



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0097156
(43) 공개일자 2013년09월02일

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 $A01K$ 67/027 (2006.01) $C12N$ 5/10 (2006.01)
 $C12N$ 15/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7003807
 (22) 출원일자(국제) 2011년07월26일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년02월14일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/045333
 (87) 국제공개번호 WO 2012/018610
 국제공개일자 2012년02월09일
 (30) 우선권주장
 61/367,809 2010년07월26일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 트리아니, 인코포레이티드
 미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴
 1515 (우: 94122)
 (72) 발명자
 와블, 마티아스
 미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴
 1515 (우: 94122)
 킬린, 니겔
 미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴
 1515 (우: 94122)
 (74) 대리인
 특허법인 남앤드남</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

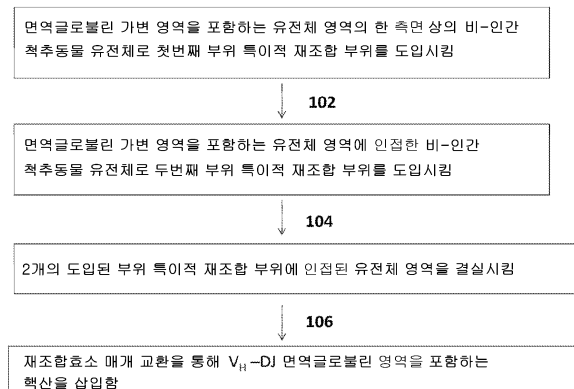
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 **트랜스제닉 동물 및 이의 사용 방법**

(57) 요약

본 발명은 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 유전체를 갖는 비-인간 척추동물 세포 및 비-인간 포유동물을 포함하며, 상기 도입된 영역은 인간 V_H 코딩 서열 및 비-인간 포유동물의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 V_H 서열을 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

비-인간 척추동물 숙주 내에 도입된 번역글로불린 영역을 포함하는 유전체를 갖는 트랜스제닉 비-인간 포유동물로서, 상기 도입된 영역이 인간 번역글로불린 가변 영역 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 번역글로불린 가변 영역 유전자좌를 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는, 트랜스제닉 비-인간 포유동물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 비-인간 척추동물 숙주의 번역글로불린 가변 영역 유전자좌 내의 내인성 가변 유전자의 일부 또는 전부가 제거된 트랜스제닉 동물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 도입된 번역글로불린 영역 유전자좌가 인간 V_H 코딩 서열을 포함하는 트랜스제닉 동물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 트랜스제닉 동물이 인간 D 및 J 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 서열을 추가로 포함하는 트랜스제닉 동물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 내인성 V_H , D 및 J 서열의 일부 또는 전부가 척추동물 숙주 유전체로부터 결실된 트랜스제닉 동물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 척추동물 숙주가 설치류인 트랜스제닉 동물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 척추동물 숙주가 마우스인 트랜스제닉 동물.

청구항 8

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 척추동물 숙주가 닭인 트랜스제닉 동물.

청구항 9

부분적 인간 번역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

a) 비-인간 척추동물 세포로 2개 이상의 재조합효소 표적화 부위를 도입시키고, 세포 유전체 업스트림 내의 적어도 하나의 부위 및 내인성 번역글로불린 가변 유전자를 포함하는 유전체 영역의 다운스트림의 적어도 하나의 부위를 통합시키는 단계; 및

b) 재조합효소 매개 교환을 통해 인간 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 번역글로불린 가변 영역 유전자좌를 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 번역글로불린 가변 영역 유전자좌를 비-인간 척추동물 숙주 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 부분적 인간 번역글로불린 영역이 단일 핵산 영역으로서 도입되는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 부분적 인간 번역글로불린 영역이 비-인간 숙주로 도입시키기 전에 단일한 핵산으로서 합성

되는 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 2개 이상의 연속 핵산 영역으로서 도입되는 방법.

청구항 13

제 9항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 가변 유전자 영역이 V_H 유전자 영역인 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이, i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제 9항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합효소 표적화 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 서열의 다운스트림에 도입되는 방법.

청구항 16

제 9항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합효소 부위에 하나 이상의 선택 마커가 도입되는 방법.

청구항 17

제 9항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 단계 b) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접(flanking)된 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 18

제 9항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 척추동물 세포가 포유동물 배아 줄기(ES) 세포인 방법.

청구항 19

제 9항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 척추동물 세포가 조류 원시종자세포(primordial germ cell)인 방법.

청구항 20

제 9항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 21

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

a) 서로 재조합될 수 없는 2개 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 비-인간 척추동물 숙주의 세포의 유전체로 도입시키는 단계로서, 여기서 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 영역의 업스트림에 도입되고, 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 영역의 다운스트림에 도입되는 단계;

b) i) 인간 V_H 코딩 서열, 및 ii) 내인성 V_H 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 제공하는 단계로서, 여기서 부분적 인간 영역이 단계 a)의 숙주 세포의 내인성 V_H 면역글로불린 영역에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;

c) 단계 b)의 벡터 및 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; 및

d) 단계 a)의 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 V_H 면역글로불린 영역을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 첫번째 재조합효소 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전체 영역의 업스트림에 도입되고, 두번째 재조합효소 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전체 영역의 다운스트림에 도입되는 방법.

청구항 23

제 21항 또는 제 22항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제 21항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 단계 c) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접된 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 25

제 21항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 배아 줄기(ES) 세포인 방법.

청구항 26

제 21항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 27

부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

a) 서로 재조합될 수 없는 2개 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 비-인간 척추동물 숙주의 세포의 유전체로 도입시키는 단계로서, 여기서 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 V_L 면역글로불린 영역의 업스트림에 도입되고, 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 V_L 면역글로불린 영역의 다운스트림에 도입되는 단계;

b) i) 인간 V_L 코딩 서열, 및 ii) 내인성 V_L 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 제공하는 단계로서, 여기서 부분적 인간 영역이 단계 a)의 숙주 세포의 내인성 V_L 면역글로불린 영역에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;

c) 단계 b)의 벡터 및 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; 및

d) 단계 a)의 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 V_L 면역글로불린 영역을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

제 27항에 있어서, 첫번째 재조합효소 부위가 내인성 V_L 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전체 영역의 업스트림에 도입되고, 두번째 재조합효소 부위가 내인성 V_L 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전체 영역의 다운스트림에 도입되는 방법.

청구항 29

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 i) 인간 J_L 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 J_L 유전자 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제 27항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 단계 c) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인

접된 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 31

제 27항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 배아 줄기(ES) 세포인 방법.

청구항 32

제 27항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조류 원시종자세포인 방법.

청구항 33

제 27항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 34

트랜스제닉 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없고, 숙주 유전체의 내인성 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 2 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 포함하는 유전체를 갖는 비-인간 척추동물 세포를 제공하는 단계;
- b) 첫번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 인지하는 재조합효소의 도입에 의해 유전체의 내인성 면역글로불린 영역의 일부를 결실시키는 단계로서, 유전체에서의 상기 결실이 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 보유하는 단계;
- c) 인간 코딩 서열 및 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위에 인접된 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역 가변 영역 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계;
- d) 단계 c)의 벡터 및 두번째 세트의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; 및
- e) 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌로 대체시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 V_H 코딩 영역을 포함하고, 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제 34항 또는 제 35항에 있어서, 상기 방법이 단계 c) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접된 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 37

제 34항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 배아 줄기(ES) 세포인 방법.

청구항 38

제 34항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조류 원시종자세포인 방법.

청구항 39

제 34항 내지 제 37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 40

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없는 2개의 부위 특이적 재조합 부위를 비-인간 척추동물 숙주의 세포의 유전체로 도입시키는 단계;
- b) i) 인간 V_H 코딩 서열, 및 ii) 내인성 V_H 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 여기서 부분적 인간 영역이 단계 a)의 숙주 세포의 유전체 내의 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;
- c) 단계 b)의 벡터 및 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; 및
- d) 단계 a)의 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 V_H 면역글로불린 영역을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제 40항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 42

제 40항 또는 제 41항에 있어서, 상기 방법이 단계 c) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접되는 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 43

제 40항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 배아 줄기(ES) 세포인 방법.

청구항 44

제 40항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조류 원시종자세포인 방법.

청구항 45

제 40항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 46

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 포유동물 세포를 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없고, 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 2개의 부위 특이적 재조합 부위를 함유하는 유전체를 갖는 비-인간 포유동물 배아 줄기(ES) 세포를 제공하는 단계;
- b) 인간 V_H 코딩 서열 및 내인성 V_H 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 부분적 인간 영역이 ES 세포 내의 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;
- c) ES 세포 및 상기 벡터를 재조합 사건을 촉진시키기에 적절한 조건하에서 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소와 접촉시켜, ES 세포에서 면역글로불린 영역의 내인성 부분을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제 46항 또는 제 47항에 있어서, 상기 방법이 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하고, 이러한 세포를 분리시키는 것을 추가로 제공하는 방법.

청구항 49

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없는 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 비-인간 척추동물 숙주의 세포의 유전체에 도입시키는 단계;
- b) i) 인간 V_H 코딩 서열, 및 ii) 내인성 V_H 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 여기서 부분적 인간 영역이 단계 a)의 숙주 세포의 유전체에 도입된 것과 동일한 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;
- c) 단계 b)의 벡터 및 1개 세트의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계;
- d) 단계 a)의 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 V_H 면역글로불린 영역을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계;
- e) 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하는 단계; 및
- f) 상기 세포를 이용하여 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물을 생성시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제 49항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제 49항 또는 제 50항에 있어서, 부위 특이적 재조합 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 서열의 다운스트림에 도입되는 방법.

청구항 52

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없고, 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 일부에 인접한 2개의 부위 특이적 재조합 부위를 함유하는 유전체를 갖는 비-인간 포유동물 배아 줄기(ES) 세포를 제공하는 단계;
- b) 인간 코딩 서열 및 내인성 면역글로불린 가변 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 부분적 인간 영역이 ES 세포에서 내인성 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;
- c) 상기 ES 세포 및 상기 벡터를 재조합 사건을 촉진시키기에 적절한 조건하에서 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소와 접촉시켜, ES 세포에서 면역글로불린 영역의 내인성 부분을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계;
- d) 핵산의 대체된 부분을 포함하는 ES 세포를 선택하고, 상기 배아 줄기 세포를 이용하는 단계; 및
- e) 상기 세포를 이용하여 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물을 생성시켜 이형접합의 부분적 인간 포유동물을 생성시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 53

제 52항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 인간 V_H 코딩 서열, 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 비-

인간 포유동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 포함하는 방법.

청구항 54

제 52항 또는 제 53항에 있어서, 부위 특이적 재조합 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 서열의 다운스트림에 도입되는 방법.

청구항 55

부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 척추동물을 생성시키는 방법으로서,

- a) 서로 재조합될 수 없고, 숙주 유전체의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 일부에 인접한 2 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 포함하는 유전체를 갖는 비-인간 척추동물 세포를 제공하는 단계;
- b) 첫번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 인지하는 재조합효소의 도입에 의해 숙주 유전체의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 일부를 결실시키는 단계로서, 유전체에서의 상기 결실이 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 보유하는 단계;
- c) 인간 코딩 서열 및 내인성 면역글로불린 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 코딩 및 비-코딩 서열이 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위에 인접되는 단계;
- d) 단계 c)의 벡터 및 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계;
- e) 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생되도록 하여, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계;
- f) 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 세포를 선택하는 단계; 및
- g) 상기 세포를 이용하여 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물을 생성시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 56

제 55항에 있어서, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 인간 V_H 코딩 영역, 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 포함하는 방법.

청구항 57

제 55항 또는 제 56항에 있어서, 부위 특이적 재조합 부위가 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 서열의 다운스트림에 도입되는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원의 전후 참조

[0002] 본 출원은 2010년 7월 26일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/367,809호를 우선권으로 주장하며, 이는 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 트랜스제닉 척추동물, 더욱 특히 인간 치료제의 개발을 위한 트랜스제닉 척추동물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 하기 논의에서, 배경 및 서론의 목적으로 특정 문헌 및 방법이 기재될 것이다. 본원에 포함된 어느 것도 종래 분야의 "시인(admission)"으로 간주되어선 안된다. 본 발명자는 적절한 경우 본원에 참조된 문헌 및 방법이 적

용가능한 법정 규정하에서 종래 분야를 구성하지 않는 것을 입증할 권리를 명백히 유보한다.

- [0007] 인간 및 마우스 면역글로불린을 엔코딩하는 유전자는 광범위하게 특성규명되어 있다. 문헌[Berman et al. (1988) EMBO J. 7:727-738]에는 $V_{H,D}$ 및 J_H 유전자 세그먼트를 포함하는 인간 Ig V_H 유전자좌가 기재되어 있다. 문헌[Sakano et al. (1981) Nature 290:562-565]에는 면역글로불린 중쇄 유전자의 다양한 세그먼트가 기재되어 있다. 문헌[Blankenstein and Kruwink (1987) Eur. J. Immunol. 17:1351-1357]에는 마우스 가변 중쇄 영역이 기재되어 있다. 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 변경된 면역글로불린 유전자좌를 갖는 마우스의 발생은 다양한 연구 및 개발 응용분야, 예를 들어, 약물 발견 및 다양한 생물학적 시스템에 대한 기본적인 연구에서의 상기 트랜스제닉 동물의 사용을 가능케 한다. 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스의 발생은 국제출원 WO 90/10077호 및 WO 90/04036호에 기재되어 있다. WO 90/04036호에는 통합된 인간 면역글로불린 "미니(mini)" 유전자좌를 갖는 트랜스제닉 마우스가 기재되어 있다. WO 90/10077호에는 트랜스제닉 동물을 발생시키는데 사용하기 위한 면역글로불린 우세 조절 영역을 함유하는 벡터가 기재되어 있다.
- [0008] 약물 발견 목적을 위한 부분적 또는 완전한 인간 항체를 생성시키기 위해 내인성 마우스 면역글로불린 영역을 인간 면역글로불린 서열로 대체시키는 다수의 방법이 개발되었다. 상기 마우스의 예는, 예를 들어, 미국 특허번호 7,145,056호; 7,064,244호; 7,041,871호; 6,673,986호; 6,596,541호; 6,570,061호; 6,162,963호; 6,130,364호; 6,091,001호; 6,023,010호; 5,593,598호; 5,877,397호; 5,874,299호; 5,814,318호; 5,789,650호; 5,661,016호; 5,612,205호; 및 5,591,669호에 기재된 것을 포함한다. 완전히 인간화된 면역글로불린 마우스 중 다수는 덜 효과적인 V(D)J 재조합, 및 부분적 유전자 상보체(complement)로부터 야기되는 제한된 항체 생성으로 인해 정상적인 비율보다 낮은 항체 생성을 갖는다. 마우스 코딩 서열이 인간 서열로 교환된(swapped) 다른 인간화된 면역글로불린 마우스는 개별적 마우스 엑손을 동염색체 인간 대응부(counterpart)로 대체시키는 방법으로 인해 생성이 매우 시간 소모적이고 고비용이다.
- [0009] 상기에 기초하여, 인간 항체를 효과적으로 생성시키는 유효하고 비용-효과적인 방법이 필요한 것이 명백하다. 더욱 특히, 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 및 항원에 적절히 반응하는 능력을 갖는 트랜스제닉 동물이 당 분야에 필요하다.

- [0010] 상기 목적에 따라, 인간 V 영역을 갖는 항체를 생성시킬 수 있는 트랜스제닉 비인간 동물이 제공된다.

발명의 내용

[0011] 발명의 개요

- [0012] 이러한 개요는 하기 상세한 설명에서 추가로 기재되는 간소화된 형태의 개념의 선택을 소개하기 위해 제공된다. 이러한 개요는 청구된 주제의 중요하거나 본질적인 특징을 확인하고자 하는 것이 아니며, 청구된 주제의 범위를 제한하기 위해 이용되는 것도 아니다. 청구된 주제의 다른 특징, 세부사항, 유용성, 및 장점은 수반되는 도면에 예시되고, 첨부된 청구항에서 정의된 양태를 포함하는 하기 기재되는 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.
- [0013] 본 발명은 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 유전체를 갖는 비-인간 척추동물 세포 및 비-인간 척추동물을 포함하며, 상기 도입된 영역은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌 코딩 서열 및 비-인간 척추동물의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 기초로 한 비-코딩 서열을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 트랜스제닉 세포 및 동물은 내인성 면역글로불린 영역의 일부 또는 전부가 제거된 유전체를 갖는다.
- [0014] 최소한, 비-인간 척추동물에서의 인간 모노클로날 항체의 생성은, 숙주가 인간 중쇄 면역글로불린 단백질을 발현하는 적어도 하나의 유전자좌, 및 인간 경쇄 면역글로불린 단백질을 발현하는 하나의 유전자좌를 갖는 것을 필요로 한다.
- [0015] 일부 양태에서, 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌는 인간 V_H 코딩 서열 및 비-인간 척추동물의 내인성 V_H 영역을 기초로 한 비-코딩 V_H 서열을 포함한다. 이러한 양태에서, 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌는 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 서열을 추가로 포함한다.
- [0016] 다른 양태에서, 면역글로불린 영역은 인간 V_L 코딩 서열 및 비-인간 척추동물의 내인성 V_L 영역을 기초로 한 비-코딩 V_L 서열을 포함하는 도입된 영역을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 인간 V_L 코딩 서열을 포함하는 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역은 인간 J 유전자 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초

로 한 비-코딩 J 유전자 서열을 추가로 포함한다.

- [0017] 특정 양태에서, 척추동물은 포유동물이고, 바람직하게는, 포유동물은 설치류, 예를 들어, 마우스 또는 래트이다. 다른 양태에서, 척추동물은 조류, 예를 들어, 닭이다.
- [0018] 한 특정 양태에서, 본 발명은 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 발생시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은, a) 비-인간 척추동물 세포로 2개 이상의 재조합효소 표적화 부위를 도입시키고, 세포 유전체 업스트림 내의 적어도 하나의 부위 및 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 유전체 영역의 다운스트림의 적어도 하나의 부위를 통합시키는 단계; 및 b) 재조합효소 매개 교환을 통해 인간 면역글로불린 가변 영역 코딩 서열 및 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 면역글로불린 가변 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 비-인간 척추동물 숙주 세포 내로 도입시키는 단계를 포함한다.
- [0019] 상기 방법의 한 특정 양태에서, 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역은 인간 V_H 유전자 코딩 영역을 포함하고, i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함한다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 바람직하게는 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 영역의 다운스트림에 도입되는 재조합효소 표적화 부위를 이용하여 숙주 세포로 도입된다.
- [0020] 다른 양태에서, V_H 유전자 코딩 영역은 다른 공급원으로부터 유래(적어도 부분적으로 유래)되고, 예를 들어, 이들은 이론적 또는 달리 설계된 서열, 인간 및 다른 설계된 서열의 조합물인 서열, 또는 다른 중, 예를 들어, 비-인간 영장류로부터의 서열일 수 있다.
- [0021] 또 다른 특정 양태에서, 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역은 인간 V_L 유전자 코딩 영역을 포함하고, i) 인간 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 J 유전자 서열을 추가로 포함한다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 바람직하게는 내인성 V_L 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 J 영역의 다운스트림에 도입되는 재조합효소 표적화 부위를 이용하여 숙주 세포에 도입된다.
- [0022] 바람직하게는, 부분적 인간 면역글로불린 영역은 단일 핵산으로 합성되고, 단일 핵산 영역으로서 비-인간 척추동물 숙주 세포에 도입된다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 또한 2개 이상의 연속적 세그먼트로 합성될 수 있고, 상기 별개의 세그먼트로 척추동물 숙주 세포에 도입될 수 있다. 부분적 인간 핵산은 또한 재조합 방법을 이용하여 생성될 수 있고, 비-인간 척추동물 숙주 세포로의 핵산의 도입 전에 분리될 수 있다.
- [0023] 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 방법은 단계 b) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접한 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공한다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 생성시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은, a) 서로 재조합될 수 없는 2개 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 비-인간 척추동물 숙주의 세포의 유전체로 도입시키는 단계로서, 여기서 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 업스트림에 도입되고, 적어도 하나의 재조합 부위가 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 다운스트림에 도입되는 단계; b) i) 인간 면역글로불린 가변 영역 코딩 서열, 및 ii) 내인성 면역글로불린 가변 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 제공하는 단계로서, 여기서 부분적 인간 영역이 단계 a)의 숙주 세포의 내인성 가변 면역글로불린 영역에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접하게 되는 단계; c) 단계 b)의 벡터 및 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; 및 d) 단계 a)의 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 영역 사이에 재조합 사건이 발생하도록 하여, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 부분적 인간 면역글로불린 영역 유전자좌로 대체시키는 단계를 포함한다. 상기 방법의 한 특정 양태에서, 부분적 인간 면역글로불린 영역은 V_H 면역글로불린 유전자 코딩 서열을 포함하며, i) 인간 D 및 J 유전자 코딩 서열 및 ii) 비-인간 척추동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 비-코딩 D 및 J 유전자 및 프리-DJ 서열을 추가로 포함한다. 재조합효소 표적화 부위는 내인성 V_H 면역글로불린 유전자의 업스트림 및 내인성 D 및 J 유전자 서열의 다운스트림에 도입된다.
- [0025] 상기 방법의 또 다른 특정 양태에서, 상기 방법은 단계 c) 전에 2개의 도입된 재조합효소 부위에 인접한 유전체 영역을 결실시키는 것을 추가로 제공한다.

합 부위를 보유하는 단계; c) 인간 코딩 서열 및 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위에 인접한 내인성 면역 글로불린 가변 영역 유전자좌를 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계; d) 단계 c)의 벡터 및 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입시키는 단계; e) 세포의 유전체와 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 사이에 재조합 사건이 발생하도록 하여, 내인성 면역글로불린 영역을 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역으로 대체시키는 단계; f) 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 세포를 선택하는 단계; 및 g) 상기 세포를 이용하여 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물을 발생시키는 단계를 포함한다.

[0033] 본 발명은 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 발생시키는 또 다른 방법을 제공하며, 상기 방법은, a) 서로 재조합될 수 없고, 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 2개의 부위 특이적 재조합 부위를 함유하는 유전체를 갖는 비-인간 포유동물 배아 줄기(ES) 세포를 제공하는 단계; b) 인간 가변 코딩 서열 및 내인성 가변 유전자 영역을 기초로 한 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 부분적 인간 영역이 ES 세포에서 면역글로불린 영역의 일부에 인접한 동일한 2개의 부위 특이적 재조합 부위에 인접하게 되는 단계; c) 상기 ES 세포 및 상기 벡터를 재조합 사건을 촉진하기에 적절한 조건하에서 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소와 접촉시켜, ES 세포에서 면역글로불린 영역의 내인성 부분을 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 단계; d) 핵산의 대체된 부분을 포함하는 ES 세포를 선택하고, 상기 배아 줄기 세포를 이용하는 단계; 및 e) 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 포함하는 트랜스제닉 동물을 생성시키기 위해 상기 세포를 이용하여 이형접합의 부분적 인간 동물을 발생시키는 단계를 포함한다.

[0034] 본 발명의 한 특정 양태에서, 트랜스제닉 비-인간 척추동물은 포유동물이고, 바람직하게는 포유동물은 설치류, 예를 들어, 마우스 또는 래트이다. 다른 양태에서, 트랜스제닉 비-인간 척추동물은 조류, 예를 들어, 닭이다.

[0035] 인간 가변 영역 코딩 서열 및 내인성 숙주 유전체를 기초로 한 비-코딩 서열을 갖는 도입된 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 발현하는 비-인간 척추동물 세포 및 비-인간 트랜스제닉 포유동물을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

[0036] 추가로, 인간 V_H 서열을 갖는 부분적 인간 항체를 발현할 수 있는 트랜스제닉 동물로부터 B-세포를 제공하는 것이 목적이며, 여기서 상기 B-세포는 특정 항원에 특이적인 모노클로날 항체의 공급원을 제공하기 위해 무한증식된다.

[0037] 진단 및 치료적 용도를 위한 항체의 생성 및/또는 최적화에서 사용하기 위한 B 세포로부터 클로닝된 인간 가변 영역을 제공하는 것이 또 다른 목적이다.

[0038] 인간 가변 영역 서열을 갖는 부분적 인간 모노클로날 항체를 생성시킬 수 있는 하이브리도마 세포를 제공하는 것이 본 발명의 추가 목적이다.

[0039] 상기 및 기타 양태, 목적 및 특징은 하기에서 보다 상세히 기재된다.

[0040] 도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 본 발명의 바람직한 구체예로부터의 한 예시적 방법을 기재하는 흐름도를 예시한다.

[0042] 도 2는 상동성 표적화 벡터를 통한 비-인간 포유동물 세포의 유전체로의 첫번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.

[0043] 도 3은 상동성 표적화 벡터를 통한 비-인간 포유동물 세포의 유전체로의 첫번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위의 도입을 예시하는 또 다른 개략적 도표이다.

[0044] 도 4는 상동성 표적화 벡터를 통한 비-인간 포유동물 세포의 유전체로의 두번째 세트의 부위 특이적 재조합 부위의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.

[0045] 도 5는 숙주 세포의 내인성 면역글로불린 영역의 결실을 예시하는 개략적 도표이다.

[0046] 도 6은 부위 특이적 표적화 벡터를 통한 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.

[0047] 도 7은 부위 특이적 표적화 벡터를 이용한 추가의 마우스 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.

- [0048] 도 8은 마우스 중쇄 영역으로의 추가적 마우스 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.
- [0049] 도 9는 마우스 카파 영역으로의 추가적 마우스 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.
- [0050] 도 10은 마우스 람다 영역으로의 추가적 마우스 서열을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.
- [0051] 도 11은 부위 특이적 표적화 벡터를 통한 인간 V_H 미니유전자(minigene)를 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 개략적 도표이다.
- [0052] **정의**
- [0053] 본원에서 사용되는 용어는 당업자에 의해 이해되는 것과 같은 분명하고 통상적인 의미를 갖는다. 하기 정의는 독자가 본 발명을 이해하는 것을 돕기 위한 것으로, 특별히 지정하지 않는 한 상기 용어의 의미를 변화시키거나 달리 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0054] 본원에서 사용되는 "부분적 인간"은 인간 및 비-인간 포유동물 둘 모두로부터의 서열을 갖는 핵산 또는 인간 및 비-인간 포유동물 둘 모두로부터의 서열을 갖는 핵산을 포함하는 동물을 의미한다. 본 발명의 부분적 인간 서열의 상황에서, 부분적 인간 핵산은 인간 면역글로불린 코딩 영역의 서열 및 비-인간 포유동물의 내인성 면역글로불린 영역의 비-코딩 서열을 기초로 한 서열을 갖는다. 비-인간 포유동물로부터의 내인성 비-코딩 서열에 대한 언급과 함께 사용되는 경우의 용어 "기초로 한"은 비-코딩 서열에 해당하고, 숙주 포유동물, 예를 들어, ES 세포가 유래되는 포유동물의 내인성 유전자좌의 비-코딩 서열과 비교적 높은 정도의 상동성을 공유하는 서열을 의미한다. 바람직하게는, 비-코딩 서열은 비-코딩 서열을 포함하는 부분적 인간 분자가 도입되는 비-인간 척추동물 숙주 세포의 내인성 유전자좌에서 발견되는 상응하는 비-코딩 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는, 90%의 상동성을 공유한다.
- [0055] 용어 "상동성 표적화 벡터"는 숙주 세포에서 상동성 매개 재조합을 이용하여 면역글로불린 영역을 변형시키는데 사용되는, 표적화 서열을 엔코딩하는 핵산, 부위 특이적 재조합 부위, 및 임의로 선택 마커 유전자를 포함하는 벡터를 의미한다. 예를 들어, 상동성 표적화 벡터는 숙주 세포 유전체의 특정 영역으로 부위 특이적 재조합 부위를 도입시키기 위해 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0056] 본원에서 사용되는 용어 "면역글로불린 가변 영역"은 항체 분자의 가변 영역의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 항체 분자의 발현을 조절하는 조절 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부를 의미한다. 중쇄에 대한 면역글로불린 영역은 V, D, J의 전부 또는 일부, 및 인트론을 포함하는 스위치(switch) 영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 경쇄에 대한 면역글로불린 영역은 경쇄 불변 영역 유전자와 관련되거나 이에 근접한 V 및 J 영역, 이들의 업스트림에 인접한 서열, 인트론을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0057] "부위 특이적 재조합"은 a) 재조합 부위에 인접한 미리 선택된 핵산의 결실, b) 재조합 부위에 인접한 미리 선택된 핵산의 뉴클레오타이드 서열의 역전(inversion), 및 c) 다양한 핵산 분자에 위치된 재조합 부위에 인접한 핵산 영역의 상호 교환의 3 사건 중 임의의 것을 포함하는, 2개의 양립되는 재조합 부위 사이의 재조합의 과정을 의미한다. 핵산 세그먼트의 상기 상호 교환은 핵산 분자 중 하나 또는 둘 모두가 원형인 경우에 통합 사건을 발생시키는 것이 이해되어야 한다.
- [0058] 용어 "표적화 서열"은 변형되는 면역글로불린 영역에 인접하거나 이에 근접하여 발생하는 세포의 유전체 내의 DNA 서열에 상동성인 서열을 의미한다. 인접하거나 근접한 서열은 유전자좌 자체 내에 존재할 수 있거나, 숙주 세포의 유전체 내의 코딩 서열의 업스트림 또는 다운스트림에 존재할 수 있다. 표적화 서열은 트랜스펙션시키는데 사용되는 재조합 DNA 벡터에 삽입되어, 세포 유전체에 삽입되는 서열, 예를 들어, 재조합 부위의 서열은 상기 벡터의 표적화 서열에 인접하게 된다.
- [0059] 본원에서 사용되는 용어 "부위 특이적 표적화 벡터"는 재조합효소 매개 부위 특이적 재조합을 이용하여 숙주에서 내인성 면역글로불린 영역을 변형시키는데 사용되는, 부위 특이적 재조합 부위를 엔코딩하는 핵산, 부분적 인간 핵산, 및 임의로 선택 마커 유전자를 포함하는 벡터를 의미한다. 표적화 벡터의 재조합 부위는 변형되는 면역글로불린 영역에 인접한 숙주 세포의 유전체 서열에 삽입(예를 들어, 상동성 표적화 벡터를 통한)되는 또 다른 상응하는 재조합 부위와의 부위 특이적 재조합에 적합하다. 면역글로불린 영역 내의 재조합 부위로의 부

분적 인간 서열의 통합은 도입된 부분적 인간 영역에 의한 내인성 영역의 대체를 발생시킨다.

[0060] 용어 "트랜스진(transgene)"은 세포, 특히 척추동물 숙주 동물의 세포의 유전체로 인공적으로 삽입되었거나 삽입되는 유전 물질을 기재하는데 본원에서 사용된다. 본원에서 사용되는 용어 "트랜스진"은 부분적 인간 핵산, 예를 들어, 발현 작제물 및/또는 표적화 벡터의 형태의 부분적 인간 핵산을 의미한다.

[0061] "트랜스제닉 동물"은 세포의 일부 내에 염색체의 인자로 존재하거나, 종자세포(germ line) DNA로 안정적으로 통합(즉, 상기 트랜스제닉 동물 세포 대부분 또는 전부의 유전체 서열 내)된 외인성 핵산 서열을 갖는 비-인간 동물, 보통 포유동물을 의미한다. 본 발명에서, 부분적 인간 핵산은 당 분야에 널리 공지된 방법에 따라, 예를 들어, 숙주 동물의 배아 또는 배아 줄기 세포의 유전적 조작에 의해 상기 트랜스제닉 동물의 종자세포에 도입된다.

[0062] "벡터"는 자가 복제되거나 그렇지 않은 간에 세포를 형질전환시키거나 트랜스펙션시키는데 사용될 수 있는 플라스미드 및 바이러스 및 임의의 DNA 또는 RNA 분자를 포함한다.

[0063] 발명의 상세한 설명

[0064] 본원에 기재된 기술의 실시는 달리 지정되지 않는 한 당업자의 기술 범위 내의 유기 화학, 중합체 기술, 분자생물학(재조합 기술을 포함함), 세포생물학, 생화학 및 시퀀싱 기술의 통상적인 기술 및 기재를 이용할 수 있다. 이러한 통상적인 기술은 중합체 어레이 합성, 폴리뉴클레오티드의 하이브리드화 및 라이게이션, 및 라벨을 이용한 하이브리드화의 검출을 포함한다. 적합한 기술의 특정 예시는 본원의 실시예가 참조될 수 있다. 그러나, 물론 다른 동등한 통상적인 절차가 또한 사용될 수 있다. 이러한 통상적인 기술 및 기재는 표준 실험 매뉴얼, 예를 들어, 문헌[Green, et al., Eds. (1999), *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), *Genetic Variation: A Laboratory Manual*; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2003), *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Bowtell and Sambrook (2003), *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*; Mount (2004), *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*; Sambrook and Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 및 Sambrook and Russell (2002), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (모두 Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, *"Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach"* 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry* 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.]에서 발견될 수 있고, 이들 모두는 모든 목적상 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

[0065] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 문맥이 명백히 달리 기재하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함함을 주의하라. 따라서, 예를 들어, "유전자좌"에 대한 언급은 하나 이상의 유전자좌를 의미하고, "방법"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 동등한 단계들 및 방법들에 대한 언급 등을 포함한다.

[0066] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 간행물은 현재 기재된 발명과 함께 사용될 수 있는 장치, 포물레이션 및 방법을 기재하고 개시하기 위한 목적으로 참조로서 포함된다.

[0067] 일정 범위의 값이 제공되는 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 사이에 존재하는 값 및 상기 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급되거나 사이에 존재하는 값이 본 발명에 포함되는 것이 이해된다. 상기 범위의 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 이러한 보다 작은 범위 내에서 독립적으로 포함될 수 있고, 이는 또한 상기 언급된 범위에서 임의의 특별히 배제되는 한계에 종속되는 본 발명에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 상기 포함된 한계 둘 중 어느 하나를 배제하는 범위가 또한 본 발명에 포함된다.

[0068] 하기 기재에서, 본 발명의 보다 충분한 이해를 제공하기 위해 다수의 특정 세부사항이 기재된다. 그러나, 본 발명은 상기 특정 세부사항 중 하나 이상이 없이도 실시될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 다른 예에서, 널리 공지된 특징 및 당업자에게 널리 공지된 절차는 본 발명을 불명료하게 하는 것을 피하기 위해 기재되지 않았다.

[0069] 전반적인 본 발명

[0070] 체액성 면역계에서, V(D)J 재조합으로 언급되는 과정에서 IgH (*Igh*) 및 IgL 사슬 (*Igl*) 유전자 유전자좌의 조합 및 접합 다양성에 의해 다양한 항체 레퍼토리가 생성된다. B 세포 발달에서, 중쇄 유전자좌의 하나의 D 유전자

세그먼트와 하나의 J 유전자 세그먼트 사이에서 첫번째 재조합 사건이 발생되고, 상기 두 유전자 사이의 DNA가 결실된다. 이러한 D-J 재조합 후에 새로이 형성된 DJ 복합체의 업스트림 영역으로부터 하나의 V 유전자가 연결되어 재배열된 V(D)J 유전자가 형성된다. 새로운 V(D)J 유전자의 V와 D 세그먼트 사이의 모든 다른 유전자는 이제 개별적 B 세포의 유전체로부터 결실된다. 이러한 재배열된 유전자는 궁극적으로 IgH 폴리펩티드로 B 세포 표면 상에서 발현되고, 이는 IgL과 회합되어 B 세포 수용체를 형성한다. 무린 및 인간 Ig 유전자좌는 매우 복잡하고, 약 2 Mb의 영역에 걸쳐 있으며, 여러 불변 영역 유전자 세그먼트, J 유전자 세그먼트, D 유전자 세그먼트 및 많은 수의 가변 유전자를 함유한다.

- [0071] 본 발명은 인간 가변 영역에 대한 코딩 영역 및 척추동물 숙주 유전체로부터의 비-코딩 서열, 예를 들어, 숙주 포유동물이 마우스인 경우 마우스 유전체 비-코딩 서열을 포함하는 도입된 부분적 인간 핵산을 포함하는 비-인간 척추동물 세포를 제공한다. 이러한 부분적 인간 핵산은 트랜스제닉 동물이 효과적인 항체 생성 및 항원 인지를 촉진하는 것을 돕는 특정 숙주 유전체 내의 개재 서열 내에서 발견될 수 있는 조절 서열 및 다른 구성요소를 보존하면서 인간 V_H 영역을 포함하는 중쇄 레퍼토리를 생성시키는 것을 가능케 한다. 본 발명은 V_H 유전자좌로부터의 인간 코딩 서열 및 비-인간 비-코딩 서열 둘 모두를 포함하는 합성 또는 재조합적으로 생성된 부분적 인간 영역의 사용을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 방법은 조작된 유전체 내의 부위 특이적 재조합 부위의 2개 이상의 세트를 이용할 수 있으므로, 재조합 단계는 부분적 인간 유전자좌와의 다수의 삽입이 이루어지는 것을 가능케 한다.
- [0073] 본 발명의 바람직한 양태에서, 숙주 척추동물 세포로 도입되는 상기 부분적 인간 영역은 모든 또는 많은 수의 공지된 인간 V_H 유전자를 포함한다. 그러나, 일부 예에서, 상기 V_H 유전자의 서브셋을 이용하는 것이 바람직할 수 있으며, 특정 예에서, 하나의 인간 V_H 코딩 서열만큼 소수가 본 발명의 세포 및 동물에서 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 바람직한 양태는 인간 V_H 유전자를 포함하고, D 및 J 유전자 인간 코딩 영역 및 비-인간 포유동물 숙주의 내인성 유전체를 기초로 한 프리-DJ 서열을 추가로 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비-인간 포유동물 및 포유동물 세포를 포함한다. 특정 양태에서, 도입된 부분적 인간 영역은 하나 이상의 완전히 재조합된 V(D)J 세그먼트를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 한 특정 양태에서, 트랜스제닉 비-인간 포유동물은 비-인간 포유동물 숙주 유전자좌 내의 개재 서열을 기초로 한 개재 서열과 함께 다수의 인간 V_H 유전자 및 인간 D 및 J 유전자에 대한 인간 코딩 영역을 포함하는 도입된 핵산을 포함한다. 한 특히 바람직한 양태에서, 부분적 인간 핵산은 인간 V_H 유전자, 비-인간 포유동물 숙주의 유전체, 예를 들어, 마우스 유전체를 기초로 한 프리-D 영역, 및 인간 D 및 J 엑손을 포함한다.
- [0076] 한 예시적 구체예에서, 실시예 섹션에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 마우스의 전체 내인성 V_H 면역글로불린 (J558 유전자좌를 포함함)이 결실되고, 마우스의 J558 V_H 영역 유전자좌의 V_H 엑손은 44개의 인간 V_H 유전자를 포함하는 핵산으로 대체되고, 결과로서, 마우스의 비-코딩 서열에 해당하는 비-코딩 서열이 산재된다. 완전한 도입된 면역글로불린 V_H 영역은 인간 D 및 J 엑손 뿐만 아니라 V_H 유전자를 추가로 포함한다. 이러한 양태에서, 10Kb 프리-D 영역은 마우스 서열을 포함하는 한편, D 및 J 영역은 인간 코딩 서열을 포함한다. 바람직하게는, D 및 J 영역은 인간 D 유전자 및 인간 J 유전자를 포함하는 인간 DJ 코딩 영역으로 제공된다.
- [0077] 본 발명의 방법은 본 발명의 세포 및 동물을 발생시키기 위해 상동성 재조합 및 부위 특이적 재조합의 조합을 이용한다. 내인성 면역글로불린 유전자좌 내의 요망되는 위치의 숙주 포유동물 유전체로 부위 특이적 재조합 부위를 도입시키기 위해 상동성 표적화 벡터가 먼저 사용된다. 생체내에서 유전체 DNA와 관련 표적화 서열의 상동성 재조합을 통한 유전체 서열로의 부위 특이적 재조합 부위의 삽입은 바람직하게는 트랜스펙션된 세포에 의해 발현되는 항체 분자의 아미노산 서열을 변형시키지 않는다. 이러한 방법은 재조합 부위, 및 임의로 임의의 추가 서열, 예를 들어, 선택 마커 유전자의 삽입 후에 요망되는 항체를 생성시키는 면역글로불린 유전자의 적절한 전사 및 번역을 유지시킨다. 그러나, 일부 경우에, 재조합효소 부위 및 다른 서열을 면역글로불린 유전자좌 서열에 삽입하여, 항체 분자의 아미노산 서열이 삽입에 의해 변경되나, 항체는 여전히 요망되는 목적에 대해 충분한 기능을 보유하도록 하는 것이 가능하며, 본 발명은 상기 삽입을 또한 포함하는 것을 고려한다.
- [0078] 상동성 재조합의 예시적 방법은 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 6,689,610호; 6,204,061호; 5,631,153호; 5,627,059호; 5,487,992호; 및 5,464,764호에 기재되어 있다.
- [0079] 본 발명의 특정 양태에서, 내인성 유전체 내의 특정 서열을 대체할 뿐만 아니라 부위 특이적 재조합 부위 및 선

택 마커를 도입시키기 위해 상동성 표적화 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어, V_H 유전자 영역의 구성요소 3'을 도입시키는데 사용되는 상동성 표적화가 마우스 프리-D 및 DJ 서열을 인간 동등부로 대체시키는데 사용될 수 있다.

[0080] 부위 특이적 재조합

[0081] 재조합효소 인지에 필요한 짧은 특이적 DNA 서열이 재조합이 발생하는 유일한 부위라는 점에서 부위 특이적 재조합은 일반적인 상동성 재조합과 상이하다. 부위 특이적 재조합은 부위를 인지하고, 상기 부위에서 재조합을 촉진하는 특화된 재조합효소를 필요로 한다. 재조합효소 및 특이적 인지체 부위를 각각 포함하는 다수의 박테리오파지 및 효모 유래 부위 특이적 재조합 시스템은 DNA 통합의 목적상 진핵생물 세포에서 작동하는 것으로 밝혀졌고, 따라서 이는 본 발명에서 사용하기 위해 적용가능하며, 이들은 박테리오파지 P1 Cre/lox, 효모 FLP-FRT 시스템, 및 부위 특이적 재조합효소의 티로신 패밀리의 Dre 시스템을 포함한다. 상기 시스템 및 사용 방법을, 예를 들어, 상기 재조합효소의 사용 방법을 교시하기 위해 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 7,422,889호; 7,112,715호; 6,956,146호; 6,774,279호; 5,677,177호; 5,885,836호; 5,654,182호; 및 4,959,317호에 기재되어 있다. 재조합효소 매개 카세트 교환(recombinase mediated cassette exchange, RMCE) 절차는 야생형 및 돌연변이 loxP (또는 FRT 등) 부위의 조합과 함께 음성 선택의 사용에 의해 촉진된다. 그러나, 이는 비-돌연변이 부위만 사용되고/되거나 선택의 부재하에서 발생할 것이다. 그러나, 효율은 매우 낮은데, 이는 삽입 반응이 아닌 삭제가 선호되고, (양성 선택을 포함시킴이 없이) 적절하게 돌연변이된 세포에 대한 풍부화(enrichment)가 존재하지 않을 것이기 때문이다.

[0082] 티로신 패밀리의 다른 시스템, 예를 들어, 박테리오파지 람다 Int 인테그라제(integrase), HK2022 인테그라제, 및 또한 재조합효소의 별도의 세린 패밀리에 속하는 시스템, 예를 들어, 박테리오파지 phiC31, R4Tp901 인테그라제가 각각의 재조합 부위를 이용하여 포유동물 세포에서 작동하는 것으로 공지되어 있고(Tronche, F. et al. 2002), 이는 또한 본 발명에서 사용하기 위해 적용가능하다.

[0083] 본 발명의 방법은 바람직하게는 동일한 재조합효소를 이용하나, 부위 사이의 재조합을 촉진하지 않는 부위 특이적 재조합 부위를 이용한다. 예를 들어, Lox P 부위 및 돌연변이된 Lox P 부위가 숙주의 유전체로 통합될 수 있으나, 숙주로의 Cre의 도입은 2개의 부위가 재조합을 촉진하도록 하지 않을 것이며, 오히려, LoxP 부위는 또 다른 LoxP 부위와 재조합될 것이며, 돌연변이된 부위는 또 다른 유사하게 돌연변이된 LoxP 부위하고만 재조합될 것이다. 상기 돌연변이된 재조합 부위의 예는 역전 반복부의 조합물을 함유하는 것 또는 돌연변이 스페이스 서열을 갖는 재조합 부위를 포함하는 것을 포함한다. 예를 들어, 안정적인 Cre-loxP 통합 재조합을 조작하기 위해 2개 부류의 변이체 재조합효소 부위가 이용가능하다. 둘 모두는 8 bp 스페이스 영역 내 또는 13-bp 역전 반복부 내의 Cre 인지 서열 내의 서열 돌연변이를 이용한다. 스페이스 돌연변이, 예를 들어, lox511 (Hoess RH et al., *Nucleic Acids Res* 1986, 14:2287-2300), lox5171 및 lox2272 (Lee G and Saito I, *Gene* 1998, 216:55-65), m2, m3, m7, 및 m11 (Langer SJ et al., *Nucleic Acids Res* 2002, 30:3067-3077)은 그들 자신과 용이하게 재조합되나, 야생형 부위와는 현저하게 감소된 재조합율을 갖는다. 비-상호작용 Cre-Lox 재조합 부위 및 비-상호작용 FLP 재조합 부위를 이용하는 재조합효소 매개 카세트 교환(RMCE)에 의한 DNA 삽입에 대해 상기 부류의 돌연변이가 이용되었다(Baer A and Bode J, *Curr Opin Biotechnol* 2001, 12:473-480; Albert H et al., *Plant J* 1995, 7:649-659; Seibler J and Bode J, *Biochemistry* 1997, 36: 1740-1747; Schlake T and Bode J, *Biochemistry* 1994, 33: 12746-12751).

[0084] 역전 반복부 돌연변이는 두번째 부류의 변이체 재조합효소 부위를 나타낸다. 예를 들어, LoxP 부위는 좌측 역전 반복부 (LE 돌연변이) 또는 우측 역전 반복부 (RE 돌연변이)에 변경된 염기를 함유할 수 있다. LE 돌연변이, lox71은 좌측 역전 반복부의 5' 말단 상에 야생형 서열로부터 TACCG로 변화된 5 bp를 갖는다(Araki K et al, *Nucleic Acids Res* 1997, 25:868-872). 유사하게, RE 돌연변이, lox66은 CGGTA로 변화된 가장 3' 측의 5개의 염기를 갖는다. "공여체" RE 돌연변이가 재조합되는 "표적" 염색체 loxP 부위로서 지정된 LE 돌연변이를 갖는 염색체 DNA로 플라스미드 삽입부를 통합시키기 위해 역전 반복부 돌연변이가 이용된다. 재조합 후, loxP 부위는 삽입된 세그먼트에 인접하여 시스(cis)로 위치된다. 재조합의 메커니즘은, 재조합 후, 하나의 loxP 부위가 이중 돌연변이(LE 및 RE 역전 반복부 돌연변이 둘 모두를 함유함)이고, 나머지가 야생형인 것이다(Lee L and Sadowski PD, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005, 80:1-42; Lee L and Sadowski PD, *J Mol Biol* 2003, 326:397-412). 이중 돌연변이는 Cre 재조합효소에 의해 인지되지 않고, 삽입된 세그먼트가 삭제되지 않는 점에서 야생형 부위와 충분히 상이하다.

[0085] 특정 양태에서, 부위 특이적 재조합 부위는 코딩 핵산 영역 또는 조절 서열과는 대조적으로 인트론에 도입될 수

있다. 이는 동물 세포의 유전체로의 부위 특이적 재조합 부위의 삽입시 적절한 항체 발현에 필요한 임의의 조절 서열 또는 코딩 영역을 부주의하게 파괴시키는 것을 피할 수 있다.

[0086] 부위 특이적 재조합 부위의 도입은 통상적인 상동성 재조합 기술에 의해 달성될 수 있다. 이러한 기술은 참고 문헌, 예를 들어, [Sambrook and Russell (2001) (Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 및 Nagy, A. (2003). (Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Genetic Recombination: Nucleic acid, Homology (biology), Homologous recombination, Non-homologous end joining, DNA repair, Bacteria, Eukaryote, Meiosis, Adaptive immune system, V(D)J recombination by Frederic P. Miller, Agnes F. Vandome, and John McBrewster (Paperback - Dec. 23, 2009)]에 기재되어 있다.

[0087] 유전체로의 특이적 재조합은 당 분야에 공지된 바와 같은 양성 또는 음성 선택을 위해 설계된 벡터를 이용하여 촉진될 수 있다. 대체 반응을 겪는 세포의 확인을 촉진하기 위해, 적절한 유전 마커 시스템이 이용될 수 있고, 예를 들어, 선택 배지의 사용에 의해 세포가 선택된다. 그러나, 대체 간격의 2개의 종점에서 또는 상기 2개의 종점에 인접하여 유전체 서열이 외인성 핵산 서열을 실질적으로 함유하지 않는 것을 보장하기 위해, 바람직하게는 대체된 핵산을 함유하는 세포의 선택 후에 마커 시스템/유전자는 제거될 수 있다.

[0088] 본 발명의 방법의 한 바람직한 양태에서, 내인성 면역글로불린의 전부 또는 일부의 대체가 발생한 세포가 독소 또는 약물에 대한 노출 후에 음성적으로 선택된다. 예를 들어, HSV-TK의 발현을 유지하는 세포가 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어, 간시클로비어(gancyclovir)의 적절한 사용을 통해 선택될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 내인성 면역글로불린 영역의 결실을 포함하는 세포는 마커 유전자의 사용에 의해 양성적으로 선택될 수 있고, 상기 마커 유전자는 재조합 사건 후 또는 재조합 사건의 결과로서 세포로부터 임의로 제거될 수 있다. 사용될 수 있는 양성적 선택 시스템은 재조합 사건을 통해 소집되는 HPRT와 같은 마커 유전자의 2개의 비-기능적 부분의 사용을 기초로 한다. 이러한 2개의 부분은 성공적인 대체 반응이 수행된 후에 기능적으로 회합되고, 여기서, 기능적으로 재구성된 마커 유전자는 추가의 부위 특이적 재조합 부위(대체 반응에 사용된 부위 특이적 재조합 부위와 상이함)에 의해 어느 한쪽 상에 인접하여, 마커 유전자는 적절한 부위 특이적 재조합효소를 이용하여 유전체로부터 삭제될 수 있다.

[0089] 재조합효소는 정제된 단백질로 제공될 수 있거나, 재조합효소 활성을 제공하기 위해 세포 내에서 일시적으로 발현되는 작체물로 제공될 수 있다. 대안적으로, 상기 세포는 마커 유전자 및 회합된 재조합 부위가 결핍된 후손을 발생시키기 위해 상기 재조합효소를 발현하는 동물과 교배될 수 있는 트랜스제닉 동물을 발생시키는데 이용될 수 있다.

[0090] 트랜스제닉 동물의 생성

[0091] 특정 양태에서, 본 발명은 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 트랜스제닉 동물의 생성을 위한 방법을 제공한다.

[0092] 일 양태에서, 내인성 면역글로불린 유전자의 대체에 이용되는 숙주 세포는 이후에 트랜스제닉 포유동물을 발생시키는데 이용될 수 있는 배아 줄기(ES) 세포이다. 따라서, 일 양태에 따르면, 본 발명의 방법은 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 배아 줄기 세포를 분리하고, 상기 ES 세포를 이용하여 대체된 부분적 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 동물을 발생시키는 것을 추가로 포함한다.

[0093] 또 다른 예에서, 트랜스제닉 동물은 조류이고, 동물은 원시종자세포를 이용하여 생성된다. 따라서, 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 방법은 도입된 부분적 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 원시종자세포를 분리하고, 상기 종자세포를 이용하여 대체된 부분적 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 동물을 발생시키는 것을 추가로 포함한다. 상기 트랜스제닉 조류의 생성 방법은, 예를 들어, 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 7,323,618호 및 7,145,057호에 개시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 실시예

[0095] 하기 실시예는 본 발명을 제조하고 이용하는 방법의 완전한 개시 및 기재를 당업자에게 제공하기 위해 나열되며, 이러한 실시예는 본 발명자가 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니고, 또한 하기 실험이 수행된 유일한 실험이거나 수행된 실험의 모두인 것을 나타내거나 의미하는 것이 아니다. 광범위하

게 기재된 바와 같은 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어남이 없이 특정 구체예에 제시된 바와 같은 본 발명에 대해 다수의 변화 및/또는 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 인지될 것이다. 따라서, 본 구체예는 모든 양태에서 예시적인 것이고, 제한적인 것이 아닌 것으로 간주된다.

[0096] 사용된 용어 및 수(예를 들어, 벡터, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력하였으나, 약간의 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 설명하지 않는 경우, 부(parts)는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 대기압 근처이다.

[0097] 실시예는 합성 DNA의 재조합 및 도입 부위에 인접된 5' 벡터 및 3' 벡터 둘 모두에 의한 표적화를 예시한다. 5' 벡터 표적화가 먼저 발생한 후에 3' 벡터 표적화가 발생하거나, 3' 벡터 표적화 후에 5' 벡터 표적화가 발생할 수 있음이 본 명세서를 본 후에 당업자에게 명백해질 것이다. 일부 상황에서, 표적화는 이중 검출 메커니즘과 동시에 수행될 수 있다.

[0098] **실시예 1: 마우스 유전체의 V_H 유전자 유전자좌로의 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입.**

[0099] 포유동물 유전체의 일부를 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체하는 예시적 방법이 도 1-6에 예시되어 있다. 도 1은 본 발명의 방법의 상기 예시적 양태의 다양한 단계를 예시하는 흐름도를 도시한다. 상기 방법은 포유동물 유전체의 내인성 V_H 영역의 5' 또는 3'에 도입될 수 있는, 포유동물 유전자좌로의 첫번째 부위 특이적 재조합 부위의 도입을 제공한다. 이후, 첫번째 부위 특이적 재조합 부위와 조합되어 내인성 면역글로불린 영역에 인접되는 포유동물 유전자좌로의 두번째 부위 특이적 재조합 부위의 도입(102)이 후속된다. 인접된 내인성 영역은 결실(104)되고, 인간 및 비-인간 서열 둘 모두를 포함하는 합성 핵산이 재조합효소 매개 교환을 통해 도입(106)된다.

[0100] 마우스 ES 세포의 유전체 유전자좌로의 부분적 인간 마우스-인간 면역글로불린 영역의 도입을 예시하는 예시적 방법이 도 2-6에 보다 상세히 예시되어 있다. 도 2에서, 2개의 상이한 재조합효소 인지 부위, 예를 들어, Flp 및 Cre에 대한 FRT(207) 및 loxP(205), 및 변형되지 않은 부위(207 및 205)와 각각 재조합될 수 없는, 예를 들어, FRT(209) 및 loxP(211)에 대한 변형된 부위에 인접된 퓨로마이신 포스포트랜스퍼라제-티미딘 키나제 융합 단백질(puroΔTK)(203)을 포함하는 상동성 표적화 벡터(201)가 제공된다. 표적화 벡터는 이후 단계에서 도입된 작제물을 발현하는 세포의 음성 선택에서 사용하기 위한 인간 디프테리아 독소 수용체(hDTR) cDNA(217)를 포함한다. 표적화 벡터는 또한 형광 녹색 단백질(GFP)와 같은 시각적 마커를 임의로 포함한다(도시되지 않음). 영역(213 및 215)은 마우스 내인성 V_H 유전자를 포함하는 유전체 영역(219)의 5' 측에 있는 내인성 마우스 유전자좌 내의 연속적 영역(223)의 5' 및 3' 부분에 각각 상동성이다. 상동성 표적화 벡터(201)는 내인성 V_H 유전자(219), 프리-D 영역(221), J 유전자 영역(225) 및 면역글로불린 영역의 불변 유전자 영역(227)을 포함하는 면역글로불린 영역(229)을 갖는 마우스 ES 세포에 도입(202)된다. 상동성 표적화 벡터(201)의 부위 특이적 재조합 부위 및 hDTR cDNA(217)가 마우스 내인성 V_H 유전자 영역의 마우스 유전체 5'으로 통합(204)된다.

[0101] 도 3은 부위 특이적 재조합 부위의 추가 세트, 예를 들어, Dre 재조합효소와 함께 사용하기 위한 Rox 부위(331) 및 변형된 Rox 부위(333)가 첨가되는 것을 제외하고는 도 2와 동일한 방법을 효과적으로 예시한다. 도 3에서, 재조합효소 인지 부위 FRT(307), loxP(305) 및 Rox(331), 및 변형되지 않은 부위(307, 305 및 331) 각각과 재조합될 수 없는 FRT(309), loxP(311) 및 Rox(333)에 대한 변형된 부위에 인접한 퓨로마이신 포스포트랜스퍼라제-티미딘 키나제 융합 단백질(303)을 포함하는 상동성 표적화 벡터(301)가 제공된다. 표적화 벡터는 또한 인간 디프테리아 독소 수용체(hDTR) cDNA(317)를 포함한다. 영역(313 및 315)은 마우스 내인성 V_H 유전자를 포함하는 유전체 영역(319)의 5' 측에 있는 내인성 마우스 유전자좌 내의 연속적 영역(323)의 각각의 5' 및 3' 부분에 상동성이다. 상동성 표적화 벡터(301)는 면역글로불린 영역의 내인성 V_H 유전자(319), 프리-D 영역(321), J 유전자 영역(325) 및 불변 유전자 영역(327)을 포함하는 마우스 면역글로불린 영역(329)에 도입(302)된다. 상동성 표적화 벡터(301)의 부위 특이적 재조합 부위 및 hDTR cDNA(317)가 마우스 내인성 V_H 유전자 영역의 마우스 유전체 5'으로 통합(304)된다.

[0102] 도 4에 예시된 바와 같이, 하이포크산틴포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 미니-유전자(435) 및 네오마이신 내성 유전자(437), 및 첫번째 상동성 표적화 벡터로부터 통합된 FRT(407) 및 loxP(405) 부위와 조합되는 능력을 갖는 Flp 및 Cre에 대한 재조합효소 인지 부위 FRT(407) 및 loxP(405)를 포함하는 두번째 상동성 표적화 벡터(401)가 제공된다. 영역(431 및 433)은 마우스 내인성 V_H , D 및 J 유전자를 포함하는 유전체 영역의 3' 측 및 불변 유

전자 영역의 5' 측에 있는 내인성 마우스 유전자와 내의 연속적 영역(441)의 5' 및 3' 부분에 각각 상동성이다. 상동성 표적화 벡터(401)가 내인성 V_H 유전자(419), 프리-D 영역(421), J 유전자 영역(425) 및 불변 유전자 영역(427)을 포함하는 변형된 마우스 면역글로불린 영역에 도입(402)된다. 상동성 표적화 벡터(401)의 부위 특이적 재조합 부위 및 HPRT 미니-유전자(435) 및 네오마이신 내성 유전자(437)는 마우스 내인성 V_H 유전자 영역의 마우스 유전체 5'으로 통합(404)된다.

[0103] 재조합 부위가 숙주 포유동물 유전체로 도입된 후, 면역글로불린 도메인의 내인성 영역은 유전체 내의 부위 특이적 재조합 부위에 상응하는 재조합효소 중 하나, 본 실시예에서, FLP 또는 Cre를 도입시킴으로써 재조합에 적용된다. 도 5에 예시된 바와 같이, FLP가 도입(502)되는 경우, 부위 특이적 재조합 부위(509, 511, 507 및 505) 및 puro Δ TK 유전자(503)를 함유하는 영역이 유지되며, 추가 FLP 재조합 부위(507)는 이제 다른 2개의 재조합 부위(507 및 505)의 3' 측에 존재한다. 두번째 상동성 표적화 벡터를 이용하여 도입된 hDTR(517), 내인성 면역글로불린 도메인(519, 521, 525), 및 HPRT(527) 및 Neo(529) 유전자를 포함하는 재조합 부위의 3' 측 영역이 결실된다. Cre가 재조합효소-매개 결실(504)에 사용되는 경우, 결실의 영역은 동일하나, 단지 하나의 부위 특이적 재조합 부위(507)가 직접적으로 puro Δ TK 유전자의 3' 측에 남는다. 상기 절차는 동족체 상에서가 아닌 동일한 염색체 상에서 발생(즉, 트랜스가 아닌 시스)하는 두번째 표적화에 좌우된다. 표적화가 트랜스로 발생하는 경우, 세포는 Cre 재조합 후에 음성 선택에 민감하지 않을 것이다.

[0104] 내인성 면역글로불린 영역의 결실에 대한 일차 스크리닝은 서던 블롯(Southern blot), 또는 서던 및/또는 자연 대립유전자 상실(loss-of-native-allele) qPCR 스크린을 이용한 이차 스크린에 의해 뒷받침되는 일차 중합효소 연쇄반응(PCR) 스크린에 의해 수행될 수 있다. HPRT는 HPRT-결핍 ES 세포에서의 (6-티오구아닌-의존성) 음성 선택을 허용할 것이다. 결실된 면역글로불린 영역을 갖는 ES 세포는 hDTR 유전자를 이용한 음성 선택에 의해 선택될 수 있다.

[0105] 도 6은 변형된 마우스 유전체로의 부분적 인간 서열의 도입을 예시한다. 포유동물 숙주 유전체로 도입되는 부분적 인간 면역글로불린 영역(610)을 포함하는 부위 특이적 표적화 벡터(629)는 부위 특이적 재조합 부위(609, 611, 607 및 605)를 포함하는 결실된 내인성 면역글로불린 영역 및 puro Δ TK 유전자(603)를 갖는 유전체 영역(601)으로 도입(602)된다. 부위 특이적 표적화 벡터는 i) 44개의 인간 V_H 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 V_H 영역(619); ii) 마우스 서열을 포함하는 10 kb 프리-DJ 영역(621); 및 iii) 인간 D 및 J 유전자 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 DJ 영역(625)을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 구성된다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 변형된 내인성 유전자좌와의 재조합을 가능케 하는 재조합 부위(609, 611, 605 및 607)에 인접된다. 적절한 재조합효소(604)의 도입 후, 부분적 인간 면역글로불린 영역은 불변 유전자 영역(627)의 유전체 업스트림으로 통합된다.

[0106] 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입을 위한 일차 스크리닝은 서던 블롯, 또는 서던 및/또는 자연 대립유전자 상실(loss-of-native-allele) qPCR 스크린을 이용한 이차 스크린에 의해 뒷받침되는 일차 PCR 스크린에 의해 수행될 수 있다. 재조합 사건의 일부로서의 HPRT 유전자(605)의 결실은 (6-티오구아닌-의존성) 음성 선택을 이용하여 재조합 사건을 겪지 않은 세포의 확인을 가능케 할 것이다.

[0107] **실시예 2: 마우스 유전체로의 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입.**

[0108] 특정 양태에서, 부분적 인간 면역글로불린 영역은 실시예 1에 기재된 바와 같으나, 추가 서열, 예를 들어, 도입된 면역글로불린 영역 내에 요망되는 간격(spacing)을 보장하고, 특정 코딩 서열이 대체된 면역글로불린 영역에 근접한 다른 서열과의 적절한 근접위치(juxtaposition)로 존재하는 것 등을 보장하기 위한 추가 조절 서열을 도입시키기 위해 전략적으로 첨가된 서열을 갖는 구성요소를 포함할 것이다. 도 7은 도 2-5에서 생성되고, 상기 실시예 1에 기재된 바와 같은 변형된 마우스 유전체로의 두번째 예시적인 부분적 인간 서열의 도입을 예시한다.

[0109] 포유동물 숙주 유전체로 도입되는 부분적 인간 면역글로불린 영역(710)을 포함하는 부위 특이적 표적화 벡터(729)는 부위 특이적 재조합 부위(709, 711, 707 및 705)를 포함하는 결실된 내인성 면역글로불린 영역 및 puro Δ TK 유전자(703)를 갖는 유전체 영역(701)으로 도입(702)된다. 부위 특이적 표적화 벡터는 i) 1-43개의 인간 V_H 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 V_H 영역(719); ii) 마우스 서열을 포함하는 10 kb 프리-DJ 영역(721); iii) 인간 D 및 J 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 DJ 영역(725); 및 iv) 마우스 비-기능성 J_H 유전자 영역을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 구성된다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 변형된 내인성 유전자좌와의 재조합을 가능케 하

는 재조합 부위(709, 711, 705 및 707)에 인접된다. 적절한 재조합효소(704)의 도입 후, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 불변 유전자 영역(727)의 유전체 업스트림으로 통합된다.

[0110] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입에 대한 일차 스크리닝은 서던 블롯, 또는 서던 및/또는 자연 대립유전자 상실(loss-of-native-allele) qPCR 스크린을 이용한 이차 스크린에 의해 뒷받침되는 일차 PCR 스크린에 의해 수행될 수 있다. 재조합 사건의 일부로서의 HPRT 유전자(705)의 결실은 (6-티오 구아닌-의존성) 음성 선택을 이용하여 재조합 사건을 겪지 않은 세포의 확인을 가능케 할 것이다.

[0111] **실시예 3: 마우스 유전체의 면역글로불린 중쇄 유전자 유전자좌로의 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입.**

[0112] 포유동물 유전체의 일부를 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체하는 방법은 도 8에 예시되어 있다. 이러한 방법은 포유동물 유전체로의 첫번째 부위 특이적 재조합 부위의 도입 후, 포유동물 유전체로의 두번째 부위 특이적 재조합 부위의 도입을 이용하였다. 상기 2개의 부위는 V_H , D_H 및 J_H 영역 유전자 세그먼트의 전체 클러스터에 인접하였다. 인접된 내인성 영역은 본원에 기재된 바와 같이 관련 부위 특이적 재조합효소를 이용하여 결실되었다.

[0113] 야생형 마우스 면역글로불린 영역(801) 내의 V_H , D_H 및 J_H 영역 유전자 세그먼트 클러스터의 어느 한 측면에 부위 특이적 재조합효소 부위를 도입시키는데 사용되는 표적화 벡터(803, 805)는 재조합효소에 의해 여전히 효과적으로 인지되지만, 변형되지 않은 부위와 재조합되지 않도록 변형된 추가 부위 특이적 재조합효소 부위를 포함하였다. 이러한 부위는 V_H , D_H 및 J_H 영역 유전자 세그먼트 클러스터의 결실 후, DNA의 비-자연 단편이 변형된 V_H 유전자좌로 이동되는 두번째 부위 특이적 재조합 사건에 사용될 수 있도록 표적화 벡터에 위치되었다. 부위 특이적 재조합효소를 이용하여 DNA를 유전자좌로 이동시키는 과정은 "재조합효소-매개 카세트 교환"으로 언급된다. 본 실시예에서, 비-자연 DNA는 인간 및 비-인간 서열 둘 모두를 포함하는 합성 핵산이었다.

[0114] 바로 상기에 기재된 과정을 달성하기 위해 2개의 유전자 표적화 벡터를 작제하였다. 벡터 중 하나(803)는 가장 원위의 가변 영역 유전자 세그먼트의 업스트림의 유전자좌의 5' 말단으로부터 수득된 마우스 유전체 DNA로 구성되었다. 나머지 벡터(805)는 J 영역 유전자 세그먼트 부근의 유전자좌 내로부터 수득된 마우스 유전체 DNA로 구성되었다.

[0115] 5'으로부터 3'으로의 순서의 5' 벡터(803)의 주요 특징부는 다음과 같았다: 폴리오마 바이러스로부터의 2개의 돌연변이 전사 인핸서에 커플링된 변형된 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 티미딘 키나제 유전자 프로모터의 전사 조절 하에 디프테리아 독소 A(DTA) 서브유닛을 엔코딩하는 유전자; 중쇄 유전자좌 내의 가장 원위의 가변 영역 유전자 세그먼트의 업스트림을 맵핑하는 4.5Kb의 마우스 유전체 DNA; J 영역 유전자 세그먼트(불능화됨); F1p 재조합효소에 대한 *FRT* 인지 서열; 마우스 *Polr2a* 유전자 프로모터를 함유하는 유전체 DNA의 단편; 번역 개시 서열("코작(Kozak)" 컨센서스 서열 내에 엠베딩된 메티오닌 코돈); Cre 재조합효소에 대한 돌연변이된 *loxP* 인지 서열(*lox5171* 부위로 공지됨); 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; Cre 재조합효소에 대한 *loxP* 인지 서열; 마우스 포스포글리세레이트 키나제 1 유전자로부터의 프로모터의 전사 조절 하에 티미딘 키나제의 트렁케이션된 형태에 융합된 퓨로마이신(pu-TK)에 내성을 부여하는 단백질로 구성된 융합 단백질을 엔코딩하는 유전자; 및 벡터 내에서 4.5Kb 서열에 가깝게 맵핑하고, 자연 상대 배향으로 배열된 3Kb의 마우스 유전체 DNA.

[0116] 5'으로부터 3'으로의 순서의 3' 벡터(805)의 주요 특징부는 다음과 같았다: 폴리오마 바이러스로부터의 2개의 돌연변이 전사 인핸서에 커플링된 변형된 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 티미딘 키나제 유전자 프로모터의 전사 조절 하에 디프테리아 독소 A(DTA) 서브유닛을 엔코딩하는 유전자; 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트에 가장 가깝게 맵핑하는 영역의 말단이 벡터 내의 DTA 유전자에 가장 가깝게 존재하도록 배향된 마우스 J 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 3.7Kb의 마우스 유전체 DNA; 마우스 *Polr2a* 유전자 프로모터의 전사 조절 하에 인간 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT)를 엔코딩하는 미니유전자; 마우스 포스포글리세레이트 키나제 1 유전자 프로모터의 조절 하의 네오마이신 내성 유전자; Cre 재조합효소에 대한 *loxP* 인지 서열; 및 마우스 유전체에서와 동일한 형태로 배향된 2개의 단편을 갖는 3.7Kb 단편의 유전체 내에 바로 다운스트림을 맵핑하는 2.1Kb의 마우스 유전체 DNA.

[0117] 마우스 배아 줄기(ES) 세포(C57B1/6NTac 마우스로부터 유래됨)를 널리 사용되는 절차에 따라 전기천공에 의해 3' 벡터(805)로 트랜스펙션시켰다. 전기천공 전, 벡터 DNA를 *NotI* 제한 효소로 선형화시켰다. 트랜스펙션된 세포를 플레이팅시키고, 24이상 초과 후, 이들을 네오마이신 유사체 G418을 이용한 약물 선택하에 두었다. 약물 내성 ES 세포의 콜로니를, 이러한 콜로니가 1주 경과 후에 육안으로 관찰될 수 있게 된 후에 플레이트로부터

물리적으로 추출하였다. 이렇게 채집된 콜로니를 분리시키고, 마이크로-웰 플레이트에 다시 플레이팅시키고, 수일 동안 배양하였다. 이후, 세포의 클론 각각을 세포의 일부가 보관용으로서 동결될 수 있고, 나머지가 분석 목적을 위해 DNA의 분리에 사용되도록 나누었다.

[0118] ES 세포 클론으로부터의 DNA를 널리 사용되는 유전자-표적화 검정 설계를 이용한 PCR에 의해 스크리닝하였다. 4개의 검정을 이용하였고, 각각의 경우, PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 중 하나는 3' 벡터(805)와 유전체 DNA 사이에 공유된 동일성 영역 외부를 맵핑한 반면, 나머지는 벡터 내(즉, HPRT 또는 neo 유전자 구성요소 내)의 유전적 동일성의 2개의 암(arm) 사이의 신규한 DNA 내를 맵핑하였다. 표준 설계에 따라, 상기 검정은 3' 헤비(heavy) 표적화 벡터와 유전체 사이에서 충분히 옳은 상동성 재조합을 겪은 트랜스펙션된 세포로부터 유래된 세포의 클론에만 존재하는 DNA의 단편을 검출하도록 설계되었다.

[0119] 2개의 별개의 트랜스펙션을 3' 벡터(805)로 수행하였다. 상기 중 첫번째는 4개의 PCR 검정을 이용하여 스크리닝된 약 300개의 클론으로부터 전체 2개의 양성 클론을 발생시켰다. 두번째는 또한 약 300개의 스크리닝된 클론으로부터 전체 6개의 양성 클론을 발생시켰다. 2개의 트랜스펙션으로부터의 전체 6개의 PCR-양성 클론을 증식을 위해 선택한 후, 서던 블롯 검정을 이용하여 추가로 분석하였다.

[0120] 프로브의 조합 및 절단이 클론 내의 표적화된 유전자좌의 구조가 상동성 재조합에 의해 적절히 변형된 것으로 확인되는 것을 가능케 하도록 선택된 다수의 제한 효소로 절단된 유전체 DNA 및 3개의 프로브를 이용하여 널리 사용되는 절차에 따라 서던 블롯 검정을 수행하였다. 프로브 중 하나는 3' 헤비 표적화 벡터와 유전체 DNA 사이에 공유된 동일성 영역 중 한면에 인접한 DNA 서열을 맵핑하고; 두번째 프로브는 동일성 영역의 외부이나, 이의 다른 면을 맵핑하고; 세번째 프로브는 벡터 내의 유전적 동일성의 2개의 암 사이의 신규한 DNA 내(즉, HPRT 또는 neo 유전자 구성요소 내)를 맵핑한다.

[0121] ES 세포의 6개의 PCR-양성 클론이 마우스 ES 세포에서 발생하는 가장 통상적으로 발생하는 염색체 이상을 구별 하도록 설계된 인 시츄 형광 하이브리드화 절차를 이용하여 핵형적으로 분석된다. 상기 이상을 갖는 클론이 추가 사용으로부터 배제된다. 서던 블롯 데이터를 기초로 하여 예상되는 정확한 유전체 구조를 갖는 것으로 판단 되고, 또한 핵형 분석을 기초로 하여 검출가능한 염색체 이상을 갖지 않는 ES 세포 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0122] 허용되는 클론은 G418/네오마이신 선택 대신 푸로마이신 선택이 사용되는 것을 제외하고는 3' 벡터(805)와 함께 사용되는 것과 설계에서 본질적으로 동일한 절차 및 스크리닝 검정을 이용하여 5' 벡터(803)로 변형된다. PCR 검정, 프로브 및 절단은 또한 5' 벡터(805)에 의해 변형되는 유전체 영역과 부합되도록 맞춤화된다.

[0123] 3' 헤비 및 5' 헤비 벡터 둘 모두에 의해 예상 방식으로 돌연변이된 ES 세포, 즉, 둘 모두의 조작된 돌연변이를 갖는 이중-표적화된 세포의 클론이 벡터 표적화 후에 분리된다. 클론은 상동성 염색체와 반대로 동일 염색체 상에서 유전자 표적화를 겪어야 한다(즉, 표적화 벡터에 의해 생성된 조작된 돌연변이는 별개의 상동성 DNA 가닥 상에서의 트랜스가 아닌 동일 DNA 가닥 상에서 시스로 존재해야 한다). 돌연변이의 시스 배열을 갖는 클론이 유전적 동일성의 암(arm) 사이의 2개의 유전자 표적화 벡터에 존재하는 새로운 DNA에 하이브리드되는 프로브를 이용한 중기 스프레드(spread)의 형광 인 시츄 하이브리드화와 같은 분석 절차에 의해 트랜스 배열을 갖는 것으로부터 구별된다. 2개 유형의 클론은 또한 이들을 Cre 재조합효소를 발현하는 벡터로 트랜스펙션시킨 후, 5' 벡터(803)에 의해 도입된 티미딘 키나제 유전자에 대한 간시클로비어 선택에서 생존하는 콜로니의 수를 비교하고, 클론으로부터의 세포의 일부를 푸로마이신 또는 G418/네오마이신에 대한 내성에 대해 시험하는 "시블링(sibling) 선택" 스크리닝 절차에 의해 생존하는 클론의 약물 내성 표현형을 분석함으로써 서로 구별될 수 있다. 시스 배열의 돌연변이를 갖는 세포는 상기 유형의 실험에서 트랜스 배열을 갖는 세포보다 약 10^3 배 더 간시클로비어 내성인 클론을 발생시키는 것으로 예상된다. 생성된 시스-유래 간시클로비어-내성 클론의 대부분은 또한 푸로마이신 및 G418/네오마이신 둘 모두의 약물에 대한 내성을 보유하는 트랜스-유래 간시클로비어-내성 클론과 대조적으로 푸로마이신 및 G418/네오마이신 둘 모두에 대해 민감하다. 중쇄 유전자좌 내에 시스-배열의 조작된 돌연변이를 갖는 세포의 이중-표적화된 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0124] 세포의 이중 표적화된 클론이 Cre 재조합효소를 발현하는 벡터로 트랜스펙션되고, 트랜스펙션된 세포는 이후 간시클로비어 선택 하에 놓여지며, 이는 상기 요약된 분석 실험과 같다. 세포의 간시클로비어-내성 클론이 분리되고, 5' 헤비 및 3' 헤비 표적화 벡터에 의해 발생된 2개의 조작된 돌연변이 사이의 예상 결실의 존재에 대해 PCR 및 서던 블롯에 의해 분석된다. 이들 클론에서, Cre 재조합효소는 (807)에 도식된 작제물을 발생시키기 위해 2개의 벡터에 의해 중쇄 유전자좌로 도입된 *loxP* 부위들 사이에서 재조합(802)이 발생되도록 한다. *loxP* 부위가 2개의 벡터 내의 동일한 상대 배향으로 배열되므로, 재조합은 2개의 *loxP* 부위 사이에 전체 유전체 간격을

포함하는 DNA의 원의 절제를 발생시킨다. 상기 원은 복제 기점을 함유하지 않으며, 따라서 유사분열 동안 복제되지 않을 것이며, 따라서 이들이 클론 확장을 겪음에 따라 세포의 클론으로부터 상실될 것이다. 결과로서 발생한 클론은 2개의 *loxP* 부위 사이에 본래 존재하였던 DNA의 결실을 갖는다.

- [0125] 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 2개의 상동성 카피 중 하나에 서열의 결실을 갖는 ES 세포 클론이 V, D 및 J 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 부분적 인간 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하는 DNA의 단편(809)과 함께 Cre 재조합효소 발현 벡터로 트랜스펙션(804)된다. 상기 DNA의 단편(809)의 중요 특징부는 다음과 같다: *lox5171* 부위; 네오마이신 내성 유전자 열린해독틀(개시자 메티오닌 코돈이 결핍되어 있으나, 인-프레임(in-frame)이며 *lox5171* 부위 내의 중단되지 않은 열린해독틀과 연속적임); 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; FRT 부위; 마우스 비코딩 서열 내에 엠베딩된 인간 코딩 서열로 각각 구성된 44개의 인간 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트의 어레이; 마우스 중쇄 유전자좌 내의 D 영역 유전자 세그먼트의 클러스터의 바로 업스트림으로부터의 유전체 DNA의 7.5Kb 단편; 인간 D 및 J 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 DNA의 58Kb 단편; *lox5171* 부위에 대해 반대의 상대 배향의 *loxP* 부위.
- [0126] 트랜스펙션된 클론이 G418 선택하에 놓여지고, 이는 부분적 인간 공여체 DNA(809)(SEQ ID NO:1)가 *loxP*와 *lox5171* 부위 사이의 결실된 면역글로불린 중쇄 유전자좌로 전체가 통합되어 (811)에 예시된 DNA 영역이 발생되는 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪는 세포의 클론을 풍부(enrich)하게 한다. 5' 벡터(803)로부터의 잔여 구성요소가 FLP-매개 재조합(806)을 통해 제거되어 (813)에 도시된 최종 인간화된 유전자좌가 발생된다.
- [0127] G418-내성 ES 세포 클론은, 이들이 원치않는 재배열 또는 결실이 없이 예상 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪었는지 결정하기 위해 PCR 및 서던 블롯에 의해 분석된다. 예상 유전체 구조를 갖는 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.
- [0128] 마우스 중쇄 유전자좌 내에 부분적 인간 면역글로불린 중쇄 DNA(813)를 갖는 ES 세포 클론이 표준 절차에 따라 계통 DBA/2로부터의 마우스 주머니배로 미세주입되어 부분적 ES 세포-유래 키메라 마우스가 발생된다. 코트(coat)에 대한 가장 높은 수준의 ES 세포-유래 기여를 갖는 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배에 선택될 것이다. 여기서, 선택된 암컷 마우스는 C57Bl/6NTac 계통일 것이며, 이는 또한 이들의 종자세포에서 발현되는 FLP 재조합효소를 엔코딩하는 트랜스진을 가질 것이다. 이러한 교배로부터의 후손이 부분적 인간 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 존재, 및 재조합효소-매개 카세트 교환 단계에서 생성된 FRT-인접된 네오마이신 내성 유전자의 상실에 대해 분석된다. 부분적 인간 유전자좌를 갖는 마우스가 마우스의 콜로니를 확립하는데 사용될 것이다.
- [0129] **실시예 4: 마우스 유전체의 면역글로불린 카파 사슬 유전자 유전자좌로의 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입.**
- [0130] 부분적 인간 면역글로불린 영역을 갖는 포유동물 유전체의 일부를 대체하기 위한 또 다른 방법이 도 9에 예시되어 있다. 이러한 방법은 포유동물 유전체의 V_K 및 J_K 영역 유전자 세그먼트의 주요 클러스터의 5' 또는 3'에 도입될 수 있는 첫번째 부위 특이적 재조합 부위를 포유동물 유전체로 도입시킨 후, V_K 및 J_K 영역 유전자 세그먼트의 전체 클러스터에 인접한 첫번째 부위 특이적 재조합 부위와 조합된 두번째 부위 특이적 재조합 부위의 포유동물 유전체로의 도입을 제공한다. 이후, 인접된 내인성 영역이 결실될 수 있고, 관련 부위 특이적 재조합효소를 이용하여 대체될 수 있다.
- [0131] V_K 및 J_K 영역 유전자 세그먼트 클러스터(901)의 한 면에 부위 특이적 재조합효소 부위를 도입시키는데 사용되는 표적화 벡터는 또한 재조합효소에 의해 여전히 효과적으로 인지되지만, 변형되지 않은 부위와 재조합되지 않도록 변형된 추가적인 부위 특이적 재조합효소 부위를 포함한다. 이러한 부위는 V_K 및 J_K 영역 유전자 세그먼트 클러스터의 결실 후, DNA의 비-자연 단편이 재조합효소-매개 카세트 교환을 통해 변형된 V_K 유전자좌로 이동되는 두번째 부위 특이적 재조합 사건에 사용될 수 있도록 표적화 벡터에 위치된다. 이러한 예에서, 비-자연 DNA는 인간 및 비-인간 서열 둘 모두를 포함하는 합성 핵산이다.
- [0132] 바로 상기에 기재된 과정을 달성하기 위해 2개의 유전자 표적화 벡터를 작제하였다. 벡터 중 하나(903)는 가장 원위의 가변 영역 유전자 세그먼트의 업스트림의 유전자좌의 5' 말단으로부터 수득된 마우스 유전체 DNA로 구성되었다. 나머지 벡터(905)는 J 영역 유전자 세그먼트 부근의 유전자좌 내로부터 수득된 마우스 유전체 DNA로 구성되었다.
- [0133] 5' 벡터(903)의 주요 특징부는 다음과 같았다: 폴리오마 바이러스로부터의 2개의 돌연변이 전사 인핸서에 커플

링된 변형된 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 티미딘 키나제 유전자 프로모터의 전사 조절 하에 디프테리아 독소 A(DTA) 서브유닛을 엔코딩하는 유전자; 카파 사슬 유전자와 내의 가장 원위의 가변 영역 유전자 세그먼트의 업스트림을 맵핑하는 6Kb의 마우스 유전체 DNA; Flp 재조합효소에 대한 *FRT* 인지 서열; 마우스 *Po1r2a* 유전자 프로모터를 함유하는 유전체 DNA의 단편; 번역 개시 서열("코작(Kozak)" 컨센서스 서열 내에 엠베딩된 메티오닌 코돈); Cre 재조합효소에 대한 돌연변이된 *loxP* 인지 서열(*lox5171* 부위로 공지됨); 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; Cre 재조합효소에 대한 *loxP* 인지 서열; 마우스 포스포글리세레이트 키나제 1 유전자로부터의 프로모터의 전사 조절 하에 티미딘 키나제의 트렁케이션된 형태에 융합된 퓨로마이신(pu-TK)에 내성을 부여하는 단백질로 구성된 융합 단백질을 엔코딩하는 유전자; 및 벡터 내에서 6Kb 서열에 가깝게 맵핑하고, 자연 상대 배향으로 배열된 2.5Kb의 마우스 유전체 DNA.

[0134] 3' 벡터(905)의 중요 특징부는 다음과 같았다: 폴리오마 바이러스로부터의 2개의 돌연변이 전사 인핸서에 커플링된 변형된 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 티미딘 키나제 유전자 프로모터의 전사 조절 하에 디프테리아 독소 A(DTA) 서브유닛을 엔코딩하는 유전자; 카파 가변 영역 유전자 세그먼트에 가장 가깝게 맵핑하는 단편의 말단이 벡터 내의 DTA 유전자에 가장 가깝게 존재하도록 배향된 카파 유전자와 J 영역 유전자 세그먼트 부근으로부터 수득된 6Kb의 마우스 유전체 DNA; 마우스 *Po1r2a* 유전자 프로모터의 전사 조절하에 인간 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT)를 엔코딩하는 미니유전자; 마우스 포스포글리세레이트 키나제 1 유전자 프로모터의 조절 하의 네오마이신 내성 유전자; Cre 재조합효소에 대한 *loxP* 인지 서열; 마우스 유전체에서와 동일한 상대 방식으로 배향된 2개의 단편을 갖는, 벡터 내에 또한 포함된 6Kb 단편의 유전체 내에 바로 다운스트림을 맵핑하는 3.6Kb의 마우스 유전체 DNA.

[0135] C57Bl/6NTac 마우스로부터 유래된 마우스 배아 줄기(ES) 세포를 널리 사용되는 절차에 따라 전기천공에 의해 3' 벡터(905)로 트랜스펙션시켰다. 전기천공 전, 벡터 DNA를 *NotI* 제한 효소로 선형화시켰다. 트랜스펙션된 세포를 플레이팅시키고, 24시간 이상 후, 이들을 네오마이신 유사체 G418을 이용한 약물 선택하에 두었다. 약물 내성 ES 세포의 콜로니를, 이러한 콜로니가 1주 경과 후에 육안으로 관찰될 수 있게 된 후에 플레이트로부터 물리적으로 추출하였다. 상기 채집된 콜로니를 분리시키고, 마이크로-웰 플레이트에 다시 플레이팅시키고, 수일 동안 배양하였다. 이후, 세포의 클론 각각을 세포의 일부가 보관용으로서 동결될 수 있고, 나머지가 분석 목적을 위해 DNA의 분리에 사용되도록 나누었다.

[0136] ES 세포 클론으로부터의 DNA를 널리 사용되는 유전자-표적화 검정 설계를 이용한 PCR에 의해 스크리닝하였다. 4개의 검정을 이용하였고, 각각의 경우, PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 중 하나는 3' 벡터(905)와 유전체 DNA(901) 사이에 공유된 동일성 영역 외부를 맵핑한 반면, 나머지는 벡터 내(즉, HPRT 또는 neo 유전자 구성요소 내)의 유전적 동일성의 2개의 암(arm) 사이의 신규한 DNA 내를 맵핑하였다. 표준 설계에 따라, 상기 검정은 3' 벡터(905)와 유전체 사이에서 충분히 옳은 상동성 재조합을 겪은 트랜스펙션된 세포로부터 유래된 세포의 클론에만 존재하는 DNA의 단편을 검출하도록 설계되었다.

[0137] 하나의 트랜스펙션을 3' 벡터(905)로 수행하였고, 이는 4개의 PCR 검정을 이용하여 스크리닝된 약 300개의 클론으로부터 전체 17개의 양성 클론을 발생시켰다.

[0138] 트랜스펙션으로부터의 전체 6개의 PCR-양성 클론을 확장을 위해 선택한 후, 서던 블롯 검정을 이용하여 추가 분석하였다. 서던 블롯 검정을 널리 사용되는 절차에 따라 수행하였고; 이는 프로브의 조합 및 절단이 클론 내의 표적화된 유전자와의 구조에 관해 결론이 도출되도록 하고, 상동성 재조합에 의해 적절히 변형되었는지의 여부에 따라 선택되는 다수의 제한 효소로 절단된 유전체 DNA 및 3개의 프로브를 포함하였다. 프로브 중 하나는 3' 카파 표적화 벡터와 유전체 DNA 사이에 공유된 동일성 영역 중 한면에 인접한 DNA 서열을 맵핑하고; 두번째 프로브는 또한 동일성 영역의 외부이나, 이의 다른 면을 맵핑하고; 세번째 프로브는 벡터 내의 유전적 동일성의 2개의 암(arm) 사이의 신규한 DNA 내(즉, neo 유전자 내)를 맵핑한다. 서던 블롯으로 외부 프로브 중 하나 및 네오마이신 프로브에 의해 검출된 바와 같은 카파 유전자와의 정확하게 돌연변이된(3' 카파 표적화 벡터를 이용한 상동성 재조합에 의함) 부분에 상응하는 DNA의 예상된 *Eco911*-생성 단편의 존재를 확인하였다(데이터는 제시되지 않음). 외부 프로브는 돌연변이 단편 및 또한 상동성 염색체 상의 면역글로불린 카파 유전자와의 비돌연변이 카피로부터의 야생형 단편을 검출한다.

[0139] ES 세포의 6개의 PCR-양성 클론을 또한 마우스 ES 세포에서 발생하는 가장 통상적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 설계된 인 시츄 형광 하이브리드화 절차를 이용하여 핵형적으로 분석하였다. 상기 이상을 갖는 하나의 클론을 추가 사용으로부터 배제시켰다. 서던 블롯 데이터를 기초로 하여 예상된 정확한 유전체 구조를 갖는 것으로 판단된 2개의 핵형적으로 정상인 클론을 추가 사용을 위해 선택하였다.

- [0140] 상기 두 클론을 G418/네오마이신 선택 대신 푸로마이신 선택이 사용되고, 5' 벡터(903)에 의해 변형된 유전체 영역에 부합시키기 위해 프로토콜이 맞춤화된 것을 제외하고는, 3' 벡터(905)에서 사용되는 것과 설계에서 본질적으로 동일한 절차 및 스크리닝 검정을 이용하여 5' 벡터(903)로 변형시켰다. 5' 벡터(903) 트랜스펙션 실험의 목표는 3' 벡터(905) 및 5' 벡터(903) 둘 모두에 의해 예상되는 방식으로 돌연변이된 ES 세포, 즉, 둘 모두의 조작된 돌연변이를 갖는 이중-표적화된 세포의 클론을 분리시키는 것이다. 이러한 클론에서, Cre 재조합효소는 (907)에 도시된 작제물을 생성시키기 위해 2개의 벡터에 의해 카파 유전자좌로 도입된 *loxP* 부위들 사이에서 재조합(902)이 발생하도록 한다.
- [0141] 추가로, 클론은 상동성 염색체와 반대로 동일 염색체 상에서 유전자 표적화를 겪어야 하며, 즉, 표적화 벡터에 의해 생성된 조작된 돌연변이는 별개의 상동성 DNA 가닥 상에서의 트랜스가 아닌 동일 DNA 가닥 상에서 시스로 존재해야 한다. 돌연변이의 시스 배열을 갖는 클론이 유전적 동일성 암(*arm*) 사이의 2개의 유전자 표적화 벡터에 존재하는 새로운 DNA에 하이브리드되는 프로브를 이용한 중기 스프레드(*spread*)의 형광 인 시츄 하이브리드화와 같은 분석 절차에 의해 트랜스 배열을 갖는 것으로부터 구별된다. 2개 유형의 클론은 또한 이들을 Cre 재조합효소를 발현하는 벡터로 트랜스펙션시키고, 5' 벡터(903)에 의해 도입된 티미딘 키나제 유전자에 대한 간시클로비어 선택에서 생존하는 콜로니의 수를 비교하고, 클론으로부터의 세포의 일부가 푸로마이신 또는 G418/네오마이신에 대한 내성에 대해 시험되는 "시블링(*sibling*) 선택" 스크리닝 절차에 의해 생존하는 클론의 약물 내성 표현형을 분석함으로써 서로 구별될 수 있다.
- [0142] 시스 배열의 돌연변이를 갖는 세포는 상기 유형의 실험에서 트랜스 배열을 갖는 세포보다 약 10^3 배 더 간시클로비어 내성인 클론을 발생시키는 것으로 예상된다. 생성된 시스-유래 간시클로비어-내성 클론의 대부분은 또한 푸로마이신 및 G418/네오마이신 둘 모두의 약물에 대한 내성을 보유하는 트랜스-유래 간시클로비어-내성 클론과 대조적으로 푸로마이신 및 G418/네오마이신 둘 모두에 대해 민감하다. 카파 사슬 유전자좌 내에 시스-배열의 조작된 돌연변이를 갖는 세포의 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.
- [0143] 세포의 이중 표적화된 클론이 Cre 재조합효소를 발현하는 벡터로 트랜스펙션되고, 트랜스펙션된 세포는 이후 간시클로비어 선택 하에 놓여지며, 이는 상기 요약된 분석 실험과 같다. 세포의 간시클로비어-내성 클론이 분리되고, 5' 벡터(903) 및 3' 벡터(905)에 의해 발생된 2개의 조작된 돌연변이 사이의 예상 결실의 존재에 대해 PCR 및 서던 블롯에 의해 분석된다. 이들 클론에서, Cre 재조합효소는 2개의 벡터에 의해 카파 사슬 유전자좌로 도입된 *loxP* 부위들 사이에서 재조합이 발생되도록 한다. *loxP* 부위가 2개의 벡터 내의 동일한 상대 배향으로 배열되므로, 재조합은 2개의 *loxP* 부위 사이에 전체 유전체 간격을 포함하는 DNA의 원의 절제를 발생시킨다. 상기 원은 복제 기점을 함유하지 않으며, 따라서 유사분열 동안 복제되지 않을 것이며, 따라서 이들이 클론 확장을 겪음에 따라 세포의 클론으로부터 상실될 것이다. 생성된 클론은 2개의 *loxP* 부위 사이에 본래 존재하였던 DNA의 결실을 갖는다. 예상된 결실을 갖는 클론이 추가 사용을 위해 선택될 것이다.
- [0144] 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌의 2개의 상동성 카피 중 하나에 서열의 결실을 갖는 ES 세포 클론은 V 및 J 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 부분적 인간 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌를 포함하는 DNA의 단편(909)과 함께 Cre 재조합효소 발현 벡터로 트랜스펙션(904)될 것이다. 상기 DNA의 단편의 중요 특징부("K-K"로 언급됨)(SEQ ID NO:2)는 다음과 같다: *lox5171* 부위; 네오마이신 내성 유전자 열린해독틀(개시자 메티오닌 코돈이 결핍되어 있으나, 인-프레임(*in-frame*))이며 *lox5171* 부위 내의 중단되지 않은 열린해독틀과 연속적임); 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; FRT 부위; 마우스 비코딩 서열 내에 엠베딩된 인간 코딩 서열로 각각 구성된 39개의 인간 카파 가변 영역 유전자 세그먼트의 어레이; 마우스 카파 사슬 유전자좌 내의 J 카파 영역 유전자 세그먼트의 클러스터의 바로 업스트림으로부터의 유전체 DNA의 13.5Kb 단편; 마우스 비코딩 DNA에 엠베딩된 5개의 인간 J 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 DNA의 2Kb 단편; *lox5171* 부위에 대해 반대의 상대 배향의 *loxP* 부위.
- [0145] 두번째의 독립적 실험에서, 부분적 인간 DNA(909)의 대안적 단편이 K-K DNA 대신에 사용된다. 상기 DNA의 중요 특징부("L-K"로 언급됨)(SEQ ID NO:3)는 다음과 같다: *lox5171* 부위; 개시자 메티오닌 코돈이 결핍되어 있으나, 인-프레임(*in-frame*))이며 *lox5171* 부위 내의 중단되지 않은 열린해독틀과 연속적인 네오마이신 내성 유전자 열린해독틀; 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; FRT 부위; 마우스 비코딩 서열 내에 엠베딩된 인간 코딩 서열로 각각 구성된 38개의 인간 람다 가변 영역 유전자 세그먼트의 어레이; 마우스 카파 사슬 유전자좌 내의 J 영역 유전자 세그먼트의 클러스터의 바로 업스트림으로부터의 유전체 DNA의 13.5Kb 단편; 마우스 비코딩 DNA에 엠베딩된 5개의 인간 J 람다 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 DNA의 2Kb 단편; *lox5171* 부위에 대해 반대의 상대 배향의 *loxP* 부위.
- [0146] K-K(SEQ ID NO:2) 및 L-K(SEQ ID NO:3) 트랜스펙션 실험으로부터의 트랜스펙션된 클론이 G418 선택하에 놓여지

고, 이는 부분적 인간 공여체 DNA가 3' 벡터(905) 및 5' 벡터(903) 각각의 옆에 놓여진 *loxP*와 *lox5171* 부위 사이의 결실된 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌로 전체가 통합되는 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪는 세포의 클론을 풍부하게 한다. K-K 서열을 이용하여 생성된 DNA 영역은 도 9의 (911)에 예시되어 있다. 5' 벡터(903)로부터의 잔여 구성요소가 FLP-매개 재조합(906)을 통해 제거되어 (913)에 도시된 최종 인간화된 유전자좌가 발생된다.

[0147] G418-내성 ES 세포 클론은, 이들이 원치않는 재배열 또는 결실이 없이 예상 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪었는지 결정하기 위해 PCR 및 서던 블롯에 의해 분석된다. 예상 유전체 구조를 갖는 K-K 및 L-K 클론 둘 모두가 추가 사용을 위해 선택된다.

[0148] 마우스 카파 사슬 유전자좌 내에 부분적 인간 면역글로불린 DNA를 각각 갖는 K-K ES 세포 클론 및 L-K ES 세포 클론이 표준 절차에 따라 계통 DBA/2로부터의 마우스 주머니배로 미세주입되어 부분적 ES 세포 유래 키메라 마우스가 발생된다. 코트에 대해 가장 높은 수준의 ES 세포 유래 기여를 갖는 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배에 선택된다. 교배에 사용하기 위해 선택된 암컷 마우스는 C57Bl/6NTac 계통이며, 이는 또한 이의 종자세포에서 발현되는 F1p 재조합효소를 엔코딩하는 트랜스진을 가질 것이다. 상기 교배로부터의 후손이 부분적 인간 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌의 존재, 및 재조합효소-매개 카세트 교환 단계에서 생성된 FRT-인접된 네오마이신 내성 유전자의 상실에 대해 분석된다. 부분적 인간 유전자좌를 갖는 마우스가 K-K 및 L-K 마우스의 콜로니를 확립하기 위해 사용된다.

[0149] 실시예 3에 기재된 바와 같이 생성된 부분적 인간(즉, 인간화된) 중쇄 유전자좌를 갖는 마우스는 인간화된 카파 사슬 유전자좌를 갖는 마우스와 교배될 수 있다. 차례로, 이의 후손은 둘 모두의 인간화된 유전자좌, 즉, 중쇄 및 카파에 대해 인간화된 유전자좌에 대해 동형접합인 마우스를 궁극적으로 발생시키는 계획으로 함께 교배된다. 이러한 마우스는 인간 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인으로 구성된 부분적 인간 중쇄를 발생시킨다. 이들은 또한 인간 카파 가변 도메인 및 이의 카파 유전자좌로부터의 마우스 카파 불변 도메인으로 구성된 부분적 인간 카파 단백질을 생성한다. 상기 마우스로부터 회수된 모노클로날 항체는 인간 카파 가변 도메인과 페어링된 인간 가변 도메인으로 구성된다.

[0150] 교배 계획에서의 변화는 인간화된 중쇄 유전자좌에 대해 동형접합이나, 카파 유전자좌에서는 이종접합이어서, 하나의 염색체 상에 K-K 인간화된 유전자좌를 갖고, 다른 염색체 상에 L-K 인간화된 유전자좌를 갖는 마우스를 발생시키는 것을 포함한다. 이러한 마우스는 인간 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인으로 구성된 부분적 인간 중쇄를 생성한다. 이들은 또한 인간 카파 가변 도메인 및 이들의 카파 유전자좌 중 하나로부터의 마우스 카파 불변 도메인으로 구성된 부분적 인간 카파 단백질을 생성한다. 다른 카파 유전자좌로부터, 이들은 인간 램다 가변 도메인 및 마우스 카파 불변 도메인으로 구성된 부분적 인간 램다 단백질을 생성할 것이다. 상기 마우스로부터 회수된 모노클로날 항체는 일부 경우에 인간 카파 가변 도메인과 페어링되고, 다른 경우에 인간 램다 가변 도메인과 페어링된 인간 가변 도메인으로 구성된다.

[0151] **실시예 5: 마우스 유전체의 면역글로불린 램다 사슬 유전자 유전자좌로의 부분적 인간 면역글로불린 영역의 도입.**

[0152] 포유동물 유전체의 일부를 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 대체시키는 방법이 도 10에 예시된다. 이러한 방법은 J3, C3, J1 및 C1 유전자 세그먼트에 바로 근접한 V2 유전자 세그먼트의 업스트림 및 V1 유전자 세그먼트의 다운스트림 둘 모두의 유전자좌와 동일성을 공유하는 표적화 벡터(1003)를 포함하는 상동성 재조합 과정에 의해 야생형 마우스 면역글로불린 램다 유전자좌(1001)로부터의 약 194Kb의 DNA를 결실시키는 것을 제공한다. 상기 벡터는 194Kb의 DNA를 DNA의 비-자연 단편이 재조합효소-매개 카세트 교환(1002)을 통해 변형된 V_L 유전자좌로 이동되는 이후의 부위 특이적 재조합을 가능케 하도록 설계된 구성요소로 대체시킨다. 이러한 예에서, 비-자연 DNA는 인간 및 비-인간 서열 둘 모두를 포함하는 합성 핵산이다.

[0153] 194Kb 결실을 달성시키기 위한 유전자 표적화 벡터(1003)의 중요 특징부는 다음과 같다: 디프테리아 독소의 A 서브유닛을 엔코딩하는 유전자 또는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자와 같은 음성 선택 유전자; 램다 유전자좌 내의 마우스 V2 가변 영역 유전자 세그먼트의 5'으로부터의 4Kb의 유전체 DNA; FRT 부위; 마우스 *Polr2a* 유전자 프로모터를 함유하는 유전체 DNA의 단편; 번역 개시 서열("코작" 컨센서스 서열에 엠베딩된 메티오닌 코돈); Cre 재조합효소에 대한 돌연변이된 *loxP* 인지 서열(*lox5171* 부위로 공지됨); 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; 퓨로마이신에 대해 내성을 부여하는 단백질을 엔코딩하는 열린해독틀; 이러한 열린해독틀은 *Polr2a* 프로모터와 비교하여 안티센스 가닥에 존재하고, 번역 개시 서열은 이 다음에 존재함; 이 뒤의 자체 전사 종료/아데닐중합체형성 서열; Cre 재조합효소에 대한 *loxP* 인지 서열; 퓨로마이신 내성 유전자 열린해독틀과

동일한 안티센스 가닥 상의 번역 개시 서열("코작" 컨센서스 서열에 엠베딩된 메티오닌 코돈); 퓨로마이신 내성 열린해독틀의 전사를 유도하고, *loxP* 부위의 개시 코돈 다운스트림에서 번역을 개시하고, *Po1r2a* 프로모터에 비해 안티센스 가닥 상에서 모두 퓨로마이신 열린해독틀로의 *loxP* 부위를 통한 복귀를 지속시키고, 번역 개시 서열이 이 다음에 존재하도록 배향된 닭 베타 액틴 프로모터 및 사이토메갈로바이러스 초기 인핸서 구성요소; "F3" 부위로 공지된 Flp 재조합효소에 대한 돌연변이된 인지 부위; J3, C3, J1 및 C1 유전자 세그먼트 및 주위 서열을 함유하는 7.3Kb의 유전체 DNA; 디프테리아 독소의 A 서브유닛을 엔코딩하는 유전자 또는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자와 같은 두번째 음성 선택 유전자.

[0154] 마우스 배아 줄기(ES) 세포(C57B1/6NTac 마우스로부터 유래됨)가 널리 사용되는 절차에 따라 표적화 벡터(1003)를 이용한 전기천공에 의해 트랜스펙션(1002)된다. 생성된 작제물(1005)은 자연 DNA를 196 Kb 영역 내의 표적화 벡터(1003)로부터의 서열로 대체할 것이다.

[0155] 전기천공 전, 벡터 DNA는 원핵생물 플라스미드 서열 또는 이와 회합된 폴리링커에서만 절단하는 레어(rare)-절단 제한 효소로 선형화된다. 트랜스펙션된 세포가 플레이팅되고, 24시간 이상 후에 퓨로마이신을 이용한 약물 선택하에 놓여진다. 약물-내성 ES 세포의 콜로니가 이들이 1주 경과 후에 육안으로 관찰될 수 있게 된 후에 플레이트로부터 물리적으로 추출된다. 이러한 채집된 콜로니는 분리되고, 마이크로-웰 플레이트에 다시 플레이팅되고, 수일 동안 배양된다. 이후, 세포의 클론 각각은 세포의 일부가 보관용으로서 동결되고, 나머지가 분석 목적을 위해 DNA의 분리에 사용되도록 나누어진다.

[0156] ES 세포 클론으로부터의 DNA가 널리 사용되는 유전자-표적화 검정 설계를 이용하여 PCR에 의해 스크리닝된다. 4개의 검정이 이용되고, 각각의 경우, PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 중 하나가 표적화 벡터와 유전체 DNA 사이에 공유된 동일성 영역 외부를 맵핑하는 반면, 나머지는 벡터 내(예를 들어, *puro* 유전자 내)의 유전적 동일성의 2개의 암(arm) 사이의 신규한 DNA 내를 맵핑한다. 표준 설계에 따라, 상기 검정은 표적화 벡터(1003)와 자연 DNA(1001) 사이에서 충분히 옳은 상동성 재조합을 겪은 트랜스펙션된 세포로부터 유래된 세포의 클론에만 존재하는 DNA의 단편을 검출한다.

[0157] 트랜스펙션(1002)으로부터 약 6개의 PCR-양성 클론이 확장을 위해 선택된 후, 서던 블롯 검정을 이용하여 추가 분석된다. 서던 블롯은 프로브 및 절단의 조합이 DNA가 상동성 재조합에 의해 적절하게 변형되었는지의 여부의 확인을 가능케 하도록 선택된 다수의 제한 효소로 절단된 클론으로부터의 유전체 DNA 및 3개의 프로브를 포함한다.

[0158] ES 세포의 6개의 PCR-양성 클론이 마우스 ES 세포에서 발생하는 가장 통상적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 설계된 인 시츄 형광 하이브리드화 절차를 이용하여 핵형적으로 분석된다. 상기 이상의 증거를 나타내는 클론이 추가 사용으로부터 배제될 것이다. 서던 블롯 데이터를 기초로 하여 예상되는 정확한 유전체 구조를 갖는 것으로 판단되는 핵형적으로 정상인 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0159] 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌의 2개의 상동성 카피 중 하나에서 결실을 갖는 ES 세포 클론이 V, J 및 C 영역 유전자 세그먼트를 함유하는 부분적 인간 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌를 포함하는 DNA의 단편(1007)(SEQ ID NO:4)과 함께 Cre 재조합효소 발현 벡터로 다시 트랜스펙션(1004)된다. 상기 DNA의 단편(1007)의 중요 특징부는 다음과 같다: *lox5171* 부위; 네오마이신 내성 유전자 열린해독틀(개시자 메티오닌 코돈이 결핍되어 있으나, 인-프레임(in-frame)이며 *lox5171* 부위 내의 중단되지 않은 열린해독틀과 연속적임); 전사 종료/아테닐중합체형성 서열; FRT 부위; 마우스 램다 비코딩 서열 내에 엠베딩된 인간 램다 코딩 서열로 각각 구성된 38개의 인간 램다 가변 영역 유전자 세그먼트의 어레이; 각각의 유닛이 인간 J 램다 영역 유전자 세그먼트 및 마우스 램다 유전자좌로부터의 비코딩 서열 내에 엠베딩된 마우스 램다 불변 도메인 유전자 세그먼트로 구성되는 J-C 유닛의 어레이(인간 J 영역 유전자 세그먼트는 J1, J2, J6 및 J7을 엔코딩하는 세그먼트일 것인 반면, 마우스 램다 불변 도메인 유전자 세그먼트는 C1 및/또는 C2 및/또는 C3일 것이다); "F3" 부위로 공지된 Flp 재조합효소에 대한 돌연변이된 인지 부위; 하이그로마이신 내성을 부여하는 열린해독틀; 열린해독틀은 작제물 내에서 면역글로불린 유전자 세그먼트 코딩 정보와 관련하여 안티센스 가닥 상에 위치됨; *lox5171* 부위에 대한 반대 상배향의 *loxP* 부위.

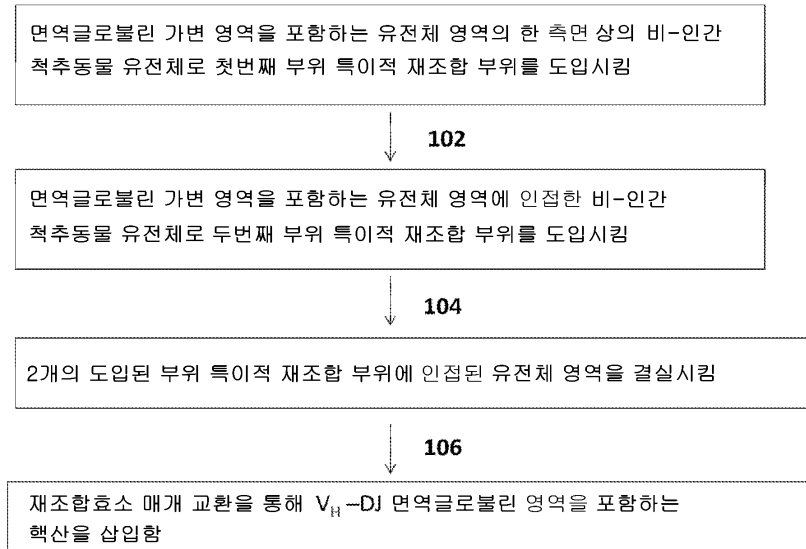
[0160] 트랜스펙션된 클론이 G418 및/또는 하이그로마이신 선택 하에 놓여지고, 이는 부분적 인간 공여체 DNA가 유전자 표적화 벡터에 의해 놓여진 *loxP*와 *lox5171* 부위 사이의 결실된 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌로 전체가 통합되는 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪는 세포의 클론을 풍부하게 한다. 표적화 벡터(1003)로부터의 잔여 구성요소가 FLP-매개 재조합(1006)을 통해 제거되어 (1011)에 도시된 최종 인간화된 유전자좌가 발생된다.

- [0161] G418/하이그로마이신-내성 ES 세포 클론은, 이들이 원치않는 재배열 또는 결실이 없이 예상 재조합효소-매개 카세트 교환 과정을 겪었는지 결정하기 위해 PCR 및 서던 블롯에 의해 분석된다. 예상 유전체 구조를 갖는 클론이 추가 사용을 위해 선택될 것이다.
- [0162] 마우스 람다 사슬 유전자좌 내에 부분적 인간 면역글로불린 DNA(1011)를 갖는 ES 세포 클론이 표준 절차에 따라 계통 DBA/2로부터의 마우스 주머니비로 미세주입되어 부분적 ES 세포-유래 키메라 마우스가 발생된다. 코트에 대해 가장 높은 수준의 ES 세포-유래 기여를 갖는 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배에 선택된다. 선택된 암컷 마우스는 C57B1/6NTac 계통일 것이며, 이는 이들의 종자세포에서 발현되는 Flp 재조합효소를 엔코딩하는 트랜스진을 갖는다. 이러한 교배로부터의 후손이 부분적 인간 면역글로불린 람다 사슬 유전자좌의 존재, 및 재조합효소-매개 카세트 교환 단계에서 생성된 FRT-인접된 네오마이신 내성 유전자 및 F3-인접된 하이그로마이신 내성 유전자의 상실에 대해 분석된다. 부분적 인간 유전자좌를 갖는 마우스가 마우스의 콜로니를 확립하는데 사용된다.
- [0163] 일부 양태에서, 인간화된 중쇄 및 카파 유전자좌(실시에 3 및 4에 기재된 바와 같음)를 포함하는 마우스가 인간화된 람다 유전자좌를 갖는 마우스와 교배된다. 상기 유형의 교배 계획으로부터 발생된 마우스는 인간화된 중쇄 유전자좌에 대해 동형접합이고, K-K 인간화된 유전자좌 또는 L-K 인간화된 유전자좌에 대해 동형접합일 수 있다. 대안적으로, 이들은 한 염색체 상에서 K-K 유전자좌 및 다른 염색체 상에서 L-K 유전자좌를 갖는 카파 유전자좌에서 이형접합일 수 있다. 이들 마우스 각각은 인간화된 람다 유전자좌에 대해 동형접합일 것이다. 이러한 마우스로부터 회수된 모노클로날 항체는 일부 경우에 인간 카파 가변 도메인 및 다른 경우에 인간 람다 가변 도메인과 페어링되는 인간 가변 도메인으로 구성될 것이다. 람다 가변 도메인은 인간화된 L-K 유전자좌 또는 인간화된 람다 유전자좌로부터 유래될 것이다.
- [0164] **실시예 6: 마우스 유전체로의 부분적 인간 면역글로불린 미니유전자의 도입.**
- [0165] 특정한 다른 양태에서, 부분적 인간 면역글로불린 영역은 도 11에 예시된 것과 같은 인간 가변 도메인 미니유전자를 포함할 것이다. 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 인간 V_H 유전자를 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역 대신, 마우스 면역글로불린 영역은 보다 적은 인간 V_H 유전자, 예를 들어, 1-43개의 인간 V_H 유전자를 포함하는 미니유전자(1119)로 대체된다.
- [0166] 포유동물 숙주 유전체로 도입되는 부분적 인간 면역글로불린 영역(1110)을 포함하는 부위 특이적 표적화 벡터(1129)는 부위 특이적 재조합 부위(1109, 1111, 1107 및 1105) 및 puro Δ TK 유전자(1103)를 포함하는 결실된 내인성 면역글로불린 영역을 갖는 유전체 영역(1101)으로 도입(1102)된다. 부위 특이적 표적화 벡터는 i) 44개 모두의 인간 V_H 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 V_H 영역(1119); ii) 마우스 서열을 포함하는 10 kb 프리-DJ 영역(721); iii) 인간 D 및 J 코딩 영역 및 마우스 유전체 내인성 서열을 기초로 한 개재 서열을 포함하는 DJ 영역(1125); 및 iv) 마우스 비-기능성 J_H 유전자 영역을 포함하는 부분적 인간 면역글로불린 영역으로 구성된다. 부분적 인간 면역글로불린 영역은 변형된 내인성 유전자좌와의 재조합을 가능케 하는 재조합 부위(1109, 1111, 1105 및 1107)에 인접된다. 적절한 재조합효소(1104)의 도입 후, 부분적 인간 면역글로불린 영역이 불변 유전자 영역(1127)의 유전체 업스트림에 통합된다.
- [0167] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 부분적 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 도입에 대한 일차 스크리닝은 서던 블롯, 또는 서던 및/또는 자연 대립유전자 상실 qPCR 스크린을 이용한 이차 스크린에 의해 뒷받침되는 일차 PCR 스크린에 의해 수행될 수 있다. 재조합 사건의 일부로서의 HPRT 유전자(1105)의 결실은 (6-티오구아닌-의존성) 음성 선택을 이용하여 재조합 사건을 겪지 않은 세포의 확인을 가능케 할 것이다.
- [0168] 상기 기재는 단지 본 발명의 원리를 예시한다. 당업자는 본원에 명백히 기재되거나 도시되어 있지 않더라도 본 발명의 원리를 구체화하는 다양한 배열을 고안할 수 있을 것이며, 이는 본 발명의 사상 및 범위 내에 포함되는 것이 인지될 것이다. 또한, 본원에 열거된 모든 예 및 조건 어구는 주로 독자가 본 발명의 원리 및 상기 분야에서 더 나아가기 위해 본 발명자에 의해 제공되는 개념을 이해하는 것을 돕기 위한 것이며, 이는 상기 특별히 열거된 예 및 조건으로 제한되지 않는 것으로 간주되어야 한다. 더욱이, 본 발명의 원리, 양태 및 구체에 뿐만 아니라 이의 특정 예를 언급하는 본원의 모든 언급은 이의 구조적 및 기능적 동등부 둘 모두를 포함한다. 추가로, 상기 동등부는 현재 공지된 동등부 및 이후에 개발되는 동등부 둘 모두, 즉, 구조와 관계 없이 동일 기능을 수행하는 개발되는 임의의 구성요소를 포함한다. 따라서, 본 발명의 범위는 본원에 제시되고 기재된 예시적 구체예로 제한되지 않는다. 오히려, 본 발명의 범위 및 사상은 첨부된 청구항에 의해 구체화된다. 하기 청구항에서, 용어 "수단"이 사용되지 않는 경우, 본원에 언급된 특징 또는 구성요소는 모두 35 U.S.C. § 112, ¶6에

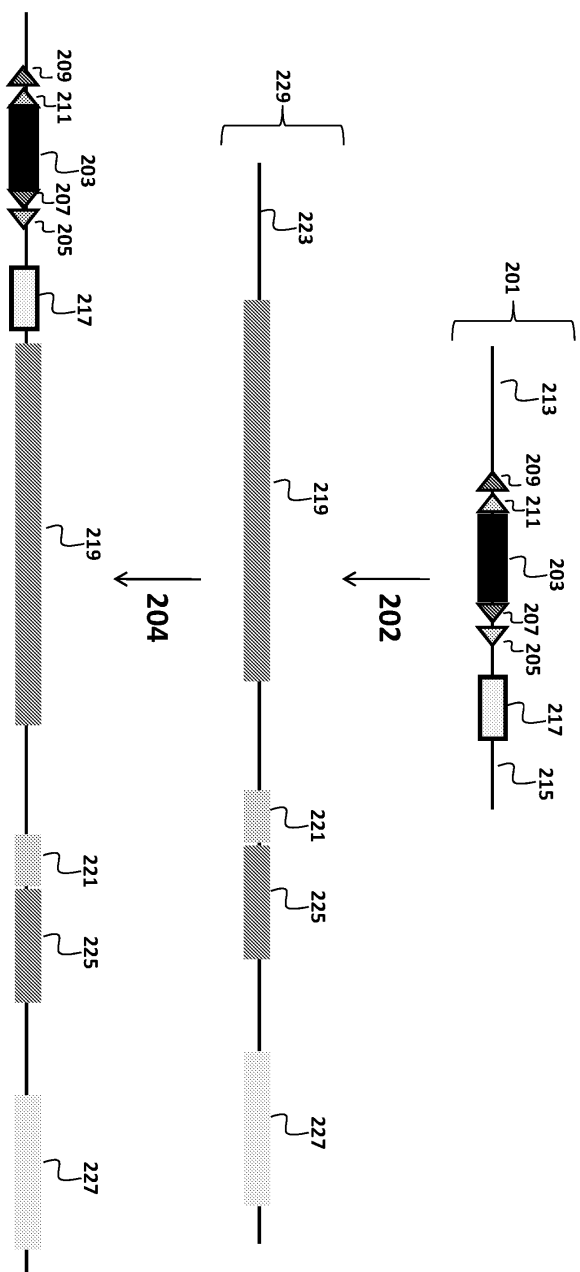
따라 수단-기능(means-plus-function) 제한으로 간주되어선 안된다.

도면

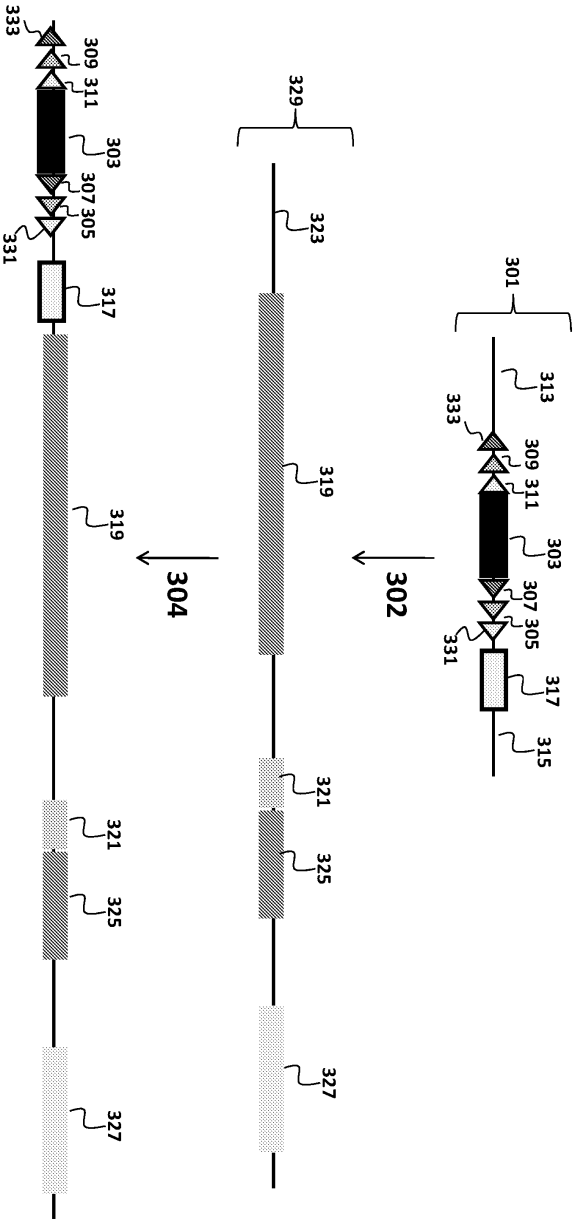
도면1



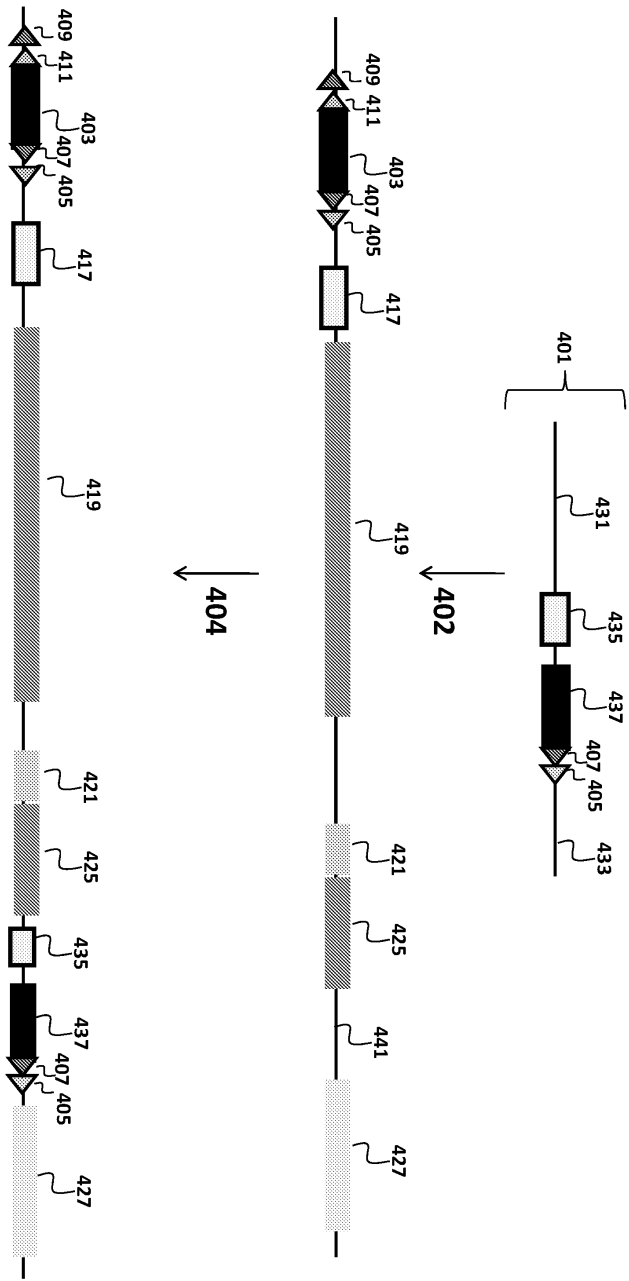
도면2



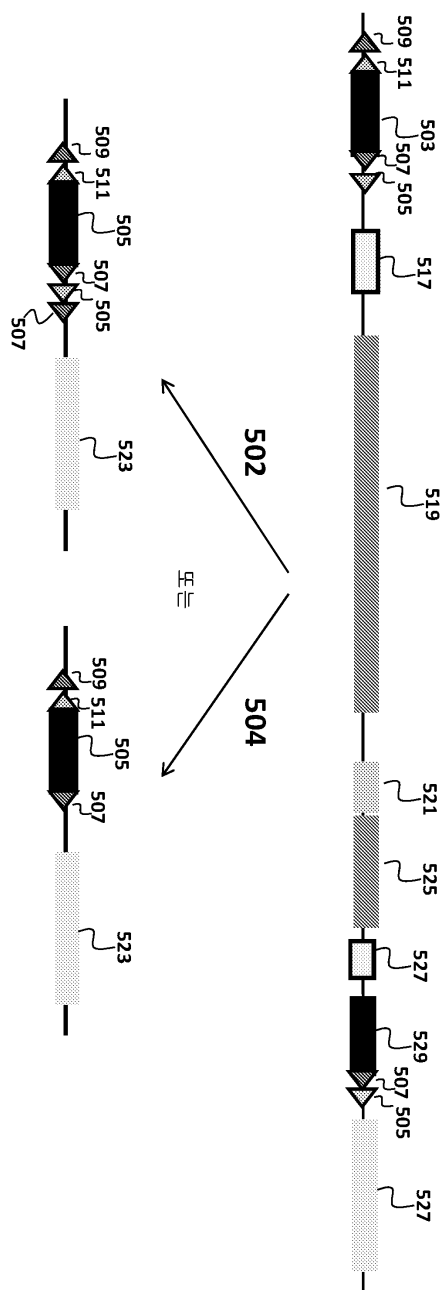
도면3



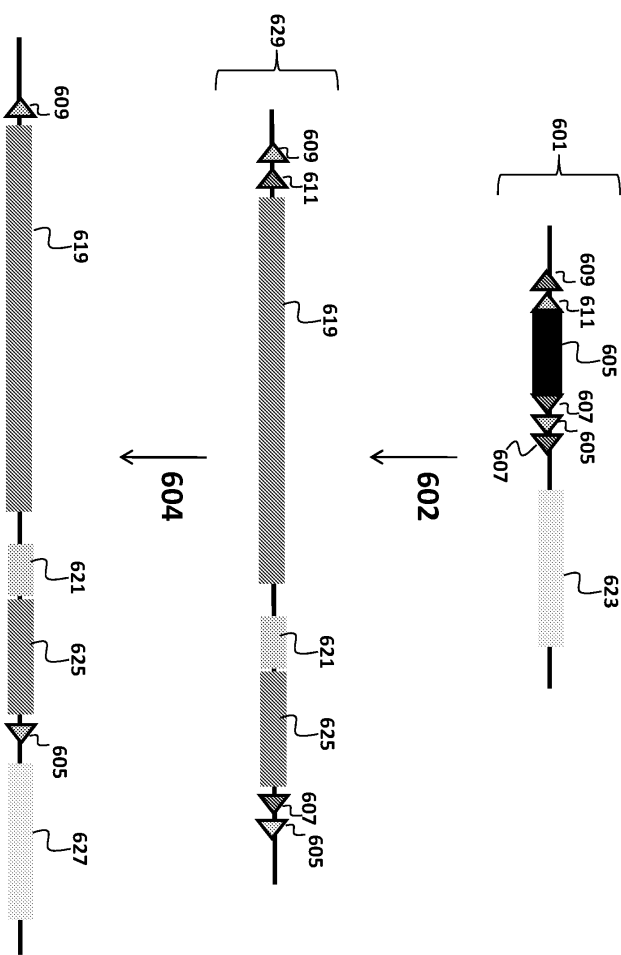
도면4



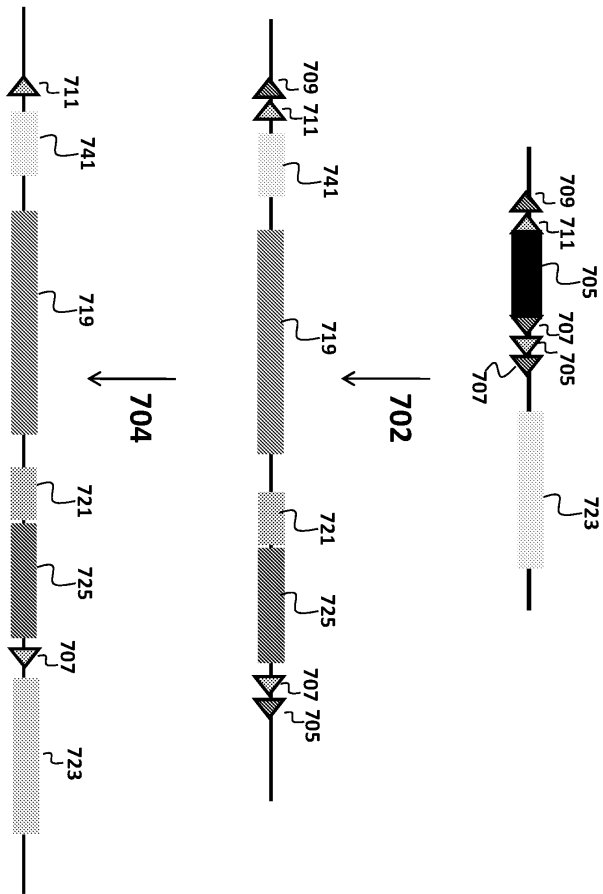
도면5



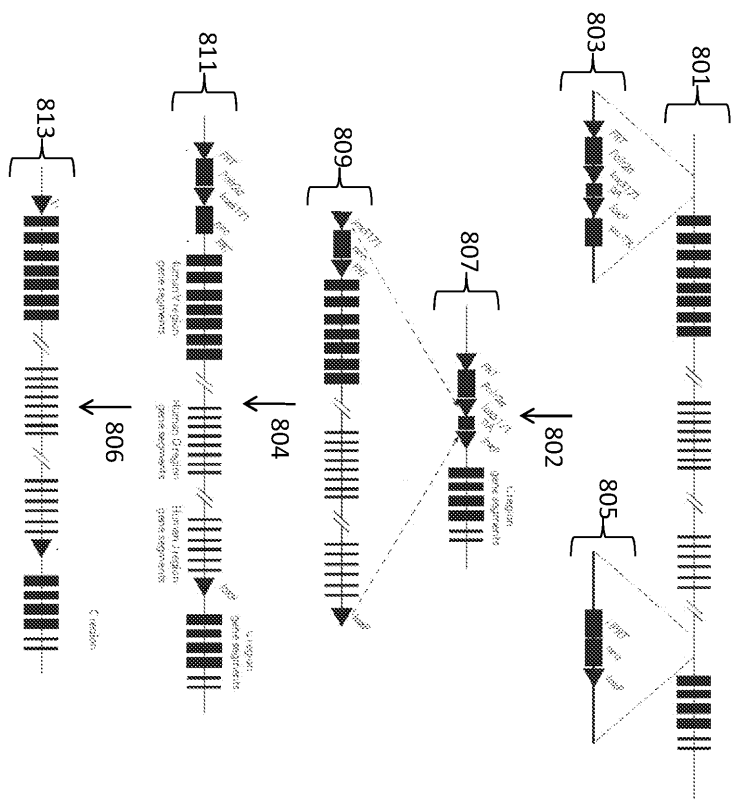
도면6



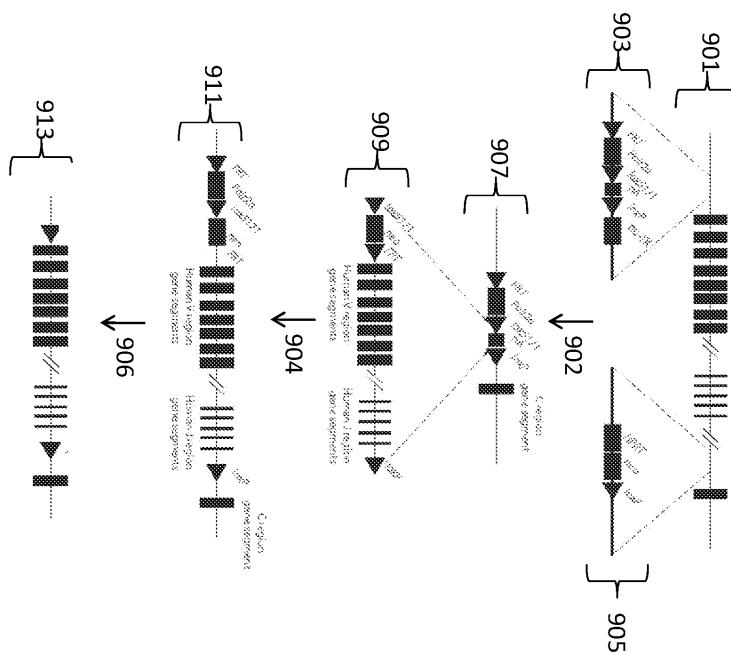
도면7



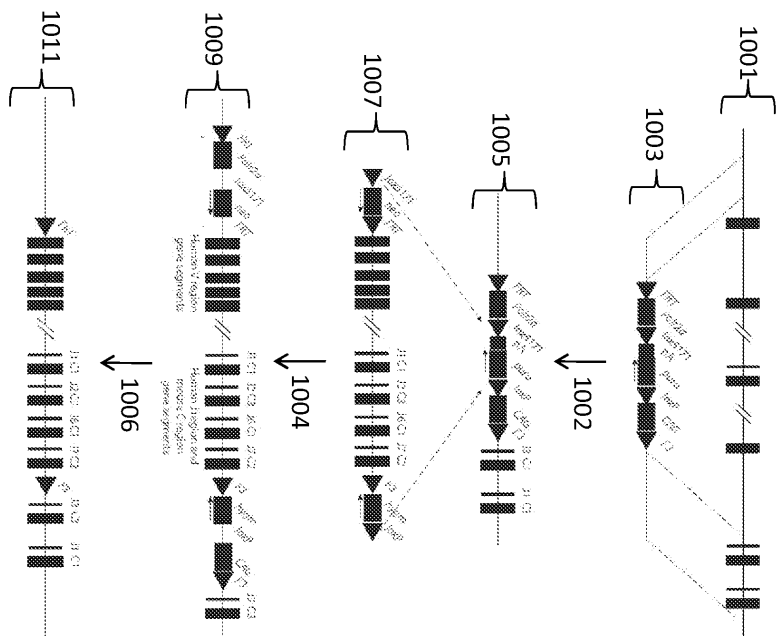
도면8



도면9



도면10



도면11

