



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년09월09일  
(11) 등록번호 10-0857943  
(24) 등록일자 2008년09월03일

(51) Int. Cl.

A01K 67/027 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7007259

(22) 출원일자 2003년05월29일

심사청구일자 2006년10월11일

번역문제출일자 2003년05월29일

(65) 공개번호 10-2003-0074634

(43) 공개일자 2003년09월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2001/045293

국제출원일자 2001년11월30일

(87) 국제공개번호 WO 2002/43478

국제공개일자 2002년06월06일

(30) 우선권주장

60/250,340 2000년11월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

PNAS, vol.97(2), pages 722-727.

UA 5770429 A

전체 청구항 수 : 총 69 항

(73) 특허권자

메다렉스, 인코포레이티드

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521

기린 파마 가부시끼가이샤

일본 150-8011 도쿄도 시부야구 진구마에 6-26-1

(72) 발명자

도미즈카, 가즈마

일본 370-0849 군마현 다카사키시 야시마쵸 110-1-405

이시다, 이사오

일본 259-1136 가나가와현 이세하라구 시하시 352-6

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영, 장수길

심사관 : 김정태

(54) 인간 항체의 제조를 위한 형질전환 트랜스염색체 설치류

(57) 요약

본 발명은 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물 (바람직하게는 설치류)을 제공한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 트랜스염색체는 자기복제형이다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 트랜스염색체는 인간 염색체 14번의 단편을 포함한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 중쇄 좌위는 트랜스염색체에 포함되고 인간 경쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 이와 같은 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위의 일부분 이상이 YAC 벡터에 클로닝된다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 중쇄 좌위는 hCF(SC20)에 포함되고, 인간 경쇄 좌위는 인간 카파 경쇄 좌위 도입유전자 KCo5에 포함된다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위는 트랜스염색체에 포함되고 인간 중쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 인간을 제외한 형질전환 포유동물 (예, 마우스)에서는, 내생성 포유동물 중쇄 좌위 및 1개 이상의 포유동물 경쇄 좌위, 및 내생성 포유동물 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위가 불활성화된다.

(72) 발명자

**론버그, 닐스**

미국94062캘리포니아주우드사이드웨스트캘리포니아  
웨이780

**할크, 에드**

미국94087캘리포니아주서니배일에드몬즈코트1004

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아, 몬테네그로, 짐바브웨, 에쿠아도르, 콜롬비아, 필리핀, 잠비아, 오만

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아, 잠비아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터어키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

2개의 인간 면역글로불린 좌위 (locus)를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편인 형질전환 (transgenic) 마우스.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편이 자기복제형 (autonomous)인 형질전환 마우스.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 인간 경쇄 좌위가 내생성 마우스 염색체와 결합한 형질전환 마우스.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 인간 중쇄 좌위가 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편에 포함되고 인간 경쇄 좌위가 내생성 마우스 염색체와 결합한 형질전환 마우스.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 인간 경쇄 좌위가 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편에 포함되고 인간 중쇄 좌위가 내생성 마우스 염색체와 결합한 형질전환 마우스.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 내생성 마우스 중쇄 좌위 및 1개 이상의 마우스 경쇄 좌위가 불활성화된 형질전환 마우스.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 내생성 마우스 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위가 불활성화된 형질전환 마우스.

### 청구항 8

제4항에 있어서, 인간 경쇄 좌위의 적어도 일부분이 효모 인공 염색체 (Yeast Artificial Chromosome, YAC) 벡터에 클로닝된 형질전환 마우스.

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제1항에 있어서, 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편이 인간 염색체 14번의 단편을 포함하는 형질전환 마우스.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 인간 중쇄 좌위가 hCF(SC20)에 포함되고 인간 경쇄 좌위가 인간 카파 경쇄 좌위 도입유전자 (transgene) KCo5에 포함된 형질전환 마우스.

### 청구항 12

제1항의 형질전환 마우스를 제공하는 단계, 및

상기 형질전환 마우스를 면역화시켜, 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포를 생성하는 방법.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포를 수거하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 다수의 B 세포를 무한증식 (immortalized) 세포와 융합시켜 하이브리도마 (hybridoma)를 형성하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 하이브리도마로부터 인간 항체 서열을 수거하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 인간 항체 서열이 정제된 것인 방법.

### 청구항 17

제12항에 있어서, 인간 항체를 코딩하는 서열을 수거하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 인간 항체를 코딩하는 서열이 전장 서열인 방법.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 형질감염된 세포에서 상기 서열을 발현하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 20

제12항에 있어서, 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편이 인간 염색체 14번의 단편인 방법.

### 청구항 21

제12항에 있어서, 마우스 세포에 전달될 수 있는 인간 염색체 또는 그의 단편이 hCF(SC20)인 방법.

### 청구항 22

제12항에 있어서, 인간 경쇄 좌위가 천연 인간 카파 경쇄 좌위에서 유래한, 재배열되지 않은 서열을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 23

제12항에 있어서, 인간 카파 경쇄 좌위가 삽입된 KCo5 도입유전자인 방법.

### 청구항 24

제12항에 있어서, 다수의 B 세포가, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 이소형 (isotype)의 항체를 코딩하는 1종 이상의 제1 B 세포를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 25

제24항에 있어서, 다수의 B 세포가, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 제1 이소형과는 상이한 제2 이소형의 항체를 코딩하는 1종 이상의 제2 B 세포를 더 포함하는 것인 방법.

### 청구항 26

제12항에 있어서, 다수의 B 세포가, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 각각 선택된 상이한 이소형의 항체를 코딩하는 5종 이상의 B 세포를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 27

제24항에 있어서, IgA 이소형이 IgA<sub>1</sub> 또는 IgA<sub>2</sub>인 방법.

#### 청구항 28

제24항에 있어서, IgG 이소형이 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>인 방법.

#### 청구항 29

제1항의 형질전환 마우스를 소정의 항원으로 면역화시키는 단계, 및  
상기 면역화된 형질전환 마우스로부터 인간 서열 항체를 수거하는 단계  
를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체를 생성하는 방법.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_a$ )로 소정의 항원에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 31

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가  $10^9 \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_a$ )로 소정의 항원에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 32

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가  $10^8 \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_a$ )로 소정의 항원에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 33

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가 모노클로날 항체인 방법.

#### 청구항 34

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가 F(ab')<sub>2</sub>, Fab, F<sub>v</sub> 또는 F<sub>d</sub> 단편인 방법.

#### 청구항 35

제29항에 있어서, 인간 서열 항체가 항원-특이적 항체인 방법.

#### 청구항 36

제1항의 형질전환 마우스를 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,  
상기 형질전환 마우스로부터의 림프구를 무한증식 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하는 단계, 및  
상기 하이브리도마 세포에 의해 생성된 항체의 소정의 항원에 대한 결합능을 측정하는 단계  
를 포함하는, 인간 서열 항체를 분비하는 항원-특이적 하이브리도마를 생성하는 방법.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 50%를 초과하는 항원-특이적 하이브리도마 클론이 인간 중쇄 및 인간 경쇄를 갖는 항체를 분  
비하는 것인 방법.

#### 청구항 38

제1항의 형질전환 마우스를 소정의 항원으로 면역화시키는 단계, 및  
형성된 하이브리도마 세포를 항원 반응성 항체의 존재에 대해 스크리닝하는 단계  
를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체를 생성하는 방법.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 하이브리도마 세포가 20%를 초과하는 효율로 서브클로닝된 것인 방법.

#### 청구항 40

제38항에 있어서, 항원 반응성 항체가 배양 중인 하이브리도마로부터 분리되는 방법.

#### 청구항 41

제38항에 있어서, 항원 반응성 항체를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 분리된 항체를 치료용으로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 43

제1항의 형질전환 마우스를 제공하는 단계, 및

상기 형질전환 마우스로부터 재배열된 면역글로불린 서열을 획득하는 단계

를 포함하는, 재배열된 면역글로불린 서열을 생성하는 방법.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, 상기 획득 단계가 재배열된 면역글로불린 서열을 함유하는 B 세포 림프구를 형질전환 마우스로부터 수거하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 45

제43항에 있어서, 상기 획득 단계가 B 세포 림프구로부터 mRNA를 분리 및 증폭시켜 cDNA를 생성하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 cDNA로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 분리 및 증폭시키는 것을 더 포함하는 방법.

#### 청구항 47

삭제

#### 청구항 48

삭제

#### 청구항 49

삭제

#### 청구항 50

삭제

#### 청구항 51

삭제

#### 청구항 52

삭제

#### 청구항 53

삭제

#### 청구항 54

제43항에 있어서,

제46항의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 핵산이 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계, 및

배양된 숙주 세포 또는 그의 배양 배지로부터 핵산을 회수하는 단계

를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 55

제1항의 형질전환 마우스에 면역원을 도입하는 단계,

인간 항체쇄를 코딩하는 핵산 집단을 상기 형질전환 마우스의 림프선 세포로부터 단리하는 단계, 및

라이브러리의 구성원이 항체쇄를 코딩하는 핵산을 포함하고 상기 항체쇄가 패키지로부터 디스플레이 (display) 되는, 항체쇄를 디스플레이하는 디스플레이 패키지의 라이브러리를 형성하는 단계

를 포함하는, 인간 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하는 방법.

#### 청구항 56

제55항에 있어서, 단리 단계를 수행할 때, 형질전환 마우스의 면역원에 대한 혈청 역가가, 면역원이 도입되지 않은 형질전환 마우스의 혈청 역가보다 한 자리수 더 큰 것인 방법.

#### 청구항 57

제55항에 있어서, 상기 면역원이 핵산인 방법.

#### 청구항 58

제55항에 있어서, 상기 핵산이 막결합 수용체를 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 59

제1항의 형질전환 마우스를 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,

상기 면역화된 형질전환 마우스로부터 항체 V 영역 서열을 수거하는 단계,

수거된 V 영역을, 발현 라이브러리를 생성하는 DNA 벡터에 클로닝하는 단계, 및

라이브러리를 발현하여, 소정의 항원에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 V 영역 서열을 동정하는 단계

를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체 또는 그의 단편을 생성하는 방법.

#### 청구항 60

제1항의 형질전환 마우스를 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,

1종 이상의 인간 항체 V 영역을 코딩하는 cDNA를, 상기 면역화된 형질전환 마우스의 B 세포로부터, 또는 상기 B 세포와 무한증식 세포의 융합에 의해 생성된 하이브리도마로부터 단리하는 단계,

상기 cDNA를 발현 벡터에 클로닝하는 단계,

상기 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계,

상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

인간 서열 항체 또는 그의 단편을 상기 숙주 세포 또는 그의 배양 배지로부터 수거하는 단계

를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체 또는 그의 단편을 생성하는 방법.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, 단리 단계가 PCR에 의해 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 62

제60항에 있어서, 단리 단계가 1종 이상의 DNA 프로브를 사용한 cDNA 라이브러리 스크리닝에 의해 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 63

제60항에 있어서, 단리 단계가 파지 (phage) 디스플레이 라이브러리 스크리닝에 의해 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 64

제60항에 있어서, cDNA가 전장의 인간 항체 서열을 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 65

제60항에 있어서, 수거된 인간 서열 항체의 이소형이 상기 면역화된 형질전환 마우스의 항체 생성 세포의 이소형과 상이한 것인 방법.

#### 청구항 66

마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편 상에 제1 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 제1 마우스를, 내생성 마우스 염색체 내에 삽입된 제2 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 제2 마우스와 교배하는 단계,

상기 제1 및 제2 인간 면역글로불린 좌위를 둘 다 포함하는 제3 마우스를 상기 교배로부터 획득하는 단계,

상기 제3 마우스 또는 그의 자손을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,

면역화된 마우스로부터 B 세포를 수거하는 단계, 및

상기 B 세포를 무한증식 세포와 융합시켜, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 획득하는 단계

를 포함하는, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하며 마우스 세포에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편을 갖는 마우스 하이브리도마 세포의 안정성을 향상시키는 방법.

#### 청구항 67

제66항에 있어서,

배지 중에서 하이브리도마 세포를 배양하는 단계,

상기 배지를 시험하여, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하는 하이브리도마 세포의 존재를 확인하는 단계,

하이브리도마 세포를 희석하는 단계, 및

희석된 하이브리도마 세포를 배양하여, 소정의 항원과 반응하는 모노클로날 인간 항체를 발현하는 클론성 세포주를 획득하는 단계

를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, 클론성 세포주가, 확인된 하이브리도마 세포 중 50% 이상으로부터 획득되는 것인 방법.

#### 청구항 69

삭제

#### 청구항 70

삭제



**청구항 71**

제1항에 있어서, 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 형질전환 마우스.

**청구항 72**

삭제

**청구항 73**

제12항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 74**

삭제

**청구항 75**

제29항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 76**

삭제

**청구항 77**

제36항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 78**

삭제

**청구항 79**

제38항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 80**

삭제

**청구항 81**

제43항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 82**

삭제

**청구항 83**

제55항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 84**

삭제

**청구항 85**

제59항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 86**

삭제

## 청구항 87

제60항에 있어서, 형질전환 마우스가 불활성화된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자를 더 포함하는 것인 방법.

## 청구항 88

삭제

## 명세서

<1> <관련 출원에 대한 상호 참조>

<2> 본 출원은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 미국 가출원 제60/250,340호 (2000년 11월 30일 출원)에 대한 우선권을 주장한다.

## 기술분야

<3> 본 발명의 기술분야는 형질전환 동물 (transgenic animal), 분자 면역학 및 의학이다.

## 배경기술

<4> 항체는 이식, 심근 질환, 감염성 질환, 암 및 자가면역성을 비롯한 다양한 영역의 분야에서 치료 분자의 군을 대표한다 (Goldenberg, M., 1999, Clin. Ther. 21: 309-318; Present, D. et al., 1999, New Engl. J. Med. 340: 1398-1405; Targan, S. et al., 1997, New Engl. J. Med. 337: 1029-1035; Davis, T. et al., 1999, Blood 94: 88a; Saez-Llorens, X. et al., 1998, Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 787-791; Berard, J. et al., 1999, Pharmacotherapy 19: 1127-1137; Glennie, M. et al. 2000, Immunol. Today 21: 403-410; Miller, R., 1982, New Engl. J. Med. 306: 517-522; Maini, R., et al., 1999, Lancet, 354: 1932-1939). 하이브리도마 (hybridoma) 기술의 발전으로 인해 후보 치료 분자로서의 설치류 모노클로날 항체 (또한 MAb라고도 불리움)의 단리가 가능해졌다 (Kohler, G. and Milstein, C., 1975, Nature 256: 495-497). 그러나, 생체내 인간 치료를 위한 인간 제외 동물의 모노클로날 항체의 사용을 포함하는 초기 연구는, 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응에 의해 그러한 약제의 사용이 제한되는 것으로 입증되었다 (Schroff, R. et al., 1985, Cancer Res. 45, 879-885; Shawler, D. et al., 1985, J. Immunol. 135: 1530-1535). 따라서, 치료용 항체의 면역원성을 감소시키는 것이 바람직한 것으로 인식되고 있다. 인간 제외 동물의 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 재조합 DNA 기술이 이용되어 왔다 (Boulianne, G. et al., 1984, Nature 312, 643-646; Morrison, S. et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855; Riechmann, L. et al., 1988, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). 그러나, 완전한 인간 모노클로날 항체도 인간 질환을 치료하기 위한 낮은 면역원성 치료제의 잠재적 공급원으로서 인식되고 있다 (Little, M. et al., 2000, Immunol. Today 21: 364-70). 생식세포주 구성에 인간 면역글로불린 (Ig) 좌위 (locus)를 포함하는 형질전환 마우스를 이용하면, 정상적인 인간 면역계가 관용성을 나타내는 인간 자가항원 (autoantigen)을 비롯한 다양한 표적에 대해 유도된 완전한 고친화성 인간 모노클로날 항체를 단리할 수 있다 (Lonberg, N. et al., 1994, Nature 368: 856-9; Green, L. et al., 1994, Nature Genet. 7: 13-21; Green, L. & Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188: 483-95; Lonberg, N and Huszar, D., 1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93; Bruggemann, M. et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326; Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-851; Mendez, M. et al., 1997, Nat. Genet. 15: 146-156; Green, L., 1999, J. Immunol. Methods 231: 11-23; Yang, X. et al., 1999, Cancer Res. 59: 1236-1243; Bruggemann, M. and Taussig, MJ., Curr. Opin. Biotechnol. 8: 455-458, 1997). 인간 항체는 경쇄 (카파 및 람다) 및 중쇄 (IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> 및 IgM)에 기초하여 다양한 군으로 분류된다. 이들 상이한 군은 잠재적으로 상이한 치료 용도를 제공한다. 예를 들어, 상이한 중쇄 이소형 (isotype)은 보체 및 세포계 Fc 수용체와 상이한 상호작용을 한다. 중쇄 군 중 몇몇 (IgM 및 IgA)은 다량체를 형성하여 Fc 및 V 영역 상호작용의 수가 (valency)를 증가시킬 수도 있다. 따라서, 모든 이소형의 인간 모노클로날 항체를 생성하는 준거를 마련할 필요가 있다. 그러나, 크기가 큰 인간 Ig 좌위 (1 내지 2 Mb)는, 전체 인간 Ig 좌위를 포함하는 메가염기 이상의 크기를 갖는 DNA 단편을 클로닝하는 것이 효모 인공 염색체 (yeast artificial chromosome)를 사용하는 경우에도 어렵기 때문에, 전체 좌위를 형질전환 마우스에 도입하여 완전한 다양성을 지닌 인간 항체 레파토리를 구성하는 데 주요 장애물이었다. 최근, 인간 염색체 자체를 유전자 전이

용 벡터로 사용하는 신규한 방법이 개발되어, DNA 단편을 인공 DNA 벡터로 클로닝하는 것을 필요로 하지 않으면서 완전한 *IgH* 및 *IgK* 좌위를 형질전환 마우스에 전달하는 것을 용이하게 하였다 (Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genet. 16: 133-143; Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 722-727). 도미즈카 등 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)은 2개의 전이 가능한 인간 염색체 단편 (hCF)(하나는 면역글로불린 (*Ig*) 중쇄 좌위 (*IgH*, 약 1.5Mb)를 함유하고, 다른 하나는  $\kappa$  경쇄 좌위 (*IgK*, 약 2Mb)를 함유함)를 내생성 *IgH* 및 *IgK* 좌위가 불활성화된 형질전환 마우스에 도입할 수 있음을 입증하였다. 결과의 이중-트랜스염색체(Tc)/이중-낙아웃(KO) 마우스에서, 실질적인 부분의 체세포가 2개의 hCF에 보유되었고, 마우스 중쇄 및 카파 경쇄의 부재 하에 인간 *Ig* 중쇄 및 카파 경쇄를 다량으로 발현함으로써 *Ig* 생성의 결함 회복이 증명되었다. 또한, 4가지 인간 *IgY* 아군 (subclass)의 혈청 발현 프로파일은 인간에서 보여지는 것과 유사하였다. 형질전환 마우스는 인간 혈청 알부민 (HSA)을 사용한 면역화에서 항원-특이적 인간 항체 반응을 나타냈고, 다양한 이소형의 HSA-특이적 인간 모노클로날 항체가 이들로부터 수득되었다. 도미즈카 등의 연구 (상기 문헌)는 또한 마우스에서 *IgK* 좌위를 함유하는 hChr.2-유래의 hCF (hCF(2-W23))가 불안정함도 입증하였다.  $\kappa$  트랜스염색체의 관찰된 불안정성은 인간 카파 경쇄의 최적 발현 및 인간 카파-양성 하이브리도마의 최적 생성에 대한 방해물일 수 있다. 더욱이, 이중-Tc/KO 마우스로부터 수득된 항-HSA 하이브리도마의 2/3가 마우스 램다-양성 ( $m\lambda^+$ )이었고, 대부분의  $IgG/m\lambda$  하이브리도마 (83%)가 hCF(2-W23)을 상실한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 도미즈카 등 (상기 문헌)에 기재된 트랜스염색체에 의해 부여된 특성을 보유하는 형질전환 동물, 특히 인간 중쇄 이소형의 거의 전체 레파토리를 발현하며, 도입된 인간 서열의 향상된 안정성을 나타내어 전체 인간 항체의 수득 효율이 증가된 동물에 대한 요구가 존재하는 실정이다.

#### <5> <발명의 개요>

<6> 본 발명은 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 제공한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 트랜스염색체는 자기복제형 (autonomous)이다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 트랜스염색체는 인간 염색체 14번의 단편을 포함한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 중쇄 좌위는 트랜스염색체에 포함되고 인간 경쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 이와 같은 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위의 일부분 이상이 YAC 벡터에 클로닝된다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 중쇄 좌위는 hCF(SC20)에 포함되고, 인간 경쇄 좌위는 인간 카파 경쇄 좌위 도입유전자 (transgene) KCo5에 포함된다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간 경쇄 좌위는 트랜스염색체에 포함되고 인간 중쇄 좌위는 내생성 포유동물 염색체와 결합한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 마우스이다. 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서는, 내생성 포유동물 중쇄 좌위 및 1개 이상의 포유동물 경쇄 좌위가 불활성화된다. 이와 같은 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서는, 내생성 포유동물 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위가 불활성화된다.

<7> 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 몇몇 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서, 상기 돌연변이는 Fc $\gamma$ RIIB 유전자의 불활성이다.

<8> 또한, 본 발명은

<9> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 제공하는 단계; 및

<10> 상기 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 면역화시켜, 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포를 생성하는 단계

<11> 를 포함하는, 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포의 생성 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법에서, 트랜스염색체는 인간 염색체 14번의 단편이다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간 트랜스염색체는 염색체 단편 SC20 (hCF(SC20))이다. 그러한 몇몇 방법은 인간 항체 서열을 발현하는 다수의 B 세포를 수거하는 단계를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법은 다수의 B 세포를 무한증식 (immortalized) 세포와 융합시켜 하이브리도마를 형성하는 단계를 더 포함한다. 그러한 다른 방법은 하이브리도마로부터 인간 항체 서열을 수거하는 단계를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간 항체 서열은 정제된 것이다. 그러한 몇몇 방법은 인간 항체를 코딩하는 서열을 수

거하는 단계를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간 항체를 코딩하는 서열은 전장 서열이다. 몇몇 방법에서, 인간 항체를 코딩하는 서열은 형질감염된 세포에서 발현된다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간 경쇄 좌위는 인간 카파 경쇄 좌위에서 유래한, 재배열되지 않은 서열을 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간 카파 경쇄 좌위는 삽입된 KCo5 도입유전자이다. 그러한 몇몇 방법에서, 다수의 B 세포는, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 이소형의 항체를 코딩하는 1종 이상의 제1 B 세포를 포함한다. 몇몇 방법에서, IgA 이소형은 IgA<sub>1</sub> 또는 IgA<sub>2</sub>이다. 몇몇 방법에서, IgG 이소형은 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>이다. 그러한 몇몇 방법에서는, 다수의 B 세포가, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 제1 이소형과는 상이한 제2 이소형의 항체를 코딩하는 1종 이상의 제2 B 세포를 더 포함한다. 몇몇 방법에서는, 다수의 B 세포가, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 각각 선택된 상이한 이소형을 갖는 항체를 코딩하는 5종 이상의 B 세포를 포함한다. 다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는 FcγRIIB 유전자의 불활성화이다.

- <12> 또한, 본 발명은
- <13> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계, 및
- <14> 인간을 제외한 상기 면역화된 형질전환 포유동물로부터 인간 서열 항체를 수거하는 단계
- <15> 를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체의 생성 방법을 제공한다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는 FcγRIIB 유전자의 불활성화이다.
- <16> 본 발명의 인간 서열 항체는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD 및 IgE와 같은 다양한 항체 이소형, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- <17> 인간 서열 항체는 전장 (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> 또는 IgA<sub>2</sub> 항체)일 수도, 또는 단지 항원 결합 부분 (Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub> 또는 F<sub>d</sub> 단편)만을 포함할 수도 있다. 몇몇 인간 서열 항체는 재조합 인간 서열 항체이다. 본 발명의 인간 서열 항체는 통상  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  및  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_d$ )로 소정의 항원에 결합할 수 있다. 본 발명의 몇몇 인간 서열 항체는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 몇몇 인간 서열 항체는 항원-특이적 항체이다.
- <18> 또한, 본 발명은
- <19> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,
- <20> 상기 인간을 제외한 형질전환 포유동물로부터의 림프구를 무한증식 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하는 단계, 및
- <21> 상기 하이브리도마 세포에 의해 생성된 항체의 소정의 항원에 대한 결합능을 측정하는 단계
- <22> 를 포함하는, 인간 서열 항체를 분비하는 항원-특이적 하이브리도마의 생성 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법에서는, 50%를 초과하는 항원-특이적 하이브리도마 클론이 인간 중쇄 및 인간 경쇄를 갖는 항체를 분비한다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는 FcγRIIB 유전자의 불활성화이다.
- <23> 또한, 본 발명은
- <24> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계, 및
- <25> 형성된 하이브리도마 세포를 항원 반응성 항체의 존재에 대해 스크리닝하는 단계

- <26> 를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체의 생성 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법에서, 하이브리도마 세포는 20%를 초과하는 효율로 서브클로닝된다. 그러한 몇몇 방법에서, 항원 반응성 항체는 배양 중인 하이브리도마로부터 분리된다. 그러한 몇몇 방법에서, 항원 반응성 항체는 실질적으로 순수한 것이다. 몇몇 방법에서는, 실질적으로 순수한 항체가 치료용으로 제제화된다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는  $Fc\gamma RIIB$  유전자의 불활성화이다.
- <27> 또한, 본 발명은
- <28> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 제공하는 단계, 및
- <29> 상기 인간을 제외한 형질전환 포유동물로부터 재배열된 인간 면역글로불린 서열을 수득하는 단계
- <30> 를 포함하는, 재배열된 면역글로불린 서열의 생성 방법을 제공한다. 몇몇 방법에서, 수득 단계는 재배열된 면역글로불린 서열을 함유하는 B 세포 림프구를 인간을 제외한 형질전환 포유동물로부터 수거하는 것을 포함한다. 그러한 방법에서, 수득 단계는 B 세포 림프구로부터 mRNA를 단리 및 증폭시켜 cDNA를 생성하는 것을 포함한다. 그러한 몇몇 방법은 cDNA로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 단리 및 증폭시키는 것을 더 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 cDNA로부터 증폭된 이들 중쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 cDNA로부터 증폭된 경쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는  $Fc\gamma RIIB$  유전자의 불활성화이다.
- <31> 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 서열 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 따라서, 본 발명의 항체-코딩 핵산 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 그러한 벡터로 형질감염된 숙주 세포 (또는 이들 숙주 세포의 자손)도 본 발명에 포함되며, 이들 숙주 세포를 배양하여 본 발명의 항체를 제조하는 방법도 본 발명에 포함된다. 그러한 몇몇 방법은 상기 숙주 세포를 핵산이 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포 또는 그의 배양 배지로부터 핵산을 회수하는 단계를 포함한다. 몇몇 숙주 세포는 진핵 세포이다. 그러한 몇몇 발현 벡터는 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 숙주 세포에서 상기 핵산의 발현을 조절하는 조절 서열과 작동 가능하게 연결되어 있다.
- <32> 또한, 본 발명은
- <33> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물에 면역원을 도입하는 단계,
- <34> 인간 항체쇄를 코딩하는 핵산 집단을 상기 인간을 제외한 형질전환 포유동물의 림프선 세포로부터 단리하는 단계, 및
- <35> 라이브러리의 구성원이 항체쇄를 코딩하는 핵산을 포함하고 상기 항체쇄가 패키지로부터 디스플레이 (display) 되는, 항체쇄를 디스플레이하는 디스플레이 패키지의 라이브러리를 형성하는 단계
- <36> 를 포함하는, 인간 항체 디스플레이 라이브러리의 생성 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 단리 단계를 수행할 때 면역원에 대해 검출가능한 역가를 나타내지 않는다. 그러한 몇몇 방법에서, 면역원은 핵산이다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 핵산은 막결합 수용체를 코딩한다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는  $Fc\gamma RIIB$  유전자의 불활성화이다.
- <37> 또한, 본 발명은
- <38> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,
- <39> 인간을 제외한 상기 면역화된 형질전환 포유동물로부터 항체 V 영역 서열을 수거하는 단계,



- <40> 수거된 V 영역을, 발현 라이브러리를 생성하는 DNA 벡터에 클로닝하는 단계, 및
- <41> 라이브러리를 발현하여, 소정의 항원에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 V 영역 서열을 동정하는 단계
- <42> 를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체 또는 그의 단편의 생성 방법을 제공한다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는 Fc $\gamma$ RIIB 유전자의 불활성화이다.
- <43> 또한, 본 발명은
- <44> 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 포함하며, 여기서 상기 2개의 인간 면역글로불린 좌위 중 하나는 인간 중쇄 좌위이고 다른 하나의 좌위는 인간 경쇄 좌위이며, 상기 좌위들 중 하나만이 트랜스염색체인 인간을 제외한 형질전환 포유동물을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,
- <45> 1종 이상의 인간 항체 V 영역을 코딩하는 cDNA를, 인간을 제외한 상기 면역화된 형질전환 포유동물의 B 세포로부터, 또는 B 세포와 무한증식 세포의 융합에 의해 생성된 하이브리도마로부터 단리하는 단계,
- <46> 상기 cDNA를 발현 벡터에 클로닝하는 단계,
- <47> 상기 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계,
- <48> 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- <49> 인간 서열 항체 또는 그의 단편을 상기 숙주 세포 또는 그의 배양 배지로부터 수거하는 단계
- <50> 를 포함하는, 소정의 항원에 결합하는 인간 서열 항체 또는 그의 단편의 생성 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법에서, 단리 단계는 PCR에 의해 수행된다. 그러한 몇몇 방법에서, 단리 단계는 1종 이상의 DNA 프로브를 사용한 cDNA 라이브러리 스크리닝에 의해 수행된다. 그러한 몇몇 방법에서, 단리 단계는 파지 (phage) 디스플레이 라이브러리 스크리닝에 의해 수행된다. 그러한 몇몇 방법에서, cDNA는 전장의 인간 항체 서열을 코딩한다. 몇몇 방법에서, 수거된 인간 서열 항체의 이소형은 인간을 제외한 상기 면역화된 형질전환 포유동물의 항체 생성 세포의 이소형과 상이하다. 또다른 측면에서, 인간을 제외한 형질전환 포유동물은 자가항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 유전자 돌연변이를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 상기 돌연변이는 Fc $\gamma$ RIIB 유전자의 불활성화이다.
- <51> 또한, 본 발명은
- <52> 트랜스염색체 상에 제1 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 제1 마우스를, 내생성 마우스 염색체 내에 삽입된 제2 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 제2 마우스와 교배하는 단계,
- <53> 상기 제1 및 제2 인간 면역글로불린 좌위를 둘 다 포함하는 제3 마우스를 상기 교배로부터 수득하는 단계,
- <54> 상기 제3 마우스 또는 그의 자손을 소정의 항원으로 면역화시키는 단계,
- <55> 면역화된 마우스로부터 B 세포를 수거하는 단계, 및
- <56> 상기 B 세포를 무한증식 세포와 융합시켜, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 수득하는 단계
- <57> 를 포함하는, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하는 트랜스염색체 마우스 하이브리도마 세포의 안정성 향상 방법을 제공한다. 그러한 몇몇 방법은 배지 중에서 하이브리도마 세포를 배양하는 단계; 상기 배지를 시험하여, 소정의 항원과 반응하는 인간 항체를 발현하는 하이브리도마 세포의 존재를 확인하는 단계; 하이브리도마 세포를 희석하는 단계; 및 희석된 하이브리도마 세포를 배양하여, 소정의 항원과 반응하는 모노클로날 인간 항체를 발현하는 클론성 세포주를 수득하는 단계를 더 포함한다. 그러한 몇몇 방법에서, 클론성 세포주는, 확인된 하이브리도마 세포 중 50% 이상으로부터 수득된다.
- <58> 또다른 측면에서, 본 발명은  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_d$ )로 특정 항원에 결합하는 IgA 이소형을 갖는 인간 서열 항체를 분비하는 마우스 하이브리도마 세포를 제공한다.
- <59> 또다른 측면에서, 본 발명은  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  이상의 평형 결합 상수 ( $K_d$ )로 특정 항원에 결합하는 IgA 이소형을 갖는 인간 서열 항체를 제공한다.

## 발명의 상세한 설명

- <74> 용어 "트랜스염색체 (transchromosome)"는 인간을 제외한 포유동물에 전달될 수 있는 염색체 또는 그의 단편을 나타낸다. 트랜스염색체가 도입되는 대표적인 세포로는 ES 세포가 있다. 트랜스염색체는 선별 마커를 포함할 수 있고, 상이한 종의 인간을 제외한 포유동물로부터 유래할 수도 있다. 트랜스염색체는 인간 염색체의 일부분을 포함할 수도 있다. 용어 "트랜스염색체의" 또는 "트랜스염색체"는 "트랜스염색체를 보유하는" 또는 "트랜스염색체에 포함되는"을 의미한다.
- <75> 본 발명의 인간 서열 항체는, V-D-J 재조합에 의해, 그리고 비-IgM/비-IgD 항체의 경우에는 이소형 스위칭 (isotype switching)에 의해 다양한 항원에 대한 다수 이소형의 인간 (예를 들어, 모노클로날 또는 폴리클로날) 항체 (예, IgM, IgD, IgG, IgA 및(또는) IgE)를 생성할 수 있는 인간을 제외한 형질전환 포유동물 (예를 들어, 형질전환 마우스)에서 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다양한 측면에는 항체 및 항체 단편과 그의 제약 조성물 뿐만 아니라, 그러한 모노클로날 항체를 제조하기 위한 인간을 제외한 형질전환 포유동물, B 세포 및 하이브리도마가 포함된다.
- <76> 달리 기재된 경우를 제외하고, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 상호교환하여 사용되며, 인간 환자 및 인간을 제외한 영장류와 같은 포유동물 뿐만 아니라, 토끼, 래트 및 마우스와 같은 실험용 동물, 및 기타 동물들을 나타낸다.
- <77> 용어 "치료하는"은 증상의 발병, 합병증, 또는 질환의 생화학적 징후를 예방하거나 지연시킴으로써, 증상을 완화시키거나, 또는 질환, 증상 또는 장애 (예를 들어, 자가면역성 질환)의 추가 발병을 억제하기 위해 본 발명의 화합물 또는 약제를 투여하는 것을 포함한다. 치료는 (질환의 발병을 예방하거나 지연시키기 위한, 또는 그의 임상적 또는 준임상적 증상의 발현을 예방하기 위한) 예방 목적일 수도, 또는 질환의 발현 이후에 증상을 억제하거나 완화시키는 치료 목적일 수도 있다.
- <78> 일반적으로, 어구 "잘 허용되는 (well tolerated)"은 치료의 결과로서 나타나는 건강 상태에 불리한 변화가 없으며, 치료법의 결정에도 영향을 미칠 수 있는 것을 의미한다.
- <79> 본원에 사용된 용어 "림프구"는 당업계 통상의 의미를 가지며, 혈액, 림프 및 림프양 조직에서 발견되는 임의의 단핵 비-식세포성 백혈구 (즉, B 및 T 림프구)를 의미한다.
- <80> 어구 "T 림프구의 아집단" 또는 "T 세포 서브세트(들)"은 특정 세포 표면 마커를 발현하는 특징이 있는 T 림프구 또는 T 세포를 의미한다 (문헌 [Barclay, A. N. et al. (eds.), 1997, THE LEUKOCYTE ANTIGEN FACTS BOOK, 2ND. EDITION, Academic Press, London, United Kingdom] 참조; 본 참고문헌은 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).
- <81> 용어 "세포독성 T 림프구-결합 항원-4", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4 항원" 및 "CD152" (Murata, 1999, Am. J. Pathol. 155: 453-460)는 상호교환하여 사용되며, 여기에는 변이체, 이소형, 인간 CTLA-4의 중 동족체, 및 CTLA-4와 1개 이상의 공통 에피토프 (epitope)를 갖는 유사체 (Balzano, 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7: 28-32)가 포함된다.
- <82> 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 진뱅크 (Genbank) 허가번호가 L15006이다. 아미노산 1 내지 37의 영역은 리더 (leader) 펩티드이고, 38 내지 161은 세포의 V-유사 도메인이고, 162 내지 187은 막횡단 도메인이며, 188 내지 223은 세포질 도메인이다. 위치 49에서 G의 A로의 변이, 위치 272에서 C의 T로의 변이, 및 위치 439에서 A의 G로의 변이를 포함하는 뉴클레오티드 서열의 변이체가 보고된 바 있다. 마우스 CTLA-4의 완전한 DNA 서열은 EMBL 허가번호가 X05719이다 (Brunet et al., 1987, Nature 328: 267-270). 아미노산 1 내지 35의 영역은 리더 펩티드이다.
- <83> 용어 "에피토프"는 항체에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 의미한다. 에피토프는 통상 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 화학적으로 활성이 있는 표면 분자 그룹으로 구성되며, 대체로 특정한 3차원 구조 및 특정한 대전성을 갖는다. 구조적 에피토프와 비-구조적 에피토프는 변성 용매가 존재하는 경우에 구조적 에피토프에 대한 결합은 파괴되지만 비-구조적 에피토프에 대한 결합은 파괴되지 않는다는 점에서 서로 구별된다.
- <84> 온전한 "항체"는 이황결합에 의해 서로 연결된, 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약기함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약기함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, 즉 CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은, 프레임워크 영

역 (FR)이라 명명된 더욱 보존된 영역과 혼재된, 상보성 결정 영역 (CDR)이라 명명된 초가변성 (hypervariability) 영역으로 추가 분류된다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 이들은 아미노-말단에서 카복실-말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은, Fc 수용체들 (예를 들어, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII 및 FcR $\eta$ )과 같은 세포 수용체 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 통해, 면역계의 다양한 세포들 (예를 들어, 이펙터 (effector) 세포)을 비롯한 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 용어 항체에는 항원에 결합하는 능력을 지닌 온전한 항체의 항원 결합부가 포함된다. 항원 결합부의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 (hinge) 영역에서 이황결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체 단일 암 (arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)이 있다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인 VL 및 VH는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 VL 및 VH 영역의 쌍이 1가 분자 (단일쇄 Fv (scFv))로도 알려짐; 예를 들어 문헌 [Bird et al., 1988], [Science 242: 423-426], 및 [Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883] 참조)를 형성하는 단일쇄 단백질로서 만들어지게 하는 합성 링커에 의해 제조할 방법을 이용하여 결합될 수 있다. 그러한 단일쇄 항체는 용어 "항체"에 포함되는 것이다. 단편은 제조할 기술에 의해, 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다.

<85> 용어 "인간 서열 항체"에는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 영역 및 불변 영역 (존재하는 경우)을 갖는 항체가 포함된다. 본 발명의 인간 서열 항체에는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서의 랜덤 돌연변이 유발 또는 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 도입된 돌연변이, 또는 생체내에서의 체세포 돌연변이)가 포함될 수도 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 서열 항체"는, 항원 특이성을 제공하기에 충분하고 다른 포유동물 중 (예를 들어, 마우스)의 생식세포주로부터 유래한 전체 CDR 서열이 인간 프레임워크 (framework) 서열 상에 이식된 항체 (즉, 인간화 항체)를 포함하는 것은 아니다.

<86> 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자 제제를 나타내는 것이다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 영역 및 불변 영역 (존재하는 경우)을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 무한증식 세포에 융합된 인간 중쇄 도입유전자 및 경쇄 도입유전자를 포함하는 계능을 갖는 인간을 제외한 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 마우스로부터 얻은 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

<87> 용어 "디클로날 (diclonal) 항체"는 한 항원에 대한 2종 이상의 항체 제제를 나타내는 것이다. 통상적으로, 상이한 항체들은 상이한 에피토프에 결합한다.

<88> 용어 "올리고클로날 (oligoclonal) 항체"는 한 항원에 대한 3종 내지 100종의 상이한 항체 제제를 나타내는 것이다. 통상적으로, 그러한 제제 중의 항체들은 소정 범위의 상이한 에피토프에 결합한다.

<89> 용어 "폴리클로날 항체"는 한 항원에 대한 1종 초과 (2종 이상의) 항체 제제를 나타내는 것이다. 그러한 제제는 소정 범위의 상이한 에피토프에 결합하는 항체들을 포함한다.

<90> 본 발명은 인간 CTLA-4, 인간 G-CSF, 인간 HSA, 인간 CD4 및 인간 EGFR에 대한 항체들을 비롯한, 다양한 항원에 대한 인간 서열 항체들을 제공한다. 본 발명의 인간 항체에는 인간 CTLA-4 수용체 및 인간 CD4 공수용체 (coreceptor)와 같은 세포 표면 수용체에 의한 신호 전달을 차단하거나 길항시키는 항체가 포함된다. 이들 항체 중 몇몇은 인간 CTLA-4 상의 특정한 에피토프에 결합하여 CTLA-4가 인간 B7 카운터수용체 (counterreceptor)와 상호작용하는 것을 억제할 수 있다. 이와 유사하게, 상기 항체들 중 몇몇은 인간 CD4 상의 특정한 에피토프에 결합하여 CD4가 인간 클래스 II MHC와 상호작용하는 것을 억제할 수 있다. 인간 CTLA-4의 인간 B7과의 상호작용은 신호 전달을 통해 인간 CTLA-4 수용체를 지닌 T-세포를 불활성화시키기 때문에, 상기 상호작용의 길항작용은 인간 CTLA-4 수용체를 지닌 T 세포의 활성화를 효과적으로 유도하거나 증대시키거나 연장시킴으로써, 면역 반응을 연장시키거나 증대시킨다. "차단 (blocking) 항체"는, 인간 CTLA-4 리간드 결합 부위에 대한 항체 결합 부위의 비율이 1:1을 초과하고 항체의 농도가 10<sup>-8</sup> M을 초과하는 조건 하에서 세포-발현 인간 B7 리간드에 대한 가용성 인간 CTLA-4의 결합을 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 99.9% 이상 감소시키는 항체를 의미한다.



- <91> 또한, 본 발명은 다양한 인간 항원들에 대한 인간 서열 IgA 항체를 제공한다. 대표적인 IgA 항체에는 CD4, G-CSF, CTLA-4 및 EGFR이 포함된다. IgA 항체는 이량체를 형성하기 때문에, 그러한 IgA 항체는 가교결합성이 향상될 수 있다.
- <92> 대개 다가 제제라고 불리우는 다른 항체 제제들은, 동일한 세포 상의 다수 인간 CTLA-4 수용체를 가교결합시키는 방식으로 CTLA-4와 같은 세포 표면 수용체에 결합한다.
- <93> 가교결합은 상이한 에피토프 특이성을 갖는 가용성 2가 항체들을 혼합함으로써 수행될 수도 있다. 이들 폴리클로날 항체 제제는 항체 매개 가교결합의 결과로 신호가 전달될 수 있도록, 항원 상의 상이한 에피토프들에 결합하는 2쌍 이상의 중쇄 및 경쇄를 포함한다.
- <94> 용어 "재조합 인간 항체"에는, 인간 면역글로불린 유전자 (이하 상세히 설명됨)로 형질전환된 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체와 같이 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 본 발명의 모든 인간 서열 항체; 재조합 발현 벡터를 숙주 세포 내에 형질감염시켜 발현된 항체; 또는 다른 DNA 서열에 대해 인간 면역글로불린 유전자 서열을 스플라이싱 (splicing)시키는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체가 포함된다. 그러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포주 면역글로불린 종으로부터 유래한 가변 영역 및 불변 영역 (존재하는 경우)을 갖는다. 그러나, 그러한 항체는 시험관내 돌연변이 유발 (또는, 인간 Ig 서열로 형질전환된 동물이 사용되는 경우에는 생체내 체세포 돌연변이 유발)에 의해, 상기 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열이 인간 생식세포주 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련되어 있지만 인간 항체의 생체내 생식세포주 레파토리 내에는 자연 상태에서 존재하지 않는 항체가 될 수 있다.
- <95> "이종 (heterologous) 항체"는 그러한 항체를 생성하는 인간을 제외한 형질전환 생물체와 관련하여 정의된다. 이 용어는, 인간을 제외한 형질전환 동물이 아니며 일반적으로 인간을 제외한 형질전환 동물의 종과는 다른 종으로부터 유래한 생물체에서 발견되는 서열에 상응하는 아미노산 서열 또는 코딩 핵산 서열을 갖는 항체를 나타낸다.
- <96> "헤테로하이브리드 (heterohybrid) 항체"는 상이한 생물체 기원의 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체를 나타낸다. 예를 들어, 쥐의 경쇄와 결합된 인간 중쇄를 갖는 항체가 헤테로하이브리드 항체이다.
- <97> 용어 "실질적으로 순수한" 또는 "단리된"은 대상 중 (예를 들어, 본 발명의 항체)이 자연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및(또는) 회수되어, 대상 종이 우세하게 존재하는 종이 되는 것 (즉, 몰농도 기준에서 조성물 중의 다른 개별 종보다 더 많은 것)을 의미하며, "실질적으로 순수한" 또는 "단리된" 조성물은 또한 대상 종이 존재하는 모든 거대분자의 약 50% 이상 (몰농도 기준)을 차지하는 것을 의미한다. 실질적으로 순수한 또는 단리된 조성물은 또한 조성물 중에 존재하는 모든 거대분자 종의 약 80 내지 90 중량%가 넘게 차지할 수 있다. 또한, 단리된 대상 중 (예를 들어, 본 발명의 항체)은, 조성물이 본질적으로 단일 거대분자 종의 유도체로 이루어진, 본질적으로 균일하게 (통상적인 검출 방법에 의해 조성물 중에 존재하는 오염물질 종이 검출되지 않음) 정제될 수 있다. 예를 들어, 인간 CTLA-4에 대한 단리된 항체에는, 인간 CTLA-4에 결합하지 않고 상이한 항원에 결합하는 다른 항체가 실질적으로 존재하지 않을 수 있다. 그러나, 특정 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 인간 CTLA-4 항체, 그의 이소형 또는 변이체는 다른 종으로부터 유래한 관련 항원 (예를 들어, CTLA-4 종 동족체)에 대해 교차-반응성을 나타낼 수 있다. 더욱이, 본 발명의 단리된 항체는 다른 세포성 물질 (예를 들어, 면역글로불린에 결합하지 않는 단백질) 및(또는) 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다.
- <98> "특이적 결합"은 비-특이적인 다른 항원에 비해 특이적 항원에 항체가 우선적으로 결합하는 것을 나타낸다. 특정 항체에 "특이적으로 (또는 선택적으로) 결합하는"이란 어구는 단백질 및 기타 생체물질들로 이루어진 이종 집단 내에 특정한 단백질이 존재함을 결정해 주는 결합 반응을 나타낸다. 통상적으로, 항체는 약  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  내지  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , 약  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  내지  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  또는 약  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  내지  $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , 또는 그 이상의 결합 상수 ( $K_a$ )로 결합하며, 특이적 항원에 대해서는, 특이적 항원이나 밀접하게 관련된 항원이 아닌 비특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합 친화도보다 2배 이상의 친화도로 결합한다. "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"라는 어구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호교환하여 사용된다. 소정의 항원은 상기 항원에 결합하는 항체를 선별하기 전에 선택된 항원이다.
- <99> 펩티드를 언급할 때, "특이적으로 결합하는"이란 어구는 표적 분자에 대해 배타적으로 또는 우세하게 중간 또는 높은 결합 친화도를 갖는 펩티드 분자를 나타낸다. "~에 특이적으로 결합하는"이란 어구는 단백질 및 기타 생체물질들로 이루어진 이종 집단 내에 표적 단백질이 존재함을 결정해 주는 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지

정된 분석 조건 하에서, 특이적으로 결합하는 잔기는 특정 표적 단백질에 우선적으로 결합하며, 시험 샘플에 존재하는 다른 성분들과는 상당한 양으로 결합하지 않는다. 그러한 조건 하에서의 표적 단백질에 대한 특이적 결합은 특정 표적 항원에 대한 그의 특이성을 위해 선별된 결합 잔기를 필요로 할 수 있다. 특정 단백질과 특이적으로 반응하는 리간드를 선별하기 위해 다양한 분석 형태가 이용될 수 있다. 예를 들어, 고상 ELISA 면역분석법, 면역침강법, 비아코어 (Biacore) 및 웨스턴 (Western) 블롯 분석법을 이용하여 항원과 특이적으로 반응하는 펩티드를 동정한다. 통상적으로 특이적 또는 선택적 반응은 배경 신호 또는 노이즈 (noise)보다 2배 이상의 신호를 나타내며, 보다 통상적으로는 배경값에 비해 10배가 넘는 신호를 나타낸다.

- <100> 항체에 대한 "고친화도"라는 용어는 평형 결합 상수 ( $K_a$ )가 약  $10^7 \text{ M}^{-1}$  이상, 약  $10^8 \text{ M}^{-1}$  이상, 약  $10^9 \text{ M}^{-1}$  이상, 약  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  이상, 약  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  이상 또는 약  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  이상, 또는 그 이상 (예를 들어,  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  또는  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ , 또는 그 이상)인 것을 나타낸다. 그러나, "고친화도" 결합은 다른 항체 이소형에 대해서 달라질 수도 있다.
- <101> 본원에 사용된 용어 " $K_a$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 결합 상수를 나타내기 위한 것이다. 이 상수의 단위는  $1/\text{M}$ 이다.
- <102> 본원에 사용된 용어 " $K_d$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 나타내기 위한 것이다. 이 상수의 단위는  $\text{M}$ 이다.
- <103> 본원에 사용된 용어 " $K_a$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 반응속도 결합 상수를 나타내기 위한 것이다. 이 상수의 단위는  $1/\text{Ms}$ 이다.
- <104> 본원에 사용된 용어 " $K_d$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 반응속도 해리 상수를 나타내기 위한 것이다. 이 상수의 단위는  $1/\text{s}$ 이다.
- <105> "특정 항체-항원 상호작용"은 평형 및 반응속도 상수를 측정하는 실험 조건을 나타낸다.
- <106> "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 군을 나타낸다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE의 항체 이소형으로 정의된다. 추가의 구조적 변이는 IgG (예를 들어, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 및 IgG<sub>4</sub>) 및 IgA (예를 들어, IgA<sub>1</sub> 및 IgA<sub>2</sub>)의 개별 서브타입을 특성화한다.
- <107> "이소형 스위칭"은 특정 항체의 군 또는 이소형이 한 Ig 군으로부터 다른 Ig 군으로 변하는 현상을 나타낸다.
- <108> "스위칭되지 않은 (nonswitched) 이소형"은 이소형 스위칭이 발생하지 않았을 때 생성되는 중쇄 이소형의 군을 나타내며, 스위칭되지 않은 이소형을 코딩하는 CH 유전자가 기능적으로 재배열된 VDJ 유전자의 바로 하류에 존재하는 통상적인 제1 CH 유전자이다. 이소형 스위칭은 고전적 또는 비-고전적 이소형 스위칭으로 분류된다. 고전적 이소형 스위칭은 도입유전자 내에서의 1개 이상의 스위치 서열을 포함하는 재조합 과정에 의해 발생한다. 비-고전적 스위칭은, 예를 들어 인간  $\sigma_\mu$ 와 인간  $\Sigma_\mu$  사이의 상동성 재조합 ( $\delta$ -관련 결실)에 의해 발생할 수 있다. 특히, 다른 비-고전적 스위칭 메커니즘, 예를 들어 도입유전자간 재조합 및(또는) 염색체간 재조합이 발생하여 이소형이 스위칭될 수 있다.
- <109> 용어 "스위치 서열"은 스위치 재조합을 담당하는 DNA 서열을 나타낸다. 통상  $\mu$  스위치 영역인 "스위치 공여체 (switch donor)" 서열은, 스위치 재조합시 결실되는 작제물 영역의 5' (즉, 상류)에 존재한다. "스위치 수용체 (switch receptor)" 영역은 결실될 작제물 영역과 불변 영역 (예를 들어,  $\chi$ ,  $\epsilon$  및 이와 유사한 것들)의 사이에 존재한다. 재조합이 항상 발생하는 특이적 부위는 없기 때문에, 통상적으로는 최종 유전자 산물을 작제물로부터 예상할 수는 없다.
- <110> "글리코실화 패턴"은 단백질, 보다 구체적으로는 면역글로불린 단백질에 공유결합에 의해 부착된 탄수화물 단위들의 패턴으로서 정의된다. 이종 항체의 글리코실화 패턴은 인간을 제외한 형질전환 동물의 종에 의해 생성된 항체에서 자연적으로 발생하는 글리코실화 패턴과 실질적으로 유사한 특징이 있으며, 당업자는 이종 항체의 글리코실화 패턴이 도입유전자의 CH 유전자가 유래한 종에 비해 인간을 제외한 형질전환 동물 종의 글리코실화 패턴과 더 유사하다는 것을 알 것이다.
- <111> 소정의 대상에 적용되는 용어 "자연 발생적인"은 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 단리되고 사람이 실험실에서 특정 목적으로 변형시키지 않은 (바이러스를 비롯한) 생물체에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생적인 것이다.

- <112> 용어 "면역글로불린 좌위"는 B 세포 또는 B 세포 전구체에 의해 면역글로불린 펩티드의 발현에 사용될 수 있는 정보를 포함하는 유전자 요소 또는 유전자 요소들의 세트를 나타낸다. 이 펩티드는 중쇄 펩티드, 경쇄 펩티드, 또는 중쇄와 경쇄 펩티드의 융합체일 수 있다. 재배열되지 않은 좌위의 경우, 유전자 요소들은 B 세포 전구체에 의해 어셈블리되어, 면역글로불린 펩티드를 코딩하는 유전자를 형성한다. 재배열된 좌위의 경우, 면역글로불린 펩티드를 코딩하는 유전자가 이 좌위 내에 포함되어 있다.
- <113> 용어 "재배열된"은 V 세그먼트가 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하여 위치하며 본질적으로는 각각 완전한 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 구조인, 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 좌위의 구성을 나타낸다. 재배열된 면역글로불린 유전자 좌위는 생식세포주 DNA와 비교함으로써 확인할 수 있고, 재배열된 좌위는 1개 이상의 재조합 7량체/9량체 상동성 요소를 갖는다.
- <114> V 세그먼트를 언급함에 있어 용어 "재배열되지 않은" 또는 "생식세포주 구성"은 V 세그먼트가 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접하도록 재조합되지 않은 구성을 나타낸다.
- <115> 용어 "핵산" 또는 "핵산 분자"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 의미하며, 달리 한정하지 않는 한, 자연 발생적인 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 기능할 수 있는 천연 뉴클레오타이드의 공지 유사체도 포함할 수 있다.
- <116> 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분 (예를 들어, VH, VL, CDR3)을 코딩하는 핵산을 언급함에 있어 용어 "단리된 핵산"은 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이, 예를 들어 CTLA-4가 아닌 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 코딩하며 다른 서열들이 인간 게놈 DNA의 핵산과 자연적으로 인접할 수 있는 다른 뉴클레오타이드 서열이 없는 핵산을 나타내는 것이다.
- <117> 2개의 핵산 또는 폴리펩티드에 있어 용어 "실질적으로 동일한"은, 최대 2개 대응하도록 하기 서열 비교 방법 및 (또는) 시각적 관찰에 의해 비교 및 정렬했을 때, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 2개 이상의 서열들 또는 서브서열들을 나타낸다. 그러한 "실질적으로 동일한" 서열들은 통상적으로 상동성이 있는 것으로 간주된다. "실질적인 동일성"은 비교되는 2개의 서열 약 50개 잔기 길이 이상에서, 약 100개 잔기 이상의 영역에 걸쳐, 약 150개 잔기 이상의 영역에 걸쳐, 또는 상기 서열 전체 길이에 걸쳐 나타날 수 있다. 하기 설명하는 바와 같이, 임의의 항체 서열 2개는 카바트 (Kabatt)의 번호 지정법을 이용하여 한 방향으로만 정렬될 수 있다. 따라서, 항체의 경우에는 동일성%가 유일하고 잘 정의된 의미를 갖는다.
- <118> 면역글로불린의 성숙 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 아미노산은 각각 Hx 및 Lx로 지정되며, 여기서 x는 카바트의 방법 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)에 따라 아미노산의 위치를 지정하는 수이다. 카바트는 항체의 각 아군에 대한 다수의 아미노산 서열을 기재하고 있으며, 상기 아군에서 각 잔기 위치에 대해 가장 통상적으로 나타나는 아미노산을 기재함으로써 컨센서스 (consensus) 서열을 생성하였다. 카바트는 기재된 서열에서 각 아미노산에 대한 잔기 번호를 부여하는 방법을 이용하고 있으며, 잔기 번호를 부여하는 이 방법은 해당 분야의 표준이 되었다. 카바트의 방법은, 당해 항체를 보존적 아미노산을 기초로 카바트의 컨센서스 서열 중 어느 하나와 정렬함으로써, 그의 개론에 포함되지 않은 다른 항체에 대해서도 적용할 수 있다. 카바트의 번호 부여 시스템을 이용하면, 상이한 항체들에서 동등한 위치의 아미노산을 용이하게 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 항체 L50 위치의 아미노산은 마우스 항체 L50의 아미노산과 동등한 위치를 차지한다. 이와 유사하게, 항체를 코딩하는 각 핵산에 의해 코딩된 아미노산 서열을 카바트 번호 부여법에 따라 정렬할 때, 항체를 코딩하는 상기 핵산도 정렬된다. 문헌 [Chothia, et al., 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917], [Chothia, et al., 1989, Nature 342: 878-883] 및 [Chothia, et al., J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1989)]에 의해 다른 구조 정의법이 제안되었으며, 상기 문헌들은 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.
- <119> "~에 선택적으로 (또는 특이적으로) 혼성화되는"이란 어구는, 소정의 서열이 복합 혼합물 (예를 들어, 전체 세포성 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA) 중에 존재할 때, 상기 서열 분자가 엄격한 혼성화 조건 하에서 특정 뉴클레오타이드 서열에 결합하거나, 이중체 (duplex)를 형성하거나, 또는 혼성화되며, 여기서 상기 특정 뉴클레오타이드 서열은 배경값의 약 10배 이상으로 검출되는 것을 나타낸다. 한 실시양태에서, 특정한 핵산은 엄격한 조건 하에서 다른 방법으로 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 결정된 핵산 (예를 들어, 본원에 기재된 예시적 서열)에 혼성화되는 그의 능력에 의해 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 결정된다.
- <120> "엄격한 혼성화 조건"이란 어구는 프로브가 표적 서열 (통상, 핵산의 복합 혼합물)에는 혼성화되지만, 다른 서

열들에는 유의한 양으로 혼성화되지 않는 조건 (예를 들어, 양성 신호 (예, 본 발명의 핵산 동정)가 배경 혼성화의 약 10배임)을 나타낸다. 엄격한 조건은 서열에 의존적이며, 상이한 환경에서는 달라질 것이다. 길이가 보다 긴 서열은 보다 높은 온도에서 특이적으로 혼성화된다. 핵산 혼성화에 대한 광범위한 지침은 문헌 [Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)], [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997)] 및 [LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, PART I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)]에서 찾아볼 수 있다.

<121> 일반적으로 엄격한 조건은, 정해진 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열 용점 ( $T_m$ )보다 약 5 내지 10°C 낮게 선택된다.  $T_m$ 은 표적에 대해 상보적인 프로브의 50%가 (정해진 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에) 평형 상태 (표적 서열이 과량 존재하기 때문에,  $T_m$ 에서는 프로브의 50%가 평형 상태로 결합함)로 표적 서열에 혼성화되는 온도이다. 엄격한 조건은, pH 7.0 내지 8.3에서 염 농도가 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온, 통상 약 0.01 내지 1.0 M의 나트륨 이온 농도 (또는 다른 염)이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들어, 10 내지 50개의 뉴클레오타이드)의 경우 약 30°C 이상이고 긴 프로브 (예를 들어, 50개 초과 뉴클레오타이드)의 경우 약 60°C 이상인 것이다. 또한, 엄격한 조건은 샘브록 (Sambrook; 하기 인용)의 문헌에 기재된 포름아미드와 같은 탈안정화제의 첨가에 의해 달성할 수도 있다. 고도의 엄격 혼성화에 있어서, 양성 신호는 배경값의 2배 이상, 바람직하게는 배경 혼성화의 10배이다. 대표적인 고도의 엄격 또는 엄격 혼성화 조건에는, 50% 포름아미드, 5x SSC 및 1% SDS 중 42°C에서 인큐베이션시키거나 5x SSC 및 1% SDS 중 65°C에서 인큐베이션시키고, 0.2x SSC 및 0.1% SDS 중 65°C에서 세척하는 것이 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화에 있어서, 양성 신호 (예를 들어, 본 발명의 핵산 동정)는 배경 혼성화의 약 10배이다. 어느 핵산이 본 발명의 범위 내에 있음을 확인하는 데 사용되는 엄격한 혼성화 조건으로는, 예를 들어 50% 포름아미드, 5x SSC 및 1% SDS를 포함하는 완충액 중 42°C에서 혼성화시키거나, 또는 5x SSC 및 1% SDS를 포함하는 완충액 중 65°C에서 혼성화시키고, 이들을 0.2x SSC 및 0.1% SDS 중 65°C에서 세척하는 것이 있다. 본 발명에 있어서, 본 발명의 핵산을 포함하는 게놈 DNA 또는 cDNA는 본원에 개시된 핵산 서열을 사용한 엄격한 조건 하의 표준 서던 (Southern) 블롯에 의해 동정될 수 있다. (본 발명의 범위 내에 있는 핵산을 동정하기 위한) 그러한 혼성화의 다른 엄격 조건으로는, 40% 포름아미드, 1 M NaCl 및 1% SDS의 완충액 중 37°C에서 혼성화시키는 것이 있다.

<122> 그러나, 혼성화 포맷의 선택은 중요하지 않다. 어느 핵산이 본 발명의 범위 내에 있는지의 여부를 결정하는 조건은 세척 조건의 엄격도이다. 본 발명의 범위 내에 있는 핵산을 동정하기 위해 이용되는 세척 조건으로는, 예를 들어 pH 7, 및 약 50°C 이상 또는 약 55°C 내지 약 60°C의 온도에서 염 농도가 약 0.02 M인 것; 72°C에서 약 0.15 M NaCl의 염 농도로 약 15분 동안 세척하는 것; 약 50°C 이상 또는 약 55°C 내지 약 60°C의 온도에서 약 0.2x SSC의 염 농도로 약 15 내지 약 20분 동안 세척하는 것; 혼성화 복합체를, 0.1% SDS를 함유하는 약 2x SSC 염 농도의 용액으로 실온에서 15분 동안 2회 세척한 후, 0.1% SDS를 함유하는 0.1x SSC로 68°C에서 15분 동안 2회 세척하는 것; 또는 이들과 균등한 조건들이 있다. SSC 완충액 및 동등한 조건에 대한 설명은 샘브록 (Sambrook), 티센 (Tijssen) 및 오수벨 (Ausubel)의 문헌을 참조한다.

<123> 용어 "서열 동일성"은 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열들 사이의 유사성 측정값을 나타내며, 이는 하기 설명되는 것들과 같은 당업계 공지 방법을 이용하여 측정할 수 있다.

<124> 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열에 관한 용어 "동일한" 또는 "동일성%"는 동일한 2개 이상의 서열 또는 서브서열, 또는 특정 비율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 갖는 (즉, 최대한 대응하도록 비교 윈도우 (window)에 대해 비교 및 정렬했을 때의 특정 영역에 대해, 또는 하기 서열 비교 연산법들 중 어느 하나를 이용하거나 수동 정렬 및 시각적 관찰에 의해 측정했을 때의 지정된 영역에 대해 60% 동일성, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 나타냄) 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 나타낸다.

<125> 2개의 핵산 또는 폴리펩티드에 있어 "실질적으로 동일한"이란 어구는, 최대한 대응하도록 하기 서열 비교 연산법 또는 시각적 관찰에 의해 비교 및 정렬했을 때, 60% 이상, 대체로 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상 또는 95% 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 나타낸다. 바람직하게는, 실질적인 동일성은 약 50개의 염기 또는 잔기 길이 이상의 서열 영역에 걸쳐 존재하고, 보다 바람직하게는 약 100개의 염기 또는 잔기 이상의 영역에 걸쳐 존재하며, 가장 바람직하게는 약 150개의 염기 또는 잔기 이상의 영역에 걸쳐 실질적으로 동일하다. 가장 바람직한 실시양태에서, 상기 서열은 코딩 영역의 전체 길이에 걸쳐 실질적으로 동일하다.



- <126> 서열 비교에 있어서, 통상적으로 1개의 서열이 비교되는 시험 서열에 대한 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 연산법을 이용할 때는, 시험 서열 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우에 서브서열 좌표를 지정한 후, 서열 연산법 프로그램의 매개변수를 지정한다. 프로그램의 디폴트 매개변수를 사용할 수도, 또는 다른 매개변수를 지정할 수도 있다. 그 후, 서열 비교 연산법에 의해, 프로그램 매개변수에 기초하여 기준 서열에 대한 시험 서열의 서열 동일성%를 계산한다. 핵산 및 단백질의 서열 비교를 위해, BLAST 및 BLAST 2.0 연산법과 하기 논의하는 디폴트 매개변수를 이용할 수 있다.
- <127> 본원에 사용된 "비교 윈도우 (comparison window)"는 20 내지 600, 통상적으로는 약 50 내지 약 200, 보다 통상적으로는 약 100 내지 약 150개로 이루어진 군으로부터 선택된 개수의 인접 위치들 중 어느 한 세그먼트에 대한 기준을 포함하며, 여기서 특정 서열은 동일한 수의 인접 위치들로 구성된 기준 서열과 최적으로 정렬된 후에 비교될 수 있다. 비교용 서열의 정렬 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 비교용 서열의 최적 정렬은 예를 들어 문헌 [Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482]의 국소 상동성 연산법에 의해, 문헌 [Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443]의 상동성 정렬 연산법에 의해, 문헌 [Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444]의 유사성 검색법에 의해, 이들 연산법을 컴퓨터에 응용한 방법 (FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information), GAP, BESTFIT, FASTA, 및 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)의 TFASTA)에 의해, 또는 수동 정렬 및 시각적 관찰 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., 1987 (1999 Suppl.), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.] 참조)에 의해 수행할 수 있다.
- <128> 서열 동일성% 및 서열 유사성%를 결정하기에 적합한 연산법의 바람직한 예로는 문헌 [Pearson, W. R. & Lipman, D. J., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444]에 기재된 FASTA 연산법이 있다. 또한 문헌 [W. R. Pearson, 1996, Methods Enzymol. 266: 227-258]을 참조할 수 있다. 동일성%를 계산하기 위한 DNA 서열의 FASTA 연산법에 사용되는 바람직한 매개변수는, BL50 Matrix 15:-5, k-tuple=2; 조이닝 패널티 (joining penalty)=40, 최적화도=28; 갭 (gap) 패널티=-12, 갭 길이 패널티=-2; 및 폭 (width)=16인 것이 최적이다.
- <129> 서열 동일성% 및 서열 유사성%를 결정하기에 적합한 연산법의 바람직한 다른 예로는 문헌 [Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402] 및 [Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410]에 각각 기재된 BLSAT 및 BLSAT 2.0 연산법이 있다. BLSAT 및 BLSAT 2.0을 본원에 기재된 매개변수로 이용하여, 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성%를 결정한다. BLSAT 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 공개적으로 입수 가능하다. 이 연산법은 먼저 검색을 원하는 서열 (query sequence)에서 짧은 길이의 워드 (word) W를 확인하여 스코어가 높은 서열 쌍 (high scoring sequence pair; HSP)을 찾아내는데, 이는 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 워드와 정렬하는 경우에 매치되거나 일부 (+) 값의 역치 스코어 T를 충족한다. T는 인접 워드 스코어 역치라 부른다 (Altschul et al., 상기 문헌). 이들 최초의 인접 워드 히트 (hit)는 이들을 포함하는 보다 긴 길이의 HSP 검색을 개시하기 위한 입력값 (seed)으로 작용한다. 워드 히트는 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한도까지 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 확장된다. 누적 스코어는, 뉴클레오타이드 서열의 경우 매개변수 M (매치되는 잔기 쌍에 대한 보상 스코어; 항상 0 초과임) 및 N (매치되지 않은 잔기에 대한 패널티 스코어; 항상 0 미만임)을 이용하여 계산한다. 아미노산 서열의 경우, 스코어 산정 매트릭스를 이용하여 누적 스코어를 계산한다. 누적 정렬 스코어가 그의 최대 달성 값에서 X의 양으로 감소되는 경우, 누적 스코어가 (-) 스코어를 갖는 하나 이상의 잔기 정렬의 누적으로 인해 0 이하로 내려간 경우, 또는 서열의 한쪽 말단에 도달한 경우에 각 방향에서 워드 히트의 확장이 중단된다. BLAST 연산법의 매개변수인 W, T 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. (뉴클레오타이드 서열의 경우) BLASTN 프로그램은 디폴트로서 워드길이 (W) 11, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 워드길이 3 및 기대값 (E) 10을 이용하고, BLOSUM62 스코어 산정 매트릭스 (문헌 [Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915] 참조)는 정렬 (B) 50, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 이용한다.
- <130> BLAST 연산법은 또한 2개 서열 사이의 유사성에 대한 통계적 분석을 수행한다 (예를 들면, 문헌 [Karlin & Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5787] 참조). BLAST 연산법에 의해 제공된 유사성 측정값은, 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매치가 우연히 발생할 가능성을 나타내는 최소 합계 확률 (P(N))이다. 예를 들어, 기준 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에서 최소 합계 확률이 약 0.2 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 간주된

다.

- <131> 유용한 다른 연산법의 예로는 PILEUP이 있다. PILEUP은 점진적인 짝맞춤 방식의 (pairwise) 정렬을 이용하여 일군의 관련 서열로부터 다수의 서열을 정렬함으로써 서열들의 관련성 및 서열 동일성%를 나타낸다. 이 연산법은 또한, 정렬하는 데 사용되는 클러스터링 (clustering) 관계를 보여주는 계통수(系統樹) 또는 수상도(dendrogram)를 구성한다. PILEUP은 문헌 [Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35: 351-360]에 기재된 점진적 정렬 방법을 간소화시켜 이용한다. 이용된 방법은 문헌 [Higgins & Sharp, 1989, CABIOS 5: 151-153]에 기재된 방법과 유사하다. 이 프로그램은 300개까지의 서열을 정렬할 수 있으며, 각 서열의 최대 길이는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 5,000개이다. 다수의 정렬 방법은 2개의 가장 유사한 서열들을 짝맞춤 방식으로 정렬하여 시작함으로써, 2개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성한다. 그 후, 이 클러스터는 그 다음으로 가장 관련성이 높은 서열, 또는 정렬된 서열들의 클러스터와 정렬된다. 서열들의 클러스터 2개는 각 서열 2개의 짝맞춤 방식의 정렬을 간단히 확장시켜 정렬한다. 최종 정렬은 일련의 점진적인 짝맞춤 방식의 정렬에 의해 달성된다. 이 프로그램은 특정 서열 및 서열 비교 영역에 대한 상기 서열의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 좌표를 지정하고, 프로그램의 매개변수를 지정함으로써 구동된다. PILEUP을 이용하는 경우, 디폴트 갭 가중치 (3.00), 디폴트 갭 길이 가중치 (0.10) 및 가중된 말단 갭의 매개변수를 이용하여 기준 서열을 다른 시험 서열과 비교함으로써 서열 동일성% 관계를 결정한다. PILEUP은 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지 (예를 들어, 버전 7.0)(Devereaux et al., 1984, Nuc. Acids Res. 12: 387-395)로부터 얻을 수 있다.
- <132> 다수의 DNA 및 아미노산 서열의 정렬에 적합한 연산법의 다른 바람직한 예로는 CLUSTALW 프로그램 (Thompson, J. D. et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680)이 있다. CLUSTALW는 서열들의 군 사이에서 짝맞춤 방식의 다중 비교를 수행하여, 이들을 상동성에 기초한 다수 정렬로 어셈블리한다. 갭 오픈 (open) 패널티 및 갭 확장 패널티는 각각 10 및 0.05였다. 아미노산 정렬의 경우, BLSOUM 연산법을 단백질 가중치 매트릭스로서 이용할 수 있다 (Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919).
- <133> 본 발명의 핵산은 전체 세포에 존재할 수도, 세포 용해물에 존재할 수도, 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은 다른 세포성 핵산 또는 단백질과 같은 다른 세포 성분 또는 다른 오염물로부터, 알칼리성/SDS 처리, CsCl 밴딩 (banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 다른 공지 기술 (예를 들어, 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함된, 본원에서 논의된 샘플북, 티센 및 오수벨의 문헌 참조)을 비롯한 표준 기술에 의해 정제되는 경우에 "단리된" 또는 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. 본 발명의 핵산 서열 및 본 발명을 수행하기 위해 사용된 다른 핵산 서열은, RNA이든 cDNA이든 게놈 DNA이든 또는 이들의 하이브리드이든 무관하게 다양한 공급원으로부터 단리되고, 유전공학적으로 조작되고, 증폭되고 (되거나), 재조합에 의해 발현될 수 있다. 박테리아 뿐만 아니라, 예를 들어 효모, 곤충 또는 포유동물 시스템을 비롯한 임의의 재조합 발현 시스템이 사용될 수 있다. 별법으로, 이들 핵산은 시험관내에서 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터 내로의 서브클로닝, 프로브의 표지, 서열분석 및 혼성화와 같은 핵산 조작 기술은 과학 문헌 및 특허 문헌에 잘 설명되어 있으며, 예를 들어 샘플북, 티센 및 오수벨의 문헌을 참조할 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지된 다수의 일반적인 방법에 의해 분석 및 정량화될 수 있다. 그 예로는 NMR, 분광법, 방사선분석법, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 박층 크로마토그래피 (TLC) 및 고확산 (hyperdiffusion) 크로마토그래피와 같은 분석 생화학적 방법, 유체 또는 겔 침전 반응, 면역확산 (단일 또는 이중), 면역전기영동, 방사선 면역분석법 (RIA), 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 면역-형광 분석법과 같은 다양한 면역학적 방법, 서던 분석법, 노던 분석법, 도트-블롯 분석법, 겔 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE), RT-PCR, 정량 PCR, 다른 핵산이나 표적 또는 신호의 증폭 방법, 방사선 표지법, 섬광 계수법, 및 친화도 크로마토그래피가 포함된다.
- <134> 본 발명의 핵산 조성물은 (변형된 제한 부위 등을 제외하고) 대체로 cDNA, 게놈 DNA 또는 그 혼합물로부터의 고유 서열이지만, 표준 기술에 따라 돌연변이화된 유전자 서열일 수도 있다. 코딩 서열의 경우, 이들 돌연변이는 아미노산 서열을 원하는 대로 변화시킬 수 있다. 특히, 고유의 V 서열, D 서열, J 서열, 불변 영역 서열, 스위치 서열, 및 본원에 기재된 그러한 다른 서열에 실질적으로 상동성이 있거나 이들로부터 유래한 DNA 서열이 본 발명에서 고려된다 (여기서, "유래한"은 특정 서열이 다른 서열과 동일하거나 그로부터 변형된 것을 나타냄).
- <135> 특정 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적인 관계에 있는 경우, 이 핵산은 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 (enhancer)는, 이들이 특정 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열과 작동가능하게 연결된 것이다. 전사 조절 서열에 있어서, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 인접하고 있으며, 필요한 경우 2개의 단백질 코딩 영역이 연결되어 인접하며 프레임 (frame)에 맞는 것을 의미한다. 스위치

서열의 경우, "작동가능하게 연결된"은 서열들이 스위치 재조합이 수행될 수 있도록 연결된 것을 의미한다.

- <136> 용어 "벡터"는 다른 핵산과 결합된 채로 이들을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 벡터의 한 유형으로 플라스미드가 있는데, 이는 부가의 DNA 세그먼트가 라이게이션 (ligation)될 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프이다. 벡터의 다른 유형으로 바이러스 벡터가 있는데, 이는 부가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포에서 자기복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 개시점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 (episome) 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합됨으로써 숙주의 게놈과 함께 복제될 수 있다. 더욱이, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 대체로 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호교환하여 사용된다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 하는 그러한 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터 (예, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)도 포함하는 것이다.
- <137> 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 나타낸다. 상기 용어는 특정 대상 세포 뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 나타내는 것으로 이해해야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 이후 세대에서 특정한 변형이 발생할 수 있기 때문에 사실상 그러한 자손은 모세포와 동일하지는 않지만, 그럼에도 불구하고 본원에 사용되는 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다.
- <138> "표지"는 분광학적 수단, 광화학적 수단, 생화학적 수단, 면역화학적 수단 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 예를 들어, 유용한 표지에는 <sup>32</sup>P, 형광 염료, 전자-치밀 (electron-dense) 시약, 효소 (예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 것), 바이오틴, 디곡시제닌 (digoxigenin) 또는 헵탄, 및 항혈청 또는 모노클로날 항체가 입수가 가능한 단백질 (예를 들어, 펩티드로의 방사성 표지 혼입 등에 의해 검출가능하며, 펩티드와 특이적으로 반응하는 항체를 검출하기 위해 사용되는 본 발명의 폴리펩티드)이 포함된다.
- <139> 세포와 관련하여 본원에 사용된 용어 "분류 (sorting)"는, 예를 들어 형광 활성화 세포 분류기를 이용하여 달성할 수 있는 세포의 물리적 분류 뿐만 아니라, 분류하지 않고 FACS 분석과 같은 세포 표면 마커의 발현에 기초한 세포 분석도 나타내는 것이다.
- <140> "면역 세포 반응"이란 어구는, 면역계 세포가 외부 또는 내부 자극 (예를 들어, 항원, 사이토카인 및 케모카인 등)에 반응하여 면역 세포에서 생화학적 변화를 생성함으로써, 면역 세포의 이동, 표적 세포의 사멸, 식세포작용, 항체 생성, 및 면역 반응의 다른 가용성 이펙터 (effector) 생성 등을 초래하는 것을 의미한다.
- <141> 용어 "T 림프구 반응" 및 "T 림프구 활성화"는 본원에서 상호교환하여 사용되며, T 림프구에 의존하는 면역 반응의 성분 (즉, T 림프구의 헬퍼, 세포독성 킬러 또는 억제 T 림프구로의 증식 및(또는) 분화; 항체 생성을 유발 또는 억제하는, 헬퍼 T 림프구의 B 림프구로의 신호 제공; 세포독성 T 림프구에 의해 특정 표적 세포의 사멸; 및 다른 면역 세포의 기능을 조절하는 사이토카인과 같은 가용성 인자의 방출)을 나타낸다.
- <142> 용어 "면역 반응"은 림프구, 항원 표출 세포 (antigen presenting cell), 식세포, 과립구, 및 상피 세포 또는 간에 의해 생성된 가용성 거대분자 (항체, 사이토카인 및 보체 포함)가 나타내는 구체적인 작용으로, 병원체가 침입한 인체, 병원체에 의해 감염된 세포 또는 조직, 암세포, 또는 자가면역성 또는 병원성 감염의 경우 정상 인간 세포 또는 조직을 선택적으로 손상시키거나 파괴시키거나 제거하는 것을 의미한다.
- <143> 면역 반응의 성분은 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 시험관내에서 검출할 수 있다. 예를 들어, (1) 세포독성 T 림프구를 방사성 표지된 표적 세포와 인큐베이션시키고, 방사선 활성화의 방출에 의해 이들 표적 세포의 용해를 검출하는 것, (2) 헬퍼 T 림프구를 항원 및 항원 표출 세포와 인큐베이션시키고, 표준 방법 (Windhagen, A. et al., 1995, Immunity 2: 373-80)에 의해 사이토카인의 합성 및 분비를 측정하는 것, (3) 항원 표출 세포를 전체 단백질 항원과 인큐베이션시키고, T 림프구 활성화 분석법 또는 생물리학적 방법 (Harding et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 4230-4)에 의해 MHC 상에 상기 항원의 표출을 검출하는 것, 및 (4) 비만세포를 자신의 Fc-엡실론 수용체와 가교결합시키는 시약과 인큐베이션시키고, 효소 면역분석법 (Siraganian, et al., 1983, TIPS 4: 432-437)에 의해 히스타민 방출을 측정하는 것이 있다.
- <144> 이와 유사하게, 모델 생물체 (예를 들어, 마우스) 또는 인간 환자에서의 면역 반응 생성물도 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 검출할 수 있다. 예를 들어, (1) 임상학 실험실에서 현재 사용되는 표준 방법 (예, ELISA)에 의해 백신화에 대한 항체의 생성을 용이하게 검출하는 것, (2) 피부 표면에 상처를 내고 멸균 용기에 넣은

후에 면역 세포의 상처 부위로의 이동을 포착 (Peters et al., 1988, Blood 72: 1310-5)함으로써 면역 세포의 염증 부위로의 이동을 검출하는 것, (3) 3H-티미딘을 사용하여, 유사분열 촉진인자에 반응한 말초 혈액 단핵 세포의 증식 또는 복합 림프구 반응을 측정하는 것, (4) PBMC를 표지된 입자와 함께 웰에 넣어 (Peters et al., 1988), PBMC의 파단, 대식세포 및 다른 식세포의 식세포작용 능력을 측정하는 것, 및 (5) PBMC를 CD4 및 CD8 과 같은 항체로 표지하여 면역계 세포의 분화를 측정하고 이들 마커를 발현하는 PBMC의 분화를 측정하는 것이 있다.

<145> 본원에 사용된 "신호 전달 경로" 또는 "신호 전달 사건"이라는 어구는 세포가 자극성 화합물 또는 제제와 상호 작용하여 발생하는, 보다 통상적으로는 일련의 생화학 반응인 1가지 이상의 생화학 반응을 나타낸다. 따라서, 자극성 화합물과 세포의 반응은 "신호"를 생성하며, 이 신호는 신호 전달 경로를 통해 전달되어, 궁극적으로는 상기 면역 반응과 같은 세포성 반응을 초래한다.

<146> 신호 전달 경로는 세포의 한 부분에서 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 나타낸다. 본원에 사용된 "세포 표면 수용체"라는 어구에는 신호를 수용하여 세포막을 통해 그 신호를 전달할 수 있는 분자 또는 분자들의 복합체가 포함된다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예로는 T 세포 수용체 (TCR) 또는 CTLA-4의 B7 리간드가 있다.

<147> 세포에서의 신호 전달 경로는 세포가 세포 내부 또는 외부의 자극인자와 상호작용함으로써 개시된다. 외부 (즉, 세포의 외부) 자극인자 (예를 들어, 항원 표출 세포 상의 MHC-항원 복합체)가 세포 표면 수용체 (예를 들어, T 세포 수용체)와 상호작용하면, 신호 전달 경로는 세포막을 가로질러, 세포의 세포질을 통해, 그리고 몇몇 경우에는 핵으로 신호를 전달한다. 내부 (예를 들어, 세포 내부) 자극인자가 세포내 신호 전달 분자와 상호작용하면, 신호 전달 경로는 세포의 세포질을 통해 신호를 전달하고, 몇몇 경우에는 세포의 핵으로 신호를 전달한다.

<148> 신호 전달은, 예를 들어 분자의 인산화, 비공유결합성의 알로스테릭 (allosteric) 상호작용, 분자들의 복합체 형성, 분자의 구조 변화, 칼슘 방출, 이노시톨 포스페이트 생성, 단백질 분해성 절단, 시클릭 뉴클레오타이드의 생성 및 디아실글리세리드의 생성을 통해 발생할 수 있다. 통상적으로, 신호 전달은 신호 전달 분자의 인산화를 통해 발생한다.

<149> 용어 "비특이적 T 세포 활성화"는 항원 특이성과 무관한 T 세포의 자극을 나타낸다.

<150> <개론>

<151> 인간 카파 경쇄 좌위의 안정성을 향상시키기 위해, 트랜스염색체 기술을 형질전환 동물 생성용의 초기 전핵 미세주입 기술과 병용하였다. 인간 카파 경쇄 좌위의 도입유전자 KCo5 (Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-851; 미국 특허 제5,770,429호)에는 인간 카파 좌위의 실질적인 부분이 포함되며, 마우스의 생식세포주에서, 그리고 상기 도입유전자에서 유래한 인간 카파쇄를 발현하는 B 세포 및 하이브리도마 세포에서 안정하게 유지된다. 이 도입유전자를 안정한 hCF(SC20) 트랜스염색체와 조합시키고, 내생성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 좌위를 돌연변이에 의해 기능적으로 불활성화시킴으로써, 다수의 인간 중쇄 이소형을 비롯한 넓은 인간 항체 레파토리를 발현하는 동물을 생성하였다. 이에 의해, 이중-TC/KO 마우스 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)에 비해 경쇄 도입유전자가 향상되어 각 융합체로부터 보다 많은 수의 하이브리도마가 회수되었다.

<152> 본 발명은 IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> 및 IgM을 비롯하여 원하는 임의의 중쇄 이소형으로 이루어진 전장 인간 항체를 단리할 수 있게 해준다. 특히, 소정의 항원에 대해 높은 친화도를 갖는 몇몇 상이한 항체들은 인간을 제외한 단일 형질전환 포유동물로부터 단리될 수 있다.

<153> 본 발명의 인간을 제외한 형질전환 포유동물, 바람직하게는 마우스 또는 다른 설치류는 기탁된 물질을 사용하여 생성될 수도 있다. hCF(SC20)을 보유하는 닭 DT40 세포는 부다페스트 조약 하에 2001년 5월 9일자로 국제 특허 생물체 기탁기관 (International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan)에 기탁되었다. 기탁 번호는 FERM BP-7583이다. 이 세포주의 명칭은 SC20으로 지정되었다.

<154> hCF(SC20)을 보유하는 닭 DT40 세포는 1999년 8월 18일자로 대만의 식품 산업 연구개발 연구소 (Food Industry Research and Development Institute (FIRDI))에 기탁되었다. 기탁 번호는 CCRC 960099이다. 대만에 기탁시 이 세포주의 명칭은 hCF(SC20)으로 지정되었다. 닭 DT-40 세포에 보유된 hCF(SC20)은 WO 00/10383 (EP



1106061)에 기재된 바와 같이 마우스 ES 세포로 옮길 수 있다. 요컨대, 마이크로세포 (microcell)를 담 DT-40 세포로부터 생성하고, 이를 CHO 세포와 융합시킨다. 그 후, hCF(SC20)는 보유한 CHO 세포를 G418 내성에 기초하여 선별할 수 있다. hCF(SC20)의 보유는 시판되는 인간 COT1 DNA 또는 인간 염색체 14번에 특이적인 프로브를 사용하여 PCR 또는 FISH 분석에 의해 확인할 수 있다. 그 후, hCF(SC20)을 보유한 CHO 세포로부터 마이크로세포를 생성하고, 이를 마우스 ES 세포와 융합시킨다. hCF(SC20)을 보유하는 ES 세포는 CHO 세포와 동일한 방법으로 선별할 수 있다.

<155> KCo5 도입유전자를 보유하는 세포는 부다페스트 조약 하에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)에 기탁되어 2001년 11월 8일자로 하기 기탁 번호를 부여받았다: 효모 중의 17E1 (YAC y17, Medarex KCo5)은 ATCC PTA-3842 (유전자 물질은 인간 면역글로불린 카파 가변 영역 유전자 좌위의 삽입체를 포함하는 효모 인공 염색체)를 부여받았고; 이. 콜라이 (*E. coli*) 중의 pKV4 (Medarex KCo5)는 ATCC PTA-3843 (인간 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함하는 플라스미드)을 부여받았으며; 이. 콜라이 중의 pKCIB (Medarex KCo5)는 ATCC PTA-3844 (인간 면역글로불린 J 카파 및 카파 불변 영역 유전자를 포함하는 플라스미드)를 부여받았다.

<156> 상기 KCo5 도입유전자를 보유하는 세포는 2001년 11월 22일자로 대만의 식품 산업 연구개발 연구소 (FIRDI)에 기탁되었다. pKV4, YACy17 및 pKCIB에 대한 기탁 번호는 각각 CCRC 940383, CCRC 940385 및 CCRC 940386이다.

<157> 도입유전자 KCo5는 상기 언급한 바와 같이 마우스 세포 내로 옮길 수 있다 (Fishwild, D. 상게서; 또한 미국 특허 제5,770,429호의 실시예 38, 및 하기 실시예 2 참조).

#### <158> <면역글로불린의 일반적 특징>

<159> 기본적인 항체 구조 단위는 서브유닛의 4량체를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 4량체는 2쌍의 동일한 폴레펩티드쇄로 구성되며, 각 쌍은 1개의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄" (약 50 내지 70 kDa)를 갖는다. 각 쌍의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는, 100 내지 110개 이상의 아미노산으로 구성된 가변 영역을 포함한다. 각 쌍의 카르복시-말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 구성한다.

<160> 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE의 항체 이소형으로 정의된다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산 영역인 "J"에 의해 연결되며, 또한 중쇄에는 약 1 내지 10개 이상의 아미노산으로 구성된 "D" 영역이 포함된다 (일반적으로, 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 문헌 [Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7] 참조).

<161> 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 온전한 항체는 2개의 결합 부위를 갖는다. 이관능성 또는 이중 특이성 항체를 제외하고는 2개의 결합 부위가 동일하다. 이들 쌍은 모두, 상보성 결정 영역 (CDR)이라고도 불리우는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 비교적 보존적인 프레임워크 영역 (FR)의 동일한 일반적 구조를 갖는다. 각 쌍의 2개 쇄로부터의 CDR은 특정 에피토프에 대한 결합을 가능하게 하는 프레임워크 영역에 의해 정렬된다. 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 N-말단에서 C-말단 방향으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인에 대한 아미노산의 지정은 문헌 [Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991], [Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)] 또는 [Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)]의 정의에 따른 것이다.

#### <162> <천연 인간 면역글로불린 좌위>

<163> 인간 면역글로불린은 3개의 별개 좌위인 중쇄, 카파 경쇄 및 람다 경쇄에 의해 자연적으로 코딩된다. 이들 천연 좌위는 각각 염색체 14번, 2번 및 22번에 위치한다. 인간 염색체 14번의 긴 암 (arm)에 있는 텔로미어 (telomere)의 부근에서 14q32.3에 위치한 천연 인간 중쇄 좌위는 약 1.3 메가염기 이상으로 확장되며, 약 45개의 V 유전자 발현 세그먼트, 27개의 D 유전자 세그먼트, 6개의 J 유전자 세그먼트 및 9개의 불변 (C) 영역 유전자 세그먼트를 코딩한다. 염색체 2번의 2p11.12에 위치한 천연 인간 카파 경쇄 좌위는 약 1.8 메가염기 이상으로 확장되며, 약 34개의 V 유전자 발현 세그먼트, 5개의 J 유전자 세그먼트 및 1개의 C 영역 유전자 세그먼트를 포함한다. 22q11.2에 위치한 천연 인간 람다 좌위는 약 30개의 V 유전자 세그먼트, 및 4개의 기능적 J-C 쌍 (각각은 1개의 J 유전자 세그먼트 및 1개의 C 유전자 세그먼트를 포함함)를 코딩한다. 이들 천연 좌위 각각은 또한 결실, 삽입 및 단일 뉴클레오타이드 다형성을 포함할 수도 있다.

<164> <하이브리도마 융합에 의한 모노클로날 항체의 생성>

<165> 모노클로날 항체의 생성은, 예를 들어 동물을 항체 (예를 들어, CD4, G-CSF, HSA, EGFR 또는 CTLA-4와 같은 인간 단백질 항체, 병원체 코딩 항원, 독소, 또는 다른 항원)로 면역화시키는 것에 의해 달성할 수 있다. 상기 항원, 또는 그 항원의 면역원성 단편, 또는 그 항원에 대한 항체의 항-유전자형 항체를 포함하는 보다 긴 폴리펩티드를 사용할 수도 있다. 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 문헌 [Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP New York, NY, 1988)] 및 [Mishell and Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, (W. H. Freeman and Co. New York, NY 1980)]을 참조할 수 있다.

<166> 그러한 면역원은 펩티드 합성에 의해 또는 재조합 발현에 의해 천연 공급원으로부터 얻을 수 있다. 임의로는, 면역원은 하기 설명하는 캐리어 단백질에 부착되거나 캐리어 단백질과 복합체를 이룬 상태로 투여될 수도 있다. 임의로는, 면역원은 면역보강제와 함께 투여될 수도 있다. 하기 설명하는 바와 같은 여러 유형의 면역보강제가 사용될 수 있다. 프로인트 (Freund) 완전 면역보강제를 사용한 투여 이후에 프로인트 불완전 면역보강제를 사용한 투여가 실험실용 동물의 면역화에 바람직하다. 토끼 또는 기니아 피그는 폴리클로날 항체의 제조에 통상적으로 사용된다. 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트 및 햄스터)는 모노클로날 항체의 제조에 통상적으로 사용된다. 이들 마우스는 형질전환 마우스일 수 있으며, 하기 설명하는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자 서열을 포함할 수 있다. 면역화 후, 면역화된 동물은 도입된 면역원에 대한 혈청 반응이 진행될 것이다. 이 혈청 반응은 다양한 분석법을 이용하여 수거된 혈청을 적정함으로써 측정할 수 있다. 통상적으로 이용되는 분석법의 예로는 ELISA가 있다. 혈청 반응의 크기는 통상적으로 역가 (titer)라 불리운다. 예를 들어, 역가 1,000은 반응성 항체의 존재가 1,000배 희석된 혈청의 분석에 의해 검출될 수 있음을 의미한다. 통상적으로, 면역화는 면역화되지 않은 동물에서 나타나는 혈청 반응보다 수 자리수 더 큰 크기의 혈청 반응을 초래할 것이다. 단지 1 또는 2 자리수 더 큰 크기의 면역 반응은 약한 것으로 간주되며, 통상적으로 항원 반응성 항체를 발현하는 B 세포가 거의 존재하지 않는 것을 의미한다. 모노클로날 항체는 통상적으로, 림프구를 무한증식 세포 (예를 들어, 골수종 세포)와 융합시켜 하이브리도마 세포라 불리우는 하이브리드 세포를 형성함으로써 얻는다. 새로이 형성된 하이브리도마 세포는 모 림프구로부터의 항체 발현 특성과, 모 무한증식 세포로부터의 증식 특성을 갖게 된다. 새로이 형성된 하이브리도마 세포는 배양용 배지를 포함하는 배양 접시 (예를 들어, 96 웰 플레이트)에서 배양된다. 배양 상층액에서, 항원에 반응하는 원하는 중쇄 및 경쇄 이소형의 항체가 존재하는지 (통상적으로 융합 후 1 내지 2 주 사이에) 시험한다. 그 후, 상기 1차 배양액의 세포를 희석하고 이를 반복하여, 단일 종의 모노클로날 항체를 분리하는 하이브리도마 세포의 개별 클론을 단리한다. 상기 2차 배양액을 추가로 서브클로닝하여 3차 배양액 등을 얻을 수 있다. 상기 서브클로닝 방법에 의해 하이브리도마 클론을 얻을 수 있는 항원 반응성 1차 배양액의 분획을 사용하여 서브클로닝의 효율을 측정할 수 있다. 모든 항원 양성 1차 하이브리도마 배양액이 클론화 세포주의 유래에 사용될 수 있으면, 서브클로닝의 효율은 100%이다. 발현된 항체를 코딩하는 면역글로불린 좌위가 불안정하면 (예를 들어, 염색체, 염색체 단편 또는 트랜스염색체의 상실을 통해, 또는 삽입된 어레이 (array)의 결실성 재조합을 통해, 또는 몇몇 다른 메카니즘을 통해 세포 분열시 쉽게 상실되면), 서브클로닝의 효율은 감소할 것이다 (즉, 100% 미만). 생성중인 모노클로날 항체에 대해 서브클로닝 효율이 높은 (예를 들어, 20% 초과, 바람직하게는 50% 초과, 보다 바람직하게는 80% 초과, 가장 바람직하게는 90% 또는 95% 초과) 준거를 갖는 것이 특히 유용하다. 항체를 사용하여 항원에 대한 특이적 결합 여부를 스크리닝한다. 임의로는, 항체를 사용하여 항원의 특정 영역에 대한 결합 여부를 스크리닝한다. 단백질 항원의 경우, 항원 펩티드의 결실 돌연변이체 집단에 대한 항체의 결합을 측정하고, 어느 결실 돌연변이체가 항체에 결합하는지 측정함으로써 후자의 스크리닝을 수행한다. 결합은, 예를 들어 웨스턴 블롯 또는 ELISA에 의해 평가할 수 있다. 항체가 특이적으로 결합하는 가장 작은 단편을 항체의 에피토프로 규정한다. 그러나, 몇몇 에피토프는 실제 에피토프 이외의 요소들의 결실에 의해 상실될 수 있는 비-인접 구조 요소를 포함할 수도 있다.

<167> 별법으로, 에피토프 특이성은 시험 항체와 기준 항체가 항원에 대한 결합에 대해 경쟁하는 경쟁 분석법에 의해 결정할 수 있다. 시험 항체와 기준 항체가 경쟁하면, 이들은 한 항체의 결합이 다른 항체의 결합을 방해할 수 있을만큼 충분히 가까운 동일한 에피토프(들)에 결합하는 것이다.

<168> <B 세포 하이브리도마로부터 항체 코딩 핵산의 클로닝>

<169> 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 핵산은 면역화 또는 고유 형질전환 동물로부터 클로닝할 수 있다. 핵산은 그러한 동물의 림프성 세포로부터 게놈 DNA 또는 cDNA로서 클로닝할 수 있다. 면역글로불린 서열의 클로닝 이전에 그러한 세포의 무한증식은 필요없다. 대체로, mRNA는 올리고-dT 프라이머를 사용한 역전사에 의해 단리 및 증폭될 수 있다. 그 후, cDNA는 인간 면역글로불린의 보존적 영역에 대한 프라이머를 사용하여 증폭된다. 라이브러리에는, 뮤 이외의 서열 (예를 들어, IgG 또는 IgA)에 대해 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 뮤

이외의 이소형이 풍부해질 수 있다. 통상적으로, 증폭된 경쇄 집단은 100, 1,000, 10,000, 100,000 또는 1,000,000개 이상의 상이한 경쇄를 포함한다. 이와 유사하게, 증폭된 중쇄 집단은 100, 1,000, 10,000, 100,000 또는 1,000,000개 이상의 상이한 중쇄를 포함한다. 예를 들어, IgG 프라이머를 사용하면, 통상적으로 90, 95 또는 99% 이상의 증폭된 중쇄가 IgG 이소형이다. 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 핵산은, PCR, 또는 인간 항체의 보존적 영역에 대해 특이적인 DNA 프로브에 의한 cDNA 라이브러리 스크리닝과 같은 다양한 공지 방법에 의해 상기 언급한 하이브리도마로부터 클로닝할 수 있다. 서브클로닝될 항체쇄를 코딩하는 핵산은 인접 서열의 제한 분해에 의해 절단될 수도, 또는 코딩 서열에 인접한 부위에 대한 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭될 수도 있다. 일반적으로 문헌 [PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992)], [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, CA, 1990)], [Mattila, et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19: 967], [Eckert, et al., 1991, PCR Methods and Applications 1: 17], [PCR (eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford)]을 참조한다. 상기 참고문헌 및 그 문헌에 인용된 참고문헌은 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.

#### <170> <항체의 제조합 발현>

<171> 임의적으로 불변 영역에 연결될 수 있는, 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산은 발현 벡터 내로 삽입된다. 경쇄 및 중쇄는 동일하거나 상이한 발현 벡터 내에 클로닝 될 수 있다. 항체쇄를 코딩하는 DNA 세그먼트는 항체쇄의 발현을 가능하게 하는 발현 벡터(들)의 조절 서열과 작동가능하게 연결된다. 그러한 조절 서열에는 신호 서열, 프로모터, 인핸서 및 전사 종결 서열이 포함된다. 발현 벡터는 통상적으로 에피솜으로서 또는 숙주 염색체의 통합된 일부로서 숙주 생물체에서 복제될 수 있다.

<172> 이. 콜라이는 본 발명의 항체를 발현하기 위해 사용되는 원핵 숙주의 하나이다. 사용하기 적합한 다른 미생물 숙주에는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스균, 및 살모넬라 (*Salmonella*), 세라티아 (*Serratia*) 및 각종 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종과 같은 다른 장내세균이 포함된다. 이들 원핵 숙주에서, 숙주 세포와 상용성인 발현 조절 서열 (예를 들어, 복제 개시점) 및 조절 서열 (예를 들어, 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템 또는 파지 람다로부터의 프로모터 시스템)을 통상적으로 포함하는 발현 벡터를 제조할 수 있다.

<173> 효모와 같은 다른 미생물도 발현을 위해 사용할 수 있다. 사카로마이세스 (*Saccharomyces*)가 바람직한 숙주이며, 적합한 벡터는 필요에 따라 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 다른 해당 효소를 비롯한 프로모터와 같은 발현 조절 서열, 복제 개시점 및 종결 서열 등을 포함한다.

<174> 포유동물 조직 세포 배양액도 본 발명의 항체를 발현 및 생성하는 데 사용될 수 있다 [Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, N.Y., 1987)]. 온전한 항체를 분비할 수 있는 다수의 적합한 진핵 세포주가 개발되어 있기 때문에 진핵 세포가 바람직하다. 본 발명의 면역글로불린을 코딩하는 핵산을 발현하기 위해 적합하고 바람직한 숙주 세포에는, SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293) (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36: 59); 어린 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소-세포-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4216); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23: 243-251); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL 1587); 인간 자궁경부암 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., 1982, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-46); 및 배칼로바이러스 세포가 포함된다.

<175> 목적 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열, 및 발현 조절 서열)을 포함하는 벡터를 숙주 세포 내로 옮길 수 있다. 원핵 세포의 경우에는 염화칼슘 형질전환법이 통상적으로 이용되며, 다른 다세포 숙주의 경우에는 인산칼슘 처리 또는 전기천공법이 사용될 수 있다 (이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)] 참조). 중쇄 및 경쇄가 별개의 발현 벡터에 클로닝되는 경우, 이 벡터들을 함께 형질감염시켜 온전한 면역글로불린을 발현시키고 어셈블리할 수 있다. 제조합 DNA의 도입 후, 면역글로불린 생성물을 발현하는 세포주를 선별한다. 안정한 발현이 가능한 세포주가 바람직하다 (즉, 세포주를 50회 계대배양한 후에도 발현량이 감소되지 않는 것이 바람직함).

<176> 본 발명의 전체 항체, 항체 이량체, 개별 경쇄 및 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태가 일단 발현되면, 이들은

항산암모늄 침전법, 친화도 컬럼, 컬럼 크로마토그래피 및 겔 전기영동 등을 비롯한 표준 방법에 따라 정제될 수 있다 (일반적으로 문헌 [Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)] 참조). 약 90 내지 95% 이상의 균일성을 갖는 실질적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하며, 98 내지 99% 이상의 균일성을 갖는 것이 가장 바람직하다.

#### <키메라 항체 및 인간화 항체>

키메라 항체 및 인간화 항체는 이들 항체의 제조를 위한 출발 물질을 제공하는 마우스 또는 다른 인간 제외 동물의 항체와 그 결합 특이성 및 친화도가 동일하거나 유사하다. 키메라 항체는 중쇄 및 경쇄 유전자가, 상이한 종에 속하는 면역글로불린 유전자 세그먼트로부터 통상적으로 유전공학적 조작에 의해 제조된 항체이다. 예를 들어, 마우스 모노클로날 항체에서 유래한 유전자의 가변 (V) 세그먼트가 IgG<sub>1</sub> 및 IgG<sub>4</sub>와 같은 인간 불변 (C) 세그먼트와 결합될 수 있다. 따라서, 통상적인 키메라 항체는 마우스 항체로부터의 V 또는 항원-결합 도메인과 인간 항체로부터의 C 또는 이펙터 도메인으로 이루어진 하이브리드 단백질이다.

인간화 항체는 실질적으로 인간 항체에서 유래한 가변 영역 프레임워크 잔기 (수용체 항체라 명명함) 및 실질적으로 마우스 항체에서 유래한 상보성 결정 영역 (공여체 면역글로불린이라고 함)을 갖는다. 문헌 [Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033], WO 90/07861, 미국 특허 제5,693,762호, 동 제 5,693,761호, 동 제5,585,089호, 동 제5,530,101호 및 윈터 (Winter)의 미국 특허 제5,225,539호 (이들은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)를 참조한다. (존재하는 경우) 불변 영역(들)은 거의 또는 전적으로 인간 면역글로불린에서 유래한 것이다. 인간 가변 도메인은 대체로, CDR이 유래한 프레임워크 서열이 쥐의 가변 영역 도메인과 높은 서열 동일성을 나타내는 인간 항체로부터 선택한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 잔기는 동일한 또는 상이한 인간 항체 서열로부터 유래할 수도 있다. 인간 항체 서열은 자연 발생적인 인간 항체일 수도, 또는 몇몇 인간 항체들의 컨센서스 서열일 수도 있다. 카터 (Carter) 등의 WO 92/22653을 참조한다. 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정 아미노산을, CDR 구조 및(또는) 항원에 대한 결합에 미칠 수 있는 이들의 영향을 토대로 선택하여 치환할 수 있다. 위와 같은 가능한 영향은 모델링, 특정 위치에 있는 아미노산의 특정 조사, 또는 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이가 미치는 효과의 실험적 관찰에 의해 조사한다.

예를 들어, 특정 아미노산이 쥐 가변 영역 프레임워크 잔기와 선택된 인간 가변 영역 프레임워크 잔기 사이에서 서로 상이할 때는, 상기 아미노산이

(1) 공유결합 이외의 결합으로 항원과 직접 결합하거나,

(2) CDR 영역과 인접하거나,

(3) CDR 영역과 다른 방식으로 상호작용하거나 (예를 들어, CDR 영역 중 6개의 A 내에 있음), 또는

(4) VL-VH 경계에 존재하는 것으로 기대되는 경우, 인간 프레임워크 아미노산은 마우스 항체로부터의 동등한 프레임워크 아미노산에 의해 치환되어야 한다.

치환체의 다른 후보로는 인간 면역글로불린의 해당 위치에서 통상적이지 않은 수용체 인간 프레임워크 아미노산이 있다. 이들 아미노산은 마우스 공여체 항체의 동등한 위치의 아미노산, 또는 보다 통상적인 인간 면역글로불린의 동등한 위치의 아미노산으로 치환될 수 있다. 치환체의 다른 후보로는 인간 면역글로불린의 해당 위치에서 통상적이지 않은 수용체 인간 프레임워크 아미노산이 있다. 인간화 면역글로불린의 가변 영역 프레임워크는 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 그러한 서열의 컨센서스 서열과 대체로 85% 이상의 서열 동일성을 나타낸다.

#### <인간 항체>

특정 항원에 대해 유도된 인간 항체는 하기 설명하는 다양한 기술에 의해 제공된다. 몇몇 인간 항체는 경쟁 결합 실험에 의해 선택하며, 다른 인간 항체는 하기 실시예에 설명되는 마우스 모노클로날 항체들 중 어느 하나와 같은 특정 마우스 항체와 동일한 에피토프 특이성을 갖는다. 또한, 인간 항체는 면역원으로서 항원의 일부분만을 사용하여 특정 에피토프 특이성에 대해 스크리닝할 수 있고(있거나), 단백질 항원의 경우에는 항원의 결실 돌연변이체 집단에 대해 항체를 스크리닝할 수 있다.

#### <트리오마 (trioma) 방법>

본 방법에 사용하기 위한 기본적인 접근법 및 대표적인 세포 융합 파트너 (SPAZ-4)는 문헌 [Oestberg et al.,



1983, Hybridoma 2: 361-367], 오스트버그 (Oestberg)의 미국 특허 제4,634,664호 및 엔젤맨 (Engleman) 등의 미국 특허 제4,634,666호 (이들 각각은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다. 본 방법에 의해 얻은 항체-생성 세포주는 3종의 세포 (2종의 인간 세포 및 1종의 마우스 세포)에서 유래했기 때문에 트리오마라고 부른다. 최초에, 마우스 골수종 세포주를 인간 B-림프구와 융합시켜 항체-비생성 이종개체 (xenogenic) 하이브리드 세포 (예를 들어, 상기 오스트버그의 문헌에 기재된 SPAZ-4 세포주)를 얻는다. 그 후, 상기 이종개체 세포를 면역화 인간 B-림프구와 융합시켜 항체-생성 트리오마 세포주를 얻는다. 트리오마는 인간 세포로부터 제조된 보통의 하이브리도마보다 더 안정하게 항체를 생성하는 것으로 밝혀졌다.

<190> 트리오마는 유전자적으로 안정하지만, 이들은 항체를 매우 다량으로 생성하지 못한다. 발현량은, 상기 트리오마로부터의 항체 유전자를 1종 이상의 발현 벡터에 클로닝하고, 이 벡터를 사용하여 표준 포유동물, 박테리아 또는 효모 세포주를 형질전환시킴으로써 증가할 수 있다.

<191> <인간을 제외한 형질전환 포유동물>

<192> 다양한 항원에 대한 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 인간을 제외한 형질전환 동물로부터 생성될 수도 있다. 통상적으로 이들 면역글로불린 좌위는 실질적인 인간 서열 항체, 바람직하게는 인간 서열과 95% 이상의 동일한, 보다 바람직하게는 98 내지 99% 이상 동일한, 가장 바람직하게는 100% 동일한 항체를 코딩한다. 면역글로불린 좌위는 재배열될 수도 또는 지배열되지 않을 수도 있으며, 천연 인간 면역글로불린 좌위에 대한 결실 또는 삽입을 포함할 수 있다. 상기 좌위는 다른 종으로부터의 유전자 요소, 또는 2차 레파토리의 코딩부에 거의 기여하지 않는 비-면역 글로불린 좌위 (비-IgM)로부터의 유전자 요소 (예를 들어, 인헨서, 프로모터 및 스위치 서열과 같은 비-코딩 요소, 또는 뮤 불변 영역 유전자 세그먼트와 같은 코딩 요소)를 포함할 수 있다. 바람직한 인간 면역글로불린 좌위는, 인간을 제외한 형질전환 포유동물에서 V(D)J 연결, 중쇄 클래스 스위칭, 및 림프양 세포 및(또는) 림프양 세포 전구체의 체세포 돌연변이에 의해 소정의 항원에 대한 고친화도의 인간 항체를 생성할 수 있다. 이 형질전환 포유동물에 함유된 인간 면역글로불린 좌위는 바람직하게는 천연 인간 중쇄 및 인간 경쇄 좌위의 배열되지 않은 서열을 포함한다. 통상적으로, 그러한 형질전환 포유동물의 내생성 면역글로불린 좌위는 기능적으로 불활성화되어 있다 (미국 특허 제5,589,369호; Takeda, S. et al., 1993, EMBO J. 12: 2329-2366; Jakobovits, A., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 2551-2555; Kitamura, D. and Rajewsky, K., 1992, Nature 356: 154-156; Gu, H. et al., 1991, Cell 65: 4754; Chen, J. et al., EMBO J. 12: 821-830; Sun, W. et al., 1994, J. Immunol 152: 695-704; Chen, J. et al., 1993, Intl. Immunology 5: 647-656; Zou, X. et al., 1995, Eur. J. Immunol 25: 2154-2162; Chen, J. et al., 1993 Intl. Immunology 5: 647-656; Boudinot, P., et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25: 2499-2505; Chen, J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 4528-4532; Roes, J. and Rajewsky, K., 1991, Intl. Immunology 3: 1367-1371; Gu, H. et al., 1993, Cell 73: 1155-1164; Taki, S. et al., 1993, Science 262: 1268-71; Kitamura, D. et al., 1991, Nature 350: 423-6; Lutz, C. et al., 1998, Nature 393: 797-801; Zou, Y. et al., 1994, Current Biology 4: 1099-1103; Chen, J. et al., 1993, EMBO J. 12: 4635-4645; Serwe, M. and Sablitzky, F., 1993, EMBO J. 12: 2321-2327; Sanchez, P. et al., 1994, Intl. Immunology 6: 711-719; Zou, Y. et al., 1993, EMBO J. 12: 811-820). 내생성 면역글로불린 유전자의 불활성화는, 바람직하게는 예를 들어 표적화 상동성 재조합에 의해 달성될 수 있다. 외생성 인간 면역글로불린 좌위는 내생성 마우스 염색체와 결합할 수도, 또는 도입된 트랜스염색체에 포함될 (예를 들어, 일부이거나, 내부에 삽입되거나, 부착된 것) 수도 있다. 트랜스염색체는 비-내생성 염색체로서, 또는 1개의 센트로미어 (centromere)와 2개의 텔로미어를 갖는 염색체 단편으로서 세포 내에 도입될 수 있다. 이 트랜스염색체는 통상적으로 텔로미어 및 센트로미어 서열을 포함하며, 온전한 모 염색체에 대한 결실을 포함할 수 있다. 트랜스염색체는 또한 부가의 삽입 서열을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 제1 면역글로불린 좌위 (예를 들어, YAC 클론, 트랜스염색체 또는 온전한 염색체로부터 유래한 것)가 제2 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스염색체 내로 삽입되게 함으로써, 2개의 인간 면역글로불린 좌위를 단일 트랜스염색체로 조합할 수 있다. 또한, 이 과정을 반복하여 3개의 모든 인간 면역글로불린 좌위를 단일 트랜스염색체로 조합할 수도 있다. 2개 또는 3개의 상이한 면역글로불린 좌위를 포함하는 단일 트랜스염색체는 유전공학적으로 연결된 이들 좌위를 제공하여, 인간 항체의 제조에 유용한 형질전환 자손의 분획을 증가시킨다. 바람직한 트랜스염색체 형태로는 문헌 [Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727], [Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-143], 및 WO 97/07671, WO 98/37757 및 WO 00/10383 (이들 문헌은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 것들이 있다. 또한, 트랜스염색체는 통합된 선별가능 마커 (예를 들어, 네오마이신 내성 유전자), 및 온전한 모 염색체에서는 발견되지 않는 다른 서열들을 포함할 수도 있다. 트랜스염색체와 내생성 마우스 염색체 사이의 재조합에 있어서는, 트랜스염색체로부터의 서열이 내생성 마우스 염색체에 삽입 또는 부가된다. 트랜스염색

체는 WO 98/37757, EP 0972445 및 WO 00/10383 (이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 바와 같이 결실, 전좌 (translocation) 및 치환 등에 의해 변형될 수도 있다. 예를 들어, 트랜스염색체는 마우스 배아 간세포 (ES) 내로의 도입시 자발적으로 단편화될 수 있고, 텔로미어에 의한 말단절단 (truncation)에 의해 단편화되며(되거나) Cre/loxP 부위-지정 재조합 또는 유사한 방법에 의해 전좌될 수 있다. 그러한 재조합 또는 전좌 사건은 재조합 부위 (예를 들어, loxP 서열 등) 서열을 특이적으로 삽입함으로써 촉진될 수 있다 (Abuin, A. and Bradley, A., 1996, Mol. Cell. Biol. 16: 1851-1856; Mitani, K. et al., 1995, Somat. Cell. Mol. Genet. 21: 221-231; Li, Z. W. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 6158-6162; Smith, A.J. et al., 1995, Nat. Genet. 9: 376-385; Trinh, K R. and Morrison, S. L., 2000, J. Immunol. Methods 244: 185-193; Sunaga, S. et al., 1997, Mol. Reprod. Dev. 46: 109-113; Dymecki, S. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 6191-6196; Zou, YR. et al., 1994, Curr. Biol. 4: 1099-1103; Rudolph, U. et al., 1993, Transgenic Res. 2: 345-355; Rickert, R. C. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 1317-1318). 도입된 loxP 부위에 있어서, cre 리코비나제 (recombinase)를 코딩하는 도입유전자의 발현은 2개의 loxP 부위 사이의 재조합을 촉진할 것이다. 또한, 트랜스염색체는 상기 설명한 바와 같은 전좌의 결과로 생성된, 상이한 염색체 단편들로 구성된 융합 염색체일 수도 있다. 트랜스염색체는 자기복제형일 수 있다. 자기복제형 트랜스염색체는 내생성 마우스 염색체와는 구별되는 것이고, 내생성 마우스 염색체와 인접하지 않으며, 내생성 마우스 염색체 내로 삽입되지 않는다. 자기복제형 트랜스염색체는 자기복제를 가능하게 하는 텔로미어와 센트로미어 서열을 포함한다. 별법으로, 트랜스염색체 서열은 마우스 세포 핵으로의 도입 이후에 마우스 염색체로 전좌될 수 있다. 내생성 마우스 염색체는 19쌍의 상염색체와 X 및 Y 염색체를 포함한다.

<193>

외생성 인간 면역글로불린 좌위의 도입은, 예를 들어 1/2-일 배아 전핵의 미세주입, 배아 간세포의 형질감염, 또는 배아 간세포와 트랜스염색체-함유 효모 스페로플라스트 (spheroplast) 또는 미세핵과의 융합을 비롯한 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 상기 설명한 방법에 의해 생성된 형질전환 포유동물은 도입된 외생성 면역글로불린 성분 서열을 기능적으로 재배열할 수 있고, 내생성 면역글로불린 유전자를 발현시키지 않으면서 인간 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 다양한 이소형의 항체 레파토리를 발현할 수 있다. 이러한 특성을 지닌 포유동물의 생성 및 그 특징은, 예를 들어 론버그 (Lonberg) 등의 WO 93/12227 (1993); 미국 특허 제5,877,397호, 동 제5,874,299호, 동 제5,814,318호, 동 제5,789,650호, 동 제5,770,429호, 동 제5,661,016호, 동 제5,633,425호, 동 제5,625,126호, 동 제5,569,825호, 동 제5,545,806호, 문헌 [Nature 48: 1547-1553 (1994)], [Nature Biotechnology 14, 826 (1996)], 쿠첼라파티 (Kuchlerlapati)의 WO 91/10741 (1991), WO 94/02602 (1993), WO 96/34096 (1995), WO 96/33735 (1996), WO 98/24893 (1997), 미국 특허 제5,939,598호, 동 제6,075,181호, 동 제6,114,598호, 문헌 [Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727], [Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-143], 및 도미즈카 (Tomizuka, K.)의 WO 97/07671, WO 98/37757, WO 00/10383 및 JP 2000-42074 (이들 각 문헌은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다. 설치류와 같은 인간을 제외한 형질전환 포유동물이 특히 적합하다. 모노클로날 항체는, 예를 들어 통상적인 콜러-밀스타인 (Kohler-Milstein) 기술을 이용하여 그러한 포유동물로부터의 B 세포를 적합한 무한증식 세포주와 융합시킴으로써 제조할 수 있다. 또한, 모노클로날 항체는 V 영역의 PCR 증폭을 이용하여 각각의 B 세포로부터 직접 제조하거나 배지로부터 단리할 수 있다 (Schrader et al., 1997, 미국 특허 제5,627,052호). 별법으로, FACS에 의해 분류되거나 다른 방법에 의해 B 세포가 풍부화된 제제를, V 영역 서열의 PCR 증폭을 위한 RNA 또는 DNA의 공급원으로서 사용할 수 있다. 파지 디스플레이 방법 (phage display method; 하기 설명)도 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 면역화 형질전환 마우스로부터 인간 항체 서열을 수득하는 데 이용될 수 있다. 이들 방법에 의해 수득된 인간 항체 V 영역 서열은, 이후에 원래 모 항체의 결합 특성을 보유하는 온전한 항체의 생성에 사용될 수 있다. 이 방법을 하기 설명한다.

<194>

#### <파지 디스플레이 방법>

<195>

인간 항체를 수득하는 다른 방법은 문헌 [Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281]에 약속된 일반적인 프로토콜에 따라 B 세포로부터 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 것이다. 그러한 B 세포는 원하는 항원이나 그의 단편, 또는 상기 항원 또는 그 단편 또는 항-유전자형 항체를 함유하는 긴 폴리펩티드로 면역화된 인간으로부터 수득할 수 있다. 임의로는, 그러한 B 세포는 항원에 노출된 적이 없는 개체로부터 얻을 수 있다. 또한, B 세포는 인간 면역글로불린 서열을 발현하는 인간을 제외한 형질전환 동물로부터 얻을 수도 있다. 인간을 제외한 형질전환 동물은 항원 또는 항원들의 집단으로 면역화될 수 있다. 또한, 이 동물은 면역화되지 않을 수도 있다. 인간 항체를 코딩하는 B 세포 mRNA 서열은 역전사효소를 사용한 cDNA 생성에 이용된다. cDNA 서열의 V 영역 코딩 단편은 이후에 항체 V 영역의 발현을 유도하는 DNA 벡터에 클로닝된다. 통상적으로, V 영역 서열은 클로닝 이전에 PCR에 의해 특이적으로 증폭된다. 또한, 통상적으로 V 영역 서열은 V 영역이 융합 단백질로서

발현되도록 구성된 DNA 벡터 내의 특정 부위에 클로닝된다. 그러한 융합 단백질의 예로는 m13 대장균 분해 파지 (coliphage) 유전자 3 및 유전자 8 융합 단백질이 있다. 코딩된 V 영역 서열들의 집단은 이후에 항체 V 영역의 발현 라이브러리 생성에 사용된다. 발현 라이브러리를 생성하기 위해, 클로닝된 V 영역 서열을 포함하는 DNA 벡터를 사용하여 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 형질전환시킨다. V 영역 이외에도, 상기 벡터는 바이러스 게놈의 전부 또는 일부를 임의적으로 코딩할 수 있고, 또한 바이러스 패키징 서열을 포함할 수도 있다. 몇몇 경우, 상기 벡터는 전체 바이러스 게놈을 포함하지 않고, 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 DNA 서열과 함께 사용된다. 발현된 항체 V 영역은 형질전환된 세포 내에서 또는 세포의 표면에서, 또는 형질전환된 세포로부터의 바이러스 입자에서 발견된다. 세포 또는 바이러스 입자를 포함하는 상기 발현 라이브러리는, 이후에 소정의 항원과 반응하는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 V 영역 서열의 확인에 사용된다. 상기 V 영역 서열을 확인하기 위해, 발현 라이브러리를 스크리닝하여 소정의 항원과 발현된 V 영역의 반응성에 대해 선별한다. 클로닝된 V 영역 서열을 포함하고 발현된 V 영역을 갖는 세포 또는 바이러스 입자는 소정의 항원과 반응 (예를 들어, 결합 또는 촉매 활성)하는 V 영역을 갖는 세포 또는 바이러스 입자를 확인하거나 이를 풍부화시키는 방법에 의해 스크리닝 또는 선별된다. 예를 들어, 발현된 V 영역에 결합하는 방사선 또는 형광 표지 항원은 검출될 수 있고, 이는 세포 또는 바이러스 입자를 확인하거나 분류하는 데 사용될 수 있다. 또한, 고체 매트릭스 또는 비드에 결합된 항원을 사용하여 표면에 반응성 V 영역을 갖는 세포 또는 바이러스 입자를 선별할 수 있다. 이와 같이 발현 라이브러리로부터 확인된 V 영역 서열은 형질전환된 숙주 세포에서 소정의 항원과 반응하는 항체 또는 그 단편의 직접 발현에 사용될 수 있다. 휴스 (Huse)에 의해 기재된 프로토콜을 파지 디스플레이 기술과 병용하면 보다 효율적이다. 예를 들어, 다우어 (Dower) 등의 WO 91/17271, 및 맥카퍼티 (McCafferty) 등의 WO 92/01047, 미국 특허 제5,871,907호, 동 제5,858,657호, 동 제5,837,242호, 동 제5,733,743호 및 동 제5,565,332호 (이들 각각은 이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)를 참조할 수 있다. 상기 방법에서, 파지의 라이브러리가 생성되는데, 이 라이브러리의 구성원 (디스플레이 패키지)은 그들의 외부 표면에 상이한 항체들을 디스플레이한다. 항체는 대체로 Fv 또는 Fab 단편으로서 디스플레이된다. 원하는 특이성을 지닌 항체를 디스플레이하는 파지는 항원 또는 그의 단편에 대한 친화도의 증가에 의해 선별할 수 있다. 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는, 인간을 제외한 면역화된 형질전환 포유동물과 파지 디스플레이를 병용하면, 항원에 대한 면역 반응이 약한 경우에도 항원-특이적 항체를 얻을 수 있다.

<196> 파지 디스플레이 방법의 변형법으로, 선택된 쥐 항체의 결합 특이성을 지닌 인간 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 윈터 (Winter)의 WO 92/20791을 참조할 수 있다. 이 방법에서는, 선택된 쥐 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 출발 물질로서 사용한다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역이 출발 물질로서 선택되는 경우, 파지 라이브러리는 라이브러리의 구성원이 동일한 경쇄 가변 영역 (즉, 쥐의 출발 물질) 및 상이한 중쇄 가변 영역을 디스플레이 하도록 구성된다. 중쇄 가변 영역은 재배열된 인간 중쇄 가변 영역의 라이브러리로부터 취득된다. CTLA-4에 대해 강력한 특이적 결합 (예를 들어,  $10^8 \text{ M}^{-1}$  이상, 바람직하게는  $10^9 \text{ M}^{-1}$  이상)을 나타내는 파지를 선택한다. 그 후, 상기 파지로부터의 인간 중쇄 가변 영역을 출발 물질로서 사용하여 추가의 파지 라이브러리를 구성한다. 이 라이브러리에서, 각 파지는 동일한 중쇄 가변 영역 (즉, 제1 디스플레이 라이브러리로부터 확인된 영역) 및 상이한 경쇄 가변 영역을 디스플레이한다. 경쇄 가변 영역은 재배열된 인간 가변 경쇄 영역의 라이브러리로부터 취득된다. 다시, 선택된 단백질에 강력한 특이적 결합을 나타내는 파지를 선택한다. 인간 항체와 유사한 인공 항체는, 예를 들어 CDR 영역에서의 랜덤 (random) 또는 합성 서열을 혼입시킨 파지 디스플레이 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

#### <197> <불변 영역의 선별>

<198> 키메라, 인간화 또는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 적어도 일부분의 인간 불변 영역과 연결될 수 있다 (문헌 [Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033] 및 WO 90/07861 참조; 이들 문헌 및 그 문헌에 인용된 참고문헌은 이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 불변 영역은, 항체 의존성 보체 및(또는) 세포 매개의 독성이 필요한지의 여부에 부분적으로 의존하여 선택한다. 예를 들어, 이소형 IgG<sub>1</sub> 및 IgG<sub>3</sub>은 대체로 이소형 IgG<sub>2</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>보다 큰 보체 결합 활성을 갖는다. 이소형의 선택은 또한 뇌로 항체가 통과하는 것에 영향을 미칠 수도 있다. 경쇄 불변 영역은 램다 또는 카파일 수 있다. 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는 4량체로서, 별개의 중쇄로서, 별개의 경쇄로서, Fab로서, Fab'으로서, F(ab')<sub>2</sub>로서, Fv로서, 또는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 스페이서를 통해 연결된 단일쇄 항체로서 발현될 수 있다.

<199> 몇몇 경우에 있어서는 비-IgG 항체가 유용할 수도 있다. 예를 들어, 다가 항체 복합체가 필요한 경우, IgM 및



IgA 항체가 사용될 수 있다.

## <200> <온전한 항체를 발현하기 위한 부분 항체 서열의 이용>

<201> 항체는, 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 위치하는 아미노산 잔기를 통해 주로 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은, 각 항체들 사이에서 CDR 이외의 서열보다 더욱 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 지닌 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열에 이식된 자연 발생의 특정 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구성함으로써, 자연 발생의 특정 항체가 지닌 특징을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다 (Riechmann, L. et al., 1988, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). 그러한 프레임워크 서열은 생식세포주 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 이들 생식세포주 서열은, 이들이 B 세포 성숙시 V(D)J 연결에 의해 형성된 어셈블리 가변 영역을 전부 포함하지 않기 때문에 성숙 항체 유전자 서열과 다를 것이다. 생식세포주 유전자 서열은 체세포 돌연변이로 인해 고친화도의 2차 레파토리 항체의 각 뉴클레오타이드 서열과도 다를 것이다. 그러나, 체세포 돌연변이는 가변 영역에 균등하게 분포하지 않는다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노-말단부 및 프레임워크 영역 4의 카르복시-말단부에는 비교적 적게 나타난다. 더욱이, 많은 체세포 돌연변이가 항체의 결합 특성을 유의하게 변화시키지는 않는다. 이러한 이유로, 원래의 항체와 유사한 결합 특성을 지닌 온전한 재조합 항체를 재생성하기 위해서는 특정 항체의 전체 DNA 서열을 얻어야 한다 (이 거명을 통해 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는, 1999년 3월 12일 출원된 PCT/US99/05535 참조). CDR 영역을 포함하는 부분 중쇄 및 경쇄 서열은 통상적으로 상기 목적에 충분하다. 상기 부분 서열을 사용하여, 어느 생식세포주 가변 유전자 및 연결 유전자 세그먼트가 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는지 결정할 수 있다. 생식세포주 서열은 그 후에 가변 영역의 결실부를 채워넣는 데 사용된다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙시 절단되어 최종 항체의 특성에 기여하지 않는다. 이러한 이유로, 발현 작제물을 위해서 상응하는 생식세포주 리더 서열을 사용할 필요가 없다. 결실 서열을 부가하기 위해서는, 라이게이션 또는 PCR 증폭에 의해 클로닝된 cDNA 서열을 합성 올리고뉴클레오타이드와 조합할 수 있다. 별법으로, 전체 가변 영역을 한 세트의 짧은 중복 올리고뉴클레오타이드로서 합성하여, PCR 증폭에 의해 조합함으로써, 전체 합성 가변 영역 클론을 생성할 수 있다. 이 방법은, 특정 제한 부위의 제거 또는 포함, 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 특정 이점이 있다.

<202> 하이브리도마에서 유래한 중쇄 및 경쇄 전사체의 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 중복된 세트의 합성 올리고뉴클레오타이드를 디자인함으로써 천연 서열과 동일한 아미노산 코딩 능력을 지닌 합성 V 서열을 생성하였다. 상기 합성 중쇄 및 카파 경쇄 서열은 하기 3가지 방식으로 천연 서열과 상이할 수 있다: 반복된 뉴클레오타이드 염기 가닥이 올리고뉴클레오타이드의 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 하기 위해 중단됨; 코작 (Kozak)의 규칙 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870)에 따라 최적 번역 개시 부위가 혼입됨; 및 HindIII 부위가 번역 개시 부위 상류에 도입됨.

<203> 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다에 있어서, 최적화된 코딩 가닥 서열 및 이에 상응하는 비-코딩 가닥 서열은 30 내지 50개의 뉴클레오타이드 세그먼트로 절단되어, 코딩 가닥 서열의 뉴클레오타이드 사이에서의 상기 절단물이 상응하는 비-코딩 올리고뉴클레오타이드의 대략 중앙 부근에 나타나게 된다. 따라서, 각각의 쇄에서 올리고뉴클레오타이드는 원하는 서열을 완전히 포함하는, 중복된 이중 가닥 세트에 어셈블리될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 혼합되어 풀 (pool)을 이루며, 150 내지 400개의 뉴클레오타이드 세그먼트를 포함한다. 그 후, 상기 풀을 주형으로 사용하여 150 내지 400 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 생성물을 제조한다. 통상적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오타이드 세트는 2개의 풀로 나누어질 것이며, 이들은 별도로 증폭되어 2개의 중복 PCR 생성물을 만들어 낸다. 이들 중복 생성물은 그 후에 PCR 증폭에 의해 조합되어 완전한 가변 영역을 형성한다. 또한, 발현 벡터 작제물로의 클로닝을 용이하게 하는 단편을 생성하기 위해서는 PCR 증폭에서 중쇄 또는 경쇄 불변 영역 (카파 경쇄의 Bbs I 부위 또는 감마 중쇄의 Age I 부위 포함)의 중복 단편을 포함하는 것이 바람직할 수도 있다.

<204> 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 그 후에 클로닝 프로모터, 번역 개시 서열, 불변 영역 서열, 3' 비번역 서열, 폴리아데닐화 서열 및 전사 종결 서열과 조합되어 발현 벡터 작제물을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 작제물은 단일 벡터로 조합되어, 숙주 세포 내로 동시 형질감염되거나 순차적으로 형질감염되거나, 또는 각 숙주 세포에 개별적으로 형질감염 (그 후에 융합되어 상기 2개의 쇄를 발현하는 숙주 세포를 형성함)될 수 있다.

<205> 인간 IgG<sub>K</sub>에 대한 발현 벡터의 구성에 사용되는 플라스미드는 하기 기재되어 있다. 이 플라스미드는 PCR 증폭



된 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중쇄 및 경쇄 미니유전자 (minigene)를 재구성하는 데 사용될 수 있다. 이들 플라스미드는 완전한 인간 항체, 키메라 IgG<sub>1</sub>k 항체 또는 IgG<sub>4</sub>k 항체를 발현하는 데 사용될 수도 있다. 유사한 플라스미드가 다른 중쇄 이소형의 발현을 위해 제조될 수도 있으며, 또한 람다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 제조될 수도 있다.

<206> 카파 경쇄 플라스미드인 하기 pCK7-96 (서열 1)은 카파 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하되, 개시 메티오닌의 상류 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머로 증폭된 상기 카파 서열이 HindIII 및 Bbs I 으로 분해되어, HindIII 및 Bbs I 으로 분해된 pCK7-96으로 클로닝됨으로써 폴리아데닐화 부위를 갖는 완전한 경쇄 코딩 서열을 재구성하도록 포함된다. 이 카세트는 HindIII/Not I 단편으로서 단리되어 전사 프로모터 서열에 라이게이션됨으로써 세포 내로의 형질감염을 위한 기능적 미니유전자를 생성할 수 있다.

<207> 감마1 중쇄 플라스미드인 pCG7-96 (서열 2)은 인간 감마1 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하되, 개시 메티오닌의 상류 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머로 증폭된 상기 감마 서열이 HindIII 및 Age I 으로 분해되어, HindIII 및 Age I 으로 분해된 pCG7-96으로 클로닝됨으로써 폴리아데닐화 부위를 갖는 완전한 감마1 중쇄 코딩 서열을 재구성하도록 포함된다. 이 카세트는 HindIII/Sal I 단편으로서 단리되어 전사 프로모터 서열에 라이게이션됨으로써 세포 내로의 형질감염을 위한 기능적 미니유전자를 생성할 수 있다.

<208> 감마4 중쇄 플라스미드인 pG4HE (서열 3)는 인간 감마4 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하되, 개시 메티오닌의 상류 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머로 증폭된 상기 감마 서열이 HindIII 및 Age I 으로 분해되어, HindIII 및 Age I 으로 분해된 pG4HE으로 클로닝됨으로써 폴리아데닐화 부위를 갖는 완전한 감마4 중쇄 코딩 서열을 재구성하도록 포함된다. 이 카세트는 HindIII/EcoR I 단편으로서 단리되어 전사 프로모터 서열에 라이게이션됨으로써 세포 내로의 형질감염을 위한 기능적 미니유전자를 생성할 수 있다.

<209> 다수의 상이한 프로모터 (CMV, 유비퀴틴, SRalpha 및 베타-액틴 프로모터 등이 포함됨)가 재구성된 중쇄 및 경쇄 유전자의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터 pCDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 HindIII와 Not I, Xho I 또는 EcoR I 으로 (각각 카파, 감마1 또는 감마4 카세트와의 라이게이션을 위해) 절단하여, 포유동물 세포에 직접 형질감염될 수 있는 발현 벡터를 형성할 수 있다.

pCK7-96 ( 서열 1 )

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC  
AGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA  
TGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC  
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA  
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG  
TTCGACCGCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT  
TCTCATAGCTCAGGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAGCTGGGCTG  
TGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGT  
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA  
GCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACACGGCTACACTAG  
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA  
GCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAG  
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC  
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTGTGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA  
CCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT  
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG  
TTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT  
CTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCA  
ATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCAT  
CCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACA  
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTC  
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT  
TAGCTCCTTCGGGCTCCGATCGTTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATG  
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT  
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC  
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAA  
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAA  
CCCACTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGC  
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATAC  
TCATACTCTTCTTTTCAATATTAATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA  
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAA  
AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA  
TCACGAGGCGCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCGAG  
CTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGG  
CGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTG  
TACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGC  
ATCAGGCGCCATTCCGCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTC  
TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGC  
CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCGGCCGCGGTC  
CAACCACCAATCTCAAAGCTTGTACCCGGGAGCCTGTTATCCAGCACAGTCTGGAAGAG  
GCACAGGGGAAATAAAGCGGACGAGGCTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCCTGGTCTTCTTC  
AGACCTGTTCTGAATTTAAACTCTGAGGGGGTTCGATGACGTGGCCATTCTTTGCTTAAAG  
CATTGAGTTTACTGCAAGGTGAGAAAAGCATGCAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAGAGCTC  
CAACAAAACAATTTAGAATTTTAAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAAACAT  
CAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTT  
TCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACACACCCCAAGGGCAGAACTTT  
GTTACTTAAACACCATCTGTTTGTCTTCTCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTT  
CATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA

<210>

ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT  
 AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC  
 CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATC  
 AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGC  
 CCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACCCCTCCCATCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTC  
 CACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTACCTCACCCCTCCTCCT  
 CCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCT  
 GTGGTTTCTCTCTTCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCACTACTCAATTTCT  
 TCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTATATAAAATCATCCT  
 TCATTCTATTTTACCCCTATCATCTCTGCAAGACAGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCT  
 GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGAATTGTAATC  
 ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAG  
 CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG  
 TTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCTGTGTCAGCTGCATTAAATGAATCGG  
 CCAACGCGCGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGC

pCG7-96 ( 서열 2 )

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGA  
 GGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCATGAGCCAGAC  
 ACTGGACGCTGAACCTCGCGACAGTTAAGAACCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCT  
 CTGTCCACACCCGCGTACATGGCACCACTCTCTTGAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
 TCTTCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGGTGCCTG  
 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGG  
 CGTGACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA  
 CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
 AACACCAAGGTGGACAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGG  
 AAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGACGCCCCAGTCCAGGGCAGC  
 AAGGCAGGCCCGCTCTGCCTCTTCAACCGGAGGCTCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGA  
 GAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAG  
 GCCTTGACACAAAGGGGAGGTGTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGAC  
 CTTGCCCTGACCTAAGCCCCACCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCT  
 TCTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTGACAGAGCCAAATCTTGTGACA  
 AAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGG  
 CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGT  
 CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC  
 CCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGA  
 CGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA  
 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTC  
 ACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC  
 CCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGCAG  
 GGCCACATGGACAGAGGCCGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAAC  
 CTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATG  
 AGCTGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC  
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAGACACGCTCCCGTGTCT  
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  
 AGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAG  
 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCGGGGCTC  
 TCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCAGCAT  
 GGAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTCTTTCCACGGG  
 TCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACA

CTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCC  
TCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGG  
CCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACAGCCCTGCCTCTGTAGGAGACTG  
TCCTGTTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAG  
GTCCGACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGG  
TCTCCCTATAGTGAGTGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGC  
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTC  
GCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGT  
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC  
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA  
TCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG  
CGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATAC  
CTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCT  
CAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCG  
ACCGCTCGCTTATCCGTTAATCTCGTCTTGAATCCAACCCGTTAAGACACGACTTATCG  
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA  
GTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACGAGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTC  
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC  
GCTGGTAGCGTGGTTTTTTTGTTCGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA  
AGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCAGTTAAG  
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGA  
AGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT  
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG  
TCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCG  
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGA  
GGCAGAAAGTGGTCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTGCGGGGAG  
CTAGAGTAAGTAGTTCCGCACTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  
GTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTTCCCAACGATCAAGGCG  
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG  
TCAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT  
ACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG  
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC  
CACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCA  
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTC  
AGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA  
AAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAT  
TGAAGCATTTATCAGGGTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA  
TAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA  
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGT  
TTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT  
GTAAGCGGATCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTG  
GGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATA  
TTGTCTGTAGAACCGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACATACGATTTAG  
GTGACACTATA

pG4HE ( 서열 3 )

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAG  
GGGGCTAAGGTGACGAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCAATGCCCATGAGCCAGACA  
CTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCC  
AGCTCTGTCCACACCGCGGTCAATGGCACCACTCTCTTGCAAGTTCACCAAGGGCCCA

TCCGTCCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG  
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA  
GCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC  
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGTGGTGAAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG  
CTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCTCTGCTGGACGACCCCGGCTGTGACGCCCCAGCCAGGG  
CAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCTCACCAGGAGGCTCTGACCACCCACTCATGCTCA  
GGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGAGCCACAGGCTGGATGCCCTAC  
CCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGAGGTGTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGG  
AGGACCTGCCCTGACCTAAGCCACCCAAAGGCCAACTCTCACTCCCTCAGCTCAGA  
CACCTTCTCTCTCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGACAGTCCAAATATGG  
TCCCCATGCCCATCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCTCGCCCTCAGCTCAAGGCGGG  
ACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTTGCATCCAGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCAC  
CTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAA  
AACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGACGTG  
AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC  
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTTCAACG  
TCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTC  
CCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCGAGGGCC  
ACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCT  
GTCCCTACAGGCGAGCCCGGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCAGGAGGAGAT  
GACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCG  
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAGACACCGCTCCCGTGTGGAC  
TCCGACGGCTCTCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGG  
GAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCTGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCGGGCTCTCGG  
GGTCCGCGCAGGATGCTTGGCAGGTACCCCGTCTACATACTTCCAGGCACCCAGCATGGAA  
ATAAAGCACCCACCTCTTCTCTTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGG  
GCCGAGTCTGAGGCCGTGAGTACATGAGGAGGCAGAGCGGTCCCACTGTCCCCACTGG  
CCCAGGCTGTGCGAGGTGTCTGGGCCACCTAGGCTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGG  
CAGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGTGCCTGGGCTGGGCCAC  
GGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACAGCCCTGCTCTGAGGAGACTGTCTCT  
GTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCCCCCATGCCACTCGGGGGGATCCCGGGTACCGA  
GCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCTGATTAATTTCCG  
ATAAGCCAGGTAACTTAACTTAAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGGCTAT  
TGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGTTCGGCTGCGGCGAG  
CGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACCGAGGA  
AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCCGCGTTGCTGGC  
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT  
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC  
TCTCCTGTTCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCCCTCGGGAGCGT  
GGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC  
TGGGCTGTGTGACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGGCTTATCCGGTAACTATCGT  
CTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT  
TAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT  
ACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGA  
GTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTGTGTTTGCAA  
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGT  
CTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGG  
ATCTTCCACTAGATCTTTTAAATTAATAAGTTTTAAATCAATCTAAGATATATATGA  
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC

<213>

TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC  
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATT  
ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCACTTTATCCG  
CCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT  
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGTCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGC  
TTCAATTCAGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA  
AAGCGTTAGCTCTTTCGCTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCA  
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTCTACTGTCTGCTATCCGTAAGATGCTTTTC  
TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAITCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT  
CTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATC  
ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC  
GATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTCACCGAGCTTTCTG  
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT  
TGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT  
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTTC  
CCCCAAAAGTGCCACCTGAGCTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACCTATAAAAAAT  
AGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACA  
CATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC  
GTCAGGGCGCGTCAAGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAG  
CAGATTGTAAGTGTGAGAGTGCACCATATGGACATATGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATA  
CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACATATA

<214>

<215>

# <제조합 항체의 발현>

<216>

키메라, 인간화 또는 인간 항체는 통상적으로 재조합 발현에 의해 제조된다. 재조합 폴리뉴클레오타이드 작제물을 통상적으로 자연적으로 결합된 또는 이중 프로모터 영역을 비롯하여 항체쇄의 코딩 서열과 작동가능하게 연



결된 발현 조절 서열을 포함한다. 바람직하게는, 발현 조절 서열은 진핵 숙주 세포의 형질전환 또는 형질 감염이 가능한 벡터 중의 진핵 프로모터 시스템이다. 벡터가 일단 적당한 숙주 내로 혼입되면, 이 숙주는 높은 수준으로 뉴클레오티드 서열을 발현하고 교차반응하는 항체를 수거 및 정제하기에 적합한 조건 하에 유지된다.

<217> 이들 발현 벡터는 통상적으로 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 생물체 내에서 복제 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 선별 마커, 예를 들어 앰피실린-내성 또는 하이그로마이신-내성 마커를 함유하기 때문에, 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출이 가능하다.

<218> 이. 콜라이 (*E. coli*)는 본 발명의 DNA 서열을 클로닝하는 데 특히 유용한 원핵 숙주의 하나이다. 효모와 같은 미생물도 발현에 유용하다. 필요에 따라 발현 조절 서열, 복제 개시점 및 종결 서열 등을 갖는 적합한 벡터가 포함된 사카로마이세스가 바람직한 효모 숙주이다. 통상적인 프로모터에는 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 기타 해당 효소가 포함된다. 유도가능한 효모 프로모터에는 특히, 알콜 데히드로게나제, 이소시토크롬 C, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소들로부터의 프로모터가 포함된다.

<219> 포유동물 세포는 면역글로불린 또는 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 세그먼트의 발현에 바람직한 숙주이다. 문헌 [FROM GENES TO CLONES, (VCH Publishers, NY, 1987)]을 참조할 수 있다. 온전한 이중 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적합한 세포주가 당업계에 개발되어 있고, 여기에는 CHO 세포주, 각종 COS 세포주, HeLa 세포 및 골수종 세포주가 포함된다. 바람직하게는, 상기 세포가 인간을 제외한 동물의 세포이다. 이들 세포용 발현 벡터는 복제 개시점, 프로모터 및 인핸서 (Queen et al., 1986, Immunol. Rev. 89: 49)를 포함할 수 있고, 또한 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결 서열과 같은 필수 프로세싱 정보 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 발현 조절 서열로는 내생성 유전자, 사이토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스 및 소 파필로마바이러스 등으로부터 유래한 프로모터가 있다 (Co et al., 1992, J. Immunol. 148: 1149).

<220> 별법으로 항체 코딩 서열은, 형질전환 동물의 게놈 내로의 도입 이후에 형질전환 동물의 모유에서의 발현을 위한 도입 유전자에 혼입될 수 있다 (미국 특허 제5,741,957호, 동 제5,304,489호 및 동 제5,849,992호 참조). 적합한 도입유전자에는, 카세인 또는 베타 락토글로불린과 같은 유선 특이적 유전자로부터의 프로모터 및 인핸서와 작동가능하게 연결된 경쇄 및(또는) 중쇄 코딩 서열이 포함된다.

<221> 목적 DNA 세그먼트를 함유하는 벡터는 숙주 세포의 유형에 따라 공지의 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 예를 들어, 염화칼슘 형질감염이 원핵 세포에 통상적으로 이용되고, 인산칼슘 처리, 전기천공법, 리포펙션법, 바이올리스틱스 (biolistics) 또는 바이러스-기재의 형질감염이 다른 숙주 세포에 이용될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키는 데 이용되는 다른 방법에는 폴리브렌, 프로토플라스트 융합, 리포솜, 전기천공법 및 미세주입 (일반적으로, 상기 Sambrook 등의 문헌 참조)을 이용하는 것이 포함된다. 형질전환 동물의 제조에 있어서, 도입유전자는 수정란에 미세주입되거나, 또는 배아 간세포의 게놈 내로 혼입될 수 있으며, 그러한 세포의 핵은 적출된 난모세포에 이식된다.

<222> 일단 발현되면, 항체는 HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피 및 겔 전기영동 등을 비롯한 당업계 표준 방법에 따라 정제될 수 있다 (일반적으로 문헌 [Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)] 참조).

#### <223> <변형 항체>

<224> 본 발명에는 변형 항체도 포함된다. 용어 "변형 항체"에는, 예를 들어 항체의 일부를 결실, 부가 또는 치환함으로써 변형된 모노클로날 항체, 키메라 항체 및 인간화 항체와 같은 항체가 포함된다. 예를 들어, 항체는 불변 영역을 결실시키고 이를 반감기 (예를 들어, 항체의 혈청 반감기, 안정성 또는 친화도)가 증가된 불변 영역으로 치환함으로써 변형될 수 있다.

<225> 본 발명의 항체 접합체 (conjugate)를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 개질시키거나 소정의 생물학적 반응 (예를 들어, 이펙터 세포의 수집)을 생성할 수 있다. 약물 부분은 전통적인 화학 치료제로 제한하여 해석되는 것은 아니다. 예를 들어, 약물 부분은 원하는 생물학적 활성을 지닌 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질에는, 예를 들어 아브린 (abrin), 리신 (recin) A, 슈도모나스 내독소 또는 디프테리아 독소와 같은 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 활성 단편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-알파와 같은 단백질; 또는 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF") 또는 기타 성장 인자와 같은 생물학적 반응 개질 인자가 포함된다.

<226> 그러한 치료제 부분을 항체에 접합시키는 기술은 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal

Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)], [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)], [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)], ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)] 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)]을 참조할 수 있다.

#### <227> <처리 방법>

본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된 1종 이상의 모노클로날 항체 (온전한 항체 또는 그의 결합 단편) 조합 제제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 몇몇 조성물은 본 발명에 기재된 다수의 (예를 들어, 2종 이상의) 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 조합 제제를 포함한다. 몇몇 조성물에 있어서, 본 발명에 기재된 각각의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 항원의 미리 선택된 별개 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체 또는 인간 서열 항체이다.

예방 용도에 있어서, 제약 조성물 또는 의약품 질환 또는 증상 (즉, 면역성 질환)에 걸릴 가능성이 높거나 걸릴 위험이 있는 환자에게, 그러한 위험을 제거하거나 감소시키고, 증상의 심각성을 감소시키고, 또는 질환의 발병 (질환의 생화학적, 조직학적 및(또는) 행태학적 증상, 그의 합병증, 및 질환 발전시 나타나는 병리학적 중간 형질을 포함)을 지연시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료 용도에 있어서, 조성물 또는 의약품 질환이 의심되거나 이미 질환에 걸린 환자에게, 질환의 합병증 또는 질환의 발전시 나타나는 병리학적 중간 형질을 비롯한 질환의 증상 (생화학적, 조직학적 및(또는) 행태학적 증상)을 치유하거나, 적어도 부분적으로 제어하기에 충분한 양으로 투여된다. 치료 또는 예방 목적에 적합한 양은 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 정의된다. 상기 예방 방법 및 치료법 둘 다에 있어서, 약제는 통상적으로 충분한 면역 반응이 달성될 때까지 수차례 투여된다. 통상적으로, 면역 반응을 모니터링하고, 면역 반응이 약해지기 시작하는 경우에 반복 투여한다.

#### <230> <유효량>

본 발명 조성물의 면역-관련 증상 및 질환 (하기 기재됨)의 치료를 위한 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태, 환자가 인간인지 동물인지의 여부, 함께 투여되는 다른 의약품, 및 처치가 예방 목적인지 치료 목적인지의 여부를 비롯한 무수한 인자에 따라 달라진다. 통상적으로, 환자는 인간이지만, 형질전환 포유동물과 같은 인간을 제외한 포유동물도 처치될 수 있다. 처치량은 안전성 및 효능이 최적화되도록 적정할 필요가 있다.

항체를 투여하는 경우, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 통상적으로는 0.001 내지 5 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 체중 1 kg 당 1 mg 또는 체중 1 kg 당 10 mg이거나, 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위 내일 수 있다. 대표적인 치료법에는 매 2주 마다, 매일, 또는 매 3 내지 6개월 마다 1회 투여하는 것이 있다. 몇몇 방법에서는 상이한 결합 특이성을 갖는 2종 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되며, 이러한 경우에는 각 항체의 투여량이 지정된 범위 내에 있다. 항체는 통상적으로 다수회 투여된다. 각 투여 사이의 간격은 1주일, 1개월 또는 1년일 수 있다. 또한, 투여 간격은 환자에서 항체의 혈액 농도를 측정함으로써 불규칙적으로 지정할 수도 있다. 몇몇 방법에서는, 혈장 항체 농도가 1 내지 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록, 그리고 몇몇 방법에서는 25 내지 300  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 투여량이 조정된다. 별법으로, 항체는 서방성 제제로서 투여될 수 있으며, 이 경우 보다 낮은 빈도로 항체를 투여할 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 환자에서의 항체 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 인간화 항체, 키메라 항체 및 인간 제외 동물 항체가 그 다음으로 긴 반감기를 나타낸다. 투여량 및 투여 빈도는 처치가 예방 목적인지 치료 목적인지의 여부에 따라 달라질 수 있다. 치료 용도에 있어서는, 보다 긴 기간에 걸쳐 비교적 낮은 빈도로 비교적 낮은 투여량이 투여된다. 몇몇 환자는 그들의 나머지 일생동안 치료를 계속 받아야 한다. 치료 용도에 있어서는, 질환의 진전이 감소 또는 종결되고, 바람직하게는 환자가 부분적인 또는 완전한 증상 완화를 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 투여된다. 그 후, 환자는 예방법에 따라 처치될 수 있다.

면역원을 코딩하는 핵산의 투여량은 환자 당 약 10 ng 내지 1 g, 100 ng 내지 100 mg, 1  $\mu\text{g}$  내지 10 mg, 또는 30 내지 300  $\mu\text{g}$ 의 범위이다. 감염성 바이러스 벡터의 투여량은 투여 단위 당 10 내지 100개의 비리온 (virion)으로 달라진다.

- <234> <투여 경로>
- <235> 면역 반응을 유도하기 위한 제제는 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개골내, 복막내, 비강내 또는 근육내 수단에 의해 예방 및(또는) 치료 목적으로 투여될 수 있다. 면역원성 제제의 가장 통상적인 투여 경로는 피하를 통한 것이며, 다른 경로들도 균등하게 효과적일 수 있다. 그 다음으로 가장 통상적인 경로는 근육내 주사이다. 이 유형의 주사는 팔 또는 다리 근육에서 통상적으로 수행한다. 몇몇 방법에서, 약제는 이 약제가 축적되는 특정 조직 내에 직접 주사 (예를 들어, 두개골내)된다. 근육내 주사 또는 정맥내 관주가 항체의 투여에 바람직하다. 몇몇 방법에서, 특정 치료 항체는 두개골 내에 직접 주사된다. 몇몇 방법에서, 항체는 서방성 조성물 또는 장치 (예를 들어, 메디패드 (상표명, Medipad) 장치)로서 투여된다.
- <236> 본 발명의 약제는, 임의로는 다양한 면역 관련 질환을 비롯한 각종 질환의 치료에 적어도 부분적으로 효과적인 약제와 조합하여 투여될 수 있다. 뇌에 아밀로이드가 축적되는 알츠하이머 질환 및 다운증후군의 경우, 본 발명의 약제는 혈뇌 장벽 (blood-brain barrier; BBB)을 통한 본 발명 약제의 통과율을 증가시키는 다른 약제와 함께 투여될 수 있다.
- <237> <제제화>
- <238> 본 발명의 약제는 대체로 활성 치료제 및 제약상 허용되는 다양한 기타 성분들을 포함하는 제약 조성물로서 투여된다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)]을 참조할 수 있다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료 용도에 의존적이다. 또한 본 발명의 조성물은, 원하는 제형에 따라 제약상 허용되는 무독성 담체 또는 희석제 (동물 또는 인간 투여용 제약 조성물의 제제화에 통상적으로 사용되는 비히클로서 정의됨)를 포함할 수 있다. 희석제는 조합 제제의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 것을 선택한다. 그러한 희석제의 예로는, 증류수, 생리적 인산염-완충 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 헵크 용액 (Hank's solution)이 있다. 또한, 제약 조성물 또는 제약 제제는 다른 담체, 보조제 또는 무독성의 비치료용 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- <239> 또한, 제약 조성물은 단백질, 다당류, 예를 들어 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체 (예를 들어, 라텍스 관능화 세파로스 (상표명, latex functionalized sepharose), 아가로스 및 셀룰로스 등), 중합성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 지질 응집체 (예를 들어, 오일 액적 또는 리포솜)와 같은, 크기가 크고 서서히 대사되는 거대분자를 포함할 수 있다. 또한, 이들 담체는 면역자극제 (즉, 면역보강제)로서 작용할 수도 있다.
- <240> 비경구 투여의 경우 본 발명의 약제는, 물, 오일, 염수, 글리세롤 또는 에탄올과 같은 멸균 액체일 수 있는 제약 담체와 함께 생리적으로 허용되는 희석제 중의 용액 또는 현탁액으로 된 주사가 가능한 투여제로서 투여될 수 있다. 또한, 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 제약 조성물의 다른 성분은 동물 기원, 식물 기원 또는 합성된 식유, 예를 들어 땅콩 오일, 대두유 및 미네랄 오일이다. 일반적으로, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 바람직한 액체 담체이며, 주사가 가능 용액에 특히 바람직하다. 항체는 활성 성분의 서방형 방출을 가능하게 하는 방식으로 제제화된 데포 (depot) 주사제 또는 이식 제제의 형태로 투여될 수 있다. 대표적인 조성물은, 50 mM L-히스티딘 및 150 mM NaCl (HCl을 사용하여 pH 6.0으로 조정함)로 구성된 완충 수용액 중에 제제화된 모노클로날 항체 5 mg/ml을 포함한다.
- <241> 통상적으로, 조성물은 주사가 가능한, 수용액으로서 또는 현탁액으로서 제제화되거나, 주사 직전에 액체 비히클 중의 용액 또는 현탁액으로 재구성되는 고체 형태로 제제화될 수 있다. 상기 제제는 또한 상기 논의한 바와 같이 면역보강 효과가 증진된 폴리락티드, 폴리글리콜리드 또는 공중합체와 같은 리포솜 또는 미세 입자 내에 유화 또는 캡슐화될 수도 있다 (문헌 [Langer, 1990, Science 249: 1527] 및 [Hanes, 1997, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119] 참조). 본 발명의 약제는 활성 성분의 서방형 방출 또는 맥박에 따른 방출을 가능하게 하는 방식으로 제제화된 데포 주사제 또는 이식 제제의 형태로 투여될 수 있다.
- <242> 다른 투여 방식에 적합한 추가의 제제로는 경구 제제, 비강내 제제, 폐 제제, 좌약 및 경피용 제제가 있다.
- <243> 좌약의 경우, 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드와 같은 결합제 및 담체가 포함되고, 그러한 좌약은 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1% 내지 2% 범위의 활성 성분을 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구 제제는 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스 및 탄산마그네슘과 같은 부형제를 포함한다. 이들 조성물은 용액제, 현탁액제, 정제, 환약, 캡슐제, 서방성 제제 또는 분말제의 형태를 취할 수 있으며, 활성 성분을 10% 내지 95%, 바람직하게는 25% 내지 70% 함유한다.



- <244> 국소 투여 용도는 경피 또는 피부내 전달을 초래할 수 있다. 국소 투여는 콜레라 독소 또는 그의 무독화 유도체 또는 서브유닛, 또는 유사한 다른 박테리아 독소를 본 발명의 약제와 동시 투여함으로써 촉진될 수 있다 (Glenn et al., 1998, Nature 391: 851). 동시 투여는, 성분들을 혼합물로 사용함으로써, 또는 성분들을 화학적 가교결합이나 융합 단백질로서의 발현에 의해 얻은 연결 분자들로서 사용함으로써 달성할 수 있다.
- <245> 별법으로, 경피 전달은 피부 패취제 또는 트랜스페로솜 (transferosome)를 사용함으로써 달성할 수 있다 (Paul et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24; Cevc et al., 1998, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15).
- <246> 제약 조성물은 일반적으로 멸균되고 실질적으로 등장성이며 미국 FDA (Food and Drug Administration)의 모든 GMP (Good Manufacturing Practice) 규정을 완전히 충족하는 것으로서 제제화된다.
- <247> <독성>
- <248> 바람직하게는, 본원에 기재된 단백질의 치료 유효량은 실질적으로 독성을 유발하지 않으면서 치료상의 이점을 제공할 것이다.
- <249> 본원에 기재된 단백질의 독성은 세포 배양액에서 또는 실험 동물에서, 예를 들어 LD<sub>50</sub> (집단의 50%에 치사작용을 나타내는 투여량) 또는 LD<sub>100</sub> (집단의 100%에 치사작용을 나타내는 투여량)을 측정함으로써 표준 제약 방법에 의해 측정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 투여량이 치료 인덱스이다. 세포 배양 분석법 및 동물 연구로부터 얻은 데이터를 이용하여 인간에 사용시 무독성인 투여량 범위를 결정한다. 본원에 기재된 단백질의 투여량은 독성이 거의 없거나 전혀 없는 유효량을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있는 것이 바람직하다. 투여량은 이용된 투여 형태 및 이용된 투여 경로에 의존하여 상기 범위 내에서 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 기초로 각 내과의사가 선택할 수 있다 (Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p.1).
- <250> <키트>
- <251> 또한, 본 발명의 범위 내에는 본 발명의 조성물 (예를 들어, 모노클로날 항체, 인간 서열 항체, 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자) 및 그 사용 지침을 포함하는 키트가 포함된다. 상기 키트는 1종 이상의 부가 시약, 또는 본 발명의 부가 인간 항체 1종 이상 (예를 들어, 제1 인간 항체와는 다른 항원 에피토프에 결합하는 보체 활성을 지닌 인간 항체)을 더 함유할 수 있다. 키트에는 통상적으로 키트 내용물의 의도된 용도를 지시하는 라벨 (label)이 포함된다. 용어 "라벨"은 키트의 표면에 공급되거나 키트와 함께 공급되는, 또는 키트에 동봉되는 임의의 문서 또는 기록 물질을 포함한다.

## 실시예

- <252> <실시예 1>
- <253> Cmu 표적화된 마우스의 생성
- <254> CMD 표적화 벡터의 제작. 플라스미드 pICEmu는 mu 유전자를 포함하는 쥐 Ig 중쇄 좌위의 EcoR I /Xho I 단편을 함유하는데, 이는 Balb/C 계놈 람다 파지 라이브러리 (Marcu et al., 1980, Cell 22: 187)에서 얻었다. 이 계놈 단편을 플라스미드 pICEMI9H의 Xho I /EcoR I 부위에 서브클로닝하였다 (Marsh et al., 1984, Gene 32: 481-485). pICEmu에 포함된 중쇄 서열은 인트론 인헨서의 바로 3'에 위치한 EcoR I 부위의 하류로 확장되어, mu 유전자의 마지막 막횡단 엑손의 하류 약 1 kb에 위치한 Xho I 부위까지 이르렀지만, 이. 콜라이에서의 계대배양에 의해 대부분의 mu 스위치 반복 영역이 결실되었다.
- <255> 표적화 벡터는 하기와 같이 제작하였다 (도 1 참조). 1.3 kb의 HindIII/Sma I 단편을 pICEmu로부터 절단해내고, HindIII/Sma I으로 분해된 pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)에 서브클로닝하였다. 이 pICEmu 단편을 Cmu1의 5' 약 1 kb에 위치한 HindIII 부위에서부터 Cmu1 내에 위치한 Sma I 부위까지 확장되었다. 결과의 플라스미드를 Sma I /Spe I으로 분해하고, Cmu1 3'의 Sma I 부위에서부터 마지막 Cmu 엑손의 바로 하류에 위치한 Xba I 부위까지 확장된 pICEmu로부터의 약 4 kb Sma I /Xba I 단편을 삽입하였다. 결과의 플라스미드인 pTAR1을 Sma I 부위에서 선형화시키고, neo 발현 카세트를 삽입하였다. 이 카세트는 마우스 포스포글레세레이트 키나아제 (pgk) 프로모터 (Xba I /Taq I 단편; Adra et al., 1987, Gene 60: 65-74)의 전사 조절 하에 있으며 pgk 폴리아데닐화 부위 (PvuII/HindIII 단편; Boer et al., 1990, Biochemical Genetics 28: 299-308)를 함유하는 neo 유전자로 구성되어 있다. 이 카세트는 neo 카세트가 EcoR I /HindIII 단편으로서 절개된 플라스미드 pKJ1 (Tybulewicz et al., 1991, Cell 65: 1153-1163)으로부터 얻어, EcoR I /HindIII로 분해된 pGEM-7Zf(+)로 서브클

로닝하여 pGEM-7 (KJ1)을 생성하였다. neo 카세트는 pGEM-7 (KJ1)로부터 EcoR I /Sal I 분해에 의해 절개되었고, 평활말단을 생성한 후, 게놈 Cmu 서열의 반대 방향으로 플라스미드 pTAR1의 Sma I 부위에 서브클로닝하였다. 결과의 플라스미드를 Not I 으로 선형화하고, 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 (tk) 카세트를 삽입하여 문헌 [Mansour et al., 1988, Nature 336: 348-352]에 기재된 바와 같이 상동성 재조합체를 포함하는 ES 클론이 풍부화되도록 하였다. 이 카세트는 문헌 [Tybulewicz et al., 1991, Cell 65: 1153-1163]에 기재된 바와 같이 마우스 pgk 프로모터와 폴리아데닐화 부위가 일괄적으로 포함된 tk 유전자의 코딩 서열로 이루어져 있다. 결과의 CMD 표적화 벡터는 중쇄 좌위에 대해 대략 총 5.3 kb의 상동체를 함유하며, 제1 Cmu 엑손의 유일한 Sma I 부위에 neo 발현 카세트가 삽입된 돌연변이 mu 유전자를 생성하도록 디자인되어 있다. 상기 표적화 벡터를 플라스미드 서열 내에서 절단되는 Pvu I 으로 선형화한 후, 전기천공법에 의해 ES 세포 내로 도입하였다.

<256> 표적화 ES 세포의 생성 및 분석. AB-1 ES 세포 (McMahon, A. P. and Bradley, A., 1990, Cell 62: 1073-1085)를, 본질적으로는 문헌 [Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford, IRL Press, p.71-112]에 기재된 바와 같이 유사분열 불활성화 SNL76/7 세포 공급층 (상게서) 상에서 배양하였다. 선형화된 CMD 표적화 벡터를 문헌 [Hasty, P. R. et al., 1991, Nature 350: 243-246]에 기재된 방법에 의해 전기천공법으로 AB-1 세포 내에 도입하였다. 전기천공법에 의해 도입된 세포를 1 내지  $2 \times 10^6$  세포/접시의 밀도로 100 mm 접시에 플레이팅하였다. 24시간 후, G418 (활성 성분 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 FIAU ( $5 \times 10^7$  M)를 배지에 첨가하고, 8 내지 9일에 걸쳐 약물-내성 클론이 증식하도록 하였다. 클론을 골라내어, 트립신 처리한 후, 2개의 부분으로 나누어 추가로 증식시켰다. 각 클론으로부터 유래한 세포의 절반을 냉동시키고, 나머지 절반을 사용하여 벡터와 표적 서열 사이의 상동성 재조합에 대해 분석하였다.

<257> DNA 분석은 서던 블롯 혼성화에 의해 수행하였다. 문헌 [Laird, P. W. et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19: 4293]에 기재된 바와 같이 DNA를 상기 클론들로부터 단리하였다. 단리된 게놈 DNA를 Spe I 으로 분해하고, mu 인트론 인헨서와 mu 스위치 영역 사이의 서열에 혼성화되는 915 pb의 Sac I 단편인 프로브 A로 탐침하였다 (도 1). 프로브 A는 야생형 좌위로부터의 9.9 kb의 Spe I 단편과, CMD 표적화 벡터 (Spe I 부위를 함유하는 neo 발현 카세트)와 상동성 재조합된 mu 좌위로부터의 특징적인 7.6 kb 밴드를 검출하였다. 서던 블롯 분석에 의해 스크리닝된 1132개의 G418 및 FIAU 내성 클론들 중에서, 3개가 mu 좌위에서의 상동성 재조합을 의미하는 7.6 kb의 Spe I 밴드를 나타냈다. 이들 3개의 클론을 효소 Bgl I, BstX I 및 EcoR I 으로 추가 분해하여 벡터가 mu 유전자 내로 상동성 통합되었음을 확인하였다. 프로브 A와 혼성화시, Bgl I, BstX I 또는 EcoR I 으로 분해된 야생형 DNA의 서던 블롯은 각각 15.7, 7.3 및 12.5 kb의 단편을 생성하였고, 표적화된 mu 대립유전자의 존재는 각각 7.7, 6.6 및 14.3 kb의 단편에 의해 확인되었다. Spe I 분해에 의해 검출된 상기 3개의 클론 모두는 neo 카세트의 Cmu1 엑손으로의 삽입을 특징적으로 나타내는, 예상된 Bgl I, BstX I 및 EcoR I 제한 단편을 보여주었다.

<258> 돌연변이 mu 유전자를 포함하는 마우스의 생성. 264, 272 및 408이라는 번호로 지정된, 표적화된 3개의 ES 클론을 해동시키고, 문헌 [Bradley, A., 1987, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151]에 기재된 바와 같이 C57BL/6J 배반포 내에 주입시켰다. 주입된 배반포를 가임신된 암컷의 자궁에 이식하여, 주입된 ES 세포 및 숙주 배반포로부터 유래한 세포 혼합물로 대표되는 키메라 마우스를 생성하였다. 상기 키메라에 ES 세포가 기여하는 정도는, 흑색 C57BL/6J 배경 상에서 ES 세포주로부터 유래한 어구티 코트 (agouti coat)의 착색량에 의해 시각적으로 평가할 수 있다. 클론 272 및 408은 낮은 비율의 키메라만을 생성 (즉, 낮은 비율의 안료 생성)하였지만, 클론 264는 높은 비율의 수컷 키메라를 생성하였다. 이들 키메라를 C57BL/6J 암컷과 교배하여, ES 세포 게놈의 생식세포주 전이를 의미하는 어구티 자손을 생성하였다. 꼬리 생검체 (tail biopsy)로부터의 Bgl I 분해 DNA의 서던 블롯 분석에 의해 표적화된 mu 유전자에 대한 스크리닝을 수행하였다 (상기 ES 세포 DNA 분석에 대해 기재된 것과 같음). 대략 50%의 어구티 자손이 15.7 kb의 야생형 밴드 이외에 7.7 kb의 혼성화 Bgl I 밴드를 나타냈는데, 이는 표적화된 mu 유전자의 생식세포주 전이를 입증하는 것이다.

<259> mu 유전자의 기능적 불활성화에 대한 형질전환 마우스의 분석. neo 카세트의 Cmu1로의 삽입이 Ig 중쇄 유전자를 불활성화시켰는지 여부를 결정하기 위해, 클론 264 키메라를 JHD 돌연변이에 대해 동형접합성인 마우스 (JH 유전자 단편의 결실로 인해 중쇄 발현이 불활성화됨; Chen et al., 1993, Immunol. 5: 647-656)와 교배하였다. 4마리의 어구티 자손이 생성되었다. 1개월령의 이들 동물로부터 혈청을 채취하여, 쥐 IgM의 존재에 대해 ELISA

로 분석하였다. 4마리의 자손 중 2마리에서 IgM이 완전히 결손되어 있었다 (표 A). 4마리 동물의 꼬리 생검체로부터의 DNA를 Bgl I 으로 분해하고 프로브 A로 혼성화시킨 서던 블롯, 및 Stu I 으로 분해하고 475 bp의 EcoR I /Stu I 단편 (상게서)으로 혼성화시킨 서던 블롯 분석에 의한 유전자형 분류는, 혈청 IgM을 발현하지 않는 동물이, 중쇄 좌위의 대립유전자 중 하나는 JHD 돌연변이를 포함하고 다른 대립유전자들은 Cmu1 돌연변이를 포함하는 동물임을 입증하였다. JHD 돌연변이에 대해 동형접합성인 마우스는 야생형 수준의 혈청 Ig 농도를 나타냈다. 이들 데이터는 Cmu1 돌연변이가 mu 유전자의 발현을 불활성화시킴을 입증하는 것이다.

## 표 A

<260>

마우스	혈청 IgM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ig H쇄 유전자형
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	CMD/JHD

<261>

표 A는 CMD 및 JHD 돌연변이 둘 다를 포함하는 (CMD/JHD) 마우스, JHD 돌연변이에 대해 동형접합성인 마우스 (+/JHD), 야생형 (129Sv x C57BL/6J) F1 마우스 (+/+) 및 JHD 돌연변이에 대해 동형접합성인 B 세포 결핍 마우스에 대해 ELISA로 검출한 혈청 IgM의 농도를 보여준다.

<262>

## <실시예 2>

<263>

## 인간 카파 경쇄 도입유전자 KCo5

<264>

인간 카파 경쇄 형질전환 마우스 세포주인 KCo5-9272의 생성은 KCo5에 대해 기존에 알려져 있다 (Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14, 845-851; 미국 특허 제5,770,429호의 실시예 38). 이 세포주는 인공 인간  $\kappa$  경쇄 좌위와, 다수의 인간 V 카파 세그먼트를 포함하는 YAC 클론을 함께 주입함으로써 생성되었다. YAC 클론 DNA는, 인간 V 카파 좌위 (ICRF YAC 라이브러리 번호 4x17E1)의 일부를 포함하는 450 kb의 효모 인공 염색체 (YAC)가 함유된 효모 균주로부터 단리하였다. YAC DNA로부터 증폭된 V 유전자 세그먼트의 DNA 서열 분석에 의해, 이 클론이 대략 32종의 상이한 V 카파 세그먼트를 비롯한 인간 말단 V 카파 영역의 실질적인 부분을 포함함을 입증하였다. 상기 클론의 상이한 단리체에 대한 분석도 그러한 결과를 확인해 주었으며 (Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191: 173-181), 또한 이 클론이 인간 카파 좌위 C 반수체형 (말단 V 클로스터의 5' 부분이 인접 V 클러스터의 상동성 영역과 유사함)의 한 예임을 입증해 주었다. 따라서, 5' O 패밀리의 V 유전자 세그먼트는 상동성인 인접 Op 패밀리의 V 세그먼트에 대한 서열과 근접해 있다.

<265>

배아 전핵으로의 미세주입을 위한 정제된 YAC DNA를 얻기 위해, 전체 게놈 DNA를 아가로스 겔 상에서 크기에 따라 분획화하였다. YAC 4x17E1을 함유한 효모 세포를 아가로스 중에 매몰시켜 세포를 용해한 후, 펄스 필드 (pulse field) 겔 전기영동에 의해 효모 염색체 DNA로부터 YAC DNA를 분리하고, 이를 단리한 다음에 1/2일 된 배아 전핵 내에 미세주입하였다.

<266>

게놈 DNA의 서던 블롯 분석은 인간 VkA10 유전자 (Cox, J. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827-836; Schable, K. & Zachau, H., 1993, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 1001-1022)가 KCo5-9272 마우스 내로 혼입되었음을 입증하였다. V 카파 01의 5' 영역에 특이적인 프로브 (m217-1, 진뱅크 X76071; AB129, ccacccataaacactgattc (서열 4); AB130, ttgatgcacacctaccagggc (서열 5)) 및 V 카파 L24와 L25 사이의 고유 영역에 특이적인 프로브 (m138-13, 진뱅크 X72824; AB127, cctgccttacagtgtgttag (서열 6); AB128, ggacagcaacaggacatggg (서열 7))를 사용한 PCR 분석 (Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191: 173-181)은, YAC 클론 4x17E1로부터 유래한 V 카파 클러스터의 5' 및 3' 영역이 KCo5-9272 도입유전자에 통합되어 포함되어 있음을 입증하였다. KCo5-9272 계통의 마우스를 이후에 인간 중쇄-형질전환 내생성 면역글로불린 좌위 돌연변이체 마우스와 교배하여, 중쇄 및 카파 경쇄 좌위의 붕괴에 대해 동형접합성인 마우스, 및 인간 중쇄 도입유전자인 HC2 또는 HCo7 (미국 특허 제5,770,429호) 및 인간 카파 경쇄 도입유전자 KCo5에 대해 반-접합성 또는 동형접합성인 마우스를 얻었다. 내생성 중쇄 및 카파 경쇄 좌위의 붕괴에 대해 동형접합성인 동물, 및 인간 중쇄 및  $\kappa$  경쇄 도입유전자에 대해 반-접합성 또는 동형접합성인 동물을 이중 형질전환/이중 결실 마우스라

고 한다.

<267> KCo5 이중 형질전환/이중 결실 마우스, 또는 이들 동물에서 생성된 하이브리도마로부터 직접 유래한 cDNA 클론의 DNA 서열 분석의 결과, L6, A27, O12, O4/O14, A10, L15, L18, L19 및 L24의 V 카파 유전자의 발현이 밝혀졌다.

<268> <실시예 3>

<269> **잡종 교배**

<270> 인간 중쇄 좌위 함유 염색체 14번 단편 hCF(SC20) 및 인간 카파 경쇄 도입유전자를, 잡종 교배에 의해 단일 세포주 내에 조합시켰다. hCF(SC20) 형질전환 마우스 세포주는 내생성 중쇄 좌위 (CM2D) 및 내생성 카파 경쇄 (CKD)의 불활성화 돌연변이에 대해 동형접합성이었다. 이 세포주는 또한  $\lambda 1$  (low) 돌연변이 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)에 대해 동형접합성이었다. CM2D 돌연변이는 Cmu2, Cmu3-Cmu4, 및 Mmu1 및 Mmu2 부분에 해당하는 3.7 kb의 BamHI-XhoI 단편이 결실되어 있다. CKD 돌연변이는 C 카파 엑손에 해당하는 2 kb의 SacII-BglII 단편이 결실되어 있다. 상기 2가지 돌연변이는 기존에 보고되어 있다 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727). 이들 마우스를 KCo5-9272 인간 카파 도입유전자 삽입에 대해 동형접합성인 마우스, 및 내생성 중쇄 및 카파 경쇄 좌위의 CMD 및 JKD 붕괴에 대해 각각 동형접합성인 마우스와 교배하였다. CMD 돌연변이는 상기 실시예 1에 기재되어 있다. JKD 돌연변이는 미국 특허 제5,770,429호 및 문헌 [Chen et al., 1993, EMBO J. 12: 821-830]에 기재되어 있다. 이들 교배로부터 얻은 hCF(SC20) 트랜스염색체에 대해 양성 반응을 나타내는 자손 (SC20/KCo5 마우스, 또는 잡종 교배된 마우스)은 상이한 6종의 유전자 변형 (SC20, KCo5, CMD, CM2D, JKD 및 CKD)에 대해 반-접합성이다. 그러나, 내생성 중쇄 좌위의 CMD 및 CM2D 돌연변이는 마우스  $\mu$  유전자의 발현을 방해하고 내생성 카파 좌위의 JKD 및 CKD 돌연변이는 마우스 카파의 발현을 방해하기 때문에, 이들 SC20/KCo5 마우스는 이들 각 2개의 좌위의 붕괴에 대해 동형접합성이다. 따라서, 상기 마우스는 카파 경쇄를 함유하는 항체의 발현에 대해 SC20 및 KCo5 도입유전자에 의존적이다. 또한, 이들은 내생성 마우스 람다 경쇄 좌위가 기능성인 채로 남아있기 때문에 하이브리드 인간/마우스 항체를 형성할 수도 있다. 또한, 상기 마우스는 인간 중쇄 V 영역 및 마우스 비- $\mu$  중쇄 이소형 불변 영역 서열을 포함하는 키메라 인간/마우스 항체를 발현할 수도 있다. 이들 키메라 항체는 클래스 스위칭에 의한 인간 SC20 IgH 좌위의 마우스 IgH 좌위로의 염색체 전좌에 의해 형성될 수 있다. 그러한 "트랜스-스위칭 (trans-switching)" 사건은 미니-좌위 중쇄 도입유전자를 함유하는 마우스에서 나타나는 것으로 기존에 밝혀졌다 (Taylor, L. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 579-591). 40마리의 수컷 KCo5/CMD/JKD 마우스와 98마리의 암컷 hCF(SC20)/CM2D/CKD 마우스 사이의 잡종 교배 결과, 305마리의 자손이 생성되었다. 상기 자손들로부터 채취한 혈청 샘플의 ELISA 분석 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727) 결과, 305마리 중 125 마리 (41%)의 자손이 인간 Ig $\mu$ 에 발현에 대해 양성 반응을 나타냈다. 인간 Ig $\kappa$ 를 검출하는 추가 분석에 의해 모든 h $\mu$ -양성 개체가 또한 h $\kappa$ -양성임이 밝혀졌는데, 이는 KCo5 도입유전자의 보유를 나타내는 것이다 (실시예 2 참조). hCF(SC20)의 검출을 위한 D14S1419 및 D14S1420 프라이머 쌍을 사용한 꼬리 DNA의 PCR 분석 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727) 결과, 모든 h $\mu$ -양성 개체가 hCF(SC20)을 보유하고 모든 h $\mu$ -음성 개체가 hCF(SC20)에 대해 음성임이 밝혀졌다. 암컷 hCF(SC20)/CM2D/CKD로부터의 hCF(SC20) 전이 효율 (41%)은 기존에 보고된 데이터 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)와 일치하였다.

<271> <실시예 4>

<272> **잡종 교배된 마우스의 혈청에서 인간 Ig의 발현**

<273> 6 내지 12주령의 잡종 교배 마우스로부터 채취한 혈청 샘플을 ELISA에 의해 조사하여 인간 Ig $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$  및 마우스  $\lambda$ 쇄의 농도를 측정하였다 (도 2). 유사한 조건 하에서 유지된, 내생성 C $\mu$  결실에 대해 반-접합성인 마우스와 비교시, 인간 Ig $\mu$  및 Ig $\gamma$ 의 평균 농도는 각각 마우스  $\mu$ 쇄 농도 (273 mg/l)보다 높았으며 마우스  $\gamma$ 쇄 농도 (590 mg/l)의 1/3이었다. 이들 중쇄 발현량은 이중-Tc/이중-KO 마우스 (hCF(SC20)/hCF(2-W23)/CM2D/CKD; Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)의 발현량과 유사하였다. 수컷과 암컷 잡종 교배 마우스의 교배에 의해 생성된 F2 자손의 1/4은, 제1 세대의 잡종 교배 마우스가 m $\lambda$ C1 ( $\lambda$  low) 돌연변이에 대해 이형접합성이었기 때문에, 상기 돌연변이에 대해 동형접합성일 것으로 기대되었다. 문헌 [Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727]에 기재된 바와 같이, 21마리의 F2 잡종 교배 마우스에서 ELISA에 의해 인간 Ig $\kappa$  및 마우스 Ig $\lambda$  경쇄의 혈청 농도를 측정하였다. 조사된 21마리의 마우스 중에서, 6마리의 마우스가 낮은 (<0.1) 마우스  $\lambda$ /인간  $\kappa$  비율을 나타냈는데, 이는  $\lambda$  low 돌연변이



(Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 97: 722-727)에 대해 동형접합성인 마우스의 특징이다. 따라서, 이들 6마리의 잡종 교배 마우스는  $\lambda$  (low) 돌연변이에 대해 동형접합성이며, 이는 인간 Ig 중쇄 및  $\kappa$  경쇄가 포함된 항체를 분비하는 하이브리도마의 효율적인 제조에 유용할 수 있다.

#### <실시예 5>

#### 항-인간 CD4 인간 모노클로날 항체의 제조

항원의 면역화. 잡종 교배 마우스 및 이중-Tc/KO 마우스 (n=5)에게 0일째에 프로인트 완전 면역보강제 (Sigma) 중의 가용성 인간 CD4 (sCD4) 100  $\mu$ g을 피하 주사하여 면역화시킨 후, 프로인트 불완전 면역보강제 (Sigma) 중에서 9, 19 및 27일째에 추가로 면역화시켰다. 37일째에 PBS 중의 sCD4 40  $\mu$ g을 최종 정맥내 주사하였다.

마우스에서의 체액성 반응. 혈청을 0, 16, 26, 34 및 40일째에 채취하였다. 항원-특이적 인간 Ig $\gamma$  및 Ig $\kappa$ 를 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)으로 모노클로날 항체 (MAb)의 생성에 대해 측정하였다. ELISA에 대한 상세한 프로토콜은 실시예 4에 기재되어 있다. 항원-특이적 플레이트를 중탄산염 완충액 (Sigma) 중의 항원 1  $\mu$ g/ml로 밤새 코팅하였다. 항원에 대해 특이적인 인간 모노클로날 IgG 중 하나를 표준으로 사용하여 항원-특이적 Ig $\gamma$  및 Ig $\kappa$ 를 정량하였다. 그 결과를 도 3, 4, 5 및 6에 나타내었다. 인간 감마 및 카파 반응은 잡종 교배 마우스 및 이중-Tc/이중-KO 마우스에서의 면역화 개시 후 34일째에 관찰하였다.

하이브리도마의 생성. 40일째에, 면역화 마우스로부터의 비장세포를 Sp2/0-Ag14 세포와 융합시켰다. 이 세포 현탁액을, 각 웰 당 20,000개의 비장 세포가 포함되도록 384-웰 플레이트에 접종하였다. sCD4에 대한 모노클로날 항체 (MAb)의 생성 여부를 기준으로 상기와 같이 생성된 하이브리도마를 스크리닝하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

CD4 모노클로날 항체의 제조		
	잡종 교배	이중-Tc/KO
콜로니가 포함된 웰의 수	1265	720
항원-특이적 h $\gamma$ /h $\kappa$ 양성 웰의 수	18	4
항원-특이적 h $\gamma$ /m $\lambda$ 양성 웰의 수	0	0
서브클로닝된 모 웰의 수	14	1
서브클로닝 효율 (%)	88	21

잡종 교배 마우스로부터의 모 하이브리도마를 2회의 제한 회석에 의해 높은 효율로 서브클로닝하였다. 잡종 교배 마우스로부터의 모든 하이브리도마는 인간  $\gamma$ /인간  $\kappa$  항-CD4 MAb를 분비하였고, 인간  $\gamma$ /쥐  $\lambda$  항-CD4 MAb를 분비하는 하이브리도마는 없었다. 이들 데이터는 잡종 교배 마우스가 항원-특이적 인간 모노클로날 항체의 제조에 있어서 이중-Tc/KO 세포주보다 우월하다는 것을 의미한다. 서브클로닝된 이들 하이브리도마에 의해 분비된 MAb의 이소형을 다수회의 ELISA에 의해 추가로 조사하였다. 7개의 웰은 h $\gamma$ 1<sup>+</sup>였고, 7개의 웰은 h $\gamma$ 4<sup>+</sup>였다.

소규모 배양액에서 항-CD4 인간 IgG $\gamma$ 1 모노클로날 항체의 성장 곡선 및 분비량. 항-CD4 인간 IgG $\gamma$ 1 $\kappa$ 를 생성하는 하이브리도마 클론들 중 하나 (KM2-3)를 사용하여 소규모 배양액에서 인간 모노클로날 항체의 성장 곡선 및 분비량을 측정하였다. 0일째에, KM2-3 하이브리도마 세포를 4개의 스피너 (spinner) 플라스크 (Bellco)에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포/ml의 농도로 시딩하였다. ITS-X (Gibco BRL) 및 1%의 낮은 농도의 IgG 혈청 (Hyclone)이 보충된 ERDF 배지 1 리터를 배양에 사용하였다. 매일 배지 1 ml를 수거하여, 문헌 [Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727]에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 세포의 수 및 IgG $\gamma$ 1 $\kappa$  농도를 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 추정된 생성물은 24.6 pg/세포/일이었으며, 이는 동일 조건 하에서 우수한 쥐 하이브리도마에 대해 예상된 것과 유사한 범위 내에 있는 값이다.

#### <실시예 6>

#### 항-인간 G-CSF 인간 모노클로날 항체의 제조

항원의 면역화. 잡종 교배 마우스 및 이중-Tc/KO 마우스 (n=5)에게 0, 9, 19 및 27일째에 타이터맥스골드



(TiterMaxGold) 면역보강제 (CytRx) 중의 가용성 인간 G-CSF 100  $\mu\text{g}$ 을 피하 주사하여 면역화시켰다. 37일째에, 잡종 교배 마우스 및 이중-Tc/KO 마우스에게 PBS 중의 G-CSF 20  $\mu\text{g}$ 을 최종 정맥내 주사하였다.

<285> 각 마우스 세포주에서의 체액성 반응. 혈청을 0, 16, 26, 34 및 40일째에 채취하였다. 항원-특이적 인간 Ig들의 농도를 ELISA에 의해 정량하였다. 항원-특이적 플레이트를 중탄산염 완충액 (Sigma) 중의 항원 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 밤새 코팅하였다. G-CSF에 대해 특이적인 인간 모노클로날 Ig 중 하나를 표준으로 사용하여 항원-특이적 Ig  $\gamma$  및 Ig  $\kappa$ 를 정량하였다. 그 결과를 도 8, 9, 10 및 11에 나타내었다. 잡종 교배 마우스의 항원에서의 항원-특이적 h  $\gamma$  및 h  $\kappa$  농도는 이중-Tc/KO 마우스의 약 10배였다.

<286> 하이브리도마의 생성. 40일째에, 면역화 마우스로부터의 비장세포를 Sp2/0-Ag14 세포와 융합시키고, 상기와 같이 생성된 하이브리도마를 G-CSF에 대한 모노클로날 항체 (MAb)의 생성에 대해 ELISA로 스크리닝하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	G-CSF 모노클로날 항체의 제조	
	잡종 교배	이중-Tc/KO
콜로니가 포함된 웰의 수	3880	1580
항원-특이적 h $\gamma$ /h $\kappa$ 양성 웰의 수	13	3
항원-특이적 h $\gamma$ /m $\lambda$ 양성 웰의 수	13	0
서브클로닝된 모 웰의 수	11	2
서브클로닝 효율 (%)	83	64

<288> 항-G-CSF IgG를 생성하는 하이브리도마의 절반이 인간  $\gamma$ /인간  $\kappa$  항-G-CSF MAb를 분비하였고, 나머지 하이브리도마는 인간  $\gamma$ /쥐  $\lambda$  항-G-CSF MAb를 분비하였다. h  $\gamma$ /h  $\kappa$  항체를 생성하는 하이브리도마를 2회의 제한 회식에 의해 서브클로닝하였다. 추가의 ELISA 실험에 의해, 5, 3 및 3 웰이 각각 h  $\gamma$  1<sup>+</sup>, h  $\gamma$  2<sup>+</sup> 및 h  $\gamma$  4<sup>+</sup>임을 입증하였다.

#### <289> <실시예 7>

#### <290> 항-인간 혈청 알부민 인간 모노클로날 항체의 제조

<291> 잡종 교배 마우스에게 0일째에 프로인트 완전 면역보강제 (Sigma) 중의 인간 혈청 알부민 50  $\mu\text{g}$ 을 복막내 주사하여 면역화시킨 후, 프로인트 불완전 면역보강제 (Sigma) 중에서 7, 14 및 21일째에 추가로 면역화시켰다.

<292> 하이브리도마의 생성. 24일째에, 면역화 마우스로부터의 비장세포를 Sp2/0-Ag14 세포와 융합시키고, 상기와 같이 생성된 하이브리도마를 항원에 대한 모노클로날 항체 (MAb)의 생성에 대해 ELISA로 스크리닝하였다. 항-알부민 h  $\gamma$ 를 생성하는 하이브리도마 중에서 10개의 하이브리도마를 무작위적으로 선택하여 서브클로닝하였다. 모든 하이브리도마가 인간  $\gamma$ /인간  $\kappa$  항-알부민을 분비하였다. 이들 데이터는, 이중-Tc/이중-KO 마우스로부터 얻은 항-알부민 IgG 하이브리도마의 2/3가 m  $\lambda$  1<sup>+</sup>였기 때문에, 잡종 교배 마우스가 완전한 항원-특이적 인간 모노클로날 항체의 제조에 있어서 이중-Tc/이중-KO 마우스보다 우월하다는 것을 의미한다 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727).

#### <293> <실시예 8>

#### <294> 항-인간 CTLA-4 모노클로날 항체의 제조

<295> 항원. 인간 CTLA-4 및 쥐 CD3  $\zeta$  유전자로부터의 서열을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 DNA 세그먼트를, 합성 올리고뉴클레오타이드를 연결하여 cDNA 클론의 PCR 증폭에 의해 제조하였다. 코딩된 융합 단백질은 하기 서열들을 함유한다: i) 인간 CTLA-4 코딩 아미노산 1 내지 190 (신호 펩티드, 인간 CTLA-4의 세포외 도메인 및 인간 CTLA-4의 추정 막횡단 서열의 전장 서열을 포함), 및 ii) 쥐 CD3  $\zeta$ 의 아미노산 52 내지 카르복시 말단. 증폭된 PCR 생성물을 플라스미드 벡터에 클로닝하고, DNA의 서열을 분석하였다. 그 후, 클로닝된 삽입체를 벡터 pBABE (퓨로마이신 내성을 코딩하는 유전자 포함, Morganstern, JP and Land, H, 1990 Nucl. Acids Res. 18: 3587-96)에 서브클로닝하여, pBABE-huCTLA-4/CD3  $\zeta$ 를 생성하였다. pBABE-huCTLA-4/CD3  $\zeta$ 를 레트로바이러스 패키징

세포주인  $\psi$ -2로 옮기고, 퓨로마이신 내성 세포들의 풀을 선별하였다. 이들 세포를 쥐 T 세포 하이브리도마 BW5147 (ATCC #TIB-47)과 함께 배양하였다. 함께 배양한지 2일 후, 비-고유 BW5147 세포를 제거하고, 퓨로마이신 내성에 대해 선별하였다. 퓨로마이신 내성 세포의 풀을 제한 희석에 의해 서브클로닝하고, FACS에 의해 인간 CTLA-4의 표면 발현에 대해 시험하였다. 세포의 표면에 인간 CTLA-4를 높은 수준으로 발현하는 클론 (BW-huCTLA-4CD3  $\zeta$ -3#12)을 선별하였다. 인간 CTLA-4의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 재조합 항원은 알 앤드 디 시스템즈 (R&D Systems; Cat. #325-CT-200)사에서 구입하였다.

<296>

면역화. 3마리의 SC20/KCo5 잡종 교배 마우스 (ID# 22227, 22230 및 22231)를 각각, 인간 CTLA-4 세포외 도메인을 발현하는 세척된 전체 BW-huCTLA-4CD3  $\zeta$ -3#12 세포  $10^7$ 개의 복막내 (i.p.) 주사에 의해 면역화시켰다. 마우스 #22227 및 22230의 경우에는 이 면역화 과정을 대략 1개월의 간격으로 2회 이상 반복하였다. 3개월째에, 마우스 #22231에게는 전체 세척 세포를 3번째 i.p. 주사하였고, 마우스 #22227 및 22230에게는 MPL+TDM 면역보강제 (Sigma, Cat.#M6536) 중의 가용성 재조합 항원 20  $\mu$ g을 각각 i.p. 주사 및 피하 (s.c.) 주사하였다. 그 후, 마우스들을 10일 동안 방치하고, 하이브리도마 융합을 위해 비장 세포를 수확하기 2일 전에 마우스 #22227 및 22230 각각에게 가용성 재조합 항원 20  $\mu$ g을 꼬리 정맥 (i.v.) 주사함과 동시에 MPL+TDM 면역보강제 중의 가용성 재조합 항원 20  $\mu$ g을 i.p. 주사하였다. 비장세포 수확 1일 전에, 이들 마우스에게 가용성 재조합 항원 20  $\mu$ g을 추가로 i.v. 주사하였다. 마우스 #22231에게는 비장 세포 수확 3일 전에 MPL+TDM 면역보강제 중의 세척된 BW-huCTLA-4CD3  $\zeta$ -3#12 세포  $10^7$ 개를 i.p. 주사하고, 이어서 융합 2일 전에 면역보강제 없이 세척된 BW-huCTLA-4CD3  $\zeta$ -3#12 세포  $10^7$ 개를 i.p. 주사하였다.

<297>

융합. 마우스 #22227, 22230 및 22231로부터의 비장 세포를, 표준 방법 (Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennett et al., 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, New York; Oi and Herzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, ed. Mishell and Shiigi, pp.357-372. Freeman, San Francisco; Halk, 1984, Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, ed. Weissbach and Weissbach, pp. 766-780, Academic Press, Orlando, FL)에 의해 마우스 골수종 세포 (세포주 P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL 1580, 또는 SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581)와 개별적인 3가지 실험으로 융합시켰다. 세포는 DMEM, 10% FBS, OPI (Sigma 0-5003), BME (Gibco 21985-023), 및 3% 오리젠 하이브리도마 클로닝 인자 (Origen Hybridoma Cloning Factor; Igen IG50-0615)에서 배양하였다. 최초 배양 및 선별 동안에 배지에 HAT 또는 HT 보충물을 첨가하였다.

<298>

하이브리도마 스크리닝. 인간 IgG 항체와 반응하는 항원을 분비하는 하이브리도마를 동정하기 위해, ELISA 플레이트 (Nunc MaxiSorp)를 100  $\mu$ l/웰의 인간 CD152 Mu-Ig 융합체 (Ancel #501-820; PBS 중의 0.2  $\mu$ g/ml)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 1% BSA를 함유하는 PBS-Tween 100  $\mu$ l/웰로 블로킹하였다. 세포 배양 상층액 15  $\mu$ l를 첨가하고, 1 내지 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 후, 알칼리성 포스파타제에 접합된 염소 항-인간 감마 중쇄 (항-인간 감마 (fc) AP Jackson #109-056-098) 100  $\mu$ l/웰과 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 각 단계 사이에서 플레이트를 PBS-Tween으로 3회 세척하였다. 감마 양성 항원의 항원 반응성 항체를 분비하는 76개의 하이브리도마가 동정되었다. 이어서, 이들 클론을 추가로 분석하여 감마 중쇄 또는 경쇄 이소형을 결정하고, 또한 IgM 분비 세포의 오염이 존재하는지 결정하였다 (표 3).

표 3

<299>

항원 반응성 인간 IgG 항체를 포함하는 1° 하이브리도마 웰로부터의 중쇄 이소형 분석								
마우스 #	IgM	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>	Ig $\kappa$	Ig $\lambda$	모든 IgG
22227	0	4	1	0	3	7	0	8
22230	9	25	8	5	7	48	6	45
22231	1	11	2	3	7	23	1	23
합계	10	40	11	8	17	75	7	76
우선, 하이브리도마 상층액을 항원 반응성 인간 IgG의 존재 여부에 대해 시험하였다. 그 후, 76개의 양성 상층액을 항원 반응성 인간 IgM, IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> , IgG <sub>4</sub> , Ig $\kappa$ , 및 마우스 Ig $\lambda$ 에 대해 시험하였다. 포획 시약: 인간 CD152 mu-Ig 융합체 (Ancel #501-820). 검출 시약: 항-인간 감마 (fc) HRP (Jackson #109-036-098); 항-인간 카파 HRP (Bethyl #A80-115P); 항-인간 감마 1 HRP (Southern Biotech #9050-05); 항-인간 감마 2 HRP (Southern Biotech #9070-05); 항-인간 감마 3 HRP (Southern Biotech #9210-05); 항-인간 감마 4 HRP (Southern Biotech #9200-05); 항-인간 mu HRP (Southern Biotech #1060-05).								

<300>

76개의 IgG 항원 양성 웰 중 75개가 인간 카파 경쇄 항원 반응성 항체에 대해서도 양성 반응을 나타냈으며, 상기 웰들 중 7개가 마우스 람다 함유 하이브리드 항체에 대해 양성 반응을 나타냈다. 그러나, 상기 7개의 람다 양성 웰들 중 6개가 카파 경쇄도 함유하였으며, 이들 중 3개의 웰이 IgM 항원 반응성 항체의 오염에 대해 양성 반응을 나타냈다. 이들 오염 IgM 항체가 람다 경쇄의 포함에 기여했을 수 있기 때문에, 총 76개의 IgG 클론들 중에서 3 내지 7개의 IgG $\Lambda$  클론이 존재한다. 따라서, 내생성 마우스 람다는 IgG 양성의 항원 반응성 하이브리도마의 단지 4 내지 9%만을 기여하는 것으로 보인다. 76개의 양성 하이브리도마 웰들 중 22개에서 유래한 세포를 제한 희석으로 다시 플레이팅하여, 각각의 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 서브클로닝하였다. 안정한 항원 반응성의 인간 IgG 서브클론이, 1° 하이브리도마 22개 중 19개로부터 얻어졌다 (하기 표 4 참조).

#### 표 4

항 - CTLA-4 하이브리도마의 서브클로닝

클론	OD	시험된 클론의 수	양성 반응의 수	양성 반응 %
4C1	0.44	24	5	21%
2E4	1.48	24	9	38%
1H5	1.39	24	14	58%
9C4	1.30	24	5	21%
6D11	3.24	16	10	63%
10H3	1.59	16	2	13%
8H4	3.14	16	7	44%
8G5	1.38	8	3	38%
4A9	1.35	24	20	83%
10E1	1.17	24	3	13%
9F6	1.08	24	0	0%
6B9	1.16	16	5	31%
9B10	2.70	32	9	28%
10D1	0.90	48	6	13%
1B6	1.34	24	9	38%
4C7	1.34	8	2	25%
1D11	0.97	8	0	0%
1B5	2.75	8	3	38%
4E9	1.36	24	1	4%
11H7	0.40	16	0	0%
2D8	1.31	24	10	42%
8F2	1.28	16	5	31%

<301>

<302>

이와 같이, 86%의 서브클로닝 효율이 얻어졌다. 서브클로닝시, 1° 하이브리도마들 중 하나가 상이한 IgG 이소형을 갖는 2개의 별도 클론을 포함하는 것으로 밝혀졌다 (하기 표 5 참조).

표 5

인간 IgGκ 항-CTLA-4 서브클론의 이소형 분석

마우스	클론	모 웰(Parent well)	IgG <sub>1</sub> κ	IgG <sub>2</sub> κ	IgG <sub>3</sub> κ	IgG <sub>4</sub> κ
22227	8G5	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22227	6B9	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22230	1B5	IgG <sub>3</sub> κ	-	-	+	-
22230	2D8	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22230	6D11	IgG <sub>4</sub> κ	-	-	-	+
22230	8H4	IgG <sub>4</sub> κ	-	-	-	+
22230	9C4	IgG <sub>3</sub> κ	-	-	+	-
22230	10H3	IgG <sub>3</sub> κ	-	-	+	-
22231	1B6	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	1H5	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	2E4	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	4A9	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	4C1.1	IgG <sub>4</sub> κ	-	-	-	+
22231	9B10	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	4C7	IgG <sub>3</sub> κ	-	-	+	-
22231	10D1.1	IgG <sub>1</sub> κ, IgG <sub>4</sub> κ	+	-	-	-
22231	10D1.4	IgG <sub>1</sub> κ, IgG <sub>4</sub> κ	-	-	-	+
22231	10E1	IgG <sub>4</sub> κ	-	-	-	+
22231	8F2	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-
22231	4E9	IgG <sub>1</sub> κ	+	-	-	-

<303>

<304>

이와 같이, 20개의 상이한 서브클론을 수득하였다. 모든 20개의 클론이 인간 κ 경쇄를 사용하며, 전적으로 인간의 것이었다.

<305>

모노클로날 항체를 서브클로닝된 5개의 하이브리도마 (1H5, 4A9, 4C1, 8H4 및 10E1)로부터 단리하여, B7.2에 대한 CTLA-4의 결합을 차단하는 이들의 능력을 시험하였다 (도 12 및 13).

<306>

요컨대, ELISA 플레이트를 B7.2-Ig 융합 단백질 0.7 μg/ml (100 μl/웰)로 코팅하였다 (이 거명을 통해 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 WO 01/14424 참조). 이 플레이트를 세척하고, PBS-T + 1% BSA 중에서 30분 동안 블로킹하였다. 항체를 동일 부피의 바이오틴-표지 CTLA-4 Ig (Ancell #501-030) 0.2 μg/ml과 혼합하고, 1시간 동안 실온에서 예비인큐베이션시킨 후, B7.2로 코팅된 ELISA 플레이트로 옮겨 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고, 100 μl/웰의 스트렙타비딘 알칼리성 포스파타제 (Kirkegaard and Perry Labs 15-30-0)를 첨가하여 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 pnpp 기질로 발색반응시켰다. B7.2에 대한 바이오틴-표지 CTLA-4의 결합 억제제는 항체 농도 대 405 nm에서의 흡광도로서 플롯팅하였다. 항체 10D1은 CTLA-4에 특이적인 인간 IgG<sub>1</sub>이다 (WO 01/14424). 항체 이소형은 1H5.1(γ<sub>1</sub>), 4A9.1(γ<sub>1</sub>), 4C1.1(γ<sub>4</sub>), 8H4.4(γ<sub>4</sub>), 10E1.1(γ<sub>4</sub>) 및 10D1(γ<sub>1</sub>)이었다.

<307>

2종의 항체 (1H5 및 4A9)는 차단 항체인 것으로 밝혀졌고, 3종의 항체 (4C1, 8H4 및 10E1)는 비차단 항체인 것으로 밝혀졌다 (도 12 및 13).

<308>

항-CTLA-4의 투여는 T 세포 매개의 면역 반응을 증진시킬 수 있다 (Krummel, 1995, J. Exp. Med. 182: 459-465; Krummel et al., 1996, Int'l Immunol. 8: 519-523). 따라서, CTLA-4 항체는 다른 제제의 면역원성을 증가시키는 면역보강제로서 사용될 수도 있다. CTLA-4에 대한 항체가 다른 제제와 함께 투여되는 경우, 상기 2가지 물질은 어떤 순서로든 또는 동시에 투여될 수 있다. 이 방법은 증진된 면역 반응이 유익한 다양한 백신용 및 치료용으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 흑색종, 결장암, 전립선암 및 신장암을 비롯한 암과 감염성 질환에 이용될 수 있다.

<309>

CTLA-4 항체는 또한 T 세포 매개의 면역 반응을 하향조절하는 데 사용될 수도 있다. 이 활성은 항-CTLA-4 항체의 다가 제제를 사용하여 얻을 수 있다. 예를 들어, (항체의 수가를 증가시키기 위한) 항-CTLA-4로 코팅된 라텍스 마이크로스피어는 T 세포 증식 및 활성화를 억제할 수 있다. 동일한 항체 결합 부위를 갖는 제제는, Fab 또는 가용성 IgG로서 나타나는 경우에 CTLA-4 길항제로서 작용할 수 있고, 높은 수준으로 가교결합되는 경우에 CTLA-4 효능제로서 작용할 수 있다. 따라서, 항-CTLA-4 항체의 다가 형태는 면역억제용 치료제로서 유용할 수 있다.

<310>

라텍스 마이크로스피어 또는 기타 불용성 입자로의 결합 이외에, 상기 항체는 서로 가교결합되거나 유전공학에

의해 조작되어 다량체를 형성할 수 있다. 가교결합은 직접 결합에 의한 것이거나, 또는 항체-바이오틴-아비딘 복합체와 같은 간접적인 결합에 의한 것일 수 있다. 가교결합은, 화학적 연결기가 사용되는 경우에 공유결합일 수 있고, 단백질-단백질 또는 다른 단백질-리간드 상호작용이 이용되는 경우에 비공유결합일 수 있다. 상기 결합을 위한 유전공학적 접근법에는, 예를 들어 IgM 발현 벡터에서 또는 임의의 단백질 잔기 (예를 들어, 폴리리신 등)에서 고친화도 IgG 항체의 가변 영역을 재발현하는 것이 포함된다. 고친화도 IgG 항체를 IgM 항체로 전환시키면, 매우 높은 친화도의 10가 복합체가 생성될 수 있다. IgA<sub>2</sub> 발현 벡터는 또한 다가 항체 복합체를 제조하는 데 사용될 수도 있다. IgA<sub>2</sub>는 J쇄 및 분비 성분과 함께 중합체를 형성할 수 있다. IgA<sub>2</sub>는, 호중구, 대식세포 및 단핵구에서 발현되는 IgA 수용체인 CD89에 의해 추가로 가교결합될 수 있다는 부가의 이점이 있다. 별법으로, C20/KCo5 잡종 교배 마우스에서 생성된 하이브리도마의 대략 2%가 IgA이기 때문에, 이들 동물을 이용하여 인간 IgA 이소형 항-CTLA-4 항체를 직접 생성할 수 있다.

<311> 또한, CTLA-4 상에 존재하는 2종 이상의 비-중복 에피토프에 대한 항체를 포함하는 CTLA-4에 대한 폴리클로날 항체로 구성된 몇몇 제제를 이용하여 효능작용을 얻을 수 있다. 2개 이상의 결합 부위를 함유하는 그러한 제제 중의 한 항체는 CTLA-4 분자 2개와 결합하여 작은 클러스터를 형성할 수 있다. 그 후, 상이한 결합 부위를 지닌 제2 항체가 상기 작은 클러스터를 연결하여 (응집시켜) 큰 클러스터를 형성함으로써, T 세포에 신호를 전달하여 CTLA-4를 포함하는 (발현하는) T 세포의 활성화가 억제, 감소 또는 방해되도록 하는 (세포 표면 상의) CTLA-4 복합체를 형성할 수 있다. 따라서, 폴리클로날 항체의 몇몇 제제는 상기 설명한 다가 제제와 유사한 효능작용을 나타낸다.

<312> 따라서, 항-CTLA-4 항체의 다가 또는 폴리클로날 제제는 CTLA-4 수용체에 대한 효능작용에 유용하며, 이로써 CTLA-4 수용체를 포함하는 T 세포에 의해 매개되는 면역 반응을 억제한다. 상기 항체의 다가 또는 폴리클로날 제제를 사용하여 치료할 수 있는 질환의 몇몇 예로는 자가면역성 질환, 이식 거부 및 염증이 포함된다.

#### <313> <실시예 9>

#### <314> 항-인간 EGFR 항체의 제조

<315> 항원. 인간 암종 A431 세포로부터 정제된 가용성 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)는 시그마 케미칼 컴퍼니 (Sigma Chemical Co.; E3641)로부터 얻었다. 인간 암종 A431 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC CRL-1555)으로부터 얻었다. Ribl MPL + TDM 면역보강제는 시그마 케미칼 컴퍼니 (M-6536)로부터 얻었다.

<316> 면역화. 2마리의 SC20/KCo5 잡종 교배 마우스 (ID# 22232 및 22239)에게 10<sup>7</sup>개의 세척된 전체 인간 암종 A431 세포를 복막내 (i.p.) 주사하여 각각 면역화시켰다. 상기 2마리 마우스에서 이 면역화 과정을 1개월 후에 반복하였다. 4개월째에, 마우스 22239에게 MPL + TDM 면역보강제 중의 EGFR 25 µg을 i.p. 주사하여 면역화시키고, 이들을 11일 동안 방치한 후, PBS 중의 EGFR 10 µg을 i.v. 주사함과 동시에 MPL + TDM 면역보강제 중의 EGFR 10 µg을 i.p. 주사하였다. 2일 후, 마우스 22239에게 PBS 중의 EGFR 10 µg을 추가로 i.v. 주사하고, 다음날 마우스 22239로부터의 비장세포를 융합용으로 수확하였다. A431 세포로의 처음 2회 주사 이후에, 마우스 22232를 3개월 동안 방치하고, MPL + TDM 면역보강제와 혼합된 10<sup>7</sup>개의 A431 세포를 i.p. 주사하였다. 4일 후, 마우스 22232로부터 비장 세포를 융합용으로 수확하였다.

<317> 융합. 마우스 #22232 및 22239로부터의 비장 세포를, 개별적인 2가지 실험에서 P3 X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580; 마우스 #22239) 또는 SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581; 마우스 #22232) 골수종 세포주와 융합시켰다. 융합은 실시예 8에 약술된 표준 방법에 의해 수행하였다.

<318> 하이브리도마 스크리닝. EGFR 하이브리도마에 대한 스크리닝 방법은 실시예 8에서의 CTLA-4에 대한 방법과 유사하였다. ELISA 플레이트 (Nunc MaxiSorp)를 100 µl/웰의 가용성 EGFR 항원 (PBS 중의 1 µg/ml)으로 밤새 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 1% BSA를 함유하는 PBS-Tween 100 µl/웰로 블로킹하였다. 세포 배양 상층액 15 µl를 첨가하고, 1 내지 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 후, 알칼리성 포스파타제에 접합된 염소 항-인간 감마 중쇄 (항-인간 감마 (fc) AP Jackson #109-056-098) 100 µl/웰과 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 각 단계 사이에서 플레이트를 PBS-Tween으로 3회 세척하였다. 인간 IgGκ 항-EGFR 특이적 항체를 분리하는 5개 및 2개의 하이브리도마를 각각 마우스 22232 및 마우스 22239 융합체로부터 서브클로닝하였다. EGFR 특이적 항체의 중쇄 및 경쇄에 대한 이소형 분석은 4개의 IgG<sub>1</sub>κ, 1개의 IgG<sub>2</sub>κ 및 1개의 IgG<sub>4</sub>κ 항체를 포함하였다.



<실시예 10>

정제된 인간 IgGκ 모노클로날 항체에 대한 속도 및 평형 상수

하이브리도마는 1% 송아지 태아 혈청 (낮은 농도의 IgG)을 함유하는 eRDF에서 배양하였다. 인간 MAb는 단백질 G 컬럼을 이용하여 정제하였다. G-CSF 및 가용성 CD4에 대한 정제된 MAb의 속도 평형 결합 상수는 BIAcore2000 장치를 이용하여 측정하였다. 인간 G-CSF (120 RU) 또는 CD4:Fc (1600 RU)를, 제조사의 지시에 따라 아민기를 통해 BIAcore2000 (BIAcore)의 센서 칩 표면에 공유결합시킴으로써 고정시켰다. 모노클로날 항체를 상기 항원 위에 흘려주었다. 글리신-HCl 완충액 (pH 1.5) 또는 4M MgCl<sub>2</sub>로 칩을 재생하여, 임의의 잔류 항-인간 G-CSF MAb 또는 항-CD4 MAb를 각각 제거하였다. 상이한 MAb 농도를 이용하여 상기 주기를 반복하였다. 항원에 대한 결합 및 항원으로부터의 해리는 BIAevaluation 3.0 소프트웨어를 이용하여 측정하였다.  $k_{\text{assoc}}$ 를  $k_{\text{dissoc}}$ 로 나눔으로써  $K_a$ 를 구하였다. 하기 표 6에 나타낸 바와 같이, 이들 값은 쥐의 항-인간 G-CSF MAb인 클론 3316.111 (R&D) 또는 쥐의 항-CD4 MAb인 Leu3a (Pharmingen)에 대해 얻은 값에 필적할만 하였다.

표 6

정제된 인간 IgGκ MAb에 대한 속도 및 평형 상수

MAb	아군	마우스	항원	$k_{\text{assoc}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{dissoc}}(\text{s}^{-1})$	$K_a(\text{M}^{-1})$
#4	IgG <sub>1</sub>	이중 -Tc/KO	G-CSF	$4.1 \times 10^5$	$3.1 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^9$
#5	IgG <sub>1</sub>	이중 -Tc/KO	G-CSF	$5.9 \times 10^6$	$5.8 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{10}$
#11	IgG <sub>4</sub>	잡종 교배	G-CSF	$4.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^{-3}$	$2.8 \times 10^9$
#21	IgG <sub>1</sub>	잡종 교배	G-CSF	$1.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^{-3}$	$5.4 \times 10^8$
#27	IgG <sub>2</sub>	잡종 교배	G-CSF	$1.3 \times 10^6$	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.5 \times 10^8$
#23	IgG <sub>1</sub>	잡종 교배	CD4	$7.6 \times 10^5$	$5.7 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{10}$
3316.111	마우스	야생형	G-CSF	$1.5 \times 10^6$	$2.3 \times 10^{-4}$	$6.3 \times 10^9$
Leu3a	마우스	야생형	CD4	$2.2 \times 10^5$	$7.1 \times 10^{-6}$	$3.1 \times 10^{10}$

<실시예 11>

잡종 교배(Fc) 마우스의 생성

면역학적 관용이 자가항원에 대한 반응 (쥐 대응물의 아미노산 서열과 유사하거나 동일한 아미노산 서열인 외래 항원에 대한 마우스 모노클로날 항체의 제조를 방해함)을 피한다는 사실은 잘 알려져 있다. 인간 항원과 그의 쥐 대응물 사이의 공통적인 에피토프에 결합하는 마우스 모노클로날 항체가 유용할 수 있는데, 이는 단백질 항원의 활성 부위 아미노산 서열이 매우 보존적이기 때문이다. 또한, 상기 항체를 생체내 투여함으로써 발생하는 임의의 효과는 마우스 모델에서 용이하게 연구할 수 있다. 그러나, 그러한 공통 에피토프에 대한 마우스 모노클로날 항체를 얻는 것은 어려운 실정이었다. 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 잡종 교배 마우스를 사용하면, 다양한 인간 항원에 대한 인간 모노클로날 항체를 획득할 수 있다. 그러나, 특정 환경에서는 매우 보존적인 인간 항원과 결합하거나 쥐의 대응물과 교차반응하는 인간 모노클로날 항체를 얻는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 측면에서는 Fcγ 수용체 IIB가 불활성화된 본 발명의 부가적인 잡종 교배 마우스가 제공된다. 본원에서 잡종 교배(Fc) 마우스로 언급하는 이들 마우스는 매우 보존적인 항원과 결합하거나 쥐의 대응물과 교차반응하는 모노클로날 항체의 생성을 가능하게 한다. 생화학적 연구 및 유전학적 연구는, 면역 글로불린 (Ig) G에 대한 유형 IIB의 저친화도 수용체 (Fcγ IIB)가 항체 또는 면역 복합체에 의해 촉발된 세포 활성화를 억제하며 또한 자가면역성이 나타나는 것을 예방하는 데 있어서 중요한 성분일 수 있음을 시사한다 (Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349). 억제성 Fc 수용체인 Fcγ IIB가 결핍된 동물은 일반적으로 증진된 항체 반응을 나타내며, 모든 항체-매개의 과민성 반응에서 높은 염증 발생을 나타낸다 (Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349). 예를 들어, 소의 콜라겐 유형 IV (C-IV)로 면역화된 돌연변이체 마우스는 마우스 C-IV에 대해 증진된 자가항체 (autoantibody) 반응을 나타냈다 (야생형 마우스에서는 나타나지 않음) (Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905). 그러나, Fcγ IIB 돌연변이체 마우스가 자가반응성 모노클로날 항체의 효율적인 제조에 사용될 수 있는지의 여부를 연구한 보고는 존재하지 않았다. 더욱이, 인간 항원과 마우스에서의 쥐 대응물 둘 다에 결합하는 인간 모노클로날 항체의 효율적인 제조를 입증하는 보고도 없었다.

하기 설명하는 바와 같이, Fcγ IIB 돌연변이체를 교배하여 본 발명의 잡종 교배 마우스를 생성하였다. 결과의

잡종 교배(Fc) 마우스를 소의 C-IV로 면역화시켰더니, 소 및 쥐 C-IV 둘 다에 대한 인간 항체 반응이 도출되었다. 소 및 쥐 C-IV 둘 다에 결합하는 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마도 생성될 수 있다. 따라서, 잡종 교배(Fc) 마우스는 면역화된 외래 항원과 그의 쥐 대응물 둘 다에 결합할 수 있는 인간 모노클로날 항체의 제조를 가능하게 한다. 잡종 교배(Fc) 마우스는 또한 매우 보존적인 항원에 대한 인간 모노클로날 항체를 얻는 데에도 유용할 수 있다. Fc  $\gamma$  IIB-낙아웃에 대해 동형접합성인 마우스 (Fc(-/-); Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349)는 도시후미 다카이 박사 (Dr. Toshifumi Takai; Tohoku University, JAPAN)가 제공하였다. Fc(-/-) 수컷 마우스를 암컷 잡종 교배 마우스와 (실시예 3에 기재된 바와 같이) 교배하였다. 각 F1 개체에서의 KCo5 도입유전자 및 hCF(SC20)의 보유는 실시예 3에 기재된 바와 같이 ELISA 및 PCR에 의해 조사하였다. Fc  $\gamma$  IIB-낙아웃의 유전자형은 하기 3종의 프라이머를 사용한 PCR 분석에 의해 결정하였다:

<327> neo, 5'-CTCGTGCTTTACGGTATCGCC (서열 8);

<328> 5'EC1, 5'-AAACTCGACCCCCCGTGGATC (서열 9); 및

<329> 3'EC1, 5'-TTGACTGTGGCCTTAACGTGTAG (서열 10).

<330> 꼬리 생검체로부터 채취한 게놈 DNA 샘플은, AmpliTaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 3종의 프라이머 (각각 0.5 pM)를 함유하는 표준 반응 혼합물에서, 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 30초 (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer)의 35주기로 상기 샘플을 증폭시켰다. 야생형 대립유전자 및 동형접합성 대립유전자에 의해 나타나는 밴드 크기는 각각 161 bp 및 232 bp이다. 유전자형이 KCo5/CMD 또는 CM2D(-)/CKD 또는 JKD(-)/Fc(-)/인 수컷 및 유전자형이 hCF(SC20)/KCo5/CMD 또는 CM2D(-)/+/CKD 또는 JKD(-)/Fc(-)/인 암컷을 선별하여 추가 교배에 사용하였다. 최종적으로, 유전자형이 hCF(SC20)/KCo5/CMD 또는 CM2D(-)/CKD 또는 JKD(-)/Fc(-)/인 마우스 (잡종 교배(Fc))를 얻었다. 잡종 교배(Fc) 마우스에서 인간 Ig  $\mu$  및 Ig  $\kappa$ 의 혈청 발현량은 잡종 교배 마우스 (실시예 4 참조)에서의 발현량과 필적할만 하였다.

#### <실시예 12>

#### 항-마우스 유형 IV 콜라겐 인간 모노클로날 항체의 제조

<331> 항원의 면역화. 소 C-IV (Cellmatrix IV)는 니타 젤라틴, 인크. (Nitta Gellatin, Inc.)로부터 얻었다. 1 mM NaOH (최종 농도)를 첨가하여 C-IV 용액 (1 mM HCl, pH 3.0 중의 3.0 mg/ml)을 중화시킨 후, 프로인트 면역보강제로 유화시켰다. 잡종 교배 마우스 및 잡종 교배(Fc) 마우스에게 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 균주 H<sub>37</sub>Rv를 함유하는 CFA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 중에 유화된 C-IV 150  $\mu$ g을 꼬리에 주사하여 면역화시켰다. 26 및 48일 후, 상기 마우스의 동일한 부위에 150  $\mu$ g의 C-IV + IFA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 주사하여 추가 면역화시켰다 (Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905).

<334> 마우스에서의 체액성 반응. 58일째에 혈청을 수거하였다. 혈청 중 항원 반응성 인간 Ig  $\gamma$ 를 변형된 ELISA (Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905)에 의해 측정하였다. 소 C-IV에 대한 항체는 96-웰 마이크로플레이트 분석기 (Nunc, MaxiSorp)에서 검출하였으며, 여기서는 웰들을 PBS 중 소 C-IV의 20  $\mu$ g/ml 용액 50  $\mu$ l/웰로 4℃에서 밤새 코팅하였다. BIOCOAT 셀웨어 (cellware) 마우스 C-IV 96 웰 플레이트 분석기 (Becton Dickinson Labware)를 사용하여 검출하였다. 희석된 혈청 (1:20-1280)을 50  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 4℃에서 밤새 반응하도록 방치하였다. 웰을 세척하고, 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (Sigma, A0170)에 결합된 염소 항-인간 IgG (Fc)와 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 세척하고, 50  $\mu$ l의 TMB 기질 (Sumitomo Bakelite, ML-1120T)과 실온에서 30분 동안 발색반응시켰다. 마이크로-플레이트 판독기 (Arvo, Wallac Berthold Japan)를 이용하여 450 nm에서의 OD를 판독하였다. 마우스 C-IV에 대한 특이적 인간  $\gamma$  자가항체 반응은 잡종 교배(Fc) 마우스의 혈청에서는 관찰되었지만, 잡종 교배 마우스의 혈청에서는 관찰되지 않았다. 소 C-IV에 대한 증진된 반응이 잡종 교배(Fc) 마우스의 혈청에서 관찰되었다 (도 14).

<335> 융합 및 하이브리도마 스크리닝. 66일 후에 마우스에게 추가로 항원 150  $\mu$ g을 복막내 주사 (KM#1: 잡종 교배, FC#1: 잡종 교배(Fc)) 또는 정맥내 주사 (KM#2: 잡종 교배, FC#2: 잡종 교배(Fc))하고, 69일 후에 비장 세포를 수확하였다. 마우스로부터의 비장 세포를 마우스 골수종 세포 (Sp2/0-Ag14)와 표준 방법에 의해 융합시켰다. 세포 현탁액을 96-웰 플레이트 내에 각 웰 당 200,000개의 비장세포 농도로 접종하였다. 세포를 DMEM, 10% FBS, 인슐린, IL-6에서 배양하였다. 최초 배양 및 선별 동안에 배지에 HAT 또는 HT 보충물을 첨가하였다. 하이브리도마는 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 마우스 C-IV를 분비하는 하이브리도마를 동정하기 위해, ELISA 플

레이트 (Nunc MaxiSorp)를 50  $\mu\text{l}$ /웰의 마우스 C-IV (Sigma, C0534; PBS 중의 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 4°C에서 밤새 코팅하였다. h $\gamma$  양성 마우스 C-IV 반응성 항체를 분리하는 2개의 하이브리도마가 잡종 교배(Fc) 마우스로부터 얻어졌고, 이를 제한 희석에 의해 성공적으로 서브클로닝하였다 (하기 표 7 참조).

표 7

마우스 #	항-콜라겐 유형 IV 모노클로날 항체의 제조		
	양성 반응 웰		
	항-소 h $\gamma$	항-마우스 h $\gamma$	
KM#1	8	0	ip
KM#2	52	0	iv
FC#1	16	0	ip
FC#2	85	2	iv

상기 데이터는 잡종 교배(Fc) 마우스가 매우 보존적인 항원 또는 에피토프에 대한 인간 모노클로날 항체의 제조에 유용함을 보여준다.

\*\*\*

본 발명은 본 발명의 일면을 예시하기 위한 예시적 실시양태에 의해 제한되는 것은 아니며, 기능적으로 균등한 임의의 클론, DNA 또는 아미노산 서열이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 더욱이, 본원에 설명된 것들 이외에 본 발명에 대한 다양한 변형이 상기 상세한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자들에게 분명해질 것이다. 그러한 변형은 첨부된 청구의 범위 내에 포함되는 것이다. 또한, 뉴클레오타이드에 대해 주어진 모든 염기쌍 크기는 대략적인 것이며 설명의 목적으로 사용된 것임을 이해할 수 있을 것이다.

상기 언급한 모든 문헌 및 특허 문헌은, 이들이 개별적으로 기재된 것과 동일한 정도로 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 Cmu 표적화 벡터에 대한 디자인이다. A) Cmu 영역에 대한 마우스 게놈 DNA. B) Cmu 표적화 벡터. C) Cmu 표적화 벡터에 의해 상동성-재조합된 마우스 게놈 DNA.

도 2는 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 인간 Ig $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$  및 마우스 램다쇄의 혈청 농도이다.

도 3은 면역화된 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 34일째에 나타난 항-CD4 인간 Ig $\gamma$ 의 혈청 농도이다.

도 4는 면역화된 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 34일째에 나타난 항-CD4 인간 Ig $\kappa$ 의 혈청 농도이다.

도 5는 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 항-CD4 인간 Ig $\gamma$ 의 반응을 시간에 따라 나타낸 것으로, 각 군(N=5)에서 34일째에 최대 혈청 역가가 나타났다.

도 6은 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 항-CD4 인간 Ig $\kappa$ 의 반응을 시간에 따라 나타낸 것으로, 각 군(N=5)에서 34일째에 최대 혈청 역가가 나타났다.

도 7은 KM2-3 하이브리도마 세포의 성장 곡선과, 상기 하이브리도마 세포의 항-CD4 인간 모노클로날 항체 생성량을 나타낸 것이다.

도 8은 면역화된 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 34일째에 나타난 항-GCSF 인간 Ig $\gamma$ 의 혈청 농도이다.

도 9는 면역화된 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 34일째에 나타난 항-GCSF 인간 Ig $\kappa$ 의 혈청 농도이다.

도 10은 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 항-GCSF 인간 Ig $\gamma$ 의 반응을 시간에 따라 나타낸 것으로, 각 군(N=5)에서 34일째에 최대 혈청 역가가 나타났다.

도 11은 이중 TC/KO 및 잡종 교배 마우스에서 항-GCSF 인간 Ig $\kappa$ 의 반응을 시간에 따라 나타낸 것으로, 각 군(N=5)에서 34일째에 최대 혈청 역가가 나타났다.

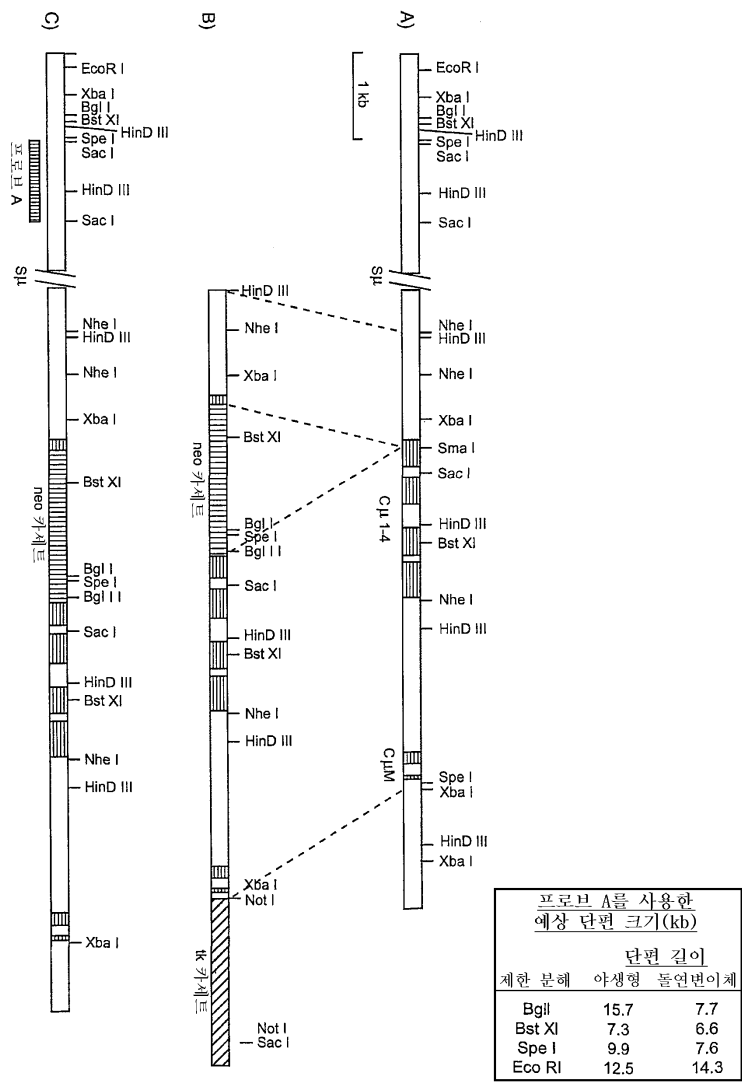
도 12는 차단 활성(blocking activity)에 대한 항-CTLA-4 인간 모노클로날 항체의 투여량 반응 곡선이다.

<72> 도 13은 모노클로날 항체에 의한 CTLA-4 (바이오티ن, biotin)의 B7.2 세포에 대한 결합 억제제를 나타낸 것이다.

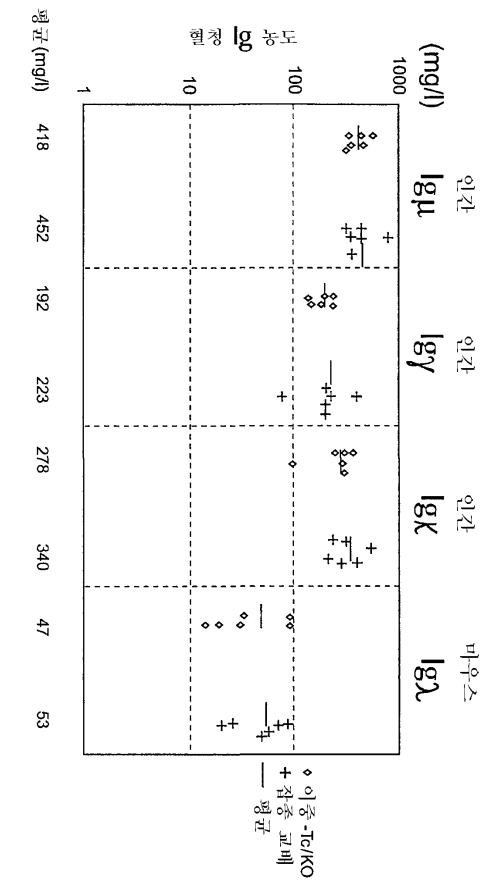
<73> 도 14는 잡종 교배(Fc) 마우스의 혈청에서 소의 C-IV에 대한 반응이 증진됨을 나타낸 것이다.

도면

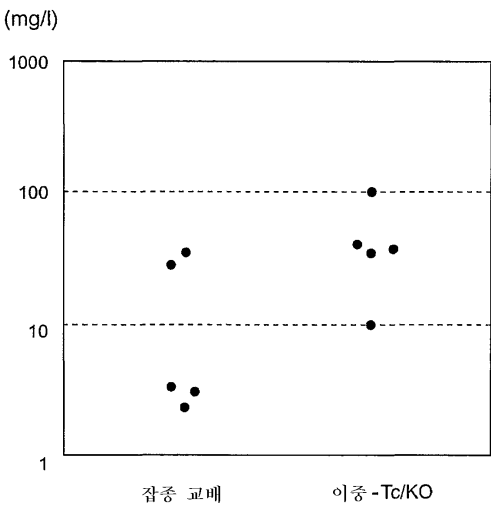
도면1



도면2

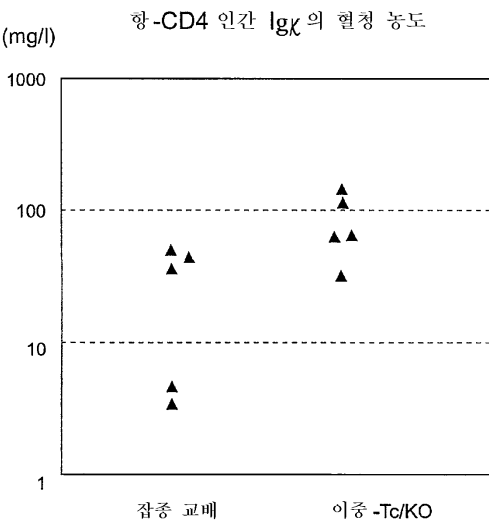


도면3

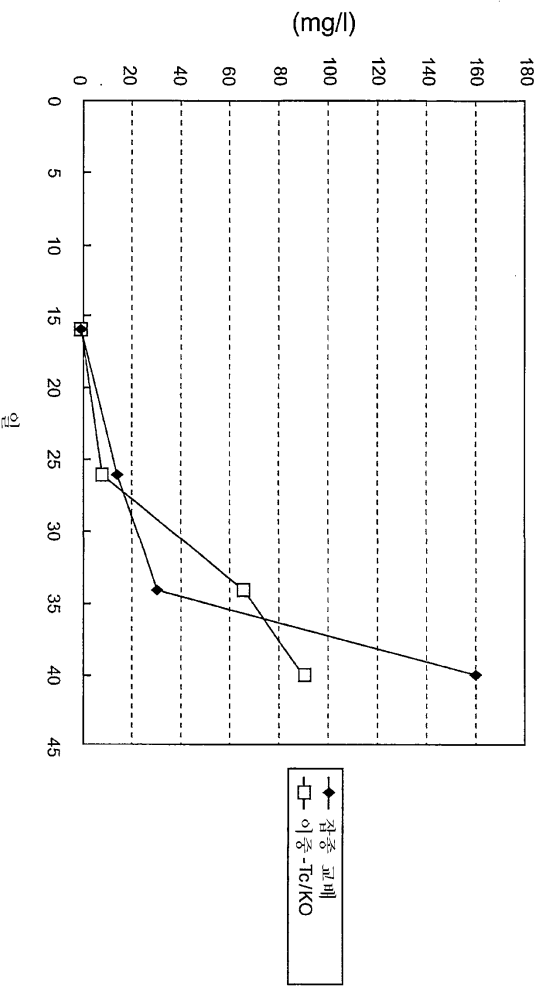




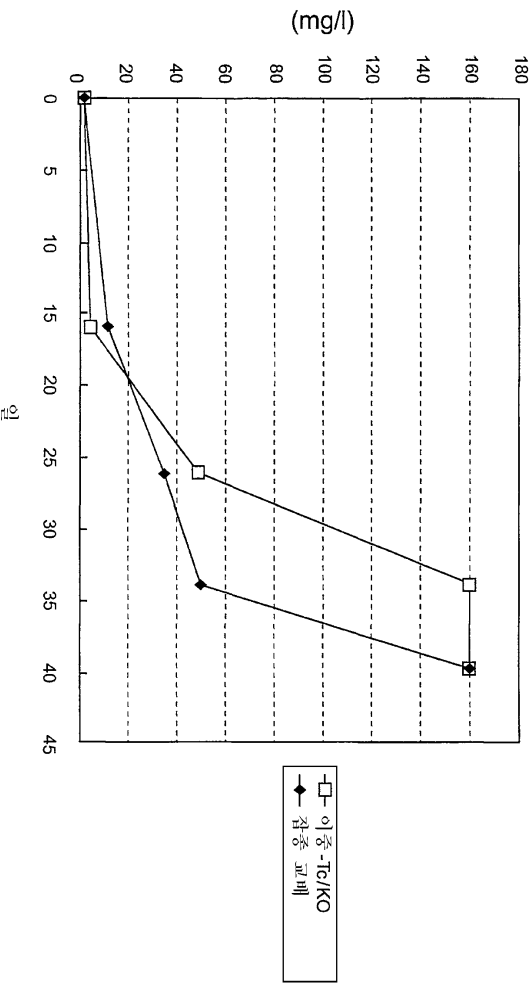
도면4



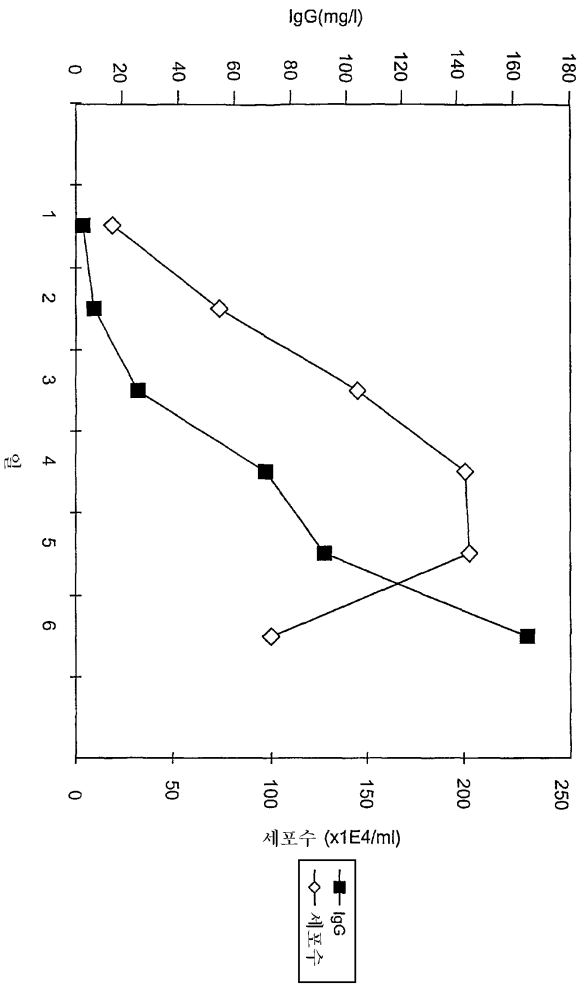
도면5



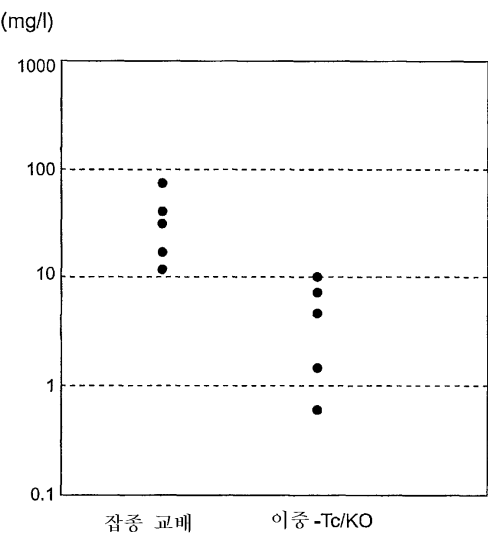
도면6



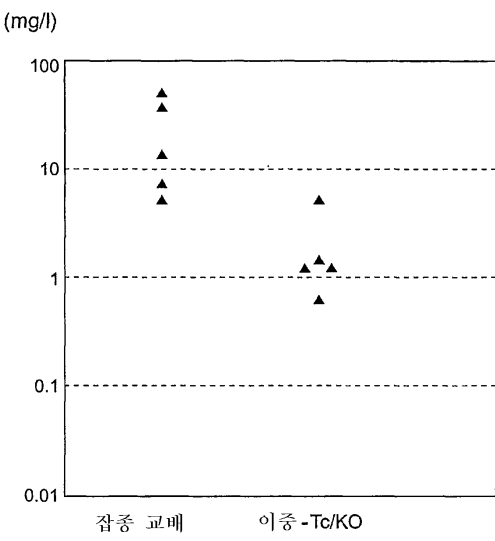
도면7



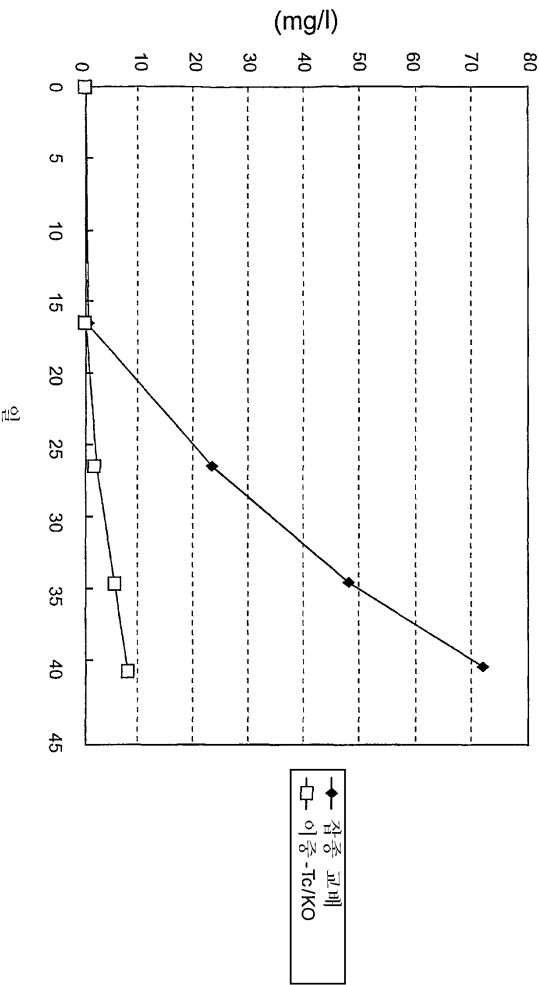
도면8



도면9

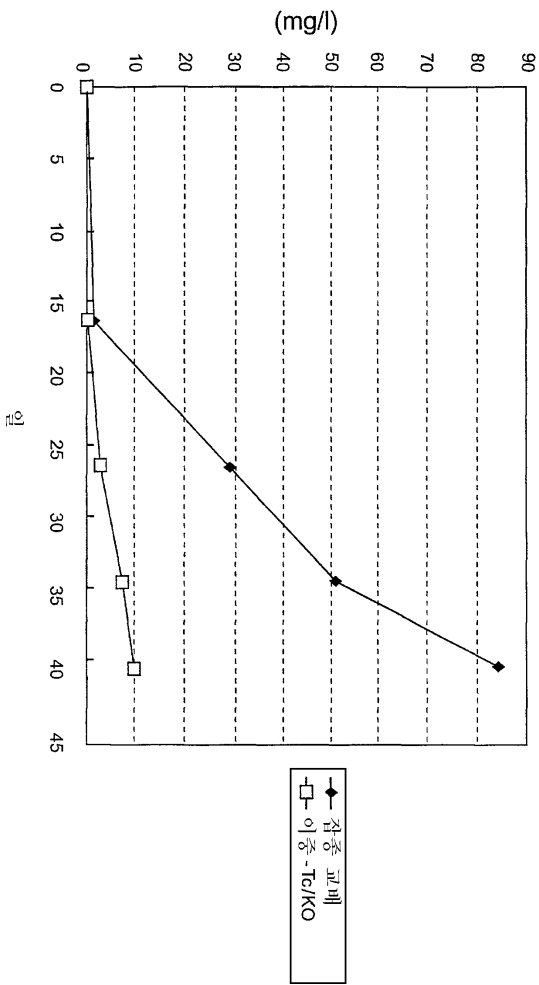


도면10

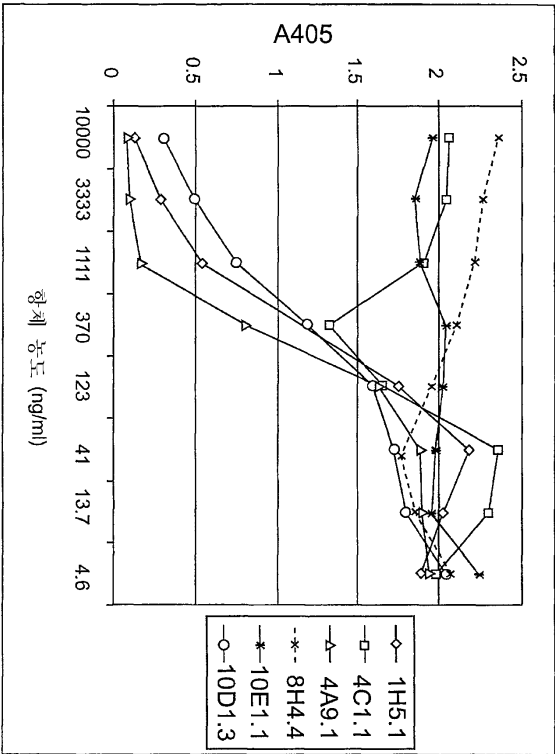




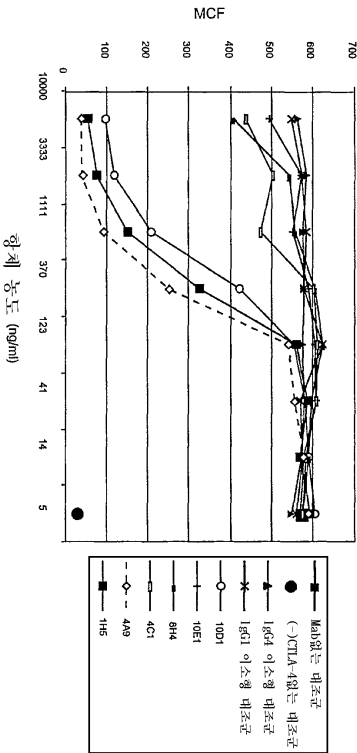
도면11



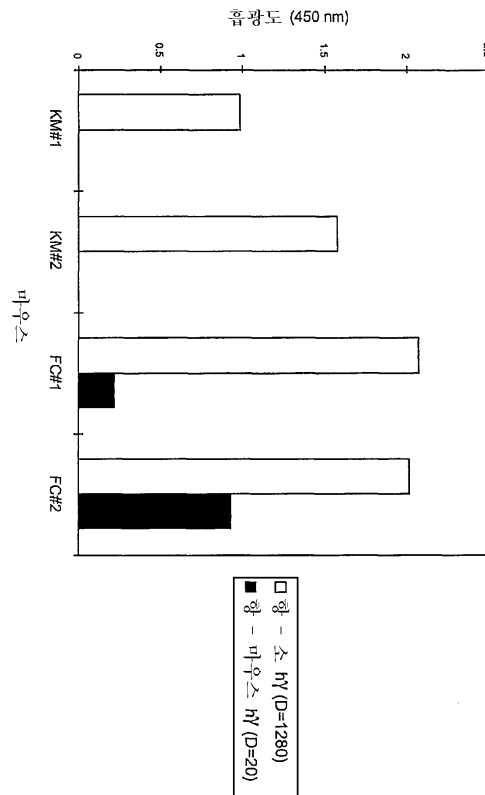
도면12



도면13



도면14



서열 목록

<110> Tomizuka, Kazuma  
Ishida, Isao  
Lonberg, Nils  
Halk, Ed

<120> TRANSGENIC TRANSCROMOSOMAL RODENTS FOR MAKING HUMAN ANTIBODIES

<130> 014643-012110US

<140> To be assigned

<141> To be assigned

<150> US 60/250,340

<151> 2000-11-30

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3881

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Kappa light chain plasmid

<220>

<223> pCK7-96

<400> 1

tcttcgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttcggtgcg gcgagcggt 60

tcagtcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120

aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180  
 tttttccata ggctcggccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240  
 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 300  
 cgctctcctg ttcgacacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcttttct cccttcggga 360  
 agcgtggcgc tttctcatag ctacacgctgt aggtatctca gttcgggtgta  
 ggctcgttcgc 420  
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 480  
 aactatcgtc ttgagtcaca cccggttaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact 540  
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgggtg 600  
 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660  
 accttcgga aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 720  
 ggttttttt tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780  
 ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa  
 actcacgtta agggattttg 840  
 gtcagtagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900  
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 960  
 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcacca tagttgctg actccccgtc 1020  
 gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtctgc aatgataccg 1080  
 cgagaccac gctaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140  
 gagcgagaa gtggtctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200  
 gaagctagag taagtagtgc gccagttaat  
 agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca 1260  
 ggcatcgtgg tgcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg tcccaacga 1320  
 tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaag cggtagctc cttcggtcct 1380  
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttagccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440  
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg tgagtactca 1500  
 accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560  
 cgggataata ccgcccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620  
 tcggggcgaa aactctcaag  
 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 1680  
 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740  
 acaggaaggc aaaaagccgc aaaaaggga ataaggcgca cacggaatg ttgaatactc 1800  
 atactcttc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860  
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920  
 aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980  
 cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040  
 atgcagctcc  
 cgagacgggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100  
 cgtcaggcgc cgtcagcggg tgttgccggg tgtcgggct ggcttaacta tgcggcatca 2160  
 gagcagattg tactgagagt gcacatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtagg 2220  
 agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgca 2280  
 tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340  
 ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaacgac ggccagtgc 2400  
 aagctagcgg ccgcggtcca accaccaatc tcaaagcttg gtaccggga gctgttatc 2460  
 ccagcacagt cctggaagag gcacagggga aataaaagcg gacggaggt ttccttgact 2520  
 cageccgtgc ctggtcttct tcagacctgt tctgaattct aaactctgag ggggtcggat 2580  
 gacgtggcca ttctttgctt aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa 2640  
 gccctcagaa tggctgcaaa gagtccaac aaaacaattt agaactttat taaggatag 2700  
 ggggaagcta ggaagaact caaaacatca agattttaaa tacgttctt ggtctccttg 2760  
 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc ctaacatgc cctgtgatta 2820  
 tccgcaaaa acacaccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc  
 2880  
 tttctcagg aactgtggct gcacatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt 2940  
 tgaaatctgg aactgctct gttgtgtgcc tctgaataa cttctatccc agagaggcca 3000  
 aagtacagt gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 3060  
 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgtg agcaaagcag 3120

actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg 3180  
tcacaaagag cttaacacagg ggagagtgtt agaggagagaa gtgccccac ctgctcctca 3240  
gttccagcct gacccctcc catcctttgg cctctgaccc ttttccaca  
ggggacctac 3300  
ccctattgcg gtcctccagc tcatctttca cctcaccccc ctcctctccc ttggctttaa 3360  
ttatgctaataa gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat ctttgacact gtggttttctc 3420  
tctttcctca atttaataat tattatctgt tgtttaccaa ctactcaatt tctcttataa 3480  
gggactaaat atgtagtcac cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tccttcattc 3540  
tattttaccc tatcatcctc tgcaagacag tctcctcctca aaccacacaag ccttctgtcc 3600  
tcacagtcct ctgggccatg gatcctcaca tcccaatccg cggccgcaat tcgtaatcat 3660  
ggtcatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac  
aattccacac aacatacgag 3720  
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagtgt gagctaactc acattaattg 3780  
cgttgccctc actgcccgtc ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 3840  
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag c 3881  
<210> 2  
<211> 4723  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Gammal heavy  
chain plasmid  
<220>  
<223> pCG7-96  
<400> 2  
gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccaggcct gaccttggtt ttggggcagg 60  
  
gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtgca caccaatgc ccatgagccc 120  
agacactgga cgtgaacct cgcggacagt taagaaccca ggggcctctg cgccctgggc 180  
ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg 240  
cccacggtc tttccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcgccct 300  
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 360  
cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgtctacag tctcaggac tctactcct 420  
cagcagcgtg gtgacctgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaact  
480  
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt ggtgagaggc cagcacaggg 540  
agggagggtg tctgctggaa gccaggtcga gcgtcctgc ctggacgcat cccgctatg 600  
cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc ccgtctgcct cttacccgg aggcctctgc 660  
ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggctttt tccccaggct ctgggcaggc 720  
acaggctagg tgccctaac ccaggccctg cacacaaagg ggcaggtgct gggctcagac 780  
ctgccaagag ccatatccgg gaggacctg cccctgacct aagcccccc caaaggccaa 840  
actctccact cctcagctc ggacacctt tctctccca gattccagta  
actccaatc 900  
ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccaggta 960  
agccagccca ggctctgccc tccagctcaa ggcgggacag gtgcctaga gtagcctgca 1020  
tccagggaca ggccccagcc ggggtgctgac acgtccacct ccatctctc ctcagacct 1080  
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 1140  
atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtgggtgacg tgagccacga agacctgag 1200  
gtcaagtcca actggtagct ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg 1260  
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagctcc  
tcaccgtcct gcaccaggac 1320  
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1380  
gagaaaaacca ttccaagc caaaggtggg acccgtgggg tgcgagggcc acatggacag 1440  
aggccggctc ggccacct ctgcctgag agtgaccgt gtaccaacct ctgtccctac 1500  
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgacaa 1560  
gaaccaggct agctgacct gcctggtaa aggtctctat cccagcgaca tcgctggga 1620  
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgctcccg tgctggactc 1680



cgacggctcc ttcttctct acagcaagct  
caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 1740  
gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1800  
cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg acggccggca agcccccgct ccccgggctc 1860  
tcgcggtcgc acgaggtatg ttggcacgta cccctgtac atacttccc ggcgccacgc 1920  
atggaataa agcaccacgc gctgccctgg gccctgcga gactgtgat gtcttttcca 1980  
cgggtcaggc cgagtctgag gcctgagtgg catgaggag gcagagcggg tcccactgtc 2040  
cccacactgg ccaggtctgt gcaggtgtgc ctgggcccc tagggtgggg ctccagccagg 2100  
ggctgccctc ggcaggggtg  
gggatttgcc agcgtggccc tccctccagc agcacctgcc 2160  
ctgggctggg ccacgggaag ccctaggagc cctggggac agacacacag cccctgcctc 2220  
tgtaggagac tgcctgttc tgtgagcgcc cctgtctcc cgacctcat gccactcgg 2280  
gggcatgcct gcaggtcgc tctagaggat ccccggtac cgagctcga ttcactgatg 2340  
atatcagatc tgccggtctc cctatagtga gtcgtattaa ttctgataag ccaggttaac 2400  
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgtcttcc 2460  
gcttctcgc tactgactc gctgcgctc gtcgttcggc tgcggcgcgc ggtatcagct 2520  
cactcaaagg  
cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 2580  
tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 2640  
cataggtctc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 2700  
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 2760  
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct ttctccctc gggaagcgtg 2820  
gcgctttctc aatgctcac ctgtaggat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 2880  
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgt gcgccttacc cggtaactat 2940  
  
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 3000  
aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 3060  
tacggctaca ctagaaggac agtatttgt atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 3120  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 3180  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc 3240  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat ttggtcatg 3300  
agattatcaa aaaggatctt cactagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca  
3360  
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 3420  
cctatctcag cgatctgtc atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag 3480  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 3540  
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 3600  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgtg ccgggaagct 3660  
agagtaagta gttcgccagt taatagttg cgcaacgtt ttgccattgc tacaggcatc 3720  
tggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca  
acgatcaagg 3780  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tctccgac 3840  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcatgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 3900  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 3960  
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 4020  
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 4080  
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 4140  
cccaactgat cttcagcatc ttttacttt accagcgtt  
ctgggtgagc aaaaacagga 4200  
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 4260  
ttctttttc aatattatg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 4320  
tttgaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttcgc gcacatttc ccgaaaagt 4380  
ccactgacg tctaagaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 4440  
acgagccct ttcgtctcgc gcgttcggg gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag 4500  
ctcccgaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtag 4560  
ggcgctcag cgggtgttgg cgggtgtcgg  
ggctggctta actatgcggc atcagagcag 4620

attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgtag aacgcggcta caattaatac 4680  
 ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact ata 4723  
 <210> 3  
 <211> 4694  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Gamma4 heavy  
 chain plasmid  
 <220>  
 <223> pG4HE  
 <400> 3  
 gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccgggcct gactttggct gggggcaggg 60  
 aggggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccagggtgcac acccaatgcc catgagccca  
 120  
 gacactggac cctgcatgga ccatcgcgga tagacaagaa ccgaggggcc tctgcgccct 180  
 gggcccagct ctgtcccaca ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca 240  
 agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagccg 300  
 ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtc tggaaactcag 360  
 gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca ggactctact 420  
 ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccttcca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca 480  
 acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgggtgag  
 aggccagcac 540  
 agggaggagg ggtgtctgct ggaagccagg ctgagccctc ctgacctggac gcaccccgcc 600  
 tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgcccatct gtctctcac ccgaggccct 660  
 ctgaccaccc cactcatgct caggagagg gtcttctgga ttttccacc aggtccggg 720  
 cagccacagg ctggatgcc ctaccccagg cctgcgcat acaggggcag gtgctgcgt 780  
 cagacctgcc aagagccata tccgggagga cctgcccct gacctaaccc caccceaaag 840  
 gccaaactct cactccctc agctcagaca cttctctcc tcccagatct gactaacctc 900  
 caatcttctc tctcagagt ccaaatatgg tcccccatgc  
 ccatcatgcc caggtaaccc 960  
 aacccaggcc tcgcccctca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag cctgcatcca 1020  
 gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcac ccacctccat ctcttctca gcacctgagt 1080  
 tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct 1140  
 cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc 1200  
 agttcaactg gtacgtggtg ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 1260  
 agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcttctcac cgtcctgcac caggactggc 1320  
 tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct  
 ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga 1380  
 aaaccatctc caaagccaaa ggtgggagcc acggggtgag agggccacat ggacagaggt 1440  
 cagctcgcc caccctctgc cctgggagtg accgtgtgc caacctctgt ccctacaggg 1500  
 cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc agggaggagat gaccaagaac 1560  
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg 1620  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1680  
 ggctccttct tctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggagggaat 1740  
 gtcttctcat gctccgtgat  
 gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1800  
 tccctgtctc tgggtaaatg agtgccaggg ccggcaagcc cccgtcccc gggctctcgg 1860  
 ggtcgccgga ggaatgcttg cactgacccc gtctacatac ttcccaggca cccagcatgg 1920  
 aaataaagca cccaccctg cctgggccc ctgtgagact gtatggttc ttccacggg 1980  
 tcaggccgag tctgaggcct gactgacatg agggaggcag agcgggtccc actgtccca 2040  
 cactgcccga ggctgtgcag gtgtgcctgg gccacctagg gtggggctca gccaggggct 2100  
 gccctcgga ggtggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca gctgccttg 2160  
 gctgggcccac  
 gggaagccct aggagccctt ggggacagac acacagcccc tgcctctgta 2220  
 ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgcccc cccatgccca ctggggggga 2280  
 tccccgggta ccgagctcga attcatgat gatatcagat ctgccgtct ccctatagt 2340

agtcgtatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 2400  
gagagcggtt ttgcgtattg ggcgtctctc cgtttctctg ctactgact cgctgcgctc 2460  
ggctgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tctactcaaag gcggtaatat ggttatccac 2520  
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 2580

ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggtct cgcctccctg acgagcatca 2640  
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 2700  
gtttccccc tgaagctccc tctgtcgtc tctgttccg accctgccgc ttaccggata 2760  
cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct caatgctcac gctgtaggta 2820  
tctcagttcg gtgtaggctg ttcgtcccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca 2880  
gccccaccgc tgcgccttat ccgtaacta tctcttgag tccaacccgg taagacacga 2940  
cttatcgcca ctggcagcag ccaatggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg

3000

tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060  
tatctgcgt ctgtgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct ctgtatccgg 3120  
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180  
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcatgtgaa 3240  
cgaaaactca cgtaaggga ttttggatcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300  
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 3360  
tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc

tatttcgttc 3420

atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480  
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga ccacgctca ccggtccag atttatcagc 3540  
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3600  
catccagctc attaatgttt gccgggaagc tagagtaagt agttcgcag ttaatagttt 3660  
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgtcgtcgt ttggtatggc 3720  
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 3780  
aaaagcgggt agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga

agtaagttgg ccgagtggt 3840

atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat ccgtaaatg 3900  
cttttctgtg actggtagt actcaacaa gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc 3960  
gagttgctct tgcccggtc caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa 4020  
agtgtcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 4080  
gagatccagt tcgatgtaac ccaactgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 4140  
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag 4200  
ggcgacacgg aatgttgaa tactcact

cttcttttt caatattatt gaagcattta 4260

tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 4320  
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 4380  
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 4440  
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta 4500  
agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgctca gcgggtgtg gcgggtgtcg 4560  
gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatggacat 4620  
attgtcgtta gaacgcggct

acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt 4680

taggtgacac tata 4694

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for  
region 5' of V kappa 01

<400> 4

ccacccata aacactgatt c 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for  
 region 5' of V  
 kappa 01  
 <400> 5  
 ttgatgcattc ctaccaggg c 21  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for V  
 kappa L24 and L25 intergenic region  
 <400> 6  
 cctgccttac agtgctgtag 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for V  
 kappa L24 and L25 intergenic  
 region.  
 <400> 7  
 ggacagcaac aggacatggg 20  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer neo  
 <400> 8  
 ctcgtgcttt acggtatcgc c 21  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 5'EC1  
 <400> 9  
 aaactcgacc cccgtggat c 21  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 3'EC1  
 <400> 10  
 ttgactgtgg ccttaaacgt gtag 24