



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월20일

(11) 등록번호 10-1991234

(24) 등록일자 2019년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/85 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7002870(분할)

(22) 출원일자(국제) 2011년06월22일

심사청구일자 2019년02월27일

(85) 번역문제출일자 2019년01월29일

(65) 공개번호 10-2019-0014576

(43) 공개일자 2019년02월12일

(62) 원출원 특허 10-2013-7001586

원출원일자(국제) 2011년06월22일

심사청구일자 2016년06월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/041366

(87) 국제공개번호 WO 2011/163311

국제공개일자 2011년12월29일

(30) 우선권주장

61/357,314 2010년06월22일 미국(US)

61/357,317 2010년06월22일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010039900 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 박영관

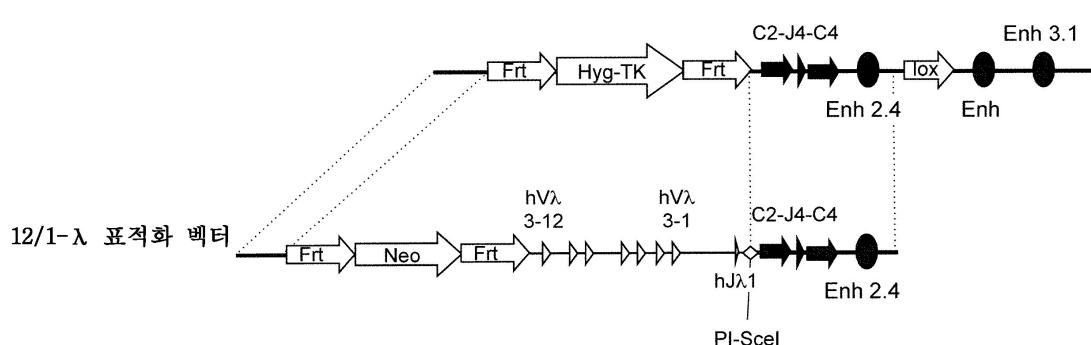
(54) 발명의 명칭 사람 람다 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 경쇄를 발현하는 마우스

(57) 요약

사람 λ 가변(hVλ) 서열을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스, 및 전이유전자 또는 에피솜으로부터 hVλ 서열을 발현하는 마우스(여기서, 상기 hVλ 서열은 마우스 불변 서열과 연결되어 있다)를 포함한다. 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 유용한 체세포적으로 돌연변이된 사람 λ 가변 서열의 공급원인 마우스가 제공된다. 사람 항체를 포함하여, 사람 λ 가변 서열을 포함하는 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대 표 도

불활성화된 마우스 λ 경쇄 유전자좌



(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

A01K 2217/07 (2013.01)

A01K 2267/0325 (2013.01)

(72) 발명자

규례르 케이건

미국 뉴욕주 10595 발할라 파멜라 레인 8

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕주 10520 크로톤-온-헤드슨 뉴턴 코트 10

호시아와 캐롤리나 에이.

미국 뉴욕주 10591 태리타운 세컨드 플로어 쳐치

스트리트 14

(56) 선행기술조사문헌

WO2011004192 A1

JP2005510253 A

WO2000026373 A1

The Journal of Experimental Medicine, vol. 189(10) pp.1611-1619(1999.05.17.)

WO2009143472 A2

JP04500911 A

KR1020050042792 A

명세서

청구범위

청구항 1

유전적으로 변형된 마우스로서, 상기 마우스의 생식선(germline) 계놈이:

- (a) 내인성 마우스 $C\lambda$ 유전자에 작동적으로 연결된 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절; 및
- (b) 내인성 마우스 $C\kappa$ 유전자에 작동적으로 연결된 하나 이상의 사람 $V\kappa$ 유전자 분절 및 하나 이상의 사람 $J\kappa$ 유전자 분절을 포함하고,

상기 마우스가 B 세포의 집단을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 B 세포가 마우스 λ 불변 도메인에 연결된 사람 λ 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하고, 적어도 하나의 B 세포가 마우스 κ 불변 도메인에 연결된 사람 κ 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 B 세포의 집단이 마우스 중쇄 불변 도메인에 연결된 사람 중쇄 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 발현하도록, 내인성 마우스 중쇄 불변 영역 유전자에 작동적으로 연결된 하나 이상의 사람 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 사람 D_H 유전자 분절, 및 하나 이상의 사람 J_H 유전자 분절을 추가로 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절이 적어도 12개의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 적어도 12개의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절이 사람 $V\lambda 3-1$, $V\lambda 4-3$, $V\lambda 2-8$, $V\lambda 3-9$, $V\lambda 3-10$, $V\lambda 2-11$ 및 $V\lambda 3-12$ 를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절이 적어도 28개의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적어도 28개의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절이 $V\lambda 2-14$, $V\lambda 3-16$, $V\lambda 2-18$, $V\lambda 3-19$, $V\lambda 3-21$, $V\lambda 3-22$, $V\lambda 2-23$, $V\lambda 3-25$ 및 $V\lambda 3-27$ 을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 적어도 28개의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절이 $V\lambda 5-52$, $V\lambda 1-51$, $V\lambda 9-49$, $V\lambda 1-47$, $V\lambda 7-46$, $V\lambda 5-45$, $V\lambda 1-44$, $V\lambda 7-43$ 및 $V\lambda 1-40$ 을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절이 사람 $J\lambda 1$ 유전자 분절을 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절이 4개의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절을

포함하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 4개의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절이 $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ 및 $J\lambda 7$ 인, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 마우스는, 재배열시켜 재배열된 경쇄 κ 가변 영역 서열을 형성하는 데에 기능성인 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절 및 마우스 $J\kappa$ 유전자 분절이 결여되어 있는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절이 내인성 마우스 $V\lambda$ 유전자 분절 및 내인성 마우스 $J\lambda$ 유전자 분절을 대체하는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 내인성 마우스 $C\lambda$ 유전자가 내인성 λ 유전자좌에 있는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 내인성 마우스 $C\kappa$ 유전자가 내인성 κ 유전자좌에 있는, 유전적으로 변형된 마우스.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 내인성 마우스 $C\lambda$ 유전자가 내인성 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 마우스 $C\kappa$ 유전자가 내인성 κ 유전자좌에 있는, 유전적으로 변형된 마우스.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

유전적으로 변형된 마우스는, 마우스 또는 사람 경쇄 불변 영역(λ 또는 카파(κ))과 작동적으로 연결된 마우스 또는 사람 람다 가변($V\lambda$) 경쇄 서열을 포함한다. 유전적으로 변형된 마우스는 사람 람다 가변($hV\lambda$) 유전자 분절 및 사람 람다 $J(hJ\lambda)$ 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인, 및 마우스 경쇄 불변(C_L) 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 에피토프-결합 단백질을 발현한다. 유전적으로 변형된 마우스는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 재배열되지 않은 면역글로불린 람다(λ) 경쇄 가변 핵산 서열을 포함한다. 마우스는 내인성 마우스 경쇄 가변 영역 유전자 분절이 모두 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 $hJ\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함하는 내인성 경쇄 유전자좌 기원의 키메라 사람 λ /마우스 C_L 경쇄를 재배열하고 발현할 수 있다. 체세포적으로 돌연변이된 항체는 $hV\lambda$ 도메인 및 마우스 C_L 도메인을 포함한다.

배경 기술

[0002]

완전히 사람, 또는 부분적으로 사람 및 부분적으로 마우스인 항체를 발현하는 마우스는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 사람 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 가변 영역 유전자를 함유하는 전이유전자로부터 완전한 사람 항체를 발현하는 형질전환 마우스가 보고되었다. 내인성 마우스 중쇄 가변 영역(HCVR) 유전자 분절 및 카파(κ) 경쇄 가변 영역(LCVR) 유전자 분절이 사람 HCVR 및 LCVR 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 키메라 사람/마우스 카파 쇄를 갖는 키메라 항체를 생성하는 유전적으로 변형된 마우스가 널리 공지되어 있다.

[0003]

항체 경쇄는 2개의 별개의 유전자좌: 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나에 의해 암호화된다. 마우스 항체 경쇄는 주로 κ 형으로 되어 있다. 사람에서 κ 대 λ 경쇄 사용 비율은 약 60:40인 반면 마우스에서는 약 95:5이다. 마우스에서 κ 경쇄의 편중된 사용은 완전 또는 부분적 사람 항체를 발현할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스에서 유지되는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 완전하거나 부분적인 사람 항체를 발현하는 마우스는 람다 가변 사용에 제한되어 있는 것으로 나타난다.

[0004] 당업계에서는 마우스든 사람이든 에피토프-결합 단백질을 생성시키는데 사용하기 위해서는 람다 가변 영역을 생성할 필요가 있다. 당업계에서는 증가된 람다 가변($V\lambda$) 사용을 나타내면서, 완전하거나 부분적인 사람 항체를 발현하는 마우스가 요구된다.

[0005] 당업계에서는 마우스가 증가된 λ 가변($V\lambda$) 사용을 나타내는, 완전 또는 부분적 사람 항체를 발현하는 마우스가 요구된다.

발명의 내용

[0006] 요약

[0007] 유전적으로 변형된 마우스, 배아, 세포, 조직, 및 마우스를 변형시키기 위한 핵산 작제물, 이들을 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 카파(κ) 경쇄와 관련된 람다(λ) 가변 영역(사람 또는 비사람)을 생성하는 마우스 및 세포가 제공된다. 예를 들어, 내인성 마우스 경쇄 유전자좌 기원의 κ 또는 λ 경쇄와 관련된 사람 λ 가변 영역을 생성하는 마우스 및 세포가 또한 제공된다. 또한, 람다 가변 영역을 포함하는 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 동족 람다 가변 영역과 함께 발현하는 중쇄를 선별하는 방법이 또한 제공된다.

[0008] 키메라 및 사람 항원-결합 단백질(예를 들어, 항체) 및 이들을 암호화하는 핵산이 제공되고, 이들은 체세포적으로 돌연변이된 가변 영역을 포함하고, 상기 항체는 마우스 경쇄 불변 도메인과 융합된 사람 $V\lambda$ 및 사람 $J\lambda$ 로부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 갖는 항체를 포함한다.

[0009] 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역을 포함하는 경쇄 상에 사람 λ 가변 영역 서열을 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, κ 불변 영역을 포함하는 경쇄상에 사람 λ 가변 영역 서열을 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 내인성 마우스 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 발현하는 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역 서열과 연결된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 마우스가 제공되고, 하나의 실시형태에서, 마우스 불변 영역 서열은 λ 불변 서열이고, 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 서열은 κ 불변 서열이다.

[0010] 하나의 양상에서, 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 가변 유전자 분절($hV\lambda$) 및 사람 λ 연결 유전자 분절($hJ\lambda$)을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 는 마우스 경쇄 유전자좌에 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 는 전이유전자 상에 있고, 사람 또는 마우스 불변 영역 서열에 작동적으로 연결되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 는 에피솜 상에 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 서열 및 $hJ\lambda$ 서열 및 마우스 경쇄 불변 영역(C_L) 핵산 서열로부터 유도된 경쇄를 포함하는 면역글로불린을 제조할 수 있다. 유전적으로 변형된 마우스를 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 또한 제공된다. (a) 마우스 중쇄 불변 영역과 융합된 사람 중쇄 가변 도메인(hV_H), 및 (b) 마우스 C_L 도메인과 융합된 사람 $V\lambda$ 를 포함하는 항체가 제공되고; 여기서, 하나 이상의 상기 가변 도메인이, 예를 들어, 본 발명의 마우스에서 항체 또는 면역 세포 선별 동안에 체세포적으로 돌연변이됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 는 사람 또는 마우스 κ 불변 영역(C_K)과 작동적으로 연결되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 는 사람 또는 마우스 λ 불변 영역($C\lambda$)과 작동적으로 연결되어 있다.

[0011] 하나의 양상에서, 생식선에서 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 사람 람다 가변 영역 서열은 마우스 면역글로불린 불변 영역 유전자 서열을 포함하는 경쇄에서 발현된다.

[0012] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 λ 유전자좌이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다.

[0013] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 내인성 경쇄 가변 서열이 결여되어 있다.

[0014] 하나의 실시형태에서, 모두 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 경쇄 가변 영역 유전자 분절은 하나 이상의 사람 λ 가변 영역 유전자 분절로 대체된다.

[0015] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 사람 $J\lambda$ 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서,

상기 사람 $J\lambda$ 서열은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0016] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 상기 사람 경쇄 유전자좌의 클러스터 A의 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 A의 단편은 $hV\lambda 3-27$ 로부터 $hV\lambda 3-1$ 을 통해 연장되어 있다.

[0017] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 상기 사람 경쇄 유전자좌의 클러스터 B의 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 B의 단편은 $hV\lambda 5-52$ 로부터 $hV\lambda 1-40$ 을 통해 연장되어 있다.

[0018] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 클러스터 A의 게놈 단편 및 클러스터 B의 게놈 단편을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 경쇄 가변 영역 서열은 클러스터 A의 하나 이상의 유전자 분절 및 클러스터 B의 하나 이상의 유전자 분절을 포함한다.

[0019] 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수(naive) 레퍼토리의 10% 이상은 $2-8, 2-23, 1-40, 5-45$, 및 $9-49$ 로부터 선택되는 2개 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수 레퍼토리의 20% 이상은 $2-8, 2-23, 1-40, 5-45$, 및 $9-49$ 로부터 선택되는 3개 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 마우스의 경쇄 순수 레퍼토리의 30% 이상은 $2-8, 2-23, 1-40, 5-45$, 및 $9-49$ 로부터 선택되는 4개 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절로부터 유도된다.

[0020] 하나의 양상에서, 마우스 불변 영역과 융합된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.

[0021] 하나의 실시형태에서, 상기 면역글로불린 경쇄는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌로부터 발현된다.

[0022] 하나의 양상에서, 마우스 κ 경쇄 불변 영역 서열과 연속성인 λ 경쇄 가변 영역 서열($V\lambda$) 및 하나 이상의 J 서열(J)을 포함하는 마우스가 제공된다.

[0023] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 기능성 마우스 $V\kappa$ 및/또는 마우스 $J\kappa$ 유전자 분절이 결여되어 있다.

[0024] 하나의 실시형태에서, 상기 $V\lambda$ 는 사람 $V\lambda(hV\lambda)$ 이고, 상기 J 는 사람 $J\lambda(hJ\lambda)$ 이다. 하나의 실시형태에서, 상기 $hV\lambda$ 및 상기 $hJ\lambda$ 는 재배열되지 않은 유전자 분절이다.

[0025] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 다수의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 다수의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절은 12개 이상의 유전자 분절, 28개 이상의 유전자 분절 또는 40개 이상의 유전자 분절이다.

[0026] 하나의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0027] 하나의 실시형태에서, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 전체적으로 또는 부분적으로 결실되어 있다.

[0028] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 κ 경쇄 불변 영역 서열은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 있다.

[0029] 하나의 실시형태에서, 마우스의 B 세포의 약 10% 내지 약 45%는 사람 λ 경쇄 가변($V\lambda$) 도메인 및 마우스 κ 경쇄 불변($C\kappa$) 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다.

[0030] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ 가변 도메인은 $3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7$ 및 $1-51/1$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 재배열된 $hV\lambda/hJ\lambda$ 서열로부터 유도된다.

[0031] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 κ 경쇄 유전자좌 기원의 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 $V\lambda$ 서열 및 J 서열과 연속성이다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 $V\lambda$ 서열과 J 서열 사이에 위치한다.

[0032] 하나의 양상에서, (a) 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 12개 이상 내지 40개 이상의 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 유전자 분절; (b) 상기 12개 이상 내지 40개 이상의 사람 경쇄 가변 영역 유전자 분절과 상기 하나 이상의 사람 $J\lambda$ 서열 사이에 위치된 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 서열을 포함하는 마우스가 제공되고; 여기서, 상기 마우스는 사람 $V\lambda$ 도메인 및 마우스 $C\kappa$ 도메인을 포함하는 경쇄를

포함하는 항체를 발현한다.

- [0033] 하나의 양상에서, λ 가변 서열 및 κ 불변 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 제공된다.
- [0034] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수로부터 수득된 미성숙 B 세포 집단은 약 1:1의 κ 사용 대 λ 사용 비율을 나타낸다.
- [0036] 하나의 양상에서, 마우스 C_L 유전자를 포함하는 마우스 경쇄 유전자좌에 연결된 재배열되지 않은 면역글로불린 V λ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.
- [0037] 하나의 실시형태에서, $V\lambda$ 및/또는 $J\lambda$ 유전자 분절은 사람 유전자 분절이다. 하나의 실시형태에서, 상기 $V\lambda$ 및/또는 $J\lambda$ 유전자 분절은 마우스 유전자 분절이고, 상기 C_L 은 마우스 $C\kappa$ 이다.
- [0038] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 λ 경쇄 유전자좌이다.
- [0039] 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에 있다.
- [0040] 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 전이유전자 상에 있다.
- [0041] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 중쇄 면역글로불린 유전자좌에서 하나 이상의 중쇄 V , D 및/또는 J 유전자 분절이 하나 이상의 사람 V , D 및/또는 J 유전자 분절로 대체됨을 추가로 포함한다.
- [0042] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 마우스 $C\kappa$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다.
- [0043] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 λ 경쇄 가변 유전자 분절($V\lambda$) 및 λ 연결 유전자 분절($J\lambda$)을 포함한다.
- [0044] 하나의 실시형태에서, 상기 경쇄 가변 유전자좌("V λ 유전자좌")는 하나 이상의 사람 $V\lambda$ ($hV\lambda$) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 사람 $J\lambda$ ($hJ\lambda$) 유전자 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, V_L 유전자좌는 4개 이하의 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 사람 λ 및 사람 κ 게놈 서열을 포함하는 연속 서열을 포함한다.
- [0045] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 가변 유전자좌("κ 유전자좌")는 하나 이상의 사람 $V\lambda$ ($hV\lambda$) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 하나 이상의 사람 $J\lambda$ ($hJ\lambda$) 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 4개 이하의 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 하나 이상의 $hV\lambda$ 및 하나 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함하고, 기능성 $V\kappa$ 영역 유전자 분절이 결여되어 있거나 실질적으로 결여되어 있고, 기능성 $J\kappa$ 영역 유전자 분절이 결여되어 있거나 실질적으로 결여되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 어떠한 기능성 $V\kappa$ 영역 유전자 분절도 포함하지 않는다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 어떠한 기능성 $J\kappa$ 영역 유전자 분절도 포함하지 않는다.
- [0046] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 가변 유전자좌("λ 유전자좌")는 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 유전자좌는 하나 이상의 사람 $J\lambda$ ($hJ\lambda$) 유전자 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 λ 유전자좌는 4개 이하의 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다.
- [0047] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 다수의 $hV\lambda$ 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 다수의 $hV\lambda$ 는 사람에서 관찰되는 $V\lambda$ 사용의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 이상을 반영하는 λ 경쇄 가변 영역 래퍼토리의 발현이 수득되도록 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 유전자 분절 $hV\lambda$ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0048] 하나의 실시형태에서, 상기 $hV\lambda$ 는 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 및 3-12를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 $V\lambda$ 3-12 내지 $V\lambda$ 3-1에 걸친 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 이상의 $hV\lambda$ 를 포함한다. 특정

실시형태에서, 상기 $hV\lambda$ 는 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 및 3-12를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 $V\lambda$ 3-12 내지 $V\lambda$ 3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0049] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 13개 내지 28개 이상의 $hV\lambda$ 를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 $hV\lambda$ 는 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 2-23, 3-25, 및 3-27을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 $V\lambda$ 3-27 내지 $V\lambda$ 3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 λ 유전자좌에 있고 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0050] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 29개 내지 40개의 $hV\lambda$ 를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 유전자좌는 $V\lambda$ 3-29 내지 $V\lambda$ 3-1에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열 및 $V\lambda$ 5-52 내지 $V\lambda$ 1-40에 걸친 사람 λ 유전자좌의 연속 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 유전적으로 변형된 마우스에서 $hV\lambda$ 1-40과 $hV\lambda$ 3-29 사이의 모든 또는 설질적으로 모든 서열은 본질적으로 $hV\lambda$ 1-40 유전자 분절의 다운스트림(3' 비번역된 부분의 다운스트림)에서 천연적으로(예를 들어, 사람 집단에서) 발견되는 대략 959bp의 사람 λ 서열, 제한 효소 부위(예를 들어, PI-SceI)에 이어서 천연적으로 발견되는 $hV\lambda$ 3-29 유전자 분절의 업스트림에서 대략 3,431 bp의 사람 λ 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 마우스 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 마우스 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 마우스 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 마우스 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 마우스 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0051] 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 다수의 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 4개의 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 $hJ\lambda$ 는 $hJ\lambda$ 1, $hJ\lambda$ 2, $hJ\lambda$ 3, 및 $hJ\lambda$ 7이다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 κ 유전자좌에 있고 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나의 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 특정 실시형태에서, 하나의 $hJ\lambda$ 는 $hJ\lambda$ 1이다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 내인성 κ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 κ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다. 다른 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 상기 내인성 λ 유전자좌에 있고, 상기 내인성 κ 유전자좌는 부분적으로 또는 완전히 결실되어 있다.

[0052] 하나의 실시형태에서, V_L 유전자좌는 하나 이상의 $hV\lambda$, 하나 이상의 $hJ\lambda$, 및 마우스 $C\kappa$ 유전자를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 유전자좌는 하나 이상의 $hV\lambda$, 하나 이상의 $hJ\lambda$ 및 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda$ 2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda$ 2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일하다.

[0053] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절의 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 여기서 상기 $hV\lambda$ 유전자 분절은 내인성 마우스 $C\kappa$ 영역 유전자

에 작동적으로 연결되어 상기 마우스는 사람 $V\lambda$ 유전자 분절을 재배열하고 사람 $V\lambda$ 도메인 및 마우스 $C\kappa$ 를 포함하는 역 키메라 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 재배열되지 않은 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절의 90 내지 100%는 하나 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된다. 특정 실시형태에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 12개 이상, 28개 이상 또는 40개 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된 것이다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 7개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절, 16개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절 또는 27개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된 것이다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 모든 마우스 $J\kappa$ 유전자 분절이 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 4, J\lambda 5, J\lambda 6, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0054] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 마우스 λ 유전자좌에서의 내인성 마우스 $V\lambda$ 유전자 분절이 내인성 마우스 λ 유전자좌에서의 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함하고, 여기서, 상기 $hV\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda$ 영역 유전자에 작동적으로 연결되어 상기 마우스는 $hV\lambda$ 유전자 분절을 재배열하고, $hV\lambda$ 도메인 및 마우스 $C\lambda$ 를 포함하는 역 키메라 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상 동일하다. 하나의 실시형태에서, 재배열되지 않은 마우스 $V\lambda$ 유전자 분절의 90 내지 100%는 하나 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된다. 특정 실시형태에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 $V\lambda$ 유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로 대체된다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 12개 이상, 28개 이상, 또는 40개 이상의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로의 대체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 대체는 7개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절, 16개 이상의 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절 또는 27개 이상의 기능성 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 유전자 분절로의 대체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 모든 마우스 $J\lambda$ 유전자 분절이 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 4, J\lambda 5, J\lambda 6, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 $J\lambda 1, J\lambda 2, J\lambda 3, J\lambda 7$, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0055] 하나의 양상에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 위치한 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역 서열을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.

[0056] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역 서열은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 마우스의 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 있고, 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역 서열은 $hV\lambda$ 와 $hJ\lambda$ 유전자 분절 사이에 배치된다. 특정 실시형태에서, 상기 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절은 재조합하여 마우스에서 기능성 사람 λ 경쇄 가변 도메인을 형성할 수 있다.

[0057] 하나의 실시형태에서, 다수의 $hV\lambda$ 및 하나 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함하고 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역 서열이 전사와 관련하여 근접하거나 3' 대부분의 $hV\lambda$ 서열의 다운스트림 및 제1 $hJ\lambda$ 서열의 업스트림 또는 5'에 배치된 마우스가 제공된다.

[0058] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 사람 $V\kappa 4-1$ 유전자 분절의 다운스트림 또는 3'의 약 130bp, 사람 $V\kappa 4-1$ 유전자 분절의 3' 비번역 영역의 다운스트림 약 130bp에 위치한 영역이고, 사람 $J\kappa 1$ 유전자 분절의 업스트림 또는 5'의 약 600bp에 걸쳐 있다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 3' 비번역 영역의 말단으로부터 사람 $J\kappa 1$ 유전자 분절의 업스트림 약 600bp까지 연장되어 있는 사람 $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역과 약 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 약 95% 이상 동일하다. 하나의 실시형태에서, $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 서열번호 100을 포함한다. 특정 실시형태에서, $V\kappa-J\kappa$ 유전자간 영역은 서

열번호 100의 기능성 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 유전자간 영역은 서열번호 100이다.

- [0059] 하나의 양상에서, 상기 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 유전자간 영역 서열을 포함하는 마우스, 마우스 세포(예를 들어, 마우스 배아 줄기 세포), 마우스 배아, 및 마우스 조직이 제공되고, 여기서, 상기 유전자간 영역 서열은 이소성이다. 특정 실시형태에서, 상기 이소성 서열은 사람화된 내인성 마우스 면역글로불린 유전자좌에 위치한다.
- [0060] 하나의 양상에서, 상기 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 유전자간 영역 서열을 포함하는 분리된 핵산 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산 작제물은 표적화 암(arm)을 포함하여 마우스 경쇄 유전자좌에 대한 상기 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 유전자간 영역 서열을 표적화한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 표적화 암은 변형된 내인성 마우스 κ 유전자좌에 대한 상기 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 유전자간 영역을 표적화하고, 여기서, 상기 표적화는 $hV\lambda$ 서열과 $hJ\lambda$ 서열 사이의 위치에 대한 것이다.
- [0061] 하나의 양상에서, 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 2개 이하의 경쇄 대립 유전자를 포함하고, 상기 경쇄 대립 유전자는 (a) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절; 및 (b) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 V_L 및 J_L 유전자 분절을 포함한다.
- [0062] 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 κ 유전자좌이다. 다른 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 경쇄 유전자좌는 λ 유전자좌이다.
- [0063] 하나의 실시형태에서, 상기 2개 이하의 경쇄 대립 유전자는 κ 대립 유전자 및 λ 대립 유전자, 2개의 κ 대립 유전자 및 2개의 λ 대립 유전자로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 2개의 경쇄 대립 유전자 중 하나는 $C\lambda 2$ 유전자를 포함하는 λ 대립 유전자이다.
- [0064] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나의 기능성 면역글로불린 경쇄 유전자좌 및 하나의 비기능성 경쇄 유전자좌를 포함하고, 여기서, 상기 기능성 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\kappa$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다.
- [0065] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나의 기능성 면역글로불린 경쇄 유전자좌 및 하나의 비기능성 경쇄 유전자좌를 포함하고, 여기서, 상기 기능성 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 $C\lambda$ 유전자자는 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일하다.
- [0066] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자를 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자는 사람/마우스 중쇄를 발현하는 사람 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 사람 V_H 유전자 분절, 사람 D_H 유전자 분절 및 사람 J_H 유전자 분절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스는 2개의 면역글로불린 중쇄 대립 유전자를 포함하고 상기 마우스는 사람/마우스 중쇄를 발현한다.
- [0067] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 $C\kappa$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 $hV\kappa$ 및 재배열되지 않은 $hJ\kappa$ 를 포함하는 제1 경쇄 대립 유전자; 및 내인성 $C\kappa$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 를 포함하는 제2 경쇄 대립 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 경쇄 대립 유전자는 상기 유전적으로 변형된 마우스의 유일한 기능성 경쇄 대립 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 λ 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 λ 불변 영역을 포함하는 경쇄를 발현하지 않는다.
- [0068] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 내인성 $C\kappa$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 재배열되지 않은 $hV\kappa$ 및 재배열되지 않은 $hJ\kappa$ 를 포함하는 제1 경쇄 대립 유전자; 및 내인성 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 유전자좌에서 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 를 포함하는 제2 경쇄 대립 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 경쇄 대립 유전자는 상기 유전적으로 변형된 마우스의 유일한 기능성 경쇄 대립 유전자이다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 $C\lambda$ 유전자자는 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일하다.

- [0069] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 6개의 면역글로불린 대립 유전자를 포함하고, 여기서, 제1 대립 유전자는 마우스 C_K 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하고, 제2 대립 유전자는 마우스 C_K 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 V_K 및 J_K 유전자 분절을 포함하고, 제3 대립 유전자는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하고, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 마우스 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 포함하고, 제6 대립 유전자는 (a) 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절, (b) 비기능성인 λ 유전자좌, 또는 (c) 완전히 또는 부분적으로 결실된 λ 유전자좌를 포함한다.
- [0070] 하나의 실시형태에서, 상기 제1 대립 유전자는 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제2 대립 유전자는 재배열되지 않은 hV_K 및 hJ_K 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제3 대립 유전자는 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 재배열되지 않은 hV_H , hD_H 및 hJ_H 를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제6 대립 유전자는 완전히 또는 부분적으로 결실된 내인성 마우스 λ 유전자좌를 포함한다.
- [0071] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 6개의 면역글로불린 대립 유전자를 포함하고, 여기서, 상기 제1 대립 유전자는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하고, 제2 대립 유전자는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자를 분절을 포함하고, 제3 대립 유전자는 마우스 C_K 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 V_K 및 J_K 유전자 분절을 포함하고, 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 마우스 중쇄 유전자를 포함하는 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 포함하고, 제6 대립 유전자는 (a) 마우스 C_K 유전자를 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 면역글로불린 V_K 및 J_K 유전자 분절, (b) 비기능성인 κ 유전자좌, 또는 (c) 하나 이상의 요소가 결실된 κ 유전자좌를 포함한다.
- [0072] 하나의 실시형태에서, 제1 대립 유전자는 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제2 대립 유전자는 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제3 대립 유전자는 재배열되지 않은 hV_K 및 hJ_K 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제4 및 제5 대립 유전자는 각각 독립적으로 재배열되지 않는 hV_H , hD_H 및 hJ_H 유전자 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제6 대립 유전자는 기능적으로 침묵된(functionally silenced) 내인성 마우스 κ 유전자좌를 포함한다.
- [0073] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 마우스 C_L 도메인에 작동적으로 연결된 재배열된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 재배열된 항체 유전자를 포함하는 B 세포를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 마우스 C_K 및 마우스 $C\lambda$ 도메인으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 도메인은 $C\lambda 2$ 유전자로부터 유도된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 도메인은 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 도메인으로부터 유도된다.
- [0074] 하나의 양상에서, C_K 인 C_L 상의 $V\lambda$ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 사람 C_K , 사람 $C\lambda$ 또는 마우스 C_K 로부터 선택된 C_L 상의 $hV\lambda$ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 양상에서, 마우스 C_K 상의 $hV\lambda$ 영역을 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다.
- [0075] 하나의 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 10 내지 50%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 28%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0076] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 23 내지 34%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 11%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0077] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 19 내지 31%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 17%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0078] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 21 내지 38%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 24 내지 27%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.

- [0079] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포 약 10 내지 14%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 9 내지 13%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 hV_λ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0080] 특정 실시형태에서, 마우스의 비장 세포의 약 31 내지 48%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 약 15 내지 21%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 hV_λ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 마우스의 비장세포의 약 30 내지 38%는 B 세포(즉 CD19-양성)이거나, 약 33 내지 48%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 hV_λ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0081] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수의 약 52 내지 70%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 미성숙 B 세포(즉, CD19-양성/B220-중간 양성/IgM-양성)의 약 31 내지 47%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 hV_λ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0082] 하나의 실시형태에서, 마우스의 골수의 약 60%는 B 세포(즉, CD19-양성)이거나 미성숙 B 세포(즉, CD19-양성/B220-중간 양성/IgM-양성)의 약 38.3%는 마우스 C_K 도메인과 융합된 hV_λ 도메인을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0083] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 V 및 사람 J 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인, 및 마우스 불변 영역 유전자로부터 유도된 불변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 유전자는 C_K 유전자이다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 불변 영역 유전자는 C_λ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 C_λ 영역은 C_λ2이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 C_λ 유전자는 마우스 C_λ2와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 C_λ 유전자로부터 유도된다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 사람 V, 사람 D 및 사람 J 유전자 분절로부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 중쇄, 및 마우스 중쇄 불변 영역 유전자로부터 유도된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 힌지-CH₂-CH₃ 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH₁-힌지-CH₂-CH₃ 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH₁-CH₂-CH₃-CH₄ 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 마우스 중쇄 불변 영역 유전자는 중쇄 불변 도메인의 CH₂-CH₃-CH₄ 서열을 포함한다.
- [0084] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 재배열된 사람 V_λ-J_λ 서열 및 마우스 C_K 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 V_λ-J_λ 서열은 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49, 및 1-51 유전자 분절로부터 선택된 hV_λ 유전자 분절의 재배열로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 V_λ-J_λ 서열은 J_λ1, J_λ2, J_λ3, 및 J_λ7 유전자 분절로부터 선택된 hJ_λ 유전자 분절의 재배열로부터 유도된다.
- [0085] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 및 1-51/1로부터 선택된 사람 V_λ/J_λ 서열을 포함하는 재배열된 면역글로불린 λ 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 B 세포는 마우스 중쇄 불변 도메인과 융합된 사람 면역글로불린 중쇄 가변 도메인, 및 마우스 κ 경쇄 불변 도메인과 융합된 사람 면역글로불린 λ 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현한다.
- [0086] 하나의 양상에서, (a) 재배열되지 않은 사람 중쇄 가변 영역 유전자 분절로부터 유도된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 중쇄(여기서, 상기 중쇄 가변 도메인은 마우스 중쇄 불변(C_H) 영역과 융합된다); 및 (b) 재배열되지 않은 hV_λ 및 hJ_λ로부터 유도된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 경쇄(여기서, 상기 경쇄 가변 도메인은 마우스 C_L 영역과 융합된다)를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 제공된다.
- [0087] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 (i) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V, D 및 J 유전자 분절이 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 V, D 및 J 유전자 분절, 및 마우스 C_H 유전자로 대체됨을 포함하는 중쇄 유전자좌, (ii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V_K 및 J_K 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hV_λ 및 hJ_λ 유전자 분절 및 마우스 C_K 유전자로 대체됨을 포함하는 제1 κ 경쇄 유전자좌, (iii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V_K 및 J_K 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 hV_K 및 hJ_K 유전자 분절 및 마우스 C_K 유전자로 대체됨을 포함하는 제2 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 C_λ 영역을 포함하는 항체를 발현하지 않는

다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 $C\lambda$ 유전자 및/또는 $V\lambda$ 및/또는 $J\lambda$ 유전자 분절의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 전체적으로 부분적으로 결실되어 있다.

[0088] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 (i) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 V , D 및 J 유전자 분절이 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 사람 V , D 및 J 유전자 분절 및 마우스 C_H 유전자로 대체됨을 포함하는 중쇄 유전자좌, (ii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절, 및 마우스 $C\lambda$ 유전자로 대체됨을 포함하는 제1 λ 경쇄 유전자좌, (iii) 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 내인성 마우스 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절이 모든, 실질적으로 모든 또는 다수의 기능성 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절, 및 마우스 $C\lambda$ 유전자로 대체됨을 포함하는 제2 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된다.

[0089] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 $C\kappa$ 유전자 및/또는 $V\kappa$ 및/또는 $J\kappa$ 유전자 분절의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 비기능성 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0090] 하나의 양상에서, 항체를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 마우스에 의해 생성된 총 IgG 항체 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 25% 초과, 30% 초과, 35% 초과, 40% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과가 λ -유도된 가변 도메인을 포함하고, 상기 마우스는 마우스 $C\kappa$ 영역과 융합된 κ -유도된 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스에 의해 생성된 전체 항체 중 약 15 내지 40%, 20 내지 40%, 25 내지 40%, 30 내지 40%, 또는 35 내지 40%가 λ -유도된 가변 도메인을 포함한다.

[0091] 하나의 실시형태에서, λ -유도된 가변 도메인은 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ -유도된 가변 도메인은 마우스 $C\kappa$ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다. 특정 실시형태에서, 상기 λ -유도된 가변 영역은 마우스 $C\lambda$ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 $C\lambda$ 영역은 $C\lambda 2$ 영역이다. 하나의 실시형태에서, 상기 κ -유도된 가변 도메인은 $hV\kappa$ 및 $hJ\kappa$ 로부터 유도되고, 특정 실시형태에서는 마우스 $C\kappa$ 영역을 포함하는 경쇄 중에 있다.

[0092] 하나의 양상에서, 업스트림 상동성 암(arm) 및 다운스트림 상동성 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공되고, 상기 업스트림 및 다운스트림 상동성 암은 마우스 κ 유전자좌에 대한 작제물을 표적화하고, 상기 작제물은 기능성의 재배열되지 않은 $hV\lambda$ 분절 및 기능성의 재배열되지 않은 $hJ\lambda$ 분절, 및 선별 또는 마커 서열을 포함한다.

[0093] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 마우스 $V\lambda 2$ 의 업스트림의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위를 갖는 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트 및 마우스 $J\lambda 2$ 의 3'의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed Hyg-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 $C\lambda 2$, $J\lambda 4$, $C\lambda 4$ 및 마우스 인핸서 2.4를 포함한다.

[0094] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 $V\lambda 1$ 에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 마우스 $C\lambda 1$ 에 대해 3'의 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Lox스트(loxed) 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 λ 3' 인핸서 및 마우스 λ 3' 인핸서 3.1을 포함한다.

[0095] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 $V\lambda 2$ 에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 마우스 $J\lambda 2$ 에 대해 3'이고 마우스 $C\lambda 2$ 에 대해 5'인 마우스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 하이그로마이신-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 3' 표적화 암은 마우스 $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ 유전자 분절 및 마우스 λ 인핸서 2.4를 포함한다.

[0096] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 $V\lambda 2$ 에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, $hV\lambda 3-12$ 다운스트림으로부터 $hJ\lambda 1$ 의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 사람 계놈 단편, 및 마우스 $J\lambda 2$ 에 대해 3'인 마우스

스 λ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 마우스 C λ 2-J λ 4-C λ 4 유전자 분절 및 마우스 λ 인핸서 2.4를 포함한다.

[0097] 하나의 양상에서, hV λ 3-12 다운스트림으로부터 hJ λ 1의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0098] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 V λ 2에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, 및 hV λ 3-27 다운스트림에서 hV λ 2-8의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 사람 게놈 단편을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 하이그로마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 게놈 단편은 3' 표적화 암을 포함한다. 특정 실시형태에서, 3' 표적화 암은 hV λ 3-12 다운스트림에서 hV λ 2-8의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 약 53kb를 포함한다.

[0099] 하나의 양상에서, hV λ 3-27 다운스트림에서 hV λ 3-12의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0100] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 V λ 2에 대해 5'의 마우스 λ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 리컴비나제 인식 부위로 5' 및 3' 플랭킹된 선별 카세트, hV λ 5-52 다운스트림에서 hV λ 1-40의 말단까지의 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 제1 사람 게놈 단편, 제한 효소 부위, 및 사람 hV λ 3-29 다운스트림으로부터 hV λ 82K의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 제2 사람 게놈 단편을 포함하는 분리된 DNA 단편이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 Frt'ed 네오마이신 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 제한 효소 부위는 호밍 엔도뉴클레아제에 대한 부위이다. 특정 실시형태에서, 상기 호밍 엔도뉴클레아제는 PI-SceI이다. 하나의 실시형태에서, 상기 제2 사람 게놈 단편은 3' 표적화 암이다. 특정 실시형태에서, 상기 3' 표적화 암은 hV λ 3-29 다운스트림에서 hV λ 82K의 말단까지 약 27kb의 사람 λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0101] 하나의 양상에서, hV λ 5-52 다운스트림에서 hV λ 1-40의 말단까지 사람 λ 경쇄 유전자좌의 연속 영역을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0102] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'으로 내인성 V κ 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 2개의 병치된(juxtaposed) 리컴비나제 인식 부위, 병치된 리컴비나제 인식 부위에 대해 3'의 선별 카세트, 및 κ 경쇄 가변 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 병치된 리컴비나제 인식 부위는 서로에 대해 반대 배향으로 존재한다. 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 상이하다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 loxP 부위 및 lox511 부위이다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 네오마이신 카세트이다.

[0103] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 마우스 J κ 유전자 분절에 대해 5'의 마우스 κ 유전자좌를 표적화하기 위한 표적화 암, 선별 카세트, 선별 카세트에 대해 3'의 리컴비나제 인식 부위, 및 마우스 J κ 유전자 분절에 대해 3' 및 마우스 κ 인트론 인핸서에 대해 5'의 마우스 κ 서열을 표적화하기 위한 3' 표적화 암을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 선별 카세트는 하이그로마이신-TK 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 상기 선별 카세트로서 전사와 동일한 방향으로 존재한다. 특정 실시형태에서, 상기 리컴비나제 인식 부위는 loxP 부위이다.

[0104] 하나의 양상에서, 전사의 방향과 관련하여 5'에서 3'로 내인성 마우스 V κ 유전자 분절의 5' 서열을 포함하는 제1 마우스 게놈 단편, 제1 리컴비나제 인식 부위, 제2 리컴비나제 인식 부위, 및 내인성 마우스 J κ 유전자 분절의 3' 및 마우스 κ 인트론 인핸서의 5'의 서열을 포함하는 제2 마우스 게놈 단편을 포함하는 분리된 DNA 작제물이 제공된다.

[0105] 하나의 양상에서, 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 유전적 변형은 상기 또는 본원에 기재된 하나 이상의 DNA 작제물을 이용한 변형을 포함한다.

[0106] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 분리된 DNA 작제물의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하는 방법에서 본원에 기재된 바와 같은 분리된 DNA 작제물의 용도가 제공된다.

- [0107] 하나의 양상에서, 상기 및 본원에 기재된 바와 같은 DNA 작제물을 포함하는 표적화 벡터를 포함하는 비-사람 줄기 세포가 제공된다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 마우스로부터 유도된 비-사람 줄기 세포가 제공된다.
- [0108] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 줄기 세포는 배아 줄기(ES) 세포이다. 특정 실시형태에서, 상기 ES 세포는 마우스 ES 세포이다.
- [0109] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 줄기 세포의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 줄기 세포의 용도가 제공된다.
- [0110] 하나의 양상에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적 변형을 포함하는 마우스 배아가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 공여체 ES 세포를 포함하는 숙주 마우스 배아가 제공되고, 여기서 상기 공여체 ES 세포는 본원에 기재된 바와 같은 유전적 변형을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 배아는 상실배 이전 단계의 배아이다. 특정 실시형태에서, 상실배 이전 단계의 배아는 4-세포 단계 배아 또는 8-세포 단계 배아이다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 마우스 배아는 배반포이다.
- [0111] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 마우스 배아의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 마우스 배아의 용도가 제공된다.
- [0112] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적으로 변형된 마우스로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자 서열을 포함하는 비-사람 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 B 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 체세포적으로 돌연변이된, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화한다.
- [0113] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적으로 변형된 마우스로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자 서열을 포함하는 비-사람 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 B 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 체세포적으로 돌연변이된, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인 및/또는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 암호화한다.
- [0114] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 세포의 용도가 제공된다. 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 세포의 용도가 제공된다.
- [0115] 하나의 양상에서, (a) $hV\lambda$ 유전자 분절 및 $hJ\lambda$ 유전자 분절로부터 유도된 가변 영역; 및 (b) 마우스 C_L 유전자를 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스 B 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 유전자는 C_K 및 C_λ 유전자로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 B 세포는 (c) hV_H , hD_H 및 (d) hJ_H 분절로부터 유도된 가변 영역을 포함하는 동족 중쇄를 추가로 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 B 세포는 재배열된 λ 유전자를 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 상기 B 세포는 재배열된 κ 유전자를 포함하지 않는다.
- [0116] 하나의 양상에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 내인성 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 $hV\lambda$ 및 하나 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 마우스 C_L 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포를 분리하는 단계(여기서, 상기 항체는 $hV\lambda$, $hJ\lambda$ 및 마우스 C_L 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 유전자는 마우스 C_K 유전자이다.
- [0117] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 내인성 κ 유전자좌에서 하나 이상의 $hV\lambda$ 및 상기 κ 유전자좌에서 하나 이상의 $hJ\lambda$ 를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 κ 유전자좌는 마우스 C_K 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나, 상기

(b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포를 분리하는 단계(여기서, 상기 항체는 $hV\lambda$, $hJ\lambda$ 및 마우스 $C\kappa$ 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0118] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 불변 유전자는 사람 $C\kappa$ 유전자 및 마우스 $C\kappa$ 유전자로부터 선택된다.

[0119] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 마우스는 λ 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 $hV\lambda$ 및 상기 λ 경쇄 유전자좌에서 하나 이상의 $J\lambda$ 를 포함하는 게놈을 갖고, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\lambda$ 유전자를 포함한다); (b) 유전적으로 변형된 마우스가 상기 항원에 대해 면역반응을 전개하도록 하는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 마우스로부터 항원을 특이적으로 인식하는 항체를 분리하거나, 상기 (b)의 마우스에서 항원에 결합하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 $hV\lambda$, $hJ\lambda$ 및 마우스 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0120] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 사람 $C\lambda$ 유전자 및 마우스 $C\lambda$ 유전자로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 사람 $C\lambda$ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 1$, $C\lambda 2$, $C\lambda 3$ 및 $C\lambda 7$ 로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 마우스 $C\lambda$ 유전자이다. 특정 실시형태에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 1$, $C\lambda 2$ 및 $C\lambda 3$ 으로부터 선택된다. 보다 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 $C\lambda 2$ 이다. 다른 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된다.

[0121] 하나의 양상에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 내인성 경쇄 유전자좌에서 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\lambda$ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 $C\lambda$ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0122] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스로부터 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 $V\lambda$ 및 마우스 $C\lambda$ 을 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0123] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 $C\lambda$ 유전자 및 마우스 $C\lambda$ 유전자 또는 이들의 기능성 단편으로부터 선택된다.

[0124] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 κ 경쇄 유전자좌에서 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고, 상기 κ 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\kappa$ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 $C\kappa$ 유전자 또는 이들의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0125] 하나의 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 불변 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 $C\kappa$ 유전자 및 마우스 $C\kappa$ 유전자 또는 이의 기능성 단편으로부터 선택된다.

[0126] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스로부터 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 $V\lambda$ 및 마우스 $C\kappa$ 를 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0127] 하나의 실시형태에서, (a) 유전적으로 변형된 마우스를 항원에 노출시키는 단계(여기서, 상기 유전적 변형은 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 $C\lambda$ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다); 및 (b) 상기 마우스에서 재배열된 면역글로불린 유전자를 동정하는 단계(여기서, 상기 재배열된 면역글로불린 유전자는 λ 경쇄 가변 영역 유전자 분절 및 $C\lambda$ 유전자 또는 이의 기능성 단편을 포함한다)를 포함하는, 유전적으로 변형된 마우스에서 재배열된 항체 유전자를 제조하는 방법이 제공된다.

[0128] 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자 또는 이의 기능성 단편은 사람 $C\lambda$ 유전자 및 마우스 $C\lambda$ 유전자 또는 이들의 기능성 단편으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 불변 유전자는 마우스 $C\lambda$ 유

전자 또는 이의 기능성 단편이다.

[0129] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 마우스 유래의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 사람 V_L 및 마우스 C_L 를 포함하는 항체로부터 유래한다.

[0130] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄를 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 불변 도메인과 융합된 상기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 핵산 서열을 사용하여 목적하는 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 목적하는 항체는 C_L 도메인과 융합된 V_L 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 도메인은 사람 도메인이고, 상기 C_L 도메인은 사람 또는 마우스 C_K 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 상기 V_L 도메인은 마우스 도메인이고, 상기 C_L 도메인은 사람 또는 마우스 C_K 도메인이다.

[0131] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는, 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄를 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 불변 도메인의 핵산 서열과 융합된 상기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 핵산 서열을 사용하여 목적하는 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 목적하는 항체는 C_K 도메인과 융합된 V_L 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0132] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 마우스를 항원에 노출시키는 단계, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조함을 포함하는 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계, 중쇄 가변 도메인을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열 및 항체의 동족 경쇄 가변 도메인 서열을 암호화하는, 상기 마우스에서 재배열된 핵산 서열을 동정하는 단계(여기서, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다), 및 사람 중쇄 불변 도메인 및 사람 경쇄 불변 도메인을 암호화하는 핵산 서열에 융합된 핵산 서열을 사용하여 사람 서열로부터 유도된 항체를 제조하는 단계(여기서, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 마우스 C_L 영역과 융합된 사람 V_L 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다)를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0133] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 영역은 C_{L1} , C_{L2} 및 C_{L3} 으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 영역은 C_{L2} 이다.

[0134] 하나의 양상에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 C_L 도메인과 융합된 재배열된 사람 V_L 도메인 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 상기 세포로부터, 사람 V_L 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 상기 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계; 및 (e) 사람 V_L 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다.

[0135] 하나의 실시형태에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 C_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열과 함께 동일한 핵산 분자상에 연속인 재배열된 사람 V_L 도메인 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 사람 V_L 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 세포로부터 클로닝하는 단계; 및 (e) 상기 사람 V_L 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 상기 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다.

[0136]

하나의 실시형태에서, (a) 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키는 단계; (b) 상기 마우스가 상기 항원에 대한 면역 반응을 전개하도록 하는 단계; (c) 마우스 $C\lambda$ 도메인과 융합된 재배열된 사람 $V\lambda$ 도메인 서열을 암호화하는 DNA를 포함하는, 상기 마우스에서 세포를 동정하는 단계(여기서, 상기 세포는 또한 사람 V_H 도메인 및 마우스 C_H 도메인을 포함하는 동족 중쇄를 암호화하고, 상기 세포는 항원에 결합하는 항체를 발현한다); (d) 상기 세포로부터, 재배열된 사람 $V\lambda$ 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하는 단계; 및 (e) 사람 $V\lambda$ 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열 및 동족 사람 V_H 도메인을 암호화하는 클로닝된 핵산 서열을 사용하여 완전한 사람 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 재배열된 항체 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 제조하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 도메인은 마우스 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 $C\lambda$ 도메인은 마우스 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된다.

[0137]

하나의 양상에서, 내인성 경쇄 불변 영역(C_L)에 융합된 사람 λ -유도된 경쇄를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스는 항원으로의 면역화시에, 마우스 C_L 도메인과 융합된 사람 $V\lambda$ 도메인을 포함하는 항체를 제조한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 C_K 도메인 및 $C\lambda$ 도메인으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스 C_L 도메인은 C_K 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 상기 $C\lambda$ 도메인은 $C\lambda 2$ 이다. 특정 실시형태에서, 상기 $C\lambda$ 도메인은 $C\lambda 2$ 와 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일한 $C\lambda$ 유전자로부터 유도된다.

[0138]

하나의 양상에서, 다수의 면역글로불린 중쇄와 연합된 다수의 면역글로불린 λ 경쇄를 발현하는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 중쇄는 사람 서열을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 상기 사람 서열은 가변 서열 $C_H 1$, 헌지, $C_H 2$, $C_H 3$, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 다수의 면역글로불린 λ 경쇄는 사람 서열을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 상기 사람 서열은 가변 서열, 불변 서열 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 손상된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 포함하고 전이유전자 또는 염색체외 에피솜으로부터 중쇄 및/또는 λ 경쇄를 발현한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 일부 또는 모든 내인성 마우스 중쇄 유전자 분절(즉, V, D, J) 및/또는 일부 또는 모든 내인성 마우스 중쇄 불변 서열(예를 들어, $C_H 1$, 헌지, $C_H 2$, $C_H 3$ 또는 이들의 조합), 및/또는 일부 또는 모든 내인성 마우스 경쇄 서열(예를 들어, V, J, 상수, 또는 이들의 조합)이 내인성 마우스 유전자좌에서 하나 이상의 사람 면역글로불린 서열로 대체됨을 포함한다.

[0139]

하나의 양상에서, 사람 λ -유도된 경쇄를 갖는 항체를 제조하기에 적합한 마우스가 제공되고, 여기서, 상기 마우스에서 모든 또는 실질적으로 모든 항체는 사람 λ -유도된 경쇄와 함께 발현된다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 λ -유도된 경쇄는 내인성 경쇄 유전자좌로부터 발현된다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 경쇄 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이다. 특정 실시형태에서, 상기 κ 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 경쇄 유전자좌이다.

[0140]

하나의 양상에서, 사람 항체에 대한 λ -유도된 경쇄를 제조하기 위한 방법이 제공되고, 본원에 기재된 마우스로부터 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 수득하고, 사람 항체를 제조하는데 상기 경쇄 서열 및 상기 중쇄 서열을 사용함을 포함한다.

[0141]

하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 방법이 제공되고, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 항원에 노출시키고; 상기 마우스가 면역 반응을 나타내도록 하고; 상기 마우스로부터 항원에 결합하는 항원-결합 단백질을 수득하거나, 항원에 결합하는 항원-결합 단백질을 제조하는데 사용될 서열을 상기 마우스로부터 수득함을 포함한다.

[0142]

하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스로부터 유도된 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 배아 줄기 세포, 만능 세포, 유도된 만능 세포, B 세포 및 하이브리도마로부터 선택된다.

[0143]

하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전적 변형을 포함하는 세포가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 마우스 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 하이브리도마 및 쿼드로마(quadroma)로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 마우스 불변 서열과 융합된 사람 λ 가변 서열을 포함하는 면역글로

불린 경쇄를 발현한다. 특정 실시형태에서, 상기 마우스 불변 서열은 마우스 κ 불변 서열이다.

[0144] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스로부터 유도된 조직이 제공된다.

[0145] 하나의 양상에서, 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 마우스 또는 세포의 용도가 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 항원-결합 단백질은 사람 단백질이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 단백질은 사람 항체이다.

[0146] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스, 세포, 조직 또는 방법에 의해 제조된 항원-결합 단백질이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 항원-결합 단백질은 사람 단백질이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 단백질은 사람 항체이다.

[0147] 본원에 기재된 임의의 실시형태 및 양상은 달리 언급되지 않거나 상기로부터 명백하지 않은 경우 서로 연계하여 사용될 수 있다. 다른 실시형태는 계속되는 기재의 검토로부터 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0148] 도 1은 규모화하기 위한 것이 아니고, $V\lambda$ 유전자 분절(A, B 및 C), 및 $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 영역 쌍(J-C 쌍)의 클러스터를 포함하는 사람 λ 경쇄 유전자좌의 상세한 도해를 나타낸다.

도 2는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 사용되는 표적화 전략에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 3은 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 사용되는 표적화 전략에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 4a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 12개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 $hJ\lambda 1$ 유전자 분절(12/1-λ 표적화 벡터)를 포함하는 사람 λ 경쇄 서열로 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 표적화하기 위한 초기 표적화 벡터의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 4b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 12개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 $hJ\lambda 1$ 유전자 분절(12/1-κ 표적화 벡터), 12개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 $hJ\lambda 1, 2, 3$ 및 7 유전자 분절(12/4-κ 표적화 벡터), 12개의 $hV\lambda$ 유전자 분절, 사람 $V\kappa-J\kappa$ 게놈 서열 및 $hJ\lambda 1$ 유전자 분절(12(κ)1-κ 표적화 벡터) 및 12개의 $hV\lambda$ 유전자 분절, 사람 $V\kappa-J\kappa$ 게놈 서열 및 $hJ\lambda 1, 2, 3$ 및 7 유전자 분절(12(κ)4-κ 표적화 벡터)를 포함하는 사람 λ 경쇄 서열로 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 표적화하기 위한 4개의 초기 표적화 벡터의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 5a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 40개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 단일 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위한 표적화 전략의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 5b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 40개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 단일 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 상기 마우스 κ 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위한 표적화 전략의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 6은 규모화하기 위한 것이 아니고, 사람 κ 유전자간 서열, 다중 $hJ\lambda$ 유전자 분절 또는 둘 다를 함유하는 하이브리드 경쇄 유전자좌의 특유한 사람 λ-κ 하이브리드 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 표적화 및 분자 엔진니어링 단계의 일반적인 도해를 나타낸다.

도 7a는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 $C\lambda 2$ 유전자에 작동적으로 연결된 40개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 단일 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 유전자좌 구조에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 7b는 규모화하기 위한 것이 아니고, 내인성 $C\kappa$ 유전자에 작동적으로 연결된 연속 사람 $V\kappa-J\kappa$ 게놈 서열의 존재 또는 부재하에 40개의 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 1개 또는 4개의 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 함유하는 4개의 독립적인 변형된 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 유전자좌 구조에 대한 일반적인 도해를 나타낸다.

도 8a는 야생형 마우스(WT), 사람 $V\kappa-J\kappa$ 게놈 서열을 포함하는 12개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $hJ\lambda$ 유전자 분절(12hV λ-V κ J κ -4hJ λ)에 대한 마우스 동종접합체 및 40개의 $hV\lambda$ 및 1개의 $hJ\lambda$ 유전자 분절(40hV λ-1hJ λ)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 $CD19^+$ 에 대해 게이팅된 $Ig\lambda^+$ 및 $Ig\kappa^+$ 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 8b는 야생형(WT), 사람 $V\kappa-J\kappa$ 게놈 서열을 포함하는 12개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $hJ\lambda$ 유전자 분절(12hV λ-V κ J κ -4hJ λ)에 대한 마우스 동종접합체 및 40개의 $hV\lambda$ 및 1개의 $hJ\lambda$ 유전자 분절(40hV λ-1hJ λ)에 대한 마우스

동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$ B 세포의 총수를 나타낸다.

도 9a는 상부 패널에서, 단일선(singlet)상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT), 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 B 및 T 세포(각각 $CD19^+$ 및 $CD3^+$)에 대해 염색된 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다. 하부 패널은 $CD19^+$ 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 $Ig\lambda^+$ 및 $Ig\kappa^+$ 발현에 대해 염색된 비장 세포의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 9b는 야생형 마우스(WT), 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$, $CD19^+ Ig\kappa^+$ 및 $CD19^+ Ig\lambda^+$ B 세포의 총수를 나타낸다.

도 9c는 $CD19^+$ 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 면역글로불린 D(IgD) 및 면역글로불린 M(IgM)에 대해 염색된 비장세포의 윤곽 플롯을 나타낸다. 성숙(WT에 대해 72개, $40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$ 에 대해 51개) 및 전이(WT에 대해 13개, $40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$ 에 대해 22개) B 세포는 윤곽 플롯 각각에 나타낸다.

도 9d는 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체로부터 수거된 비장에서 $CD19^+$ B 세포, 전이 B 세포($CD19^+ IgM^{hi} IgD^{lo}$) 및 성숙 B 세포($CD19^+ IgM^{lo} IgD^{hi}$)의 총수를 나타낸다.

도 10a는 상부 패널에서, 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 B 및 T 세포(각각 $CD19^+$ 및 $CD3^+$)에 대해 염색된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 하부 패널은 $CD19^+$ 상에 게이팅되고 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 $ckit^+$ 및 $CD43^+$ 에 대해 염색된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 프로(Pro) 및 프리(Pre) B 세포는 하부 패널의 윤곽 플롯 상에 나타낸다.

도 10b는 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 수거된 골수에서 프로($CD19^+ CD43^+ ckit^+$) 및 프리($CD19^+ CD43^- ckit^-$) B 세포의 수를 나타낸다.

도 10c는 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체 유래의 면역글로불린 M(IgM) 및 B220에 대해 염색된 단일선상에 게이팅된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다. 미성숙, 성숙 및 프로/프리 B 세포는 상기 윤곽 플롯의 각각에 나타낸다.

도 10d는 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 분리된 골수에서 미성숙($B220^{int} IgM^+$) 및 성숙($B220^{hi} IgM^+$) B 세포의 총수를 나타낸다.

도 10e는 야생형 마우스(WT) 및 사람 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 게놈 서열을 포함하는 40개의 $hV\lambda$ 및 4개의 $J\lambda$ 유전자 분절($40hV\lambda-V_{\kappa}J_{\kappa}-4hJ\lambda$)에 대한 마우스 동종접합체의 대퇴부로부터 분리된 $Ig\lambda$ 및 $Ig\kappa$ 발현에 대해 염색된 미성숙($B220^{int} IgM^+$) 및 성숙($B220^{hi} IgM^+$) B 세포에 대해 게이팅된 골수의 윤곽 플롯을 나타낸다.

도 11은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장세포 RNA로부터 증폭된 18개의 독립적인 RT-PCR 클론의 $V\lambda-J\lambda-C\kappa$ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. A6 = 서열번호 57; B6 = 서열번호 58; F6 = 서열번호 59; B7 = 서열번호 60; E7 = 서열번호 61; F7 = 서열번호 62; C8 = 서열번호 63; E12 = 서열번호 64; 1-4 = 서열번호 65; 1-20 = 서열번호 66; 3B43 = 서열번호 67; 5-8 = 서열번호 68; 5-19 = 서열번호 69; 1010 = 서열번호 70; 11A1 = 서열번호 71; 7A8 = 서열번호 72; 3A3 = 서열

번호 73; 2-7 = 서열번호 74. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. hJ λ 1 및 마우스 C κ 의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

도 12는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 연속 사람 V κ -J κ 게놈 서열을 포함하는 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장 세포 RNA로부터 증폭된 12개의 독립적인 RT-PCR 클론의 V λ -J λ -C κ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. 5-2 = 서열번호 87; 2-5 = 서열번호 88; 1-3 = 서열번호 89; 4B-1 = 서열 번호 90; 3B-5 = 서열번호 91; 7A-1 = 서열번호 92; 5-1 = 서열번호 93; 4A-1 = 서열번호 94; 11A-1 = 서열번호 95; 5-7 = 서열번호 96; 5-4 = 서열번호 97; 2-3 = 서열번호 98. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. 사람 J λ 및 마우스 C κ 각각의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

도 13은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 서열을 함유하는 마우스의 비장 세포 RNA로부터 증폭된 3개의 독립적인 RT-PCR 클론의 V λ -J λ -C λ 접합부의 뉴클레오타이드 서열 정렬을 나타낸다. 2D1 = 서열번호 101; 2D9 = 서열번호 102; 3E15 = 서열번호 103. 소문자 염기는 재조합 동안에 돌연변이 및/또는 N 첨가로부터 비롯된 비-생식선 염기를 나타낸다. hJ λ 1 및 마우스 C λ 2의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 골격 4 영역(FWR4)내 컨센서스 아미노산은 서열 정렬의 하부에 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0149] 다양한 실시형태의 구체적인 특징이 상세히 논의되었지만, 특정 양상, 실시형태 및 실시예의 기재는 청구항의 주요 요지를 제한하지 않고 청구항이 본 발명의 범위를 기재한다. 본원에 사용된 모든 용어 및 어구는 당업자에게 통상적으로 통용되는 의미를 포함한다.
- [0150] 상기 용어 "연속"은 동일한 핵산 문자상에 발생함을 언급하고, 예를 들어, 2개의 핵산 서열이 동일한 핵산 문자상에 발생하지만 다른 핵산 서열에 의해 방해되는 경우 상기 핵산 서열은 "연속"이다. 예를 들어, 재배열된 V(D)J 서열은 불변 영역 유전자 서열과 "연속"이지만 V(D)J 서열의 최종 코돈은 상기 불변 영역 서열의 첫번째 코돈이 바로 이어지는 것은 아니다. 다른 예에서, 2개의 V 유전자 분절 서열은 이들이 동일한 게놈 단편상에 존재하는 경우 "연속"이지만 이들은 상기 V 영역의 코돈을 암호화하지 않는 서열에 의해 분리될 수 있고, 예를 들어, 이들은 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 또는 다른 비암호화 서열에 의해 분리될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 연속 서열은 야생형 게놈에서 발견되는 바와 같이 배열된 게놈 서열을 함유하는 게놈 단편을 포함한다.
- [0151] 언급된 유전자 또는 유전자 분절"로부터 유도된" 가변 영역에 대하여 사용되는 경우, 어구 "로부터 유도된"은 특정 재배열되지 않은 유전자 분절 또는 가변 도메인을 발현하는 유전자를 형성하기 위해 재배열되는 유전자 분절로 서열을 역추적하는 능력을 포함한다(경우에 따라, 스플라이스 차이 및 체세포적 돌연변이를 해명함).
- [0152] 가변 영역 유전자 분절 또는 연결 유전자 분절에 관하여 사용되는 경우, 어구 "기능성"은 발현된 항체 레퍼토리에서의 사용을 언급하고; 예를 들어, 사람 V λ 유전자 분절에서 3-1, 4-3, 2-8 등은 기능성인 반면 V λ 유전자 분절 3-2, 3-4, 2-5 등은 비기능성이다.
- [0153] "중쇄 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, 중쇄 가변성 (V H), 중쇄 다양성(D H), 중쇄 연결성(J H) 및 중쇄 불변성(C H) 영역 DNA 서열이 발견된다.
- [0154] " κ 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, κ 가변성(V κ), κ 연결성(J κ), 및 κ 불변성(C κ) 영역 DNA 서열이 발견된다.
- [0155] " λ 유전자좌"는 염색체, 예를 들어, 마우스 염색체상의 위치를 포함하고, 야생형 마우스에서, λ 가변성(V λ), λ 연결성(J λ), 및 λ 불변성(C λ) 영역 DNA 서열이 발견된다.
- [0156] 상기 용어 "재배열되지 않은"은, V 유전자 분절 및 J 유전자 분절(중쇄에 대한, 또한 D 유전자 분절)이 별도로 유지되지만 V(D)J 레퍼토리의 단일 V, (D), J 를 포함하는 재배열된 V(D)J 유전자를 형성하기 위해 연결될 수 있는 면역글로불린 유전자좌의 상태를 포함한다.
- [0157] 사람 λ 가변 도메인을 발현하는 마우스
- [0158] 완전히 사람, 또는 부분적으로 사람이고 부분적으로 마우스인 항체를 발현하는 마우스가 이전에 보고되었다. VELOCIMMUNE®의 유전자 조작된 마우스는 내인성 마우스 유전자좌에서 재배열되지 않은 V(D)J 유전자 분절이 사

람 V(D)J 유전자 분절로 대체됨을 포함한다. VELOCIMMUNE®의 마우스는 사람 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 갖는 키메라 항체를 발현한다(문현참조: 예를 들어, 미국 특허 제7,605,237호). 대부분의 다른 보고는 손상된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 갖는 마우스에서 완전한 사람 전이유전자 유래의 완전한 사람 항체를 발현하는 마우스에 관한 것이다.

[0159] 항체 경쇄는 2개의 별도의 유전자좌: 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나에 의해 암호화된다. 마우스 항체 경쇄는 주로 κ 형이다. 마우스 항체를 제조하는 마우스 및 완전한 사람 또는 키메라 사람-마우스 항체를 제조하는 변형된 마우스는 경쇄 사용에 있어서 편중된 것으로 나타난다. 사람은 또한 마우스에서와 같이 뚜렷하지는 않지만 경쇄 편중을 나타내고, 마우스에서 κ 경쇄 대 λ 경쇄의 비율은 약 95:5인 반면, 사람에서, 상기 비율은 약 60:40이다. 마우스에서 보다 뚜렷하게 편중된 것은 항체 다양성에 큰 영향을 줄 것으로 사료되지는 않지만, 그 이유는 우선 마우스에서 λ 가변 유전자좌가 다양하지 않기 때문이다. 이것은 사람에서는 그렇지 않다. 사람 λ 경쇄 유전자좌는 매우 다양하다.

[0160] 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌는 1,000kb 이상으로 연장되어 있고, 가변(V) 또는 연결(J) 분절을 암호화하는 80개 이상의 유전자를 함유한다(도 1). 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌 내에, 관찰된 모든 $V\lambda$ 도메인의 절반 이상이 유전자 분절 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 및 3-21에 의해 암호화된다. 전반적으로 사람 $V\lambda$ 유전자 분절의 약 30개 정도가 기능성인 것으로 생각된다. 7개의 $J\lambda$ 유전자 분절이 있고, 이들 중 4개만이 일반적으로 기능성인 $J\lambda$ 유전자 분절- $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, 및 $J\lambda 7$ 로서 간주된다.

[0161] 사람에서 상기 λ 경쇄 유전자좌는 사람 λ 경쇄 유전자좌가 기능성 경쇄 단백질을 형성하기 위해 재조합할 수 있는 수개의 가변성 영역 유전자 분절을 갖는다는 점에서 마우스 및 사람 둘 다의 κ 유전자좌의 구조와 유사하다. 상기 사람 λ 경쇄 유전자좌는 대략 70개의 V 유전자 분절 및 7개의 $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 분절 쌍을 함유한다. 이들 $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 분절 쌍 중 4개만이 기능성인 것으로 나타난다. 일부 대립 유전자에서, 5번쩨 $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 분절 쌍이 의사(pseudo) 유전자($C\lambda 6$)인 것으로 보고되었다. 상기 70개의 $V\lambda$ 유전자 분절은 38개의 기능성의 유전자 분절을 함유하는 것으로 나타난다. 상기 70개의 $V\lambda$ 서열은 3개의 클러스터로 배열되어 있고, 상기 클러스터 모두는 독특한 V 유전자 계열 그룹의 상이한 구성원(클러스터 A, B 및 C; 도 1)을 함유한다. 이것은 잠재적으로 비-사람 동물에서 사람 V 영역과 함께 항체를 생성하기 위해 비교적 가용한 다양성의 잠재적 풍부한 공급원이다.

[0162] 대조적으로, 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 단지 2개 또는 3개(종에 따라 상이함)의 마우스 $V\lambda$ 영역 유전자 분절을 함유한다(도 2). 적어도 상기 이유 때문에, 마우스에서 심한 κ 편중이 특히 전체 항체 다양성에 치명적인 것으로 사료되지 않는다.

[0163] 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 공개된 맵에 따르면, 상기 유전자좌는 필수적으로 대략 200kb의 범위내에서 2개 클러스터의 유전자 분절로 이루어진다(도 2). 상기 2개의 클러스터는 독립적으로 재배열될 수 있는 2개 세트의 V, J 및 C 유전자를 함유한다: $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ 및 $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$. $V\lambda 2$ 가 모든 $J\lambda$ 유전자 분절과 재조합하는 것으로 밝혀졌지만, $V\lambda 1$ 이 전적으로 $C\lambda 1$ 과 재조합하는 것으로 나타난다. $C\lambda 4$ 는 결함 스플라이스 부위를 갖는 의사 유전자인 것으로 사료된다.

[0164] 상기 마우스 κ 경쇄 유전자좌는 현저히 상이하다. 재조합 반응에 관여하여 마우스 κ 유전자좌로부터 기능성 경쇄 단백질을 유도하는 유전자 분절의 구조 및 수는 보다 더 복잡하다(도 3). 따라서, 마우스 λ 경쇄는 전형적인 마우스에서 항체 집단의 다양성에 크게 기여하지 않는다.

[0165] 마우스에서 사람 λ 경쇄 유전자좌의 풍부한 다양성을 이용하여 무엇보다 경쇄 V 도메인의 보다 완전한 사람 레퍼토리에 대한 공급원을 수득할 가능성이 높다. 상기 다양성을 이용하기 위한 이전의 시도는 무작위로 마우스 계놈에 도입된 사람 λ 경쇄 유전자좌의 무리를 함유하는 사람 전이유전자를 사용하였다(문현참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,998,514호 및 미국 특허 제7,435,871호). 이들 무작위로 통합된 전이유전자를 함유하는 마우스는 완전한 사람 λ 경쇄를 발현하지만 일부 경우에, 하나 또는 2개의 내인성 경쇄 유전자좌는 온전한 상태로 유지되는 것으로 보고되었다. 상기 상황은 마우스의 발현된 항체 레퍼토리에서 사람 λ 경쇄 서열이 마우스 경쇄(κ 또는 λ)와 경쟁하기 때문에 바람직할 수 없다.

[0166] 대조적으로, 본 발명자들은 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 대체하는 것으로 포함하여, 마우스 경쇄 유전자좌로부터 직접 하나 이상의 λ 경쇄 핵산 서열을 발현할 수 있는, 유전적으로 변형된 마우스를 기재한다. 내인성 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄 서열을 발현할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스는 사람 중쇄 유전자좌를 포함함으로써 완전히 사람인 V 영역(중쇄 및 경쇄)을 포함하는 항체를 발현하기 위해 사용되는 마우스와 추가로 교배

할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 상기 V 영역은 마우스 불변 영역과 함께 발현한다. 다양한 실시형태에서, 어떠한 내인성 마우스 면역글로불린 유전자 분절도 존재하지 않고 V 영역은 사람 불변 영역과 함께 발현한다. 이를 항체는 다수의 응용, 치료학적 뿐만 아니라 진단학적으로 유용한 것으로 입증된다.

[0167] 마우스에서 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절로부터 유도되는 결합 단백질을 발현하는 다양한 실시형태에 대한 많은 이점이 실현될 수 있다. 내인성 경쇄 유전자좌, 예를 들어, 마우스 κ 또는 λ 유전자좌에 사람 λ 서열을 위치시킴에 의해 이점이 실현될 수 있다. 상기 마우스로부터 제조된 항체는 마우스 C_L 영역, 특히 마우스 $C\kappa$ 또는 $C\lambda$ 영역과 융합된 사람 $V\lambda$ 도메인을 포함하는 경쇄를 가질 수 있다. 상기 마우스는 또한 사람 C_L 영역, 특히, $C\kappa$ 및/또는 $C\lambda$ 영역을 사용하여 동정하고 클로닝하기 위해 적합한 사람 $V\lambda$ 도메인을 발현할 것이다. 다른 한편 이러한 마우스에서 B 세포 개발은 통상적인 것이지만, $C\lambda$ 또는 $C\kappa$ 영역과 관련하여 호환성인 $V\lambda$ 도메인(체세포적으로 돌연변이된 $V\lambda$ 도메인을 포함함)을 제조할 수 있다.

[0168] 면역글로불린 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에서 재배열되지 않은 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스가 기재된다. $C\kappa$ 및/또는 $C\lambda$ 영역과 융합된 사람 $V\lambda$ 도메인을 갖는 경쇄를 포함하는 항체를 발현하는 마우스가 기재된다.

[0169] 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 멸균 전사체

[0170] 마우스에서 사람 면역글로불린 λ 서열을 발현하는 테마에 대한 다양성은 상기 발현을 수행할 수 있는 유전적으로 변형된 마우스의 다양한 실시형태로 반영된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 사람 유전자좌 유래의 비-암호화 서열(들)을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 변형된 마우스는 내인성 κ 경쇄 유전자좌에서 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하고 사람 κ 경쇄 게놈 단편을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 사람 κ 경쇄 게놈 단편은 사람 $V\kappa$ 유전자 분절과 사람 $J\kappa$ 유전자 분절 사이에서 천연적으로 발견되는 비-암호화 서열이다.

[0171] 상기 사람 및 마우스 κ 경쇄 유전자좌는 개시 코돈 또는 개방 판독 프레임이 결여된 멸균성 전사체를 암호화하고 κ 경쇄 유전자좌의 전사를 조절하는 요소로서 간주되는 서열을 포함한다. 이를 멸균성 전사체는 최외곽 $V\kappa$ 유전자 분절의 다운스트림 또는 3', 및 κ 경쇄 불변 영역 유전자($C\kappa$)의 업스트림인 κ 경쇄 인트론 인핸서(E κ i)의 업스트림 또는 5'에 위치한 유전자간 서열로부터 생성된다. 상기 멸균성 전사체는 $C\kappa$ 와 융합된 $V\kappa J\kappa 1$ 분절을 형성하기 위해 유전자간 서열의 재배열로부터 생성된다.

[0172] $C\kappa$ 유전자의 κ 경쇄 유전자좌 업스트림의 대체는 멸균성 전사체를 암호화하는 유전자간 영역을 제거한다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 마우스 $C\kappa$ 유전자의 마우스 κ 경쇄 서열 업스트림의 사람 λ 경쇄 유전자 분절로의 대체는 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 함유하지만 멸균성 전사체를 암호화하는 κ 경쇄 유전자간 영역을 함유하지 않는 사람화된 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 생성시킨다.

[0173] 본원에 기재된 바와 같이, 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 사용한 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 사람화(여기서, 상기 사람화는 유전자간 영역을 제거한다)는 κ 경쇄 유전자좌의 사용을 급격히 저하시키고, 이는 λ 경쇄 사용의 현저한 증가와 연관된다. 따라서, 유전자간 영역이 결여된 사람화된 마우스가 이것이 사람 경쇄 가변 도메인(예를 들어, 사람 λ 또는 κ 도메인)을 갖는 항체를 제조할 수 있다는 점에서 유용하지만 상기 유전자좌로부터의 사용은 감소한다.

[0174] 전사와 관련하여 최종 사람 $V\lambda$ 유전자 분절과 제1 사람 $J\lambda$ 유전자 분절 사이에, κ 유전자간 영역을 함유하는 $V\lambda$ 유전자좌를 생성하기 위해 사람 κ 유전자간 영역의 삽입과 연합된 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 갖는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 사람화가 또한 기재되고, 이는 κ 유전자간 영역이 결여된 유전자좌 보다 높은 발현을 갖는 B 세포 집단을 나타낸다. 상기 관찰은 상기 유전자간 영역이 직접적으로 멸균성 전사체를 통해 또는 간접적으로 내인성 λ 경쇄 유전자좌 유래의 사용을 억제하는 가설과 일치한다. 상기 가설하에, 유전자간 영역을 포함시키는 것은 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 사용을 감소시키고 마우스에게 제한적인 선택을 부여하여 변형된(λ 를 κ 로) 유전자좌를 사용하여 항체를 생성할 수 밖에 없다.

[0175] 다양한 실시형태에서, 마우스 $C\kappa$ 유전자의 업스트림에 있는 마우스 κ 경쇄 서열의 사람 λ 경쇄 서열로의 대체는 전사와 관련하여 3' 대부분의 $V\lambda$ 유전자 분절의 3' 비변역 영역과 제1 사람 $J\lambda$ 유전자 분절에 대한 5' 사이에 배치된 사람 κ 경쇄 유전자간 영역을 추가로 포함한다. 대안으로, 상기 유전자간 영역은 내인성 λ 경쇄 유전자좌 내에서 결실시킴에 의해 대체된 내인성 κ 경쇄 유전자좌(마우스 $C\kappa$ 유전자의 업스트림)로부터 제거될 수 있다. 또한, 상기 실시형태하에, 상기 마우스는 사람 λ 경쇄 서열을 함유하는 내인성 κ 경쇄 유전자

좌로부터 항체를 생성한다.

[0176] 사람 $V\lambda$ 도메인을 발현하도록 마우스를 조작하는 방법

[0177] 내인성 C_L (예를 들어, C_K 또는 C_A) 영역과 융합된 사람 $V\lambda$ 도메인을 갖는 경쇄를 함유하는 항체를 제조하는 유전적으로 변형된 마우스를 제조하는 다양한 접근법이 기재되어 있다. 다양한 실시형태에서, 하나 또는 2개의 내인성 경쇄 유전자좌의 결실을 포함하는 유전적 변형이 기재되어 있다. 예를 들어, 내인성 항체 레퍼토리로부터 마우스 λ 경쇄를 제거하기 위해, 제1 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터의 결실시킬 수 있고 제2 유전자 클러스터의 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절을 전체적으로 또는 부분적으로 사람 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절로 대체할 수 있다. 유전적으로 변형된 마우스 배아, 세포, 및 마우스, 마우스 배아 및 세포를 제조하기 위한 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0178] 하나의 내인성 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터의 결실 및 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절의 다른 내인성 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터로의 대체는 다양한 실시형태에서 동물에서 천연 항체 불변 영역 연합 및 기능을 비교적 최소로 파괴하는데, 이는 내인성 $C\lambda$ 유전자가 온전하게 남아있고 따라서 내인성 중쇄의 불변 영역과 연합하는 정상적인 기능 및 능력을 유지하고 있기 때문이다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 상기 변형은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 함유하는 기능성 항체 분자의 어셈블리를 위한 기능성 경쇄 불변 영역에 의존하여 다른 내인성 중쇄 불변 영역에 영향을 주지 않는다. 추가로, 다양한 실시형태에서, 상기 변형은 내인성 중쇄 및 경쇄, 예를 들어, 마우스 $C\lambda$ 영역에 연결된 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 기능성 막-결합된 항체 분자의 어셈블리에 영향을 주지 않는다. 하나 이상의 기능성 $C\lambda$ 유전자는 내인성 유전자좌에 유지되어 있기 때문에, 내인성 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터의 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절이 사람 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절로 대체됨을 포함하는 동물은 동물의 발현된 항체 레퍼토리에 존재하는 사람 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절을 통해, 면역 반응 동안에 항원과 결합할 수 있는 정상적인 λ 경쇄를 제조할 수 있어야만 한다.

[0179] 결실된 내인성 마우스 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터의 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 2에 제공된다. 도시된 바와 같이, 상기 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 유전자 클러스터로 구성되어 있고 상기 클러스터 둘 다는 재조합하여 기능성 마우스 λ 경쇄를 형성할 수 있는 기능성 유전자 분절을 함유한다. 상기 내인성 마우스 $V\lambda 1-J\lambda 3-C\lambda 3-J\lambda 1-C\lambda 1$ 유전자 클러스터는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 갖는 표적화 작제물(표적화 벡터 1)에 의해 결실된다. 다른 내인성 유전자 클러스터($V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2-C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$)는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 하이그로마이신-티미딘 키나제 카세트를 갖는 표적화 작제물(표적화 벡터 2)에 의해 부분적으로 결실된다. 상기 제2 표적화 반응에서, $C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$ 내인성 유전자 분절은 유지된다. 상기 제2 표적화 작제물(표적화 벡터 2)은 제1 표적화 작제물(표적화 벡터 1)과 부위들과 상이한 재조합 부위를 사용하여 성공적인 표적화가 성취된 후 선별 카세트를 선택적으로 결실시킴에 의해 작제된다. 수득한 이중-표적화된 유전자좌는 어떠한 내인성 λ 경쇄가 제조될 수 없다는 점에서 기능적으로 침묵된다. 상기 변형된 유전자좌는 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 λ 유전자좌를 제조하기 위한 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 위해 사용될 수 있고, 이로써 상기 변형된 유전자좌에서 재조합시 상기 동물은 내인성 마우스 $C\lambda$ 유전자 분절과 연결된 재배열된 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄를 생성한다.

[0180] 다양한 실시형태에서, 내인성 λ 유전자 분절을 비기능성이도록 하는 마우스의 유전적 변형은 이의 항체 레퍼토리에서 전적으로 K 경쇄를 나타나는 마우스를 유도하여, 상기 마우스는 면역 반응에서 λ 경쇄의 역할을 평가하는데 유용하게 하고 V_K 도메인을 포함하지만 $V\lambda$ 도메인을 포함하지 않는 항체 레퍼토리를 제조하는데 유용하게 된다.

[0181] 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 재조합된 마우스 $C\lambda$ 유전자에 연결된 $hV\lambda$ 를 발현하는 유전적으로 변형된 마우스는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 사람 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 사용하여 내인성 마우스 $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2$ 유전자 분절을 대체하는 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 4a에 제공된다. 도시된 바와 같이, 비기능성이 부여된 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌는 재조합 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 포함하는 표적화 작제물(12/1- λ 표적화 벡터)에 의해 대체된다. 상기 $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2$ 유전자 분절은 12 $hV\lambda$ 유전자 분절 및 단일 $hJ\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 사람 λ 서열을 함유하는 게놈 단편으로 대체된다.

[0182] 따라서, 상기 제1 접근법은 단일 $hJ\lambda$ 유전자 분절과 연속성인 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절을 위치시킨다(도 4a).

[0183] 상기 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 대한 추가의 변형은 보다 많은 $hV\lambda$ 유전자 절편을 삽입하는 유사한 기

술을 사용하여 성취될 수 있다. 예를 들어, 부가적 사람 $hV\lambda$ 유전자 분절의 점진적 삽입을 위해 사용되는 2개의 부가적 표적화 작제물(+16- λ 및 +12- λ 표적화 벡터)의 도식적 도해는 도 5a에 제공된다. 도시된 바와 같이, 특정 사람 $hV\lambda$ 유전자 분절을 함유하는 부가적 게놈 단편은 사람 λ 경쇄 서열의 이전의 삽입에 의해 제공된 상동성을 사용하는 성공적인 단계로 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 삽입된다. 도시된 각각의 표적화 작제물과의 재조합시, 연속된 방식으로 28개의 부가적 $hV\lambda$ 유전자 분절이 변형된 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 삽입된다. 이것은 마우스 $C\lambda$ 유전자에 연결된 사람 $V\lambda-J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄 단백질을 생성하는 키메라 유전자좌를 생성시킨다.

[0184] 상기 마우스 λ 유전자좌에 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 삽입하기 위한 상기 접근법은 $C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$ 유전자 분절의 다운스트림에 위치한 인핸서(Enh 2.4, Enh 및 Enh 3.1로 지정됨, 도 4a 및 도 5a)를 유지한다. 상기 접근법은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에 단일 변형된 대립 유전자를 생성시킨다(도 7a).

[0185] 마우스 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동적으로 연결된 $hV\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 경쇄를 발현하는 마우스를 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공되고, 이는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌로부터 상기 유전자를 발현하는 마우스를 제조하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 상기 방법은 하나의 내인성 마우스 $V\lambda-J\lambda-C\lambda$ 유전자 클러스터가 선택적으로(예를 들어, 표적화된 결실에 의해) 비기능성이 되도록 하고 마우스에서 $hV\lambda$ 도메인을 발현하기 위해 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 $hV\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 사용함을 포함한다.

[0186] 대안으로, 제2 접근법에서, 사람 λ 경쇄 유전자 분절은 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 위치할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 상기 유전적 변형은 내인성 κ 경쇄 유전자좌의 결실을 포함한다. 예를 들어, 내인성 항체 레퍼토리로부터 마우스 κ 경쇄를 제거하기 위해, 마우스 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절을 결실시킬 수 있다. 유전적으로 변형된 마우스 배아, 세포, 및 상기 마우스, 마우스 배아 및 세포를 제조하기 위한 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0187] 상기 진술된 이유때문에, 마우스 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절의 결실은 비교적 최소의 파괴를 사용한다. 결실된 마우스 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절의 도식적 도해(규모화하기 위한 것이 아님)는 도 3에 제공된다. 상기 내인성 마우스 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절은 각각 부위-특이적 재조합 부위를 사용하는 2개의 정확하게 위치된 표적화 벡터 사이의 마우스 서열 위치를 리컴비나제-매개 결실을 통해 결실시킨다. 제1 표적화 벡터($J\kappa$ 표적화 벡터)는 마우스 $J\kappa$ 유전자 분절을 결실시키기 위한 제1 표적화 반응에 사용된다. 제2 표적화 벡터($V\kappa$ 표적화 벡터)는 최외곽 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절의 5'에 위치한 서열을 결실시키기 위한 제2 연속 표적화 반응에 사용된다. 2개의 표적화 벡터는 부위-특이적 재조합 부위를 함유하여 이로써 성공적인 표적화가 성취된 후 선별 카세트 및 모든 간접 마우스 κ 경쇄 서열 둘 다가 선택적으로 결실된다. 상기 수득한 결실된 유전자좌는 어떠한 내인성 κ 경쇄도 제조될 수 없다는 점에서 기능적으로 침목된다. 상기 변형된 유전자좌는 $hV\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 κ 유전자좌를 제조하기 위한 $hV\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 위해 사용될 수 있고, 이로써 상기 변형된 유전자좌에서 재조합시, 상기 동물은 내인성 마우스 $C\kappa$ 유전자 분절에 작동적으로 연결된 재배열된 $hV\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함하는 λ 경쇄를 생성한다. 사람 λ 경쇄 서열을 포함하는 다양한 표적화 벡터는 마우스 $C\kappa$ 영역과 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 함유하는 하이브리드 경쇄 유전자좌를 제조하기 위해 상기 결실된 마우스 κ 유전자좌와 연계하여 사용될 수 있다.

[0188] 따라서, 제2 접근법은 하나 이상의 사람 $V\lambda$ 유전자 분절을 단일 사람 $J\lambda$ 유전자 분절과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12/1- κ 표적화 벡터, 도 4b)에 위치시키는 것이다.

[0189] 다양한 실시형태에서, 상기 접근법에 대한 변형은 유전자 분절 및/또는 조절 서열을 부가하여 마우스 항체 레퍼토리내 마우스 κ 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄 서열의 사용을 최적화하도록 수행될 수 있다.

[0190] 제3 접근법에서, 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절은 4개의 $hJ\lambda$ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12/4- κ 표적화 벡터 도 4b)에 위치한다.

[0191] 제3 접근법에서, 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절은 사람 κ 유전자간 서열 및 단일 $hJ\lambda$ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12(κ)1- κ 표적화 벡터, 도 4b)에 위치한다.

[0192] 제4 접근법에서, 하나 이상의 $hV\lambda$ 유전자 분절은 사람 κ 유전자간 서열 및 4개의 $hJ\lambda$ 유전자 서열과 연속성인 마우스 κ 경쇄 유전자좌(12(κ)4- κ 표적화 벡터 도 4b)에 위치한다.

[0193] 마우스 κ 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 삽입하기 위한 상기 모든 접근법은 $C\kappa$ 유전자의 업스트림에 κ 인트론 인핸서 요소($E_{\kappa i}$ 로 지정됨, 도 4b 및 도 5b) 및 $C\kappa$ 유전자의 다운스트림에 3' κ 인핸서($E_{\kappa 3'}$ 으로 지정됨, 도 4b 및 도 5b)를 유지한다. 상기 접근법은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에서 4개의 분리된

변형된 대립 유전자를 생성시킨다(도 7b).

[0194] 다양한 실시형태에서, 유전적으로 변형된 마우스는 상기 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 녹아웃을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 λ 경쇄 유전자좌는 $V\lambda 2$ 내지 $J\lambda 2$ 에 걸친 영역 및 $V\lambda 1$ 내지 $C\lambda 1$ 에 걸친 영역을 결실시키는 전략에 의해 녹아웃된다(도 2). 내인성 λ 도메인을 발현하는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 능력을 감소시키거나 제거하는 임의의 전략은 상기된 실시형태를 사용하기 위해 적합하다.

[0195] 유전적으로 변형된 마우스 유래의 람다 도메인 항체

[0196] 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 서열을 포함하는 마우스는 마우스 $C\kappa$ ($C\kappa$ 또는 $C\lambda$) 영역과 융합된 $hV\lambda$ 영역을 포함하는 경쇄를 발현할 것이다. 이들은 (a) 기능적으로 침묵된 경쇄 유전자좌(예를 들어, 내인성 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌의 녹아웃)를 포함하고; (b) 내인성 마우스 $C\lambda$ 유전자에 작동적으로 연결된 hV 및 hJ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 포함하고; (c) 내인성 마우스 $C\kappa$ 유전자와 작동적으로 연결된 $hV\kappa$ 및 $hJ\kappa$ 유전자 분절을 포함하는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 포함하고; (d) 하나의 κ 대립 유전자가 $hV\kappa$ 및 $hJ\kappa$ 를 포함하고, 다른 하나의 κ 대립 유전자가 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고; 하나의 λ 대립 유전자가 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고 하나의 λ 대립 유전자가 침묵되거나 녹아웃되거나, λ 대립 유전자 둘 다가 $hV\lambda$ 및 $hJ\lambda$ 를 포함하고; 2개의 중쇄 대립 유전자가 각각 hV_H , hD_H , 및 hJ_H 를 포함하는 마우스에 유리하게 접종된다.

[0197] $C\kappa$ 또는 $C\lambda$ 로 발현되는 $hV\lambda$ 도메인을 포함하는 항체는 $hV\lambda$ 도메인을 암호화하는 핵산을, 사람 $C\lambda$ 를 암호화하는 유전자를 함유하는 발현 작제물에 클로닝함에 의해 완전한 사람 항체를 제조하기 위해 사용하였다. 수득한 발현 작제물은 $hC\lambda$ 와 융합된 완전한 $hV\lambda$ 도메인을 나타내는 항체를 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포로 전달된다.

[0198] 실시예

[0199] 다음 실시예는 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 위해 제공되고 본 발명자가 이들의 발명으로서 간주되는 것의 범위를 제한하려 하는 것이 아니다. 달리 특정되지 않는 경우, 온도는 섭씨로 나타내고 압력은 대기압 근처이다.

[0200] 실시예 I

[0201] 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌의 결실

[0202] 다양한 표적화 작제물은 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화하기 위해 마우스 계놈 세균 인조 염색체(BAC) 라이브러리를 변형시키기 위한 VELOCIGENE® 기술(문헌참조: 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela et al.(2003)), 고상도 발현 분석과 커플링된 마우스 계놈의 고속 처리 엔지니어링(문헌참조: Nature Biotech. 21(6):652-659)을 사용하여 제조하였다.

[0203] 마우스 λ 경쇄 유전자좌의 결실. 마우스 BAC 클론 RP23-135k15 (Invitrogen) 유래의 DNA는 상기 $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 클러스터의 표적화된 결실을 통해 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌를 불활성화시키기 위한 상동성 재조합으로 변형시켰다(도 2).

[0204] 간략하게, $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ 유전자 분절을 포함하는 전체 인접한 클러스터는 $V\lambda 1$ 유전자 분절의 5' 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암 및 $C\lambda 1$ 유전자 분절의 3' 서열을 함유하는 3' 마우스 상동성 암과 함께 loxP 부위로 플랭킹된 네오마이신 카세트를 포함하는 표적화 벡터(도 2, 표적화 벡터 1)를 사용한 단일 표적화 반응에서 결실시켰다.

[0205] 제2 표적화 작제물은 $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ 를 함유하는 원거리 내인성 마우스 λ 유전자 클러스터를 정확하게 결실시켜 제조하였고, 단 상기 표적화 작제물은 $V\lambda 2$ 유전자 분절의 5' 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암 및 내인성 $C\lambda 2$ 유전자 분절에 대한 5' 서열을 함유하는 3' 마우스 상동성 암을 함유한다(도 2, 표적화 벡터 2). 따라서, 상기 제2 표적화 작제물은 $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ 가 정확하게 결실된 반면 내인성 마우스 λ 유전자좌에서 $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ 는 온전하게 잔류한다. 불활성화된 내인성 λ 유전자좌(상기된 바와 같음)를 함유하는 ES 세포는 당업계에 공지된 핵형분석 및 스크리닝 방법(예를 들어, TAQMAN®)에 의해 확인하였다. 이어서, DNA는 변형된 ES 세포로부터 분리하고 CRE 리컴비나제로 처리하여 네오마이신 마커 유전자를 함유하는 인접한 표적화 카세트의 결실을 매개하고 결실 부위에서 단일의 loxP 부위가 잔류하도록 한다(도 2, 하부).

[0206] 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 결실. 수개의 표적화 작제물은 상기된 유사한 방법을 사용하여 제조하여 2단계 공정

으로 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 불활성화시키기 위한 상동성 재조합에 의해 마우스 BAC 클론 RP23-302g12 및 RP23-254m04(Invitrogen) 유래의 DNA를 변형시킨다(도 3).

[0207] 간략하게, 상기 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 $J\kappa$ 유전자 분절(1-5)을 hyg-TK 카세트에 대한 3'에 단일 loxP 부위를 함유하는 하이그로마이신-티미딘 키나제(hyg-TK) 카세트를 포함하는 표적화 벡터(도 3, $J\kappa$ 표적화 벡터)를 사용하여 단일 표적화 반응으로 결실시켰다. 상기 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 상동성 암은 내인성 마우스 $J\kappa$ 유전자 분절의 5' 및 3'에 마우스 게놈 서열을 함유하였다. 제2 표적화 반응에서, 제2 표적화 벡터는 가장 원거리의 내인성 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절에 대해 5' 업스트림에 있는 마우스 게놈 서열 일부 결실시켜 제조하였다(도 3, $V\kappa$ 표적화 벡터). 상기 표적화 벡터는 역위된 lox511 부위, loxP 부위 및 네오마이신 카세트를 함유하였다. 상기 표적화 벡터를 제조하기 위해 사용되는 상동성 암은 가장 원거리의 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절의 업스트림에 마우스 게놈 서열을 함유하였다. 상기 표적화 벡터는 ES 세포내에서 DNA를 표적화하기 위해 연속적인 방식(즉, $J\kappa$ 에 이어서 $V\kappa$)으로 사용하였다. 이중-표적화된 염색체(즉, 2개의 표적화 벡터로 표적화된 단일 내인성 마우스 κ 유전자좌)를 함유하는 ES는 당업계에 공지된 핵형분석 및 스크리닝 방법(예를 들어, TaqmanTM)에 의해 확인하였다. 이어서, DNA는 변형된 ES 세포로부터 분리하고 Cre 리糍비나제로 처리하여 내인성 마우스 $V\kappa$ 유전자 분절 및 선별 카세트 둘 다의 결실을 매개하고 서로 반대 배향인 2개의 병치된 lox 부위를 유지시킨다(도 3, 하부; 서열번호 1).

[0208] 따라서, 온전한 인핸서 및 불변 영역을 함유하는 2개의 변형된 내인성 경쇄 유전자좌(κ 및 λ)는 하기된 표적화 벡터를 사용한 정확한 방식으로 재배열되지 않은 사람 λ 생식선 유전자 분절을 점진적으로 삽입하기 위해 제조하였다.

[0209] 실시예 II

[0210] 마우스 경쇄 유전자좌의 사람 λ 경쇄 소형-유전자좌로의 대체

[0211] 다중 표적화 벡터는 상기된 유사한 방법을 사용하여 사람 λ 유전자 분절을 내인성 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌로 점진적으로 삽입하기 위해 조작하였다. 다수의 독립적인 초기 변형은 내인성 경쇄 유전자좌에 대하여 각각 마우스 경쇄 불변 유전자 및 인핸서에 작동적으로 연결된 hV λ 및 hJ λ 유전자 분절을 함유하는 키메라 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0212] 12개의 사람 V λ 및 1개의 사람 J λ 유전자 분절을 함유하는 사람 λ 소형-유전자좌. 일련의 초기 표적화 벡터는 RP11-729g4(Invitrogen)로 호칭되는 사람 BAC 클론을 사용하여 클러스터 A 기원의 제1의 12개의 연속 사람 V λ 유전자 분절 및 hJ λ 1 유전자 분절 또는 4개의 hJ λ 유전자 분절을 함유하도록 조작하였다. 도 4a 및 4b는 각각 마우스 λ 및 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 초기 삽입체를 제조하기 위해 작제된 표적화 벡터를 보여준다.

[0213] 초기 표적화 벡터의 제1 세트에 대해, 12개 hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1 유전자 분절을 함유하는 729g4 BAC 클론 유래의 124,125 bp DNA 단편은 3' 마우스 상동성 암의 연결을 위해 hJ λ 1 유전자 분절 다운스트림(3')에 PI-SceI 부위 996bp를 함유하도록 조작하였다. 2개의 상이한 세트의 상동성 암은 상기 사람 단편으로의 연결을 위해 사용하였고; 상동성 암의 하나의 세트는 135k15 BAC 클론 유래의 내인성 마우스 λ 서열을 함유하고(도 4a) 또 다른 세트는 각각 마우스 BAC 클론 RP23-302g12 및 RP23-254m04 기원의 마우스 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절의 5' 및 3'에 내인성 κ 서열을 함유하였다(도 4b).

[0214] 12/1- λ 표적화 벡터에 대해(도 4a), PI-SceI 부위는 마우스 C λ 2-J λ 4-C λ 4 및 실시예 1에 기재된 변형된 마우스 λ 유전자좌의 인핸서 2.4를 함유하는 27,847 bp DNA 단편의 5' 말단에서 조작하였다. 상기 약 28 kb 마우스 단편은 5'에서 3'로, hJ λ 1 유전자 분절, hJ λ 1 유전자 분절의 3'에 996 bp의 사람 λ 서열, 마우스 C λ 2 유전자에 대해 5'의 1229bp의 마우스 λ 서열, 마우스 C λ 2 유전자 및 약 28kb의 마우스 단편의 나머지 부분을 함유하는 3' 접합부를 생성시키는, 약 124kb 사람 λ 단편으로부터의 연결에 의해 3' 상동성 암으로서 사용하였다. 사람 V λ 3-12 유전자 분절 기원의 업스트림(5')은 내인성 마우스 λ 유전자좌의 5' 서열에 상응하는 23,792bp의 마우스 게놈 DNA를 함유하는, 5' 마우스 상동성 암의 개시부 전에 부가적인 1456 bp의 사람 λ 서열이다. 사람 λ 서열의 5' 상동성 암 및 개시부 사이에 Frt 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트가 있다.

[0215] 따라서, 상기 12/1- λ 표적화 벡터는 5'에서 3'로 내인성 λ 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 λ 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 연속 hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb의 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위, 및 내인성 C λ 2-J λ 4-C λ 4 유전자 분절을 포함하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열, 마우스 인핸서 2.4 서열 및 인핸서 2.4의 다운스트림(3')에

추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4a).

[0216] 유사한 방식으로, 상기 12/1-κ 표적화 벡터(도 4b)는 동일한 약 124 사람 λ 단편을 사용하고 단, 마우스 κ 서열을 함유하는 마우스 상동성 암은 내인성 κ 유전자좌로의 표적화가 상동성 재조합에 의해 성취될 수 있도록 사용된다. 따라서, 12/1-κ 표적화 벡터는 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 연속 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절을 함유하는 약 124kb의 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위 및 내인성 C κ 유전자, Eκi 및 Eκ3'을 함유하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열 및 Eκ3'의 다운스트림(3')에 추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4b, 12/1-κ 표적화 벡터).

[0217] 이들 2개의 초기 표적화 벡터 중 하나를 사용한 상동성 재조합으로 재조합 즉시 키메라 λ 경쇄의 형성을 유도하는 상기 내인성 마우스 경쇄 불변 유전자 및 인핸서(Cκ 또는 Cλ2 및 Eκi/Eκ3' 또는 Enh2.4/Enh3.1)에 작동적으로 연결된 12hVλ 유전자 분절 및 hJλ1 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 경쇄 유전자좌(κ 또는 λ)를 제조하였다.

[0218] 12개 사람 Vλ 및 4개 사람 Jλ 유전자 분절을 갖는 사람 λ 소형-유전자좌. 키메라 λ 경쇄 유전자좌에 다양성을 부가하기 위한 또 다른 방법에서, 제3 초기 표적화 벡터는 클러스터 A로부터의 제1의 12개 연속 사람 Vλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 마우스 κ 경쇄 유전자좌로 삽입하도록 조작한다(도 4b, 12/4-κ 표적화 벡터). hJλ1, Jλ2, Jλ3 및 Jλ7 유전자 분절을 함유하는 DNA 분절은 드 노보 DNA 합성 (Integrated DNA Technologies)에 의해 제조하고, 이는 각각 Jλ 유전자 분절 및 각각 Jλ 유전자 분절의 5' 및 3'에 바로인접한 영역 둘 다 기원의 약 100bp의 사람 게놈 서열을 함유한다. PI-SceI 부위는 상기 약 1kb의 DNA 단편의 3' 말단내로 조작하고 클로로람페니콜 카세트에 연결한다. 상동성 암은 사람 BAC 클론 729g4의 hJλ1 유전자 분절에 대한 5' 및 3' 위치에서 사람 λ 서열로부터 PCR 증폭시켰다. 상기 인터메디에이트 표적화 벡터를 사용한 상동성 재조합은, 5' Frt 부위에 대해 5'에서 I-CeuI 부위를 또한 함유하는 Frt 부위에 의해 플랭킹된 네오마이신 카세트를 갖는 사람 Vλ3-12 유전자 분절의 업스트림(5')에서 표적화된 변형된 729g4 BAC 클론에 대해 수행하였다. 상기 이중-표적화된 729g4 BAC 클론은 5'에서 3'로 I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb의 단편, 사람 Jλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하는 약 1 kb 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 포함한다. 상기 인터메디에이트 표적화 벡터는 I-CeuI 및 PI-SceI와 함께 분해하고 후속적으로 변형된 마우스 BAC 클론(상기된 바와 같은)에 연결하여 제3 표적화 벡터를 제조한다.

[0219] 상기 연결로 사람 λ 서열을 상기 내인성 κ 경쇄 유전자좌로 삽입하기 위한 제3 표적화 벡터를 수득하였고, 상기 벡터는 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 마우스 상동성 암, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개의 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123kb 단편 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하는 약 1kb의 단편, 사람 게놈 λ 서열, PI-SceI 부위 및 내인성 마우스 Cκ 유전자, Eκi 및 Eκ3'을 함유하는 약 28kb의 마우스 게놈 서열 및 Eκ3'의 다운스트림(3')에 추가의 마우스 게놈 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다(도 4b, 12/1-κ 표적화 벡터)를 함유한다. 상기 제3의 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 재조합 즉시, 키메라 사람 λ/마우스 κ 경쇄의 형성을 유도하는, 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된, 12개 hVλ 유전자 분절 및 4개의 hJλ 유전자 분절을 함유하는 변형된 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0220] 통합된 사람 κ 경쇄 서열을 갖는 사람 λ 소형-유전자좌.

[0221] 유사한 양상으로, 사람 λ 유전자 분절의 내인성 κ 경쇄 유전자좌로의 초기 삽입체(도 4b, 12/1-λ 및 12/4-κ 표적화 벡터)를 제조하기 위해 조작된 것들과 유사한 2개의 추가의 표적화 벡터는 연속 사람 λ 및 κ 게놈 서열을 함유하는 고유 작제된 표적화 벡터를 사용하여 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 점진적으로 삽입하기 위해 조작하였다. 이들 표적화 벡터는 사람 Vκ4-1 및 Jκ1 유전자 분절 사이에 천연적으로 위치된 약 23kb의 사람 κ 게놈 서열을 함유하도록 작제하였다. 상기 사람 κ 게놈 서열은 사람 Vλ 및 사람 Jλ 유전자 분절 사이에 이들 2개의 추가의 삽입 벡터(도 4b, 12(κ)-κ 및 12(κ)4-κ 표적화 벡터) 내에 특이적으로 위치시켰다.

[0222] 사람 κ 게놈 서열을 함유하는 2개의 표적화 벡터는 상기된 변형된 RP11-729g4 BAC 클론을 사용하여 제조하였다(도 6). 상기 변형된 BAC 클론은 NotI 및 AsI SI 제한 부위로 플랭킹된 스펙티노마이신 선별 카세트로 표적화하였다(도 6, 상부 좌측). 스펙티노마이신 카세트와의 상동성 재조합으로 5'에서 3'로 I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, 제1의 12개 hVλ 유전자 분절을 함유하는 약 123 kb 단편, hVλ3-1 유전자 분절의 노나며 서열에 대해 약 200bp 다운스트림(3')에 있는 NotI 부위, 스펙티노마이신 카세트 및 AsI SI 부위를

함유하는 이중-표적화된 729g4 BAC 클론을 수득하였다. 사람 κ 서열을 함유하는 분리된 사람 BAC 클론(CTD-2366j12)은 2회 별도의 시점에 hV κ 4-1 및 hJ κ 1 유전자 분절 사이의 위치에서 제한 부위를 조작하여 이중 표적화된 변형된 729g4 BAC 클론내 함유된 hV λ 유전자 분절과의 연결을 위한 약 23kb 단편의 후속적 클로닝이 가능하도록 표적화하였다(도 6, 상부 우측).

[0223] 간략하게, 상기 2366j12 BAC 클론은 크기가 약 132 kb이고 hV κ 유전자 분절1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, V κ 유전자 분절의 다운스트림에 있는 사람 κ 게놈 서열, hJ κ 유전자 분절 1-5, hC κ 및 사람 κ 유전자좌의 약 20kb의 추가 게놈 서열을 함유한다. 상기 클론은 먼저 Frt 부위로 플랭킹된 하이그로마이신 카세트 및 상기 3' Frt 부위의 다운스트림(3')에 있는 NotI 부위를 함유하는 표적화 벡터로 표적화하였다. 상기 표적화 벡터에 대한 상동성 암은 BAC 클론내에 V κ 유전자 분절의 5' 및 3'에 사람 게놈 서열을 함유하여 상기 표적화 벡터와 상동성 재조합하여 상기 V κ 유전자 분절은 결실되고 NotI 부위는 hV κ 4-1 유전자 분절의 약 133bp의 다운스트림에서 조작된다(도 6, 상부 우측). 상기 변형된 2366j12 BAC 클론은 3' 말단에서 2개의 표적화 벡터로 독립적으로 표적화하여 hJ λ 1 유전자 분절, PI-SceI 부위 및 AsiSI 부위 또는 4개의 hJ λ 유전자 분절(상기 참조), PI-SceI 부위 및 AsiSI 부위를 함유하는 사람 λ 게놈 단편을 또한 함유하는 클로로람페니콜 카세트를 갖는 hJ κ 유전자 분절을 결실시킨다(도 6, 상부 우측). 이들 2개의 유사한 표적화 벡터에 대한 상동성 암은 hJ κ 유전자 분절의 5' 및 3'에 서열을 함유한다. 이들 제2 표적화 벡터 및 상기 변형된 2366j12 BAC 클론과의 상동성 재조합으로 5'에서 3'로, 5' Frt 부위, 하이그로마이신 카세트, 3' Frt 부위, NotI 부위, V κ 4-1과 J κ 1 유전자 분절 사이에 유전자간 영역을 함유하는 사람 κ 유전자좌의 22,800 bp 게놈 단편, hJ λ 1 유전자 분절 또는 hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 및 J λ 7을 함유하는 사람 λ 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 이중 표적화된 2366j12 클론을 수득하였다(도 6, 상부 우측). 2개의 추가의 변형을 만들기 위한 2개의 최종 표적화 벡터는 이중-표적화된 729g4 및 2366j12 클론을 사용하는 2개의 연결 단계에 의해 성취하였다.

[0224] 이중 표적화된 729g4 및 2366j12 클론은 NotI 및 AsiSI로 분해하여 각각 네오마이신 카세트 및 hV λ 유전자 분절을 함유하는 하나의 단편 및 V κ 4-1과 J κ 1 유전자 분절 사이의 유전자간 영역을 함유하는 사람 κ 유전자좌의 약 23kb의 게놈 단편, hJ λ 1 유전자 분절 또는 hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 및 J λ 7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 또 다른 단편을 수득한다. 이들 단편들의 연결은 5'에서 3'로 hV λ 유전자 분절, V κ 4-1과 J κ 1 유전자 분절 사이에 사람 κ 게놈 서열, hJ λ 1 유전자 분절 또는 hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 및 J λ 7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, 게놈 단편, PI-SceI 부위 및 클로로람페니콜 카세트를 함유하는 2개의 독특한 BAC 클론을 생성시켰다(도 6, 하부). 이들 새로운 BAC 클론은 이어서 I-CeuI 및 PI-SceI로 분해하여 업스트림 네오마이신 카세트 및 연속 사람 λ 및 κ 서열을 함유하는 독특한 단편들을 병출시키고 5'에서 3'로 내인성 κ 유전자좌의 5'에 마우스 게놈 서열, I-CeuI 부위, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위, hV λ 유전자 분절(3-12 내지 3-1), V λ 3-1의 약 200bp 다운스트림에 NotI 부위, 사람 V κ 4-1 및 J κ 1 유전자 분절 사이에서 천연적으로 발견되는 약 23kb의 사람 κ 서열, hJ λ 1 유전자 분절 또는 hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 및 hJ λ 7 유전자 분절을 함유하는 게놈 단편, 마우스 E κ i, 마우스 C κ 유전자 및 E κ 3'를 함유하는 변형된 마우스 BAC 클론 302g12에 연결시켰다(도 4, 12hV λ -V κ J κ -hJ λ 1 및 12hV λ -V κ J κ -4hJ λ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터 둘 다와의 상동성 재조합으로 12hV λ 유전자 분절, 사람 κ 게놈 서열 및 내인성 마우스 C κ 유전자와 작동적으로 연결된 하나 또는 4개의 hJ λ 유전자 분절을 제조하여 이는 재조합 즉시 키메라 사람 λ/마우스 κ 경쇄의 형성을 유도한다.

[0225] 실시예 III

[0226] 사람 λ 경쇄 소형-유전자좌로 추가의 사람 V λ 유전자 분절의 조작

[0227] 추가의 hV λ 유전자 분절은 유사한 표적화 벡터 및 방법을 사용하여 실시예 2에 기재된 초기 변형 각각에 독립적으로 부가하였다(도 5a, +16-λ 표적화 벡터 및 도 5b, +16-κ 표적화 벡터).

[0228] 16개 추가의 사람 V λ 유전자 분절의 도입. 16개 추가의 hV λ 유전자 분절을 실시예 2에 기재된 변형 유전자좌로 첨가하기 위한 표적화 벡터를 제조하는데 사용되는 업스트림(5') 상동성 암은 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 마우스 게놈 서열을 함유한다. 상기 3' 상동성 암은 모든 표적화 벡터에 대해 동일하고 실시예 2에 기재된 바와 같이 변형의 사람 λ 서열의 5' 말단과 중첩하는 사람 게놈 서열을 함유한다.

[0229] 간략하게, 2개의 표적화 벡터는 실시예 2에 기재된 변형된 마우스 경쇄 유전자좌에 16개 추가의 hV λ 유전자 분절의 도입을 위해 조작하였다(도 5a 및 도 5b, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터). 클러스터 A 기원의 21개 연속 hV λ 유전자 분절을 함유하는 사람 BAC 클론 RP11-761113 (Invitrogen) 기원의 약 172kb의 DNA 단편을 내인성 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에 대해 5'에 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암 및 사람 게놈 λ 서열을 함

유하는 3' 상동성 암과 함께 조작한다. 이들 표적화 작제물에 사용되는 5' 마우스 κ 또는 λ 상동성 암은 실시 예 2에 기재된 것과 동일한 5' 상동성 암이다(도 5a 및 5b). 상기 3' 상동성 암은 실시예 2에 기재된 약 123kb 단편의 사람 게놈 λ 서열의 동등한 5' 말단에 상응하는 사람 게놈 λ 서열의 53,057 bp 중첩을 함유한다. 이들 2개의 표적화 벡터는 5'에서 3'로, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 23kb의 게놈 서열 또는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 게놈 서열, 5' Frt 부위, 하이그로마이신 카세트, 3' Fit 부위, 및 실시예 3에 기재된 사람 λ 서열의 5' 말단과 약 53kb가 충접하고 표적화 작제물에 대해 3' 상동성 암으로서 작용하는 21개 연속 hVλ 유전자 분절을 함유하는 171, 457 bp의 사람 게놈 λ 서열을 함유한다(도 5a 및 5b, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 각각 28 hVλ 유전자 분절 및 내인성 마우스 불변 유전자 (Cκ 또는 Cλ2)에 작동적으로 연결된 hJλ1 유전자 분절을 함유하고 재조합 즉시 키메라 경쇄를 형성하는 독립적으로 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0230]

유사한 양상으로, 상기 +16-κ 표적화 벡터를 또한 사용하여 16개의 추가의 hVλ 유전자 분절을, 통합된 사람 κ 서열의 존재 및 부재하에 다중 hJλ 유전자 분절을 혼입시키는 실시예 2에 기재된 다른 초기 변형에 도입하였다(도 4b). 다른 초기 변형을 함유하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 상기 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열의 존재 또는 부재하에 28 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 3 및 7 유전자 분절을 함유하여 재조합 즉시 키메라 λ-κ 경쇄를 형성하는 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0231]

12개 추가의 사람 Vλ 유전자 분절의 도입. 추가의 hVλ 유전자 분절은 독립적으로 유사한 표적화 벡터 및 방법을 사용하여 상기된 변형 각각에 부가하였다. 추가의 hVλ 유전자 분절을 함유하는 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로부터 수득된 최종 유전자좌 구조는 도 7a 및 7b에 나타낸다.

[0232]

간략하게, 표적화 벡터는 상기된 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌로 12개 추가의 hVλ 유전자 분절의 도입을 위해 조작하였다(도 5a 및 5b, +12-λ 또는 12-κ 표적화 벡터). 클러스터 B 기원의 12개의 연속 hVλ 유전자 분절을 함유하는 사람 BAC 클론 RP11-22I18 (Invitrogen) 기원의 93,674 bp의 DNA 단편은 내인성 마우스 κ 또는 λ 경쇄 유전자좌에 대해 5' 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암 및 사람 게놈 λ 서열을 함유하는 3' 상동성 암으로 조작하였다. 상기 표적화 작제물에 사용되는 5' 상동성 암은 상기된 16개 hVλ 유전자 분절의 첨가를 위해 사용되는 동일한 5' 상동성 암이다(도 5a 및 5b). 상기 3' 상동성 암은 BAC 클론 RP11-76I13으로부터 사람 λ 서열의 27,468 bp 게놈 단편에 함유된 사람 Vλ3-29P 유전자 분절에 대해 약 3431 bp 5'에 있는 PI-SceI 부위를 조작함에 의해 제조하였다. 상기 PI-SceI 부위는 약 94kb의 추가의 사람 λ 서열 단편을, +16-λ 또는 +16-κ 표적화 벡터(도 5a 및 5b)를 사용하는 이전의 변형에서 사람 λ 서열의 5' 말단과 중첩하는 약 27kb의 사람 λ 서열 단편으로 연결하기 위한 연결점으로서 작용한다. 이들 2개의 표적화 벡터는 5'에서 3'로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 23kb의 마우스 게놈 서열, 또는 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 5'에 약 24kb의 마우스 게놈 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 5' Frt 부위, 네오마이신 카세트, 3' Frt 부위 및 16개 추가의 hVλ 유전자 분절의 삽입 기원의 사람 5' 말단과 약 27kb과 중첩하고 상기 표적화 작제물에 대해 3' 상동성 암으로서 작용하는, 16 hVλ 유전자 분절 및 PI-SceI 부위를 함유하는 121, 188bp의 사람 게놈 λ 서열을 함유한다(도 5a 및 5b, +12-λ 또는 12-κ 표적화 벡터). 이들 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 독립적으로 내인성 마우스 불변 영역(Cκ 또는 Cλ2)와 작동적으로 연결된 40 hVλ 유전자 분절 및 사람 Jλ1을 함유하여, 이의 재조합 즉시 키메라 경쇄를 형성하는 변형된 마우스 κ 및 λ 경쇄 유전자좌를 제조하였다(도 5a 및 5b의 하부).

[0233]

유사한 방식으로, +12-κ 표적화 벡터를 또한 사용하여 12개 추가의 hVλ 유전자 분절을, 통합된 사람 κ 서열의 존재 또는 부재하에 다중 hJλ 유전자 분절을 혼입시킨 다른 초기 변형에 도입하였다(도 4b). 다른 변형을 함유하는 내인성 마우스 κ 유전자좌에서 상기 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 내인성 마우스 Cκ 유전자와 작동적으로 연결된 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열의 존재 및 부재하에 40 hVλ 유전자 분절 및 hJλ1, 2, 및 7 유전자 분절을 함유하여 이의 재조합 즉시 키메라 λ-κ 경쇄를 형성하는 마우스 κ 경쇄 유전자좌를 제조하였다.

[0234]

실시예 IV

[0235]

사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 표적화된 ES 세포의 동정

[0236]

이전의 실시예에 따라 제조된 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 전기영동하여 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 발현하는 키메라 마우스를 생성하기 위해 변형된 ES 세포를 제조하였다. 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 삽입체를 함유하는 ES 세포는 정량적 TAQMAN® 분석으로 동정하였다. 특이적 프라이머 세트 및 프로브는 사람 λ 서열 및 연합된 선별 카세트의 삽입(대립 유전자의 수득, GOA), 내인성 마우스 서열 및 임

의의 선별 카세트의 상실(대립 유전자의 상실, LOA) 및 플랭킹 마우스 서열의 보유(대립 유전자 보유, AR)를 위해 디자인하였다. 사람 λ 서열의 각각의 추가의 삽입을 위해, 추가의 프라이머 세트 및 프로브를 사용하여 이전에 표적화된 사람 서열의 보유를 확인하기 위해 사용된 이전의 프라이머 세트 및 프로브 뿐만 아니라 추가의 사람 λ 서열의 존재를 확인하였다. 표 1은 정량적 PCR 분석에 사용되는 프라이머 및 연합된 프로브를 제시한다. 표 2는 ES 세포 클론에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절 각각의 섹션에 대한 삽입을 확인하기 위해 사용되는 조합을 제시한다.

[0237]

사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 ES 세포는 임의로 FLP를 발현하는 자체물로 형질감염시켜 사람 V λ 5-52-V λ 1-40 유전자 분절을 함유하는 표적화 자체물의 삽입에 의해 도입된 Frt'ed 네오마이신 카세트를 제거하였다(도 5a 및 5b). 네오마이신 카세트는 임의로 FLP 리컴비나제를 발현하는 마우스에 접종함에 의해 제거될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 제6,774,279호). 임의로 상기 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

표 1

프라이머 서열번호:프로브 서열번호:

hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	—	—
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

[0238]

표 2

변형	검정	정방향/역방향 프라이머 세트	프로브	서열 위치
12hV λ & hJ λ 1의 삽입	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	hJ λ 서열
		NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
	LOA	MK20F/MKP4R	—	불활성화된 κ 유전자좌의 lox511/loxP 서열
		HygF/HygR	HygP	불활성화된 λ 유전자좌로 부터의 하이그로마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 V λ 1-C λ 1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 V λ 2-C λ 2 클러스터
	AR/LOA	mL12F/mL12R	mL12P	
		MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열
16hV λ 의 삽입	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV λ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	하이그로마이신 카세트
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 V λ 1-C λ 1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 V λ 2-C λ 2 클러스터
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열

[0239]

12hV λ 의 삽입	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hV λ 5-52 – hV λ 1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	네오마이신 카세트
	LOA	HygF/HygR	HygP	하이그로마이신 카세트
		mL1F/mL1R	mL1P	마우스 V λ 1-C λ 1 클러스터
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	마우스 V λ 2-C λ 2 클러스터
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV λ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	5' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	3' V κ 유전자좌에서의 마우스 서열

[0240]

- [0241] 실시예 V
- [0242] 내인성 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스의 제조
- [0243] 상기된 표적화된 ES 세포는 공여체 ES 세포로서 사용하고 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아

에 도입하였다(문현참조: 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou et al. (2007). F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). 사람 λ 유전자 분절을 독립적으로 함유하는 VELOCIMICE® (공여체 ES 세포로부터 완전히 유래된 F0 마우스)은 고유 사람 λ 유전자 분절의 존재를 검출하는 변형된 대립 유전자 분석 (Valenzuela et al., supra)을 사용한 유전자분류에 의해 동정하였다(상기 참조).

[0244] 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스의 $\kappa:\lambda$ 경쇄 사용. 단일 hJ λ 유전자 분절을 갖는 hV λ 유전자 분절의 3개의 연속적 삽입 각각에 대한 마우스 동종접합체(도 5b) 및 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 단일 hJ λ 유전자 분절 또는 4개의 사람 J λ 유전자 분절을 갖는 hV λ 유전자 분절의 제1 삽입에 대한 마우스 동종접합체(도 4b)는 유동 세포측정기를 사용하여 비장세포에서 κ 및 λ 경쇄 발현에 대해 분석하였다.

[0245] 간략하게, 비장은 마우스 그룹(그룹당 3마리 내지 7마리 동물)으로부터 수거하고 유리 슬라이드를 사용하여 분쇄하였다. ACK 용해 완충액으로 적혈구 세포(RBC)를 용해시킨 후(Lonza Walkersville), 비장세포는 마우스 CD19 (클론 1D3; BD Biosciences), 마우스 CD3 (17A2; Biolegend), 마우스 Ig κ (187.1 ; BD Biosciences) 및 마우스 Ig λ (RML-42; Biolegend)에 특이적인 형광성 염료 접합된 항체로 염색시켰다. BD™ LSR II 유동 세포측정기 (BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 획득하고 FLOWJO™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 표 3은 각각의 유전자 변형을 갖는 동물 그룹 기원의 비장세포에서 관찰된 B 세포(CD19 $^+$), κ 경쇄 (CD19 $^+$ Ig κ $^+$ Ig λ $^-$) 및 λ 경쇄(CD19 $^+$ Ig κ $^-$ Ig λ $^+$) 발현에 대한 평균 % 값을 제시한다.

[0246] 유사한 실험에서, 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 12개 hV λ 및 4개 hJ λ 유전자 분절의 제1 삽입을 위한 동종접합성 마우스(도 4b의 하부) 및 40개 hV λ 및 하나의 hJ λ 유전자 분절에 대해 동종접합성 마우스(도 5b의 하부 또는 도 7b의 상부) 기원의 비장 구획의 B 세포 함량을 유동 세포측정기(상기된 바와 같은)을 사용하여 Ig κ 및 Ig λ 발현에 대해 분석하였다. 도 8a는 각각의 그룹 기원의 대표적인 마우스에 대한 CD19 $^+$ B 세포에서 Ig λ 및 Ig κ 발현을 보여준다. 비장 당 CD19 $^+$ B 세포의 수는 또한 각각의 마우스에 대해 기록하였다(도 8b).

[0247] 또 다른 실시형태에서, 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 40hV λ 및 4개의 hJ λ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스 기원의 비장 및 골수 구획의 B 세포 함량(도 7b의 하부)은 다양한 세포 표면 마커의 유동 세포측정기를 사용하여 B 세포 발육을 통한 진행에 대해 분석하였다.

[0248] 간략하게, 야생형, 및 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 40hV λ 및 4개의 hJ λ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스의 2개의 그룹(각각 N=3, 9-12주령, 수컷 및 암컷)을 희생시키고 비장 및 골수를 수거하였다. 골수는 완전 RPMI 배지(태아 소 혈청), 나트륨 피루베이트, 헤페스, 2-메캅토에탄올, 비필수 아미노산 및 젠타마이신이 보충된 RPI 배지)로 세정함에 의해 대퇴부로부터 수거하였다. 비장 및 골수 접단 기원의 RBC는 ACK 용해 완충액 (Lonza Walkersville)으로 용해시킴에 이어서 완전 RPMI 배지로 세척하였다. 1×10^6 세포는 10분 동안 냉장에서 항-마우스 CD16/CD32 (2.4G2, BD Biosciences)로 항온처리함에 이어서 냉장에서 30분 동안 선별된 항체 패널을 사용하여 표지시켰다.

[0249] 골수 패널: 항마우스 FITC-CD43 (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-1gM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-1gD (11-26c.2a, BioLegend), APC-B220(RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD) 및 Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend).

[0250] 골수 및 비장 패널: 항마우스 FITC-1g κ (187.1, BD), PE-1g λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-1gM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-1gD(11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

[0251] 염색 후, 세포를 세척하고 2% 포름알데하이드에 고정시킨다. 데이터 획득은 FACSCANTOII™ 유동 세포측정기(BD Biosciences)로 수행하고 FLOWJO™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 도 9a 내지 도 9d는 각각의 그룹 기원의 하나의 대표적인 마우스의 비장 구획에 대한 결과를 보여준다. 도 10a 내지 도 10e는 각각의 그룹 기원의 하나의 대표적인 마우스의 골수 구획에 대한 결과를 보여준다. 표 4는 다양한 유전적 변형을 갖는 동물 그룹 기원의 비장세포에서 관찰된 B 세포(CD19 $^+$), κ 경쇄 (CD19 $^+$ Ig κ $^+$ Ig λ $^-$), 및 λ 경쇄(CD19 $^+$ Ig κ $^-$ Ig λ $^+$) 발현에 대한 평균 % 값을 제시한다. 표 5는 야생형, 및 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 40hV λ 및 4개의 hJ λ 유전자 분절에 대해 동종접합성인 마우스의 골수에서 관찰

되는 B 세포($CD19^+$), 성숙한 B 세포($B220^{hi} IgM^+$), 미성숙한 B 세포($B220^{int} IgM^+$), κ 경쇄($B220^{int} IgM^+ Ig\kappa^+$)를 발현하는 미성숙한 B 세포 및 λ 경쇄($B220^{int} IgM^+ Ig\lambda^+$)를 발현하는 미성숙 B 세포에 대한 평균 % 값을 제시한다. 상기 실험은 상기된 마우스의 추가 그룹으로 반복하고 유사한 결과를 입증하였다(데이타는 나타내지 않음).

표 3

유전자형	B 세포 %	Ig κ ⁺ %	Ig λ ⁺ %
야생형	46.2	91.0	3.6
12 hVλ+hJλ.1	28.3	10.4	62.5
12 hVλ-VκJκ-hJλ.1	12.0	11.0	67.5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ.	41.8	17.2	68.4
28 hVλ+hJλ.1	22.0	13.3	51.1
40 hVλ+hJλ.1	28.2	24.3	53.0

[0252]

표 4

유전자형	B 세포 %	Ig κ ⁺ %	Ig λ ⁺ %
야생형	49.8	91.2	3.5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33.3	41.6	43.1

[0253]

표 5

유전자형	B 세포 %	성숙 B 세포 %	미성숙 B 세포 %	미성숙 B 세포 % Igκ ⁺	미성숙 B 세포 % Igλ ⁺
야생형	62.2	9.2	12.0	79.0	8.84
40hVλ-VκJκ-4hJλ	60.43	2.59	7.69	38.29	43.29

[0254]

사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스에서 사람 Vλ 유전자 사용. 사람 λ 서열(hVλ3-12-hVλ3-1 및 hJλ1, 도 5b)의 제1 삽입에 대해 이종접합성인 마우스 및 사람 λ 서열(hVλ5-52-hVλ3-1 및 hJλ1, 도 5b)의 제3 삽입을 위해 동종접합성인 마우스는 비장으로부터 분리된 RNA를 사용하는 역전사효소 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)에 의한 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였다.

[0255]

간략하게 비장을 수거하고 멸균 1회용 백중에서 5% HI-FBS를 갖는 10ml의 RPMI-1640(Sigma)로 관장하였다. 이어서 단일 비장을 함유하는 각각의 백을 STOMACHER™ (Seward)에 위치시키고 30초 동안 배지 세팅에서 파쇄하였다. 파쇄된 비장은 0.7μm 세포 스트레이너를 사용하여 여과하고 이어서 원심분리(10분 동안 1000rpm)로 펠렛화하고 RBC는 3분 동안 BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences)에서 용해시켰다. 비장 세포는 RPMI-1640으로 희석하고 다시 원심분리하여 이어서 1mL의 PBS (Irvine Scientific)중에 재현탁시켰다. RNA는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 펠렛화된 비장 세포로부터 분리하였다.

[0256]

RT-PCR은 사람 hVλ 유전자 분절 및 마우스 Cκ 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 비장세포 RNA에 대해 수행하였다(표 6). PCR 생성물은 젤 정제하고 pCR2.1-TOPO TA 벡터(Invitrogen)로 클로닝하고 클로닝 부위를 플랭킹하는 위치에서 벡터내에 위치하는 프라이머 M13 정배향(GTAAACGAC GGCCAG; 서열번호 55) 및 M13 역배향(CAGGAAACAG CTATGAC; 서열번호 56)을 사용하여 서열분석하였다. 사람 λ 서열의 제1 및 제3 삽입으로부터 유래하는 84개 총 클론을 서열 분석하여 hVλ 유전자 사용을 측정하였다(표 7). 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ 1-mCκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 도 11에 나타낸다.

[0257]

RT-PCR은 사람 hVλ 유전자 분절 및 마우스 Cκ 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 비장세포 RNA에 대해 수행하였다(표 6). PCR 생성물은 젤 정제하고 pCR2.1-TOPO TA 벡터(Invitrogen)로 클로닝하고 클로닝 부위를 플랭킹하는 위치에서 벡터내에 위치하는 프라이머 M13 정배향(GTAAACGAC GGCCAG; 서열번호 55) 및 M13 역배향(CAGGAAACAG CTATGAC; 서열번호 56)을 사용하여 서열분석하였다. 사람 λ 서열의 제1 및 제3 삽입으로부터 유래하는 84개 총 클론을 서열 분석하여 hVλ 유전자 사용을 측정하였다(표 7). 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hVλ-hJλ 1-mCκ 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 도 11에 나타낸다.

[0258]

유사한 양상으로, 내인성 마우스 Cκ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 경쇄 유전자 서열의 제3 삽입(즉, 사람 Vκ-Jκ 게놈 서열을 포함하는 40hVλ 유전자 분절 및 4개의 hJλ 유전자 분절, 도 7b의 하부)에 동종접합성인 마우스는 비장세포로부터 분리된 RNA를 사용하는 RT-PCR에 의해 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였

다(상기된 바와 같이). 26개의 선택된 RT-PCR 클론에 대한 상기 사람 λ 경쇄 유전자 분절 사용은 표 8에 나타낸다. 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hV λ -hJ λ -mC κ 접합부의 뉴클레오파이드 서열은 도 12에 나타낸다.

[0259] 유사한 양상으로, 내인성 마우스 C λ 2 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 경쇄 유전자 분절의 제1 삽입(12hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1, 도 4a 및 도 5a)에 대해 동종접합성인 마우스는 비장세포로부터 분리된 RNA를 사용하는 RT-PCR에 의해 사람 λ 경쇄 유전자 사용에 대해 분석하였다(상기된 바와 같이). hV λ 유전자 분절에 특이적인 프라이머(표 6)는 마우스 C λ 2 유전자에 특이적인 2개의 프라이머; C λ 2-1 (서열번호 104) 또는 C λ 2-2 (서열번호 105) 중 하나와 쌍을 형성한다.

[0260] h λ 1로 재배열된 다중 hV λ 유전자 분절은 내인성 마우스 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스 기원의 RT-PCR 클론으로부터 관찰하였다. 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hV λ -hJ λ -mC λ 2 접합부의 뉴클레오파이드 서열은 도 13에 나타낸다.

표 6

5' hV λ 프라이머	서열 (5'-3')	서열 번호 :
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYCCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53

3' 마우스 C κ 프라이머	서열 (5'-3')	서열 번호 :
mlgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

표 7

hV λ 측정된 클론의 번호
3-1
4-3
2-8
3-9
3-10
2-14
3-19
2-23
3-25
1-40
7-43
1-44
5-45
7-46
9-49
1-51

[0262]

표 8

클론	hV λ	hJ λ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

[0263]

도 11은 단일 hJ λ 유전자 분절과 함께 hV λ 유전자 분절의 제1 및 제3 삽입을 함유하는 마우스 기원의 RT-PCR 클론에 대한 hV λ -hJ λ 1-mC κ 접합부의 서열을 나타낸다. 도 11에 나타낸 상기 서열은 마우스 C κ 유전자와 재조합된 hJ λ 1을 갖는 상이한 hV λ 유전자 분절을 포함하는 고유 재배열을 도시한다. 12개 hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1을 함유하는 단일의 변형된 내인성 κ 유전자좌를 함유하는 이종접합성 마우스 및 40hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1을 함유하는 2개의 변형된 내인성 κ 유전자좌를 함유하는 동종 접합성 마우스는 둘 다 마우스 C κ 유전자와 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 사람 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성한다. 이들 재배열은 키메라 유전자좌가 이들 마우스내 다중의 독립적인 B 세포에서 독립적으로 사람 λ 유전자 분절을 재배열 할 수 있음을 입증한다. 추가로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 대한 이들 변형은 hV λ 유전자 분절 중 어느 것이 작동 불가능하게 하지 않았거나 hJ λ 1과 재배열하는 것으로 관찰된 16개의 상이한 hV λ 유전자 분절에 의해 입증된 바와 같이 B 세포 발육 동안에 다중 hV λ 및 hJ λ (J λ 1) 유전자 분절과 키메라 유전자좌가 재조합하는 것을 방해하지 않았다(표 7). 추가로, 이들 마우스는 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 재배열된 사람 V λ -J λ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 제조하였다.

[0265]

도 12는 사람 V κ -J κ 계놈 서열을 포함하는 40개 hV λ 및 4개 hJ λ 유전자 분절에 대해 동종접합성 마우스 기원의 선택된 RT-PCR 클론에 대한 hV λ -hJ λ -mC κ 접합부의 서열을 나타낸다. 도 12에 나타낸 서열은 다수의 상이한 hV λ 유전자 분절이 재배열되고 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된, 전체 키메라 유전자좌에 걸쳐 있는 다수의 상이한 hV λ 유전자 분절을 포함하는 추가의 고유 재배열을 도시한다. 40 hV λ 및 4개 hJ λ 유전자 분절을 함유하는 변형된 내인성 κ 유전자좌를 포함하는 동형접합성 마우스는 또한 마우스 C κ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 사람 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성할 수 있다. 이들 재배열은 추가로 모든 단계의 키메라 유전자좌가 이들 마우스내 다수의 독립적인 B 세포에서 사람 λ 유전자 분절을 독립적으로 재배열할 수 있음을 입증한다. 추가로, 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 대한 상기 추가의 변형은 사람 λ 유전자 분절의 각각의 삽입이 hV λ 및/또는 J λ 유전자 분절중 어느 것도 작동될 수 없도록 하지 않거나 26개 선택된 RT-PCR 클론으로부터 모든 4개의 hJ λ 유전자 분절(표 8)과 재배열하는 것으로 관찰된 12개 상이한 hV λ 유전자 분절에 의해 입증된 바와 같이 B 세포 발육동안에 키메라 유전자좌가 hV λ 과 J λ 유전자 분절과 재조합하

는 것을 방해하지 않음을 입증한다. 추가로, 이들 마우스는 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 C κ 영역에 작동적으로 연결된 사람 V λ -J λ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 생성하였다.

[0266] 도 13은 12 hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1에 대해 동종접합성 마우스 기원의 3개의 개별 RT-PCR 클론에 대한 hV λ -hJ λ -mC λ 2 접합부의 서열을 보여준다. 도 13에 나타낸 서열은 hJ λ 1이 재배열되고 마우스 C λ 2 유전자에 작동적으로 연결된 제1 삽입의 길이에 걸쳐있는, 상이한 hV λ 유전자 분절을 포함하는 추가의 고유 재배열을 도시한다(2D1 = V λ 2-8J λ 1 ; 2D9 = V λ 3-10J λ 1 ; 3E15 = V λ 3-1J λ 1). 하나의 클론은 hV λ -hJ λ 접합부에서 N 첨가로 인한 비생산적인 재배열을 입증하였다(2D1, 도 13). 이것은, 재조합 동안에 유전자 분절의 연결이 부정확한 것으로 나타남으로써 V(D)J 재조합에서 범상하지 않은 경우 아니다. 상기 클론은 이들 마우스의 경쇄 레퍼토리에 존재하는 비생성적 재조합체를 나타내지만 이것은 항체 유전자간에 접합 다양성에 기여하는 유전적 기작이 이들 마우스에서 정상적으로 작동하여 보다 큰 다양성을 갖는, 경쇄를 함유하는 항체 레퍼토리를 형성함을 입증한다.

[0267] 12hV λ 유전자 분절 및 hJ λ 1을 함유하는 변형된 내인성 λ 유전자좌를 함유하는 동종접합성 마우스는 또한 내인성 마우스 C λ 유전자에 작동적으로 연결된 사람 λ 유전자 분절을 생성하고 마우스 C λ 영역에 연결된 hV λ 영역을 함유하는 역 키메라 λ 경쇄를 발현하는 B 세포를 생성할수 있다. 이들 재배열은 추가로, 다른 경쇄 유전자좌(즉, λ 유전자좌)에 위치한 사람 λ 경쇄 유전자 분절이 이들 마우스에서 다수의 독립적인 B 세포에서 사람 λ 유전자 분절을 독립적으로 재배열할 수 있음을 입증한다. 추가로, 상기 내인성 λ 경쇄 유전자좌에 대한 변형은 사람 λ 유전자 분절의 삽입이 hV λ 및/또는 hJ λ 1 유전자 분절의 어느 것도 비작동성이도록 하지 않거나 B 세포 발육 동안에 상기 키메라 유전자좌가 hV λ 및 hJ λ 1 유전자 분절을 재조합하는 것을 방해하지 않음을 입증한다. 추가로, 이들 마우스는 또한 내인성 면역글로불린 경쇄 레퍼토리의 일부로서 마우스 C λ 영역에 작동적으로 연결된 사람 V λ -J λ 유전자 분절을 함유하는 기능성 항체를 생성하였다.

[0268] 상기 실시예에 나타낸 바와 같이, 내인성 κ 및 λ 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 마우스는 사람 λ 경쇄 유전자 분절을 재배열할 수 있고, 기능성 경쇄가 비장 및 골수 둘 다에서 B 세포 발육의 다양한 시점에서 요구되기 때문에, 마우스의 정상적인 항체 레퍼토리의 일부로서 마우스 C κ 및/또는 C λ 영역의 구조로 이들을 발현할 수 있다. 추가로, B 세포의 조기 서브세트(예를 들어, 프레-, 프로- 및 전이 B 세포)는 야생형 한배새끼와 비교하여 이들 마우스에서 정상적인 표현형을 입증한다(도 9d, 10a 및 10b). 골수 및 말초 B 세포 집단에서의 작은 결점이 관찰되고 이는 자가-반응성 미성숙 B 세포의 결실 및/또는 마우스 중쇄와 사람 λ 경쇄의 준최적 연합에 기여할 수 있다. 그러나, 상기 마우스에서 관찰된 Ig κ /Ig λ 사용은 마우스에서 관찰되는 것 보다 사람 경쇄를 더 발현하는 상황임을 입증한다.

[0269] 실시예 VI

[0270] 내인성 경쇄 유전자좌로부터 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스의 교배

[0271] 내인성 마우스 경쇄 유전자좌에서 사람 λ 유전자 분절의 사용을 최적화하기 위해, 재배열되지 않은 사람 λ 유전자 분절을 함유하는 마우스를, 반대 내인성 경쇄 유전자좌(κ 또는 λ)에서 결실을 포함하는 또 다른 마우스와 교배한다. 예를 들어, 내인성 κ 유전자좌에 위치한 사람 λ 유전자 분절은, 내인성 λ 경쇄 유전자좌에서 또한 결실을 포함하는 마우스에 존재하는 유일한 기능성 경쇄 유전자 분절이다. 상기 방식으로, 수득된 후손은 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 사람 λ 경쇄만을 발현한다. 교배는 당업계에 인지된 표준 기술 및 대안으로 상업적 회사(예를 들어, Jackson Laboratory)에 의해 수행한다. 내인성 κ 유전자좌에서 사람 λ 경쇄 유전자 분절 및 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 결실을 함유하는 마우스 좋은 고유 역-키메라(사람-마우스) λ 경쇄의 존재 및 내인성 마우스 λ 경쇄의 부재에 대해 스크리닝한다.

[0272] 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 마우스는 또한 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자좌가 사람 중쇄 가변 유전자좌로 대체됨을 포함하는 마우스와 교배한다(문헌참조: 미국 특허 제6,596,541호, Regeneron Pharmaceuticals, the VELOCIMMUNE® genetically engineered mouse). VELOCIMMUNE® 마우스는 부분적으로 내인성 마우스 불변 영역 유전자좌에 작동적으로 연결된 사람 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 가짐을 포함하여 항원 자극에 응답하여 사람 중쇄 가변 영역 및 마우스 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 생성한다. 항체의 중쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA는 분리될 수 있고 사람 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA에 작동적으로 연결된다. 따라서, 상기 DNA는 항체의 완전한 사람 중쇄를 발현할 수 있는 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 교배 스케줄에 따라, 내인성 마우스 중쇄 유전자좌가 내인성 κ 경쇄 유전자좌에서 사람 중쇄 유전자좌 및 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌로 대체된 것을 함유하는 마우스를 수득한다. 체세포적으로 돌연변이된 사람 중쇄 가변 영역 및 사람 λ 경쇄 가변 영역을 함유하는 항체는 목적하는 항원과의 면역화즉시 분리될 수 있다.

[0273] 실시예 VII

[0274] 사람 중쇄 및 사람 λ 경쇄를 발현하는 마우스로부터 항체의 제조

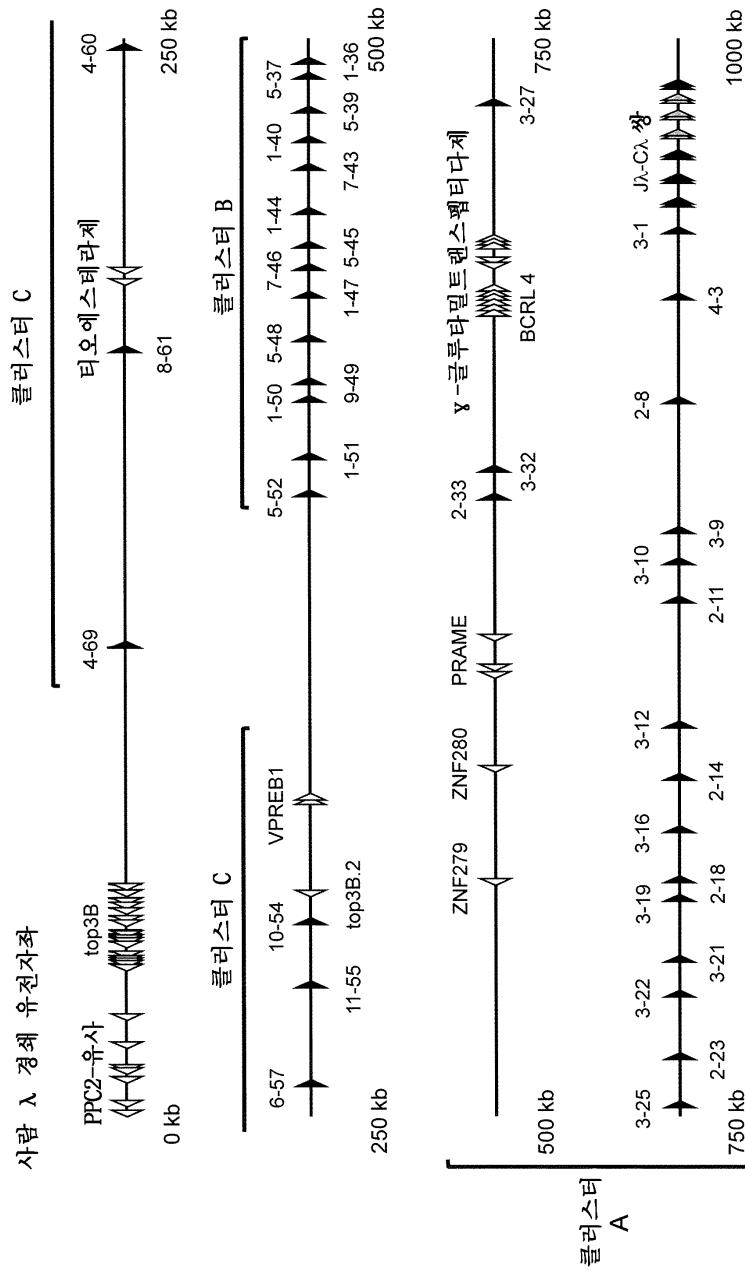
[0275] 다른 내인성 Ig 유전자좌(상기된 바와 같이)의 변형 및 결실을 함유하는 다양한 목적하는 종에 대한 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 마우스를 육종시킨 후(상기된 바와 같이), 선택된 마우스는 목적하는 항원과 면역화시킨다.

[0276] 일반적으로, 단일의 재배열되지 않은 사람 생식선 경쇄 영역 중 하나를 함유하는 VELOCIMMUNE® 마우스를 항원으로 기회감염시키고, 림프구 세포(예를 들어, B 세포)를 동물의 혈청으로부터 회수한다. 상기 림프구 세포는 골수종 세포주와 융합하여 불멸의 하이브리도마 세포주를 제조할 수 있고 상기 하이브리도마 세포주는 스크리닝하고 선별하여 면역화를 위해 사용되는 항원에 특이적인 사람 중쇄 및 사람 λ 경쇄를 함유하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 동정한다. 중쇄 및 λ 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA를 분리하고 중쇄 및 경쇄의 목적하는 이소형 불변 영역에 연결시킬 수 있다. 내인성 마우스 λ 유전자좌와 비교하여 추가의 hV λ 유전자 분절의 존재로 인해, 경쇄 레퍼토리의 다양성이 급격히 증가하고 면역화즉시 항원-특이적 레퍼토리에 대해 보다 높은 다양성을 부여한다. 상기 수득한 클로닝된 항체 서열이 후속적으로 CHO 세포와 같은 세포에서 제조될 수 있다. 또한, 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA는 항원-특이적 림프구(예를 들어, B 세포)로부터 직접 분리할 수 있다.

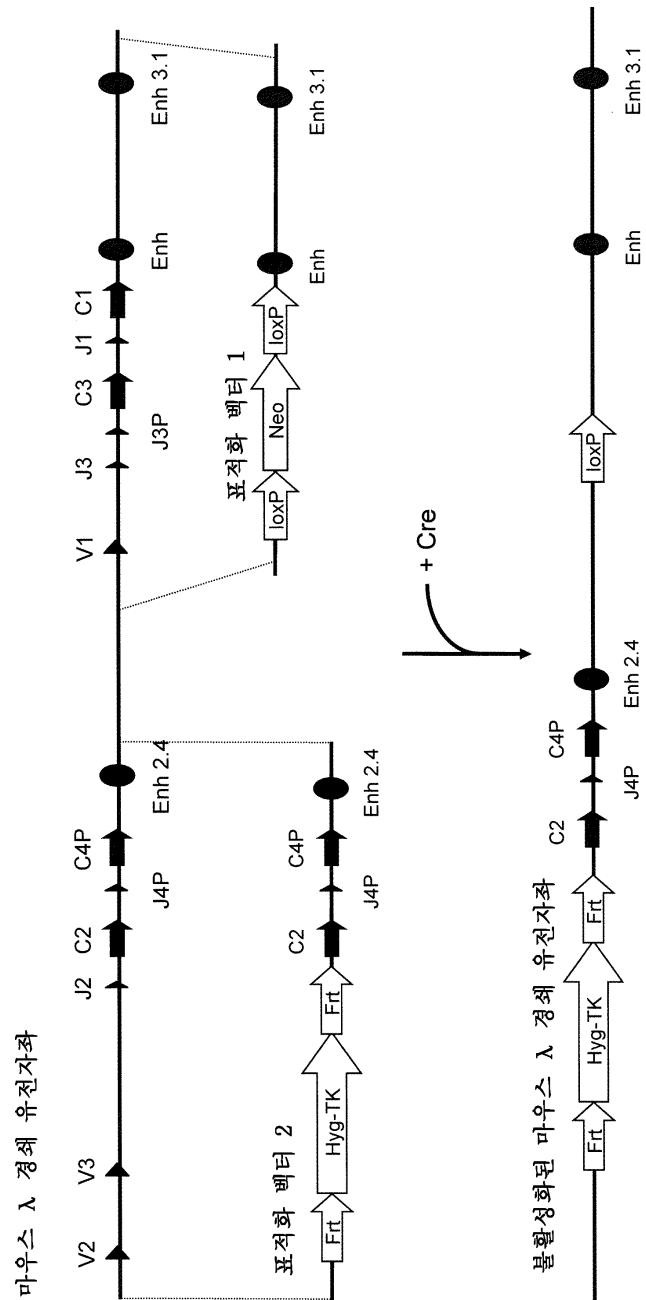
[0277] 처음에, 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 높은 친화성의 키메라 항체를 분리한다. 상기된 바와 같이, 상기 항체의 특성을 분석하고 친화성, 선택성, 에피토프 등을 포함하는, 목적하는 특성에 대해 선택한다. 상기 마우스 불변 영역은 목적하는 사람 불변 영역으로 대체하여 체세포적으로 돌연변이된 중쇄 및 본 발명의 재배열되지 않은 사람 λ 경쇄 유전자좌로부터 유래된 사람 λ 경쇄를 제조한다. 적합한 사람 불변 영역은 예를 들어, 야생형 또는 변형된 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4를 포함한다.

도면

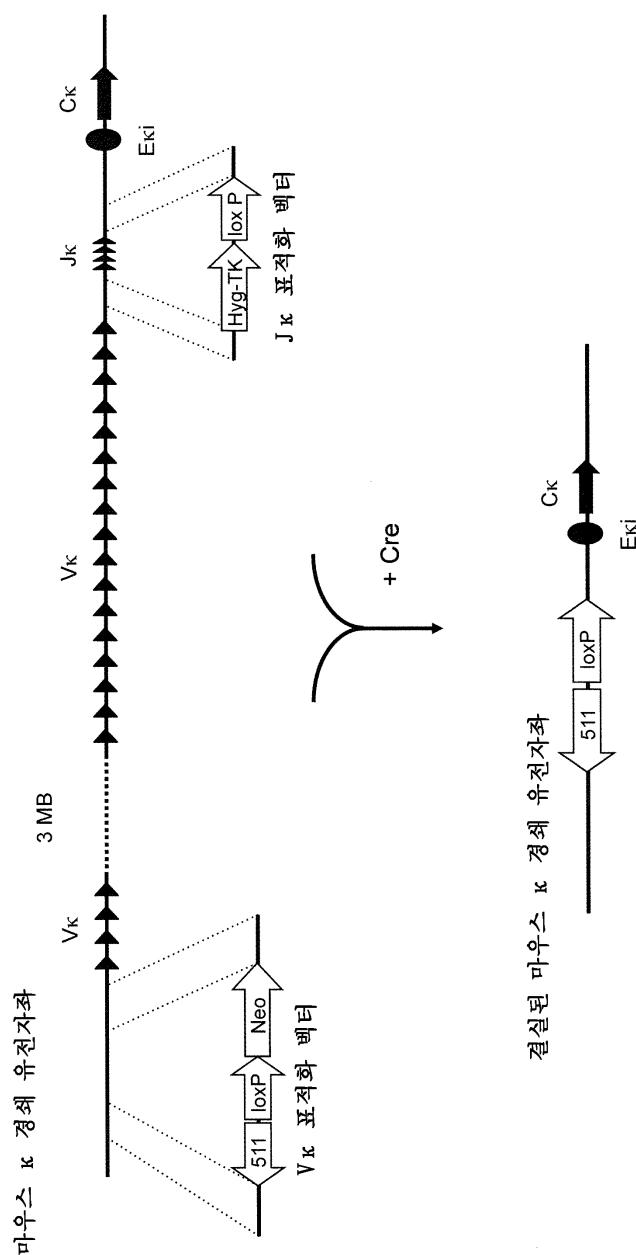
도면1



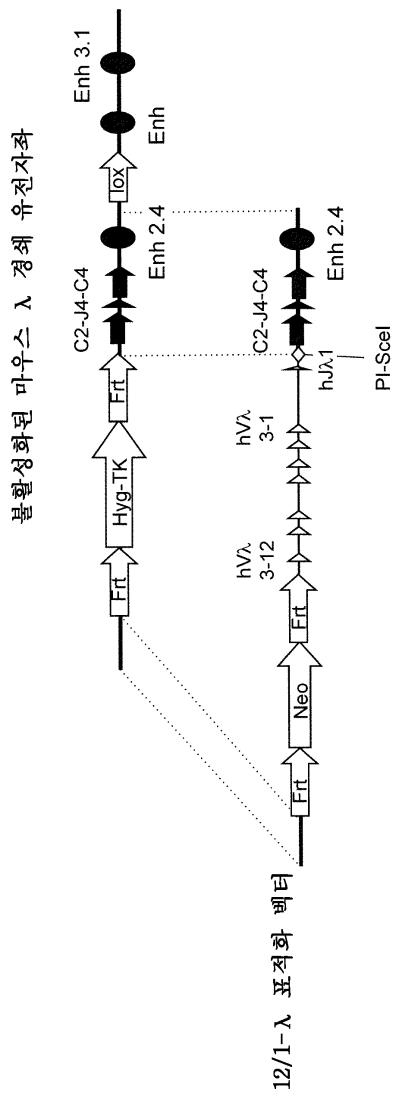
도면2



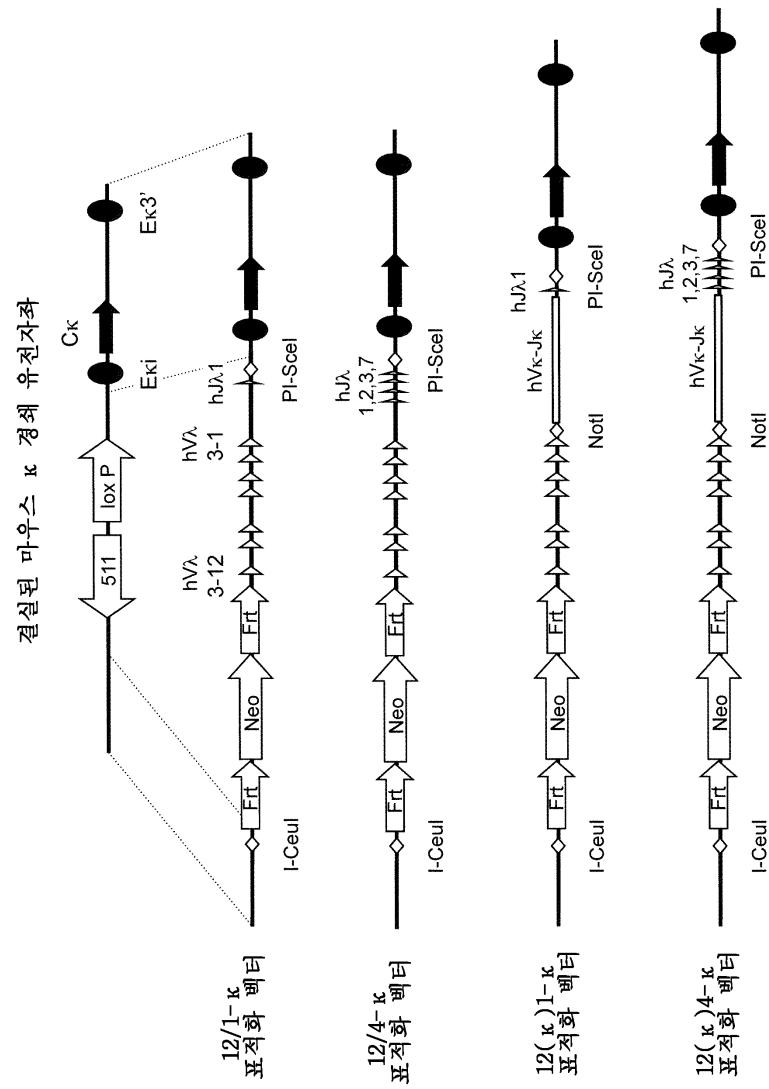
도면3



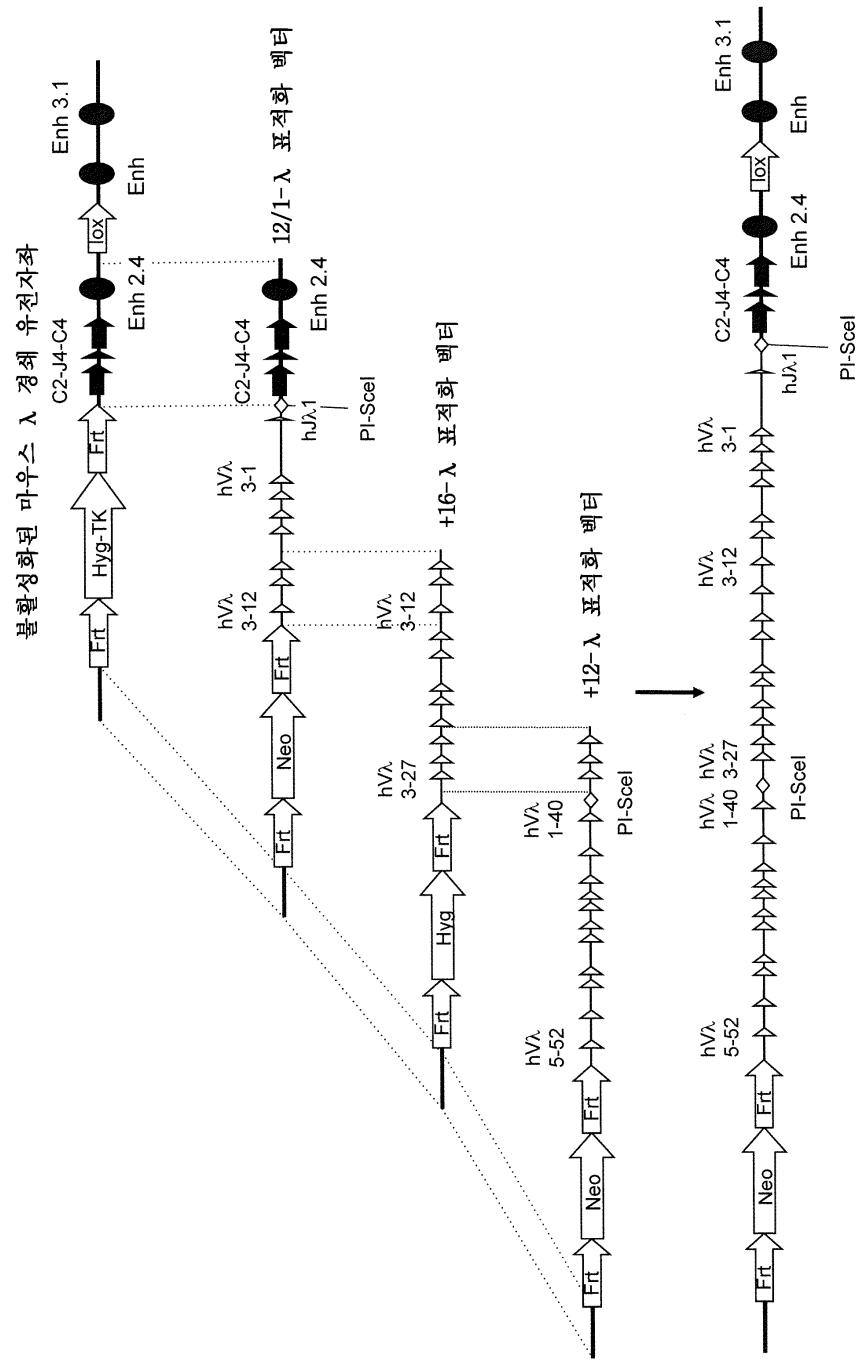
도면4a



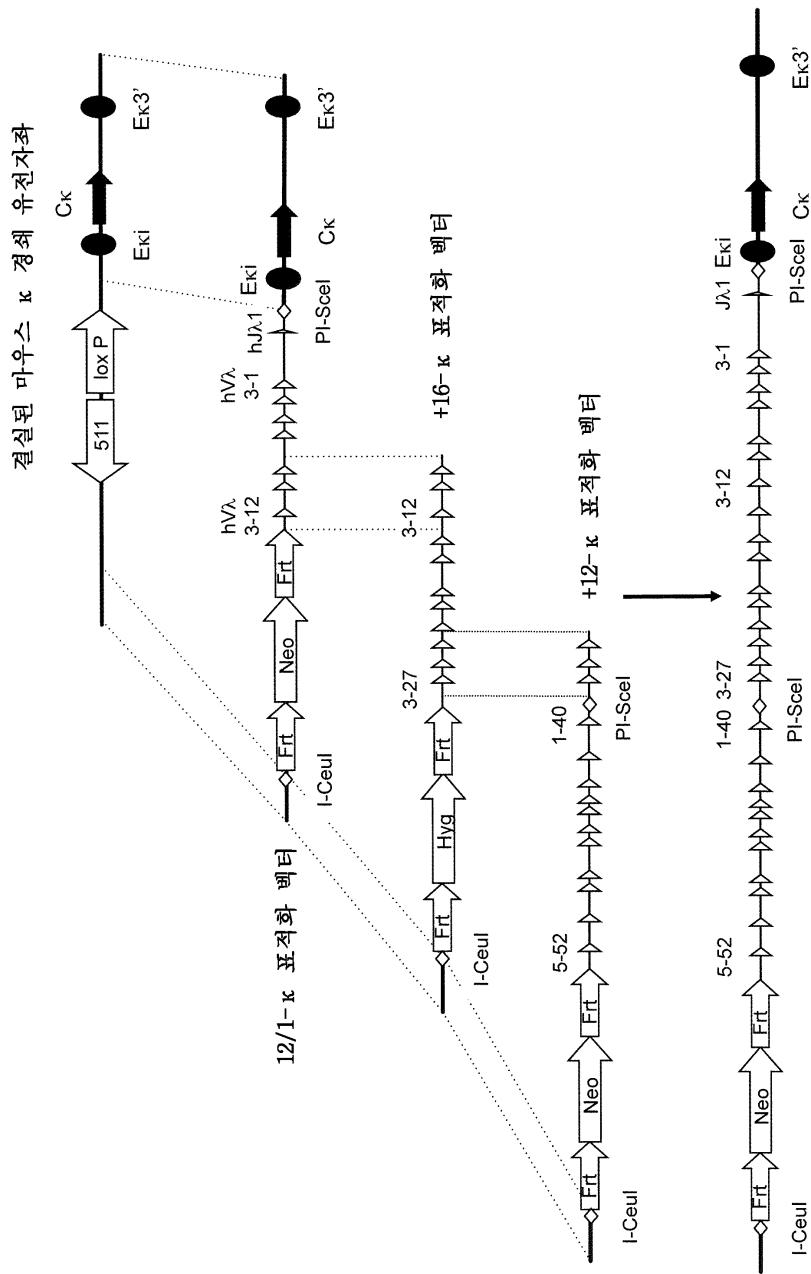
도면4b



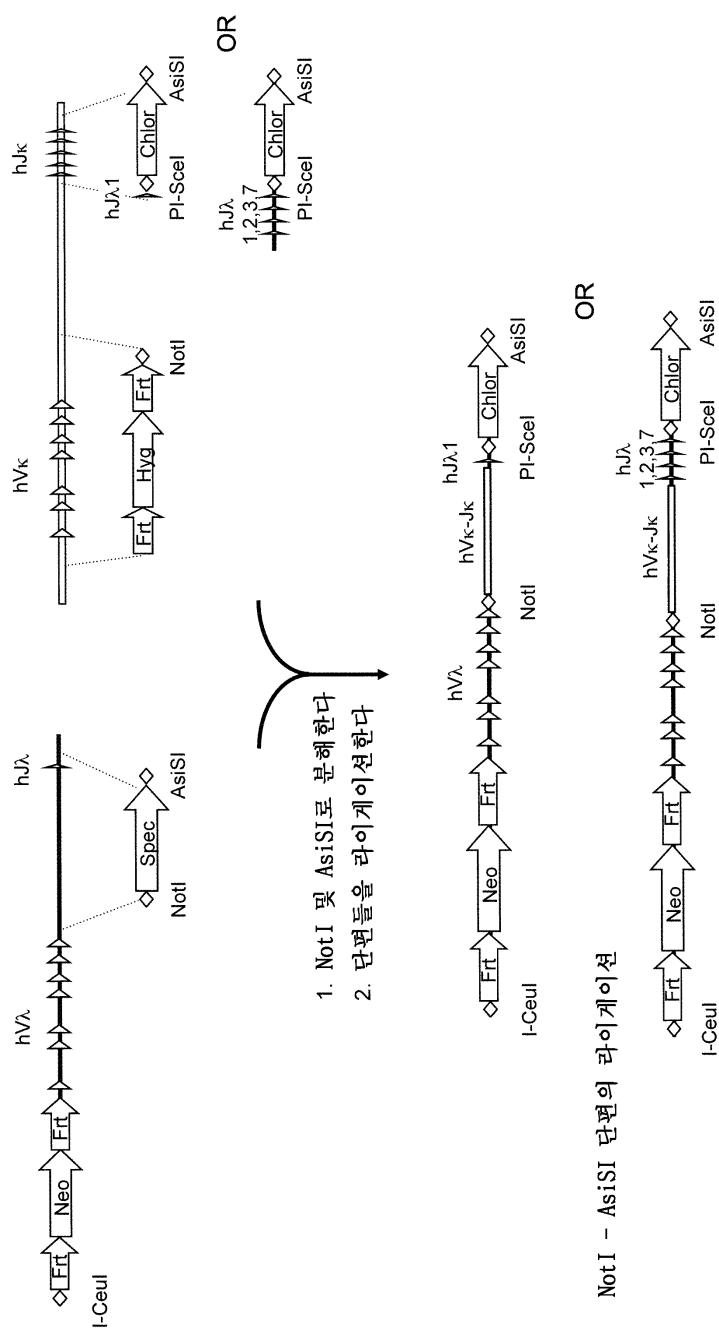
도면5a



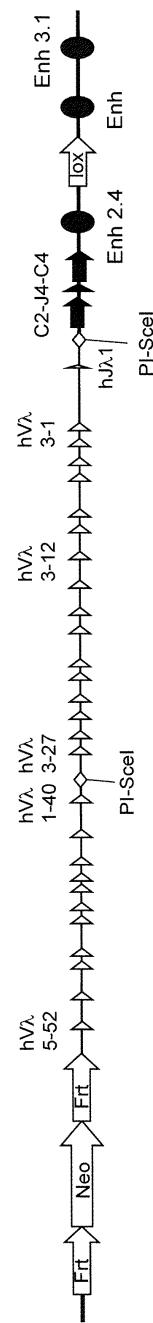
도면5b



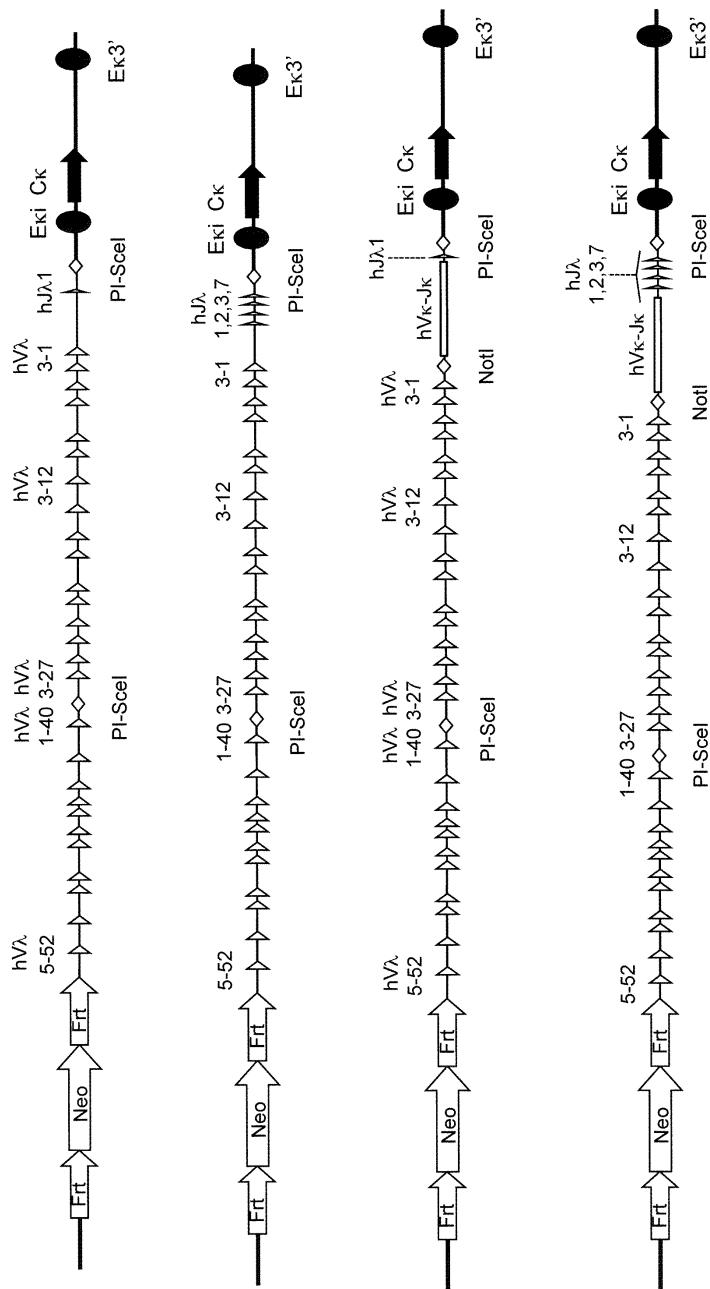
도면6



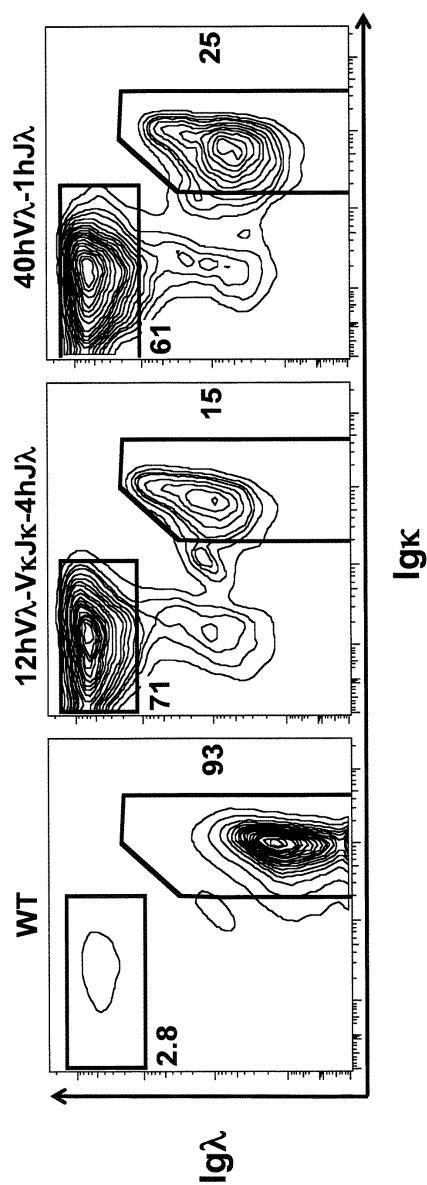
도면7a



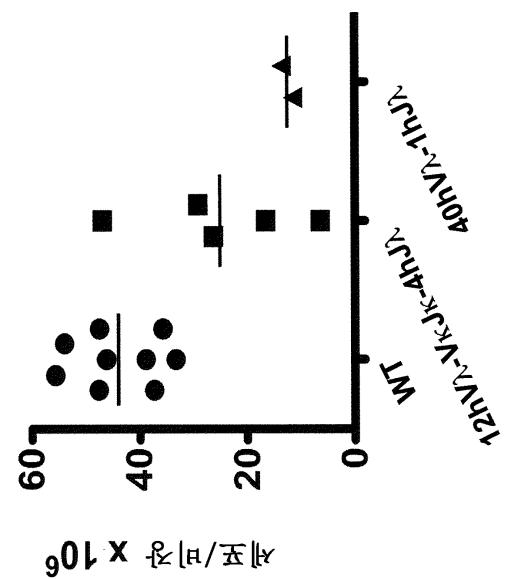
도면7b



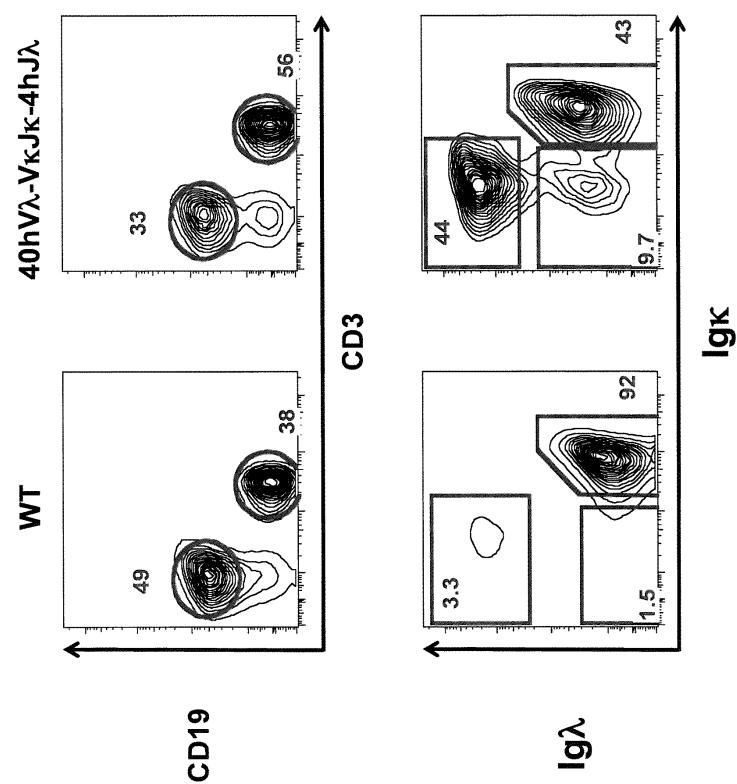
도면8a



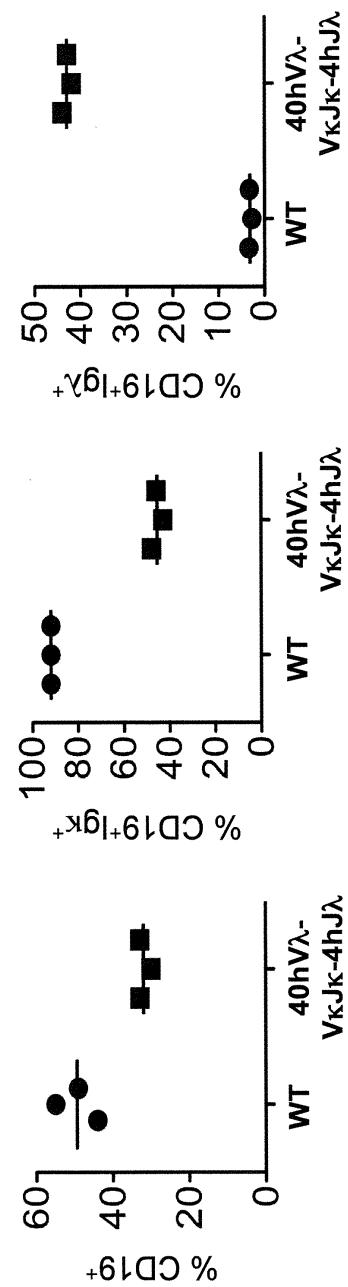
도면8b



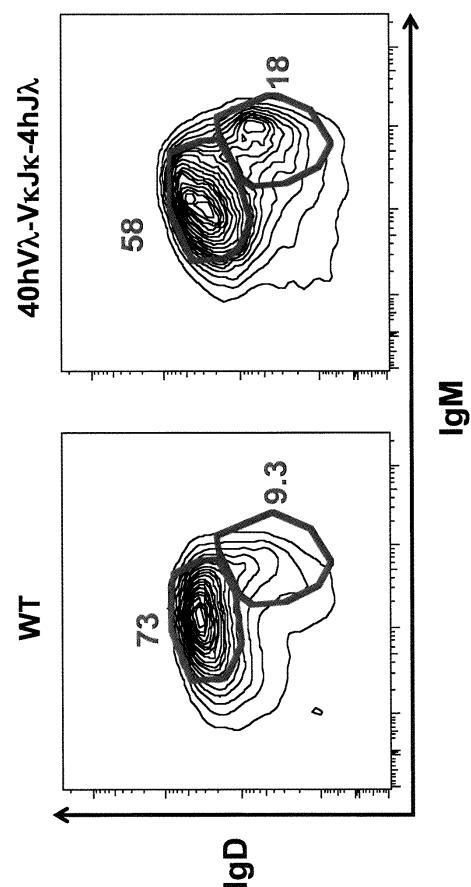
도면9a



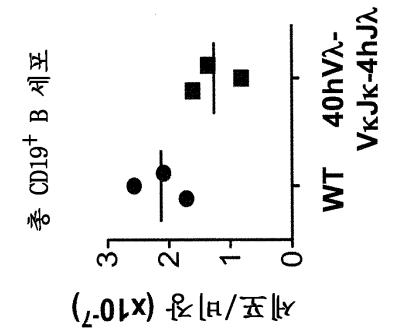
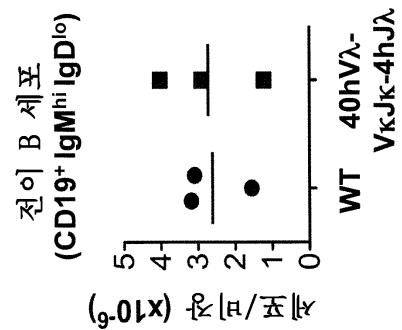
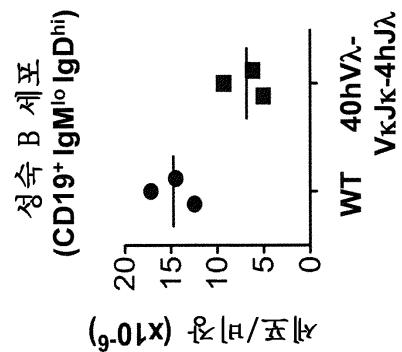
도면9b



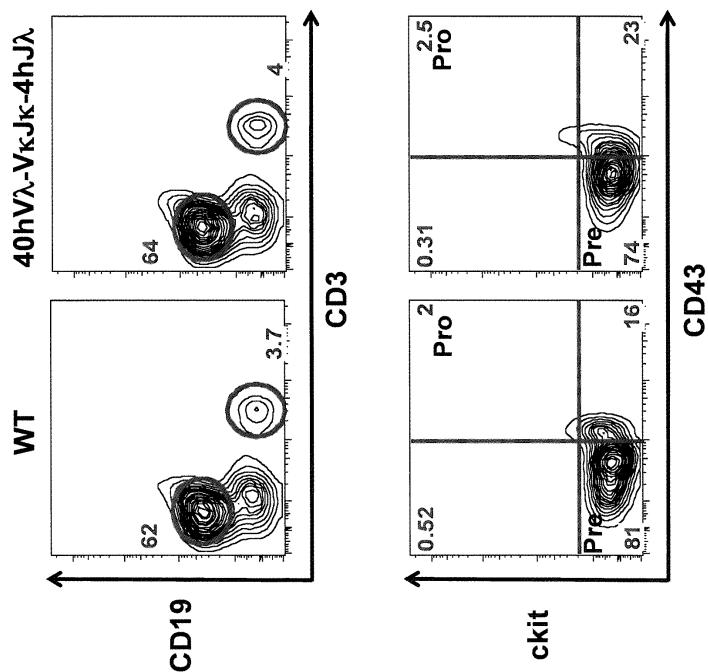
도면 9c



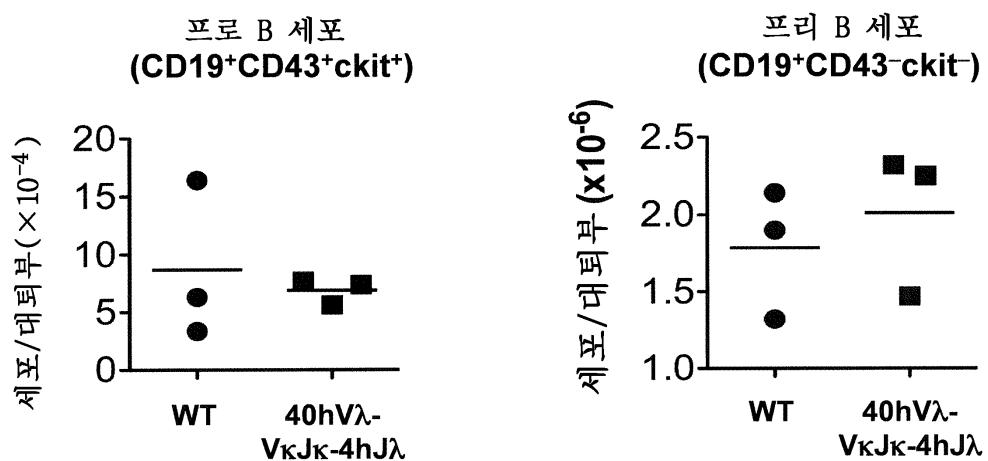
도면9d



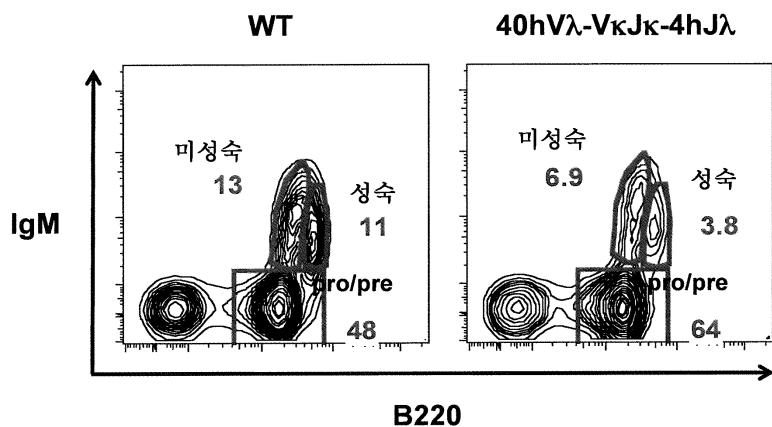
도면 10a



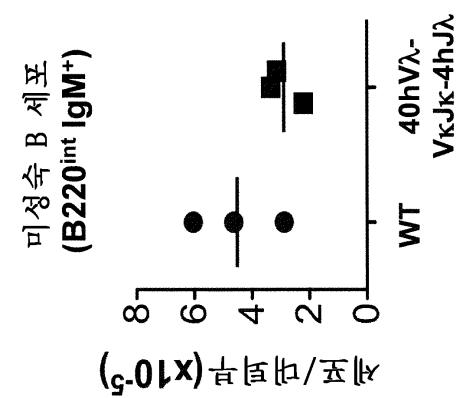
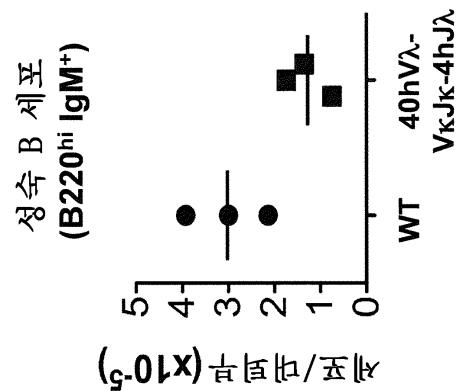
도면 10b



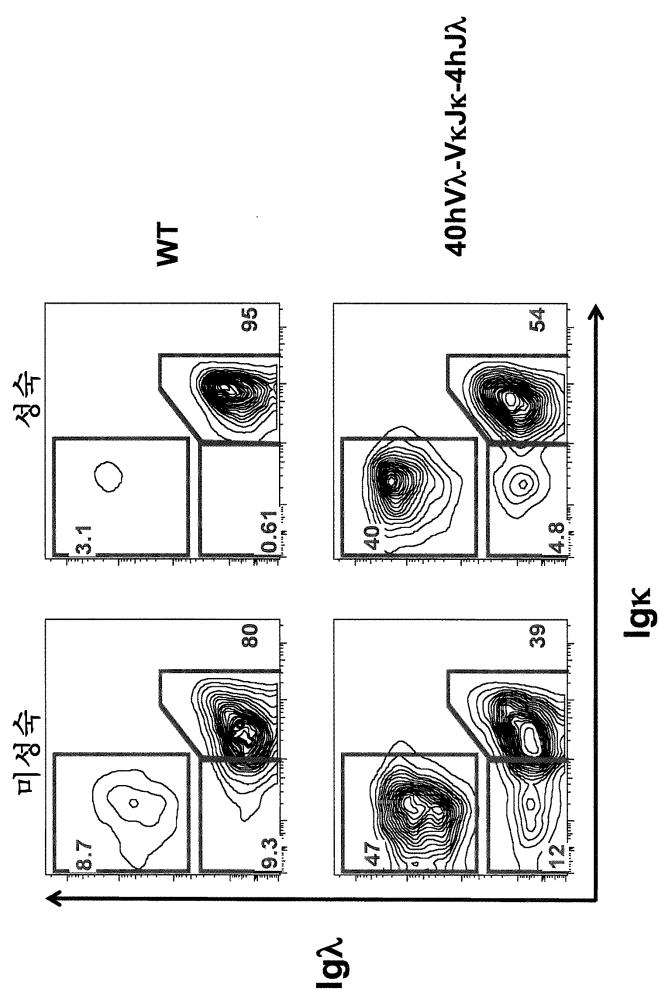
도면 10c



도면10d



도면 10e



도면11

3' 서립 Vλ		5' 막-우스 Cκ	
서립 Jλ1		5' 막-우스 Cκ	
A6	GCAACAAATT	tcgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
B6	GCAACAAATT	atgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
F6	GCAACAAATT	atgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
B7	GCAACAAATT	atgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
E7	GCAACAAAT	gtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
F7	GCAACAAATT	atgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
C8	GCAACAAATT	atgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
E12	CAAGTCGGTT	gtgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
1-4	TGAGTGCT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
1-20	TGAGTGCG	gttttttttgcgaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
3B4 3	CTGAATGGT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
5-8	AGTGGTAAT	cattgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
5-19	AGTGGTGCT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
10 10	AGCAGGACT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
11A1	AGCAGCGCT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
7A8	GGTGGTGCT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
3A3	AGTAGGACT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
2-7	AGCAGGACT	ttatgtctttcggaactggaccaaggtaaccgttccttag	ggccgtgatgcgtgcaccaactgtatccatcttc
FWR4			
		F G T G T K V L V D A A P T V S I F	

도면12

	3' 시그마 Vλ	시그마 λ	5' 미우스 Cκ
5-2	CAGCCCTGAGTGGTTC	TGTGTTTCGAGGGACCCGGCTGACGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCCTGAGTGGT	ATGICCTTCGAACTGGACCAAGGTCAACGTGACCAACTGTATCCATC	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCCTGAATGGT	GCTGTTTCGAGGGACCCAGTGACGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCCTGAGTGGTC	GGGTGTTTCGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTTCGAGGGACCCAGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GCTGTTTCGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGAACTGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTTGGTATTGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGC	GGGTGTTTCGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGC	GTATTTCGGCGAGGGACCAAGGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTG	CTGTGTTTCGGAGGGACCCAGTGACCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4			
	F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I		

도면13

	3' 시그마 V λ	시그마 J λ 1	5' 마우스 C λ 2
2D1	GCAGGCAGCAACAAATTta	aGTCCTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCACTGGTCTCTAG	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCAACTCTC
2D9	GACAGCAGTGGTAAATCAT	TATGTCCTCGGAACACTGGGACCAAGGTACCGTCTAG	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCAACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCCTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCTAG	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCAACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MICE EXPRESSING A LIGHT CHAIN WITH HUMAN LAMBDA VARIABLE AND MOUSE CONSTANT REGIONS

<130> 796A-WO

<150> 61/357,314

<151> 2010-06-22

<150> 61/357,317

<151> 2010-06-22

<160> 105

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 219

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 1

actttcagaa tggcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60

atagtataca ttatacgaag ttattctaga ccccccggct cgataactat aacggtccta 120

aggttagcgac tcgagataac ttctgtataat gtatgtata cgaagttatc catggtaagc 180

ttacgtggca tacagtgtca gatttctgt ttatcaagc 219

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 2

agctgaatgg aaacaaggca a 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 3

ggagacaatg ccccaatgt 19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 4

tcccataggg ctaggatttc c 21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 5

tccccctcaca ctgttcccc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 6

ggtgagagg ctattcgcc 19

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 7

gaacacggcg gcatcag 17

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 8	
tcaaccttc ccagcctgtc t	21
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 9	
ccccagagag agaaaaacaga tttt	24
<210> 10	
<211>	
20	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 10	
ccctggtgaa gcatgttgc	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 11	
tgtggcctgt ctgccttacg	20
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 12	
cacacctaga ccccgaaagt c	21

<210> 13

<211>

21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 13

tcgcgttgcc agttgattct c

21

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 14

tgcggccgat cttagcc

17

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 15

ttgaccgatt ccttgcgg

18

<210> 16

<211>

20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 16

gcaaacaaaa accactggcc

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 17

ggccacatc catgggttc

19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 18

ccatgactgg gcctctgtac ac

22

<210> 19

<211>

25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 19

caagt caggg tgctaatgct gtatc

25

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 20

cacagcttgt gcagcctcc

19

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 21

gggcactgga tacgatgtat gg 22

<210> 22

<211>

21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 22

tcataggtag gtctcagttt g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 23

tgatctgcgc tggatccatcc t 21

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 24

tgacatgaac catctgttcc tctctcgaca a 31

<210> 25

<211>

29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>	
<223> synthetic	
<400> 25	
agagacgctc cgaggtaag gtgctctag	29
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 26	
tgggcacaac agacaatcg 23	
<210> 27	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 27	
accctctgct gtccct 16	
<210> 28	
<211>	
26	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 28	
ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26	
<210> 29	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	

<400> 29

tccacactgt cggtggag ctca 24

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 30

acgagcgggt tcggccatt c 21

<210> 31

<211>

37

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 31

ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 32

tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 33

agaagaagcc tgtactacag catccgttt acagtca 37

<210> 34

<211>

21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 34

gggctacttg aggaccttgc t

21

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 35

gacagccctt acagagtttg gaa

23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 36

aagaccagga gctctgccta agt

23

<210> 37

<211>

22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 37

cccatcacga actgaagttg ag

22

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 38

cagggcctcc atcccaggca 20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 39

ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc 28

<210> 40

<211>

20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 40

cctctctcc tcaccctcc 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (4)...(4)

<223> r=a or g

<220>

<221> variation

<222> (9)...(9)

<223> s=c or g

<220>

<221> variation

<222> 11, 12, 13

<223> y=c or t

<400> 41

atgrccdgst yyyctctcct

20

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 42

ctcctcaactc agggcaca

18

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (18)...(18)

<223> s=c or g

<400> 43

atggcctggg ctctgctsct

20

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> (11)...(11)

<223> y=c or t

<220>

<221> variation

<222> (13)...(13)

<223> s=c or g

<400> 44

atggcctgga ycsctctcc

19

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> variation

<222> 11, 16, 18, 21

<223> y=c or t

<220>

<221> variation

<222> (15)...(15)

<223> r=a or g

<220>

<221> variation

<222> (20)...(20)

<223> m=a or c

<400> 45

tcaccatggc ytggrycycm ytc

23

<210> 46

<211

> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 46

tcaccatggc ctgggtctcc tt

22

<210> 47

<211> 22	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<221> variation	
<222> (16)...(16)	
<223> m=a or c	
<220>	
<221> variation	
<222> (19)...(19)	
<223> y=c or t	
<400> 47	
tcaccatggc ctggamtcyt ct	22
<210> 48	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223>	
> synthetic	
<400> 48	
tcaccatggc ctgggctcca ctactt	26
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 49	
tcaccatggc ctggactcct	20
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	

<223> synthetic

<400> 50

tcaccatggc ctggatgatg ctt 23

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223>

> synthetic

<400> 51

taaatatggc ctgggctcct ct 22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 52

tcaccatgcc ctgggctctg ct 22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 53

tcaccatggc cctgactcct ct 22

<210> 54

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223>

> synthetic

<400> 54

cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 55

gtaaaaacgac ggccag 16

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 56

cagggaaacag ctatgac 17

<210> 57

<211> 440

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223

> synthetic

<400> 57

gggcctggc tcgtctgctc ctcaccctcc tcactcaggg cacagggtcc tggcccccagt 60

ctgcctgtac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctctgg acagttagtc accatctct 120

gcactgaaac cagcgtgac gttgggtggataaactatgt ctcgtgtac caacagcacc 180

caggaaacgc cccaaactc atgattatg aggttagtaa gggccctca ggggtccctg 240

atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300

ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtttcg 360

gaactggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420

caccatccag taagttggg 440

<210> 58

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 58

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctggcccg 60
 tctgccctga ctcaagctcc ctccgcgtcc gggctccctg gacagtcgt caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcgtga cggtgggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaag ccccaaact catgattat gaggtacta agcggccctc aggggtccct 240
 gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtccttaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 59

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 59

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctggcccg 60
 tctgccctga ctcaagctcc ctccgcgtcc gggctccctg gacagtcgt caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcgtga cggtgggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaag ccccaaact catgattat gaggtacta agcggccctc aggggtccct 240
 gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
 gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtccttaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 60

<211> 438

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 60

atggcctggg ctctgctct caccctcctc actcaggca cagggctctg ggcccagtct 60

gccctgactc agcctccctc cgcgccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120

actggaacca gcagtgacgt tgggtgtat aactatgtct cctggtaacca acagcaccca 180

ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240

cgcttcctg gtcccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gtcaggct 300

gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catttccca 420

ccatccagta agttggg 438

<210> 61

<211> 438

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 61

atggcctggg ctctgctgt cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctggcccg 60

tctgccctga ctcaaggctcc ctccgcgtcc gggctccctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcgtga cgttggtgt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaag ccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggccccc tgaccgtctc tgggtccag 300

gctgaggatg aggtgattt ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catttccca 420

ccatccagta agttggg 438

<210> 62

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 62

atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggc 60
 tctgccctga cttagcctcc ctccgcgtcc gggctccctg gacagtcagt caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcagtga cgttgggtgt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaag ccccaaact catgattat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240

gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
 gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 ggaactggaa ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 63

<211> 442

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 63

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggc 60
 tctgccctga cttagcctcc ctccgcgtcc gggctccctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttgggtgt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaag ccccaaact catgattat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
 gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
 gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 cggaactggg accaaggtca cgtcctaggg gctgatgctg gcaccaactg tatccatctt 420
 cccaccatcc agtaagcttgg 442

<210> 64

<211> 428

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 64

ccttcattt ctccacaggt ctctgtgctc tgcctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
 ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcacccct aagcagttag cacagcacct 120
 acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggta 180
 agagtgtatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgccttcatg ggctccagg 240
 ctggggctga ccgttaccc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
 actgtggaga gagccacacg attgtatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360
 aggtcaccgt cctagggct gatgctgcac caactgtatc catctccca ccatccagta 420

agcttggg 428

<210> 65

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 65

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcaact gcacagggtc ctggcccg 60
 tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggcccccag gacagaaggt caccatctcc 120
 tgctctggaa gcagctccaa cattggaaat aattatgtat cctggtagcca gcagctccca 180
 ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
 cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcacccgg actccagact 300

ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tggatagca gcctgagtgc ttatgtttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtccttaggg gctgatgtcg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtgaggcgtt a 441

<210> 66

<211> 441

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 66

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcaact gcacagggtc ctggcccg 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggcccccag gacagaaggt caccatctcc 120

tgctctggaa gcagctccaa cattggaaat aattatgtat cctggcacca gcagctccca 180

ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240

cgattctctg gtcacaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcacccgg actccagact 300

ggggacgagg ccgattatta ctgcggaca tggatagca gcctgagtgc ggctttttt 360

ggaactggga ccaaggcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420

ccaccatcca gtgagcagtt a 441

<210> 67

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 67

cccgccaga gggtcaccat ctttgttct ggaagcagct ccaacatcg 60

gtaaactgg accagcagct cccaggaacg gccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120

cagccgcct caggggtccc tgaccgattc tctggctca agtctggcac ctcagcctcc 180

ctggccatca gtggctcca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatggat 240

gacagcctga atggatgt cttcgaaact gggaccaagg tcaccgtct agggctgat 300

gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca tccagtgagc agtta 345

<210> 68

<211> 432

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 68

atggcctgga cccctctct gtcctccctc ctcactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60

tatgagctga cacagccacc ctgggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120

tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggt accagcagaa gtcaggccag 180

gccctgtgc tggtcatcta tgaggacagc aaacgaccct cgggatccc tgagagattc 240

tctggctcca gtcaggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300

gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggtt atcatgtctt cggaactggg 360

accaaggta ccgtcctagg ggctgatgt gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
 agtgagcgt ta 432
 <210> 69

<211> 426
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 69

atggcctgga ctccctcttt tctgttcctc ctcacttgct gcccagggtc caattccag 60
 gctgtggta ctcaggagcc ctcactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
 tgtggctcca gcaactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactgggtt ccagcagaag 180
 cctggccaag cccccaggac actgatttt gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
 gccccgttct caggctccct ccttggggc aaagctgcc tgacccttc gggtgcgccag 300
 cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctctata gtggtgctta tgtttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgtgcac caactgtatc catttccca 420
 ccatcc 426
 <210> 70
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 70

agtggcctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggaa aacaacattt gaagtaaaaa 60
 tgtgcactgg taccagcaga agccaggcca ggccctgtg ctggcatct ataggataa 120
 caaccggccc tctggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggaa acacggccac 180
 cctgaccatc agcagagccc aagccgggaa tgaggctgac tattactgtc aggtgtggaa 240

cagcagcact tattgtttcg gaactgggac caaggtcacc gtcttaggg ctgtatgtgc 300
 accaactgtta tccatcttcc caccatccag t 331
 <210> 71
 <211> 417

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 71

```

actcctctcc tcctcctgtt cctctctcac tgcacagggtt ccctctcgca ggctgtgctg 60
actcagccgt ctccctctc tgcacatctt ggagcatcag ccagtctcac ctgcacccctt 120
cgcagtggttca tcaatgttgg tacctacagg atatactgtt accagcagaa gccaggagtt 180
cctccccagt atctccttagt gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240

```

```

cccagccgct tctctggatc caaagatgtc tcggccaaatg cagggatttt actcatctt 300
gggcctccaggct ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgtttat 360
gtctcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctagggctg atgctgcacc aactgtt 417

```

<210> 72

<211> 393

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 72

```

tttcgttcc tcctcacttg ctgcccagggtt tccaaatttcc agactgtggta gactcaggag 60
ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgttcc cagcactggaa 120
gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcacccagg 180

```

```

gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcctggaccc ctgcccgggtt ctcaggctcc 240
ctccctgggg gcaaagctgc cctgacactg tcaggtgtgc agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgctctacta tgggtgggtatgtcttcg gaactggac caaggtcacc 360
gtccttagggg ctgatgctgc accaactgtatcc 393

```

<210> 73

<211> 417

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 73

atggcctgg ctctgctgct cctcaactc ctcactcagg acacagggtc ctggcccaag 60
 tctgccctga ctcaagcctgc ctccgtgtct gggtctccctg gacagtcgt caccatctcc 120

tgcaactggaa ccagcagtga tggtggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaaaag ccccaact catgattat gagggcagta agcggccctc aggggttct 240
 aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
 gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtccttaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

<210> 74

<211> 348

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 74

cagctctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgacggtgg ggttataact atgtctccctg gtaccaacag 120
 cacccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggta gtaatcgcc ctcagggtt 180
 tctaattcgct tctctggctc caagtctggc aacacggctt ccctgaccat ctctggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
 ttcgaaactg ggaccaaggt caccggctcg ggggctgatg ctgcacca 348

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 75

aacaaccgag ctccaggtgt 20

<210> 76

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223> synthetic		
<400> 76		
agggcagcct tgtctccaa	19	
<210> 77		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 77		
cctgccagat tctcaggctc	20	
<210> 78		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 78		
catcacaggg gcacagactg	20	
<210> 79		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 79		
gatttgctga gggcagggt	19	
<210> 80		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		

<400> 80	
ccccaaagtct gatccttcct t	21
<210> 81	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 81	
gctgaccaac gatgcctaa	20
<210> 82	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 82	
taagcgccac actgcacct	19
<210> 83	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 83	
cctgccagat tctcaggctc cctg	24
<210> 84	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic	
<400> 84	

ctgattggag acaaggctgc cct 23

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 85

ccttcatact ctigcatcct cccttctcca 30

<210> 86

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 86

ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35

<210> 87

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 87

tctggcacct cagcctccct ggccatcaact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg cacccggctg 120

accggccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 88

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 88

tctggcacct cagcctccct ggccatcaact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
 accgtccctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 89

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 89

tctggcacct cagcctccct ggccatcaagt gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catggatga cagcctgaat ggtgctgtt tcggaggagg caccagctg 120
 accggccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 90

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 90

tctggcacct cagcctccct ggccatcaagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtccctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 91

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 91

tcgggaaaca cggccacctt gaccatcago agagcccaag ccggggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg tgtggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcaccca gctgaccgcc 120

ctcggggctg atgtgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 92

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 92

tcagggacaa tggcacctt gactatcagt gggcccagg tggaggatga agctgactac 60

tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtttcg gaggaggcac ccagctgacc 120

gccctgggg ctgtatgc accaactgta tccatc 156

<210> 93

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 93

tcagggacaa tggcacctt gactatcagt gggcccagg tggaggatga agctgactac 60

tactgttact caacagacag cagtggtaat catagggtgt tcggcgagg gaccaagctg 120

accgtcttag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 94

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 94

tctggcacct cagccctccct ggccatcaact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgccagt cctatgacag cagccctgagt ggttatgtct tcgaaactgg gaccaaggtc 120

accgtcttag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 95

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 95

gatgcttcgg ccaatgcagg gatttactc atctctggc tccagtcgtga ggtatgaggct 60
 gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggat tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 96

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 96

cttggggca aagctgccct gacactgtca ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagttat 60
 tactgcctgc tctactatgg tggtgctcggtgtcggc gaggaccaa gctgaccgtc 120
 ctagggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 97

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 97

cttggggca aagctgccct gacccttcg ggtgcgcagc ctgaggatga ggctgagttat 60
 tactgcttgc tctcctatag tggtgctcggtattcggc gaggaccaa gctgaccgtc 120
 ctagggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 98

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 98

tcaggcctga atcggtaacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gagtgactac 60
 cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120
 cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccatc 165

<210> 99

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 99

tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60
 tactgcggaa catggatag cagcctgagt gctggcccg ggtgttcggc ggagggacca 120

agctgaccgt cctagggct gatgctgcac caactgtatc ccatc 164

<210> 100

<211> 22800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 100

aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaatttca 60
 tagggcata aatgtgaaac gccttgtca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120
 ccaatttctt aactgccttt tacctatatt aatcgtat atactggctt ttacctctgt 180
 taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tttcaatgc ctgctcagca 240
 acatttccg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tcctattgca 300

gcattcttg ggattnacc agttccaa gactcttc acaatgttaa gatgttagaa 360
 atagatccaa aactaggta tatatccct agtaaaactg tgaggtaaa cttgtctggc 420
 taatgcttcc attaaaaat ttctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaattc 480
 agggaaaac tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540
 cacacacaaa aaaatcaatt ctattactc cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600
 cctgttctaa gatcattgtt gcatgaccat atgtattcca ggtctaattct aaactgtgga 660

taaatcccag caggacatta gagattttg tgagagtaag catataggat tcagggtaa 720
 tgagcttag attttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780

agataaataa aattcaaac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840
 cttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaatatta gaaaaatcag 900
 ttaataaaag tatgtcattt catcaattca ataagtata atagcaaaaa accataataa 960
 attatcaattt aaatgtcaat acatttataa actatggta ataaatagga tattgaatag 1020
 ccattgatgc tcctgatgaa aatttagcagg cagtataaa tgataaatat gaagcacatg 1080
 tcaataaataa aaataagttt tatgttaattt aggagaaaaat ggtgataatg acacaaaatg 1140
 tgaatitatgg atgcatctat aaaattcttt gtacattttgt gaattgtaaa tatttatctt 1200
 agagacatta ttactttgta tatgttccat ttgctcacct atatgtccca gtctccttac 1260

aatgctatg gccaaagaaaa taggcataca tacatcctt gcaggctgag gcagggaaaa 1320
 gatcttacgg aattttccag tctatcctt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380
 ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggt 1440
 gcatggagca gagcacctt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500
 atttggtaa gctaggccat gagatttggg gcagtggat aacctaccct attatggaaa 1560
 atataaatac acaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620
 atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680
 ccttctggta atcaaactaa tggctacag ctccaaagaa gaatgctcgc ctaacgtctc 1740

cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaatttac tattgcattc 1800
 tttgatgtaa gggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaaccc aggtcactta 1860
 gttcgtggca gagctgagc taaaaccagg cctttgact cctaattttg tgctctttac 1920
 accttctcac atcacttctc caacccaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatataat 1980
 gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttccctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040
 atggttcaca ataaggcagca gagggaaagt aataacttac ttctgtccctt ctactgtat 2100
 ttgtgcagtt tgaagctt ctcttaatc atgtttctt ctctgttaa atactacaac 2160
 ttgtgcctt tatgtgtgta taaattttaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220

aatggacac tccaaaaga tggctcaataa gggttacatgg ctgcacattt cccctctac 2280
 accatcttgtt ggagctcac acccacctca cccaaatttg agaaaaataa tcaagaaaaat 2340
 gactctactt agcagtgaga ccaagtcac aagcactaat gtcatcagt cacactgcag 2400
 cctcatgtgtt ccaagcatgtt tttggcgta tccctggact gggttggta catgtcaaa 2460
 ggtacattttt ccacctgcat agccccatcc tggatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520

aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttata aagtttattt 2580
 tcccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtcctgatat atgtgccaa 2640
 gggggtcggg gcacagcttg gtgttataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700

tgtagaagat gtgcacatcgct ttggctcgat aagggtgtac aactcaaggc agggaaagggg 2760
 gcttcctgct ggggttcgt tggtttgagt ctctgatcag ccttcacat gtgaaaggca 2820
 ggttagagaaa tagtcattt tgccttagtc tggcttattt aaacagtagg gcagaagaag 2880
 cattgcatat gcatttgcgt gaagtgaaca gaggatgac tttgagctct gtccttcctt 2940
 tgtccacaag gaattacattt gtggcaaat tgtgagggag gtatgtagct ttttttcctt 3000
 ttagtatac ttttttagga ataaaatggg aggcagggtt gcctgatgca attccagct 3060
 tgactttccc ttttggctta gtgatttttgggtcctgag gtttattttt tctttcacat 3120
 tagtataact actttcttt ttcttaattcc ttttctactt gtatgtgtt cagctgactt 3180

atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240
 gatgataacg aatcctccag aatcttagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
 ttcttggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360
 gagctcttatttctt tggttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420
 gacactgggtt tctaagtttctt agggtaaac agtccactcc cagggccacc acaccatacc 3480
 ctcctgacat ctggtaaca gcaataaaat tgtttcttatttctt tctgaaaatc ctccaaatct 3540
 tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600
 acaatatcca ttatattatttcttggcttt gagatacctt acaaaacaaa tacaaaaaaa 3660

gtcccaattt aacatctttt aataatctttt acaaaacaga acacatctcc ttttttgata 3720
 atagtcaga ggctcagtgg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgttcaa 3780
 aggttagaaaa aatagaattt gttacatattt tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840
 caagggtt gcaagtgtttt aacctgagca actagagaat ttggaggac attttctgag 3900
 atggggagg caggcggaa tcagggatta gagttgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
 tgcttagacat ctaattggca atatccctt gacagggttga tgaatatgct tgattctgg 4020
 gttcgggaaa tagtccgggtt ggagatgcaat tttggggaaa cagggcgagg ttacttagcaa 4080
 tgagttaaat caatgaaggc aggctggac ctggcaggtt accaacaag tagaggtcga 4140

agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaaggact ggtcaggagg aaggagttga 4200
 accaagaaag ttagtgccta gagccaacaa aataaggatt tctttctgt ttacaatgt 4260
 aaaaattaaaaa ggttaataaa aagaaaattt tactttatg gttgggtgtt attaagtgg 4320
 ccaaacactg tctcttattt gttagatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgaa 4380

```
agtacttt taaaagggtgt gtgcactgct gcccttgcgt ggtcaagttt atgcactgca 4440
aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcccttaaa atagctcagg ctgtacaaggc 4500
tagaaagaac ctcgcaagat attcccttcca acatttgcat ttgacttatg ggaagtgcag 4560
gttcagccag aaaagtgttg tgcaaggccg tttatgtaaat ttatcagac ctgattctta 4620
```

cggtctttcc cattgtttcg agcctccctt ccattcaatt cccgctcata cgcgaccaag 4680
tataggacag gagtagttat tctgcacttt atagcagetc cactgtctgg cactctgatg 4740
ttctttaatt acaagctta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctag 4800
ggcagaaaaga agaaaatgtg tgtaactcg gaggctctgg tctgaaagct cggggatc 4860
atttcttcaa agtcttgagc ttgttttgt ttgtattttt ttatttattt gtttttagaga 4920
caaggctctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
gtgaataaaag agatatcagt aatgactgtt ttatattgtg gctgttagcgc attcgaggga 5040
taattcgatt ctgttctgct ttgcattgtca tggctcaactg taacctccaa ctccgggtc 5100

caagcgatcc tcctacctca gcttcaggtagttgagct tgatttattt taaagttca 5160
taaaattttg gcatttctt ccacaatatg gccatgtgtc ctttactata aaatattttc 5220
atcacaaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caacccaaga 5280
aagcagaaca gactcaaatt atcccttaaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagtcc 5340
gtgactggc gtgttgctt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400
gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaac cccgtcccta 5460
ttaaaaatac aaaattttc aggagttgtc gcaggcagtt gtaatccag ctacttggg 5520
ggctgaggca ggagaatcac ttgaacccag gaggtggagg ttgttagttag ccaagatttg 5580

gcccgtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaaa aaaaaattaa 5640
gttaataaaa tataaaaaaa taaaggcagtc cctattgata tctcttatt cactaaatca 5700
acctggaatt gacctgaatt ctgattttt tttcatcatg gatTTTgc attaattttg 5760
atgtttaaa tattgcatta aaatattatt tatcttgact actgagttt cgggacctcc 5820
ttaaaattt tgaccaaggc aatgcctcac tcactgcct taccataatc tgggccacat 5880
atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac ttttgaacag ctaagacttc tctcttca 5940
gtgaagacca gatggccct gcaaacagtg taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000
aactacaacc aggcacaaaaa gactctgtat gtgaagtccc agccctccaa gtcccaactt 6060

cctgaaggga aagagcaccc caagttctga ccagaggcca gagtcataac gaagatggaa 6120
tgtgagcttg acatagaagg ggtggtagca cctggctcag taatgaagag gcttcggtc 6180
ctgaaggaag agctcagcac attcaaagat tagaagggag gtcccgatca taggagccgg 6240

gaaggagaga aggccaata agaaacacag acaggaggga ggggtcaggg caagatcata 6300
 ctggaaaca cttagagact aataaaagtc acagtgcacca gtccccacat ggaccagact 6360
 cttcggaatc tcttaggcac aatttggca ccagtagtt tcaaagttct ccagaagatt 6420
 ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggttgtgc cttaggatca tgacaatgag 6480
 tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag gggataatt tgattgttt 6540

cttggggatg attttaaag atcagtctgg ttactgtgtg taagacaata atccagaaaa 6600
 tctgttgcctc atgaaccaca tatctgtaaa ttgttccc ctgttaactgg atctaaccaa 6660
 caaaaattag tacttactaa gaaattacat gcccaggac tatgctaagt aattcataaa 6720
 cactatTTTt ttiactcctc acagcaagt tataagagaa acgttattat ttccacattt 6780
 cggatgagaa atttgaggct tggggaaagt taagtaattt acctaattgtc acacccagtt 6840
 cataagatgc agagttttaaga ttcttaattt gtgttaactgt tgatgttcca tcaaacacac 6900
 cacgcctcca acttaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960
 tggttagatt tcttaggcaca gatgaataaa tcaacatgtt ggtttgcattt agaatgaatc 7020

tatccagctc tgaatttgc tccaagggtt tgtgaggcaca caagtctaaa agtgtggct 7080
 cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140
 ggacagtcca ccatctgttt acagatggta aagccacata ccagcttgc catctgatgt 7200
 tctctattca cattcaacat ttatacaaga aatagtctata tggatcctt tcaatagaca 7260
 gtactgggaa aattttaattt ccatatgcag aagaatggaa ctagacctt atctctcacc 7320
 aaatacaaaa gttaactcaa gacagattaa agacttacat ataagacctg taactacaaa 7380
 aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgtct tctggattt atcttaggtga agaactcagg 7440
 actaagatata caaaaggcaca agcaccaaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500

tagaacgcctt ctgaacagca agagaaataa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560
 gggtaaaaat atttgcacac tatgcacatct acagggaaat aatgtccaga attttagaagg 7620
 aactcaaaca attcaacaac aacagcaaaa taacccccc aaaaaagtgg gcaaaggaca 7680
 tgaatagaca ttttcaaaa gaaggttat gatatggttt ggctctgtgt ctccacccag 7740
 atctcacctt aaattgtat aatccccaca tatcatggg gagaccgggt gggaggtat 7800
 tgaatcatgg gggcagggtt gtcccatgtt gttctcatga tactgaataa gtcctatgag 7860
 atctgatgtat ttataaagg ggagttcccc tgcacacact ctcttgcctg cctccatgtt 7920
 atatgtgcct ttgtttctcc ttgccttctt gccatgattt tgaggctct ccagccatata 7980

ggaactgagt caattaaacc actttttttt tggtaaattttt ccaatcttgg gtatgtttt 8040
 attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg tacaaaaaac 8100

aaaatgtca aatcaatac cactagagaa tcgcaagtta aaaccacaat gagatattat 8160
 cttacagcag tcagaatgcc tattattaaa acaccaaaaa ataacatgtt ggcaaggatg 8220
 cagagaaaag ggaatactta cacattatta gtggaatgt aaactagttac agcttctgtg 8280
 gaaaacacta tggagatttc tcaaagaact agaaatagaa ctaccatgtg gttcagcaat 8340
 accacaactg ggtatctacc caaaggaaa taaattatta tataaaaaag atatctgcac 8400
 tcacttgttt attgcagcac tattcacaat agcaaagata tggaaatcaac ccaagtgtcc 8460

atcaacagat gattggataa agaaaacgtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 8520
 acacatacca caatgaaata ctattcagct ataaagaaaa gaatgaaatc atgtctttg 8580
 cagcaatgtg gtggaaactg gaggccattt tcttaagtgg ataattcaaa aacagaaggt 8640
 caaatgtcac atgttctcac ttataagtgg gagctaaatg atgtgtacac atggacatag 8700
 agtgtgttat gataaacact ggagattgag atgggtggaa gggtggagg aggttgagt 8760
 atgagaaaat actaaatgga tacaatatac atgattcagg cgatagatac actaaaagcc 8820
 cagacttcac cactacacag tatactatg tagcaaaattt gcacctgtat tgcttaattt 8880
 tatacaagta aaaaaaagat cgtacgaatt ctgtttta ttctctatga aattactact 8940

gagagtatta tccaatgccg tttctatgca gtgcggccaa tattatccat ttagcagctc 9000
 ctatgcaatg ccccaagata gaaattgtct tcaactttt tcccagggaa accttcagtc 9060
 acacgttagaa actagaaatt tttcccttag atgaaagtta tgtaacataa cacattatct 9120
 tcatttagtc ggttccaag aagctcagaa ccagattttt tggtaatca aaaactgctt 9180
 atttaagtg aggttactg aggtataat tacaataaaa gccacccctt cgtgttatatt 9240
 tctataagt tggcaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300
 agtccctcat cctttaagt tcctttatgc cccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360
 ctggtttttgc tctgatccaa tcggttgcct ctccctgaat gtcatgaaa tagagccatg 9420

caatgtgaag cctttgagt ctggctttgt tcacttgc acctaggaga atgcatttg 9480
 gattcattt tgcgtttcg tgcgttgc gttcactgtc tattgttgat tagtattcca 9540
 ttgtgtggat atgcccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggcattt 9600
 ctaatttta gctgctaaga ataaagttgc tgtaagctt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660
 aactcaggat ttcatgtc ttggtaaat tcctagctt gggactgctg agtcatctgg 9720
 taggtgtatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactgtt ttccaaagtt gctgtgtct 9780
 tttgcactcc catcagcagt gaatgagggt tccacttgc cgagccatgt attttaactt 9840
 cactatatac ctctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggtaagtt tttattgggg 9900

tggtgttact atggactgtg agagttctt gtatattctg catatgattt ttttctcaca 9960

tttgtgtttt atgaatatgt tctccaaatg tgtggcgctt ttatttct taacgtgcca 10020
 tgtgaagagc agaagttaa tttatgatg tccaaattat cttttttct tttcttttt 10080
 agatcaaaat aggggtctat ttgattacc actgttattt tatctccatt tgatttcga 10140
 ttttattttt tattttcta atttcatigt aaattttaa ttaaacccaa atattctagg 10200
 ggaagaggc aagataaaaa tagtctaact tggcataaa ttttagagtc atattcttt 10260
 ggcgagaaag gaaactagct ctcttacatt gattgtttaa ttccagacgt cactactta 10320

tgaggatgcc caaattatgg gcttaaaaaa atatataatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380
 taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagttgc ccagtgacag 10440
 ggtctatatt atittctata tatcaaattc tacaactggt cttaaagct actgtacata 10500
 acctaagtta aaatattagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560
 ctgtgtcat agtagagaa tctttaaaaa tatggagcta tttcataga tttaaactatg 10620
 ccagttaaaa gttggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaaggtt 10680
 ttaaagcaa ctccaagtca tttcatcaa tgaaatcaat aagtttgc aaatataat 10740

gtatgaaaat actgatttaa aatgcaaata agggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800
 aaatgattt ataattctag taagttata ggttatggg gttttacgt actttctac 10860
 ccaacttgc tataagactt taatgaatca cttagaattt taaaataat ttattattac 10920
 tctgtacctg ttcttactc tgcaaatctt accttgcctt tttgtctaaa agcaataaaaa 10980
 tctgacctgg ttatatcgt atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040
 ggcctatgta ggctcatggt ttataacaaca ctgccccatctg ctgacagagt gtgacagtca 11100
 cagtcagcaa cacgagacca ctttatccc attttagtg tttatagaaa tatgaatata 11160

cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgcataat cttgtttcaa 11220
 ctaccgcctc cccccctatc caattactct gttctctcac ctccctcac acagacactg 11280
 gcagttttt tcagccaaatc attaatacgt tgccaaactga taaggacttt taaaaaccaa 11340
 ccaccattcc attatgattc ccagcataat tgagagtaat tccctaataat ccaataccca 11400
 ttttctattt caatttcctt gattgtctt aaactgtttt taccctaaatg ttgcttaat 11460
 caaagtccag gtcctgttaa acatatggtt aagtttacc caaacccaa taaataaata 11520
 aataaataaa taaaataacccat atttttcca attccaggaa atagtgaaag aggtaatg 11580

ccattatcca gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaattga 11640
 agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaaacttatt taaaacttc aatgcagaac 11700
 tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatca ttctgttcc atcagtattc 11760
 actcagctat atgttagttga aatctaacta gaggagcttgc atcagataaa gagatacatt 11820

tttctcacca aggccgactc tggaggcagg tggtagag ctagacagct gctgcaggac 11880
 ccaggtcctt tccctgcctg ctccctccact ctagcttg acttcatcc tgcaagatgg 11940
 gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtgg 12000

gcctctgtcc atcaagcaaa attttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
 aacagtctta actgcaaaga agctgaggaa ttagatttt ggctggacca ctgttgcct 12120
 gtaaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaaactc 12180
 ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tggcatacc taaaaacag 12240
 gcaattcaca acagatgaga ccccaatagc caataaacat tttaaatgg tcaacctcat 12300
 gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatTTT aaaccaaaaa taaaatacaa tgtatigacc 12360
 atttgagtgg aaaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgttagagt 12420

gagggaaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480
 ttgaggccaa ttgttaatt gaaaaatgcg cacaccctgc aaccaagtac cccttgcatt 12540
 attttigaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cctttatact 12600
 cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac tattttttt 12660
 ttaatTTTT tttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
 tcataactct ctctagcagc ctgcactcc tgggtcaag catcctcctg cctcagcctc 12780
 ccaagtagct aggactacag gcatggacca caacacacag ctaatTTTT taaatTTTT 12840

ttagagacat ggtctacta tggcctac gctggctca aactcctagg tcaagcgatt 12900
 ctcccacctc tactcacaa agtgctgttagt gtatgttagt atggatgtt ggtatgaacc 12960
 accgtgcca actcactact ttttattact aattattcca tggatggat gtaccgact 13020
 ttgtttacc attaatctat tggtagacat ttgactgtatcc tccagttttt ttttaataca 13080
 aataaaacca ctatgaatag ttgtgtattt tatacgttt tgtgctaatgt tttcattttt 13140
 ctggataag tttcatttc ttggcctt tactgtatcc ttgatattat aatatgttac 13200
 atctcagtt ttattctatt caatatataa tctttatTTT tcctgaaat ctcccatgga 13260

ttgtttagaa gtgtgttgg tggggccaa ggggtggca tttttccat tattttctta 13320
 ttatcgattt ccagttttagt tccaggtggt cagagaacac acttcatgtt atttcagttc 13380
 tattaaattt gtgggggtt gttacatggc ccagttatgt gcaattttgg tataatgttcc 13440
 atggcactt gaaaagaatg cgaattctgc tgggtgttgg tggatTTTc cagcaatgtt 13500
 gattatgtt ctactcattt gatgggtggt ttgagtttga tgggttctt cgtggcagc 13560
 tttaacattt ttgtcaggta attctaacgt ctctgtcatg tcagtattag cgcctttaa 13620

ctgtctcatc aaagctgaga tttcctggc tcccctggc cctgtgggaa tgtgtggttt 13680

tcatttggaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgagggc tttggatctc atttaaactc 13740
 atctcagcga atttcccttc ttgccactca ggaaggagaa gttgggtgtt tgaatggagc 13800
 agagccgtta ctgcctaaga attgtttac tgggcttccc cttctttct ccttgacta 13860
 gagagagcca gcttttattt agggctttat gttttctgg gcctgttggtt gtttctgggt 13920
 tgacaaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgagggc aaaaagaaac cccgtggaaat 13980
 gcactgctgg gtcgctcctt gggtccaaat gttcctaact ggtctgcctt cttctctcca 14040
 gcttccagag tttcataag tttgctttac gtacaatgtc cggggttttt actttacttg 14100

agagaaatag gtaaaagtaa ttctactcca tctttcagga agcaaaagcc cccttgtgtta 14160
 ttttttaaa ctttcaaaaa caaaacaaaaa ggcagctgca acagtaaaga agcttagtaac 14220
 acccttggtg ggaatttcaa gtccaaatac acattttaag tttggcttagc cagtggaaac 14280
 atcagaatag ttccaggaaaaa aaacaaattt atatttataa ttatgcataat actaaaagct 14340
 gaaggcatct tatatttact aagcacctat tttgttcttg taaaaagac agaattccat 14400
 tcccttagaa atttgcacccg ctgactggag ctgatccacc tggccacttag agcacagagc 14460
 agggagagta gtagccctgc cccagccacc cctcaagaca ggatttttc tctggaaact 14520

gttagtaaca ctaaatcggtt ctggAACACA acaacgaaag aagaaggaa agagaaagaa 14580
 agaaaggaaag aaagagagag agaaggaaagg aaggagggaa gggagggaaag gaagggaaag 14640
 ggaaggaaat ggaaggaaag gaaggaaagga aaaggaaagga agggagggag agaggaaagga 14700
 aggaaggaaa ggaaggaaag gaaggaaagaa ggaaagaaaa aaagaaagaa agaagaaaga 14760
 aagaaagaca agaaagaaag aaagaaagaa agaaaggaaag aagaaaagaa agaggaaaga 14820
 aagagaaaga aagaaaagaa agaaaggaaa gaaagagaaa gaaagaaaaaa gaaagagaaa 14880
 gaaagagaaa gacaagaaag aaaaaggaaa gaaaagaaag agaaagaaaa gaaagaaagg 14940

aaagaaagag aaagaaagaa aaagaaagaa agaaaagaag aaagagaaag aaagaaagaa 15000
 aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaaaag aaaaagaaag gagaaaatga cagcaattac 15060
 ttttgcaca acctaataata agtttttaa aagttaataa ttctgttcca tgcattgctg 15120
 gataccttat aaataacagg gcattctatg acctgaattt cccaaattat gagttgggg 15180
 tttgaactat ttttaaaaaa caaggaggcc aggcgcactg gctcatgcct gtaatcccag 15240
 cacttggaa ggctgaggca ggtggatcac gaggtcagga gctcgagacc agccttacca 15300
 acatagtcaa acaccgcctc tactaaaaat acaaaaatata gccggcgtg atggtgcgca 15360

cctgttaatct cagctactca gcaggcttag gcaggagaat cgcttgaacc cagaaggcgg 15420
aggttgcagt gagccaagat cacagcattg cactccagcc tgggcacag agggagactc 15480
cgtttcaaa aaaaaaaaaa aagacaagga atctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540
acttttattt tcattctatg ctatccgatg cctactgcta tttcccttca tatttaacct 15600
ccaacagctg cattttgctc cctccagacc acctgattgg agtcacgtg ctccccacaca 15660
gtacacctaa ccagagagag tcgagtccca cagaaaggcg taacaatcac cagtaattt 15720
gcacttattt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctt tgaatcatat 15780

ttaataaaata tgtgtatttggatgttagc atattgcagc tacctggata tataatttaa 15840
tttagaaaaaa aattttgtgt ggctcaatca acaaacgact tttctctctc tctcttctc 15900
tttctccctc tctctcttctt tcttctcagt tgatgttgct ggagttcagt gttgtgcaga 15960
tggcagtgac aaatgccatg ggcacatgat atatgataaa aggtccctga agaaggtgga 16020
gaaccaggtta tcttatgaaa tttccagag tgggtactgg atctctcctg tctggcacca 16080
tgctggcctc agcccaaggg gaatttcctt ccagagacag agggcagtga ttgaggtggg 16140
gagacagatc gtaacactga gacttacatg aggacaccaa acagaaaaaa ggtggcaagt 16200

atagaaaatt ctttctctg gacagtctc tctgttctaa cttagcaaa attctcccc 16260
cagtggatgc tattgcacaa ccctacatat gctatgttt ttcctataca cacttacca 16320
tgataaaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaaata 16380
gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatatca tgacagtcaa 16440
tctgtatgacc aagagggcta ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500
gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctggatg gacggaaagg gcatgatatg 16560
tcatcacgt actaaggcac acaatttaaa atgagtaat tcttatttct agaaatttct 16620

tttaaatatt ttcagactac agttgcctac aggtaactga aaccccgaaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatcgcc ttgaaccaa ctttatcatt tgcttagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatataca catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800
cacacacaca cacgcacaca cacacactca catctactaa tgtagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttgtt aatgcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920
ctttctact agataaaaat ccattatcat ttctataaag tttctttac attaacatct 16980
aactttgca atcttagttt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040

tgaatcaaat atccttggaaa acatacatag tcatctttt ggtttatttt tatttttaga 17100
taaatttattt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgcact gtatatttg 17160
acttggctt tcaaacttaa tttgtacttt tatgtatcgt gtttacctca atttttttt 17220

atagctctga agtacggcgtt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520
aggacaccc tcgttttgc aatggaaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat ggtttaaatc tctgtgggt tcttcaaagt ttttcttct aataggacct 17640
ctcatgattc tccaaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatttct tctgtcattg 17700
caaaggaggt ttgaaagag tggaggacgc gctaatgaac tcaaaaatcc acactattcc 17760
ttgtttccat ctgttgttca ttcattgttt ccattggcct gtccgcctcc tatcctcctt 17820
cttagacttg gagctctagc ctcagccagg ataggaaaaa gagagatcag actgttactt 17880

tgtctatgt aaaaaggaaac acataagaaa ctccatgg atctgtatcc tgaacaattt 17940
tttgcctt agatgttgtt aatctgtaac tttagccccca accttggct cacagaaaca 18000
tgtgttgtat ggaatcaaga tttagggat ctaggctgt gcagaatgtt ccttgttaac 18060
aacatgtttt caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctcgattttt 18120
tagggcaca gtgcactgcg gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattt 18180
tccaagggtt ctccttactg agacagcctg agatatggcc ttgcggatg ggaaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgcgtt aggaggattt gtaaaaaggagg 18300

aaggccttt gcgggttggaa taaggaggaaag ccctctgtct cctgcattgc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttctgttat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggaggcgaga tatgtggcg gcaatgctgc tctgttgc tttactacac 18480
ttagatgttt gggtgagaga agcataaatac tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttggaa ttactgttg acacagattc ctgtgtcac atgtttctt gctgaccctc 18600
tccccactat caccctgttc tcctggcgca ttcccccttgc tgaggtagtg aaaatagtaa 18660
tcaataaataa ctgaggggAAC tcagagaccg gtggccagcgc gggctctccg tatgtgtgagt 18720

gacggtcct tggcccaact gttcctctc tatactttgt ctctgtgtct tatttcttt 18780
ctcagtcctc cgtcccacct gacgagaaat acccacaggt gtggagggc tggacacccc 18840
ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagccccca actcatcgat 18900
ttcacaacctt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcc a gtaggtaga cagggaggc agggactct 19020
aagacagagc ttgagggct cattcctt gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080

tatgtaaatc tcggggctg aaccctctt agatagtaa gccctgacac aattgctgt 19140

atcttcttt tctctcaagg aagtcaaaaa acacccgcag cttactgtc ccctggaaa 19200
 caagatgaac atctacattt tctaaagtgg gacaagaatc tctgttcata tttatgtccc 19260
 atgcattgc acgtggccgg acaaaggact ttgcttgc cagcacatct gtcttcagat 19320
 atgagaggaa acagacacaa cctggaggcg gcaaagaagc agctttct caagtgcac 19380
 cctctatctc cctacttcct ggctaattggg gcagccttga tccttggaa tccaggacag 19440
 atatccactc gtgacaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttcc aagcaccact 19500
 ggtatgtgaac cacagaattt ctcctctcc ttgtgaaatg tcagcttacg tctgacaaaa 19560

aatgtaaaac tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtca agctaaagca gaaagaatca 19620
 cctactctgg actccagcat gactgcttagt ctcataata tatagagaga gaaagaacca 19680
 caaacttcaa gatggatatac agctacagac ttccctgagt caggtaggaa aatggccatc 19740
 cctcaaaacct tgcacaaaggc aaacttatgc cattgtgtcc tctgacatac tgggtatgt 19800
 actgtatgtt actgtatgtga ggggaacttc ctaaattggc tagtaaatta tgccaaataa 19860
 aaagcaaaaa tggatattct tggaaatgtt catctgagga acattgctaa aataatttat 19920
 cagtagttt caggatgatt tataatgtg cattgaagtg tgtactgtg ctctctct 19980

cctctcttc tctttctc tctctctct cgtctttct ctccttgc ccctccctcc 20040
 ctgactttcc ttccgtccc ctccacagca gtttatattt ttttctgtat aatctaactt 20100
 tgctgagggt tcaatgtaaa gcacccatcg tggatgtt gttggaaatgt tcccaagaa 20160
 attctatttc cagcacttta ttacatgaaa tccaaaggc tctcagacta tcttactgac 20220
 acctgcctt tcctcaacag atcaatcttca tcaatgtcca tcacagatata tttttagaaac 20280
 ggtggatctt ggcagagtct cacagatgt tctgagacaa catttgcattt caaaaaatga 20340
 accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccatgtt cattttgtgt tacagcaaac 20400

atcacaacaa tcatttcac agatcaccac tgcatgtgtt caataaaataa gttttgca 20460
 caatggtaact tggataatc atcttttattt gtttacaaat actgctttac aatagttattt 20520
 cgggtgcact gttcatattt gatttccaaat tagctcaattt aggaacataa gtcctcgaa 20580
 cagctcagtc atcttttca ttccgtttc tatccctac atctttcc tttgcagacg 20640
 actatctctt acactgaaac agggaaagctt ttacctttt ggcattgtt atttaaagat 20700
 tataaaaaatgat tatttgcacaa agaaaaactca cacatgtgtg tacatatctt taaaaatgtt 20760
 atgtttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaataatg gcaatgtcag agtttactgt 20820

ttttcaaaat tagtacagtt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 2080
 accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tggcctcct ctgcaatccc 20940
 aggagataac taccaagcac aatttatgtc tttaaaatt cagccgtat ttatatacat 21000
 atataattcaa tggatggg atcatgatct ctcaccacac atactttca gtgaccgtca 21060
 tttcacaaa cacccacac gtaactatag agaagtctac gtctccct taatgtctgc 21120
 tttgtgtac attgtaaagc tctggcacag tttaacaaa ctcctattaa tgaggatttt 21180
 agttatcccc cacttttaa acaatatttc catgtgtat cttatacata cgtctgtaca 21240

cacttatccc agtctaagga gttcccttta cttccccc tccagcatt ccctgtcacg 21300
 cttgttgtt ccgttgagtg actttactcc tggagtataa tctgcgtata gttcgtttaa 21360
 aaacatggga tctgagtttta ggtcacagct ctgcccactt ctgcataag ccagttcctt 21420
 gacccctctg ccctcaagtt tttgcaccta caaagtaggg gataatatta gttccttagtt 21480
 catagagtct tggaaataat taaatgtat gatccatgtt caatgtctgg cacttagtaa 21540
 gtgctcaata aatgtcaccc tttatgattt gtattgcgtg tatgtctgca gagaaaatca 21600
 ctttgttcc ctttaaaaaa aggactatgc cttggcgtc ctatggcata cattaaattt 21660

cacttgccaa tattaaactct ccacctctaa cttgatccct ctcccttcctc atcttctgg 21720
 gagacccaaat gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780
 aataaaccta cccctaatct tttagattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840
 tgtggcagtc agtatttagtc ttggcttat gatagcatct ctgatctatt attgayttc 21900
 aattakgtt tttttttat ttattctgaa aatgtttgtt aagcatttgc taagtaaaga 21960
 tactggackg agccctccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataattttaga 22020
 agggtagaag agaatctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggtc ggcgcgggtgg 22080

ctcacgcctg taatcccagc actttgggag gccgagggtgg gggatcactc aggtcaggag 22140
 atcgagacca tcctggctaa cacggtaaa ccccgctct actaaaaata caaaaaattta 22200
 gcgaggcgtg gtggcggcgc ccttagtcc cagcttagtc ggaggctgag gcaggagaat 22260
 ggtgtgaacc cgggaggcgg agcttgcgtt gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320
 tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataataa aataaaataa aaaataatta 22380
 ggtactctgac gcccagtgc ctgtctctgt actctgtaaa tttaggtcac ctgctcagg 22440
 ctaatctgag agaaggtctc tttcagttt aatttgaaa gacaatttgc agttcacaag 22500

ctaaccagg tggacaaaga tggcccaag cagagggagt gcttggaaa gctggaggcc 22560
 atagaaaaac tctaaggagt gtagggaggt gggagtaatg tatggaaagg gtggagatgg 22620
 aaggtaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680

aggtttcag tttttttagt gagattacta tggaaacact atggaaacact gggactccat 22740
 ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttcctgtg 22800
 <210> 101
 <211> 154
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 101
 tctggcaaca cggcctccct gaccgtctt gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60

tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaaggtcac 120
 cgtccttaggt cagcccaagt ccactccac tctc 154
 <210> 102
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 102
 tcagggacaa tggccacctt gactatcagt gggcccaagg tggaggatga agctgactac 60
 tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
 accgtcctag gtccagccaa gtccactccc actctc 156
 <210> 103
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic
 <400> 103
 tctggaaaca cagccactt gaccatcagc gggaccagg ctatggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg cgtggacag cagcactgcc gtctcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120
 ctaggtcagc ccaagtccac tcccaactctc 150
 <210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 104

aggtaaaaac acggtagag t

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 105

ccactcgaaaatggaa a

21