의 인간 불변 영역 유전자 세그먼트, 예컨대 인간 κ 또는 λ 경쇄 불변 영역 서열을 추가로 포함하는 훨씬 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 수 있다.

[0122] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 하기 실시예는 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에서 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에서 참조로 명백하게 포함된다.

[0123] 실시예 1

[0124] *최적 리더 펩티드-코딩 서열의 선택*

[0125] 본 발명의 방법, 구축물 및 동물에 사용하기 위한 최적 리더 펩티드 서열, 및 최적 리더 펩티드-코딩 서열의 선택은 하기와 같이 선택하였다. 간략하면, 잠재적 리더 펩티드 서열의 초기 패널은 모든 리더 서열 군 내의 서열의 보존 및 컨센서스, 인간 항체 레퍼토리에서의 빈도 및 용도에 기반하여, 및 초기 패널 간의 서열 다양성을 최대화하기 위해 선택하였다. 아미노산 및 DNA 서열 둘 다가 또한 일반적으로 인간 항체 레퍼토리에서, 및 승인받은 항체 약물에서의 그의 보급률에 기반하여, 상기 선택은 생물학적으로 바람직하고, 상업적인 항체 생산 세포주 및 방법에 맞게 적합화될 수 있고, 인간 치료제에 사용될 수 있는 서열을 제안한다는 것에 근거하여 순위화하였다. 이어서, 상기 리더 펩티드 패널을 상기 목적을 위해 자주 사용되는 오스테오넥틴 (서열식별번호: 117)을 비롯한 대조군 리더와 함께 중쇄 및 경쇄 리더 조합의 쌍별 평가에 의해 재조합 단백질 발현의 효율성에 대해 평가하였다. 본 발명자들은 상기 초기 평가를 통해 차선의 리더를 제외시키고, 시험관내 발현에 충분한 리더 후보를 선택할 수 있었다. 패널 중 중쇄 및 경쇄 리더 서열의 선택된 쌍별 조합을 사용하여 각각 중쇄 및 경쇄의 발현을 구동시킴으로써 2개의 예시적인 항체의 발현을 결정하였다. 결과에 따르면, 비록 일부 리더는 매우 불량했지만, 대부분의 리더는 오스테오넥틴 리더 서열 이상으로 적절한 발현을 지원한다. 시험관내 발현에 대해 우수한 성능을 보이는 공통 리더 세트를 선택하는 이점은 재조합 벡터에서 공통 리더를 사용하는데 있어서 그리고 중쇄 및 경쇄 서열의 전사 활성 폴리머라제 연쇄 반응 증폭에 직접 사용하여 리드 항체 후보를 동물로부터 직접 스크리닝하는데 전략적 유연성을 가능하게 함으로써 범용 서열 회수 전략법을 하류의 기능 스크리닝 전략법을 통합할 수 있게 한다는 점이다. 이점으로는 오스테오넥틴보다 잠재적으로 개선된 발현, 동물로부터, 서열 회수를 개선시킬 수 있는 시험관내 세팅으로 옮기는 단순화된 분자 생물학 전략법, 및 자동화를 위해 프로세스를 스케일링할 수 있는 능력을 포함한다.

[0126] 리더 패널은 시험관내 발현에 의한 초기 기능 스크리닝에 따라 추가로 정련되었다. 상기 기준은 트랜스제닉 구축물에의 포함을 위해 다중 가변 유전자 간의 조작을 수용하는지 여부를 결정하기 위해 게놈 서열의 복잡성 및 길이 평가를 포함하였다. 엑솜 블라스트를 통해 프라이머 디자인에 사용된 서열이 마우스 전사체 전체에 걸쳐 고유하고, 특이성을 뒷받침한다는 것을 확인하였다. 재조합 세팅에서의 기능적 책임은 고가치 리더에 대한 기준을 추가로 정련하기 위해 고려되었다. 예를 들어, 리더 서열은 또한 그가 크립틱 번역 시작 부위로서 사용되는 것을 막기 위해, IGKV 1-9 (서열식별번호: 97) 및 IGKV 1-39 (서열식별번호: 104)와 같은 하류 메티오닌 잔기를 포함할 경우에는 제거하였다.

[0127] 추가로, 리더 펩티드-코딩 서열과 함께 사용하기 위한 잠재적 증폭 프라이머의 서열은 고성능 PCR 전략법을 디자인할 수 있는 능력에 영향을 미칠 수 있는 비바람직한 2차 구조 및 서열 책임에 대해 분석하였다. 이는 리더의 3' 영역 근처의 가변 도메인 프레임워크에 바로 인접한 프라이머 서열을 포함하였으며, 상기 영역은 더 많은 5' 영역이 시퀀싱에 의해 분석되는 더 긴 서열을 생성하기 때문에, 전장 가변 도메인 시퀀싱을 지원하기 위한 전략적 영역이다.

[0128] 상기 고려사항에 기반하여, 서열식별번호: 112를 코딩하는, IGKV 3-20 (서열식별번호: 49 및 137)에 대한 경쇄 리더 펩티드-코딩 서열과 같이, 중쇄의 경우, 서열식별번호: 86을 코딩하는, IGHV 3-23 (서열식별번호: 16 및 136)에 대한 중쇄 리더 펩티드-코딩 서열을 본 발명의 방법, 구축물 및 마우스에서 선택하였다. 바람직한 실시양태에서, IGHV 3-23 (서열식별번호: 136) 및 IGKV 3-20 (서열식별번호: 137)의 게놈 리더 펩티드-코딩 서열이 각각 중쇄 및 경쇄 V 유전자 세그먼트에 대해 사용된다. 비록 상기 서열이 본원에 제공된 기준에 기반하여 최적인 것으로 결정되기는 하였지만, 어떠한 특정 서열이 선택되는지와는 상관없이, 동일한 리더 펩티드-코딩 서열의 사용이 본질적으로 유익하기 때문에, 본 발명의 방법, 구축물 및 마우스에서 다른 서열도 사용될 수 있다.

[0129] 실시예 2

[0130] *중쇄 및 경쇄 V 유전자 세그먼트의 선택*

[0131] 본 발명의 방법 및 마우스에서 사용하기 위한 V 유전자 세그먼트는 하기와 같이 선택하였다. 간략하면, 중쇄 및 경쇄 둘 다에 대한 V 유전자 세그먼트는 일반적으로 인간 항체 레퍼토리에서, I상 임상 시험에 진입한 항체 치료제에서, 및 승인받은 항체 약물에서의 그의 보급률에 기반하여 선택하였다. 이를 또한 메티오닌 (특히 CDR에서) 또는 쌍을 형성하지 않은 시스테인의 존재와 같은 화학적 책임, 및 DG 및 NG와 같은 서열 책임, 글리코실화 부위의 존재, 및 실험적으로 관찰되면서 또한 (예를 들어, EPIVAX® 면역원성 평가 소프트웨어 (미국 로드아일랜드주 프로비던스 소재의 에피박스 인크.(EpiVax Inc.))에 의해) 컴퓨터상으로 예측되는 면역원성에 대해서도 평가하였다.

[0132] 상기 인자를 고려하고, 균형을 맞춘 후, 중쇄 가변 도메인 로커스에 대해 하기 19개의 V 유전자 세그먼트

(hIGHV)를 선택하였다: 3-23; 5-51; 3-7; 1-2; 1-69-1; 3-48; 1-18; 1-46; 3-21; 3-30; 3-74; 4-39; 3-9; 2-5; 1-3; 4-4; 7-4-1; 3-66; 및 1-24. 경쇄 가변 도메인 로커스에 대해 하기 17개의 V 유전자 세그먼트(hIGKV)를 선택하였다: 1-39; 3-11; 1-33; 3-20; 4-1; 1-27; 1-5; 1-16; 1-12; 2-30; 3-15; 2-28; 1D-13; 1-17; 6-21; 1-9; 및 1D-43.

[0133] 공통 리더의 IGH 및 IGK 가변 유전자로의 조작은 기능성 가변 도메인 유전자가 가변적이지만, 적당한 길이의 인트론 및 제2 엑손 중 생식계열 리더 말단에 의해 분리된 두 엑손이라는 관찰에 의해 해결되었다. 이는 엑손 1의 ATG에서부터 엑손 2의 공통 리더의 말단까지의 공통 리더에 대한 생식계열 DNA 서열을 포함함으로써 모든 가변 유전자에 대한 트랜스진 디자인에 대한 범용 접근법을 가능하게 했다. 범용 전략법은 각각의 가변 도메인 유전자는 인트론 간의 역기능적 스플라이싱과 같은 기능적 책임을 도입하지 않거나, 또는 가변 도메인 유전자의 발현에 부정적인 영향을 미치지 않으면서, 성공적으로 디자인될 수 있다록 보장한다.

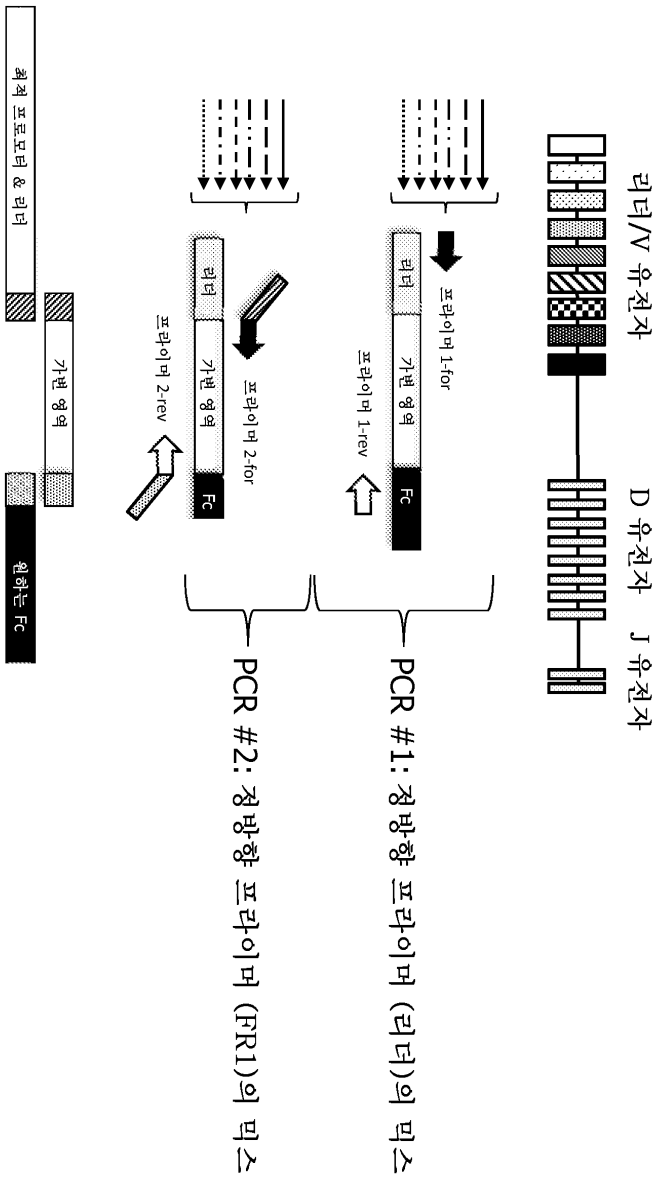
[0134] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에서 명백하게 참조로 포함된다.

[0135] 등가물:

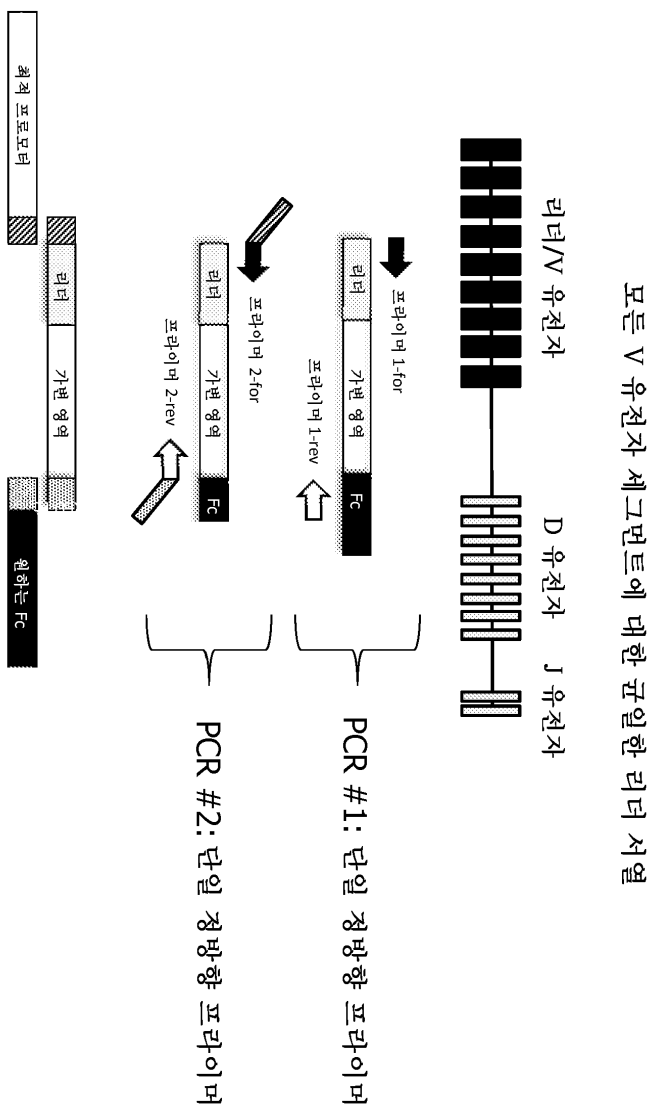
[0136] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 통상의 실험만을 이용하여 본원에 개시된 구체적인 실시양태의 다수의 등가물을 인식하거나, 또는 확인할 수 있을 것이다. 상기 등가물은 하기 청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1


리더/V 유전자
D 유전자
J 유전자
PCR #1: 정방향 프라이머 (리더)의 믹스
PCR #2: 정방향 프라이머 (FR1)의 믹스
리더
가변 영역
Fc
프라이머 1-for
프라이머 1-rev
프라이머 2-for
프라이머 2-rev
최적 프로모터 & 리더
가변 영역
원하는 Fc

도면2



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> BCR TRANSGENIC MICE WITH A COMMON LEADER SEQUENCE

<130> 13330-WO-PCT

<150> 62/949,707

<151> 2019-12-18

<160> 137

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggactgga cctggaggat cctcttttttg gtggcagcag ccacaggtgc ccactcc 57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcc 57

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggactgca cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgcc 57

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag tcacagatgc ctactcc 57

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccaggtgc tcactcc 57

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggactgga tttggaggat cctcttcttg gtgggagcag cgacaggtgc ccactcc 57

<210> 8

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggactgga cctggaggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcc 57

<210> 9

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggacacac tttgctacac actcctgctg ctgaccaccc cttcctgggt cttgtcc 57

<210> 10

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atggacatac tttgttccac gctcctgcta ctgactgtcc cgtcctgggt cttatcc 57

<210> 11

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggagttgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgt 57

<210> 12

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatta taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 13

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgctattt taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 14

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 15

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgt 57

<210> 16

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 17

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atggagtttg ggctgagctg ggtttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtcc 57

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgt 57

<210> 20

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgt 57

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggagtttg ggcttagctg ggttttcctt gttgctattt taaaaggtgt ccaatgt 57

<210> 22

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggagtttt ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt caaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 23

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt ttaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 24

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgttattt tacaaggtgt ccagtgt 57

<210> 25

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcc 57

<210> 26

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcc 57

<210> 27

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcc 57

<210> 28

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgaaacatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcc 57

<210> 29

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

atggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgcc 57

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

atgtctgtct ccttcctcat cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgtcctgtca 60

<210> 31

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

aaatgt 66

<210> 32

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggctcccagg tgccagatgt 60

<210> 34

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 34

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggttcc 60

agatgc 66

<210> 35

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

atggacatga gagtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 36

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 37

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

atggacatga gggtccctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc 60

agatgt 66

<210> 38

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

atggacatga gggtccctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ctcaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 39

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 40

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 41

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 41

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctac tgctctgggt cccaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 42

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atggacatga gggtgcccgc tcagcgcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

agatgt 66

<210> 43

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgaggctcc ttgctcagct tctggggctg ctaatgctct gggtccctgg atccagtggg 60

<210> 44

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggtctctgg atccagtggg 60

<210> 45

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatccctgg atccagtgcg 60

<210> 46

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggtcccagg atccagtggg 60

<210> 47

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

<210> 48

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60

<210> 49

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

<210> 50

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

atggaaccat ggaagcccca gcacagcttc ttcttcctcc tgctactctg gctcccagat 60

accaccgga 69

<210> 51

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60

<210> 52

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

atggggtccc aggttcacct cctcagcttc ctcctccttt ggatctctga taccagggca 60

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggt 57

<210> 54

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

atgagggctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccctcgc a 51

<210> 55

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt ttagaggtgt ccagtgt 57

<210> 56

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

atgggggtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatg 75

<210> 57

<211> 48

<212> DNA

<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 57

atgaagtgcc ttttgtactt agccttttta ttcattgggg tgaattgc 48

<210> 58

<211> 63

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 58

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gac 63

<210> 59

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccacag ccaccggtgt ccattct 57

<210> 60

<211> 48

<212> DNA

<213> Bombyx mori

<400> 60

atgaagccta tatttttggt attactcgtc gttacaagcg cctacgct 48

<210> 61

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ariticfically created leader peptide sequence; Barash et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 294: 835

<400> 61

atgtggtggc gcctgtggtg gctgctgctg ctgctgctgc tgctgtggcc catggtgtgg 60

gcc 63

<210

> 62

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

atgccgctgc tgctactgct gcccctgctg tgggcagggg ccctggctat g 51

<210> 63

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccagc 69

<210> 64

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

atggctttcc tctggctcct ctcctgctgg gccctcctgg gtaccacctt cggc 54

<210> 65

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

atgaatctac ttctgatcct tacctttgtt gcagctgctg ttgct 45

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60

<210> 67

<211> 51

<212> DNA

<213> Gaussia princeps

<400> 67

atgggagtga aagttctttt tgcccttatt tgtattgctg tggccgaggc c 51

<210> 68

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttcc 54

<210> 69

<211> 48

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 69

atgaagacca tcattgcttt gagctacatt ttctgtctgg ttctcggc 48

<210> 70

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac 60

ccagccgcag cc 72

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 73

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 74

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 75

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Val Thr Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Ser

<210> 76

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Met Asp Thr Leu Cys Tyr Thr Leu Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Met Asp Ile Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 83

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 84

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 86

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 89

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 90

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Met Glu Phe Trp Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ser Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 91

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Phe Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Val Ile Leu Gln Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 93

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 94

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly

1 5 10 15

Val Cys Ala

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

1 5 10 15

Gly Val Leu Ser

20

<210> 96

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Lys Cys

20

<210> 97

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys

20

<210> 99

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 100

<211> 22

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 102

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys

20

<210> 103

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys

20

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys

20

<210> 105

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Val Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Met Arg Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly
20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly
20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15
Gly Ser Ser Ala
20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

110

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly
20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 113

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Met Glu Pro Trp Lys Pro Gln His Ser Phe Phe Phe Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly

20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 115

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Met Gly Ser Gln Val His Leu Leu Ser Phe Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Asp Thr Arg Ala
20

<210> 116

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 118

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

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

<210> 119

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met
20 25

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 120

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

<210> 121

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 121

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp
20

<210> 122

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 123

<211> 16

<212> PRT

<213> Bombyx mori

<400> 123

Met Lys Pro Ile Phe Leu Val Leu Leu Val Val Thr Ser Ala Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 124

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ariticfically created leader peptide sequence; Barash et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 294: 835

<400> 124

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala

20

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met

<210> 126

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser

20

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Met Ala Phe Leu Trp Leu Leu Ser Cys Trp Ala Leu Leu Gly Thr Thr

1 5 10 15

Phe Gly

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Asn Leu Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Val Ala

1 5 10 15

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Gaussia princeps

<400> 130

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

Ala

<210> 131

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 132

<211> 16

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 132

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Leu Gly

1 5 10 15

<210> 133

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala

20

<210> 134

<211> 78

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 134

atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tcctcctgct ggtggcggct 60

cccagatggg tcctgtcc 78

<210> 135

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser

20 25

<210> 136

<211> 160

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 136

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtaa ttcatggaga 60

aatagaaaaa ttgagtgtga atggataaga gtgagagaaa cagtggatac gtgtggcagt 120

ttctgaccag ggtttctttt tgtttgcagg tgtccagtgt 160

<210> 137

<211> 247

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccagg tgaggggaac 60

atgggatggt tttgcatgtc agtgaaaacc ctctcaagtc ctgttacctg gcaactctgc 120

tcagtcaata caataattaa agctcaatat aaagcaataa ttctggctct tctgggaaga 180

caatgggttt gatttagatt acatgggtga cttttctgtt ttatttccaa tctcagatac 240

caccgga 247