



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0125236  
(43) 공개일자 2023년08월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/00 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)  
C07K 14/58 (2006.01) C07K 14/72 (2006.01)  
C12N 15/90 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/00 (2013.01)  
A01K 67/0275 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7024356
- (22) 출원일자(국제) 2021년12월20일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년07월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/064263
- (87) 국제공개번호 WO 2022/140219  
국제공개일자 2022년06월30일
- (30) 우선권주장  
63/129,893 2020년12월23일 미국(US)  
63/219,402 2021년07월08일 미국(US)

- (71) 출원인  
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드  
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
- (72) 발명자  
마스타이티스 제이슨  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론파마슈티칼스 인코포레이티드 내  
머피 앤드류 제이.  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론파마슈티칼스 인코포레이티드 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

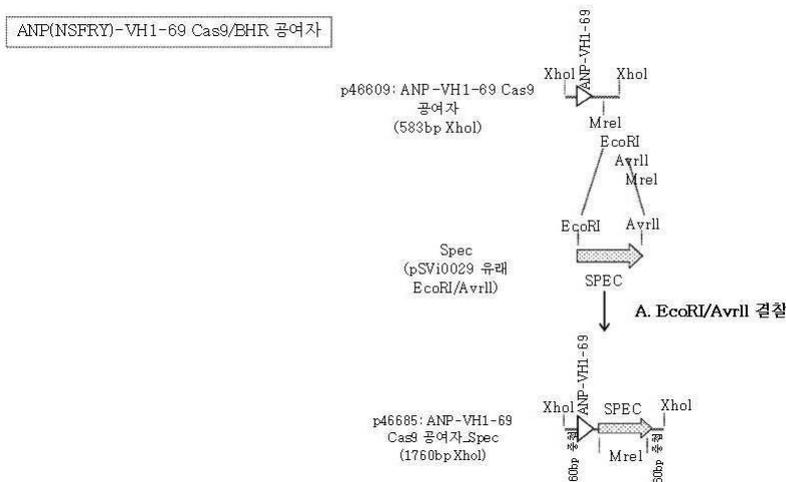
전체 청구항 수 : 총 99 항

(54) 발명의 명칭 앵커 변형된 항체를 암호화하는 핵산 및 이의 사용

(57) 요약

앵커-변형된 면역글로불린 폴리펩티드가 본원에 기술되며, 여기서 앵커는 관심 수용체에 대해 면역글로불린 폴리펩티드를 이동시킨다. 앵커-변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 일반적으로 N-말단에서 앵커, 예를 들어, 수용체에 결합하는 리간드의 수용체 결합 부분을 갖는 것으로 특징지어진다. 앵커-변형된 면역글로불린 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 면역글로불린 분자로 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 앵커-변형된 면역글로불린 폴리펩티드를 만들 수 있다. 이러한 비-인간 동물은 비-인간 동물을 만들고 사용하기 위한 방법 및 조성물과 함께 또한 제공된다. 비-인간 동물로부터 앵커-변형된 면역글로불린을 생산하는 방법뿐만 아니라, 이로부터 생성된 앵커-변형된 면역글로불린도 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*C07K 14/58* (2013.01)  
*C07K 14/723* (2013.01)  
*C12N 15/907* (2013.01)  
*C07K 2317/21* (2013.01)  
*C07K 2317/56* (2013.01)  
*C07K 2317/76* (2013.01)  
*C07K 2317/92* (2013.01)  
*C07K 2319/02* (2013.01)  
*C07K 2319/33* (2013.01)

(72) 발명자

**맥휘터 존**

미국 노스 캐롤라이나 27858 그린빌 핀 오크 코트  
102

**보로니나 베라**

미국 메릴랜드 20852 노스 베데스다 올드 게이트  
플레이스11806

**그로마다 제스퍼**

미국 매사추세츠 01742 콩코드 엘시노어 스트리트  
197

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 면역글로불린(Ig) 가변(V) 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

여기서 변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고,

여기서 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

(i) Ig 신호 펩티드,

(ii) 앵커, 및

(iii) 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하고,

여기서 앵커는 동족 수용체에 결합하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 포함하고, 선택적으로, 여기서 핵산 분자는 임의의 다른 V 분절이 결합되어 있는, 재조합 핵산 분자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, Ig 신호 펩티드는 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 Ig 신호 펩티드인, 재조합 핵산 분자.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 중쇄 가변( $V_H$ ) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라

변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig  $V_H$  분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig  $V_H$  분절이고,

앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

(i) Ig 신호 펩티드,

(ii) 앵커, 및

(iii) 생식계열 Ig  $V_H$  분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 인간 (h)  $V_H1-2$  분절, 생식계열  $hV_H1-3$  분절, 생식계열  $hV_H1-8$  분절, 생식계열  $hV_H1-18$  분절, 생식계열  $hV_H1-24$  분절, 생식계열  $hV_H1-45$  분절, 생식계열  $hV_H1-46$  분절, 생식계열  $hV_H1-58$  분절, 생식계열  $hV_H1-69$  분절, 생식계열  $hV_H2-5$  분절, 생식계열  $hV_H2-26$  분절, 생식계열  $hV_H2-70$  분절, 생식계열  $hV_H3-7$  분절, 생식계열  $hV_H3-9$  분절, 생식계열  $hV_H3-11$  분절, 생식계열  $hV_H3-13$  분절, 생식계열  $hV_H3-15$  분절, 생식계열  $hV_H3-16$  분절, 생식계열  $hV_H3-20$  분절, 생식계열  $hV_H3-21$  분절, 생식계열  $hV_H3-23$  분절, 생식계열  $hV_H3-30$  분절, 생식계열  $hV_H3-30-3$  분절, 생식계열  $hV_H3-30-5$  분절, 생식계열  $hV_H3-33$  분절, 생식계열  $hV_H3-35$  분절, 생식계열  $hV_H3-38$  분절, 생

식계열 hV<sub>H</sub>3-43 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-48 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-49 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-53 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-64 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-66 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-72 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-73 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-74 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-28 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-31 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-34 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-39 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-59 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-61 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>5-51 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>6-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-4-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-81 분절, 또는 이의 변이체인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체가 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절 또는 이의 변이체이고, 선택적으로 여기서 Ig 신호 펩티드가 서열 MDWTWRFLFVVAATGVQS(서열번호 7)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 6**

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 작동가능한 연결로 및 5' 에서 3' 로:

- (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절,
- (II) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 다양성 (D<sub>H</sub>) 분절, 및
- (III) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 결합 (J<sub>H</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

- (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절이 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig D<sub>H</sub> 분절을 포함하고/하거나,
- (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절이 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig J<sub>H</sub> 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 8**

제6항 또는 제7항 있어서, (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절 및 (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 유전자 분절이, 재조합되고 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성해서, 재조합 핵산 분자가 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 으로 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열이 재조합되어 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성하고,

여기서 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인은 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커, 및
- (iii) 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, 상보성 결정 영역(CDR) 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 10**

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절이 재배열되지 않은 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 11**

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, Ig 중쇄 불변 영역(C<sub>H</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

여기서 Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은

- (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절,
- (II) 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절, 및
- (III) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절

의 하류에서 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.

**청구항 12**

제11항에 있어서, Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은 IgM 이소형을 암호화하는 Igμ 유전자, IgD 이소형을 암호화하는 Igδ 유전자, IgG 이소형을 암호화하는 Igγ 유전자, IgA 이소형을 암호화하는 Igα 유전자, 및/또는 IgE 이소형을 암호화하는 Igε 유전자를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 13**

제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 앵커-변형된 Ig 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산 분자로서, 여기서 앵커-변형된 Ig 중쇄는 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커,
- (iii) 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 중쇄 가변 도메인, 및
- (iv) Ig C<sub>H</sub>를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 14**

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Ig C<sub>H</sub>는 비-인간 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 설치류 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 랫트 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 마우스 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 18**

제1항 또는 제2항에 있어서, 생식계열 Ig V 유전자 분절 또는 이의 변이체가 생식계열 Ig 경쇄 가변 (V<sub>L</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라

변형된 Ig V 분절이 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임 워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절이고,

앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커, 및
- (iii) 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:

- (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및
- (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 (J<sub>L</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및 하나 또는 복수의 Ig J<sub>L</sub> 분절이 재조합되어 앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열을 형성하고,

앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인은 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커, 및
- (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 21**

제19항 또는 제20항에 있어서, Ig 경쇄 불변 영역(C<sub>L</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

Ig C<sub>L</sub>을 암호화하는 상기 핵산 서열은:

- (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및
  - (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합(J<sub>L</sub>) 분절
- 의 하류에 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.

**청구항 22**

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 앵커-변형된 Ig 경쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산 분자로서, 앵커-변형된 Ig 경쇄는 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커,
- (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 경쇄 가변 도메인, 및

(iv) Ig C<sub>L</sub>을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, Ig C<sub>L</sub>은 비-인간 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 설치류 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 랫트 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 26**

제23항에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 마우스 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 27**

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 카파(V<sub>K</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라

변형된 Ig V 분절은 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>K</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절이고,

앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커, 및
- (iii) 생식계열 Ig V<sub>K</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:

- (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및
- (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파(J<sub>K</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 29**

제28항에 있어서, Ig 경쇄 불변 카파 영역(C<sub>K</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

여기서 Ig C<sub>K</sub>를 암호화하는 핵산 서열은:

- (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및
  - (II) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>K</sub> 분절
- 의 하류에서 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.

**청구항 30**

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 람다(V<sub>λ</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라

변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V $\lambda$  분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V $\lambda$  분절이고,

앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

- (i) Ig 신호 펩티드,
- (ii) 앵커, 및
- (iii) 생식계열 Ig V $\lambda$  분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:

- (I) 변형된 Ig V $\lambda$  분절, 및
- (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 램다(J $\lambda$ ) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 32**

제31항에 있어서, Ig 경쇄 불변 램다 영역(C $\lambda$ )을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

Ig C $\lambda$ 를 암호화하는 핵산 서열은:

- (I) 변형된 Ig V $\lambda$  분절, 및
  - (II) 하나 또는 복수의 Ig J $\lambda$  분절
- 의 하류에서 작동가능하게 연결되는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 앵커는 관심있는 비-면역글로블린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3에 연결하는 링커를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 링커는 서열 GGGGS(서열번호 5)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 35**

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 앵커는 나트륨이노 펩티드(NP)의 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR) 결합 부분을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 36**

제35항에 있어서, NP의 NPR 결합 부분은 NP의 C-말단 꼬리를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 37**

제35항 또는 제36항에 있어서, NP는 심방 나트륨 이노 펩티드(ANP)인, 재조합 핵산 분자.

**청구항 38**

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 앵커는 서열 NSFRY(서열번호 3)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 39**

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8 또는 이의 퇴화 변이체로 제시된 서열, 서열번호 10 또

는 이의 퇴화 변이체로 제시된 서열, 이의 퇴화 변이체인 서열번호 11, 및 서열번호 12 또는 이의 퇴화 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 재조합 핵산 분자.

**청구항 40**

제1항 내지 제10항 및 제33항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>H</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>H</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 42**

제40항 또는 제41항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 43**

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절 또는 모든 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절 제외한 모든 것을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 44**

제40항 내지 제43항 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 45**

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 5' 상동성 암은 서열번호 11로서 제시된 서열을 포함하고/하거나 3' 상동성 암은 서열번호 12로서 제시된 서열을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 46**

제1항 내지 제17항 및 제33항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 유전자 분절, 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간 C<sub>H</sub> 유전자를 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 48**

제1항 내지 제2항, 제18항 내지 제20항, 제27항 내지 제28항, 제30항 내지 제31항, 및 제33항 내지 제38항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>L</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 50**

제48항 또는 제49항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 51**

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 52**

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 53**

제1항 내지 제2항, 제18항 내지 제38항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절, 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 유전자 분절, 및 비-인간 C<sub>L</sub> 유전자를 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 55**

제1항 내지 제2항, 제18항 내지 제20항, 제27항 내지 제28항, 및 제33항 내지 제38항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>κ</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 κ 좌위이

고/이거나 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성  $Ig V_{\kappa}$  및/또는  $J_{\kappa}$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_{\kappa}$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 57**

제55항 또는 제56항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_{\kappa}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 58**

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서의 모든 비-인간  $V_{\kappa}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 59**

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위는  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 60**

제1항 내지 제2항 및 제18항 내지 제29항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위가  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 61**

제60항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간  $Ig$  경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_{\kappa}$  분절, 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_{\kappa}$  유전자를 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 62**

제1항 내지 제2항, 제18항 내지 제20항, 제30항 내지 제31항, 및 제33항 내지 제38항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위가 비-인간  $Ig$  경쇄 좌위에서 비-인간  $Ig C_{\lambda}$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위는 내인성 설치류  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위이고/이거나 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성  $Ig V_{\lambda}$  및/또는  $J_{\lambda}$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V_{\lambda}$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 64**

제62항 또는 제63항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간  $Ig$  경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간  $Ig$  경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_{\lambda}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\lambda}$  분절을 치환하는, 표적화

벡터.

**청구항 65**

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 모든 비-인간  $V\lambda$  분절 및 모든 비-인간  $J\lambda$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 66**

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 67**

제1항 내지 제2항, 제18항 내지 제26항, 및 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하는, 표적화 벡터.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V\lambda$  분절, 모든 비-인간  $J\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간  $C\lambda$  유전자를 치환하는, 표적화 벡터.

**청구항 69**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자 또는 제40항 내지 제68항 중 어느 한 항의 표적화 벡터를 포함하는 비-인간 동물 계놈으로서, 선택적으로 여기서 비-인간 동물은 설치류이고, 선택적으로 여기서 설치류는 랫트 또는 마우스인, 비-인간 동물 계놈.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 재조합 핵산은 비-인간 동물 계놈의 내인성 Ig 좌위에 있는, 비-인간 동물 계놈.

**청구항 71**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자, 제40항 내지 제68항 중 어느 한 항의 표적화 벡터, 또는 제69항 또는 제70항의 비-인간 동물 계놈을 포함하는 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포.

**청구항 72**

제71항에 있어서, 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 또는 비-인간 동물 계놈은 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포의 생식계열에 있는, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포.

**청구항 73**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 포함하는 단리된 세포를 변형하는, 시험관 내 방법.

**청구항 74**

제73항에 있어서, 도입하는 단계는 제40항 내지 제68항 중 어느 한 항의 표적화 벡터와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 시험관 내 방법.

**청구항 75**

제73항 또는 제74항에 있어서, 세포는 숙주 세포인, 시험관 내 방법.

**청구항 76**

제73항 또는 제74항에 있어서, 세포는 배아 줄기(ES) 세포인, 시험관 내 방법.

**청구항 77**

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 설치류 세포이고, 선택적으로 설치류 세포는 랫트 세포 또는 마우스 세포인, 시험관 내 방법.

**청구항 78**

제76항의 배아 줄기 세포로부터 생성된 비-인간 동물 배아.

**청구항 79**

제76항의 배아 줄기 세포로부터 생성된 비-인간 동물.

**청구항 80**

제76항의 ES 세포 또는 ES 세포를 포함하는 배아를 적절한 숙주 내에 이식하는 단계 및 ES 세포 또는 배아가 생존 가능한 자손으로 발달하는 동안 적절한 조건 하에서 숙주를 유지하는 단계를 포함하는, 비-인간 동물의 제조 방법.

**청구항 81**

제71항 내지 제72항 및 제79항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 대조군 비-인간 동물과 비교하여:

- (a) 필적할 만한 수의 비장 내 성숙한 B 세포,
- (b) 필적할 만한 수의 비장 내 카파 양성 B 세포,
- (c) 필적할 만한 수의 비장 내 람다 양성 B 세포,
- (d) 필적할 만한 수준의 혈청 IgG 및/또는
- (e) 필적할 만한 수준의 혈청 IgM을 포함하는, 비-인간 동물.

**청구항 82**

제71항 내지 제72항, 제79항 및 제81항 중 어느 한 항의 비-인간 동물, 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물이 대조군 비-인간 동물에 필적할 만한 면역-반응을 수용할 수 있는, 비-인간 동물.

**청구항 83**

제71항 내지 제72항 및 제79항 및 제81항 내지 제82항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 각각 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 포함하는 복수의 항원-결합 단백질을 포함하고, 선택적으로:

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 비-인간 동물.

**청구항 84**

제71항 내지 제72항 및 제79항 및 제81항 내지 제83항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 또는 제80항의 방법에 따

라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체를 추가로 포함하는, 비-인간 동물.

**청구항 85**

제71항 내지 제72항 및 제79항 및 제81항 내지 제84항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 각각 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 포함하고 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체에 특이적으로 결합하는 복수의 항원-결합 단백질을 포함하고, 선택적으로:

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되는, 비-인간 동물.

**청구항 86**

제84항 또는 제85항에 있어서, 동족 수용체는 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR)인, 비-인간 동물.

**청구항 87**

제84항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질 각각은  $1 \times 10^9$  미만의 KD 및/또는 30분 초과  $t_{1/2}$ 를 포함하는, 비-인간 동물.

**청구항 88**

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질의 적어도 15%는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 동족 수용체의 결합을 차단하는, 비-인간 동물.

**청구항 89**

제84항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질 중 50% 초과는 세포 표면 상에서 발현된 동족 수용체에 결합하는, 비-인간 동물.

**청구항 90**

제71항 내지 제72항, 제79항, 및 제81항 내지 제89항 중 어느 한 항의 비-인간 동물, 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 설치류이고, 선택적으로 여기서 설치류는 랫트 또는 마우스인, 비-인간 동물.

**청구항 91**

항원-결합 단백질을 생산하거나 이를 암호화하는 핵산을 수득하는 방법으로서, 상기 방법은

제71항 내지 제72항, 제79항, 및 제81항 내지 제90항 중 어느 한 항의 비-인간 동물, 또는 제80항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물을 항원으로 면역화하는 단계,

비-인간 동물이 항원에 결합하는 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 항원-결합 단백질을 생산할 수 있게 하고, 선택적으로:

여기서 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,

여기서 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,

여기서 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되는, 방법.

**청구항 92**

제91항에 있어서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포로부터 항원 결합 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 93**

제92항에 있어서, 비-인간 동물 세포는 B 세포 또는 하이브리도마인, 방법.

**청구항 94**

제91항의 방법에 따라 회수된, 비-인간 동물 세포.

**청구항 95**

제94항에 있어서, 비-인간 동물 세포는 B 세포인, 비-인간 동물.

**청구항 96**

제94항 또는 제95항에 있어서, B 세포는 마우스 B 세포인, 비-인간 동물 세포.

**청구항 97**

골수종 세포와 융합된 제94항 내지 제95항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 세포를 포함하는, 하이브리도마 세포.

**청구항 98**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 핵산 분자, 제40항 내지 제68항 중 어느 한 항의 표적화 벡터, 제69항 내지 제70항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 계통에 의해 암호화된, 제71항 내지 제72항 및 제81항 내지 제90항 중 어느 한 항의 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, 제73항 내지 제76항 및 제80항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, 또는 제91항 내지 제93항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드로서, 선택적으로:

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,

여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드.

**청구항 99**

제98항에 있어서, 이의 N-말단에서 서열번호 3으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 2020년 12월 23일에 출원된 미국 가출원 제63/129,893호, 및 2021년 7월 8일에 출원된 미국 가출원 제63/219,402호의 35 USC § 119(e)에 따른 이익을 주장하며, 이들 출원 각각은 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 10507W001\_ST25.txt 파일에 기록된 서열 목록은 47킬로바이트이고, 2021년 12월 17일에 생성되었으며, 본원에 참조로서 통합된다.

**배경 기술**

[0005] 단일클론 항체 산물은 생물의약품 산업에 혁명을 일으켰으며 여러 질환 치료에서 상당한 발전을 이루었다. 이리

한 발전과 치료 용도로 단일클론 항체를 사용하여 얻은 지식에도 불구하고, 단일클론 항체가 결합 및/또는 접근하기 어려운 표적과 관련된 질병이 지속되고 있으며, 이는 효과적인 치료제 개발을 위한 다양한 접근법의 필요성을 강조한다.

**발명의 내용**

- [0006] 본원에 개시된 것은, 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있는, 새로운 항체-기반 치료제, 일부 실시예에서, 항체 (예를 들어, 단일클론 항체 및/또는 그 단편)를 동정하고 개발하기 위한 개선된 *생체 내* 시스템으로서 비-인간 동물을 조작하는 것이 바람직하다는 인식이다. 본원에 개시된 핵산, 비-인간 동물, 방법 및 폴리펩티드는 앵커-변형된(anchor-modified) 면역글로불린에 관한 것이다. 본원에 기술된 바와 같은 앵커는 일반적으로 동족 수용체에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 포함한다. 면역글로불린에 부착된 앵커는 앵커의 동족 수용체에 대한 면역글로불린의 친화도를 증가시키는 데 도움을 주어, 면역글로불린의 결합 특성을 개선시킨다. 앵커-변형된 면역글로불린을 암호화하고/하거나 비-인간 동물이 앵커-변형된 면역글로불린을 새롭게 만들 수 있도록 비-인간 동물을 변형시키는데 사용될 수 있는 핵산 분자가 본원에 기술된다.
- [0007] 본원에 기술된 앵커-변형된 면역글로불린은 적어도 부분적으로 가변 영역(V) 분절, 예를 들어, 면역글로불린(Ig) 중쇄 가변 영역(V<sub>H</sub>) 분절 또는 Ig 경쇄 가변 영역(V<sub>L</sub>) 분절에 의해 암호화될 수 있고, Ig 리더 서열 및 생식계열 V 분절의 프레임워크(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 서열의 작동가능한 연결 사이에서 및 작동가능한 연결에서 앵커를 암호화하도록 변형될 수 있다.
- [0008] 따라서, 재배열되지 않거나 재배열된 변형된 Ig V 분절을 포함하는, 표적화 벡터 및 비-인간 동물 계놈을 포함하는 핵산 분자가 또한 기술된다. 또한, 본원에 기술된 핵산 분자를 포함하는 비-인간 동물 계놈, 비-인간 동물 세포, 및 비-인간 동물이 기술된다.
- [0009] 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 면역글로불린(Ig) 가변(V) 분절을 포함할 수 있고, 여기서 변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드는 (i) Ig 신호 펩티드, (ii) 앵커, 및 (iii) 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 작동가능한 연결로 포함하고, 여기서 앵커는 동족 수용체에 결합하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 포함하고, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 임의의 다른 V 분절이 결합되어 있다. 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 또한 하나 이상의 재배열된(되지 않은) Ig 다양성(D) 분절, 하나 이상의 재배열된(되지 않은) Ig 결합(J) 분절 및/또는 하나 이상의 Ig 불변 영역(C) 유전자를 포함할 수 있다.
- [0010] 일부 실시예에서, Ig 신호 펩티드는 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 Ig 신호 펩티드이다. 일부 실시예에서, Ig 신호 펩티드는 서열 MDWTWRFLFVVAATGVQS(서열번호 7)을 포함한다. 일부 실시예에서, 앵커는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3에 연결하는 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 서열 서열 GGGGS(서열번호 5)을 포함한다.
- [0011] 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 중쇄 가변(V<sub>H</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 예를 들어, 인간(h) 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체, 예를 들어, 생식계열 인간 (h) V<sub>H</sub>1-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-8 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1 18 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-24 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-45 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-46 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-58 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-26 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-70 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-7 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-9 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-11 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3 13 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-15 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-16 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-20 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-21 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-23 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-33 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-35 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-38 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-43 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-48 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-49 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-53 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-64 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-66 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-72 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-73 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-74 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-28 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4 30-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-31

분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-34 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-39 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-59 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-61 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>5-51 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>6-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-4-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-81 분절, 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 변이체는 대립유전자 변이체이다.

[0012] 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 중쇄 가변 영역 좌위를 포함할 수 있고, 예를 들어, 하기를 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 포함할 수 있다: (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, (II) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 다양성(D<sub>H</sub>) 분절, 및 (III) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 결합(J<sub>H</sub>) 분절. 일부 실시예에서, (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절은 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig D<sub>H</sub> 분절을 포함하고/하거나, (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절은 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig J<sub>H</sub> 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절 및 (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 유전자 분절은, 재조합 핵산 분자가 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 으로 포함하도록 재조합되어 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성한다.

[0013] 일부 실시예에서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열은 재조합되어 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성하고, 여기서 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인은 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 (i) Ig 신호 펩티드, (ii) 앵커, 및 (iii) FR1, 상보성 결정 영역(CDR) 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 작동가능한 연결로 포함한다.

[0014] 일부 실시예에서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절은 재배열되지 않은 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절이다.

[0015] 일부 실시예에서, 본원에 개시된 재조합 핵산은 Ig 중쇄 불변 영역(C<sub>H</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은 (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, (II) 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절, 및 (III) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절의 하류에서 작동가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은 IgM 이소형을 암호화하는 Ig<sub>μ</sub> 유전자, IgD 이소형을 암호화하는 Ig<sub>δ</sub> 유전자, IgG 이소형을 암호화하는 Ig<sub>γ</sub> 유전자, IgA 이소형을 암호화하는 Ig<sub>α</sub> 유전자, 및/또는 IgE 이소형을 암호화하는 Ig<sub>ε</sub> 유전자를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 앵커-변형된 Ig 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 앵커-변형된 Ig 중쇄는 (i) Ig 신호 펩티드, (ii) 앵커, (iii) 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 중쇄 가변 도메인, 및 (iv) Ig C<sub>H</sub>를 작동가능한 연결로 포함한다. 일부 실시예에서, Ig C<sub>H</sub>는 비-인간 Ig C<sub>H</sub>, 예를 들어, 설치류 Ig C<sub>H</sub>, 예를 들어, 랫트 Ig C<sub>H</sub> 또는 마우스 Ig C<sub>H</sub>이다.

[0016] 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변(V<sub>L</sub>) 분절 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 경쇄 가변 영역 좌위를 포함할 수 있고, 예를 들어, 작동가능한 연결로 및 5' 에서 3' 로 하기를 포함할 수 있다: (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합(J<sub>L</sub>) 분절.

[0017] 일부 실시예에서, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및 하나 또는 복수의 Ig J<sub>L</sub> 분절은 재조합되어 앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열을 형성하며, 여기서 앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인은 (i) Ig 신호 펩티드, (ii) 앵커, 및 (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 작동가능한 연결로 포함한다.

[0018] 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 경쇄 가변 영역 좌위 및 Ig 경쇄 불변 영역(C<sub>L</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 Ig C<sub>L</sub>를 암호화하는 핵산 서열은 하기의 하류에 있고 작동가능하게 연결된다: (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합(J<sub>L</sub>) 분절. 일부 실시예에서, 앵커-변형된 Ig 경쇄는 (i) Ig 신호 펩티드, (ii) 앵커, (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 경쇄 가변 도메인, 및 (iv) Ig C<sub>L</sub>를 작동가능한 연결로 포함한다. 일부

실시예에서, Ig C<sub>L</sub>은 비-인간 Ig C<sub>L</sub>, 예를 들어, 설치류 Ig C<sub>L</sub>, 예를 들어, 랫트 Ig C<sub>L</sub> 또는 마우스 Ig C<sub>L</sub>이다.

- [0019] 일부 경쇄 가변 영역 좌위 실시예에서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 카파(Ig V<sub>K</sub>) 분절 또는 이의 변이체이다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파(J<sub>K</sub>) 분절. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파 (J<sub>K</sub>) 및 (III) Ig 경쇄 불변 카파 영역(C<sub>K</sub>)을 암호화하는 핵산 서열.
- [0020] 일부 경쇄 가변 영역 좌위 실시예에서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 람다(Ig V<sub>λ</sub>) 분절 또는 이의 변이체이다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 람다(J<sub>λ</sub>) 분절. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 람다 (J<sub>λ</sub>) 분절, 및 Ig 경쇄 불변 람다 영역(C<sub>λ</sub>)을 암호화하는 핵산 서열.
- [0021] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 서열번호 8 또는 이의 퇴화 변이체, 또는 서열번호 10 또는 이의 퇴화 변이체로서 제시된 서열을 포함한다.
- [0022] 표적화 벡터, 비-인간 동물 세포(예를 들어, 숙주 세포, 배아 줄기 세포 등), 및 핵산 분자를 포함하는 비-인간 동물도 또한 기술된다.
- [0023] 본원에 개시된 재조합 핵산 분자 실시예를 포함하는 표적화 벡터가 또한 기술된다. 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>H</sub>의 상류에 작동가능한 연결로 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암(arm)을 추가로 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절 또는 모든 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 제외한 모든 것을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 설치류 또는 설치류 세포(예를 들어, 설치류 배아 줄기 세포)에서의 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및 /또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 유전자 분절, 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간 C<sub>H</sub> 유전자를 치환한다. 일부 실시예에서, 5' 상동성 암은 서열번호 11로서 제시된 서열을 포함하고/하거나 3' 상동성 암은 서열번호 12로서 제시된 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig CL의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3

' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_L$  및/또는  $J_L$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간  $V_L$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_L$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_H$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 표적화 벡터는 본원에 기술된 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_L$  및/또는  $J_L$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 여기서 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간  $V_L$  분절, 모든 비-인간  $J_L$  유전자 분절, 및 비-인간 CL 유전자를 치환한다.

[0025]

일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위가 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig  $C_\kappa$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_\kappa$  및/또는  $J_\kappa$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_\kappa$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_\kappa$  분절 및 모든 비-인간  $J_\kappa$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 모든 비-인간  $V_\kappa$  분절 및 모든 비-인간  $J_\kappa$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다. 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위가 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_\kappa$  분절, 모든 비-인간  $J_\kappa$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_\kappa$  유전자를 치환한다.

[0026]

일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $C_\lambda$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_\lambda$  및/또는  $J_\lambda$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V_\lambda$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_\lambda$  분절 및 모든 비-인간  $J_\lambda$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 모든 비-인간  $V_\lambda$  분절 및 모든 비-인간  $J_\lambda$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간

Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $\lambda$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V\lambda$  분절, 모든 비-인간  $J\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간  $C\lambda$  유전자를 치환한다.

[0027] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자 및/또는 표적화 벡터를 포함하는 비-인간 동물 게놈이 본원에 기술된다. 일부 비-인간 동물 게놈 실시예에서, 비-인간 동물 게놈은 비-인간 동물 게놈의 내인성 Ig 좌위에서 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자를 포함하고, 예를 들어, 비-인간 동물 게놈은 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터를 포함하며, 여기서 표적화 벡터는 내인성 Ig 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함한다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 게놈은 설치류 게놈이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 게놈은 랫트 게놈이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 게놈은 마우스 게놈이다.

[0028] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 및/또는 비-인간 동물 게놈을 포함하는 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포가 본원에 기술된다. 일부 비-인간 동물 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은, 생식계열에, 예를 들어, 생식 세포에, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 및/또는 비-인간 동물 게놈을 포함하며, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 및/또는 비-인간 동물 게놈을 이의 자손에게 전달할 수 있다.

[0029] 또한, 비-인간 세포, 비-인간 배아, 및/또는 비-인간 동물을 제조하기 위해 *시험관 내*에서 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 예를 들어 표적화 벡터를 사용하는 방법이 기술된다. 일부 실시예에서, 단리된 세포를 변형시키는 *시험관 내* 방법은, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터와 세포를 접촉시킴으로써, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 세포는 숙주 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 배아 줄기(ES) 세포이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 세포 또는 본원에 기술된 방법에 따라 만들어진 세포는 설치류 세포이고, 예를 들어, 설치류 세포는 랫트 세포 또는 마우스 세포이다.

[0030] 또한, 앵커-변형된 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자, 비-인간 세포, 및/또는 비-인간 동물을 사용하는 방법이 기술된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같은 배아 줄기 세포를 포함할 수 있고/하거나 배아 줄기 세포로부터 개발(예를 들어, 생성)될 수 있는 비-인간 동물 배아 및 비-인간 동물이 기술된다. 이러한 배아 또는 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 ES 세포를 배아에 이식하는 단계, 및/또는 ES 세포를 포함하는 배아를 적절한 숙주에 이식하는 단계, 및 ES 세포 또는 배아를 생존가능한 자손으로 개발하는 동안 적절한 조건 하에서 숙주를 유지하는 단계를 포함하는 방법에 의해 개발될 수 있다.

[0031] 본원에 기술된 바와 같은 일부 비-인간 동물 실시예에서(예를 들어, 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 및/또는 게놈을 포함하고/하거나 본원에 기술된 방법에 따라 생성됨), 비-인간 동물은 대조군 비-인간 동물과 비교하여 하기를 포함한다: (a) 비장에서 필적할 만한 수의 성숙 B 세포, (b) 비장에서 필적할 만한 수의 카파 양성 B 세포, (c) 비장에서 필적할 만한 수의 람다 양성 B 세포, (d) 필적할 만한 수준의 혈청 IgG 및/또는 (e) 필적할 만한 수준의 혈청 IgM. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 대조군 비-인간 동물과 필적할 만한 면역-반응을 수용할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 각각 앵커를 포함하고/하거나 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터 및/또는 비-인간 동물로부터 유래된 복수의 항원-결합 단백질을 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체를 추가로 포함하며, 이의 수용체 결합 부분은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드가 앵커로서 기능한다. 일부 비-인간 동물 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체에 각각 특이적으로 결합하는 복수의 항원-결합 단백질을 포함하며, 이의 수용체 결합 부분은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드가 앵커로서 기능한다.

[0032] 본원에 기술된 바와 같이, 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드(관심있는 이의 비-면역글로불린 폴리펩티드가 앵커로서 작용하는 수용체 결합 부분은)는 심방 나트륨이뇨 펩티드(ANP, atrial natriuretic peptide)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, ANP의 c-말단 꼬리(예를 들어, NSFRY(서열번호 3))는 동족 수용체에 대한 앵커로서 기능할 수 있다. 일부 실시예에서, 동족 수용체는 나트륨이뇨 펩티드 수용체(NPR), 예를 들어, NPR3, 또는 이의 일부를 포함한다.

- [0033] 일부 비-인간 동물 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은, 이의 수용체 결합 부분(예를 들어, NSFRY(서열번호 3))이 본원에 기술된 바와 같이 앵커로서 작용하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드(예를 들어, ANP)의 동족 수용체로 면역화되며(선택적으로 여기서 동족 수용체는 나트륨이노 펩티드 수용체 (NPR), 예를 들어, NPR3을 포함함), 본원에 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 동족 수용체에 결합하는 복수의 항원 결합 단백질을 추가로 포함하며, 이들 각각은  $1 \times 10^9$  미만의 KD 및/또는 30분 초과  $t_{1/2}$ 를 포함한다. 일부 실시예에서, 복수의 항원-결합 단백질의 적어도 15%는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 동족 수용체의 결합을 차단할 수 있고/있거나 차단한다. 일부 실시예에서, 복수의 항원 결합 단백질의 50% 초과는 세포 표면 상에서 발현된 동족 수용체에 결합한다.
- [0034] 본원에서 설명된 일부 비-인간 동물 실시예에서, 비-인간 동물은 설치류이다. 본원에서 설명된 일부 비-인간 동물 실시예에서, 비-인간 동물은 랫트이다. 일부 비-인간 실시예에서, 비-인간 동물은 마우스이다.
- [0035] 또한, 본원에 기술된 핵산 분자에 의해 암호화되거나 본원에 기술된 비-인간 동물에 의해 만들어진 앵커-변형된 항원-결합 단백질이 기술된다.
- [0036] 항원-결합 단백질을 생산하거나 이를 암호화하는 핵산을 수득하는 방법이 본원에 기술되며, 이러한 방법은 (i) 본원에 기술된 바와 같은 또는 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 비-인간 동물(예를 들어, 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 면역글로불린(Ig) 가변(V) 분절을 포함하는 비-인간 동물)을 항원(예를 들어, 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체, 여기서 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분은 앵커로서 작용함)으로 면역화하는 단계, 및 (ii) 비-인간 동물이 항원에 결합하는 항체 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 항원에 대한 면역-반응을 일으키도록 하는 단계를 포함한다. 일부 실시예는 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포, 예를 들어, B 세포로부터 항원 결합 단백질, 또는 이를 암호화하는 핵산을 회수하는 단계, 및 선택적으로 B 세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예는 회수된 핵산을 발현 작제물 내로 클로닝하는 단계, 및 선택적으로 숙주 세포에서 발현 작제물을 발현하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 클로닝 실시예에서, 이러한 방법은 회수된 핵산을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 회수된 핵산은 인간 Ig 불변 영역 암호화 서열과 프레임 내 Ig 가변 도메인을 암호화한다. 또한, B 세포, B 세포와 융합된 하이브리도마, 또는 B 세포로부터 회수된 핵산을 발현하는 숙주 세포가 본원에 기술된다. 일부 실시예에서, 각각의 항원 결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인한다. 일부 실시예에서, 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) - 비행 시간 질량 분광법(Time of Flight Mass Spectrometry)에 의해 결정된다. 일부 실시예에서, 각각의 항원 결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원 결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정된다.
- [0037] 또한, (a) 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 본원에 기술된 표적화 벡터, 또는 본원에 기술된 비-인간 동물 게놈에 의해 암호화된, (b) 본원에 기술된 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, (c) 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, 및/또는 (d) 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드가 기술된다.
- [0038] 본원에 개시된 비-인간 동물, 세포, 핵산 및 조성물의 다른 특징, 목적 및 이점은 하기 특정 실시예들의 상세한 설명에서 명백하다. 그러나, 본 발명의 특정한 실시예를 나타내지만, 상세한 설명은 단지 예시로서 제공될 뿐 제한하고자 함이 아닌 것으로 이해해야 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0039] 다음의 도면들로 구성된 본원에 포함된 도면은 단지 예시적인 목적이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

**도 1**은 Cas9/GA 변형을 위한 공여자 DNA로서 유용한 ANP-변형된  $V_H$  유전자 분절의 예시적인 비제한적인 실시예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 또한, 제한 인식 부위(XhoI, MreI, EcoRI, AvrII, MreI) 및 스펙티노마이신 내성 유전자(SPEC, Spectinomycin resistance gene)가 도시되어 있다. 이러한 비제한적인 실시예에서, 인간  $V_H1-69$  유전자 분절은 심방 나트륨이노 단백질(ANP)의 C-말단 꼬리(NSFRY; 서열번호 3)를 암호화하는 서열로 변형되어 ANP-변형  $V_H1-69$  유전자 분절을 포함하는 공여자 DNA를 형성한다. 일반적으로, 채워지지 않은 모양은 인간 서열을 나타내고, 채워진 모양은 뮤린 서열을 나타내고, 점선 모양은 비-인간 및 비-뮤린 서열을 나타

낸다.

**도 2**는 BAC 클론 VI504에서 V<sub>H</sub>1-69 유전자를 변형시키는 데 사용된 DNA 공여자(서열번호 10으로 제시됨)의 예시적인 비제한적인 실시예를 도시한다. 하기와 같은 특징이 표시된다:

-하기를 포함하는 센스 DNA 서열:

(a) 생식계열 인간 V<sub>H</sub>1-69 분절에 의해 암호화된 이분 신호 펩티드의 마지막 7개의 코돈(“신호 펩티드”로 표시된 분할 화살표 참조); 신호 폴리펩티드의 전체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6으로 제시되고; 신호 폴리펩티드의 전체의 아미노산 서열은 서열번호 7로 제시된다,

(b) 엑손 1, 인트론 1 및 엑손 2를 포함하는 생식계열 Ig V<sub>H</sub>1-69 분절(DNA 서열 바로 위에 “VH”로 표시된 분할된 화살표 참조)

(c) 생식계열 Ig V<sub>H</sub>1-69 분절의 인트론 1(“인트론”),

(d) 심방 나트륨이뇨 펩티드(ANP, atrial natriuretic peptide)(서열번호 3)의 C-말단 꼬리 및 G4S 링커(서열번호 5)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열,

(e) FR1, CDR1(패턴화된 박스), FR2, CDR2(패턴화된 박스), FR3 및 CDR3 (패턴화된 박스), 및 이의 아미노산 서열을 암호화하는 생식계열 V<sub>H</sub>1-69 분절의 부분(IgHV1-69로 표시된 분할된 화살표 참조), 및

(e) 23-량체 재조합 신호 서열(RS-23 분할),

-리더 서열을 포함하는 ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절의 개념적 번역(ANP-G4S-VH1-69로 표시됨),

-Cas9를 사용해 시험관 내에서 VI504를 절단하는 데 사용된 crRNA 결합 부위(5' VH1-69 Cas9 및 PAM으로 표시됨),

- 공여자 및 VI504의 겹손 조립(Gibson Assembly)에 사용된 5' 및 3' 중첩부(각각 “5' VH1-69 중첩부” 및 3' VH1-69 중첩부로 표시된 화살표를 갖는 검은색 선), 및

- 서열 아래 사선 줄무늬 박스로 표시된 제한 효소 부위: EcoRI 및 AvrII 부위는 스펙티노마이신-내성 카세트를 공여자에 연결시키는데 사용하였고, XhoI 부위는 pUC 벡터 백본으로부터 공여자를 제거하는 데 사용하였고, MreI 부위는 결합된 올리고-매개 겹손 조립에 의한 매끄러운 복구 전에 변형된 BAC로부터 Spec 카세트를 제거하는 데 사용하였다.

**도 3**은 예 1에 따라 ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절을 BAC 클론 VI504에 삽입하여 표적화 벡터 VI748을 생성하는 비제한적인 예시적인 실시예의 예시를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 일반적으로, 채워지지 않은 모양은 인간 서열을 나타내고(예를 들어, 채워지지 않은 삼각형은 인간 V<sub>H</sub>1-69 분절, 인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 인간 J<sub>H</sub> 분절을 나타냄), 채워진 모양은 무린 서열을 나타내고(예를 들어, 채워진 삼각형은 내인성 무린 V<sub>H</sub> 분절(비표지됨)을 나타내고, 채워진 화살표는 무린 Adam6a “a” 및 Adam6b “b” 유전자를 나타내고, 채워진 타원형은 Ig 인헨서를 나타내고, 채워진 화살표는 무린 Ig<sub>μ</sub> 유전자 “IgM”을 나타냄), 점선 모양은 비-인간 및 비-무린 서열(예를 들어, 클로람페니콜 내성 유전자 “CM”, 부위-특이적 재조합 인식 부위 “Frt 부위, 하이그로마이신 내성 유전자 “HYG”, 및 스펙티노마이신 내성 유전자 “SPEC”)을 나타낸다.

**도 4**는 전기천공을 통해 마우스 ES 세포의 게놈에서 면역글로불린 중쇄 가변 영역 좌위에 표적화 벡터를 삽입하는 비제한적인 예시적인 실시예를 도시하며, 축척에 비례하지는 않는다. 전기천공 후, 이러한 비제한적인 예시적인 실시예는 Adam6a(“a”) 유전자의 채워진 삼각형 상류로 도시된 내인성 V<sub>H</sub> 분절을 보유한다. 일반적으로, 채워지지 않은 모양은 인간 서열을 나타내고(예를 들어, 채워지지 않은 삼각형은 인간 V<sub>H</sub>1-69 분절, 인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 인간 J<sub>H</sub> 분절을 나타냄), 채워진 모양은 무린 서열을 나타내고(예를 들어, 채워진 삼각형은 내인성 무린 V<sub>H</sub> 분절(비표지됨)을 나타내고, 채워진 화살표는 무린 Adam6a “a” 및 Adam6b “b” 유전자를 나타내고, 채워진 타원형은 Ig 인헨서를 나타내고, 채워진 화살표는 무린 Ig<sub>μ</sub> 유전자 “IgM”을 나타냄), 점선 모양은 비-인간 및 비-무린 서열(예를 들어, 클로람페니콜 내성 유전자 “CM”, 부위-특이적 재조합 인식 부위 “Frt 부위, 하이그로마이신 내성 유전자 “HYG”, 및 스펙티노마이신 내성 유전자 “SPEC”)을 나타낸다

**도 5a 내지 5f**는 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터의 집단 비장세포를 대조군 VELOCIMMUNE® 마우스와 비교하는 결과를 보여준다. **도 5a 내지 5b**는 (a) 비장 당 세포의 총 수(y-축), CD19<sup>+</sup> 세포/비장 수(y-축) 또는 (b) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 비장 당 림프구(CD19<sup>+</sup> 세포)의 백분율(y-축)을 제공한다. **도 5c 내지 5d**는 (c) 성숙 B 세포(CD19<sup>+</sup>IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>int</sup>) 및 전이 B 세포(CD19<sup>+</sup>IgD<sup>int</sup>IgM<sup>hi</sup>)의 총 수(y-축) 또는 (d) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 비장 당 성숙 B 세포(CD19<sup>+</sup>IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>int</sup>) 및 전이 B 세포(CD19<sup>+</sup>IgD<sup>int</sup>IgM<sup>hi</sup>)의 백분율(y-축)을 제공한다. **도 5e 내지 5f**는 (e) 비장 당 CD19<sup>+</sup>카파<sup>+</sup> 세포 및 CD19<sup>+</sup>람다<sup>+</sup> 세포의 총 수(y-축) 또는 (f) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 비장 당 CD19<sup>+</sup>κ<sup>+</sup> 세포 및 CD19<sup>+</sup>λ<sup>+</sup> 세포의 백분율(y-축)을 제공한다.

**도 6a 내지 6f**는 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 대퇴골로부터 단리된 집단 골수 세포를 대조군 VELOCIMMUNE® 마우스와 비교하는 결과를 보여준다. **도 6a 내지 6b**는 (a) 대퇴골 당 총 세포 수(y-축) 및 대퇴골 당 CD19<sup>+</sup> B 세포 수(y-축) 또는 (b) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 대퇴골 당 림프구(CD19<sup>+</sup> 세포)의 백분율(y-축)을 제공한다. **도 6c 내지 6d**는 (c) 대퇴골 당 CD43<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup> pro-B 세포의 총 수(y-축) 및 대퇴골 당 CD43<sup>-</sup>ckit<sup>-</sup> pre-B 세포의 총 수(y-축) 또는 (d) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 대퇴골 당 CD43<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup> pro-B 세포 또는 CD43<sup>-</sup>ckit<sup>-</sup> pre-B 세포의 백분율을 제공한다. **도 6e 내지 6f**는 (e) 대퇴골 당 미성숙 B 세포 및 성숙 B 세포의 총 수(y-축) 또는 (f) ANP-변형된 V<sub>H</sub>1-69 분절로 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)의 대퇴골 당 미성숙 B 세포 및 성숙 B 세포의 백분율(y-축)을 제공한다.

**도 7**은 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 동물과 대조군 VELOCIMMUNE® 대조군 동물로부터의 혈청 IgG 수준을 나타낸 것이다.

**도 8a 내지 8b**는, 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 동물(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)으로부터 단리된 (a) 혈청 마우스(m) IgG 또는 (b) 혈청 mIgM의 농도(μg/mL; y-축)를 도시한다.

**도 9**는 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)에서 단백질 항원에 대한 면역-반응(항체 역가; y-축)을 비교하는 그래프를 도시한다. 시험된 혈청 중, 3개의 혈청 샘플은 3차 추가 접종 후의 출혈에서 유래한 반면, 1개의 혈청 샘플은 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에 대한 5차 추가 접종 후의 것이었다. VELOCIMMUNE® 대조군 마우스의 경우, 2개의 혈청 샘플은 6차 추가 접종 후의 출혈에서 유래한 반면, 1개는 9차 추가 접종 후의 것이었다.

**도 10**은 본 발명의 비제한적 실시예와 관련하여, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)에서 단백질 항원에 대한 면역-반응(항체 역가; y-축)을 비교하는 그래프를 도시한다. 시험된 혈청 중, 3개의 혈청 샘플은 3차 추가 접종 후의 출혈에서 유래한 반면, 1개의 혈청 샘플은 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에 대한 5차 추가 접종 후의 것이었다. VELOCIMMUNE® 대조군 마우스의 경우, 2개의 혈청 샘플은 6차 추가 접종 후의 출혈에서 유래한 반면, 1개는 9차 추가 접종 후의 것이었다.

**도 11**은, 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, 박스 및 위스커 플롯을 사용하여 25°C에서 단백질 항원 상에서 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)로부터 단리된 NPR3 단일클론 항체(mAb)에 대한 hNPR3-MMH 결합의 K<sub>D</sub> 값(y-축)을 비교하는 그래프를 도시한다.

**도 12**는, 본 발명의 비제한적인 실시예와 관련하여, 박스 및 위스커 플롯을 사용하여 25°C에서 단백질 항원 상

에서 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스(ANP) 또는 인간화된 Ig 좌위를 포함하는 대조군 VELOCIMMUNE® 동물(대조군)로부터 단리된 NPR3 단일클론 항체(mAb)에 결합하는 hNPR3-MMH의 t<sub>1/2</sub> 값(y-축)을 비교하는 그래프를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**[0040] 정의**

[0041] 본 발명의 범주는 본원에 첨부된 청구범위에 의해 정의되고, 본원에 설명된 특정 실시예에 의해 한정되지 않으며; 본 개시내용 읽는 당 기술분야의 숙련자는 기술된 이러한 실시예와 동등할 수 있거나, 달리 청구범위의 범주에 속할 수 있는 다양한 변형예를 알 수 있을 것이다. 일반적으로, 용어는 달리 명시되지 않는 한, 당해 기술분야에서 이해되는 의미에 따른다. 특정 용어에 대한 명시적 정의가 여기에 그리고 아래에 제공된다; 본 명세서 전반에 걸친 특정 경우의 이들 및 다른 용어들의 의미는 문맥으로부터 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 하기 용어들 및 기타 용어들에 대한 추가 정의는 본 명세서 전반에 걸쳐 제시된다. 본 명세서, 또는 이의 관련 부분에 인용된 참고문헌들은 그들 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0042] 청구범위 요소를 변형하기 위한 청구범위 내 “제1”, “제2”, “제3” 등과 같은 서수 용어의 사용은 그 자체가 하나의 청구범위 요소가 다른 것을 앞서는 어떠한 우선순위, 선행, 또는 순서 또는 방법의 작용이 수행되는 일시적인 순서를 나타내지 않으며, 단지 청구범위 요소들을 구분하기 위해 일정한 이름을 갖는 하나의 청구범위 요소를 (서수 용어의 사용이 없었다면) 동일한 이름을 가진 다른 요소로부터 구분하기 위한 표지로서 사용된다.

[0043] 본 명세서 및 청구범위 내에서 관사 “a” 및 “an”은 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 하나의 군의 하나 이상의 구성원 사이에서 “또는”을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은 반대로 지시되거나 그렇지 않으면 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나, 하나 초과 또는 전체의 군 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련되는 것을 만족하는 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 실시예를 포함한다. 본 발명은 또한 하나 초과, 또는 전체 군의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 실시예를 포함한다. 나아가, 본 발명은 그렇지 않은 것으로 지시되거나 반대 또는 불일치가 일어날 수 있다는 것이 당 기술분야의 숙련자에게 명백하지 않는 한 하나 이상의 열거된 청구범위로부터 하나 이상의 제한, 요소, 항목, 서술 용어 등이 동일한 기반의 청구범위에 의존하는 다른 청구범위에 도입된 모든 변형, 조합, 치환을 포함하는 것으로 이해된다. 요소가 (예를 들어, 마쿠쉬 군 또는 유사한 형식 내) 목록으로서 제시된 경우, 이러한 요소의 각각의 하위군도 또한 개시되고, 임의의 요소(들)가 이러한 군으로부터 제거될 수 있는 것으로 이해된다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 측면이 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 본 발명의 실시예 또는 측면은 이러한 요소, 특징으로 이루어지거나 필수적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 간결성을 위해, 이러한 실시예들은 본원에서 글자 그대로 모든 경우에서 구체적으로 기재되지 않는다. 또한 본 발명의 임의의 실시예 또는 측면은 특정한 배제가 본 명세서 내에 언급되었는지에 관계없이 청구범위로부터 명백하게 제외될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0044] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 “약(about)” 및 “대략(approximately)”은 동등하게 사용된다. 본 출원에서 사용된 임의의 수치는 약/대략을 사용하거나 사용하지 않더라도 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 임의의 정상적인 변동, 예를 들어, +/- 5%을 포함하는 것을 의미한다.

[0045] **투여:** 조성물을 대상체 또는 시스템 (예를 들어, 세포, 기관, 조직, 유기체 또는 관련 성분 또는 그의 성분 세트)에 투여하는 것을 의미한다. 당 기술분야의 숙련자라면 투여 경로가 예를 들어, 조성물이 투여되고 있는 대상 또는 시스템, 조성물의 성질, 투여 목적 등에 따라 달라질 수 있음을 이해해야 할 것이다.

[0046] 예를 들어, 일부 실시예에서, 동물 대상체(예를 들어, 사람 또는 설치류)에 대한 투여는 기관지(기관지 점적을 포함함), 협측, 장내, 진피간, 동맥내, 진피내, 위내, 골수내, 근육내, 비강내, 복강내, 척수강내, 정맥내, 뇌실내, 점막, 비강, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기관(기관내 점적을 포함함), 경피, 질 및/또는 유리체 투여일 수 있다. 일부 실시예에서, 투여는 간헐적 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 투여는 적어도 선택된 기간 동안 연속 투여(예를 들어, 관류)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체는 대상체(예를 들어, 인간 대상체 또는 설치류)에 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 완충액, 희석제, 부형제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 보관 또는 투여를 위한 용기, 예를 들어 바이알, 주사기(예를 들어, IV 주사기), 또는 백(예를 들어, IV 백)에 포함될 수 있다.

- [0047] **친화도:** 항원-결합 단백질과 이의 결합 파트너 사이, 예를 들어, 항체와 특이적 에피토프 사이의 상호작용 강도를 지칭한다. 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 일반적으로 이의 표적 에피토프에 대해 약  $10^{-9}$  M 이하(예를 들어, 약  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  M)의  $K_D$ 를 갖는다.  $K_D$ 는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어, BIACORE™; 효소 결합 면역분석(ELISA) 또는 다른 잘 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0048] **항체:** 면역글로불린 항원-결합 단백질을 지칭한다. 사량체 항체는 4개의 폴리펩티드 면역글로불린(Ig) 사슬, 예를 들어, 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 Ig 중쇄(H) 및 2개의 Ig 경쇄(L)를 포함한다. 각각의 중쇄는 Ig 중쇄 가변 도메인 및 Ig 중쇄 불변 영역 또는 도메인( $C_H$ )을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 을 포함한다. 각각의 Ig 경쇄는 Ig 경쇄 가변 도메인 및 Ig 경쇄 불변 영역( $C_L$ )을 포함한다.
- [0049] Ig 중쇄 가변 도메인 및 Ig 경쇄 가변 도메인은 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 보다 보존적인 영역이 사이 사이에 배치되는, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 추가로 다시 나뉘질 수 있다. 각각의 Ig 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 아미노-말단으로부터 카복시 말단 방향으로 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4(중쇄 CDR는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로 약칭될 수 있고; 경쇄 CDR는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로 약칭될 수 있음).
- [0050] **항원-결합 단백질**은 면역글로불린, 항체, 항체들, 결합 단백질 등, 예를 들어, 단일클론 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 단일-사슬 Fv(scFv), 단일 사슬 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화-연결된 Fv(sdFv), 인트라바디, 미니바디, 디아바디 및 항-이디오프(항-Id) 항체, 및 전술한 것들 중 임의의 에피토프-결합 단편을 지칭한다. 용어 “항체” 및 “항체들”은 또한 미국 특허 출원 출원 공개 제 20070004909호(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 개시된 것들과 같은 공유 디아바디, 및 미국 특허 출원 공개 제 20090060910호(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 개시된 것과 같은 Ig-DARTS를 지칭한다.
- [0051] **생물학적 활성:** 생물학적 시스템, 시험관 내 또는 생체 내(예를 들어, 유기체 내)에서 활성을 갖는 임의의 제제의 특성을 지칭한다. 예를 들어, 유기체 내에 존재할 때, 유기체 내에서 생물학적 효과를 갖는 제제는 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다.
- [0052] 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 특정한 실시예에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공여하는 단백질 또는 폴리펩티드의 부분은 통상적으로 “생물학적 활성” 부분으로서 지칭된다.
- [0053] **동족:** 일반적으로 상호작용하는 2개의 생체분자(예를 들어, 수용체 및 이의 리간드)를 지칭한다.
- [0054] **필적할 만한:** 서로 동일하지 않을 수 있지만, 이들 사이의 비교가 가능할 만큼 충분히 유사하여, 관찰된 차이점 또는 유사점에 기초하여 합리적으로 결론을 도출할 수 있는 둘 이상의 제제, 엔티티, 상황, 조건의 집합 등을 지칭한다. 당 기술분야의 숙련자는, 문맥 내에서 둘 이상의 이러한 제제, 엔티티, 상황, 조건의 집합 등에 대하여 임의의 주어진 상황에서 필적할 만한 것으로 간주되는데 어떠한 정도의 동일성이 필요한지를 이해할 것이다.
- [0055] **보존적:** 보존적 아미노산 치환, 즉 유사한 화학적 성질(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 지칭한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 관심있는 단백질의 기능성 성질, 예를 들어, 이의 동족 수용체에 결합하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: 지방족 측쇄, 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 지방족-하이드록실 측쇄, 예를 들어 세린 및 트레오닌; 아마이드 함유 측쇄, 예를 들어, 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 측쇄, 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 염기성 측쇄, 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 산성 측쇄, 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산; 및 황 함유 측쇄, 예를 들어, 시스테인 및 메티오닌. 보존적 아미노산 치환기는, 예를 들어, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/티로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르트이트, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다.
- [0056] 일부 실시예에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에서 사용된 바와 같은 알라닌을 갖는 단백질 내 임의의 원래의 잔기의 치환일 수 있다. 일부 실시예에서, 그 전문이 참조로서 본원에 통합된 Gonnet, G. H. 외, 1992, Science 256:1443-1445에 개시된 PAM250 log 우도 매트릭스에서 양성 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다. 일부 실시예에서, 치환은 적당한 보존적 치환인데, 이러한 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가진다.

- [0057] **대조군**: 결과가 비교되는 표준인, 당 기술분야에서 이해되는 “대조군”의 의미를 지칭한다. 통상적으로, 대조군은 변수들에 대한 결론을 내리기 위해 변수들을 분리하여 실험의 완전성을 높이기 위해 사용된다. 일부 실시예에서, 대조군은 비교자를 제공하기 위해 시험 반응 또는 검정과 동시에 수행되는 반응 또는 검정이다. “대조군”은 “대조군 동물”을 나타낼 수 있다. “대조군 동물”은 본원에 설명된 변형, 본원에 설명된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 동물). 하나의 실험에서, “시험”(즉, 시험 중인 변수)이 적용된다. 제2 실험에서, “대조군,” 시험 중인 변수가 적용되지 않는다. 대조군은 양성 대조군 또는 음성 대조군일 수 있다.
- [0058] 일부 실시예에서, 대조군은 과거의 대조군(즉, 이전에 수행된 시험 또는 분석의 대조군, 또는 이전에 알려진 양 또는 결과)이다. 일부 실시예에서, 대조군은 인쇄되거나 달리 저장된 기록이거나 이를 포함한다.
- [0059] 기준 핵산 분자의 **퇴화 변이체**는, 기준 핵산에 의해 암호화된 것과 동일한 아미노산 서열을 가지며 기준 핵산 분자와 실질적으로 동일한 핵산 서열을 갖지만 유전자 코드의 퇴화로 인한 차이를 갖는 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0060] **파괴**: (예를 들어, 유전자 또는 유전자 좌위와 같은 내인성 상동성 서열을 갖는) DNA 분자를 이용한 상동성 재조합 이벤트의 결과를 지칭한다.
- [0061] 일부 실시예에서, 파괴는 DNA 서열의 삽입, 결실, 치환, 대체, 파오 들연변이 또는 DNA 서열의 틀-이동 또는 이들의 임의의 조합을 달성하거나 나타낼 수 있다. 삽입은 전체 유전자, 유전자의 단편, 예를 들어, 내인성 서열(예를 들어, 이중 서열) 이외의 기원일 수 있는, 엑손, 또는 관심있는 특정 유전자로부터 유도되거나 단리된 코딩 서열의 삽입을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물(예를 들어, 유전자에 의해 암호화된 단백질)의 발현 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자의 서열 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 변경시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 염색체의 서열 또는 계놈 내의 염색체 위치를 변경시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 절단하거나 단편화할 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물을 확장할 수 있다. 일부 이러한 실시예에서, 파괴는 융합 단백질의 조립을 달성할 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 영향을 미칠 수 있지만 활성에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에는 영향을 미칠 수 있지만 수준에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 실시예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준 또는 활성에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 실시예에서, 유의한 효과는, 예를 들어, 스튜던트 T-테스트에 의해 측정될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0062] **내인성 좌위** 또는 **내인성 유전자**: 본원에 설명된 변형, 파괴, 결실, 삽입, 변형, 치환 또는 대체의 도입 전에 부모 또는 기준 유기체 (또는 세포)에서 발견되는 유전자 좌위를 지칭한다.
- [0063] 일부 실시예에서, 내인성 좌위는 전체적으로 또는 부분적으로, 자연에서 발견되는 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 좌위는 야생형 좌위이다. 일부 실시예에서, 기준 유기체는 야생형 유기체이다. 일부 실시예에서, 기준 유기체는 조작된 유기체이다. 일부 실시예에서, 기준 유기체는 (야생형이든 조작된 것이든) 실험실에서 교배된 유기체이다.
- [0064] **내인성 프로모터**: 예를 들어, 야생형 유기체에서, 내인성 유전자 또는 유전자 좌위와 자연적으로 연관된 프로모터를 지칭한다.
- [0065] **조작된**: 일반적으로, 사람의 손으로 조작된 측면을 지칭한다. 통상적인 관행이면서 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 세포의 자손은 실제 조작이 이전 엔티티에 대해 수행되었다고 일반적으로는 여전히 “조작된” 것으로 지칭된다. 또한, 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 본원에서 기술된 바와 같은 “조작”이 달성될 수 있는 다양한 방법론이 이용 가능하다. 자연에서 그러한 순서로 함께 연결되지 않은 둘 이상의 서열이 조작된 폴리뉴클레오티드에서 서로 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작될 때, 폴리뉴클레오티드는 “조작된” 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시예에서, 조작된 폴리뉴클레오티드는 자연에서 발견되는 조절 서열로서 제1 코딩 서열과 작동적으로 연결되고, 제2 코딩 서열과는 작동적으로 연결되지 않는 조절 서열을 포함할 수 있는데, 상기 조절 서열은 제2 코딩 서열과 작동적으로 연관되도록 사람의 손에 의해 연결된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 자연에서 서로 연결되어

있지 않은 폴리펩티드 요소 또는 도메인을 각각 암호화하는 제1 및 제2 핵산 서열은 하나의 조작된 폴리펩티드에서 서로 연결될 수 있다. 이에 비해, 일부 실시예에서, 세포 또는 유기체가 그의 유전 정보가 변경되도록 (예를 들어, 이전에 존재하지 않았던 새로운 유전 물질이 도입되거나, 이전에 존재하던 유전 물질이 변경되거나 제거되도록) 조작된 경우, 세포 또는 유기체는 “조작된” 것으로 간주될 수 있다.

[0066] 일부 실시예에서, “조작”은 분석이나 비교를 수행하거나, 달리 서열, 변경 등을 분석, 권고 및/또는 선택하도록 프로그램된 컴퓨터 시스템의 사용을 통해 (예를 들어, 핵산 서열, 폴리펩티드 서열, 세포, 조직 및/또는 유기체를) 선택하거나 설계하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, “조작”은 시험관 내 화학 합성 방법론 및/또는 예를 들어, (중합효소 연쇄 반응을 통한) 핵산 증폭 하이브리드화, 돌연변이, 형질전환, 형질감염 등과 같은 재조합 핵산 기술, 및/또는 임의의 다양한 통제된 교배 방법론을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, (예를 들어, 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양과 형질전환(예를 들어, 전기 천공, 리포펙션 등)을 위한) 확립된 이러한 다양한 기술은 당 기술분야에 잘 알려져 있고, 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고/되거나 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참조 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, Sambrook 등의, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 본원에 그 전체가 참조로서 통합됨)을 참조한다.

[0067] **유전자:** 생성물(예를 들어, RNA 생성물 및/또는 폴리펩티드 생성물)을 위해 코딩하는 염색체 내의 DNA 서열을 지칭한다. 명료성을 위해, 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 “유전자”는 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 일부를 지칭하고; 문맥으로부터 당 기술분야의 숙련자에게 명백해지는 바와 같이, 조절 서열을 선택적으로 포함할 수 있음을 주목한다. 이러한 정의는 비단백질 코딩 발현 단위에 대한 용어 “유전자”의 적용을 배제하고자 하는 것이 아니며, 오히려, 대부분의 경우에, 본 문서에서 사용된 바와 같이 상기 용어가 폴리펩티드 코딩 핵산을 지칭한다는 것을 명확히 하고자 하는 것이다.

[0068] 일부 실시예에서, 유전자는 코딩 서열(즉, 특정 생성물을 암호화하는 서열)을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전자는 비-코딩 서열을 포함한다. 일부 특정 실시예에서, 유전자는 코딩(예를 들어, 엑손) 서열과 비-코딩(인트론) 서열 모두를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 유전자는 하나 이상의 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등) 및/또는, 예를 들어, 유전자 발현의 하나 이상의 측면(예를 들어, 세포 유형 특이적 발현, 유도 발현 등)을 조절하거나 이에 영향을 줄 수 있는 인트론 서열을 포함할 수 있다.

[0069] 면역글로불린 항원 수용체, 예를 들어, 항체의 가변 도메인은, 염색체를 따라 순차적으로 위치하고 체세포 재조합을 거쳐 완전한 가변 도메인 엑손을 형성하는 “분절”로도 본원에서 지칭되는 **유전자 분절**의 세트에 암호화된다. 유전되는 인간 유전자 분절의 구성, 예를 들어, 인간 유전자 분절의 생식계열 구성, 예를 들어, 인간의 생식계열 계층(예를 들어, 다음 세대로 내려가는 계층) 내의 인간 유전자 분절의 순서는, Lefranc, M.-P., *Exp. Clin. Immunogenet.*, 18, 100-116 (2001)(이의 전체 내용은 본원에 참조로서 통합됨)에서 발견될 수 있으며, 이는 또한 생식계열 구성에서 인간 면역글로불린 중쇄 좌위 내에서 발견되는 기능성 유전자 분절 및 위유전자를 보여준다. 유전자 분절은 가변(V) 유전자 분절(이들 각각은 또한 V 분절로서 개별적으로 지칭될 수 있음), 다양성(D) 유전자 분절(이들 각각은 또한 D 분절로서 개별적으로 지칭될 수 있음), 또는 결합(J) 유전자 분절(이들 각각은 또한 J 분절로서 개별적으로 지칭될 수 있음)로서 분류된다. 생식계열 DNA에는 각 유형의 유전자 분절의 다중 카피가 있지만, 수용체가 포함된 림프구에서는 각 유형의 수용체 사슬에 대해 오직 하나만 발현된다.

[0070] 여러 유전적 성분을 포함하는 일련의 재조합 이벤트는 유전자 분절(예를 들면, V, D 및 J)의 정렬된 배열로부터 면역글로불린을 조립하는 역할을 한다. 이러한 유전자 분절 조립은 부정확한 것으로 알려져 있으며, 따라서, 면역글로불린 다양성은 다른 유전자 분절의 조합과 부정확한 결합을 통한 고유한 접합의 형성 모두에 의해 달성된다. 또한, 다양성은 면역글로불린의 가변 영역 서열이 항원에 대한 친화도 및 특이성을 증가시키기 위해 변경되는 체세포 과돌연변이로 알려진 과정을 통해 생성된다. 본원의 Ig 유전자 분절, 예를 들어, Ig V 분절에 대한 참조는 생식계열 Ig V 분절의 변이체를 포함한다. 생식계열 Ig 분절, 예를 들어, 생식계열 Ig V 분절의 변이체는 다형성, 예를 들어, 대립유전자, 이의 변이체, 이의 체세포적으로 과돌연변이된 변이체, 이의 재조합된 변이체, 및 이의 퇴화 변이체를 포함한다.

[0071] Ig 분절의 코딩 영역의 서열 다형성, 예를 들어, 생식계열 Ig 분절의 대립유전자 변이체의 서열은 Pallarés, N. 등의 (1998) *Exp. Clin. Immunogenet.*, 15, 8-18; Barbié, V. 및 Lefranc, M.-P. (1998) *Exp. Clin. Immunogenet.*, 15, 171-183; Martinez, C. 및 Lefranc, M.-P. (1998) *Exp. Clin. Immunogenet.*, 15, 184-193;

Pallarès, N. 등의 (1999) *Exp. Clin. Immunogenet.*, 16, 36-60 (1999), 및 Ruiz, M. 등의 (1999) *Exp. Clin. Immunogenet.*, 16, 173-184에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 대립유전자 생식계열 Ig 분절의 표현은 또한 월드와이드 웹(www) 상에서 2개의 형식으로 발견될 수 있는데, [imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/#B](http://imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/#B)는 대립 유전자\*01와 비교하여 상이한 대립유전자에 할당된 모든 공지된 서열의 정렬을 표시하고, [imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/#C](http://imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/#C)는 대립 유전자\*01와 비교하여 뉴클레오티드 돌연변이 및 상이한 대립유전자의 상응하는 아미노산 변화에 대한 설명을 제공한다. 또한 유럽특허 제3 128 009호를 참조하고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0072] Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 포함하는 경우, 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 분절에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 핵산 서열 상동성, 또는 생식계열 Ig V 분절에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산을 암호화하는 것.

[0073] 일부 실시예에서, Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 포함하는 경우, 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 분절과 80% 내지 99%의 핵산 서열 상동성. 일부 실시예에서, Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 포함하는 경우, 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 분절과 85% 내지 99%의 핵산 서열 상동성. 일부 실시예에서, Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 포함하는 경우, 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 분절과 90% 내지 99%의 핵산 서열 상동성. 일부 실시예에서, Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 포함하는 경우, 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 분절과 95% 내지 99%의 핵산 서열 상동성.

[0074] Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 암호화하는 경우 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 Ig V 분절에 의해 암호화된 아미노산 서열과 80% 내지 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산. Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 암호화하는 경우 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 Ig V 분절에 의해 암호화된 아미노산 서열과 85% 내지 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산. Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 암호화하는 경우 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 Ig V 분절에 의해 암호화된 아미노산 서열과 90% 내지 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산. Ig V 분절은 하기 영역 중 하나 이상을 암호화하는 경우 생식계열 Ig V 분절의 재조합된 또는 체세포적으로 과돌연변이된 변이체로 간주될 수 있다: FR1, FR2 및/또는 FR3, 생식계열 Ig V 분절에 의해 암호화된 아미노산 서열과 95% 내지 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산.

[0075] 면역글로불린은 두 개의 동일한 중쇄 및 두 개의 동일한 경쇄로 구성된 Y-자형 폴리펩티드이며, 이들 각각은 두 개의 구조적 성분: 하나의 가변 도메인과 하나의 불변 도메인을 가지고 있다. 유전자 분절의 조립에 의해 형성되는 것은 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인이지만, 불변 도메인들은 RNA 스플라이싱을 통해 가변 도메인에 융합된다. 유전자 분절을 조립 (또는 결합)하는 메커니즘은 중쇄 및 경쇄에 대해 유사하지만, 경쇄의 경우에는 단 하나의 결합 이벤트가 요구되지만 (즉, V에서 J로) 중쇄의 경우에는 두 개가 요구된다 (즉 D에서 J 및 V에서 DJ로).

[0076] 일반적으로, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 면역글로불린 중쇄 다양성(D<sub>H</sub>) 유전자 분절(D<sub>H</sub> 분절로도 지칭됨) 및 면역글로불린 중쇄 결합 J<sub>H</sub> 유전자 분절(J<sub>H</sub> 분절로도 지칭됨)과 재조합된 면역글로불린 중쇄 가변(V<sub>H</sub>) 유전자 분절(V<sub>H</sub> 분절로도 지칭됨)의 체세포 재조합에 의해 형성된 가변 도메인 엑손에 의해 암호화된다. 면역글로불린 경쇄 가변 도메인은 일반적으로 면역글로불린 경쇄 가변(V<sub>L</sub>) 유전자 분절(V<sub>L</sub> 분절로도 지칭됨)과 면역글로불린 경쇄 결합(J<sub>L</sub>) 유전자 분절(J<sub>L</sub> 분절로도 지칭됨)의 체세포 재조합에 의해 형성된 가변 도메인 엑손에 의해 암호화된다.

[0077] (각각 VDJ 재조합 및 VJ 재조합으로 지칭되는) 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 유전자 분절의 조립은, 재조합 신호 서열 (RSS)이라고 불리는, 각각의 유전자 분절 측부에 있는 보존된 논코딩 DNA 서열에 의해 가이드되며,

이는 V, D 및 J 코딩 서열에 대하여 정확한 위치에서의 DNA 재배열을 보장한다 (예를 들어, Ramsden, D.A. 외, 1994, Nuc. Acids Res. 22(10):1785-96 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 각각의 RSS는 코딩 서열 (예를 들어, V, D 또는 J 분절)과 인접하는 7개 뉴클레오티드 (7량체)의 보존된 블록에 이어서, 보존된 스페이스 (12bp 또는 23bp) 및 9개 뉴클레오티드 (9량체)의 제2 보존된 블록으로 구성된다. 개체 간에 12bp 또는 23bp 스페이스에서 상당한 서열 다양성이 허용되지만, 일반적으로 이러한 서열들의 길이는 변하지 않는다. 면역글로불린 유전자 분절들 사이의 재조합은 일반적으로 12/23 규칙으로 지칭되는 규칙을 따르며, 12bp 스페이스 (또는 12-량체)가 있는 RSS가 측부에 있는 유전자 분절이 일반적으로 23bp 스페이스가 측부에 있는 유전자 분절에 결합된다 (또는 23-량체; 예를 들어, Hiom, K. 및 M. Gellert, 1998, Mol. Cell. 1(7):1011-9 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0078] 달리 표시되지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것이라는 것이 당 기술분야의 숙련자에게 명백하지 않는 한, RSS에 대한 언급이 없는 재배열되지 않은 유전자 분절은, 유전자 분절이 자연적으로 연관되는, 예를 들어, 측부에 위치하거나, 작동가능하게 연결된, 등의 2개의 RSS를 포함하는 것으로 추정된다. 일부 실시예에서, 본원의 재배열되지 않은 유전자 분절은 그의 생식계열(예를 들어, 야생형) 구성의 유전자 분절을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 생식계열  $V_H$  유전자 분절 및 생식계열  $J_H$  유전자 분절이 양쪽 측부에 각각 23-량체 RSS가 위치한다. 대조적으로, 생식계열  $D_H$  유전자 분절, 예를 들어, 재배열되지 않은  $D_H$  유전자 분절은 각각의 한쪽 측부 상에 12-량체 RSS가 위치한다.

[0079] 이와 같이, 재배열되지 않은 유전자 분절은 또한 이러한 생식계열 구성과 연관된 임의의 RSS를 포함하는, 그의 생식계열 구성의 유전자 분절을 지칭할 수 있다. 또한, 그 생식계열 구성의 복수의 유전자 분절은 일반적으로 각각의 개별 유전자 분절이 그 생식계열(예를 들어, 재배열되지 않은) 구성에 있을 뿐만 아니라, 기능성 유전자 분절의 순서 및/또는 위치도 지칭한다. 예를 들어, Lefranc, M.-P., Exp. Clin. Immunogenet., 18, 100-116 (2001) 참조; 인간 V, D 및 J 유전자 분절의 생식계열 구성에 대해, 그 전문이 참조로서 본원에 통합된다.

[0080] 각각의 V 분절은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 면역글로불린 가변 도메인의 CDR3의 일부를 암호화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 Ig 신호 또는 리더(L) 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 각각의 D 유전자 분절은 면역글로불린 중쇄 가변 도메인의 CDR3에 기여한다. 각각의 J 유전자 분절은 또한 면역글로불린 가변 도메인의 CDR3 및 FR4에 기여한다. 고유한 넘버링에 기초한 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4의 아미노산 위치가 Lefranc 등의 (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77에 기술되어 있고 [www.imgt.org](http://www.imgt.org)에서 또한 확인할 수 있다.

[0081] **이종:** 상이한 근원으로부터의 제제 또는 엔티티를 지칭한다. 예를 들어, 특정 세포 또는 유기체 내에 존재하는 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물을 참조하여 사용될 때, 이 용어는 관련 폴리펩티드 또는 그의 단편, 유전자 또는 그의 단편, 또는 유전자 산물 또는 그의 단편이: (1) 사람의 손에 의해 조작되었고; 2) 사람의 손에 의해(예를 들어 유전자 조작을 통해) 세포 또는 유기체 (또는 이의 전구체) 내로 도입되었고; 그리고/또는 (3) 관련 세포 또는 유기체(예를 들어, 관련 세포 유형 또는 유기체 유형)에 존재하거나 이에 의해 자연적으로 생성되지 않음을 분명히 한다. 또 다른 예시는 보통 특정 천연 세포 또는 유기체에 존재하지만, 예를 들어, 비-자연적으로 연관된 및 일부 실시예에서는, 비-내인성 조절 요소 (예를 들어, 프로모터)의 조절 하에 돌연변이 또는 배치에 의해, 변형된, 폴리펩티드 또는 그의 단편, 유전자 또는 그의 단편, 또는 유전자 산물 또는 그의 단편을 포함한다.

[0082] **숙주 세포:** 이종(예를 들어, 외인성) 핵산 또는 단백질이 도입된 세포를 지칭한다. 본 개시내용을 읽는 당 기술분야의 숙련자는 이러한 용어가 특정한 대상 세포를 언급하는 것 뿐 아니라 이러한 세포의 자손을 언급하기 위해 사용된다는 것을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 의해 다음 세대에서 특정한 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은, 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 여전히 포함된다.

[0083] 일부 실시예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 포유류 세포이거나 이를 포함한다. 일반적으로, 숙주 세포는 해당 세포가 지정된 계(Kingdom of life)와 무관하게 이종 핵산 또는 단백질을 받고/받거나 생산하기에 적합한 임의의 세포이다. 예시적인 세포는 원핵세포 및 진핵 세포(단세포 또는 다세포), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*), 고초균 종(*Bacillus spp.*), 스트렙토미세스 종(*Streptomyces spp.*) 등의 균주), 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예를 들어, 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 메타놀리카(*Pichia methanolica*) 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들

어, SF-9, SF-21, 배콜로바이러스에 감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni) 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 세포 융합체, 예컨대 하이브리도마(hybridoma) 또는 쿼드로마(quadroma) 등을 포함한다.

[0084] 일부 실시예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트, 또는 마우스 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 진핵세포이고, 다음의 세포로부터 선택된다: CHO(예를 들어, CHOK1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60(예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포로부터 유래한 세포주. 일부 실시예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6® 세포)를 포함한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 단리된 세포이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 조직의 일부이다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 유기체의 일부이다.

[0085] **인간화된:** 비-인간 기원이고 변형된(예를 들어, 인간화된) 분자가 그의 생물학적 기능을 보유하고/하거나 보유한 생물학적 기능을 수행하는 구조를 유지하는 방식으로 그 일부가 상응하는 인간 분자의 상응하는 일부로 대체된 분자(예를 들어, 핵산, 단백질 등)를 지칭한다. 대조적으로, “인간” 등은 인간 기원만을 갖는 분자, 예를 들어, 각각 인간 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열만을 포함하는 인간 뉴클레오타이드 또는 단백질을 포함한다. 용어 “인간(화된)” 는 인간(화된) 분자가 (a) 인간 분자 또는 (b) 인간화 분자일 수 있음을 반영하기 위해 사용된다.

[0086] **동일성:** 서열의 비교와 관련하여, 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당해 분야에 알려진 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 지칭한다.

[0087] 일부 실시예에서, 본원에 설명된 동일성은 10.0의 오픈 갭 패널티, 0.1의 연장갭 패널티를 채용한 ClustalW v. 1.83 (slow) 정렬 및 Gonnet 유사성 매트릭스(MACVECTOR™ 10.0.2, MacVECTOR Inc., 2008)를 사용하여 결정된다.

[0088] **면역글로불린**은 항체, 예를 들어, 항원-결합 단백질로서 기능하는, 혈청에 존재하거나 면역 체계의 B 세포에서 발현되는 폴리펩티드의 부류, 및 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 지칭한다.

[0089] **비-면역글로불린 폴리펩티드**는 동족 수용체에 결합하는 리간드, 예를 들어, 폴리펩티드를 지칭한다. 예시적인 및 잘 알려진 비-면역글로불린 폴리펩티드: 동족 수용체 쌍은, 예를 들어, 동족 G-단백질 결합 수용체(GPCR)에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 GPCR은 케모카인 수용체, 글루카곤 수용체(예를 들어, GLP1:GLP1R), 칼시토닌 수용체, 멜라노코틴 수용체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드를 포함하는 이들 및 다른 동족 GPCR은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Wu 등의 (2017) *J. Mol. Biol.* 429:2726-45를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 추가의 비제한적이고 예시적인 비-면역글로불린 폴리펩티드(리간드): 동족 수용체 쌍은 하기를 포함한다:

[0090] a. 동족 수용체 티로신 키나제에 결합하는 리간드, 예를 들어, 표피 성장 인자(EGF), 인슐린, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF) 등과 같은 리간드, 그러나 이에 한정되지 않음.

[0091] b. DLL:노치 수용체 쌍,

[0092] c. B7:CD28/CLTA4/PD1 수용체 쌍,

[0093] d. 세마포린:플렉신 수용체 쌍,

[0094] e. PCSK9/LDLR 쌍,

[0095] f. HLA:LILR 쌍,

[0096] g. HLA:KIR 쌍,

[0097] h. RGD-리간드:인테그린 쌍,

[0098] i. 아밀린:CALCR/RAMP, 예를 들어, RAMP1/2/3, 쌍

[0099] j. 나트륨이노 펩티드(예를 들어, ANP, BNP, CNP 등): 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR, NPR3 등) 쌍 등.

- [0100] 리간드: 수용체 쌍은 프로테아제 및 억제제를 포함할 수 있다.
- [0101] **시험관 내:** 다세포 유기체 내에서가 아니라, 인공적인 환경, 예를 들어 시험관이나 반응 용기, 세포 배양기 등에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.
- [0102] **생체 내:** 인간 및 비-인간 동물과 같은 다세포 유기체 내에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 세포 기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 (예를 들어 시험관 내 시스템과 반대로) 활 세포 내에서 발생하는 이벤트를 지칭하도록 사용될 수 있다.
- [0103] **단리된:** (1) (자연에서 및/또는 실험실 세팅에서의 여부를 불문하고) 초기에 생성될 때 연관되었던 성분의 적어도 일부로부터 분리되었고/되었거나, (2) 사람의 손에 의해 설계, 생산, 제작 및/또는 제조된 물질 및/또는 엔티티를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 엔티티는 이들이 초기에 연관되었던 다른 성분 중 약 10개 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시예에서, 단리된 제제는 적어도 약 80% 이상 순수하다. 실질적으로 다른 구성요소가 없는 경우에 물질은 “순수”하다. 일부 실시예에서, 당 기술분야의 숙련자에게 이해되는 바와 같이, 물질은, 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제(예를 들어, 완충액, 용매, 물 등)와 같은 어떤 다른 성분과 조합된 후에도 여전히 “단리”되거나 심지어 “순수”한 것으로 간주될 수 있는데; 이러한 실시예에서, 물질의 단리 또는 순도 백분율은 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다.
- [0104] 하나의 예로서, 일부 실시예에서, 자연에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 폴리머는: (a) 파생의 기원 또는 공급원으로 인해 자연계에서의 원래의 상태에서 동반되는 일부 또는 전체 성분과 연관되어 있는 경우; (b) 자연에서 이를 생산하는 종과 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없는 경우; 또는 (c) 자연에서 이를 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템의 성분에 의해 발현되거나 아니면 이와 연관되어 있는 경우에 “단리된” 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시예에서, 화학적으로 합성되거나 자연에서 폴리펩티드를 생산하는 세포 시스템과 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 “단리된” 폴리펩티드로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 하나 이상의 정제 기술을 거친 폴리펩티드는, a) 상기 폴리펩티드가 자연에서 연관되는 다른 성분; 및/또는 b) 상기 폴리펩티드가 초기에 생산될 때 연관되었던 다른 성분으로부터 분리된 정도까지 “단리된” 폴리펩티드로 간주될 수 있다.
- [0105] **리더 서열 또는 신호 펩티드:** 소포체를 통해 번역글로불린 중쇄 또는 경쇄를 안내하고 최종 항체가 조립되기 전에 중쇄 또는 경쇄에서 절단되는 번역글로불린 신호 또는 리더(L) 펩티드를 지칭한다. 이는 또한 신호 또는 리더 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 지칭할 수 있다. 각각의 V 유전자 분절은 생식계열 Ig V 분절의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 및 CDR3을 암호화하는 엑손 2 서열의 바로 상류에 있는 분절(예를 들어, 도 2 참조)의 엑손 1 및 엑손 2에 의해 암호화된 리더 서열을 포함한다. Ig 신호 또는 리더 서열은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Lefranc 등의 (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77을 참조하고, 그 전문은 참조로서 본원에 통합되며, 또한 [imgt.org](http://imgt.org) 주소를 갖는 월드와이드 웹(www)에서 볼 수 있다. 또한 Lefranc 및 Lefranc (2020)의 *Biomedicines* 8(9):1-117을 참조한다.
- [0106] **비-인간 동물:** 인간이 아닌 임의의 척추 동물 유기체를 지칭한다. 비-인간 동물은 원구류, 경골어, 연골 어류(예를 들어, 상어 또는 가오리), 양서류, 파충류, 포유류, 및 조류일 수 있다. 일부 실시예에서, 비-인간 포유류는 영장류, 염소, 양, 돼지, 개, 소, 또는 설치류일 수 있다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 랫트 또는 마우스일 수 있다.
- [0107] **핵산**은 가장 넓은 의미에서, 올리고뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있고 일반적으로 핵산 분자, 핵산 서열, 뉴클레오티드 분자, 뉴클레오티드 분자와 상호교환가능한 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭하며, 이 용어는 또한 서로 상호교환가능하다.
- [0108] 일부 실시예에서, “핵산”은 인산디에스테르 결합을 통해 올리고뉴클레오티드 사슬에 포함되거나 포함될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥으로부터 명백해지는 바와 같이, 일부 실시예에서, “핵산”은 개별적인 핵산 잔기(예를 들어, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭하고; 일부 실시예에서, “핵산”은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 사슬을 지칭한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 RNA이거나 이를 포함하고; 일부 실시예에서, “핵산”은 DNA이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 자연적인 핵산 잔기이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 핵산 유사체이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 핵산 유사체는 인산디에스테르 백본을 활용하지 않는다는 점에서 “핵산”과 다르다. 예를 들어, 일부 실시예에서, “핵산”은 당 기술분야에 알려져 있고, 백본에서 인산디에스테르 결합(phosphodiester bonds) 대신 펩티드 결합을 가지며, 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주되

는 하나 이상의 “펩티드 핵산(peptide nucleic acid)” 이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, “핵산”은 인산디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5' -N-포스포라미디트 결합을 가진다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 자연적인 뉴클레오시드(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 테옥시아데노신, 테옥시티미딘, 테옥시구아노신, 및 테옥시시티딘)이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-테자아데노신, 7-테자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 0(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화 염기, 삽입 염기, 및 이의 조합)이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, “핵산”은 천연 핵산의 당과 비교해 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2' -플루오로리보스, 리보스, 2' -데옥시리보스, 아라비노스, 및 핵소스)을 포함한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 RNA 또는 단백질과 같은 기능성 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 실시예에서, “핵산”은 폴리펩티드 단편(예를 들어, 펩티드)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 엑손을 포함한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 하나 이상의 코딩 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, “핵산”은 자연 공급원 유래의 하나 이상의 단리체, 상보성 템플릿에 기반한 중합화에 의한 효소적 합성(생체 내 또는 시험관 내), 재조합 세포나 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성 중 하나 이상에 의해 제조된다. 일부 실시예에서, “핵산”은 적어도 3개 이상의 잔기 길이이다. 일부 실시예에서, “핵산”은 단일 가닥이고; 일부 실시예에서, “핵산”은 이중 가닥이다. 일부 실시예에서, “핵산”은 폴리펩티드 또는 그의 단편을 암호화하는 서열에 상보적이거나, 이를 암호화하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 실시예에서, “핵산”은 효소 활성을 가진다.

[0109] **작동가능하게 연결된:** 기술된 성분이 의도된 방식으로 기능하게 하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 지칭한다.

[0110] 다른 실시예에서, 작동가능한 연결은 인접성을 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 서로에게 “작동가능하게 연결된” 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절은 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하도록 재배열될 수 있으며, 이는 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절이 반드시 서로 인접할 필요는 없다. 서로에게 그리고 인접한 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절은, 항원 결합 단백질의 폴리펩티드 사슬로서 불변 영역 유전자와 함께 발현되는 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하도록 재배열될 수 있다. 코딩 서열에 “작동가능하게 연결된” 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 호환 가능한 조건 하에 달성되도록 연결된다. “작동가능하게 연결된” 서열은 관심 유전자에 인접한 발현 조절 서열 및 관심 유전자를 조절하기 위해 일정한 거리에서 또는 가로 질러(in trans) 작용하는 발현 조절 서열 둘 다를 포함한다.

[0111] 용어 “**발현 조절 서열**”은, 연결되는 코딩 서열의 발현 및 가공에 영향을 미치는 데 필요한, 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. “**발현 조절 서열**”은 다음을 포함한다: 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 증강자 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닌화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진하는 서열; 단백질 안정성을 증진하는 서열(즉, 코작 공통(Kozak consensus) 서열); 및 원하는 경우, 단백질 분비를 증진하는 서열. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르다. 예를 들어, 원핵생물에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하는 반면, 진핵생물에서, 통상적으로, 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. “**조절 서열(control sequence)**”이라는 용어는 존재하는 것이 발현 및 가공에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 의도되고, 존재하는 것이 유리한 추가적인 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다.

[0112] **생리학적 조건:** 세포 또는 유기체가 살고 그리고/또는 재생하는 조건을 참조하는 그 분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 유기체 또는 세포 시스템을 위해 자연에서 발생할 수 있는 외부 또는 내부 환경의 조건을 지칭한다. 일부 실시예에서, 생리학적 조건은 인간 또는 비-인간 동물의 체내에 존재하는 이러한 조건, 특히 수술 부위 지점 및/또는 내부에 존재하는 조건이다. 생리학적 조건은 통상적으로, 예를 들어, 그것이 지상에서 마주치게 되는 20-40°C의 온도 범위, 1 대기압, pH 6-8, 1-20 mM의 포도당 농도, 대기 수준에서 산소 농도, 및 중력을 포함한다. 일부 실시예에서, 실험실에서의 조건은 생리학적 조건에서 조작되고 그리고/또는 유지된다. 일부 실시예에서, 생리학적 조건은 유기체(예를 들면, 비-인간 동물)에서 마주하게 된다.

[0113] **폴리펩티드:** 아미노산의 임의의 고분자 사슬을 지칭한다.

- [0114] 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 서로 별개로 자연에서 발생하는 부분(즉, 2종 이상의 상이한 유기체로부터, 예를 들어, 인간 및 비-인간 부위)을 함유하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 사람의 손의 작용을 통해 설계되고/되거나 생산된 조작된 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는, 이들 각각이 관심있는 폴리펩티드에서 발견되는 것보다 서로에 대해 다른 공간적 배열로 동일한 모체 폴리펩티드에서 발견되는, 복수의 단편을 포함하거나 이들로 구성될 수 있어서 (예를 들어, 모체에 직접 연결되는 단편은 관심있는 폴리펩티드에서 공간적으로 분리되거나 또는 그 반대일 수 있고, 그리고/또는 단편은 모체에서와 다른 관심있는 폴리펩티드 내에서의 순서로 존재할 수 있음), 관심있는 폴리펩티드는 그의 모체 폴리펩티드의 유도체가 된다.
- [0115] **제조합:** 제조합 수단, 예컨대 숙주 세포에 형질감염된 제조합 발현 벡터를 사용해 발현된 폴리펩티드, 제조합, 조합 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드(Hoogenboom H. R., 1997 TIB Tech. 15:62-70; Hoogenboom H., 및 Chames P., 2000, Immunology Today 21:371-378; Azzazy H., 및 Highsmith W. E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., 및 Larrick J. W., 2002, BioTechniques 29:128-145), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D., 등, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Little M. 등, 2000, Immunology Today 21:364-370; Kellermann S. A. 및 Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Murphy, A.J., 등, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111(14):5153-5158; 이들 각각은 그 전문이 참조로 본원에 포함됨)에 의해 설계, 조작, 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드, 또는 선택된 서열 요소를 서로에게 스플라이싱시키는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제작, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0116] 일부 실시예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 자연에서 발견된다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는, 예를 들어, 자연 또는 합성 공급원으로부터의 알려진 서열 요소의 돌연변이 유발(예를 들어, *생체 내* 또는 *시험관 내*)로부터 유래한다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 제조합 폴리펩티드는 관심있는 근원 유기체(예를 들어, 인간, 마우스 등)의 게놈(예를 들어, 폴리펩티드)에서 발견되는 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제조합 폴리펩티드는 2가지의 상이한 유기체(예, 인간 및 비-인간 유기체)에서 서로(즉, 둘 이상의 상이한 유기체, 예를 들어, 인간 및 비-인간 부위로부터) 별개로 자연에서 발생하는 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제조합 폴리펩티드는(예를 들어, 비-인간 동물 내에서, 예를 들어, *시험관 내* 또는 *생체 내*) 돌연변이 유발로부터 유래한 아미노산 서열을 가지므로, 제조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열로부터 기원하고 이와 관련되지만 비-인간 동물의 *생체 내*. 게놈 내에서는 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.
- [0117] **기준(reference):** 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 관심 서열 또는 관심 값이 비교되는 표준 제제 또는 대조 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 지칭한다. “기준” 또는 “대조군”은 “기준 동물” 또는 “대조군 동물”을 지칭할 수 있다. “기준 동물”은 본원에 설명된 변형, 본원에 설명된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 동물). 통상적으로, 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 개체군, 샘플, 서열 또는 값은 관심있는 제제, 동물(예를 들어, 포유동물), 코호트, 개체, 개체군, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 사용된 것에 필적할 만한 조건 하에 결정되거나 특성화된다.
- [0118] 일부 실시예에서, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심있는 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값의 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험 및/또는 결정된다. 일부 실시예에서, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은, 선택적으로 유형 매체로 구현된, 역사적 기준이다. 일부 실시예에서, 기준은 대조군을 지칭할 수 있다. “VELOCIMMUNE® 대조군” 등, 예를 들어, 기준 동물로서의 “대조군 VELOCIMMUNE®” 또는 “대조군”은 마우스가 번식할 수 있는 인간화된 중쇄 및 카파 가변 영역 좌위를 포함하는 VELOCIMMUNE® 마우스를 지칭한다. 이들 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스는 일반적으로 Macdonald 등 (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 및 supplemental information에 기술되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0119] **체세포 제조합:** 면역글로불린 중쇄 좌위에서  $V_H$ ,  $D_H$ , 및  $J_H$  유전자 분절의 제조합 또는 면역글로불린 경쇄 좌위에서  $V_L$  및  $J_L$  유전자 분절을 지칭한다. 체세포 제조합은 골수에서 B 세포 발생 동안 항원 접촉 ad 전에 일어난다. 중쇄 좌위에서, 하나의  $D_H$  및 하나의  $J_H$ 는 D-J 결합으로 지칭되는 과정에서 모든 개체 DNA의 제거와 무작위

로 재조합된다. 다음으로, 무작위  $V_H$  분절이 재배열된  $D_HJ_H$  분절에 재조합된다. 면역글로불린 경쇄 좌위에서의 재조합은 유사한 방식으로 발생한다.  $V_L$  유전자 분절 및  $J_L$  유전자 분절은 V-J 결합으로 지칭되는 과정 중에 조합되어 재조합되고, 이들 사이에서 모든 DNA가 제거된다.

[0120] **실질적으로:** 관심있는 특성 또는 성질의 전체 범위나 정도 또는 전체에 근사한 범위 또는 정도를 나타내는 정성적인 조건을 포함한다. 생물학 분야의 숙련자는 생물학적 및 화학적 현상이 완료되고/되거나 완료에 이르거나, 절대적인 결과를 달성하거나 피하는 경우는 거의 없다는 것을 이해할 것이다. 따라서, “실질적으로” 라는 용어는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완전성의 잠재적인 결여를 포착하도록 본원에서 사용된다.

[0121] **실질적 상동성:** 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 지칭한다. 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열이 상응하는 위치에 상동성 잔기를 함유하는 경우, 이들은 “실질적 상동성” 인 것으로 일반적으로 간주된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능성 특성을 갖는 동일하지 않은 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당 기술분야의 숙련자에게 공지된 바와 같이, 특정 아미노산은 일반적으로 “소수성” 또는 “친수성” 아미노산으로서, 및/또는 “극성” 또는 “비극성” 측쇄를 갖는 것으로서 분류된다. 하나의 아미노산이 동일한 유형의 다른 것으로 치환되는 것은 흔히 “상동성” 치환으로 간주될 수 있다. 일반적인 아미노산 분류가 아래에 요약되어 있다.

|        |     |   |     |    |      |
|--------|-----|---|-----|----|------|
| 알라닌    | Ala | A | 비극성 | 중성 | 1.8  |
| 아르기닌   | Arg | R | 극성  | 양성 | -4.5 |
| 아스파라긴  | Asn | N | 극성  | 중성 | -3.5 |
| 아스파르트산 | Asp | D | 극성  | 음성 | -3.5 |
| 시스테인   | Cys | C | 비극성 | 중성 | 2.5  |
| 글루탐산   | Glu | E | 극성  | 음성 | -3.5 |
| 글루타민   | Gln | Q | 극성  | 중성 | -3.5 |
| 글리신    | Gly | G | 비극성 | 중성 | -0.4 |
| 히스티딘   | His | H | 극성  | 양성 | -3.2 |
| 이소류신   | Ile | I | 비극성 | 중성 | 4.5  |
| 류신     | Leu | L | 비극성 | 중성 | 3.8  |
| 리신     | Lys | K | 극성  | 양성 | -3.9 |
| 메티오닌   | Met | M | 비극성 | 중성 | 1.9  |
| 페닐알라닌  | Phe | F | 비극성 | 중성 | 2.8  |
| 프롤린    | Pro | P | 비극성 | 중성 | -1.6 |
| 세린     | Ser | S | 극성  | 중성 | -0.8 |
| 트레오닌   | Thr | T | 극성  | 중성 | -0.7 |
| 트립토판   | Trp | W | 비극성 | 중성 | -0.9 |
| 티로신    | Tyr | Y | 극성  | 중성 | -1.3 |
| 발린     | Val | V | 비극성 | 중성 | 4.2  |

| 모호 아미노산         | 3자  | 1자 |
|-----------------|-----|----|
| 아스파라긴 또는 아스파르트산 | Asx | B  |
| 글루타민 또는 글루탐산    | Glx | Z  |
| 류신 또는 이소류신      | Xle | J  |
| 불특정 또는 불명 아미노산  | Xaa | X  |

[0122]

[0123] 당 기술분야에서 공지된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은, 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 갭 BLAST 및 PSI-BLAST와 같이 상업적 컴퓨터 프로그램에서 사용할 수 있는 것들을 포함하여, 임의의 다양한 알고리즘을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul, S. F. 등, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul, S. F. 등, 1996, Methods in Enzymol. 266:460-80; Altschul, S. F. 등, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D., 및 B. F. F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener 등 (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1998에 기술되어 있다. 상동성 서열을 확인하는 것 외에도, 전술된 프로그램은 일반적으로 상동성의 정도에 대한 지표를 제공한다.

[0124] 일부 실시예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도 95% 이상상이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 상동성인 경우 이들은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 실시예에

서, 관련 구간은 적어도 9개 이상의 잔기이다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 완전한 서열을 따라 인접 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 전체 서열을 따라 불연속 잔기, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 이의 부분의 접힌 형태에 의해 한데 모인 인접하지 않은 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 적어도 10개 이상의 잔기이다.

[0125] **실질적 동일성:** 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 지칭한다. 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열이 상응하는 위치에 동일한 잔기를 함유하는 경우, 이들은 “**실질적으로 동일한**” 것으로 일반적으로 간주된다. 당 기술분야에서 공지된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은, 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 깎 BLAST 및 PSI-BLAST와 같이 상업적 컴퓨터 프로그램에서 사용할 수 있는 것들을 포함하여, 임의의 다양한 알고리즘을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul, S. F. 등, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul, S. F. 등, 1996, Methods in Enzymol. 266:460-80; Altschul, S. F. 등, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Baxevanis, A.D., 및 B. F. F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener 등 (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1998에 기술되어 있다. 동일한 서열을 확인하는 것 외에도, 전술된 프로그램은 일반적으로 동일성의 정도에 대한 지표를 제공한다.

[0126] 일부 실시예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도 95% 이상이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 동일한 경우 이들은 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 실시예에서, 관련 구간은 적어도 10개 이상의 잔기이다.

[0127] **표적화 벡터** 또는 **표적화 작제물:** 표적화 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 표적화 영역은, 표적 세포, 조직 또는 동물 내 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하고 상동성 재조합을 통해 세포, 조직 또는 동물의 게놈 내 위치에 표적화 작제물의 통합을 제공하는 서열을 포함한다. 부위 특이적 재조합효소 인식 부위 (예를 들어, *loxP* 또는 *Frt* 부위)를 이용하여 표적화하는 표적화 영역도 포함된다.

[0128] 일부 실시예에서, 본원에서 설명되는 표적화 작제물은 특정 관심 핵산 서열 또는 유전자, 선택 가능한 마커, 제어 및/또는 조절 서열, 및 이러한 서열을 포함하는 재조합을 돕거나 촉진하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 매개되는 재조합을 가능하게 하는 다른 핵산 서열을 더 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 작제물은 관심 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 더 포함하되, 관심 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 이중 유전자이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 작제물은 관심 인간화 유전자를 전체적 또는 부분적으로 더 포함하되, 관심 인간화 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드와 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화한다. 일부 실시예에서, 표적화 작제물(또는 표적화 벡터)은 사람의 손에 의해 조작되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 표적화 작제물(또는 표적화 벡터)은, 자연에서는 그러한 순서로 함께 연결되지 않지만 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 폴리뉴클레오티드에서는 서로 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작되는 둘 이상의 서열을 함유하는 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 작제될 수 있다.

[0129] **이식유전자** 또는 **이식유전자 작제물:** 사람의 손에 의해, 예컨대 본원에 설명된 방법에 의해 세포 내로 도입된 핵산 서열 (예를 들어, 전체적으로 또는 부분적으로, 관심 폴리펩티드를 암호화함)을 지칭한다. 또한, 이식유전자는 이식유전자가 도입되는 유전자이식 동물 또는 세포에 대해 부분적으로 또는 전체적으로 이중, 즉 외래일 수 있다. 이식유전자는 하나 이상의 전사 조절 서열 및 선택된 핵산 서열의 발현에 필요할 수 있는 임의의 다른 핵산, 예컨대 인트론이나 프로모터를 포함할 수 있다. 이식유전자는 이식유전자를 흡수한 자손(예를 들어, 세포)의 후속 선택을 허용하는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다.

[0130] **유전자이식 동물, 이식유전자 비-인간 동물** 또는 **Tg<sup>+</sup>:** 비-인간 동물의 세포 중 하나 이상이 관심있는 폴리펩티드를 암호화하는 이중 핵산 및/또는 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 임의의 비-자연발생 비-인간 동물과 상호교환적으로 사용되거나 이를 지칭할 수 있다.

[0131] 일부 실시예에서, 이중 핵산 서열 및/또는 유전자는 미세주입이나 재조합 바이러스 감염에 의한 것과 같은, 고의적인 유전자 조작에 의해 전구체 세포에 도입됨으로써 세포 내에 직접 또는 간접적으로 도입된다. 유전자 조작이라는 용어는 고전적인 교배 기술을 포함하지 않고, 오히려 재조합 DNA 분자(들)의 도입에 관한 것이다. 이러한 분자는 염색체 내에 통합되거나, 염색체 외에서 DNA를 복제할 수 있다. 용어 “Tg<sup>+</sup>” 는 이중 핵산 및/또는

유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 동물, 및/또는 이중 핵산 및/또는 유전자의 단일 또는 다중-사본을 갖는 동물을 포함한다.

- [0132] **표적화 벡터:** 관심있는 핵산이 연관된 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하며, 특히 관심있는 핵산을 또 다른 핵산 분자, 예를 들어, 공여자 플라스미드, 비-인간 동물 게놈 등에 표적화하여 삽입하기 위한 것이다.
- [0133] 일부 실시예에서, 벡터는, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포와 같은 숙주 세포에서 벡터가 연결된 핵산의 염색체의 복제 및/또는 발현을 할 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있는 벡터를 본원에서 “**발현 벡터**” 또는 “**작제물**” 로 지칭된다.
- [0134] **야생형:** (돌연변이, 질환, 변경 등과 대조적으로) “정상” 상태에서 자연에서 발견되는 구조 및/또는 활성을 갖는 엔티티를 지칭하는, 당 기술분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 당 기술분야의 숙련자는 야생형 유전자 및 폴리펩티드가 흔히 다수의 상이한 형태(예를 들어, 대립유전자)로 존재한다는 것을 이해할 것이다.
- [0135] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 장점은 이어지는 특정한 실시예의 상세한 설명에서 명백해진다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 일부 실시예를 나타내지만, 단지 예시로서 제공될 뿐 제한하고자 함이 아닌 것으로 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내 다양한 변형예들 및 수정예들이 상세한 설명으로부터 당 기술분야의 숙련자에게 명백해질 것이다.
- [0136] **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0137] 항체-기반 치료제는 여러 질환의 치료에 상당한 가능성을 제공하지만, 난치성 표적에 결합하는 특히 효과적인 항체 제제의 개발은 여전히 도전 과제이다. 앵커-변형된 면역글로불린(Ig) 및 이를 암호화하는 변형된 Ig V 분절이 본원에 기술되며, 여기서 앵커는 동족 수용체에 결합하는 리간드(예를 들어, 비-면역글로불린 폴리펩티드)의 적어도 수용체 결합 부분을 포함한다. 변형된 Ig V 분절을 포함하는 동물은 수용체 동족체로 앵커에 대한 면역화에 반응하여 앵커-변형된 면역글로불린의 다양한 레퍼토리를 생성할 수 있다.
- [0138] 이론에 얽매이지 않고, 앵커는, 예를 들어, 동족 수용체에 특이적으로 결합하는 항체와 동족 수용체에 동시에 결합함으로써 및/또는 동족 수용체에 대한 항원 공격에 반응하여 앵커 없이는 정상적으로 확장되지 않는 항체의 친화성 성숙을 허용함으로써, 동족 수용체에 대한 항원 공격에 대한 반응으로 동물에서 새롭게 생성된 항체의 친화도를 증가시키는 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 본원에 개시된 비-인간 동물에 의해 생산된 면역글로불린의 다양한 레퍼토리는 높은 친화도로 동족 수용체에 결합하는 앵커-변형된 면역글로불린을 포함할 수 있으며, 이에 따라 이전에 난치성 표적에 대한 리드 후보물질이 발견될 수 있는 면역글로불린의 집단을 증가시킬 수 있다.
- [0139] **표적화 벡터 및 동물 게놈 등을 포함하는 핵산 분자**
- [0140] 본원에 기술된 앵커-변형된 면역글로불린은 적어도 부분적으로 가변 영역(V) 분절, 예를 들어, 면역글로불린(Ig) 중쇄 가변 영역(V<sub>H</sub>) 분절 또는 Ig 경쇄 가변 영역(V<sub>L</sub>) 분절에 의해 암호화될 수 있고, Ig 리더 서열과, 생식계열 Ig V 분절의 프레임워크(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 사이에서 및 작동가능하게 연결된 앵커를 암호화하도록 변형될 수 있다. 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열 및 생식계열 V 분절, 예를 들어, 인간 생식계열 V 분절의 핵산 서열은, 이렇게 암호화된 아미노산 서열과 마찬가지로 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Lefranc, M.-P., *Exp. Clin. Immunogenet.*, 18, 100-116 (2001)를 참조하며, 그 전문이 참조로서 본원에 통합되고, 웹사이트는 [imgt.org.kr](http://imgt.org.kr)에서 월드와이드 웹(www)에서 찾을 수 있다.
- [0141] 표적화 벡터를 포함하는 핵산 분자, 및 본원에 기술된 동물 게놈은 생식계열 V 분절의 임의의 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 변형된 Ig V 분절은 제1 생식계열 Ig V 분절의 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 앵커를 암호화하는 핵산 서열, 및 프레임워크 영역(FR) 1을 암호화하는 핵산 서열, 제2 생식계열 Ig V 분절의 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하며, 제1 생식계열 Ig V 분절 및 제2 생식계열 Ig 분절은 상이한 생식계열 Ig V 분절이다. 일부 실시예에서, 변형된 Ig V 분절은 제1 생식계열 Ig V 분절의 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 앵커를 암호화하는 핵산 서열, 및 제2 생식계열 Ig V 분절의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산을 포함하며, 여기서 제1 생식계열 Ig V 분절 및 제2 생식계열 V 분절은 동일한 생식계열 V 분절이다. 일부 실시예에서, Ig 신호 펩티드는 서열 MDWTWRFLFVVAATGVQS(서열번호 7)을 포함한다.
- [0142] 인간(h) 생식계열 V 분절(예를 들어, 인간 생식계열 가변 중쇄(hV<sub>H</sub> 또는 hIGVH) 분절, 인간 생식계열 가변 카파(hV<sub>K</sub> 또는 hIGKV) 분절, 및 인간 생식계열 가변 람다(hV<sub>L</sub> 또는 hIGLV) 분절 및 뮤린(m) 생식계열 V 분절(예를

들어, 마우스 생식계열 가변 중쇄(mV<sub>H</sub> 또는 mIGHV) 분절, 마우스 생식계열 가변 카파(mV<sub>K</sub> 또는 mIGKV) 분절, 및 마우스 생식계열 가변 람다(mV<sub>λ</sub> 또는 mIGLV) 분절의 아미노산 서열이 [imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/SequenceLogos/human/](http://imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/SequenceLogos/human/) 및 [imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/SequenceLogos/mouse/](http://imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/SequenceLogos/mouse/) 주소인 월드와이드 웹에서 확인할 수 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0143] 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화함)는 인간(h) 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체, 예를 들어, 생식계열 인간(h) V<sub>H</sub>1-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-8 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1 18 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-24 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-45 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-46 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-58 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-26 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2 70 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-7 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-9 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3 11 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3 13 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-15 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-16 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-20 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-21 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-23 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-33 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-35 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-38 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-43 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-48 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-49 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-53 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-64 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-66 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-72 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-73 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-74 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-28 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4 30-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-31 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-34 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-39 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-59 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-61 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>5-51 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>6-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-4-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-81 분절, 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절 또는 이의 변이체이다.

[0144] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자는 변형된 Ig hV<sub>H</sub> 분절만을 포함하고, 예를 들어, 임의의 추가 hV<sub>H</sub> 분절 또는 이의 변이체를 포함하지 않는다.

[0145] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자는 변형된 Ig hV<sub>H</sub> 분절 외에, 추가의 hV<sub>H</sub> 분절, 예를 들어, V<sub>H</sub>1-2, hV<sub>H</sub>1-3, hV<sub>H</sub>1-8, hV<sub>H</sub>1 18, hV<sub>H</sub>1-24, hV<sub>H</sub>1-45, hV<sub>H</sub>1-46, hV<sub>H</sub>1-58, hV<sub>H</sub>1-69, hV<sub>H</sub>2-5, hV<sub>H</sub>2-26, hV<sub>H</sub>2 70, hV<sub>H</sub>3-7, hV<sub>H</sub>3-9, hV<sub>H</sub>3 11, hV<sub>H</sub>3 13, hV<sub>H</sub>3-15, hV<sub>H</sub>3-16, hV<sub>H</sub>3-20, hV<sub>H</sub>3-21, hV<sub>H</sub>3-23, hV<sub>H</sub>3-30, hV<sub>H</sub>3-30-3, hV<sub>H</sub>3-30-5, hV<sub>H</sub>3-33, hV<sub>H</sub>3-35, hV<sub>H</sub>3-38, hV<sub>H</sub>3-43, hV<sub>H</sub>3-48, hV<sub>H</sub>3-49, hV<sub>H</sub>3-53, hV<sub>H</sub>3-64, hV<sub>H</sub>3-66, hV<sub>H</sub>3-72, hV<sub>H</sub>3-73, hV<sub>H</sub>3-74, hV<sub>H</sub>4-4, hV<sub>H</sub>4-28, hV<sub>H</sub>4-30-1, hV<sub>H</sub>4 30-2, hV<sub>H</sub>4-30-4, hV<sub>H</sub>4-31, hV<sub>H</sub>4-34, hV<sub>H</sub>4-39, hV<sub>H</sub>4-59, hV<sub>H</sub>4-61, hV<sub>H</sub>5-51, hV<sub>H</sub>6-1, hV<sub>H</sub>7-4-1, hV<sub>H</sub>7-81 및 이들의 변이체 중 하나, 이들 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 추가로 포함한다. V<sub>H</sub>1-2, hV<sub>H</sub>1-3, hV<sub>H</sub>1-8, hV<sub>H</sub>1 18, hV<sub>H</sub>1-24, hV<sub>H</sub>1-45, hV<sub>H</sub>1-46, hV<sub>H</sub>1-58, hV<sub>H</sub>1-69, hV<sub>H</sub>2-5, hV<sub>H</sub>2-26, hV<sub>H</sub>2 70, hV<sub>H</sub>3-7, hV<sub>H</sub>3-9, hV<sub>H</sub>3 11, hV<sub>H</sub>3 13, hV<sub>H</sub>3-15, hV<sub>H</sub>3-16, hV<sub>H</sub>3-20, hV<sub>H</sub>3-21, hV<sub>H</sub>3-23, hV<sub>H</sub>3-30, hV<sub>H</sub>3-30-3, hV<sub>H</sub>3-30-5, hV<sub>H</sub>3-33, hV<sub>H</sub>3-35, hV<sub>H</sub>3-38, hV<sub>H</sub>3-43, hV<sub>H</sub>3-48, hV<sub>H</sub>3-49, hV<sub>H</sub>3-53, hV<sub>H</sub>3-64, hV<sub>H</sub>3-66, hV<sub>H</sub>3-72, hV<sub>H</sub>3-73, hV<sub>H</sub>3-74, hV<sub>H</sub>4-4, hV<sub>H</sub>4-28, hV<sub>H</sub>4-30-1, hV<sub>H</sub>4 30-2, hV<sub>H</sub>4-30-4, hV<sub>H</sub>4-31, hV<sub>H</sub>4-34, hV<sub>H</sub>4-39, hV<sub>H</sub>4-59, hV<sub>H</sub>4-61, hV<sub>H</sub>5-51, hV<sub>H</sub>6-1, hV<sub>H</sub>7-4-1, 및 hV<sub>H</sub>7-81 분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서, hV<sub>H</sub> 분절은 생식계열 구성(configuration)으로 있다.

[0146] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 계통 등)는 Ig 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 앵커-변형된 V 분절에 추가하여, 추가의 재배열된(되지 않은) V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함할 수 있으며, 일부 실시예에서, 추가의 재배열된(되지 않은) hV<sub>H</sub>, hD<sub>H</sub> 및/또는 hJ<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 계통 등)는 오직 하나의 재배열된(되지 않은) hV<sub>H</sub> 분절, 하나 이상의 재배열된(되지 않은) hD<sub>H</sub> 분절, 및 하나 이상의 재배열된(되지 않은) hJ<sub>H</sub> 분절을 포함하며, 여기서 오직 하나의 재배열된(되지

않은)  $hV_H$  분절은 본원에 기술된 바와 같은 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된  $hV_H$  분절이다.

[0147] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)는 하나 이상의 인간  $D_H$  분절, 예를 들어,  $hD_{H1-1}$ ,  $hD_{H1-7}$ ,  $hD_{H1-14}$ ,  $hD_{H1-20}$ ,  $hD_{H1-26}$ ,  $hD_{H2-2}$ ,  $hD_{H2-8}$ ,  $hD_{H2-15}$ ,  $hD_{H2-21}$ ,  $hD_{H3-3}$ ,  $hD_{H3-9}$ ,  $hD_{H3-10}$ ,  $hD_{H3-16}$ ,  $hD_{H3-22}$ ,  $hD_{H4-4}$ ,  $hD_{H4-11}$ ,  $hD_{H4-17}$ ,  $hD_{H4-23}$ ,  $hD_{H5-5}$ ,  $hD_{H5-12}$ ,  $hD_{H5-18}$ ,  $hD_{H5-24}$ ,  $hD_{H6-6}$ ,  $hD_{H6-13}$ ,  $hD_{H6-19}$ ,  $hD_{H6-25}$ ,  $hD_{H7-27}$ , 및 이들의 변이체 중 하나, 하나 초과 또는 이들 각각을 포함한다.  $hD_{H1-1}$ ,  $hD_{H1-7}$ ,  $hD_{H1-14}$ ,  $hD_{H1-20}$ ,  $hD_{H1-26}$ ,  $hD_{H2-2}$ ,  $hD_{H2-8}$ ,  $hD_{H2-15}$ ,  $hD_{H2-21}$ ,  $hD_{H3-3}$ ,  $hD_{H3-9}$ ,  $hD_{H3-10}$ ,  $hD_{H3-16}$ ,  $hD_{H3-22}$ ,  $hD_{H4-4}$ ,  $hD_{H4-11}$ ,  $hD_{H4-17}$ ,  $hD_{H4-23}$ ,  $hD_{H5-5}$ ,  $hD_{H5-12}$ ,  $hD_{H5-18}$ ,  $hD_{H5-24}$ ,  $hD_{H6-6}$ ,  $hD_{H6-13}$ ,  $hD_{H6-19}$ ,  $hD_{H6-25}$ , 및  $hD_{H7-27}$  중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서,  $hD_H$  분절은 생식계열 구성으로 있다.

[0148] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)는 하나 이상의 인간  $J_H$  분절, 예를 들어,  $hJ_{H1}$ ,  $hJ_{H2}$ ,  $hJ_{H3}$ ,  $hJ_{H4}$ ,  $hJ_{H5}$ ,  $hJ_{H6}$ , 및 이들의 변이체 중 하나, 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함한다.  $hJ_{H1}$ ,  $hJ_{H2}$ ,  $hJ_{H3}$ ,  $hJ_{H4}$ ,  $hJ_{H5}$ , 및  $hJ_{H6}$ , 분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서,  $hJ_H$  분절은 생식계열 구성으로 있다.

[0149] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)는 중쇄 가변 영역 좌위를 포함할 수 있으며, 예를 들어 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 으로 하기를 포함할 수 있다: (I) 변형된  $Ig V_H$  분절, (II) 하나 또는 복수의  $Ig$  중쇄 다양성 ( $D_H$ ) 분절, 및 (III) 하나 또는 복수의 모든  $Ig$  중쇄 결합 ( $J_H$ ) 분절. 일부 실시예에서, (II)의 하나 또는 복수의  $Ig D_H$  분절은 하나, 복수의, 또는 모든 인간  $Ig D_H$  분절을 포함하고/하거나, (III)의 하나 또는 복수의  $Ig J_H$  분절은 하나, 복수의, 또는 모든 인간  $Ig J_H$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, (II)의 하나 또는 복수의  $Ig D_H$  분절 및 (III)의 하나 또는 복수의  $Ig J_H$  유전자 분절은, 재조합 핵산 분자가 변형된  $Ig V_H$  유전자 분절 및 재배열된  $Ig D_H/J_H$  서열을 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 으로 포함하도록 재조합되어 재배열된  $Ig D_H/J_H$  서열을 형성한다.

[0150] 일부 실시예에서,  $Ig V_H$  유전자 분절 및 재배열된  $Ig D_H/J_H$  서열은 재조합되어 앵커 변형된  $Ig$  중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된  $Ig V_H/D_H/J_H$  서열을 형성하며, 여기서 앵커 변형된  $Ig$  중쇄 가변 도메인은 (i)  $Ig$  신호 펩티드, (ii) 앵커, 및 (iii) 재배열된  $Ig V_H/D_H/J_H$  서열에 의해 암호화된 FR1, 상보성 결정 영역(CDR) 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 작동가능한 연결로 포함한다.

[0151] 일부 실시예에서, 변형된  $Ig V_H$  분절은 재배열되지 않은 변형된  $Ig V_H$  유전자 분절이다.

[0152] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)은  $Ig$  중쇄 불변 영역( $C_H$ )을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서  $Ig C_H$ 를 암호화하는 핵산 서열은 (I) 변형된  $Ig V_H$  분절, (II) 하나 또는 복수의  $Ig D_H$  분절, 및 (III) 하나 또는 복수의  $Ig J_H$  분절의 하류에서 작동가능하게 연결된다. 일부 실시예에서,  $Ig C_H$ 를 암호화하는 핵산 서열은  $IgM$  이소형을 암호화하는  $Ig \mu$  유전자,  $IgD$  이소형을 암호화하는  $Ig \delta$  유전자,  $IgG$  이소형을 암호화하는  $Ig \gamma$  유전자,  $IgA$  이소형을 암호화하는  $Ig \alpha$  유전자, 및/또는  $IgE$  이소형을 암호화하는  $Ig \epsilon$  유전자를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 앵커-변형된  $Ig$  중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 앵커-변형된  $Ig$  중쇄는 (i)  $Ig$  신호 펩티드, (ii) 앵커, (iii) 재배열된  $Ig V_H/D_H/J_H$  서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는  $Ig$  중쇄 가변 도메인, 및 (iv)  $Ig C_H$ 를 작동가능한 연결로 포함한다. 일부 실시예에서,  $Ig C_H$ 는 비-인간  $Ig C_H$ , 예를 들어, 설치류  $Ig C_H$ , 예를 들어, 랫트  $Ig C_H$  또는 마우스  $Ig C_H$ 이다.

[0153] 일부 실시예에서, 생식계열  $Ig V$  분절 또는 이의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig V$  분절의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 것)는 생식계열  $Ig$  경쇄 가변( $V_L$ ) 분절 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 경쇄 가변 영역 좌위를 포함할 수 있고, 예를 들어, 작동가능한 연결로 및 5' 에서 3' 로 하기를 포함할 수 있다: (I) 변형된  $Ig V_L$  분절, 및 (II) 하나 또는 복수의  $Ig$  경쇄 결

합( $J_L$ ) 분절. 일부 실시예에서, 변형된  $Ig V_L$  분절 및 하나 또는 복수의  $Ig J_L$  분절은 재조합되어 앵커 변형된  $Ig$  경쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된  $Ig V_L/J_L$  서열을 형성하며, 여기서 앵커 변형된  $Ig$  경쇄 가변 도메인은 (i)  $Ig$  신호 펩티드, (ii) 앵커, 및 (iii) 재배열된  $Ig V_L/J_L$  서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 작동가능한 연결로 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 경쇄 가변 영역 좌위 및  $Ig$  경쇄 불변 영역( $C_L$ )을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 여기서  $Ig C_L$ 을 암호화하는 핵산 서열은 다음의 하류에 있고 작동가능하게 연결된다: (I) 변형된  $Ig V_L$  분절 및 (II) 하나 또는 복수의  $Ig$  경쇄 결합( $J_L$ ) 분절. 일부 실시예에서, 앵커-변형된  $Ig$  경쇄는 (i)  $Ig$  신호 펩티드, (ii) 앵커, (iii) 재배열된  $Ig V_L/J_L$  서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는  $Ig$  경쇄 가변 도메인, 및 (iv)  $Ig C_L$ 을 작동가능한 연결로 포함한다. 일부 실시예에서,  $Ig C_L$ 은 비-인간  $Ig C_L$ , 예를 들어, 설치류  $Ig C_L$ , 예를 들어, 랫트  $Ig C_L$  또는 마우스  $Ig C_L$ 이다.

[0154] 일부 실시예에서, 생식계열  $Ig V$  분절 또는 이의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig V$  분절의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화함)는 생식계열  $Ig$  경쇄 가변 카파( $V_K$ ) 분절 또는 이의 변이체이고, 예를 들어, 인간  $V_K$  분절은, 예를 들어,  $hV_{K1-5}$  분절,  $hV_{K1-6}$  분절,  $hV_{K1-8}$  분절,  $hV_{K1D-8}$  분절,  $hV_{K1-9}$  분절,  $hV_{K1-12}$  분절,  $hV_{K1D-12}$  분절,  $hV_{K1-13}$  분절,  $hV_{K1D-13}$  분절,  $hV_{K1-16}$  분절,  $hV_{K1D-16}$  분절,  $hV_{K1-17}$  분절,  $hV_{K1D-17}$  분절,  $hV_{K1-27}$  분절,  $hV_{K1-33}$  분절,  $hV_{K1D-33}$  분절,  $hV_{K1-37}$  분절,  $hV_{K1D-37}$  분절,  $hV_{K1-39}$  분절,  $hV_{K1D-39}$ , a  $hV_{K1-NL1}$  분절,  $hV_{K1D-42}$  분절,  $hV_{K1D-43}$  분절,  $hV_{K2-4}$  분절,  $hV_{K2-18}$  분절,  $hV_{K2D-18}$  분절,  $hV_{K2-24}$  분절,  $hV_{K2D-24}$  분절,  $hV_{K2-28}$  분절,  $hV_{K2D-28}$  분절,  $hV_{K2-29}$  분절,  $hV_{K2D-29}$  분절,  $hV_{K2-30}$  분절,  $hV_{K2D-30}$  분절,  $hV_{K2-40}$  분절,  $hV_{K2D-40}$  분절,  $hV_{K2D-26}$  분절,  $hV_{K3-7}$  분절,  $hV_{K3D-7}$  분절,  $hV_{K3-11}$  분절,  $hV_{K3D-11}$  분절,  $hV_{K3-15}$  분절,  $hV_{K3D-15}$  분절,  $hV_{K3-20}$  분절,  $hV_{K3D-20}$  분절,  $hV_{K4-1}$  분절,  $hV_{K5-2}$  분절,  $hV_{K6-21}$  분절,  $hV_{K6D-21}$  분절,  $hV_{K6D-41}$  분절,  $hV_{K7-3}$  분절, 및 이들의 변이체이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 핵산 분자는, 변형된  $Ig hV_K$  분절 외에, 추가의  $hV_K$  분절, 예를 들어,  $hV_{K1D-8}$  분절,  $hV_{K1-9}$  분절,  $hV_{K1-12}$  분절,  $hV_{K1D-12}$  분절,  $hV_{K1-13}$  분절,  $hV_{K1D-13}$  분절,  $hV_{K1-16}$  분절,  $hV_{K1D-16}$  분절,  $hV_{K1-17}$  분절,  $hV_{K1D-17}$  분절,  $hV_{K1-27}$  분절,  $hV_{K1-33}$  분절,  $hV_{K1D-33}$  분절,  $hV_{K1-37}$  분절,  $hV_{K1D-37}$  분절,  $hV_{K1-39}$  분절,  $hV_{K1D-39}$ , a  $hV_{K1-NL1}$  분절,  $hV_{K1D-42}$  분절,  $hV_{K1D-43}$  분절,  $hV_{K2-4}$  분절,  $hV_{K2-18}$  분절,  $hV_{K2D-18}$  분절,  $hV_{K2-24}$  분절,  $hV_{K2D-24}$  분절,  $hV_{K2-28}$  분절,  $hV_{K2D-28}$  분절,  $hV_{K2-29}$  분절,  $hV_{K2D-29}$  분절,  $hV_{K2-30}$  분절,  $hV_{K2D-30}$  분절,  $hV_{K2-40}$  분절,  $hV_{K2D-40}$  분절,  $hV_{K2D-26}$  분절,  $hV_{K3-7}$  분절,  $hV_{K3D-7}$  분절,  $hV_{K3-11}$  분절,  $hV_{K3D-11}$  분절,  $hV_{K3-15}$  분절,  $hV_{K3D-15}$  분절,  $hV_{K3-20}$  분절,  $hV_{K3D-20}$  분절,  $hV_{K4-1}$  분절,  $hV_{K5-2}$  분절,  $hV_{K6-21}$  분절, 및  $hV_{K6D-21}$  분절 중 하나, 하나 초과, 또는 이들 각각을 추가로 포함한다.  $hV_{K1D-8}$  분절,  $hV_{K1-9}$  분절,  $hV_{K1-12}$  분절,  $hV_{K1D-12}$  분절,  $hV_{K1-13}$  분절,  $hV_{K1D-13}$  분절,  $hV_{K1-16}$  분절,  $hV_{K1D-16}$  분절,  $hV_{K1-17}$  분절,  $hV_{K1D-17}$  분절,  $hV_{K1-27}$  분절,  $hV_{K1-33}$  분절,  $hV_{K1D-33}$  분절,  $hV_{K1-37}$  분절,  $hV_{K1D-37}$  분절,  $hV_{K1-39}$  분절,  $hV_{K1D-39}$ , a  $hV_{K1-NL1}$  분절,  $hV_{K1D-42}$  분절,  $hV_{K1D-43}$  분절,  $hV_{K2-4}$  분절,  $hV_{K2-18}$  분절,  $hV_{K2D-18}$  분절,  $hV_{K2-24}$  분절,  $hV_{K2D-24}$  분절,  $hV_{K2-28}$  분절,  $hV_{K2D-28}$  분절,  $hV_{K2-29}$  분절,  $hV_{K2D-29}$  분절,  $hV_{K2-30}$  분절,  $hV_{K2D-30}$  분절,  $hV_{K2-40}$  분절,  $hV_{K2D-40}$  분절,  $hV_{K2D-26}$  분절,  $hV_{K3-7}$  분절,  $hV_{K3D-7}$  분절,  $hV_{K3-11}$  분절,  $hV_{K3D-11}$  분절,  $hV_{K3-15}$  분절,  $hV_{K3D-15}$  분절,  $hV_{K3-20}$  분절,  $hV_{K3D-20}$  분절,  $hV_{K4-1}$  분절,  $hV_{K5-2}$  분절,  $hV_{K6-21}$  분절, 및  $hV_{K6D-21}$  분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서,  $hV_K$  분절은 생식계열 구성으로 있다.

[0155] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)는  $Ig$  경쇄  $\kappa$  가변 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어 앵커-변형된  $hV_K$  분절 외에, 추가의 재배열된(되지 않은)  $J_K$  분절, 및 일부 실시예에서, 추가의 재배열된(되지 않은)  $hJ_K$  유전자 분절을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된  $Ig V_K$  분절, 및 (II) 하나 또는 복수의  $Ig$  경쇄 결합 카파  $J_K$  분절. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 게놈 등)은 하나 이상의 인간  $J_K$  분절, 예를 들어,  $hJ_{K1}$ ,  $hJ_{K2}$ ,  $hJ_{K3}$ ,  $hJ_{K4}$ ,  $hJ_{K5}$ , 및 이들의 변이체 중 하나, 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함한다.  $hJ_{K1}$ ,  $hJ_{K2}$ ,  $hJ_{K3}$ ,  $hJ_{K4}$ ,  $hJ_{K5}$  분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서,  $hJ_K$  분절은 생식계열 구성으로 있다.

[0156] 또한, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다:

(I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파 (J<sub>K</sub>) 및 Ig 경쇄 불변 카파 영역(C<sub>K</sub>)을 암호화하는 핵산 서열.

[0157] 일부 실시예에서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화함)는 생식계열 Ig 경쇄 가변 램다(V<sub>λ</sub>) 분절 또는 이의 변이체, 예를 들어, 인간 V<sub>λ</sub> 분절, 예를 들어, hV<sub>λ</sub>1-36 분절, hV<sub>λ</sub>1-40 분절, hV<sub>λ</sub>1-41 분절, hV<sub>λ</sub>1-44 분절, hV<sub>λ</sub>1-47 분절, hV<sub>λ</sub>1-50 분절, hV<sub>λ</sub>1-51 분절, hV<sub>λ</sub>1-62 분절, hV<sub>λ</sub>2-5 분절, hV<sub>λ</sub>2-8 분절, hV<sub>λ</sub>2-11 분절, hV<sub>λ</sub>2-14 분절, hV<sub>λ</sub>2-18 분절, hV<sub>λ</sub>2-23 분절, hV<sub>λ</sub>2-33 분절, hV<sub>λ</sub>2-34 분절, hV<sub>λ</sub>3-1 분절, hV<sub>λ</sub>3-9 분절, hV<sub>λ</sub>3-10 분절, hV<sub>λ</sub>3-12 분절, hV<sub>λ</sub>3-13 분절, hV<sub>λ</sub>3-16 분절, hV<sub>λ</sub>3-19 분절, hV<sub>λ</sub>3-21 분절, hV<sub>λ</sub>3-22 분절, hV<sub>λ</sub>3-25 분절, hV<sub>λ</sub>3-27 분절, hV<sub>λ</sub>3-31 분절, hV<sub>λ</sub>3-32 분절, hV<sub>λ</sub>4-3 분절, hV<sub>λ</sub>4-60 분절, hV<sub>λ</sub>4-69 분절, hV<sub>λ</sub>5-37 분절, hV<sub>λ</sub>5-39 분절, hV<sub>λ</sub>5-45 분절, hV<sub>λ</sub>5-48 분절, hV<sub>λ</sub>5-52 분절, hV<sub>λ</sub>6-57 분절, hV<sub>λ</sub>7-43 분절, hV<sub>λ</sub>7-46 분절, hV<sub>λ</sub>8-61 분절, hV<sub>λ</sub>9-49 분절, hV<sub>λ</sub>10-54 분절, hV<sub>λ</sub>11-55 분절, 및 이들의 변이체이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자는 변형된 Ig hV<sub>λ</sub> 분절 외에, 추가의 hV<sub>λ</sub> 분절, 예를 들어, hV<sub>λ</sub>1-36 분절, hV<sub>λ</sub>1-40 분절, hV<sub>λ</sub>1-41 분절, hV<sub>λ</sub>1-44 분절, hV<sub>λ</sub>1-47 분절, hV<sub>λ</sub>1-50 분절, hV<sub>λ</sub>1-51 분절, hV<sub>λ</sub>1-62 분절, hV<sub>λ</sub>2-5 분절, hV<sub>λ</sub>2-8 분절, hV<sub>λ</sub>2-11 분절, hV<sub>λ</sub>2-14 분절, hV<sub>λ</sub>2-18 분절, hV<sub>λ</sub>2-23 분절, hV<sub>λ</sub>2-33 분절, hV<sub>λ</sub>2-34 분절, hV<sub>λ</sub>3-1 분절, hV<sub>λ</sub>3-9 분절, hV<sub>λ</sub>3-10 분절, hV<sub>λ</sub>3-12 분절, hV<sub>λ</sub>3-13 분절, hV<sub>λ</sub>3-16 분절, hV<sub>λ</sub>3-19 분절, hV<sub>λ</sub>3-21 분절, hV<sub>λ</sub>3-22 분절, hV<sub>λ</sub>3-25 분절, hV<sub>λ</sub>3-27 분절, hV<sub>λ</sub>3-31 분절, hV<sub>λ</sub>3-32 분절, hV<sub>λ</sub>4-3 분절, hV<sub>λ</sub>4-60 분절, hV<sub>λ</sub>4-69 분절, hV<sub>λ</sub>5-37 분절, hV<sub>λ</sub>5-39 분절, hV<sub>λ</sub>5-45 분절, hV<sub>λ</sub>5-48 분절, hV<sub>λ</sub>5-52 분절, hV<sub>λ</sub>6-57 분절, hV<sub>λ</sub>7-43 분절, hV<sub>λ</sub>7-46 분절, hV<sub>λ</sub>8-61 분절, hV<sub>λ</sub>9-49 분절, hV<sub>λ</sub>10-54 분절, 및 hV<sub>λ</sub>11-55 분절 중 하나, 하나 초과, 또는 이들 각각을 추가로 포함한다. hV<sub>λ</sub>1-36 분절, hV<sub>λ</sub>1-40 분절, hV<sub>λ</sub>1-41 분절, hV<sub>λ</sub>1-44 분절, hV<sub>λ</sub>1-47 분절, hV<sub>λ</sub>1-50 분절, hV<sub>λ</sub>1-51 분절, hV<sub>λ</sub>1-62 분절, hV<sub>λ</sub>2-5 분절, hV<sub>λ</sub>2-8 분절, hV<sub>λ</sub>2-11 분절, hV<sub>λ</sub>2-14 분절, hV<sub>λ</sub>2-18 분절, hV<sub>λ</sub>2-23 분절, hV<sub>λ</sub>2-33 분절, hV<sub>λ</sub>2-34 분절, hV<sub>λ</sub>3-1 분절, hV<sub>λ</sub>3-9 분절, hV<sub>λ</sub>3-10 분절, hV<sub>λ</sub>3-12 분절, hV<sub>λ</sub>3-13 분절, hV<sub>λ</sub>3-16 분절, hV<sub>λ</sub>3-19 분절, hV<sub>λ</sub>3-21 분절, hV<sub>λ</sub>3-22 분절, hV<sub>λ</sub>3-25 분절, hV<sub>λ</sub>3-27 분절, hV<sub>λ</sub>3-31 분절, hV<sub>λ</sub>3-32 분절, hV<sub>λ</sub>4-3 분절, hV<sub>λ</sub>4-60 분절, hV<sub>λ</sub>4-69 분절, hV<sub>λ</sub>5-37 분절, hV<sub>λ</sub>5-39 분절, hV<sub>λ</sub>5-45 분절, hV<sub>λ</sub>5-48 분절, hV<sub>λ</sub>5-52 분절, hV<sub>λ</sub>6-57 분절, hV<sub>λ</sub>7-43 분절, hV<sub>λ</sub>7-46 분절, hV<sub>λ</sub>8-61 분절, hV<sub>λ</sub>9-49 분절, hV<sub>λ</sub>10-54 분절, hV<sub>λ</sub>11-55 분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서, hV<sub>λ</sub> 분절은 생식계열 구성으로 있다.

[0158] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 계통 등)는 Ig 경쇄 λ 가변 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 앵커-변형된 hV<sub>λ</sub> 분절 외에, 추가의 재배열된(되지 않은) J<sub>λ</sub> 분절, 및 일부 실시예에서, 추가의 재배열된(되지 않은) hJ<sub>λ</sub> 유전자 분절을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, 및 (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파 J<sub>λ</sub> 분절. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자(예를 들어, 표적화 벡터, 비-인간 동물 계통 등)는 하나 이상의 인간 J<sub>λ</sub> 분절, 예를 들어, hJ<sub>λ</sub>1, hJ<sub>λ</sub>2, hJ<sub>λ</sub>3, hJ<sub>λ</sub>4, hJ<sub>λ</sub>5, hJ<sub>λ</sub>6, hJ<sub>λ</sub>7 분절 및 이들의 변이체 중 하나, 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함한다. hJ<sub>λ</sub>1, hJ<sub>λ</sub>2, hJ<sub>λ</sub>3, hJ<sub>λ</sub>4, hJ<sub>λ</sub>5, hJ<sub>λ</sub>6, hJ<sub>λ</sub>7 분절 중 하나 초과, 또는 이들 각각을 포함하는 일부 실시예에서, hJ<sub>λ</sub> 분절은 생식계열 구성으로 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로 하기를 포함한다: (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 램다 (J<sub>λ</sub>) 분절, 및 Ig 경쇄 불변 램다 영역(C<sub>λ</sub>)을 암호화하는 핵산 서열.

[0159] 앵커

[0160] 본원에 기술된 바와 같이, 앵커는 동족 수용체에 결합하는 리간드(또는 이의 일부분)를 포함한다. 일부 실시예에서, 리간드는 비-면역글로불린 폴리펩티드일 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같이, 앵커는 비-면역글로불린 폴리펩티드, 예를 들어, 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 앵커 변형은 난치성 수용체에 대한 항원-결합 단백질, 예를 들어, 항체의 친화도를 증가시키는 데 유용할 수 있다.

[0161] 예시적인 및 잘 알려진 비-면역글로불린 폴리펩티드:동족 수용체 쌍은, 예를 들어, 동족 G-단백질 결합 수용체(GPCR)에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 GPCR은 케모카인 수용체, 글루카곤 수용체(예를 들어, GLP1:GLPIR), 칼시토닌 수용체, 멜라노코틴 수용체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드를 포함하는 이들 및 다른 동족 GPCR은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Wu 등의 (2017) *J. Mol. Biol.* 429:2726-45를 참조하고, 이들 각각은 그 전

체가 참조로서 본원에 통합된다. 추가의 비제한적이고 예시적인 비-면역글로불린 폴리펩티드(리간드):동족 수용체 쌍은 하기를 포함한다:

- [0162] a. 동족 수용체 티로신 키나제에 결합하는 리간드, 예를 들어, 표피 성장 인자(EGF), 인슐린, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF) 등과 같은 리간드, 그러나 이에 한정되지 않음.
- [0163] b. DLL:노치 수용체 쌍,
- [0164] c. B7:CD28/CLTA4/PD1 수용체 쌍,
- [0165] d. 세마포린:플렉신 수용체 쌍,
- [0166] e. PCSK9/LDLR 쌍,
- [0167] f. HLA:LILR 쌍,
- [0168] g. HLA:KIR 쌍,
- [0169] h. RGD-리간드:인테그린 쌍,
- [0170] i. 나트륨이노 펩티드(예를 들어, ANP, BNP, CNP 등): 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR, NPR3 등) 쌍 등.
- [0171] 리간드:수용체 쌍은 프로테아제 및 억제제를 포함할 수 있다.
- [0172] 일부 실시예에서, 앵커는 나트륨이노 펩티드(NP), 예를 들어 NP의 수용체 결합 부분을 포함한다. NP는 3개의 상이한 프로호르몬인 심방 나트륨이노 펩티드(ANP) 프로호르몬, B형 나트륨이노 펩티드(BNP) 프로호르몬, 및 C형 나트륨이노 펩티드(CNP) 프로호르몬으로서 저장된 적어도 8개의 구조적으로 관련된 아미노산 펩티드를 포함한다. D형 나트륨이노 펩티드(DNP)인 덴드로아스피스 나트륨이노 펩티드가 최근에 발견되었으며, 인간에서 이의 역할은 여전히 명확하지 않다.
- [0173] ANP 프로호르몬(proANP)은 주로 심근세포에 의해 발현되고 혈압 저하 특성, 나트륨이노 특성, 이뇨제 특성, 및/또는 칼리우레틱 특성을 갖는 여러 펩티드를 생성하는 126개 아미노산 폴리펩티드이다. ANP 프로호르몬으로부터 유래된 이들 펩티드는 ANP 프로호르몬의 N-말단 단부에서 시작하는 아미노산 서열에 의해 식별된다: 예를 들어, proANP 1-30은 지속성 NP를 포함하고, proANP 31-67은 혈관 확장을 포함하고, proANP 79-98은 칼리우레틱 펩티드를 포함하고, 특히, 아미노산 99-126(ANP로도 지칭됨)에 의해 식별된다. 신장 내에서, proANP는 상이하게 처리되어, N-말단에 4개의 아미노산, 예를 들어, proANP 95-126(우로딜라틴으로도 지칭됨)이 추가된다.
- [0174] BNP 프로호르몬(proBNP)은 주로 심근세포에 의해서도 발현되는 108-아미노산 폴리펩티드이다. BNP 프로호르몬은 인간 심장 내에서 처리되어 BNP(예를 들어, 이의 108개 아미노산 프로호르몬의 아미노산 77-108) 및 NT-proBNP(예를 들어, 아미노산 1-76)를 형성하고, 이들 모두는 인간에서 순환한다. BNP는 심실 확장의 신뢰할 수 있는 바이오마커이다. Pandit 등의(2011) *Ind. J. Endocrinol. Metab.* 15(4) S345-53, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다.
- [0175] ANP 및 BNP와 달리, CNP는 주로 내피 및 신장 상피 세포에 의해 발현된다. 2개의 CNP 분자가 순환에서 식별되었다. 또한, CNP는 나트륨 이노 기능이 결여된 것으로 보이지만, CNP는 측분비 또는 자가분비 방식으로 혈관 긴장도 및 성장의 조절자 역할을 할 가능성이 높으며, CNP가 골 성장에서 역할을 할 수 있다는 일부 표시가 존재한다.
- [0176] NP는 세포-표면 수용체에 대한 특이적 결합에 의해 이들의 생물학적 기능을 발휘한다. 포유류 조직에서 3개의 특이적 수용체가 식별되었다: 2개의 구아닐릴 시클라아제-결합된 수용체(각각, NP 수용체(NPR)-A 및 NPR-B로도 지칭되는 GC-A 및 GC-B). NPR-A 및 NPR-B는 cGMP-의존적 신호전달 캐스케이드의 활성화를 통해 작용한다. 대조적으로, 제3 유형 C 수용체(NPR-C로도 지칭됨)는 구아닐릴 시클라아제에 결합되지 않으며, NP의 제거에 주로 관여하는 것으로 보인다. 3개의 수용체 모두는 상이한 친화도로 ANP, BNP, 및 CNP에 결합한다. GC-A에 대한 리간드 선택도의 순위 순서는 ANP ≥ BNP ≫ CNP이고, GC-B에 대한 리간드 선택도는 CNP ≫ ANP ≥ BNP이고, NPR-C에 대한 리간드 선택도는 ANP > CNP > BNP이다. Jaubert 등의 (1999) *PNAS* 96(18) 10278-283, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다.
- [0177] NP 수용체는 고혈압 및 심혈관 질환의 치료에 유용한 표적일 수 있다. 그러나, ANP 및 BNP는 중요한 이뇨제, 나트륨 이노 및 저혈압 특성을 갖지만, CNP는 골 성장에 역할을 할 수 있다. 이와 같이, NP 수용체의 임의의 항체

-기반 표적화는 NP에 대한 수용체의 차등 결합 친화도를 유념해야 한다.

- [0178] 일부 실시예에서, 앵커는 서열 ANP 또는 이의 일부를 포함한다. 인간 ANP를 암호화하는 핵산 서열은 본원에서 NCBI 수탁번호 NM\_006172.4 및 서열번호 1로서 제시된다. 인간 ANP의 아미노산 서열은 본원에서 NCBI 수탁번호 NP\_006163 및 서열번호 2로서 제시된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 앵커는 ANP의 수용체 결합 부분, 예를 들어, ANP의 C-말단 꼬리를 포함한다. 일부 실시예에서, ANP의 수용체 결합 부분은 아미노산 서열 NSFRY(서열번호 3)를 포함한다.
- [0179] 링커
- [0180] 일부 실시예에서, 앵커는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3에 연결하는 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 적어도 하나의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 2개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 3개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 4개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어, 링커는 서열 GLSG(서열번호 13)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 5개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어, 링커는 서열 GGGGS(서열번호 5)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 6개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어, 링커는 서열 GLSGSG(서열번호 14)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 7개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 서열 GLSGLSGS(서열번호 15)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 9개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 10개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어, 링커는 GLSGLSGLSG(서열번호 16) 또는 GLSGGSGLSG(서열번호 17)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 10개 초과인 아미노산 길이이다.
- [0181] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재조합 핵산 분자는 서열번호 8 또는 이의 퇴화 변이체, 또는 서열번호 10 또는 이의 퇴화 변이체로서 제시된 서열을 포함한다.
- [0182] 표적화 벡터
- [0183] 본원에서 제공된 유전적으로 변형된 비-인간 동물, 세포, 조직 또는 배아를 제조하는 방법에 사용될 표적화 벡터가 추가로 제공된다.
- [0184] 일 실시예에서, 관심있는 좌위, 예를 들어, Ig 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 좌위와 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동 암이 측면에 위치한, 삽입 핵산, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터가 제공된다. 표적화 벡터 및 표적화 벡터의 성분(즉, 삽입 핵산, 관심있는 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 등)의 예는 이하에서 본원에서 상세히 기술된다.
- [0185] 상동 암 및 표적 부위(즉, 동족 게놈 영역)는 상동성 재조합 반응을 위한 기질로서 작용하기 위해 2개의 영역이 서로에 대해 충분한 수준의 서열 동일성을 공유할 때 서로 "상보성(complement)"이거나 "상보적(complementary)"이다. 용어 "상동성(homology)"은 상응하는 또는 "상보적인" 서열과 동일하거나 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 의미한다. 주어진 표적 부위와 표적화 벡터에서 발견되는 상응하는 상동성 암간의 서열 동일성은 상동성 재조합이 발생할 수 있게 하는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 예를 들어, 표적화 벡터(또는 이의 단편)의 상동성 암 및 표적 부위(또는 이의 단편)에 의해 공유되는 서열 동일성의 양은, 서열이 상동성 재조합을 거치도록 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성일 수 있다. 또한, 상동성 암과 상보적인 표적 부위 사이의 상보적인 상동성 영역은 절단된 인식 부위에서 상동성 재조합을 촉진하기에 충분한 임의의 길이일 수 있다. 예를 들어, 주어진 상동성 암 및/또는 상보적인 표적 부위는 적어도 5 내지 10kb, 5 내지 15kb, 10 내지 20kb, 20 내지 30kb, 30 내지 40kb, 40 내지 50kb, 50 내지 60kb, 60 내지 70kb, 70 내지 80kb, 80 내지 90kb, 90 내지 100kb, 100 내지 110kb, 110 내지 120kb, 120 내지 130kb, 130 내지 140kb, 140 내지 150kb, 150 내지 160kb, 160 내지 170kb, 170 내지 180kb, 180 내지 190kb, 190 내지 200kb, 200kb 내지 300kb 이상의 길이(예를 들어 본원의 다른 곳에서 기술된 벡터에서 기술된 바와 같음)인 상동성의 상보적인 영역을 포함할 수 있어서 상동성 암은 세포 게놈 내의 상응하는 표적 부위와 상동성 재조합을 수행하기에 충분한 상동성을 갖는다. 용이한 참조를 위해, 상동성 암은 본원에서 5' 및 3' 상동성 암으로서 지칭된다. 이러한 용어는 표적화 벡터 내에서 삽입 핵산에 대한 상동성 암의 상대 위치에 관한 것이다.
- [0186] 따라서, 표적화 벡터의 상동성 암은 표적화된 좌위를 갖는 표적 부위에 상보적이 되도록 설계된다. 따라서, 상동성 암은 세포에 대해 천연인 좌위에 상보적일 수 있거나, 대안적으로 이들은 세포의 게놈에 통합된 DNA의 이종 또는 외인성 분절의 영역에 상보적일 수 있으며, 이는 게놈 DNA의 이식 유전자, 발현 카세트, 또는 이종 또

는 외인성 영역을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 대안적으로, 표적화 벡터의 상동성 암은 인간 인공 염색체의 영역 또는 적절한 숙주 세포에 함유된 임의의 다른 조작된 게놈 영역에 상보적일 수 있다. 또한, 표적화 벡터의 상동성 암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 파지 라이브러리의 영역에 상응하거나 이로부터 유래될 수 있다. 따라서, 특정 실시예에서, 표적화 벡터의 상동성 암은 주어진 세포에 대해 천연, 이중 또는 외인성인 진핵, 비-인간, 포유류, 비-인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스 또는 랫트 게놈 좌위에 상보적이다. 일부 실시예에서, 상동성 암은 합성 DNA로부터 유래된다.

[0187] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>H</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig D<sub>H</sub> 및/또는 Ig J<sub>H</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절 또는 모든 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 제외한 모든 것을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다.

[0188] 일부 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig D<sub>H</sub> 분절, Ig J<sub>H</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>H</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 설치류 또는 설치류 세포(예를 들어, 설치류 배아 줄기 세포)의 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 유전자 분절, 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간 C<sub>H</sub> 유전자를 치환한다.

[0189] 일부 실시예에서, 5' 상동성 암은 서열번호 12로서 제시된 서열을 포함하고/하거나 3' 상동성 암은 서열번호 13으로서 제시된 서열을 포함한다.

[0190] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>L</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 Ig J<sub>L</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시,

표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다.

[0191] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 표적화 벡터는 본원에 기술된 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 Ig J<sub>L</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>L</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절, 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 유전자 분절, 및 비-인간 C<sub>L</sub> 유전자를 치환한다.

[0192] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>κ</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>κ</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>κ</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 κ 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>κ</sub> 및/또는 J<sub>κ</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 κ 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다.

[0193] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위가 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 κ 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>κ</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>κ</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>κ</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절, 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 유전자 분절, 및 비-인간 C<sub>κ</sub> 유전자를 치환한다.

[0194] 일부 표적화 벡터 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>λ</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig J<sub>λ</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 λ 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>λ</sub> 및/또는 J<sub>λ</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위에서 비-인간 V<sub>λ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>λ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>λ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>λ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>λ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위는 Ig 경쇄 λ 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 λ 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자를 포함한다.

[0195] 일부 실시예에서, 표적화 벡터는 본원에 기술된 재조합 핵산 분자, 및 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위

사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V $\lambda$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J $\lambda$  분절 및/또는 Ig C $\lambda$  유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 V $\lambda$  분절, 모든 비-인간 J $\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간 C $\lambda$  유전자를 치환한다.

[0196] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터는 부위-특이적 재조합 표적 서열이 측면에 위치한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 표적화 벡터 내의 임의의 영역 또는 개별적인 관심있는 폴리뉴클레오티드가 또한 이러한 부위에 의해 측면에 위치할 수 있음을 인식한다. 부위-특이적 재조합효소는, 재조합효소 폴리펩티드를 세포 내로 도입하는 것 또는 부위-특이적 재조합효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하여, 임의의 수단에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 부위-특이적 재조합효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표적화 벡터 내에 또는 별도의 폴리뉴클레오티드 내에 위치할 수 있다. 부위-특이적 재조합효소는, 예를 들어 유도성 프로모터, 세포에 내인성인 프로모터, 세포에 이종인 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 발달 단계-특이적 프로모터를 포함하는, 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 표적화 벡터에서 뉴클레오티드 서열 또는 임의의 관심있는 폴리뉴클레오티드의 측면에 위치할 수 있는 부위-특이적 재조합 표적 서열은 *loxP*, *lox511*, *lox2272*, *lox66*, *lox71*, *loxM2*, *lox5171*, *FRT*, *FRT11*, *FRT71*, *attP*, *att*, *FRT*, *rox*, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0197] 일부 실시예에서, 부위-특이적 재조합 부위는 표적화 벡터 내의 선별 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 측면에 위치한다. 이러한 경우에, 표적화된 좌위에서 표적화 벡터의 통합 후, 부위-특이적 재조합 부위 사이의 뉴클레오티드 서열이 제거될 수 있다.

[0198] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터는 선별 카세트에 함유될 수 있는 선별 마커를 포함한다. 이러한 선별 마커는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(neo<sup>r</sup>), 히그로마이신 B 포스포트랜스퍼라아제(hyg<sup>r</sup>), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스퍼라아제(puro<sup>r</sup>), 블라스티딘 S 디아미나아제(bsr<sup>r</sup>), 크산틴/구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(gpt), 또는 헤르페스 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSV-k)를 포함하지만 이에 제한되는 않는다. 일 실시예에서, 선별 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일 실시예에서, 선별 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 부위-특이적 재조합 표적 서열이 측면에 위치한다.

[0199] 비-인간 동물 계놈

[0200] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자 및/또는 표적화 벡터를 포함하는 비-인간 동물 계놈이 본원에 기술된다. 일부 비-인간 동물 계놈 실시예에서, 비-인간 동물 계놈은 비-인간 동물 계놈의 내인성 Ig 좌위에서 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자를 포함하고, 예를 들어, 비-인간 동물 계놈은 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터를 포함하며, 여기서 표적화 벡터는 내인성 Ig 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함한다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 계놈은 설치류 계놈이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 계놈은 랫트 계놈이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 계놈은 마우스 계놈이다.

[0201] 비-인간 동물 계놈 실시예에서, 계놈은 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>H</sub>의 상류에서 이에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig D<sub>H</sub> 및/또는 Ig J<sub>H</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절 또는 모든 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 제외한 모든 것을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된다.

- [0202] 일부 실시예에서, 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig D<sub>H</sub> 분절, Ig J<sub>H</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>H</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 설치류 또는 설치류 세포(예를 들어, 설치류 배아 줄기 세포)에서의 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>의 결실, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 유전자 분절, 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간 C<sub>H</sub> 유전자를 치환한다.
- [0203] 비-인간 동물 게놈 실시예에서, 게놈은 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>L</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>L</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>L</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0204] 비-인간 동물 게놈 실시예에서, Ig 경쇄 좌위는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>L</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>L</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절, 모든 비-인간 J<sub>L</sub> 유전자 분절, 및 비-인간 C<sub>L</sub> 유전자를 치환한다.
- [0205] 비-인간 동물 게놈 실시예에서, 게놈은 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>κ</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>κ</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>κ</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위를 포함하며, 선택적으로 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 κ 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>κ</sub> 및/또는 J<sub>κ</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 모든 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 κ 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자.
- [0206] 일부 실시예에서, Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 κ 조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>κ</sub> 분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig J<sub>κ</sub> 분절 및/또는 Ig C<sub>κ</sub> 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)로서, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 κ 좌위에서 비-인간 V<sub>κ</sub> 분절, 모든 비-인간 J<sub>κ</sub> 유전자 분절, 및 비-인간 C<sub>κ</sub> 유전자를 치환한다.
- [0207] 비-인간 동물 게놈 실시예에서, 게놈은 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>λ</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, 및 선택적으로 Ig J<sub>λ</sub> 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 λ 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>λ</sub> 및/또는 J<sub>λ</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 λ 좌위에서 비-인간 V<sub>λ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>λ</sub> 분절 및 모든 비-인간 J<sub>λ</sub> 분절을 치환한다. 일부 실시예

서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 모든 비-인간  $V\lambda$  분절 및 모든 비-인간  $J\lambda$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자.

[0208] 일부 비-인간 동물 계능 실시예에서, 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V\lambda$  분절, 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J\lambda$  분절 및/또는 Ig  $C\lambda$  유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V\lambda$  분절, 모든 비-인간  $J\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간  $C\lambda$  유전자를 치환한다.

[0209] **비-인간 동물 세포, 비-인간 동물, 및 이를 제조하는 방법**

[0210] 비-인간 동물 및 비-인간 동물 세포

[0211] 앵커-변형된 면역글로불린을 발현하는 비-인간 동물 및 비-인간 동물 세포가 제공되며, 예를 들어, 이는 Ig 리더 서열과, 및 생식계열  $V$  분절의 프레임워크(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 서열 사이에서 이와 작동가능한 연결로 앵커를 암호화하도록 변형된, 변형된 Ig  $V$  분절, 예를 들어, Ig 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 분절 또는 Ig 경쇄 가변 영역( $V_L$ ) 분절을 포함하는 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자를 포함하도록 변형된 좌위로부터 유래된다. 따라서, 본원에 기술된 비-인간 동물, 배아, 재조합 핵산 분자를 포함하는 세포, 표적화 작제물, 및/또는 동물 계능이 제공된다.

[0212] 일부 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포 실시예에서, 비-인간 동물 또는 세포는 동물의 계능 내에 무작위로 위치한 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자(Ig 리더 서열과, 생식계열  $V$  분절의 프레임워크(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 서열 사이에서 작동가능한 연결로 앵커를 암호화하도록 변형된, 변형된 Ig  $V$  분절, 예를 들어, Ig 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 분절 또는 Ig 경쇄 가변 영역( $V_L$ ) 분절을 포함함)를 포함한다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 비-인간 동물의 내인성 Ig 좌위에서 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자(Ig 리더 서열과, 생식계열  $V$  분절의 프레임워크(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 서열 사이에서 작동가능한 연결로 앵커를 암호화하도록 변형된, 변형된 Ig  $V$  분절, 예를 들어, Ig 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 분절 또는 Ig 경쇄 가변 영역( $V_L$ ) 분절을 포함함)를 포함하며, 예를 들어, 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터를 포함하고, 여기서 표적화 벡터는 내인성 Ig 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 포함한다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 설치류다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 세포는 설치류 세포이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 랫트이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 세포는 랫트 세포이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 마우스이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물 세포는 마우스 세포이다.

[0213] 실시예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $C_H$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_H$  분절, 및 선택적으로 Ig  $D_H$  및/또는 Ig  $J_H$  분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_H$ ,  $D_H$ , 및/또는  $J_H$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간  $V_H$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_H$  분절, 모든 비-인간  $D_H$  분절, 및 모든 비-인간  $J_H$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간  $V_H$  분절 또는 모든 비-인간  $V_H$  분절, 모든 비-인간  $D_H$  분절, 및 모든 비-인간  $J_H$  분절을 제외한 모든 것을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0214] 일부 실시예에서, 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_H$  분절, 및 선택적으로 Ig  $D_H$  분절, Ig  $J_H$  분절 및/또는 Ig  $C_H$  유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 설치류 또는 설치류 세포(예를 들어, 설치류 배아 줄기 세포)에서의 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_H$ ,  $D_H$ 의 결실, 및/또는  $J_H$  유전자 분절, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의

비-인간  $V_H$  분절, 모든 비-인간  $D_H$  유전자 분절, 모든 비-인간  $J_H$  유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간  $C_H$  유전자를 치환한다.

[0215] 일부 실시예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $C_L$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_L$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J_L$  분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_L$  및/또는  $J_L$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간  $V_L$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_L$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_H$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0216] 일부 실시예에서, 상기 Ig 경쇄 좌위는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_L$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J_L$  분절 및/또는 Ig  $C_L$  유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_L$  및/또는  $J_L$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하고, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간  $V_L$  분절, 모든 비-인간  $J_L$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_L$  유전자를 치환한다.

[0217] 일부 실시예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig  $C_{\kappa}$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_{\kappa}$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J_{\kappa}$  분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위를 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_{\kappa}$  및/또는  $J_{\kappa}$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_{\kappa}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_{\kappa}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 모든 비-인간  $V_{\kappa}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자.

[0218] 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자(변형된 Ig  $V_{\kappa}$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J_{\kappa}$  분절(s) 및/또는 Ig  $C_{\kappa}$  유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자)는 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능하게 연결되어 있으며, 선택적으로 여기서 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_{\kappa}$  분절, 모든 비-인간  $J_{\kappa}$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_{\kappa}$  유전자를 치환한다.

[0219] 일부 실시예에서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $C_{\lambda}$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_{\lambda}$  분절, 및 선택적으로 Ig  $J_{\lambda}$  분절을 포함하는 재조합 핵산 분자)를 포함하는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_{\lambda}$  및/또는  $J_{\lambda}$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간  $V_{\lambda}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_{\lambda}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\lambda}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 모든 비-인간  $V_{\lambda}$  분절 및 모든 비-인간  $J_{\lambda}$  분절을 치환한다. 일부 실시예에서, Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능하게 연결된 재조합 핵산 분자.

[0220] 일부 실시예에서, 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자(예를 들어, 변형된 Ig  $V_{\lambda}$  분절, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같은 Ig  $J_{\lambda}$  분절

및/또는 Ig C $\lambda$  유전자)를 포함한다. 일부 실시예에서, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 V $\lambda$  분절, 모든 비-인간 J $\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간 C $\lambda$  유전자를 치환한다.

[0221]

*비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포를 만드는 방법*

[0222]

또한, *시험관 내* 비-인간 세포, 비-인간 배아, 및/또는 비-인간 동물을 제조하기 위해 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자, 예를 들어 표적화 벡터를 사용하는 방법이 기술된다. 일부 실시예에서, 단리된 세포를 변형시키는 *시험관 내* 방법은, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터와 세포를 접촉시킴으로써, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 핵산 분자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 세포는 숙주 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 배아 줄기(ES) 세포이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 세포 또는 본원에 기술된 방법에 따라 만들어진 세포는 설치류 세포이고, 예를 들어, 설치류 세포는 랫트 세포 또는 마우스 세포이다.

[0223]

또한, 앵커-변형된 항원-결합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자, 비-인간 세포, 및/또는 비-인간 동물을 사용하는 방법이 기술된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같은 배아 줄기 세포를 포함할 수 있고/있거나 배아 줄기 세포로부터 개발(예를 들어, 생성)될 수 있는 비-인간 동물 배아 및 비-인간 동물이 기술된다. 이러한 배아 또는 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 ES 세포를 배아에 이식하는 단계 및/또는 ES 세포를 포함하는 배아를 적절한 숙주에 이식하는 단계 및 ES 세포 또는 배아를 생존가능한 자손으로 개발하는 동안 적절한 조건 하에서 숙주를 유지하는 단계를 포함하는 방법에 의해 개발될 수 있다.

[0224]

본원에 기술된 바와 같이, 표적화 벡터는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 가변 영역을 갖는 Ig 좌위를 표적화하는 데 사용될 수 있다. 인간 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 좌위는 당 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제5,633,425호; 제5,770,429호; 제5,814,318호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6,150,584호; 제6,998,514호; 제7,795,494호; 제7,910,798호; 제8,232,449호; 제8,502,018호; 제8,697,940호; 제8,703,485호; 제8,754,287호; 제8,791,323호; 제8,809,051호; 제8,907,157호; 제9,035,128호; 제9,145,588호; 제9,206,263호; 제9,447,177호; 제9,551,124호; 제9,580,491호 및 제9,475,559호(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 뿐만 아니라 미국 특허 공개 제20100146647호, 제20110195454호, 제20130167256호, 제20130219535호, 제20130326647호, 제20130096287호 및 제2015/0113668호(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 및 PCT 공개 번호 W02007117410, W02008151081, W02009157771, W02010039900, W02011004192, W02011123708 및 W02014093908(이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에서 확인할 수 있다.

[0225]

일부 실시예에서, 본원에 개시된 바와 같은 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절을 포함하는 외인성 완전한 인간 면역글로불린 이식유전자를 포함하며, 이는 마우스의 전구체 B 세포에서 재배열할 수 있다(Alt 등, 1985, Immunoglobulin genes in transgenic mice, Trends Genet 1:231-236; 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 이들 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절을 포함하는 완전한 인간 면역글로불린 이식유전자는 (무작위로) 삽입될 수 있고, 내인성 면역글로불린 유전자는 또한 녹아아웃될 수도 있고 (Green 등, 1994, Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs, Nat Genet 7:13-21; Lonberg 등, 1994, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, Nature 368:856-859; Jakobovits 등, 2007, From Xenomouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice, Nat Biotechnol 25:1134-1143; 이들 간행물 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨), 예를 들어, 여기서 내인성 면역글로불린 중쇄 및  $\kappa$  경쇄 좌위는, 예를 들어, 각 내인성 좌위의 작지만 중요한 부분의 표적화 결실에 이어 무작위로 통합된 큰 이식유전자 또는 소염색체로서 인간 면역글로불린 좌위를 도입함으로써 불활성화된다 (Tomizuka 등, 2000, Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, PNAS USA 97:722-727; 그 전체는 참조로서 통합됨).

[0226]

일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절을 포함하는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위에 각각 위치한다. 또한, 인간 V $H$  유전자 분절과 단일 내인성 V $H$  유전자 분절의 치환조차도 인간화된 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 면역-반응을 생성할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, Tien 등 (2016) Cell 166:1471-84를 참조하며; 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

- [0227] 자손을 생성하는 마우스의 능력을 유지하면서 마우스 생식계열 면역글로불린 가변 좌위를 인간 생식계열 면역글로불린 가변 유전자 좌위와 대규모로 *제자리에서(in situ)* 유전자 치환하는 방법이 이전에 기술된 적이 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,596,541호 및 제8,697,940호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 구체적으로, 마우스 불변 영역은 온전하게 남기면서 마우스 중쇄 및  $\kappa$  경쇄 면역글로불린 가변 유전자 좌위 둘 다의 6메가염기를 이의 인간 상대와 정밀하게 치환하는 것이 기술되어 있다. 그 결과, 마우스 불변 영역은 유지하면서, 동등한 인간 생식계열 면역글로불린 가변 서열과 마우스의 전체 생식계열 면역글로불린 가변 레퍼토리가 정확하게 치환된 마우스가 생성되었다. 인간 가변 영역은 마우스 불변 영역에 연결되어 생리학적으로 적절한 수준으로 재배열되고 발현되는 키메라 인간-마우스 면역글로불린 좌위를 형성한다. 발현된 항체는 “역 키메라” 이고, 즉, 인간 가변 영역 서열 및 마우스 불변 영역 서열을 포함한다.
- [0228] 일부 실시예에서, 인간 또는 인간화된 가변 영역을 갖는 항체를 발현하는 인간화된 면역글로불린 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 마우스는 VELOCIMMUNE® 마우스라 불린다. VELOCIMMUNE® 인간화된 마우스는 야생형 마우스와는 본질적으로 구별불가능한 완전한 기능성 체액 면역 시스템을 나타낸다. 이들은 B 세포 발달의 모든 단계에서 정상 세포 집단을 나타낸다. 이들은 정상적인 림프 기관 형태를 나타낸다. VELOCIMMUNE® 마우스의 항체 서열은 정상적인 V(D)J 재배열 및 정상적인 체세포 과돌연변이 빈도를 나타낸다. 이러한 마우스의 항체 집단은 정상 클래스 스위칭(예를 들어, 정상 이소형 시스-스위칭)으로 인한 이소형 분포를 반영한다. VELOCIMMUNE® 마우스를 면역화하면, 후보 치료제로서 사용하기에 적합한 인간 면역글로불린 가변 도메인을 갖는 크고 다양한 항체 레퍼토리를 생성하는 강력한 체액 면역-반응이 생성된다. 이러한 플랫폼은 약학적으로 허용가능한 항체 및 다른 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 자연적으로 친화도-성숙된 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 풍부한 공급원을 제공한다. 이는, VELOCIMMUNE® 마우스의 제조를 가능하게 하는 역 키메라 방식으로 내인성 비-인간 불변 영역 유전자 서열과 인간 면역글로불린 가변 서열이 작동가능하게 연결되도록, 마우스 면역글로불린 가변 서열을 인간 면역글로불린 가변 서열과 정확하게 치환하는 것이다.
- [0229] 역 키메라 방식으로 변형된 마우스에는, 내인성 면역글로불린 좌위에서, 비제한적으로 내인성 불변 영역에 작동가능하게 연결된 인간(화된) 가변 영역(예를 들어, (D), J 및 하나 이상의 인간 V 유전자 분절을 포함함)을 포함하도록 변형된 마우스를 포함하며, 예를 들어,
- [0230] (a) 내인성 중쇄 좌위에서:
- [0231] (i) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 가변 영역(여기서, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 복수의 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 영역  $V_H$  유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간인 재배열되지 않은 인간  $V_H$  유전자 분절), 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $D_H$  유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절을 포함하고,
- [0232] 선택적으로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $D_H$  유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄  $D_H$  유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간  $D_H$  유전자 분절) 및/또는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절임(예를 들어, 완전한 기능성 인간  $J_H$  유전자 분절임);
- [0233] (ii) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열된 인간(화된) 중쇄 가변 영역(여기서, 제한된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린  $D_H$  유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절과 작동가능하게 연결된 하나의 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 영역  $V_H$  유전자 분절로 이루어지고; 선택적으로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $D_H$  유전자 분절 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절은 각각 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄  $D_H$  유전자 분절 및/또는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄  $J_H$  유전자 분절임);
- [0234] (iii) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역(여기서, 히스티딘 변형된 인간(화된) 중쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열

되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열을 포함함); 또는

- [0235] (iv) 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 단독 면역글로불린 암호화 서열 (여기서, 내인성 중쇄 불변 영역은 (1) 경쇄와 결합되는 IgM 이소형을 암호화하는 온전한 내인성 IgM 유전자 및 (2) 기능성 CH1 도메인을 암호화하는 서열이 결합된 비-IgM 유전자, 예를 들어, IgG 유전자를 포함하고; 비-IgM 유전자는 경쇄 불변 영역과 공유 결합될 수 있는 CH1 도메인이 결합된 비-IgM 이소형을 암호화함);
- [0236] 및/또는
- [0237] (b) 내인성 경쇄 좌위에서:
- [0238] (i) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (여기서, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 복수의 재배열되지 않은 인간 경쇄 가변 영역  $V_L$  유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간인 재배열되지 않은 인간  $V_L$  유전자 분절) 및 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄  $J_L$  유전자 분절을 포함하고,
- [0239] 선택적으로, 하나 이상의 재배열되지 않은 면역글로불린 경쇄  $J_L$  유전자 분절은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 경쇄  $J_L$  유전자 분절(예를 들어, 완전한 기능성 인간  $J_{HL}$  유전자 분절)이고,
- [0240] 선택적으로, 내인성 면역글로불린 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 경쇄 카파 ( $\kappa$ ) 좌위이고, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 인간 가변  $\kappa$  ( $V_\kappa$ ) 및 결합  $\kappa$  ( $J_\kappa$ ) 유전자 분절이고, 내인성 경쇄 불변 영역은 내인성  $\kappa$  사슬 불변 영역 서열이고/이거나; 내인성 면역글로불린 경쇄 좌위는 내인성 면역글로불린 경쇄 람다( $\lambda$ )이고, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 인간 가변  $\lambda$  ( $V_\lambda$ ) 및 결합  $\lambda$  ( $J_\lambda$ ) 유전자 분절을 포함하고, 내인성 경쇄 불변 영역은 내인성  $\lambda$  사슬 불변 영역 서열이고; 선택적으로, 내인성 면역글로불린 경쇄  $\lambda$  좌위는 (a) 하나 이상의 인간  $V_\lambda$  유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간  $J_\lambda$  유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간  $C_\lambda$  유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 면역글로불린 경쇄 불변 ( $C_\lambda$ ) 유전자 분절에 작동가능하게 연결되며; 내인성 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 좌위는 하나 이상의 설치류 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 인핸서( $E_\lambda$ ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 인핸서( $E_\lambda$ )를 포함하고, 선택적으로는 3개의 인간  $E_\lambda$ 를 포함함);
- [0241] (ii) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 공통 경쇄 암호화 서열 (여기서, 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역 서열은 면역글로불린 경쇄  $J_L$  유전자 분절과 재배열된 인간 경쇄 가변 영역  $V_L$ 을 포함함);
- [0242] (iii) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역 (여기서, 제한된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 결합( $J_L$ ) 유전자 분절에 작동가능하게 연결된 2개 이하의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 경쇄 가변( $V_L$ ) 유전자 분절을 포함함);
- [0243] (iv) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역 (여기서, 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화된) 경쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함함); 또는
- [0244] (v) 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역 (여기서, 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화) 경쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 포함하는 재배열된 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역 서열을 포함함)을 포함하는 마우스로서,
- [0245] 선택적으로, 마우스는
- [0246] (i) 마우스가 비-인간 동물의 야생형 생식능력을 나타내도록 기능성 ADAM6 좌위를 포함하는 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 좌위; 및/또는

- [0247] (ii) 선택적으로, 재배열된 가변 영역 유전자의 적어도 10%가 비템플릿 첨가를 포함하도록 항원 수용체의 다양성을 증가시키기 위해 외인성 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제(TdT) 유전자를 추가로 포함하는 마우스가,
- [0248] 이전에 기술되었다. 예를 들어, 미국 특허 제8,697,940호; 제8,754,287호; 제9,204,624호; 제9,334,334호; 제9,801,362호; 제9,332,742호; 및 제9,516,868호; 미국 특허 공개 20110195454, 20120021409, 20120192300, 20130045492; 20150289489; 20180125043; 20180244804; PCT 공개 번호 W02019/113065, W02017210586 및 W02011163314; Lee 등 (2014) *Nature Biotechnology* 32:356을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0249] 당 기술분야의 숙련자는 임의의 마우스 또는 마우스 세포(예를 들어, 역 키메라 방식으로 변형된 마우스 ES 세포)가 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 분절을 포함하도록 변형될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 것은 다음을 포함하는 계놈, 예를 들어, 생식계열 계놈을 갖는 유전적으로 변형된 비-인간 동물이다:
- [0250] 본 발명의 변형된  $hV_H$  유전자 분절, 인간  $D_H$  유전자 분절, 및 인간  $J_H$  유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하되, 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 불변 영역에 작동가능하게 연결되는, 내인성 면역글로불린 좌위, 및/또는
- [0251] 본 발명의 변형된  $V_L$  분절 및 인간  $J_L$  유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하되, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 불변 영역에 작동가능하게 연결되는, 내인성 사슬 좌위.
- [0252] 일부 실시예에서, 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스는 이의 계놈에서 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위에서 하나 이상의 내인성  $V_H$ ,  $D_H$ , 및  $J_H$  분절과 하나 이상의 인간  $V_H$ ,  $D_H$ , 및  $J_H$  분절의 치환을 포함하며, 여기서 하나 이상의 인간  $V_H$ ,  $D_H$ , 및  $J_H$  분절은 본원에 기술된 바와 같은 변형된 인간  $V_H$  유전자 분절을 포함하고 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자에 작동가능하게 연결되어 있으며; 선택적으로 재배열되지 않았거나 재배열된 인간  $V_L$  및 인간  $J_L$  분절은 예를 들어, 내인성 비-인간 경쇄 좌위에서, 비-인간, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스 또는 랫트, 또는 예를 들어 인간 면역글로불린 경쇄 불변( $C_L$ ) 영역 유전자에 작동가능하게 연결된다.
- [0253] 특정 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 그의 계놈, 예를 들어, 생식계열 계놈에서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig V 유전자 분절을 포함하는 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역 및 면역글로불린 불변 영역 유전자를 포함하는 면역글로불린 불변 영역을 함유하는 (외인성 또는 내인성) 면역글로불린 좌위를 포함하며, 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 면역글로불린 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된다.
- [0254] 일반적으로, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 면역글로불린 불변 영역에 작동가능하게 연결된 (면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는) 면역글로불린 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는 중쇄 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_H$  유전자 분절을 포함하는, 하나 이상의 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는  $\kappa$  사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_\kappa$  유전자 분절을 포함하는, 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역  $\kappa$  유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는  $\lambda$  사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_\lambda$  유전자 분절을 포함하는, 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역  $\lambda$  유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 면역글로불린 좌위는  $\lambda$  사슬 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_\lambda$  유전자 분절을 포함하는, 인간 재배열되지 않은 면역글로불린 가변 영역  $\lambda$  유전자 분절을 포함한다.
- [0255] 특정 실시예에서, 비-인간 동물은 내인성 중쇄 좌위에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 조작된 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_H$  유전자 분절을 포함하는 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 면역글로불린 가변 영역은 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 Ig 중쇄 가변 영역 유전자 분절을 함유한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 Ig 가변 영역 유전자 분절은 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Ig  $V_H$  유전자 분절, 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 다양성( $D_H$ ) 분절, 및 하나 이

상의 면역글로불린 중쇄 결합( $J_H$ ) 분절(선택적으로 하나 이상의 재배열되지 않은 인간  $J_H$  분절)을 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig V_H$  유전자 분절은 중쇄 가변 영역에 존재하는 유일한  $Ig V_H$  분절이다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간  $Ig$  유전자 분절은 모든 기능적 인간  $D_H$  유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간  $Ig$  유전자 분절은 모든 기능성 인간  $J_H$  유전자 분절을 포함한다.  $Ig$  중쇄 유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, *Macdonald* 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 및 supplemental information에 제공되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0256] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물은 내인성 중쇄 좌위에서, 적어도 비-인간  $IgM$  유전자를 포함하는 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 제한된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역은 단일 인간  $V_H$  유전자 분절(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 단일 변형된  $Ig V_H$  유전자 분절), 복수의  $D_H$  유전자 분절(예를 들어, 인간  $D_H$  유전자 분절) 및 복수의  $J_H$  유전자 분절(예를 들어 인간  $J_H$  유전자 분절)을 특징으로 하고, 여기서 제한된 면역글로불린 중쇄 좌위는 재배열이 가능하고 복수의 구별되는 재배열을 형성할 수 있으며, 여기서 각각의 재배열은 단일 인간  $V_H$  유전자 분절,  $D_H$  분절 중 하나 및  $J_H$  분절 중 하나로부터 유래되고, 여기서 각각의 재배열은 상이한 중쇄 가변 도메인을 암호화한다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20130096287호에 기술된 바와 같고, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 일부 실시예에서, 단일 변형된 인간  $V_H$  유전자 분절은  $V_H1-2$  또는  $V_H1-69$ 이다.

[0257] 특정 실시예에서, 비-인간 동물은 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig V_L$  분절을 포함하여, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 내인성 경쇄 좌위에 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 재배열되지 않은 인간  $Ig \kappa$  가변 영역 유전자 분절을 함유한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 가변 영역은, 본원에 기술되지 않은 변형된  $Ig V_K$  분절을 포함할 수 있는, 하나 또는 복수의 재배열되지 않은 인간  $V_K$  분절, 및 하나 이상의 재배열되지 않은 인간  $J_K$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간  $J_K$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 4개의 기능성  $V_K$  분절 및 모든 인간  $J_K$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 16개의 기능성  $V_K$  분절 및 모든 인간  $J_K$  분절(예를 들어, 모든 기능성 인간  $V_K$  분절 및  $J_K$  분절)을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간  $V_K$  분절 및 모든 인간  $J_K$  분절을 포함한다.  $Ig \kappa$  유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, *Macdonald* 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 및 supplemental information에 제공되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0258] 일부 실시예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 제한된 재배열되지 않은 인간(화된) 경쇄 가변 영역은, 재배열되지 않은 인간(화된) 경쇄 가변 영역이 2개 이하의 인간  $V_L$  유전자 분절 및 복수의  $J_L$  유전자 분절(예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 제9,796,788호에 기술된 것과 같은 이중 경쇄 마우스, 또는 DLC)을 포함하는 것을 특징으로 하며, 2개 이하의 인간  $V_L$  유전자 분절 중 하나는 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig V_L$  분절일 수 있다. 일부 실시예에서,  $V_L$  유전자 분절은  $V_K$  유전자 분절이다. 일부 실시예에서,  $V_L$  유전자 분절은  $V_\lambda$  유전자 분절이다. 일부 실시예에서,  $V_K$  유전자 분절은  $IGKV3-20$  및  $IGKV1-39$ 이다. 일부 실시예에서, 비-인간 동물은 마우스이 내인성  $\kappa$  경쇄 좌위에서 마우스 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 정확히 2개의 재배열되지 않은 인간  $V_K$  유전자 분절 및 5개의 재배열되지 않은 인간  $J_K$  유전자 분절을 포함하되, 선택적으로 2개의 재배열되지 않은 인간  $V_K$  유전자 분절은 인간  $V_K1-39$  유전자 분절 및 인간  $V_K3-20$  유전자 분절이고, 5개의 재배열되지 않은 인간  $J_K$  유전자 분절은 인간  $J_K1$  유전자 분절, 인간  $J_K2$  유전자 분절, 인간  $J_K3$  유전자 분절, 인간  $J_K4$  유전자 분절, 및 인간  $J_K5$  유전자 분절이고, 재배열되지 않은 인간  $J_K$  유전자 분절은 재배열되어 항체의 인간 가변 도메인을 암호화할 수 있으며, 추가로, 비-인간 동물은 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 형성하기 위해 재배열될 수 있는 내인성 내인성  $V_K$  유전자 분절을 포함하지 않는다.

[0259] 일부 실시예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig \lambda$  분절을 포함하여, 재배열되지 않은 인간  $Ig\lambda$  가변 영

역 유전자 분절을 함유한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 복수의 인간  $V\lambda$  분절 및 하나 이상의 인간  $J\lambda$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 하나 이상의 인간  $V\lambda$  분절 및 하나 이상의 인간  $J\lambda$  분절 및 하나 이상의 인간  $C\lambda$  불변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간  $V\lambda$  분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절은 모든 인간  $J\lambda$  분절을 포함한다.  $Ig \lambda$  유전자 분절을 포함하는 예시적인 가변 영역은 예를 들어, 미국 특허 제9,035,128호 및 제6,998,514호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 실시예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 (a) 하나 이상의 인간  $V\lambda$  유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간  $J\lambda$  유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간  $C\lambda$  유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 내인성 (예를 들어, 설치류)  $C\lambda$  유전자 분절에 작동가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 좌위는 하나 이상의 설치류 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 인헨서( $E\lambda$ ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린  $\lambda$  경쇄 인헨서( $E\lambda$ )를 추가로 포함하고, 선택적으로는 3개의 인간  $E\lambda$ 를 포함한다.

[0260] 특정 실시예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 경쇄 가변 영역은, 비-인간 동물이 내인성  $\kappa$  불변 도메인과 융합된  $V\lambda$  및  $J\lambda$  유전자 분절로부터 유래된 인간  $\lambda$  가변 도메인 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하도록, 내인성(예를 들어, 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스)  $C\kappa$  유전자에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 인간  $Ig\lambda$  가변 영역 유전자 분절, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된  $Ig \lambda$  분절을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제9,226,484호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨).

[0261] 일부 실시예에서, 인간화된 면역글로불린  $\kappa$  경쇄 좌위, 예를 들어, 인간화된 면역글로불린 내인성  $\kappa$  좌위는, 예를 들어, 내인성  $C\lambda$  유전자를 치환할 수 있는  $C\lambda$  유전자의 상류에 있는(예를 들어, 작동가능하게 연결된) 하나 이상의 인간  $V\lambda$  유전자 분절(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 인간  $V\lambda$  분절) 및 하나 이상의 인간  $J\lambda$  유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서,  $C\lambda$  유전자는 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)  $C\lambda$  유전자이다. 일부 실시예에서,  $C\lambda$  유전자는 마우스  $C\lambda 1$  유전자이다. 일부 실시예에서,  $C\lambda$  유전자는 하나 이상의 인간  $C\lambda$  유전자를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 인간화된 면역글로불린  $\kappa$  경쇄 좌위의 하나 이상의 인간  $J\lambda$  유전자 분절 및 하나 이상의  $C\lambda$  유전자는  $J\lambda$ - $C\lambda$  클러스터 내에 존재한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는 이러한 인간화 면역글로불린  $\kappa$  경쇄 좌위에 대해 동형접합체이다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는 이러한 인간화 면역글로불린  $\kappa$  경쇄 좌위에 대해 이형접합체이다. 일부 실시예에서, 이러한 인간화 면역글로불린  $\kappa$  경쇄 좌위를 포함하는 유전적으로 변형된 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히,  $\lambda$  경쇄를 포함하는 항체를 생산하며, 각각의  $\lambda$  경쇄는, 예를 들어, 항원 자극에 반응하여 인간  $\lambda$  경쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간  $\lambda$  경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0262] 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간 면역 글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역은 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자간 서열(intergenic 서열)을 또한 포함한다. 일부 실시예에서, 면역글로불린 가변 영역은 비-인간(예를 들어, 설치류, 랫트, 마우스)  $Ig$  가변 영역 유전자간 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 유전자간 서열은 내인성 중 기원이다.

[0263] 일부 실시예에서, 면역글로불린 가변 영역은 재배열된 경쇄 가변 영역(범용 경쇄 가변 영역)이다. 일부 실시예에서, 재배열된  $Ig$  경쇄 가변 영역 유전자는 인간 재배열된  $Ig$  경쇄 가변 영역 유전자이다. 예시적인 재배열된  $Ig$  경쇄 가변 영역은, 예를 들어, 미국 특허 제9,969,814호; 제10,130,181호, 및 제10,143,186호 및 미국 특허 공개 제20120021409호, 제20120192300호, 제20130045492호, 제20130185821호, 제20130302836호, 및 제20150313193호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 실시예에서, 범용 경쇄 가변 영역을 포함하는 비-인간 유기체("범용 경쇄" 유기체)는 이중특이적 항체를 생산하는데 사용된다. 일부 실시예에서, 공통 경쇄 암호화 서열은 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 단일 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄  $V\kappa/J\kappa$  서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 단일 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄  $V\kappa/J\kappa$  서열은, 범용 경쇄에 작동가능하게 연결된 본원에 기술된 바와 같은 앵커를 암호화하도록 변형된다. 일부 실시예에서, 단일 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄  $V\kappa/J\kappa$  서열은 (i) 인간  $J\kappa 5$  유전자 분절에 융합된 인간  $V\kappa 1$ -39 유전자 분절을 포함하는 인간  $V\kappa 1$ -39/ $J\kappa 5$  서열이거나, (ii) 인간  $J\kappa 1$  유전자 분절에 융합된 인간  $V\kappa 3$ -20 유전자 분절을 포함하는 인간  $V\kappa 3$ -20/ $J\kappa 1$  서열이다.

[0264] 일부 실시예에서, 면역글로불린 가변 영역은 이러한 비-인간 유기체에서 생성된 항체에 pH 의존적 결합 특성을

도입하도록 설계된 히스티딘 코돈의 삽입 및/또는 치환을 포함하는 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역이다. 일부 이러한 실시예에서, 히스티딘 코돈은 CDR3를 암호화하는 핵산 서열에 삽입되고/되거나 치환된다. 다양한 이러한 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 좌위는 미국 특허 제9,301,510호; 제9,334,334호; 및 제9,801,362호 및 미국 특허 출원 공개 제20140013456호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 실시예에서, 내인성 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열된 인간(화된) 경쇄 가변 영역은, 인간  $V_K$  및  $J_K$  분절 서열을 포함하는 하나의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하되, 선택적으로  $V_K$  분절 서열은 인간  $V_{K1-39}$  또는  $V_{K3-20}$  유전자 분절로부터 유래되며, 선택적으로 하나의 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 서열은 (IMGT 넘버링에 따른) 105, 106, 107, 108, 109, 111 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 발현되는 히스티딘 코돈과  $V_K$  분절 서열의 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환을 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화된) 중쇄 가변 영역은, 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 상보성 결정 영역 3(CDR3) 암호화 서열에 (예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 (인간)  $V_H$  유전자 분절에서) 포함하는, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 재배열되지 않은 인간(화된) 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열은 재배열되지 않은 인간  $V_H$ (예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 (인간)  $V_H$  분절), 재배열되지 않은 인간  $D_H$  또는 합성  $D_H$ , 및 재배열되지 않은 인간  $J_H$  유전자 분절을 포함하며, 선택적으로 여기서 재배열되지 않은 인간  $V_H$  분절(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 (인간)  $V_H$  분절)은 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비-히스티딘 코돈의 치환 또는 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 중쇄 불변 영역에 대한 작동가능하게 연결된 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화된) 경쇄 가변 영역은 재배열되지 않은  $V_L$  및 재배열되지 않은  $J_L$  유전자 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 히스티딘 변형된 재배열되지 않은 인간(화된) 경쇄 가변 영역은 2개 이하의 재배열되지 않은 인간  $V_L$  (예를 들어, 2개 이하의  $V_K$  유전자 분절) 및 하나 이상의 재배열되지 않은 인간  $J_L$  (예를 들어,  $J_K$ ) 유전자 분절(들)을 포함하되, 2개 이하의 인간  $V_L$  유전자 분절 각각은 히스티딘 코돈과 적어도 하나의 비히스티딘 코돈의 치환 및 적어도 하나의 히스티딘 코돈의 삽입을 CDR3 암호화 서열에 포함한다. 일부 실시예에서, 2개 이하의 인간  $V_K$  유전자 분절은 인간  $V_{K1-39}$  및  $V_{K3-20}$  유전자 분절이고, 이들 각각은 히스티딘 코돈과 비히스티딘 코돈의 하나 이상의 치환을 포함하되, 인간  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절은 재배열될 수 있고, 인간  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절은 (IMGT 넘버링에 따른) 105, 106, 107, 108, 109, 111로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 하나 이상의 히스티딘을 포함하는 인간 경쇄 가변 도메인을 암호화하며, 하나 이상의 히스티딘은 하나 이상의 치환으로부터 유래된다.

[0265] 일부 실시예에서, 면역 글로불린 불변 영역은 중쇄 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 실시예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 인간 중쇄 불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 내인성 중 기원이다. 일부 실시예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는 마우스 불변 영역 유전자이거나 랫트 불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 불변 영역 유전자는 인간 서열과 비-인간 서열의 혼합물이다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 불변 영역 유전자는 인간 CH1 영역 및 비-인간(예를 들어, 내인성 중 기원, 마우스, 랫트) CH2 및/또는 CH3 영역을 암호화한다. 일부 실시예에서, 중쇄 불변 영역 유전자는  $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma$  ( $C_{\gamma 1}$ ,  $C_{\gamma 2}$ ,  $C_{\gamma 3}$ ,  $C_{\gamma 4}$ ),  $C_\alpha$  또는  $C_\epsilon$  불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 불변 영역 유전자는 내인성 불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 불변 영역 유전자는, 비-인간 동물이 중쇄 단독 항체를 발현하도록 돌연변이된 CH1 영역을 암호화한다(예를 들어, 미국 특허 제8,754,287호, 미국 특허 출원 공개 제2015/0289489호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 예를 들어, (범용 또는 이중 경쇄 유기체에서) 이중 특이적 항체를 만들기 위한 중쇄를 생성하는 것이 목표인 일부 실시예에서, 중쇄의 Fc 도메인은 중쇄 이중이량체 형성을 용이하게 하고/하거나 중쇄 동중이량체 형성을 억제하기 위한 변형을 포함한다. 이러한 변형은, 예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호; 제5,807,706호; 제5,821,333호; 제7,642,228호 및 제8,679,785호, 및 미국 특허 공개 제2013/0195849호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본문에 통합된다.

[0266] 일부 실시예에서, 면역 글로불린 불변 영역은 경쇄 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 실시예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는  $\kappa$  불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는  $\lambda$  불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 내인성 중 기원이다. 일부 실시예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 마우스 불변 영역 유전자이거나 랫트 불변 영역 유전자이다. 일부 실시예에서, 경쇄 불변 영역 유전자는 인간 서열과 비-인간 서열의 혼합물이다.

- [0267] 일부 실시예에서, 가변 영역 유전자 분절이 작동가능하게 연결된 면역글로불린 불변 영역 유전자 및 인간 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역은 내인성 면역글로불린 좌위에 위치한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성 중쇄 좌위이다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성  $\kappa$  좌위이다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 내인성  $\lambda$  좌위이다. 일부 실시예에서, 인간 가변 영역 유전자 분절이 작동가능하게 연결된 불변 영역 유전자는 내인성 불변 영역 유전자이다.
- [0268] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 비-인간 동물의 게놈 내의 하나 이상의 내인성 면역글로불린 좌위 또는 하나 이상의 내인성 좌위의 일부분(예를 들어, 가변 영역 및/또는 불변 영역)은 불활성화된다. 내인성 면역글로불린 가변 영역 좌위 및 이의 일부분은, 유기체의 게놈으로부터 좌위 또는 이의 일부분을 결실시키는 것, 상이한 핵산 서열과 좌위 또는 이의 일부분을 치환하는 것, 비-인간 유기체의 게놈 내 또 다른 위치로 유전자 또는 이의 일부분을 역위 또는 변위시키는 것을 포함하되 이들로 한정되지 않는, 당 기술분야에 알려진 임의의 방법을 사용해 불활성화될 수 있다. 일부 실시예에서, 좌위의 불활성화는 단지 부분적 불활성화이다. 일부 실시예에서, 좌위의 가변 영역은 불활성화되지만 불변 영역은 (예를 들어, 불변 영역이 비내인성 가변 영역 유전자 분절에 작동가능하게 연결되어 있기 때문에) 기능적인 상태로 유지된다.
- [0269] 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위를 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위 또는 이의 일부는 내인성 중쇄 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 중쇄 좌위의 가변 영역의 적어도 일부는 가변 영역의 J 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린 중쇄 좌위 또는 이의 일부는 내인성 중쇄 좌위의 내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성 중쇄 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의  $O_{\mu}$  유전자를 포함한다.
- [0270] 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린  $\kappa$  사슬 좌위를 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린  $\kappa$  사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성  $\kappa$  사슬 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성  $\kappa$  사슬 좌위의 가변 영역의 적어도 일부는 가변 영역의 J 분절을 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린  $\kappa$  사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성  $\kappa$  사슬 좌위의 내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성  $\kappa$  사슬 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의  $C_{\kappa}$  유전자를 포함한다.
- [0271] 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 불활성화된 내인성 면역글로불린  $\lambda$  사슬 좌위를 포함한다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린  $\lambda$  사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성  $\lambda$  사슬 좌위의 내인성 가변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 내인성  $\lambda$  사슬 좌위 내의 적어도 하나의 V-J-C 유전자 클러스터의 적어도 일부는 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위된다. 일부 실시예에서, 내인성 면역글로불린  $\lambda$  사슬 좌위 또는 이의 일부는 내인성  $\lambda$  사슬 좌위의 내인성 불변 영역의 적어도 일부의 결실, 치환, 변위 및/또는 역위에 의해 불활성화된다. 일부 실시예에서, 결실되고, 치환되고, 변위되고/되거나 역위되는 내인성  $\lambda$  사슬 좌위의 불변 영역의 적어도 일부는 내인성 불변 영역의 C 유전자를 포함한다.
- [0272] 다양한 실시예에서, 면역글로불린 좌위의 변형은 비-인간 동물의 생식능력에 영향을 미치지 않는다. 일부 실시예에서, 중쇄 좌위는 기능성 유전자, 예를 들어, 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다를 포함하고, 유전적 변형은 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다를 발현 및/또는 기능에 영향을 미치지 않는다. 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물의 게놈은 이소적으로(ectopically) 위치된 기능성 유전자, 예를 들어 내인성 ADAM6a 유전자, ADAM6b 유전자, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 외인성 ADAM6a 및/또는 ADAM6b를 발현하는 예시적인 비-인간 동물은 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0273] 일부 실시예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 항원 수용체 다양성을 증가시키기 위해 외인성 말단 데옥시시티뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제(TdT)를 추가로 포함하고 이를 발현한다. 외인성 TdT를 발현하는 예시적인 비-인간 동물은 PCT 공개 WO 2017210586에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0274] 일부 실시예에서, 전사 제어 요소는 RAG1 전사 제어 요소, RAG2 전사 제어 요소, 면역글로불린 중쇄 전사 제어 요소, 면역글로불린 k 경쇄 전사 제어 요소, 면역글로불린 l 경쇄 전사 제어 요소, 또는 이들의 임의의 조합을

포함한다.

- [0275] 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물의 게놈은 하나 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄 유전자 (예를 들면, 미국특허 번호 8,502,018; 미국특허 번호 8,642,835; 미국특허 번호 8,697,940; 미국특허 번호 8,791,323; 및 미국특허출원 공개 번호 2013/0096287 A1 및 2018/0125043 A1; 및 PCT 공개 번호 WO2019/113065 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 대안적으로, 재조합 핵산 분자는 예를 들면, VELOCIMMUNE® 균주 같은 다른 변형된 균주의 배아 줄기 세포에 도입될 수 있다 (예를 들면, 미국특허 제8,502,018호 또는 미국특허 제8,642,835호 참조; 그 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터를 변형 균주로부터의 세포에 도입하여 제작될 수 있다. 일 예를 제공하기 위해, 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터는 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에 기술된 바와 같이 비-인간 동물에 도입될 수 있으며; 상기 특허는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되며, 상기 비-인간 동물은 완전히 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 항체를 발현한다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 인간 면역 글로불린 유전자(가변 및/또는 불변 영역 유전자)를 추가로 포함하도록 제작된다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은, 본원에 설명된 바와 같은, 변형된 Ig V 분절, 및 이종 중(예를 들어, 인간) 유래의 유전 물질을 포함하고, 여기서 유전 물질은 전체적으로 또는 부분적으로, 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 암호화한다.
- [0276] 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 종종 비-인간 동물의 의도된 용도에 따라 추가적인 인간 또는 인간화 유전자를 포함하도록 전술한 바와 같이 또는 당 기술분야에 공지된 방법을 사용해 제조될 수 있다. 이러한 추가적 인간 또는 인간화 유전자의 유전 물질은 전술한 바와 같이 유전자 변형된 세포(예를 들어, 배아 줄기 세포)의 게놈의 추가적 변경을 통해, 또는 원하는 대로 유전자 변형된 다른 계통을 이용한 당 기술분야에 공지된 번식 기술을 통해 도입될 수 있다.
- [0277] 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이, 변형된 Ig V 분절을 포함하는 비-인간 동물의 게놈은 (예를 들면, 이종 교배 또는 다수 유전자 표적화 전략을 통해) 미국특허 출원공개 제2011-0195454 A1호, 제2012-0021409 A1호, 제2012-0192300 A1호, 제2013-0045492 A1호, 제2013-0185821 A1호, 제2013-0198880 A1호, 제2013-0302836 A1호, 제2015-0059009 A1호; 국제특허 출원공개 WO 2011/097603호, WO 2012/148873호, WO 2013/134263호, WO 2013/184761호, WO 2014/160179호, WO 2014/160202호에 설명된 하나 이상의 변형을 더 포함하며; 이들 모두 그들 전문이 본원에 참조로 인용된다.
- [0278] 유전자이식 파운더(transgenic founder) 비-인간 동물은 이의 게놈에 변형된 Ig V 분절의 존재 및/또는 동족 수용체에 결합하는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분에 상응하는 아미노산을 포함하는 앵커-변형된 항체의 발현에 기초하여 식별될 수 있다. 그런 다음, 유전자이식 파운더 비-인간 동물은 변형된 Ig V 분절 가지를 추가의 비-인간 동물을 교배시켜, 변형된 Ig V 분절의 하나 이상의 카피를 각각 갖는 일련의 비-인간 동물을 생성하는데 사용될 수 있다. 또한, 변형된 Ig V 분절을 갖는 유전자이식 비-인간 동물은 원하는 대로 다른 이식 유전자(예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자)를 갖는 유전자이식 다른 비-인간 동물과 추가로 교배시킬 수 있다.
- [0279] 유전자이식 비-인간 동물은 이식유전자의 발현을 조절하거나 유도할 수 있는 선택된 시스템을 함유하도록 생산될 수도 있다. 예시적인 시스템은 박테리오파지 P1의 Cre/*loxP* 재조합효소 시스템(예를 들어, Lakso, M. 등의 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 및 S. 세레비시아의 FLT/Frt 재조합효소 시스템(O' Gorman, S. 등의 1991, Science 251:1351-1355; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 포함한다. 이러한 동물은, 예를 들어, 선택된 변형(예를 들어, 변형된 Ig V 분절)을 포함하는 이식유전자를 함유하는 하나의 유전자이식 동물과 재조합 효소(예를 들어, Cre 재조합 효소)를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 다른 하나의 유전자이식 동물의 교배에 의한, "이중" 유전자이식 동물의 작제를 통해 제공될 수 있다.
- [0280] 마우스 (즉, 전부 하나 이상의 무린 중쇄 불변 영역 유전자와 작동가능하게 연결되어 있는, 변형된 인간 V<sub>H</sub> 분절, D<sub>H</sub>, 및 J<sub>H</sub> 유전자 분절을 가진 마우스)에서 변형된 Ig v 분절을 사용하는 실시예들이 본원에서 광범위하게 논의되었지만, 변형된 Ig v 분절을 포함하는 다른 비-인간 동물 또한 제공된다. 이러한 비-인간 동물은, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 돼지, 소(예를 들어, 젖소, 황소, 버팔로), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 현담비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이) 등을 포함하여, 본원에 기술된 바와 같은 앵커-변형된 면역글로불린을 발현하도록 유전자적으로 변형될 수 있는 임의의 동물을 포함한다. 예를 들어, 적합하게 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 구할 수 없는 비-인간 동물의 경우, 유전자 변형을 포함하여 비-인간 동물을 제조하기 위한 다른 방법이 채용된다. 이러한 방법은, 예를 들어, 비ES 세포 게놈(예를 들어, 섬유아세

포 또는 유도 다능성 세포)을 변형하는 단계 및 적합한 세포, 예를 들어, 핵이 없는 난모세포에 유전자 변형된 게놈을 전달하기 위해 체세포 핵 전달(SCNT)을 채용하는 단계, 및 변형된 세포(예를 들어, 변형된 난모세포)를 배아를 형성하기에 적합한 조건 하에 비-인간 동물에 잉태시키는 단계를 포함한다.

[0281] 비-인간 동물 게놈(예를 들어, 돼지, 젓소, 설치류, 닭 등)을 변형하는 방법은, 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 작동자 뉴클레아제(TALEN), 또는 Cas 단백질(즉, CRISPR/Cas 시스템)을 채용하여 본원에 설명된 변형된 Ig V 분절을 포함하도록 게놈을 변형시키는 단계를 포함한다. 비-인간 동물의 생식계열 게놈을 변형하는 방법에 대한 안내는, 예를 들어, 미국특허 출원공개 번호 2015-0376628 A1, US 2016-0145646 A1 및 US 2016-0177339 A1에서 찾을 수 있으며; 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0282] 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 포유동물이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은, 예를 들어, 뛰는 쥐상과(Dipodoidea 또는 Muroidea) 아목의 작은 포유동물이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전적으로 개질된 동물은 설치류이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 마우스, 랫트 및 햄스터로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 쥐상과 아목으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전적으로 변형된 동물은 칼로미스쿠스과(Calomyscidae)(예를 들어, 마우스 유사 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예를 들어, 햄스터, 뉴 월드 랫트 및 마우스, 들쥐), 쥐과(Muridae)(진짜 마우스 및 랫트, 사막쥐, 가시쥐, 갈기쥐), 네소미스과(Nesomyidae)(클라이밍 마우스, 락 마우스(rock mice), 흰꼬리 랫트, 말라가시 랫트 및 마우스), 가시겨울잠쥐과(Platacanthomyidae)(예를 들어, 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예를 들어, 두더쥐, 대나무쥐, 및 동북)로부터 선택된 과(family)로부터 유래한다. 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 유전자 변형된 설치류는 진짜 마우스 또는 랫트(쥐상과), 사막쥐(gerbil), 가시쥐(spiny 마우스), 갈기쥐(crested rat)로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 쥐상과의 구성원으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 설치류이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 설치류는 마우스와 랫트로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 마우스이다.

[0283] 일부 실시예에서, 본원에서 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이다. 일부 실시예에서, 본 발명의 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예를 들어, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 균주로 이루어진 균으로부터 선택되는 129 균주이다(예를 들어, Festing 등, 1999, Mammalian 게놈 10:836; Auerbach, W. 등, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조; 그 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 전술한 129 균주 및 전술한 C57BL/6 균주의 혼합체이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 전술한 129 균주들의 혼합체, 또는 전술한 BL/6 균주들의 혼합체이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 혼합체의 129 균주는 129S6(129/SvEvTac) 균주이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 BALB 균주, 예를 들어 BALB/c 균주이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 마우스는 BALB 균주 및 전술한 다른 균주의 혼합체이다.

[0284] 일부 실시예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비-인간 동물은 랫트이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 랫트는 위스타 랫트(Wistar rat), LEA 균주, 스프래그 다울리(Sprague Dawley) 균주, 피셔(Fischer) 균주, F344, F6, 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 랫트 균주는 위스타, LEA, 스프래그 다울리, 피셔, F344, F6, 및 아크 아구티로 이루어지는 균으로부터 선택된 2 가지 이상 균주의 혼합체이다.

[0285] **앵커-변형된 면역글로불린 및 앵커-변형된 면역글로불린을 생산하는 방법**

[0286] 항체-기반 치료제의 생산을 위한 여러가지 시험관 내 및 생체 내 기술이 개발되었다. 특히, 생체 내 기술은 동물의 게놈에 무작위로 포함시키거나 (예를 들어, 미국특허 번호 5,569,825 참조, 그 전문이 본원에 참조로 인용됨) 동물의 내인성 면역글로불린 불변 영역과 작동가능하게 연결하여 내인성 면역글로불린 좌위에 정확히 위치시킨 (미국특허 제8,502,018호; 제8,642,835호; 제8,697,940호; 및 제8,791,323호 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 인용됨) 인간 면역글로불린 유전자를 함유하는 유전자이식 동물 (즉, 설치류)의 생산을 특징으로 하고 있다. 두 가지 접근법 모두 인간에 사용하기 위한 유망한 항체 치료제 후보물질을 생산하는데 생산성이 있었다. 또한, 두 가지 접근법 모두 생체 내에서 생성된 항체 레퍼토리에서 항체 후보물질을 선택한다는 점

에서 시험관 내 접근법에 비해 장점이 있으며, 숙주의 면역계의 내부 환경 내에서 항원에 대한 친화도 및 특이성을 선별하는 것을 포함한다. 이런 식으로, 항체는 시험관 내 기술을 동반할 수 있는 인공 환경 또는 인 실리코 예측보다는 (관련 생물학적 에피토프와 표면 내에서) 자연적으로 제시된 항원에 결합한다. 생체 내 기술로부터 생산된 강력한 항체 레퍼토리에도 불구하고, 복합체 (예, 바이러스, 채널 폴리펩티드) 또는 세포질 항원에 대한 항체는 여전히 어려움이 있다. 또한, 종 (예, 인간 및 마우스) 간에 고도의 서열 동일성을 공유하는 폴리펩티드에 대한 항체를 생성하는 것은 면역 내성으로 인해 도전과제로 남아 있다.

[0287] 따라서, 본 발명은 무엇보다도, 동족 수용체에 대한 자체 친화성을 통해 분자의 결합력에 기여하고/하거나 동족 수용체를 인식할 수 있는 면역글로불린의 더 큰 레퍼토리의 체세포 과돌연변이를 허용함으로써 면역글로불린을 관심있는 항원(예를 들어, 앵커의 동족 수용체)에 정박시키고 항원에 대한 이의 친화도를 증가시키는 것을 돕는 앵커를 갖는 항체의 생산을 특징으로 하는 생체 내 시스템의 작제물이 인식에 기초한다.

[0288] 제공된 비-인간 동물은 인간 항체를 제작하기 위해 사용될 수 있으며, 이때 인간 항체는 본원에 설명된 비-인간 동물의 세포의 유전 물질에 의해 암호화된 하나 이상의 가변 영역 핵산 서열로부터 유래된 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 제공된 비-인간 동물은, 비-인간 동물이 관심있는 항원에 대한 면역 반응을 나타내는 데 충분한 시간 및 조건 하에서 상기 관심있는 항원(예를 들어, 앵커에 대해 동족인 수용체)으로 면역화된다. 항체는 비-인간 동물 (예를 들어, 하나 이상의 B 세포 같은, 하나 이상의 세포)로부터 단리되고, 예를 들어 친화도, 특이성, 에피토프 맵핑, 리간드-수용체 상호 작용을 차단하는 능력, 억제 수용체 활성화 등 같은, 다양한 분석 측정을 이용하여 특징지어진다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물에 의해 생산된 항체는 비-인간 동물로부터 단리된 하나 이상의 인간 가변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 유래된 하나 이상의 인간 가변 도메인을 포함한다.

[0289] 본원에 설명된 비-인간 동물은 다양한 분석에 유용한 인간 항체를 생산하는 생물학적 물질(예, 세포)의 공급원 및 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 리간드 수용체 쌍의 하나 이상의 수용체를 표적으로 하는 치료제를 개발하는데 사용된다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 G-단백질-결합 수용체(GPCR) 폴리펩티드에 결합하는 후보 치료제(예를 들어, 항체 등)를 식별, 스크리닝 및/또는 개발하는 데 사용된다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 수용체 티로신 키나제, 하나 이상의 인간 GPCR 폴리펩티드, 하나 이상의 노치 수용체, CD28, CTLA4, 및 PD1 중 하나 이상, 플렉신 수용체, LDLR, LILR, KIR, 및 인테그린, 또는 NPR, 예를 들어, NPR3의 활성을 차단하는 후보 치료제(예를 들어, 항체 등)를 스크리닝하고 개발하는 데 사용된다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 인간 GPCR 폴리펩티드, 하나 이상의 노치 수용체, CD28, CTLA4, 및 PD1 중 하나 이상, 플렉신 수용체, LDLR, LILR, KIR, 및 인테그린, 또는 NPR, 예를 들어, NPR3의 길항제 및/또는 작용제의 결합 프로파일을 결정하는 데 사용된다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 하나 이상의 인간 GPCR 폴리펩티드, 하나 이상의 노치 수용체, CD28, CTLA4, 및 PD1 중 하나 이상, 플렉신 수용체, LDLR, LILR, KIR, 및 인테그린, 또는 NPR, 예를 들어, NPR3에 결합하는 하나 이상의 후보 치료 항체의 에피토프 또는 에피토프들을 결정하는 데 사용된다.

[0290] 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 항체의 약동학적 프로파일을 결정하는 데 사용된다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 제공된 비-인간 동물 및 하나 이상의 대조군 또는 기준 비-인간 동물은 하나 이상의 후보 치료제 항체에 다양한 용량에서(예를 들어, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 또는 50 mg/kg 이상)에 각각 노출된다. 후보 치료용 항체는 비경구 및 비경구가 아닌 투여 경로를 포함하여 임의의 원하는 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 비경구 경로는, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 문맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척수내, 척추강내, 뇌심실내, 두개내, 흉막내 주입 경로 또는 다른 주입 경로를 포함한다. 비경구가 아닌 경로는, 예를 들어, 경구, 비강, 경피, 폐, 직장, 볼, 질내, 안내를 포함한다. 투여는 또한 연속적 주입, 국소 투여, 이식물(젤, 막 등)으로부터의 서방출, 및/또는 예를 들어, 정맥내 수액 백을 사용하는, 정맥내 주입일 수 있다. 혈액은 다양한 시점(예를 들어, 0시간, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 또는 최대 30일 이상)에서 비-인간 동물(인간화 및 대조군)로부터 단리된다. 총 IgG, 항-치료 항체 반응, 응집 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 검정이 본원에 설명된 비-인간 동물로부터 수득한 샘플을 사용하여 투여된 후보 치료용 항체의 약동학적 프로파일을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0291] 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물이 항체를 발현하며, 이에 따라 세포, 세포주, 및 세포 배양물이 생성되어 결합 및 기능 검정, 특히 길항제 또는 작용제가 인간 폴리펩티드 서열 또는 에피토프에 대해 특이적이거나, 대안적으로, 리간드 수용체 상호작용(결합)에서 기능하는 인간 폴리펩티드 서열 또는 에피토프에 대해 특이적인 경우, 예를 들어, 길항제 또는 작용제의 결합 또는 기능에 대한 검정에 사용하기 위한 항체 공급원으로서의 역

할을 한다. 일부 실시예에서, 후보 치료 항체 또는 siRNA에 결합된 에피토프는 제공된 비-인간 동물로부터 단리된 세포를 사용해 결정될 수 있다.

[0292] 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물 유래의 세포는 필요에 따라 단리되어 사용될 수 있거나, 많은 세대 동안 배양물 내에 유지될 수 있다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물 유래의 세포는 (예를 들어, 바이러스의 사용을 통해) 불멸화되고, 배양물 내에서 (예를 들어, 계대 배양물 내에서) 무기한으로 유지된다.

[0293] 일부 실시예에서, 본원에 설명된 바와 같은 비-인간 동물은 인간 표적 항원에 결합하는 항체 변이체의 생성을 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 그러한 변이체는 2개 이상의 인간 표적 항원에 의해 공유되는 공통 에피토프에 대한 원하는 기능성, 특이성, 낮은 교차-반응성을 갖는 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 제공된 비-인간 동물은 원하는 또는 개선된 기능성에 대해 스크리닝되는 일련의 항체 변이체를 생성하기 위해 항체 패널을 생성하는데 사용된다.

[0294] 일부 실시예에서, 본원에 설명된 비-인간 동물은 항체 라이브러리를 생성하기 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 그러한 라이브러리는 원하는 작용기 기능에 기초하여 상이한 Fc 영역 상에 그래프트되고/되거나 당 기술분야에 공지된 기술 (예, 부위-특이적 돌연변이 유발, 에러 유발(error-prone) PCR 등)을 사용하여 가변 영역 서열의 진화도 성숙을 위한 소스로서 사용될 수 있는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에 대한 소스를 제공한다.

[0295] **키트**

[0296] 본 발명은, 적어도 하나의 비-인간 동물, 비-인간 세포, DNA 단편, 및/또는 본원에 설명된 바와 같은 표적화 벡터가 들어있는 하나 이상의 용기를 포함하는 팩 또는 키트를 추가로 제공한다. 키트는 임의의 적용 가능한 방법 (예를 들어, 연구 방법)에서 사용될 수 있다. 이러한 용기(들)에는 의약품 또는 생물학적 제제의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 양식으로 된 공지가 선택적으로 부착될 수 있으며, 공지는 (a) 인간 투여용으로 제조, 사용 및 판매에 대한 기관의 승인 사항, (b) 사용 지침, 또는 둘 모두, 또는 둘 이상의 엔티티 간의 물질 및/또는 생물학적 제품 (예를 들어, 본원 설명된 비-인간 동물 또는 비-인간 세포)의 이전을 규율하는 계약이 반영된다.

[0297] 비제한적인 실시예가 아래에 기술된다:

[0298] 실시예 1. 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 면역글로불린(Ig) 가변(V) 분절을 포함하는 재조합 핵산 분자로서,

[0299] 여기서 변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고,

[0300] 여기서 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

[0301] (i) Ig 신호 펩티드,

[0302] (ii) 앵커, 및

[0303] (iii) 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하고,

[0304] 여기서 앵커는 동족 수용체에 결합하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 포함하고,

[0305] 선택적으로, 여기서 핵산 분자는 임의의 다른 V 분절이 결합되어 있는, 재조합 핵산 분자.

[0306] 실시예 2. 실시예 1에 있어서, Ig 신호 펩티드는 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 신호 펩티드인, 재조합 핵산 분자.

[0307] 실시예 3. 실시예 1 또는 2에 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 중쇄 가변(V<sub>H</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라

[0308] 변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>H</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절이고,

[0309] 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:

- [0310] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0311] (ii) 앵커, 및
- [0312] (iii) 생식계열 Ig V<sub>H</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0313] 실시예 4. 실시예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 인간 (h) V<sub>H</sub>1-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-8 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-18 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-24 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-45 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-46 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-58 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-26 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>2-70 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-7 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-9 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-11 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-13 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-15 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-16 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-20 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-21 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-23 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-3 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-30-5 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-33 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-35 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-38 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-43 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-48 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-49 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-53 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-64 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-66 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-72 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-73 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>3-74 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-28 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-2 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-30-4 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-31 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-34 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-39 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-59 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>4-61 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>5-51 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>6-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-4-1 분절, 생식계열 hV<sub>H</sub>7-81 분절, 또는 이의 변이체인, 재조합 핵산 분자.
- [0314] 실시예 5. 실시예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 생식계열 Ig V 분절 또는 이의 변이체가 생식계열 hV<sub>H</sub>1-69 분절 또는 이의 변이체이고, 선택적으로 여기서 Ig 신호 펩티드가 서열 MDWTWRFLFVVAATGVQS(서열번호 7)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0315] 실시예 6. 실시예 3 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 작동가능한 연결로 및 5' 에서 3' 로:
- [0316] (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절,
- [0317] (II) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 다양성 (D<sub>H</sub>) 분절, 및
- [0318] (III) 하나 또는 복수의 Ig 중쇄 결합 (J<sub>H</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0319] 실시예 7. 실시예 6에 있어서,
- [0320] (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절이 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig D<sub>H</sub> 분절을 포함하고/하거나,
- [0321] (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절이 하나, 복수의, 또는 모든 인간 Ig J<sub>H</sub> 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0322] 실시예 8. 실시예 6 또는 7에 있어서, (II)의 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절 및 (III)의 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 유전자 분절이, 재조합되고 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성해서 재조합 핵산 분자가 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 으로
- [0323] 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및
- [0324] 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0325] 실시예 9. 실시예 8에 있어서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절 및 재배열된 Ig D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열이 재조합되어 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열을 형성하고,
- [0326] 여기서 앵커 변형된 Ig 중쇄 가변 도메인은 작동가능한 연결로:

- [0327] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0328] (ii) 앵커, 및
- [0329] (iii) 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, 상보성 결정 영역(CDR) 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0330] 실시예 10. 실시예 3 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절이 재배열되지 않은 변형된 Ig V<sub>H</sub> 유전자 분절인, 재조합 핵산 분자.
- [0331] 실시예 11. 실시예 6 내지 10 중 어느 하나에 있어서, Ig 중쇄 불변 영역(C<sub>H</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,
- [0332] 여기서 Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은
- [0333] (I) 변형된 Ig V<sub>H</sub> 분절,
- [0334] (II) 하나 또는 복수의 Ig D<sub>H</sub> 분절, 및
- [0335] (III) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>H</sub> 분절의 하류에서 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.
- [0336] 실시예 12. 실시예 11에 있어서, Ig C<sub>H</sub>를 암호화하는 핵산 서열은 IgM 이소형을 암호화하는 Ig μ 유전자, IgD 이소형을 암호화하는 Ig δ 유전자, IgG 이소형을 암호화하는 Ig γ 유전자, IgA 이소형을 암호화하는 Ig α 유전자, 및/또는 IgE 이소형을 암호화하는 Ig ε 유전자를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0337] 실시예 13. 실시예 3 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 앵커-변형된 Ig 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산 분자로서, 여기서 앵커-변형된 Ig 중쇄는 작동가능한 연결로:
- [0338] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0339] (ii) 앵커,
- [0340] (iii) 재배열된 Ig V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 중쇄 가변 도메인, 및
- [0341] (iv) Ig C<sub>H</sub>를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0342] 실시예 14. 실시예 11 내지 13 중 어느 하나에 있어서, Ig C<sub>H</sub>는 비-인간 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0343] 실시예 15. 실시예 14에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 설치류 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0344] 실시예 16. 실시예 15에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 랫트 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0345] 실시예 17. 실시예 15에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>H</sub>는 마우스 Ig C<sub>H</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0346] 실시예 18. 실시예 1 또는 실시예 2에 있어서, 생식계열 Ig V 유전자 분절 또는 이의 변이체가 생식계열 Ig 경쇄 가변 (V<sub>L</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라
- [0347] 변형된 Ig V 분절이 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임 워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절이고,
- [0348] 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:
- [0349] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0350] (ii) 앵커, 및
- [0351] (iii) 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산

분자.

- [0352] 실시예 19. 실시예 18에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:
- [0353] (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절, 및
- [0354] (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 (J<sub>L</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0355] 실시예 20. 실시예 19에 있어서, 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및 하나 또는 복수의 Ig J<sub>L</sub> 분절이 재조합되어 앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열을 형성하고,
- [0356] 앵커 변형된 Ig 경쇄 가변 도메인은 작동가능한 연결로:
- [0357] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0358] (ii) 앵커, 및
- [0359] (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0360] 실시예 21. 실시예 19 또는 20에 있어서, Ig 경쇄 불변 영역(C<sub>L</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,
- [0361] Ig C<sub>L</sub>을 암호화하는 상기 핵산 서열은:
- [0362] (I) 변형된 Ig V<sub>L</sub> 분절 및
- [0363] (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합(J<sub>L</sub>) 분절의 하류에 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.
- [0364] 실시예 22. 실시예 18 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 앵커-변형된 Ig 경쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산 분자로서, 앵커-변형된 Ig 경쇄는 작동가능한 연결로:
- [0365] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0366] (ii) 앵커,
- [0367] (iii) 재배열된 Ig V<sub>L</sub>/J<sub>L</sub> 서열에 의해 암호화된 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함하는 Ig 경쇄 가변 도메인, 및
- [0368] (iv) Ig C<sub>L</sub>을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0369] 실시예 23. 실시예 21 또는 22에 있어서, Ig C<sub>L</sub>은 비-인간 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0370] 실시예 24. 실시예 23에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 설치류 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0371] 실시예 25. 실시예 23에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 랫트 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0372] 실시예 26. 실시예 23에 있어서, 비-인간 Ig C<sub>L</sub>은 마우스 Ig C<sub>L</sub>인, 재조합 핵산 분자.
- [0373] 실시예 27. 실시예 18 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 카파(V<sub>K</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라
- [0374] 변형된 Ig V 분절은 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>K</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절이고,
- [0375] 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:
- [0376] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0377] (ii) 앵커, 및

- [0378] (iii) 생식계열 Ig V<sub>K</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0379] 실시예 28. 실시예 27에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:
- [0380] (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및
- [0381] (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 카파(J<sub>K</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0382] 실시예 29. 실시예 28에 있어서, Ig 경쇄 불변 카파 영역(C<sub>K</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,
- [0383] 여기서 Ig C<sub>K</sub>를 암호화하는 핵산 서열은:
- [0384] (I) 변형된 Ig V<sub>K</sub> 분절, 및
- [0385] (II) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>K</sub> 분절의 하류에서 작동가능하게 연결된, 재조합 핵산 분자.
- [0386] 실시예 30. 실시예 18 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 생식계열 Ig V<sub>L</sub> 분절 또는 이의 변이체는 생식계열 Ig 경쇄 가변 람다 (V<sub>λ</sub>) 분절 또는 이의 변이체이고, 이에 따라
- [0387] 변형된 Ig V 분절은 Ig 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열과 생식계열 Ig V<sub>λ</sub> 분절 또는 이의 변이체의 프레임워크 영역(FR) 1, 상보성 결정 영역(CDR)1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 암호화하는 핵산 서열 사이의 앵커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절이고,
- [0388] 앵커 변형된 Ig 폴리펩티드는 작동가능한 연결로:
- [0389] (i) Ig 신호 펩티드,
- [0390] (ii) 앵커, 및
- [0391] (iii) 생식계열 Ig V<sub>λ</sub> 분절 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0392] 실시예 31. 실시예 30에 있어서, 작동가능한 연결로 5' 에서 3' 로:
- [0393] (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, 및
- [0394] (II) 하나 또는 복수의 Ig 경쇄 결합 람다(J<sub>λ</sub>) 분절을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0395] 실시예 32. 실시예 31에 있어서, Ig 경쇄 불변 람다 영역(C<sub>λ</sub>)을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 핵산 분자로서,
- [0396] Ig C<sub>λ</sub>를 암호화하는 핵산 서열은:
- [0397] (I) 변형된 Ig V<sub>λ</sub> 분절, 및
- [0398] (II) 하나 또는 복수의 Ig J<sub>λ</sub> 분절의 하류에서 작동가능하게 연결되는, 재조합 핵산 분자.
- [0399] 실시예 33. 실시예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 앵커는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체 결합 부분을 생식계열 Ig V 분절, 또는 이의 변이체의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, 및 CDR3에 연결하는 링커를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0400] 실시예 34. 실시예 33에 있어서, 링커는 서열 GGGGS(서열번호 5)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0401] 실시예 35. 실시예 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 앵커는 나트륨이노 펩티드(NP)의 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR) 결합 부분을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0402] 실시예 36. 실시예 35에 있어서, NP의 NPR 결합 부분은 NP의 C-말단 꼬리를 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0403] 실시예 37. 실시예 35 또는 36에 있어서, NP는 심방 나트륨 이노 펩티드(ANP)인, 재조합 핵산 분자.
- [0404] 실시예 38. 실시예 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 앵커는 서열 NSFRY(서열번호 3)를 포함하는, 재조합 핵산 분자.

- [0405] 실시예 39. 실시예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 8 또는 이의 퇴화 변이체로 제시된 서열, 서열번호 10 또는 이의 퇴화 변이체로 제시된 서열, 이의 퇴화 변이체인 서열번호 11, 및 서열번호 12 또는 이의 퇴화 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 재조합 핵산 분자.
- [0406] 실시예 40. 실시예 1 내지 10 및 33 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 C<sub>H</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나, 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0407] 실시예 41. 실시예 40에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>H</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0408] 실시예 42. 실시예 40 또는 41에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0409] 실시예 43. 실시예 40 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절 또는 모든 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 분절, 및 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 분절 제외한 모든 것을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0410] 실시예 44. 실시예 40 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.
- [0411] 실시예 45. 실시예 40 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 5' 상동성 암은 서열번호 11로서 제시된 서열을 포함하고/하거나 3' 상동성 암은 서열번호 12로서 제시된 서열을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0412] 실시예 46. 실시예 1 내지 17 및 33 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 비-인간 Ig 중쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 중쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 중쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및/또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0413] 실시예 47. 실시예 46에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 중쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 중쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V<sub>H</sub> 분절, 모든 비-인간 D<sub>H</sub> 유전자 분절, 모든 비-인간 J<sub>H</sub> 유전자 분절, 및 하나 이상의 비-인간 C<sub>H</sub> 유전자를 치환하는, 표적화 벡터.
- [0414] 실시예 48. 실시예 1 내지 2, 18 내지 20, 27 내지 28, 30 내지 31, 및 33 내지 38 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig C<sub>L</sub>의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V<sub>L</sub> 및/또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0415] 실시예 49. 실시예 48에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 V<sub>L</sub> 분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0416] 실시예 50. 실시예 48 또는 실시예 49에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합

시, 재조합 핵산 분자는 이상의 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_L$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.

- [0417] 실시예 51. 실시예 48 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 모든 비-인간  $V_L$  분절 및 모든 비-인간  $J_H$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0418] 실시예 52. 실시예 48 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 중쇄 좌위는 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.
- [0419] 실시예 53. 실시예 1 내지 2, 18 내지 38 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이에 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄 좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig 경쇄 조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄 좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄 좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄 좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_L$  및/또는  $J_L$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0420] 실시예 54. 실시예 53에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄 좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간  $V_L$  분절, 모든 비-인간  $J_L$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_L$  유전자를 치환하는, 표적화 벡터.
- [0421] 실시예 55. 실시예 1 내지 2, 18 내지 20, 27 내지 28, 및 33 내지 38 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이에서 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위가 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig  $C_\kappa$ 의 상류에서 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하며, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig  $V_\kappa$  및/또는  $J_\kappa$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.
- [0422] 실시예 56. 실시예 55에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자가 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_\kappa$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0423] 실시예 57. 실시예 55 또는 실시예 56에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 하나 이상의 비-인간  $V_\kappa$  분절 및 모든 비-인간  $J_\kappa$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0424] 실시예 58. 실시예 55 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서의 모든 비-인간  $V_\kappa$  분절 및 모든 비-인간  $J_\kappa$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0425] 실시예 59. 실시예 55 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위는 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.
- [0426] 실시예 60. 실시예 1 내지 2 및 18 내지 29 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위가 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하는, 표적화 벡터.
- [0427] 실시예 61. 실시예 60에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\kappa$  좌위에서 비-인간  $V_\kappa$  분절, 모든 비-인간  $J_\kappa$  유전자 분절, 및 비-인간  $C_\kappa$  유전자를 치환하는, 표적화 벡터.
- [0428] 실시예 62. 실시예 1 내지 2, 18 내지 20, 30 내지 31, 및 33 내지 38 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 비-인간 Ig  $C_\lambda$ 의 상류에서 작동가능한 연

결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하고, 선택적으로 여기서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 내인성 설치류 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위이고/이거나 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 내인성 Ig V $\lambda$  및/또는 J $\lambda$  유전자 분절의 결실, 또는 이들의 조합을 포함하는, 표적화 벡터.

- [0429] 실시예 63. 실시예 62에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 V $\lambda$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0430] 실시예 64. 실시예 62 또는 실시예 63에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄 좌위에서 하나 이상의 비-인간 V $\lambda$  분절 및 모든 비-인간 J $\lambda$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0431] 실시예 65. 실시예 62 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서의 모든 비-인간 V $\lambda$  분절 및 모든 비-인간 J $\lambda$  분절을 치환하는, 표적화 벡터.
- [0432] 실시예 66. 실시예 62 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위는 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하는, 표적화 벡터.
- [0433] 실시예 67. 실시예 1 내지 2, 18 내지 26, 및 30 내지 38 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 포함하는 표적화 벡터로서, 여기서 표적화 벡터는 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 표적화된 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위가 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  조절 서열에 작동가능한 연결로 재조합 핵산 분자를 포함하도록 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위를 표적화하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함하는, 표적화 벡터.
- [0434] 실시예 68. 실시예 67에 있어서, 표적화 벡터와 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위 사이의 상동성 재조합 시, 재조합 핵산 분자는 비-인간 Ig 경쇄  $\lambda$  좌위에서 비-인간 V $\lambda$  분절, 모든 비-인간 J $\lambda$  유전자 분절, 및 비-인간 C $\lambda$  유전자를 치환하는, 표적화 벡터.
- [0435] 실시예 69. 실시예 1 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자 또는 실시예 40 내지 68 중 어느 하나의 표적화 벡터를 포함하는 비-인간 동물 계통으로서, 선택적으로 여기서 비-인간 동물은 설치류이고, 선택적으로 여기서 설치류는 랫트 또는 마우스인, 비-인간 동물 계통.
- [0436] 실시예 70. 실시예 69에 있어서, 재조합 핵산은 비-인간 동물 계통의 내인성 Ig 좌위에 있는, 비-인간 동물 계통.
- [0437] 실시예 71. 실시예 1 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자, 실시예 40 내지 68 중 어느 하나의 표적화 벡터, 또는 실시예 69 또는 실시예 70의 비-인간 동물 계통을 포함하는 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포.
- [0438] 실시예 72. 실시예 71에 있어서, 재조합 핵산 분자, 표적화 벡터, 또는 비-인간 동물 계통은 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포의 생식계열에 있는, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포.
- [0439] 실시예 73. 실시예 1 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 포함하는 단리된 세포를 변형하는, 시험관 내 방법.
- [0440] 실시예 74. 실시예 73에 있어서, 도입하는 단계는 실시예 40 내지 68 중 어느 하나의 표적화 벡터와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 시험관 내 방법.
- [0441] 실시예 75. 실시예 73 또는 실시예 74에 있어서, 세포는 숙주 세포인, 시험관 내 방법.
- [0442] 실시예 76. 실시예 73 또는 실시예 74에 있어서, 세포는 배아 줄기(ES) 세포인, 시험관 내 방법.
- [0443] 실시예 77. 실시예 73 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 세포는 설치류 세포이고, 선택적으로 설치류 세포는 랫트 세포 또는 마우스 세포인, 시험관 내 방법.
- [0444] 실시예 78. 실시예 76의 배아 줄기 세포로부터 생성된 비-인간 동물 배아.
- [0445] 실시예 79. 실시예 76의 배아 줄기 세포로부터 생성된 비-인간 동물
- [0446] 실시예 80. 실시예 76의 ES 세포 또는 ES 세포를 포함하는 배아를 적절한 숙주 내에 이식하는 단계 및 ES 세포

또는 배아가 생존 가능한 자손으로 발달하는 동안 적절한 조건 하에서 숙주를 유지하는 단계를 포함하는, 비-인간 동물의 제조 방법.

- [0447] 실시예 81. 실시예 71 내지 72 및 79 중 어느 하나의 비-인간 동물 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 대조군 비-인간 동물과 비교하여:
- [0448] (a) 필적할 만한 수의 비장 내 성숙한 B 세포,
- [0449] (b) 필적할 만한 수의 비장 내 카파 양성 B 세포,
- [0450] (c) 필적할 만한 수의 비장 내 람다 양성 B 세포,
- [0451] (d) 필적할 만한 수준의 혈청 IgG 및/또는
- [0452] (e) 필적할 만한 수준의 혈청 IgM을 포함하는, 비-인간 동물.
- [0453] 실시예 82. 실시예 71 내지 72, 79 및 81 중 어느 하나의 비-인간 동물, 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물이 대조군 비-인간 동물에 필적할 만한 면역-반응을 수용할 수 있는, 비-인간 동물.
- [0454] 실시예 83. 실시예 71 내지 72, 79 및 81 내지 82 중 어느 하나의 비-인간 동물 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 각각 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 포함하는 복수의 항원-결합 단백질을 포함하는 비-인간 동물로서, 선택적으로:
- [0455] 여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,
- [0456] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,
- [0457] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 비-인간 동물.
- [0458] 실시예 84. 실시예 71 내지 72, 79 및 81 내지 83 중 어느 하나의 비-인간 동물 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체를 추가로 포함하는, 비-인간 동물.
- [0459] 실시예 85. 실시예 71 내지 72, 79 및 81 내지 84 중 어느 하나의 비-인간 동물 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 각각 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드를 포함하고 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 동족 수용체에 특이적으로 결합하는 복수의 항원-결합 단백질을 포함하는 비-인간 동물로서, 선택적으로:
- [0460] 여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,
- [0461] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,
- [0462] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 비-인간 동물.
- [0463] 실시예 86. 실시예 84 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 동족 수용체는 나트륨이노 펩티드 수용체(NPR)인, 비-인간 동물.
- [0464] 실시예 87. 실시예 84 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질 각각은  $1 \times 10^9$  미만의 KD 및/또는 30분 초과  $t_{1/2}$ 를 포함하는, 비-인간 동물.
- [0465] 실시예 88. 실시예 84 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질의 적어도 15%는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 동족 수용체의 결합을 차단하는, 비-인간 동물.
- [0466] 실시예 89. 실시예 84 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 복수의 항원-결합 단백질 중 50% 초과는 세포 표면 상에서 발현된 동족 수용체에 결합하는, 비-인간 동물.
- [0467] 실시예 90. 실시예 71 내지 72, 79, 및 81 내지 89 중 어느 하나의 비-인간 동물, 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물에 있어서, 비-인간 동물은 설치류이고, 선택적으로 여기서 설치류는 랫트 또는 마우스

인, 비-인간 동물.

- [0468] 실시예 91. 항원-결합 단백질을 생산하거나 이를 암호화하는 핵산을 수득하는 방법으로서, 상기 방법은
- [0469] 실시예 71 내지 72, 79, 및 81 내지 90 중 어느 하나의 비-인간 동물, 또는 실시예 80의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물을 항원으로 면역화하는 단계,
- [0470] 비-인간 동물이 항원에 결합하는 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 항원-결합 단백질을 생산할 수 있게 하고, 선택적으로:
- [0471] 여기서 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,
- [0472] 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,
- [0473] 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 방법.
- [0474] 실시예 92. 실시예 91에 있어서, 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포로부터 항원 결합 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0475] 실시예 93. 실시예 92에 있어서, 비-인간 동물 세포는 B 세포 또는 하이브리도마인, 방법.
- [0476] 실시예 94. 실시예 91의 방법에 따라 회수된, 비-인간 동물 세포.
- [0477] 실시예 95. 실시예 94에 있어서, 비-인간 동물 세포는 B 세포인, 비-인간 동물 세포.
- [0478] 실시예 96. 실시예 94 또는 95에 있어서, B 세포는 마우스 B 세포인, 비-인간 동물 세포.
- [0479] 실시예 97. 골수종 세포와 융합된 실시예 94 내지 95 중 어느 하나의 비-인간 동물 세포를 포함하는, 하이브리도마 세포.
- [0480] 실시예 98. 실시예 1 내지 39 중 어느 하나의 재조합 핵산 분자, 실시예 40 내지 68 중 어느 하나의 표적화 벡터, 실시예 69 내지 70 중 어느 하나의 비-인간 동물 계통에 의해 암호화된, 실시예 71 내지 72 및 81 내지 90 중 어느 하나의 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, 실시예 73 내지 76 및 80 중 어느 하나의 방법에 따라 제조된 비-인간 동물 또는 비-인간 동물 세포에 의해 발현된, 또는 실시예 91 내지 93 중 어느 하나의 방법에 따라 제조된 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드로서, 선택적으로:
- [0481] 여기서 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하거나,
- [0482] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석에 의해 결정되거나,
- [0483] 각각의 항원-결합 단백질의 질량은 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드의 존재를 확인하고, 각각의 항원 결합 단백질의 질량은 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법에 의해 결정되는, 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드.
- [0484] 실시예 99. 실시예 98에 있어서, 이의 N-말단에서 서열번호 3으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 앵커-변형된 Ig 폴리펩티드.
- [0485] 상기 설명된 실시예들의 다른 특징은 예시적인 실시예들에 대한 다음의 설명 과정에서 명백해질 것이며, 이들 실시예는 예시를 위해 제공되고 이를 제한하도록 의도되지 않는다.
- [0486] **실시예**
- [0487] 다음의 실시예는 당 기술분야의 숙련자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 어떻게 제조하고 사용하는지를 설명하기 위해 제공되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주한 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 달리 명시되지 않는 한, 온도는 섭씨로 표시되고, 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다.
- [0488] **예 1. ANP-변형된 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 가변 영역의 작제물**
- [0489] 이러한 비제한적인 예는 앵커-변형된 면역글로불린(Ig) 가변 영역(V) 유전자 분절을 면역글로불린 좌위의 면역글로불린 가변 영역으로 통합하기 위한 표적화 벡터의 작제물을 예시한다. 후술하는 바와 같이, ANP C-말단 꼬리의 암호화 서열은 Ig V 유전자 분절과 작동가능한 연결로 배치되고, 변형된 Ig V 분절은 Ig 결합(J) 유전자 분절과 작동가능한 연결로 배치되고, 적절한 경우 Ig 다양성(D) 유전자 분절과 작동가능한 연결로 배치될 수 있

으므로, V(D)J 재조합 시, 면역글로불린 폴리펩티드 사슬의 N-말단에서 ANP C-말단 꼬리를 포함하는 항체가 발현된다.

[0490] 면역글로불린 중쇄 가변 영역 내로의 삽입을 위한 ANP- 변형된  $V_H$  유전자 분절을 함유하는 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술(예컨대, 미국특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 등, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조; 참조로서 본원에 통합됨) 및 당 기술분야에 공지된 분자 생물학적 기법을 사용하여 생성하였다. ANP의 C-말단 꼬리를 암호화하는 서열을 사용하여 표적화 벡터를 삭제하기 위한 비제한적인 예시적 전략은 **도 1 내지 2**에 제시되어 있다.

[0491] 펩티드 링커를 암호화하는 서열을 통해 ANP의 C-말단 꼬리를 포함하는 공여자 DNA 분절을 생식계열  $V_H1-69$  유전자 분절 내로 삽입하는 것을, 새로운 DNA 합성법(Blue Heron Biotech, 워싱턴주 보셀 소재)에 의해 수행하였다. **도 1**은 “p466090” ANP- $V_H1-69$  Cas9 공여자 단편을 도시한다. 스펙티노마이신-내성 카세트 “SPEC”를 공여자 플라스미드 p46609의 EcoRI 및 AvrII 부위에 연결시켜 플라스미드 p46685를 만들었다(**도 1**). **도 2**에 도시된 것은 생성된 공여자 플라스미드 p46609의 보다 상세한 도면이다.

[0492] 공여자 단편을 사용하여 BAC 클론 VI504(MAID6211)를 변형시켰다. **도2**를 참조한다. BAC 클론 VI504는, 5' 에서 3' 으로서, 약 20 kb의 5' 약 20kb 5' 마우스 상동성 압, 마우스 Adam6a 유전자 “a”, Frt-Ub-Hyg-Frt 카세트, 및 마우스 Adam6b 유전자 “b”를 함유하는 약 15kb I-CeuI-AscI 단편, 생식계열 인간  $V_H1-69$  유전자를 함유하는 약 9kb AscI-AsiSI 단편, 인간  $D_H$  및 인간  $J_H$  유전자를 함유하는 약 60kb 단편, 및 마우스 IgH 인트론 인핸서(채워진 타원형), IgM 스위치 영역, 및 마우스 IgM 유전자의 부분을 함유하는 약 ~8kb 3' 마우스 상동성 압을 포함한다(**도 3**).

[0493] 단계 1에서, 생식계열  $V_H1-69$  유전자의 5' 및 3' 을 절단하는 2개의 gRNA의 혼합물과 복합체를 형성한 Cas9로 VI504를 시험관 내에서 소화시켰다. 생성된 3' 및 5' 말단은 p46685의 말단과 60 bp 중첩된다. 그런 다음, p46685의 XhoI 단편을 Gibson Assembly에 의해 VI504(MAID6211)와 조립하여 VI738을 제조하였다. 단계 2에서, VI738을 MreI로 소화시켜 스펙티노마이신-내성 카세트를 제거하였다. 그런 다음, BAC를 접합자 올리고-매개된 Gibson Assembly에 의해 복구하여, 매끄러운(seamless) 접합부( $\Delta$ MreI)를 남기고, 최종 LTVEC VI748(MAID6833)을 제조하였다. LTVEC는 VI748에서 ANP-G4S 코돈의 삽입을 제외하고는 VI504와 동일하였다.

[0494] 본원에 기술된 바와 같은 공여자 단편의 정확한 조립 및 BAC 클론 VI504의 생식계열(GL)  $V_H1-69$  유전자 분절의 본원에 기술된 바와 같은 NP-변형된  $V_H1-69$  유전자 분절로의 표적화된 치환을 표 1에 제시된 프라이머를 사용하여 표적화 벡터의 삭제 전반에 걸쳐 시퀀싱하고 중합효소 연쇄 반응에 의해 확인하였다.

**표 1**

| 단계  | 접합    | 프라이머 명칭             | 프라이머 서열<br>(서열번호)                  | Jxn PCR(bp) |
|---|-------|---------------------|------------------------------------|-------------|
| A. pSVi0029를 p46609로 EcoRI/AvrII 연결시켜 p46685를 제조함 |       |                     |                                    |             |
| Jxn PCR   | EcoRI | 5' 검출 $V_H1-69$ FR3 | ACAGAAGTTCCAGGGCAGAG<br>(서열번호 18)  | 302         |
|   |       | 3' 상류 검출 세부사항       | TGTCCACTGGGTTCGTGCCTT<br>(서열번호 19) |             |
| Jxn PCR   | AvrII | 5' 하류 검출 세부사항       | CAGTATCAGCCGTCATACTT<br>(서열번호 20)  | 197         |
|   |       | 3' $V_H1-69$ 중첩 검출  | TAACCCTGTCATCTCCTC<br>(서열번호 21)    |             |
| 1. VI504의 Cas9/GA (MAID6211) + p46685=VI738       |       |                     |                                    |             |

|   |                        |                                      |   |     |
|---|------------------------|--------------------------------------|---|-----|
| Cas9  |                        | 5' DNA 표적(PAM)                       | GGATCCTGGTTTAGTTAAAG(AGG)<br>(서열번호 22)  |     |
|   |                        | 5' V <sub>H</sub> 1-69 Cas9 crRNA    | GGAUCCUGUUUAGUAAAAG<br>GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG<br>(서열번호 23)  |     |
|   |                        | 3' DNA 표적(PAM)                       | GACAAAAACCTGAGGGAGA(AGG)<br>(서열번호 24)   |     |
|   |                        | 3 V <sub>H</sub> 1-69 Cas9 crRNA     | GACAAAAACCCUGAGGGAGA<br>GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG<br>(서열번호 25)   |     |
| Jxn PCR   | 5' V <sub>H</sub> 1-69 | 5' 상류 검출 V <sub>H</sub> 1-69         | CTGTGAAATACCCTGCCTC<br>(서열번호 26)  | 797 |
|   |                        | 3' 상류 검출 세부사항                        | TGTCCACTGGGTTCGTGCCTT<br>(서열번호 27)  |     |
| Jxn PCR   | 3' V <sub>H</sub> 1-69 | 5' 하류 검출 세부사항                        | CAGTATCAGCCCGTCATACTT<br>(서열번호 28)  | 631 |
|   |                        | 3' 하류 검출 M1116(h70)                  | CCCCCTCTTGCTCTTTCT<br>(서열번호 29)   |     |
| 2. 접합자 올리고-매개된 GA= VI748/MAID6822에 의한 VI738로부터의 MreI_Spec의 결실 |                        |                                      |   |     |
| 접합자 올리고   |                        | V <sub>H</sub> 1-69 MreI del 접합자 올리고 | GTGAAAACCCACATCTGAGAGT<br>G<br>ACAAAAACCTGAGGGAGAAGGC<br>AGCTGTGCCGGGCTGAGGAGATG<br>ACAGGGGTTA<br>(서열번호 30) |     |
| Jxn PCR   | △MreI                  | 5' 검출 V <sub>H</sub> 1-69 FR3        | ACAGAAGTTCAGGGCAGAG<br>(서열번호 31)  | 634 |
|   |                        | 3' 하류 검출 M1116(h70)                  | CCCCCTCTTGCTCTTTCT<br>(서열번호 32)   |     |

[0496] **예 2. NP-변형된 V<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함하는 설치류의 생성**

[0497] 본 예는 게놈이 NP-변형된 V<sub>H</sub> 유전자 분절, 예를 들어, ANP의 C-말단 꼬리를 포함하는 V<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 비-인간 동물(예를 들어, 설치류)의 생산을 입증한다.

[0498] VI748 표적화 벡터를 선형화하고, 가장 5' V<sub>H</sub>1-86 분절(1115KO)을 제외한 모든 내인성 V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, 및 J<sub>H</sub> 분절의 결실을 포함하는 내인성 Ig 중쇄 가변 영역 좌위에 대해 동형접합이고, 모든 내인성 V<sub>K</sub> 및 J<sub>K</sub> 절편을 인간 V<sub>K</sub> 및 J<sub>K</sub> 절편의 완전한 레퍼토리로 대체하는 것을 포함하는 내인성 Ig 경쇄 가변 영역 κ 유전자좌에 대해 동형접합인 게놈을 갖는 마우스 배아 줄기 세포 내로 전기천공하였다. 각각의 표적화 벡터의 전기천공에 사용된 ES 세포의 Ig 중쇄 좌위(50% Balb, 25% C57BL/6, 25% 129 배경)가 도 4에 도시되어 있다. 전기천공 후, 전기천공된 세포를 선별 배지에서 배양하였다. 전기천공 후 10일차에 약물-내성 콜로니를 피킹(picking)하고 이전에 기술된 바와 같이(Valenzuela 등, *상기*; Friendewey, D. 등, 2010, *Methods Enzymol.* 476:295-307, 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨), 앵커 변형된 V<sub>H</sub>1-69 유전자 분절의 적절한 통합을 검출하는 프라이머/프로브 세트를 사용하여 정확한 표적화를 위해 TAQMAN™ 및 핵형분석에 의해 스크리닝하였다.

[0499] 정방향 프라이머: TGTGTCCTGTCACAGGTG(서열번호 34)

[0500] 프로브: CCAAGTCCAACAGTTCGGTACG (서열번호 35)  
 [0501] 역방향 프라이머: CAGCTGGACCTGGCTACC (서열번호 36)  
 [0502] VELOCIMOUSE® 방법(DeChiara, T.M. 등, 2010, Methods Enzymol. 476:285-294; DeChiara, T.M., 2009, Methods Mol. Biol. 530:311-324; Poueymirou 등, 2007, Nat. Biotechnol. 25:91-99; 그 전문이 참조로서 본원에 통합됨)을 사용하여, 표적화된 ES 세포를 미압축된 8-세포 단계의 Swiss Webster 배아 내로 주입하여, 앵커 (ANP) 변형된 V<sub>H</sub> 분절에 대해 이형접합성이며 앵커 (ANP) 변형된 항체를 발현하는 건강하고 완전한 ES 세포-유래 F0 세대 마우스를 생산하였다. 이러한 변형된 마우스는 본원에서 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로 지칭된다.

[0503] 예컨대, ES 세포 단계 또는 배아 단계에서 제거되지 않은 표적화 작제물에 의해 도입된 임의의 lox 선택된 카세트 제거하기 위해, 재조합 효소의 후속 첨가에 의해 (예컨대, Cre 처리에 의해) 또는 Cre deleter 마우스 균주 (예컨대, 국제 특허 출원 공개 WO 2009/114400호 참조)과의 교배에 의해 약물 선별 카세트를 선택적으로 제거할 수 있다. 선택적으로, 선별 카세트를 마우스 내에 유지시킬 수 있다.

[0504] **예 3. 유세포 분석으로 설치류의 면역 표현형 분석**

[0505] ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 면역 표현형을 결정하기 위해, 골수 및 비장 B 세포를 유세포 측정법으로 분석하였다. 본 연구를 위해, 2마리의 VELOCIMUNE® 대조군 마우스(예를 들어, 미국특허 제8,502,018호; 제8,642,835호; 제8,697,940호를 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 및 예 2에 기술된 3마리의 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스를 희생시키고 이들의 비장 및 골수를 수확하였다. 2분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 대퇴골로부터 골수를 채취하였다. 비장을 단일 세포 현탁액에 대해 해리시켰다. 비장 및 골수 준비로부터의 적혈구 세포를 ACK 세포용해 완충액으로 세포용해하고 2% FBS를 함유하는 DPBS로 세척하였다. 단리된 세포(총 1x10<sup>6</sup>)를 항-마우스 CD16/CD32(클론 2.4G2, BD)와 함께 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션한 다음, 표 2에 기술된 항체 패널로 얼음 상에서 30분 동안 표지하였다.

**표 2**

유세포 측정법에 사용된 Ab의 패널

[0506]

| 골수 성숙 Ab 패널      |           |             |
|------------------|-----------|-------------|
| 항원               | 클론        | 소스          |
| CD43             | 1B11      | BioLegend   |
| c-키트             | 2B8       | BioLegend   |
| IgM              | II/41     | eBioscience |
| IgD              | 11-26c.2a | BioLegend   |
| B220             | RA3-6B2   | eBioscience |
| CD19             | ID3       | BD          |
| CD3              | 17-A2     | BioLegend   |
| 골수 및 비장 카파/람다 패널 |           |             |
| 항원               | 클론        | 소스          |
| IgK              | 187.1     | BD          |
| IgL              | RML-42    | BioLegend   |
| IgM              | II/41     | eBioscience |
| IgD              | 11-26c.2a | BioLegend   |
| CD3              | 17A2      | BioLegend   |
| B220             | RA3-6B2   | eBioscience |
| CD19             | ID3       | BD          |
| 비장 성숙 패널         |           |             |
| 항원               | 클론        | 소스          |
| CD23             | B3B4      | BioLegend   |
| CD93             | AA4.1     | BioLegend   |
| IgM              | II/41     | eBioscience |
| IgD              | 11-26c.2a | BioLegend   |
| CD19             | ID3       | BD          |
| CD21/35          | 7G6       | BD          |

|      |         |             |
|------|---------|-------------|
| B220 | RA3-6B2 | eBioscience |
|------|---------|-------------|

- [0507] 염색한 후, 세포를 세척하고 2% 포름알데히드로 고정시켰다. BD LSRFortessa 유동 세포 계측기 상에서 데이터 수집을 수행하고 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 다음의 전략을 사용하여 세포의 하위 집합을 식별하였다. 골수 성숙: 미성숙 B 세포(B220int IgM+), 성숙 B 세포(B220high IgM+), pro-B 세포(IgM- B220int, c-KitintCD43high), pre-B 세포(IgM- B220int, c-Kit-CD43int). 비장 및 골수카과/람다: B 세포(CD19+ CD3-), T 세포(CD3+ CD19-), IgK+ B 세포(CD19+ IgK+ IgL-), IgL+ B 세포(CD19+ IgK- IgL+). 비장 성숙: 성숙 B 세포(CD19+, B220+ CD93-), 난포성 B 세포(CD19+, B220+ CD93-, CD21/35int IgMint/+), 변연부 B 세포(CD19+, B220+ CD93-, CD21/35+ IgM+), 전이 B 세포(CD19+, B220+ CD93+), T1 B 세포(CD19+, B220+ CD93+, IgM+ CD23-), T2 B 세포(CD19+, B220+ CD93+, IgM+ CD23+), 및 T3 B 세포(CD19+, B220+ CD93+, IgMint CD23+).
- [0508] 도 5a 내지 5f에 도시된 바와 같이, 비장에서, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교했을 때 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서 유사한 수준의 B 세포가 있었다. ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서 성숙한 B 세포의 빈도는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스에서 관찰된 것과 유사한 것으로 보이지만, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 미성숙 세포에서 약간의 감소가 있었다. 비장에서, 람다 및 카파 양성 B 세포의 빈도는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서 유사하다.
- [0509] 도 6a 내지 6f에 도시된 바와 같이, 골수에서, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서 유사한 수준의 B 세포가 있었다. 골수에서, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서 더 많은 pro-B 세포 및 더 적은 pre-B 세포가 있었다. VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 골수에는 덜 성숙하고 더 미성숙한 B 세포가 있었다.
- [0510] 추가 면역 표현형 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스를 위해, 웨스턴 블롯을 통해 마우스 IgG의 수준을 분석하였다. 분석을 위해, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스의 하위 집합으로부터 혈액을 채취하였다. 혈청 분리관(BD)에 혈청을 수집하고, 30분 동안 인큐베이션하고, 4°C에서 5분 동안 9000 rcf에서 원심분리하여 혈액으로부터 분리하였다. 마우스 혈청을 PBS 중에서 1:25로 희석한 다음, 비환원 조건 하에서 4-20% Novex Tris-글리신 겔 상에서 수행하였다. 제조사의 사양(BioRad Trans-Blot Transfer System)에 따라 겔을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막으로 옮겼다. 0.05% Tween-20 (TBST, Sigma)이 함유된 트리스 완충 식염수 중 10% 무지방 우유로 밤새 블롯을 차단하였다. 항-마우스 IgG-HRP(Thermo/Pierce, Cat #31432)로 PVDF 막을 TBST 중 4% 무지방 우유 중 1:20,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 블롯을 각 세척 당 5분 동안 5회 세척한 다음 제조사의 사양에 따라 Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare Life Sciences)으로 1분 동안 전개시켰다. 그런 다음, GE Healthcare ImageQuant LAS-4000 Cooled CCD Camera Gel Documentation System을 사용하여 블롯을 촬영하였다. 20개의 이미지가 캡처되거나 이미지들이 완전히 노출되는 것 중 어느 하나가 될 때까지 15초 간격으로 이미지를 캡처하였다.
- [0511] 도 7에 도시된 바와 같이, 혈청 IgG 수준은 웨스턴 블롯에 의해 측정했을 때 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스와 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 간에 비슷하였다. 이러한 결과는 ANP 마우스 Designer V 마우스가 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 정상 Ab 수준을 가짐을 시사한다.
- [0512] 추가 면역 표현형 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스를 위해, 총 혈청 IgM 및 IgG의 수준을 ELISA에 의해 측정하였다. ELISA의 경우, 플레이트를 1 µg/mL의 항-마우스 IgM+IgG+IgA(Clone Ab102445, Abcam)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 그런 다음, 플레이트를 0.1% Tween-20으로 DPBS에서 세척하고, DPBS 중 1% BSA에서 실온에서 1시간 동안 차단하였다. ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 또는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 및 마우스 IgM 표준(Biolegend, Cat# 401604) 또는 마우스 IgG 표준(Sigma, Cat# I8765)을 위한 혈청을 DPBS 중 1% BSA에서 연속 희석하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 0.1% Tween-20으로 DPBS에서 세척하고, 항-마우스 IgM-HRP(Southern Biotech, Cat #1021-05) 또는 항-마우스 IgG-HRP(Southern Biotech, Cat #1030-05)를 사용하여 IgM 또는 IgG를 검출하였다. 추가 세척을 수행한 다음, TMB 기제(BD)를 첨가하였다. 발색을 허용한 후, 반응을 1N 황산으로 정지시키고 SpectraMax 플레이트 판독기 상에서 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. IgM 또는 IgG 표준의 비선형 회귀(곡선형 피트, 4개의 파라미터)를 사용하여 GraphPad Prism에서 표준 플롯을 생성하고 혈청 IgM 및 IgG 수준을 정량화하였다.

- [0513] 도 8a 내지 8b에 도시된 바와 같이, ELISA에 의해 측정된 혈청 IgG 수준은 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스와 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 간에 비슷하였다. ELISA에 의해 측정된 혈청 IgM 수준은 또한 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스와 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 간에 비슷하였다. 두 결과 모두 ANP 마우스가 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스와 비교하여 정상 Ab 수준을 가짐을 시사한다.
- [0514] 항체에 의한 앵커의 유지는 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광법(MALDI-TOF MS)에 의해 확인하였다. 단백질 A 자기 비드(Thermo Scientific)를 사용하여 마우스 혈청으로부터 단리된 면역글로불린을 환원 조건 하에 SDS-PAGE 겔에 의해 수행하여 면역글로불린 중쇄와 경쇄를 분리하였다. 면역글로불린 중쇄를 잘라내고 Lys-C 효소(Promega)로 밤새 소화시켰다. 염을 제조업체의 프로토콜에 따라 C18 Ziptip(Millipore)으로 소화물로부터 제거하였다. 펩티드를 10 mg/ml a-시아노-4-히드록시신남산(CHCA)을 함유하는 2.5 ul의 70% ACN/0.1% TFA에서 각 집팁(ziptip)으로부터 용리시키고, 70% 아세트니트릴 +0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)에 용해시킨, a-시아노-4-히드록시신남산(Protea)과 혼합된 Bruker Anchorchip Target(Bruker Daltonics)에 직접 적용하였다. 건조 시, 각 표적을 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 - 비행 시간 질량 분광분석법(MALDI-TOF MS)에 의해 Bruker Ultraflextreme MALDI MS(Bruker Daltonics) 상에서 반사-양성 모드로 분석하였다.
- [0515] MALDI-TOF MS는 ANP-변형된 면역글로불린이 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 혈청에서 온전하게 유지된다는 것을 시사한다(데이터 미도시).
- [0516] **예 4. 조작된 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 함유하는 설치류에서 항체의 생산**
- [0517] 본 예는 그의 게놈이 본원에 설명된 바와 같이 조작된 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 중쇄가변 영역을 포함하는 설치류에서의 항체 생산을 보여준다. 본 예에 기술된 방법, 및/또는 당 기술 분야에 널리 공지된 면역화 방법이 폴리펩티드 또는 이의 단편(예컨대, 원하는 에피토프로부터 유도된 펩티드), 또는 원하는 폴리펩티드 또는 이의 단편의 조합을 사용하여 본원에 기술된 바와 같은 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 함유하는 설치류를 면역화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0518] 요약하자면, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 마우스의 코호트에 당 기술분야에 공지된 면역화 방법을 사용하여 관심있는 항원, 예를 들어, 동족 수용체에 결합하는 관심있는 비-면역글로불린 폴리펩티드의 수용체를 접종하였다. 항체 면역-반응을 ELISA 면역분석법(즉, 혈청 역가)으로 모니터링하였다.
- [0519] **면역화**
- [0520] 표준 면역화 프로토콜을 사용하여, C-말단 mFc 태그(인간 NPR3 ecto-mFc로서 지칭됨)에 융합된 NPR3의 세포외 도메인으로 구성된 단백질 면역원으로 VELOCIMMUNE® 대조군(n=3) 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 (n=4) 마우스를 면역화하였다. 면역화 개시 전에 그리고 면역원 추가접종 후에 마우스를 채혈하였다. 항체 단리를 위해 마우스를 안락 사시키기 전의 마지막 출혈에 대해 인간 NPR3 단백질(myc-myc-핵사히스티딘 태그에 융합된 NPR3의 세포외 도메인으로 구성됨; 인간 NPR3 엑토-MMH로도 지칭됨) 및 조작된 인간 NPR3 발현 세포(전장 인간 NPR3을 과발현하도록 조작된 HEK293 세포; 293/hNPR3 세포로도 지칭됨)에 대한 역가 분석을 수행하였다.
- [0521] **항-혈청 역가 결정**
- [0522] NPR3에 대한 혈청 내 항체 역가를 ELISA를 사용하여 결정하였다. 96-웰 마이크로역가 플레이트(Pierce)를 4°C에서 밤새 인산염 완충 식염수(PBS, Irvine Scientific) 중 2 µg/mL의 인간 NPR3 엑토-MMH 항원으로 코팅하였다. 0.05% Tween-20이 포함된 인산염 완충 식염수(PBS-T, Sigma-Aldrich)로 플레이트를 세척하고, PBS 중 0.5% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma-Aldrich) 250 µl로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 면역 전 및 면역 항-혈청을 0.5% BSA-PBS에서 3배 연속 희석하고, 실온에서 1시간 동안 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 세척하고 염소 항-마우스 IgG-Fc- 서양 고추냉이 과산화효소(HRP) 접합된 이차 항체(Jackson Immunoresearch)를 1:5000 희석으로 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, TMB/H2O2를 기체로서 사용하여 15 내지 20분 동안 인큐베이션함으로써 현상하였다. 반응물을 산으로 정지시키고, 450 nm에서 분광광도계(Victor, Perkin Elmer) 상에서 플레이트를 판독하였다. 항체 역가는 Graphpad PRISM 소프트웨어를 사용하여 연산하였다. 역가는, 결합 신호가 배경 대비 2배인 보간된 혈청 희석 인자로서 정의되었다.
- [0523] **세포에서의 항체 역가**
- [0524] 조작된 세포에서의 항-NPR3 항체 역가는 Meso Scale Discovery(MSD) MULTI-ARRAY® 기술을 사용하여 결정하였

다. 96-웰 탄소 전극 플레이트(MSD 입수)를 37°C에서 1시간 동안 PBS 중 293/hNPR3 세포 또는 HEK293 세포의 웰 당 40,000 세포로 코팅하였다. 세포 코팅 용액을 따라내고 PBS 중 150 μL의 2% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma-Aldrich)과 함께 실온(RT)에서 1시간 동안 인큐베이션하여 차단한 후 PBS로 세척하였다. 면역 전 및 면역 항-혈청을 1% BSA-PBS에서 3배 연속 희석하고, 실온에서 1시간 동안 플레이트에 첨가한 후 세척하였다. 이어서 염소 항-마우스 IgG-Fc 루테늄 접합된 이차 항체(Jackson ImmunoResearch 및 Ruthenium 표지된 사내 제작)를 1 μg/mL로 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양했다. MSD의 4X Read Buffer T 계면활성제가 없는 것을 1X로 희석하고 150 μL를 각 웰에 첨가하고 MSD SECTOR® 이미저 기기에서 판독하였다. 항체 역가는 Graphpad PRISM 소프트웨어를 사용하여 연산하였다. 역가는, 결합 신호가 배경 대비 2배인 보간된 혈청 희석 인자로서 정의되었다.

[0525] **결과**

[0526] NPR3 엑토 단백질 면역원으로 면역화한 후, 재조합 hNPR3 단백질 및 조작된 인간 NPR3-발현 세포(HEK293/hNPR3)를 사용하여 VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스에서의 체액성 면역-반응을 결정하였다. ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스(n=4)의 항혈청은, VELOCIMMUNE® 대조군 계통(n=3)에 대한 394,032의 평균 역가와 필적할 만한 465,625의 평균 역가를 가져, hNPR3.mmh 단백질 상에서 높은 항체 역가의 범위를 나타냈다(도 9). HEK293/hNPR3 발현 세포 및 부모 HEK293 세포에서 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 평균 항체 역가는 각각 268,763 및 3,948이었으며, 이는 항-혈청이 NPR3에 특이적임을 시사한다. HEK293/hNPR3 발현 세포 및 부모 HEK293 세포에서 각각 72,826 및 5,219의 평균 항체 역가를 가져, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스에서 유사한 결과를 얻었다(도 10). 이러한 결과는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스가 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 계통과 유사한 면역-반응을 수용할 수 있음을 시사한다.

[0527] **예 4. 조작된 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 함유하는 설치류에서 생산된 항체를 암호화하는 핵산 및/또는 발현하는 세포의 단리**

[0528] 원하는 면역 반응이 달성되면, 비장세포 (및/또는 림프 조직)를 채취하고, 마우스 골수종 세포와 융합시켜 생존력을 보존하고 불멸 하이브리도마 세포주를 형성한다. 상기 하이브리도마 세포주를 스크리닝 (예컨대, ELISA 분석으로) 및 선택하여 항원-특이적 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 확인하였다. 하이브리도마를 원하는 상대적인 결합 친화도 및 이소형에 대해 추가로 특성분석할 수 있다. 이러한 기술을 사용하여, 몇몇 항원-특이적 키메라 항체 (즉, 인간 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 포함하는 항체)가 수득된다.

[0529] 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 단리하여 완전한 인간 항체의 제조를 위해 중쇄 및 경쇄의 원하는 이소형 (불변 영역)에 연결할 수 있다. 이러한 항체 단백질은 CHO 세포와 같은 세포에서 생산될 수 있다. 완전한 인간 항체는 이어서 관심 항원의 상대적인 결합 친화도 및/또는 중화 활성에 대해 특성분석된다.

[0530] 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA가 항원-특이적 림프구로부터 직접 단리될 수 있다. 초기에, 인간 가변 영역 및 설치류 불변 영역을 갖는 고친화도 키메라 항체가 단리되고 특성분석되고 친화도, 선택도, 에피토프 등을 포함하여 원하는 특성에 대해 선택된다. 설치류 불변 영역은 원하는 인간 불변 영역으로 치환되어 완전한 인간 항체가 생성된다. 선택된 불변 영역은 특이적 용도에 따라 매우 다양할 수 있지만, 고친화도 항원 결합 특성 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 존재한다. 예컨대, 구체적으로 그 내용이 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제7,582,298호에 기술된 바와 같이, 골수종 세포의 융합 없이 항원-양성 B 세포 (면역화된 마우스로부터 유래함)로부터 항원-특이적 항체가 또한 직접 단리된다. 이러한 방법을 사용하여, 몇몇 완전한 인간 항원-특이적 항체 (즉, 인간 가변 도메인 및 인간 불변 도메인)가 제조된다.

[0531] 구체적으로, NPR3 면역화된 VELOCIMMUNE® 마우스 또는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 유래의 비장세포를 C-말단 인간 Fc 태그(hNPR3 ecto-hFc) 및 미국 특허 제7,582,298호(그 전체는 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 바와 같은 FITC-항-mFc로 발현된 인간 NPR3 세포의 도메인으로 염색하였다. 단일 IgG 양성 및 항원 양성 B 세포를 형광-활성화된 세포 분류(FACS)에 의해 384-웰 플레이트의 별도의 웰로 단리하였다. 이들 B 세포로부터의 항체 유전자의 RT-PCR은 Wang 및 Stollar에 의해 기술된 방법에 따라 수행하였다(Journal of Immunological Methods 2000; 244 : 217-225, 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 간략하게, 각각의 B 세포에 대한 cDNA를 역전사효소(RT) 반응(SUPERSCRIPT™ III, Invitrogen)을 통해 합성하였다. 그런 다음, 각각의 생성된 RT 생성물을 분할하고, 중쇄 및 경쇄 서열의 증폭을 위해 별도의 384-웰 플레이트 상의 2개의 상응하는 웰로 옮겼다. 생성된 RT 생성물의 한 세트를 인간 IgG 중쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 및 마우스 중쇄 불변

영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 먼저 증폭시켜 증폭물을 형성하였다. 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 또는 ANP 펩티드에 특이적인 프라이머 세트(ANP 마우스만 해당) 및 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여, 증폭물을 제2 회차에 적용하였다. 생성된 RT 생성물의 다른 세트는 먼저 인간 카파 경쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 마우스 카파 경쇄 불변 영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켜 증폭물을 형성하였다. 인간 카파 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 인간 카파 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여 이 증폭물에 대해 제2 회차 PCR을 수행하였다. 중쇄 및 경쇄 PCR 생성을 IgG 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역을 각각 함유하는 항체 벡터 내에 클로닝하였다. 제조항 hIgG1 항체는 추가 스크리닝을 위해 CHO K1 세포의 일시적 형질감염에 의해 생산하였다.

[0532] **예 5: CHO K1 세포로부터 단리된 상등액의 일차 스크리닝**

[0533] CHO K1 형질감염된 세포로부터 수집한 상등액, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 수집한 146개 상등액 및 VELOCIMMUNE® 대조군으로부터 수집한 65개 상등액을 함유하는 항-NPR3 단일클론 항체 패널의 결합 특성을 특성화하고, 동역학 결합 파라미터 및 평형 결합 상수를 SPR 기술을 사용하여 결정하였다.

[0534] 상이한 NPR3 단일클론 항체(mAb)에 결합하는 NPR3에 대한 평형 해리 상수(K<sub>D</sub>) 및 pH6.0에서의 해리 속도는 Biacore 4000 기기를 사용하여 실시간 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 결정하였다. 25°C에서 pH 7.4(PBS-T<sub>pH7.4</sub>) 실행 완충액으로 제조한 10mM 인산나트륨, 137mM NaCl, 2.7 mM KCl 및 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20(PBS-T)에서 모든 결합 연구를 수행하였다. Biacore CM5 센서 칩 표면을 먼저 항-인간 Fc 특이적 마우스 mAb(REGN2567)와의 아민 결합에 의해 유도체화하여 상이한 NPR3 mAb를 포획하였다. PBS-T<sub>pH7.4</sub> 실행 완충액에서 제조된 C-말단 myc-myc-6xHis 태그(hNPR3-MMH)와 함께 발현된 인간 NPR3의 엑토도메인의 단일 100nM 농도를 NPR3 mAb 포획 표면 위로 30 μL/분의 유속으로 90초 동안 주입하고, PBS-T<sub>pH7.4</sub> 실행 완충액에서의 해리를 90초 동안 모니터링하였다. 해리 단계 후, pH6.0에서 제조한 PBS-T 완충액(PBS-T<sub>pH6.0</sub>)을 2분 동안 주입하였다. 각 사이클의 종료 시, NPR3 mAb 포획 표면을 20mM 인산의 12초 주입을 사용하여 재생시켰다.

[0535] 결합 속도(k<sub>a</sub>) 및 해리 속도(k<sub>d</sub>)는 Biacore 4000 평가 소프트웨어를 사용하여 질량 수송에 제한이 있는 1:1 결합 모델에 실시간 결합 센서그램을 피팅하여 결정하고 PBS-T<sub>pH6.0</sub> 중의 NPR3 mAb로부터의 hNPR3-MMH의 해리는 Scrubber 2.0c 곡선-피팅 소프트웨어를 사용하여 해리 곡선을 피팅하여 결정하였다. 결합 해리 평형 상수(K<sub>D</sub>) 및 해리 반감기(t<sub>1/2</sub>)를 동역학 속도로부터 다음과 같이 계산하였다:

[0536] 
$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{및} \quad t_{1/2} (\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0537] VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 NPR3 mAb의 K<sub>D</sub> 및 t<sub>1/2</sub> 값의 중앙값 및 평균값도 또한 계산하여 표 3에 제공하였다.

[0538] VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 NPR3 mAb의 K<sub>D</sub> 및 t<sub>1/2</sub> 값을 도 11 내지 도 12에 각각 도시된 바와 같이 박스 및 위스커 플롯을 사용하여 비교하였다.

[0539] ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 및 VELOCIMMUNE® 대조군의 mAb 군의 K<sub>D</sub> 및 t<sub>1/2</sub>의 평균 및 중앙값이 각각 표 3에 나열되어 있고, K<sub>D</sub> 값 및 t<sub>1/2</sub>의 비교는 각각 도 11 및 도 12에 도시되어 있다. ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 둘 다는 넓은 친화도 범위에서 항체를 생성할 수 있었으며, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 Ab에 대해서는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스보다 K<sub>D</sub> 값의 평균/중간값이 더 작고, t<sub>1/2</sub>는 더 길었다. 이러한 결과는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스가 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스보다 더 높은 집단에서 높은 친화도 항체를 생성할 수 있음을 시사한다.

**표 3**

[0540] 25°C에서 VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 NPR3 단일클론 항체(mAb)에 대한 hNPR3-MMH 결합의 평균 및 중앙 K<sub>D</sub> 및 t<sub>1/2</sub> 값

| 마우스 계통                      | 샘플 수 | 중앙 KD (M) | 평균 KD (M) | 중앙 t½ (분) | 평균 t½ (분) |
|-----------------------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 | 146  | 2.18E-09  | 7.85E-09  | 47.00     | 48.64     |
| VELOCIMMUNE® 대조군            | 65   | 6.05E-09  | 1.39E-08  | 6.00      | 27.36     |

[0541] 루미넥스

[0542] NPR3으로 면역화된 마우스로부터 단리된 항체의 NPR3 항원 패널에 대한 결합을 결정하기 위해 Luminex 결합 분석을 수행하였다. 이러한 분석을 위해, 항원을 Luminex 미소구체에 아민 결합시켰다. 아민 결합 단백질용 미소구체는 다음과 같이 제조하였다: 대략 1천만 개의 MicroPlex 미소구체(MicroPlex Microspheres, Luminex, Cat. No. LC10000-00)를 0.1 M NaPO<sub>4</sub>, pH 6.2(활성화 완충액) 500 µL 중에서 와류발생기에 의해 재현탁한 다음 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 미소구체를 160 L의 활성화 완충액 중에 재현탁시키고, 25°C에서 50 mg/mL의 N-히드록시숙신이미드(NHS, Thermo Scientific, Cat# 24525) 15 L을 첨가하고, 이어서 50 mg/mL의 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드(EDC, ThermoScientific, Cat# 22980) 15 L를 첨가하여 카르복시산기(-COOH)를 활성화하였다. 10분 후, 50 mM MES pH 5.0 500 µL를 첨가하여 반응물의 pH를 5.0까지 감소시키고, 미소구체를 와동시킨 다음, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 활성화된 미소구체를 50 mM MES pH 5.0 중의 25 µg/mL의 단백질 항원[C-말단 인간 Fc 태그와 함께 발현된 인간 NPR3 세포의 도메인(hNPR3 ecto-hFc) 및 인간 ANP와 복합체화된 C-말단 마우스 Fc 태그와 함께 발현된 인간 NPR3 세포의 도메인(hNPR3-ecto-mFc-hANP)] 500 µL와 즉시 혼합하였다. 결합된 단백질/항체 당 고유한 비드 영역을 사용하였다. 미소구체-단백질 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 50 µL의 1 M Tris-HCl, pH 8.0을 첨가하여 결합 반응을 퀸칭시키고, 미소구체를 와동시키고, 원심분리하고, 0.05% Tween20을 함유하는 800 µL의 PBS로 3회 세척하여 미결합된 단백질과 다른 반응 성분을 제거하였다. 미소구체를 2% BSA 및 0.05% Na 아지드를 사용해 1천만 미소구체/mL로 PBS에 재현탁시켰다.

[0543] 아민-결합 단백질을 갖는 미소구체를 2700 비드/mL로 혼합한 다음, 75 µL의 미소구체를 웰 당 96 웰 필터 플레이트 평평한 바닥 플레이트(Millipore, Cat. No: MSBVN1250)에 플레이팅하고, 개별 항-NPR3 항체를 함유하는 25 µL의 상등액과 혼합하였다. 샘플 및 미소구체를 25°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음 0.05% Tween 20을 사용해 200 µL의 PBS로 2회 세척하였다. 개별 미소구체에 결합된 항체 수준을 검출하기 위해, 2% BSA 및 0.05% Na 아지드가 포함된 PBS 중의 2.5 µg/mL R-피코에리트린 접합 염소 F(ab')<sub>2</sub> 항-인간 카파(Southern Biotech, Cat. No. 2063-09) 100 µL를 첨가한 다음, 25°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 0.05% Tween 20이 포함된 200 µL의 PBS로 2회 세척하고 0.05% Tween 20이 포함된 150 µL의 PBS에 재현탁하였다. Luminex xPonent 소프트웨어 버전 4.2를 사용해 Luminex FlexMap 3D 기기 상에서 플레이트를 판독하였다.

[0544] 1000 초과, 5000 미만 및 5000 초과와 결합 신호로 hNPR3-엑토-hFc 및 hNPR3-엑토-mFc-hANP에 결합된 항체는 표 4에 나타나 있다. 시험된 샘플은 총 439개였다: ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 유래의 샘플 236개 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 유래의 샘플 203개. 결합 신호를 형광 강도(MFI)의 중앙값으로서 측정하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리된 항체와 비교하여, Luminex 분석에서 hNPR3 ecto-hFc 및 hNPR3 엑토-mFc-hANP >5000의 복합체에 결합된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터의 항체의 백분율이 더 높았다.

**표 4**

[0545] Luminex 결합 분석에서 아민 결합된 hNPR3-엑토-hFc 및 hNPR3-엑토-mFc-hANP에 결합된 항-NRP3 항체의 총 수(백분율).

| 마우스 계통                      | 결합 신호 (MFI) | hNPR3-엑토-hFc | hNPR3-엑토-mFc-hANP |
|-----------------------------|-------------|--------------|-------------------|
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 | >5000       | 206 (87%)    | 202 (86%)         |
|                             | >1000       | 14 (6%)      | 18 (8%)           |
| VELOCIMMUNE® 대조군            | >5000       | 88 (43%)     | 83 (41%)          |
|                             | >1000       | 14 (22%)     | 50 (25%)          |

[0546] 차단 기능

[0547] 인간 NPR3 결합 인간 ANP(hANP)를 차단하는 항-NPR3 항체의 능력을 결정하기 위해 ELISA-기반 차단 분석을 개발하였다. 이 분석에서, 마우스 IgG2a at the NPR3 C-말단(hNPR3-mFc, Seq ID 또는 기탁번호)에서 마우스 IgG2a의 Fc 부분에 융합된 인간 NPR3 세포의 도메인(아미노산 Gly27-Ser482)의 일부를 포함하는 재조합 인간 NPR3 단백질, 96-웰 마이크로티터 플레이트 상에서 PBS 중 2 µg/mL의 농도로 밤새 4°C에서 수동적으로 흡수시켰다. 후속하여, PBS 중의 0.5%(w/v) BSA 용액을 사용하여 실온에서 1시간 동안 비특이적 결합 부위를 차단하였다. 플레이트를 PBS+ tween으로 세척한 후, 1:10 희석의 항-NPR3 항체 상등액 또는 1 µg/mL의 비-결합 인간 IgG1 이소형 대조군 항체를 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 재조합 비오틴화 hANP(비오틴-hANP; Phoenix Pharmaceuticals INC, 캘리포니아주 버린게임 소재)를 200pM의 최종 농도까지 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비오틴-hANP의 농도는 EC50 값 부근에서 플레이트-코팅된 hNPR3에 대한 비오틴-hANP의 용량 의존적 결합의 동적 범위에 있었다. 플레이트를 세척하고, 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)와 결합된 스트렙타비딘 100 ng/mL로 플레이트-결합된 비오틴-hANP를 검출하고, 제조사의 권장 절차에 따라 TMB 기질 용액(BD Biosciences, 캘리포니아주 산호세 소재)을 사용하여 시각화하였다. 450 nm에서의 흡광도를 Victor™ 다중 표지 플레이트 판독기(PerkinElmer™) 상에서 측정하였다.

[0548] 시험된 항-NPR3 항체에 대한 차단 백분율은 아래 식을 사용하여 계산하였다:

$$\text{차단\%} = 100 - \left( \frac{[\text{실험 신호 (시험된 항-NPR3)} - \text{배경 신호 (완충액)}]}{[\text{최대 신호 (비오틴-hANP 단독)} - \text{배경 신호 (완충액)}]} \right) \times 100$$

[0549]

[0550] 50% 이상의 hNPR3에 대한 비오틴-hANP의 결합을 차단한 항체를 차단제로서 분류하였다.

[0551] 인간 항-NPR3에 대한 인간 ANP 결합을 차단하는 VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 항-NPR3 항체 상등액의 능력을 ELISA-기반 차단 분석을 사용하여 평가하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 338개의 항-NPR3 항체 상등액을 인간 NPR3에 대한 인간 ANP 결합을 차단하기 위해 시험하였으며, 여기서 125개는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 유래하였고 213개는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 유래하였다. 134개의 항-NPR3 항체 상등액은 50% 이상의 차단 백분율로 비오틴-hANP에 대한 hNPR3-mFc 결합을 차단하였다. 134개의 차단제 중, 17개를 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리하였고, 117개를 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리하였는데, 이는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 시험한 항체 수의 각각 14% 및 55%였다. 상위 50개의 차단제 중, 7개는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스 유래이고 43개는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 유래하였으며, 이는 각각 마우스의 2개의 계통으로부터 시험된 총 mAb의 6% 및 20%를 차지한다.

[0552] 이 실험에서, 인간 IgG1 이소형 대조군 항체는 32%의 차단 백분율을 나타냈고, 비-차단제로서 분류되었다.

[0553] 전반적으로, VELOCIMMUNE® 대조군 마우스에 비해 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스는 높은 특이성으로 NPR3에 결합하고 인간 ANP에 대한 재조합 NPR3 단백질 결합을 차단하는 항체를 더 많이 생산하였다.

**표 5**

[0554] 인간 NPR3-mFc에 결합하는 인간 ANP를 차단하는 항-NPR3 항체 상등액의 요약.

| 마우스 계통                      | 시험된 항-NPR3의 수 | 차단제 수 (%차단 >50%) | 마우스 계통 당 차단제 % | 상위 50개 차단제 중 mAb의 수 (차단 %의 범위) | 마우스의 개별 계통으로부터 차단 %에 대해 가장 높은 50 값을 갖는 % 차단제 |
|-----------------------------|---------------|------------------|----------------|--------------------------------|--|
| VELOCIMMUNE® 대조군            | 125           | 17               | 14%            | 7 (80% - 95%)                  | 6%   |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 | 213           | 117              | 55%            | 43 (80% - 99%)                 | 20%  |

- [0555] 인간 NPR3(hNPR3) 발현 세포에 결합하는 NPR3 재조합 단백질로 면역화된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리된 항-인간 NPR3 단일클론 항체의 능력을 전기화학발광(ECL) 기반 분석을 사용하여 결정하였다.
- [0556] 간략하게, HEK293을 인간 NPR3(아미노산 M1-A541, UniProtKB - P17342)을 암호화하는 네오마이신 내성 pLVXN.NPR3 발현 플라스미드로 세포를 형질감염시킴으로써 인간 NPR3을 발현하도록 조작하였다. 상업적 심방 나트륨 이노 펩티드(ANP)를 이용한 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 NPR3의 검출가능한 발현을 나타내지 않은 형질감염되지 않은 HEK293 세포를 배경 결합 대조군으로서 실험에 포함시켰다. 항-알레르기 항원 인간 IgG1 항체 및 항-이디오타입 마우스 IgG2 항체를 결합을 위한 무관한 항체 대조군으로서 포함시켰다.
- [0557] 다음의 절차에 따라 실험을 수행하였다. 플라스크에서 배양한 NPR3-발현 세포 및 부모 세포를 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 없는 1xPBS 완충액에서 1회 행구고, 무효소 세포 해리 용액으로 37°C에서 10분 동안 인큐베이션한 후 세포를 플라스크로부터 분리하였다. 모든 세포를 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함된 1xPBS로 1회 세척하고, Cellometer™ Auto T4 세포 계수기(Nexcelom Bioscience LLC, 마사추세츠 주 로렌스 소재)로 계수하였다. 웰 당 약 2.0x10<sup>4</sup> HEK293/hNPR3 또는 HEK293 세포를 96-웰 탄소 전극 플레이트(Meso Scale Discovery, 메릴랜드주 록빌 소재) 상에 별도로 시딩하고, 세포를 정착시킬 수 있도록 37°C서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비특이적 결합 부위는 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>가 포함된 1xPBS 중 2% BSA(w/v)와 함께 인큐베이션하여 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 플레이트-결합 세포에, 1:10 또는 0.2 µg/mL의 대조군 항체 희석액에서 항-NPR3 항체 상등액을 첨가한 다음, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 세포 세척 헤드가 구비된 AquaMax2000 플레이트 세척기(MDS Analytical Technologies, 캘리포니아주 써니베일 소재)를 사용하여 세척하여 미결합 항체를 제거하였다. 중쇄 및 경쇄에 특이적인 SULFO-TAG™-접합된 염소 다클론 항-인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch Labs, 펜실베이니아주 웨스트 그로브 소재)로 플레이트-결합된 인간 IgG를 검출하였고, 플레이트-결합된 마우스 IgG(상업용 NPR3 항체 및 mIgG 이소형 대조군 항체)를 Fcγ 단편에 특이적인 SULFO-TAG™-접합된 염소 다클론 항-마우스 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch Labs, 펜실베이니아주 웨스트 그로브 소재)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 검출하였다. 세척 후, 플레이트를 제조사의 권장 절차에 따라 판독 완충액(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)으로 현상하였고, 발광 신호를 SECTOR Imager 600(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)으로 기록하였다. 부모 HEK293 세포에 대한 HEK293/hNPR3의 결합 신호 비율을 계산하여 항-NPR3 항체의 결합 특이성의 표시로서 보고하였다. 200 RLU 이상의 HEK293/hNPR3 세포에 대한 결합 신호를 갖는 항체 및 3 이상의 결합 비율을 특이적 결합제로 분류하였고, 200 RLU 미만의 결합 신호를 갖는 항체 또는 3 미만의 결합 비율을 비특이적인 결합제 또는 비-결합자로 분류하였다.
- [0558] 결과:
- [0559] VELOCIMMUNE® 대조군 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 항-NPR3 항체가 NPR3-발현 HEK293 세포에 특이적으로 결합하는 능력을 전기화학발광 기반 결합 분석으로 평가하였다.
- [0560] 실험 결과를 표 6에 요약하였다. 미정제 상등액 내 총 338개의 항-NPR3 항체를 HEK293/hNPR3 세포에 대한 결합에 대해 시험하였으며, 이 중 125개의 항체는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리하고 213개의 항체는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리하였다. VELOCIMMUNE® 대조군 유래의 62개 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 188개인 총 250개의 항-NPR3 항체는 HEK293/hNPR3 세포에서 200 RLU 이상의 결합 신호 및 HEK293/hNPR3에서 3 이상의 부모 HEK293에 대한 결합 비율을 나타냈는데, 이는 NPR3에 특이적으로 결합할 수 있는 이들 항체를 시사한다. VELOCIMMUNE® 대조군 마우스의 항-NPR3 항체의 50% 및 이에 비해, ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 88%는 특이적 NPR3 결합제였다. 상위 50개의 특이적 결합제 중, 6개의 항체는 VELOCIMMUNE® 대조군에서 유래되었고, 44개의 항체는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 유래되었으며, 이는 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스의 항-NPR3 항체 상등액의 5% 및 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스의 항-NPR3 항체 상등액의 21%가 상위 결합제임을 시사한다.
- [0561] 실험에서, HEK293/hNPR3 세포에 특이적으로 결합된 양성 대조군으로서 포함된 상업적 항-hNPR3-mIgG2 항체, 및 인간 IgG1 및 마우스 IgG2 이소형 대조군 둘 다는 예상대로 HEK293/hNPR3 세포에 결합하지 않았다.
- [0562] 전반적으로, HEK293/hNPR3 세포를 사용한 결합 결과는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스가 hNPR3 발현 세포에 특이적으로 결합된 항체를 생성할 수 있고, 높은 효능의 결합제의 풍부함은 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 항

체가 일반 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스보다 더 높을 수 있음을 시사한다.

**표 6**

[0563] 인간 NPR3을 발현하도록 조작된 세포에 결합하는 항-NPR3 항체 상등액의 요약.

| 마우스 계통                          | 시험된 항-NPR3의 수 | 특이적 항-NPR3 결합체의 수 | 마우스 계통 당 특이적 항-NPR3 결합체의 % | 상위 50개 세포 결합비를 갖는 특이적 항-NPR3 결합체의 수 | 마우스의 계통 당 총 결합체 당 상위 50개의 세포 결합비를 갖는 항-NPR3 특이적 결합체의 % |
|---------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|
| VELOCIMMUNE® 대조군                | 125           | 62                | 50%                        | 6                                   | 5%   |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 마우스 | 213           | 188               | 88%                        | 44                                  | 21%  |

[0564] 정제된 항체

[0565] NPR3에 결합하는 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 유도된 항-NPR3 항체의 능력을 평가하기 위해, 조작된 세포주를 전장 인간 NPR3을 안정적으로 발현하도록 형질감염된 HEK293 세포(인간 배아 신장 293, ATCC)에서 확립하였고 이어서 고발현을 위해 분류하였다. 생성된 세포주를 HEK293/hNPR3 고분류(ACL#9752, Regeneron)로 명명하였다.

[0566] 유세포 계측 결합 평가를 위해, HEK293/hNPR3 고분류 세포를 무효소 세포 해리 완충액(Millipore, cat#S-004-C)으로 들어올리고, 1회 세척하고 염색 완충액(1X PBS, 칼슘 또는 마그네슘 없고(Irvine Scientific, cat#9240) 2% 여과된 소 태아 혈청(Seradigm, cat#1500-500)이 포함됨)에 재현탁시키고 고정가능한 녹색 시각화 염료(Life Technologies, cat#L23101)로 염색하고 다시 세척하고 V-바닥 염색 플레이트(Axygen Scientific, cat#P-96-450-V-C-S)에 플레이팅하였다.

[0567] ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리된 정제된 항체, 상업적 항체(GeneTex, GTX84015), 또는 이소형 대조군 항체를 100nM에서 24.4 pM까지 염색 완충액 1:3으로 연속 희석하고(시험 분자 없이 염색 완충액만을 위한 추가 웰과 함께) 염색 플레이트 내의 세포에 첨가하였다.

[0568] 추가의 세척 단계 후, CytoFix(BD Biosciences, cat#554655) 고정 완충액으로 고정하기 전에 Alexa Fluor® 647-태그된 이차 검출 항체[항-인간 (Jackson ImmunoResearch, cat#109-607-003) 및 항-마우스(Jackson ImmunoResearch, cat#115-607-003)]로 샘플을 염색하였다. 모든 샘플을 96-웰 필터 플레이트(Pall, cat#8027)를 통해 U-바닥 관독 플레이트(Corning, cat#3799)로 여과한 후, iQue PLUS 유세포 분석기를 통해 작동시키고 각 샘플에 대해 평균 형광 강도(MFI)를 측정하였다. 데이터를 iQue Forecyt® 소프트웨어에서 게이팅하여 RL1-A 채널에서 각 시료의 기하 평균을 계산하고, 결과를 Prism® 8 소프트웨어에서 비선형 회귀(4-파라미터 로지스틱) 모델을 사용해 추가로 분석하여 EC50 값을 얻었다. 최대 배수 결합은 다음 식을 사용하여 계산하였다:

$$\text{배수 결합} = \frac{\text{MFI}_{\text{기하학적 평균 RL1-A}}}{\text{MFI}_{\text{기하학적 평균 RL1-A, 이차 항체 단독 대조군}}}$$

[0569]

[0570] 이 수학적식에서 “MFI<sub>기하학적 평균 RL1-A</sub>”는 정제된 항체로 염색된 세포로부터 RL1-A 채널에서의 최대 평균 형광 강도(MFI) 값을 지칭한다. “MFI<sub>기하학적 평균 RL1-A, 이차 항체 단독 대조군</sub>”은 Alexa647-태그된 이차 검출 항체만으로 염색된 세포로부터의 RL1-A 채널에서의 MFI 값을 지칭한다.

[0571] 표 7에 나타낸 바와 같이, ANP 태그와 함께 발현된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 12개의 정제된 항-NPR3 항체(“+ANP”), ANP 태그 없이 발현된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 12개의 정제된 항-NPR3 항체(“-ANP”), 및 VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리된 8개의 정제된 항-NPR3 항체에 대해 HEK293/hNPR3 고분류 세포의 특이적 결합을 유세포 계측기로 시험하였다. ANP 태그와 함께 발현된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 12개의 정제된 항-NPR3 항체 중 11개는 HEK293/hNPR3 세포에 대한 특이적 결합을 나타냈고, 이차

검출 항체 단독 대조군에 대한 배수 결합 값은 21 내지 1012이고, EC50 값은 7.7 nM 내지 >10 nM이었다. ANP 태그 없이 발현된 ANP-V<sub>H</sub>1-69 변형된 마우스로부터 단리된 12개의 정제된 항-NPR3 항체 중 10개는 HEK293/hNPR3 세포에 특이적 결합을 나타내었고, 2차 검출 항체 단독 대조군에 대한 배수 결합 값은 132 내지 819이고 EC50 값은 6.3 nM 내지 >10 nM이었다. VELOCIMMUNE® 대조군 마우스로부터 단리된 모든 8개의 정제된 항-NPR3 항체는 HEK293/hNPR3 세포에 대한 특이적 결합을 나타내었고, 이차 검출 항체 단독 대조군에 대한 215 내지 789의 배수 결합 값 및 2.4 nM 내지 >10 nM의 EC50 값을 가졌다. 이소형 대조군 항체는 HEK293/hNPR3 세포에 결합하지 않았고, 상업적 항-NPR3 항체는 2차 검출 항체 단독 대조군 및 7.6 nM의 EC50에 비해 22배의 결합을 갖는 HEK293/hNPR3에 결합하였다.

표 7

[0572]

| 항체                                     | 결합 배수 | EC <sub>50</sub> [M] |
|--|-------|----------------------|
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 1                  | 609   | >1.0E-08             |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 2                  | 311   | >1.0E-08             |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 3                  | 215   | 2.4E-09              |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 4                  | 562   | 1.1E-08              |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 5                  | 629   | 1.0E-08              |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 6                  | 789   | >1.0E-08             |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 7                  | 443   | 1.1E-08              |
| VELOCIMMUNE® 대조군 Ab 8                  | 291   | 2.1E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 1-ANP   | 132   | >1.0E-08             |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 2-ANP   | 798   | >1.0E-08             |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 3-ANP   | 689   | >1.0E-08             |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 4-ANP   | 798   | 7.0E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 5 -ANP  | 3     | 결합 없음                |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 6 -ANP  | 576   | 9.1E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 7 -ANP  | 605   | 7.0E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 8 -ANP  | 819   | 9.9E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 9 -ANP  | 566   | 6.3E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 10 -ANP | 799   | 8.7E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 11 -ANP | 712   | 1.7E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 12 -ANP | 14    | 결합 없음                |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 1+ANP   | 330   | >5.0E-08             |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 2+ANP   | 519   | 7.7E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 3+ANP   | 664   | 1.2E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 4+ANP   | 688   | 8.4E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 5+ANP   | 7     | 결합 없음                |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 6+ANP   | 549   | 1.0E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 7+ANP   | 686   | 1.3E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 8+ANP   | 783   | 9.5E-09              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 9+ANP   | 913   | 1.1E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 10+ANP  | 1012  | >1.0E-08             |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 11+ANP  | 411   | 1.5E-08              |
| ANP-V <sub>H</sub> 1-69 변형된 Ab 12+ANP  | 21    | >5.0E-08             |
| 이소형 대조군 Ab 1                           | 2     | 결합 없음                |
| 이소형 대조군 Ab 2                           | 1     | 결합 없음                |
| 상업적 항-hNPR3 Ab                         | 22    | 7.6E-09              |

[0573]

균등물

[0574]

본 발명의 적어도 하나의 실시예의 몇몇 측면이 설명되었는데, 다양한 변경, 변형 및 개선이 당 기술분야의 숙

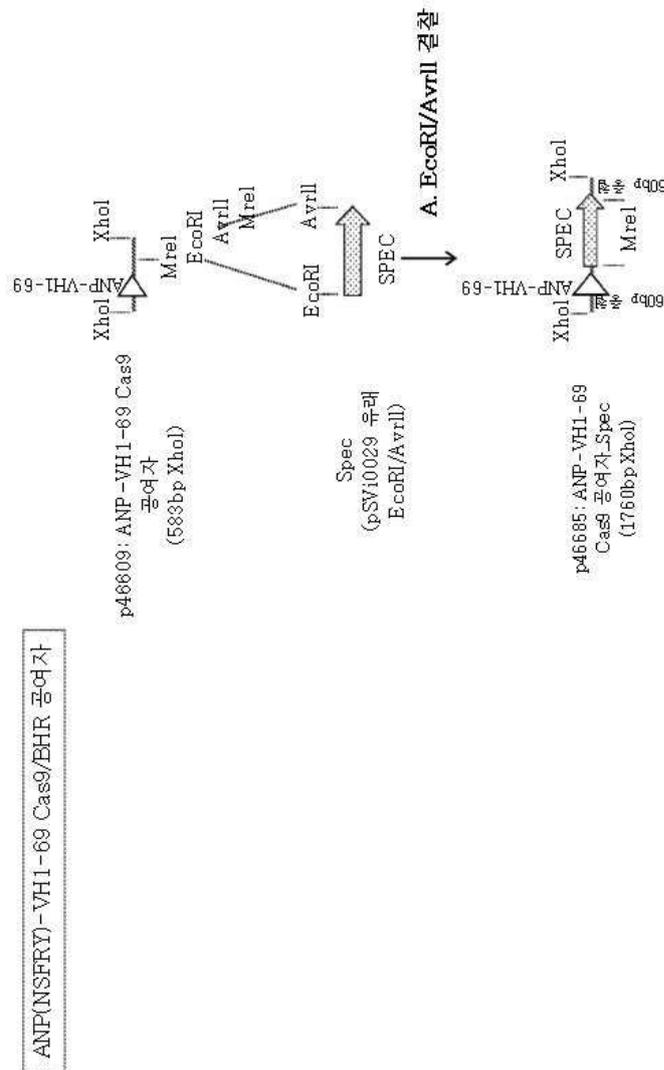
련자에 의해 용이하게 이루어질 것임을 당 기술분야의 숙련자는 이해할 것이다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시의 일부가 되도록 의도되고, 본 발명의 사상 및 범주 내에 있도록 의도된다. 따라서, 전술된 설명 및 도면은 단지 예시이며, 본 발명은 이어지는 청구범위에 의해 상세히 기술된다.

[0575] 당 기술분야의 숙련자는 본원에 설명된 검정 또는 다른 과정들에서 얻어진 값에서 기인할 수 있는 통상적인 오차 또는 표준 편차를 이해할 것이다.

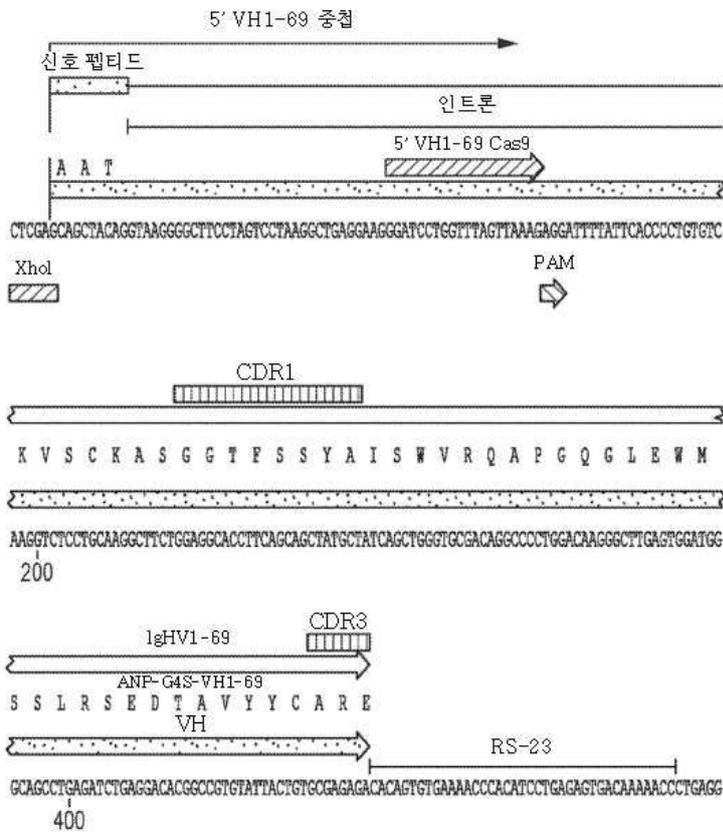
[0576] 간행물, 웹사이트 및 다른 참조 물질들은 본 발명의 배경기술을 설명하고, 그의 시행이 참조로서 본원에 포함되는 것을 고려하여 추가적인 상세한 설명을 제공하기 위해 언급되었다.

도면

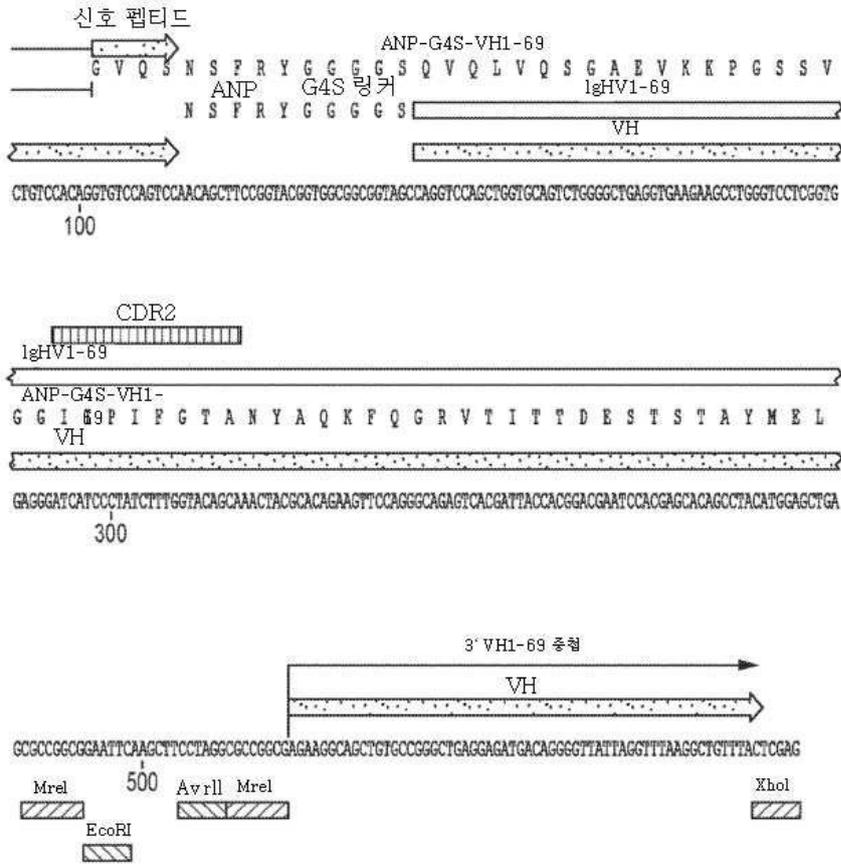
도면1



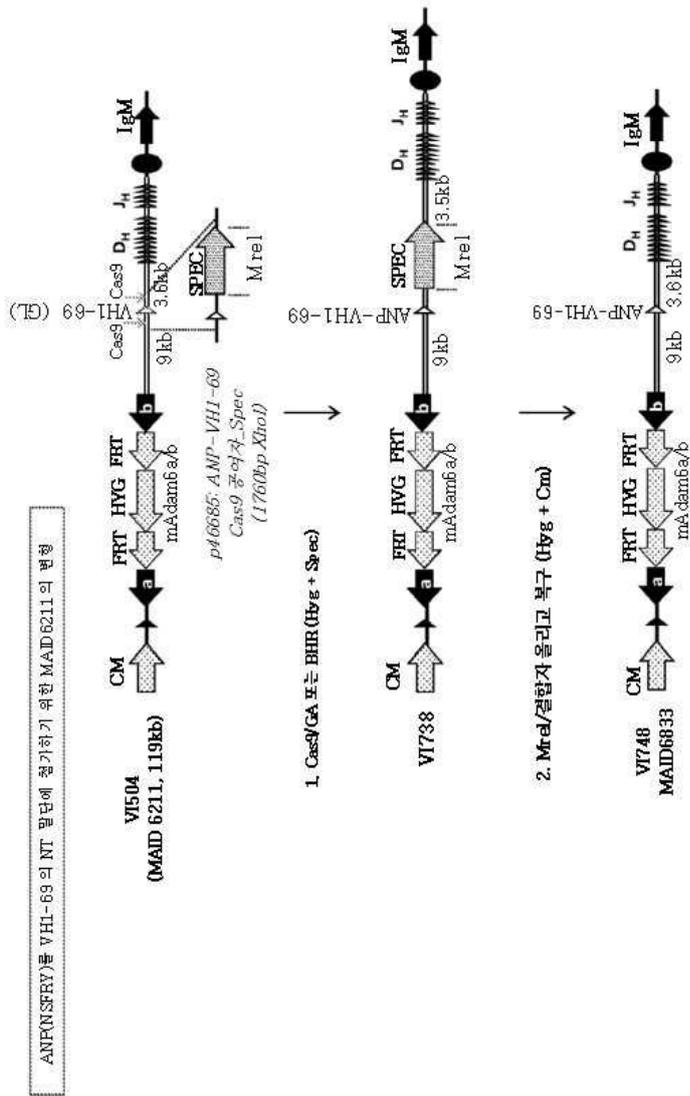
도면2a



도면2b

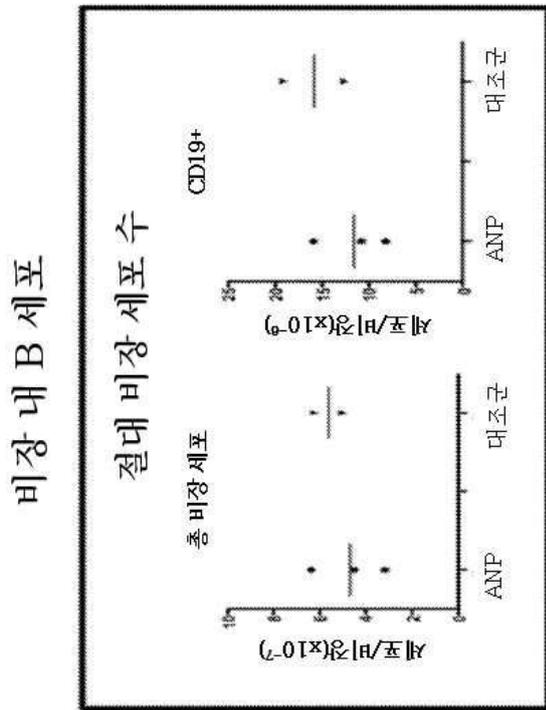


도면3

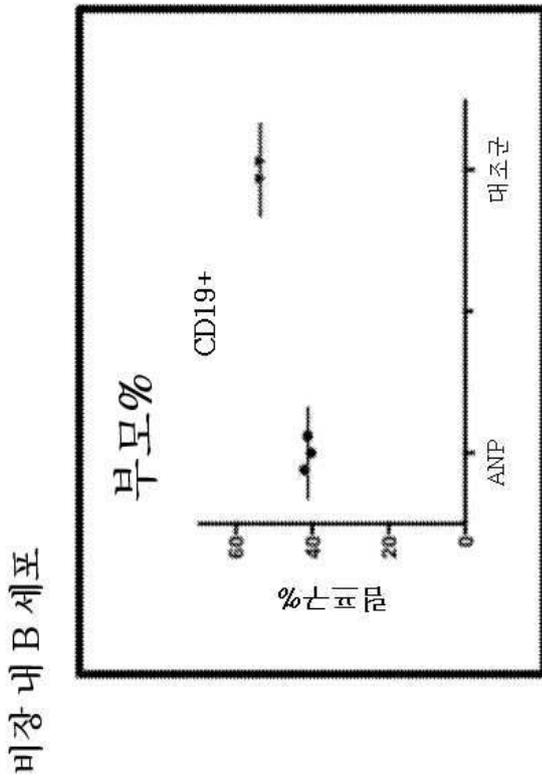




도면5a

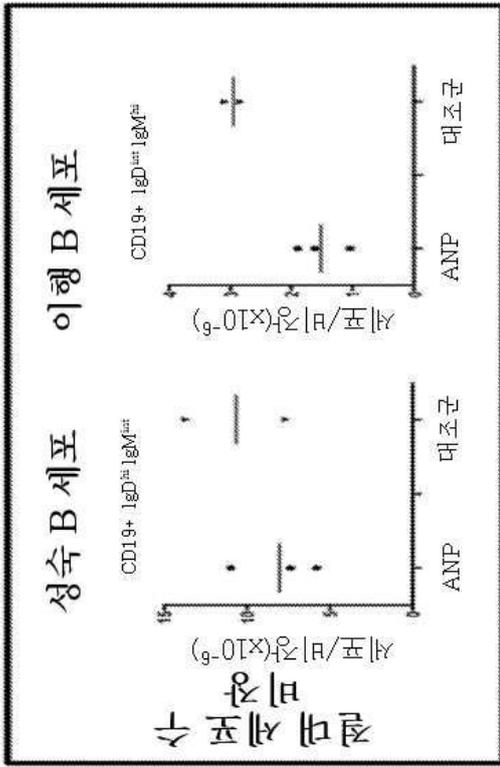


도면5b



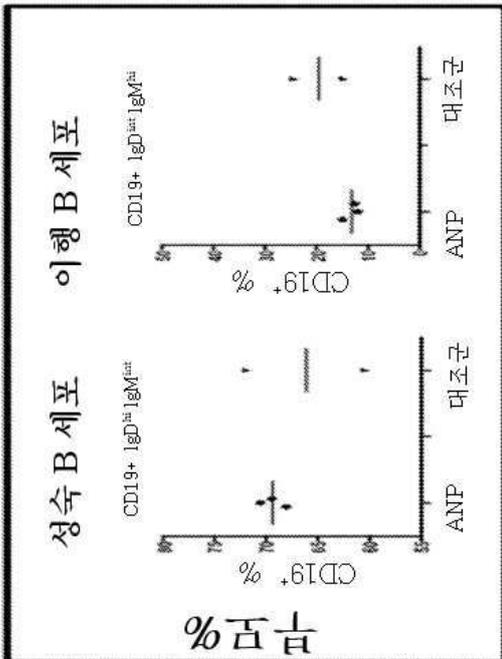
도면5c

비장 중의 성숙 B 세포 및 미성숙 B 세포



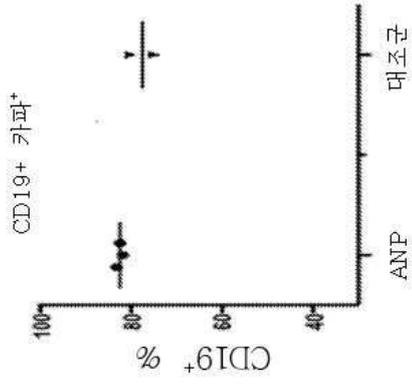
도면5d

비장 중의 성숙 B 세포 및 미성숙 B 세포



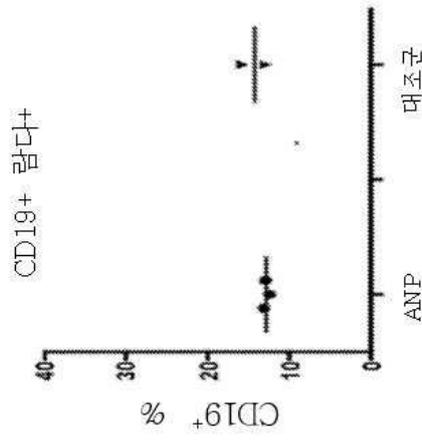
도면5e

비장 내 람다 및 카파 양성 B 세포 빈도



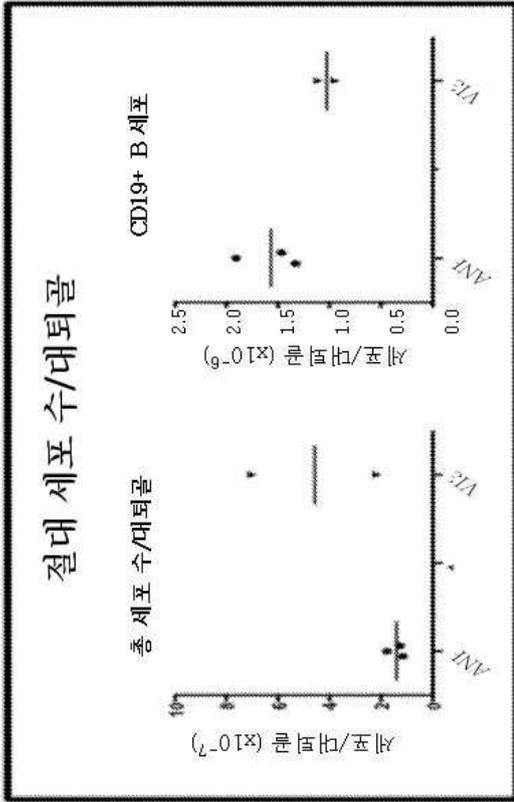
도면5f

비장 내 람다 및 카파 양성 B 세포 빈도



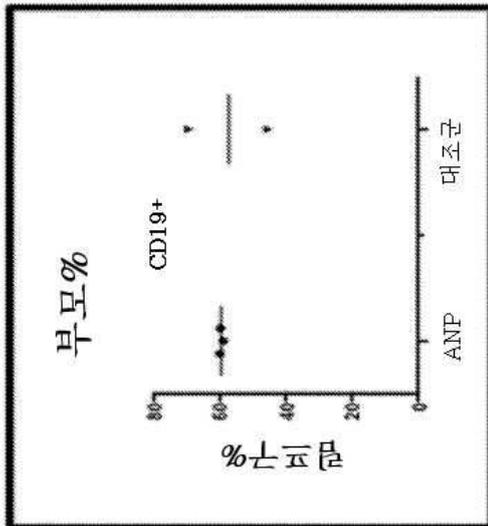
도면6a

골수 내 B 세포 빈도



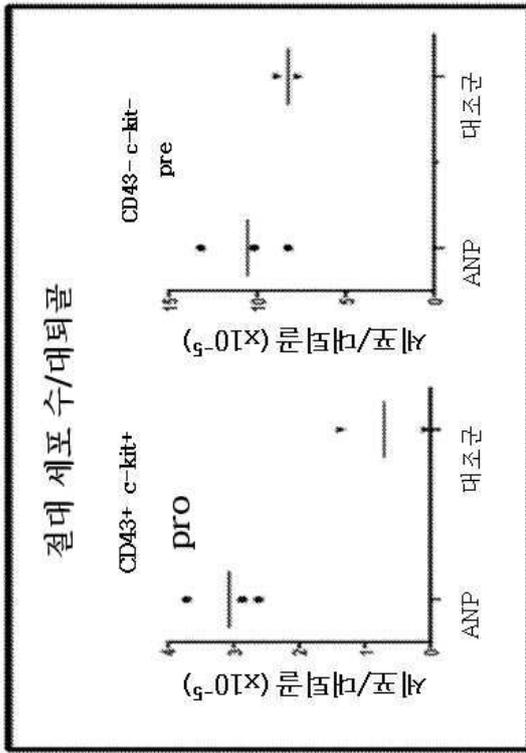
도면6b

골수 내 B 세포 빈도



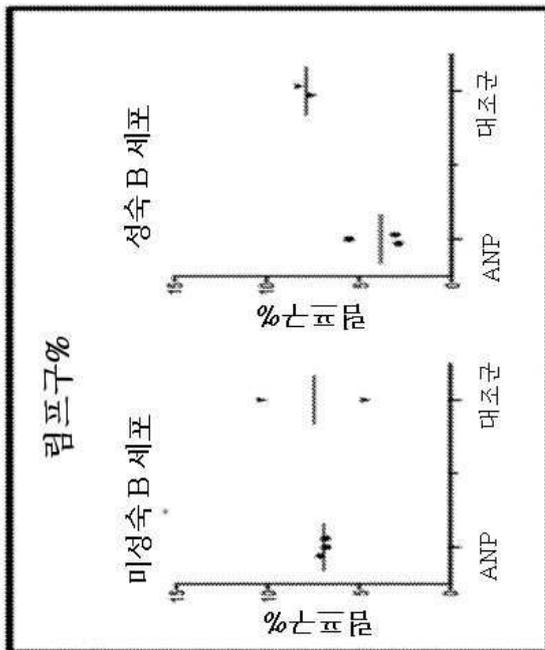
도면6c

골수 내 Pro-B 및 Pre-B 세포 수준



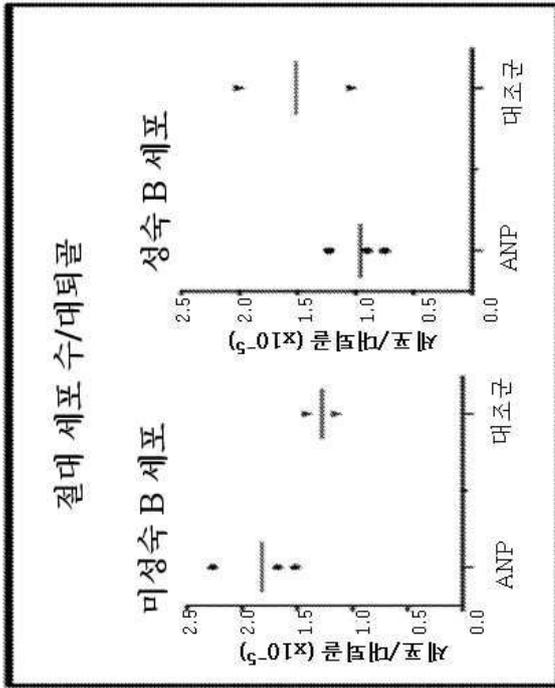
도면6d

골수 내 성숙 및 미성숙 B 세포



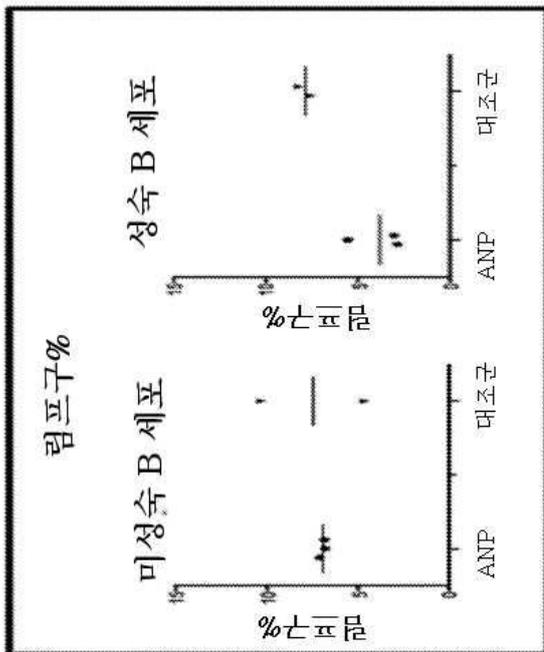
도면6e

골수 내 성숙 및 미성숙 B 세포

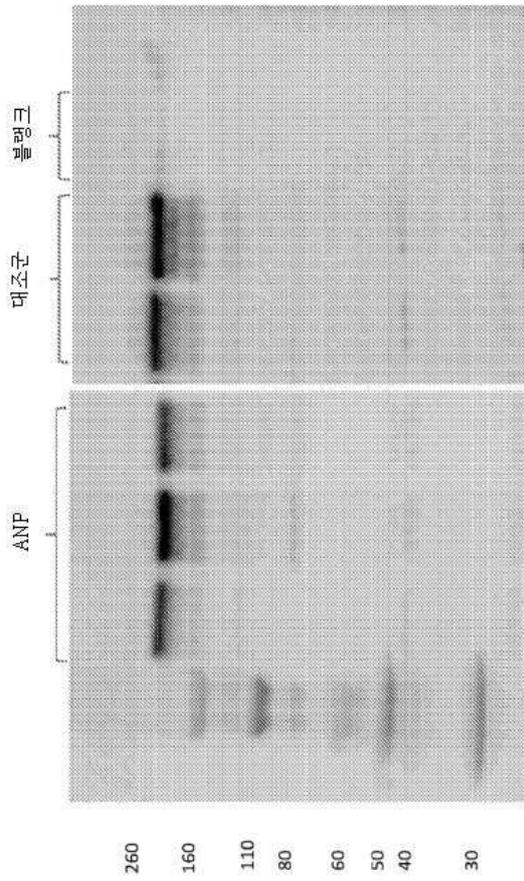


도면6f

골수 내 성숙 및 미성숙 B 세포

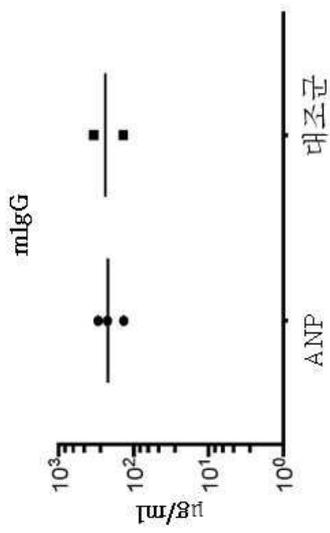


도면7

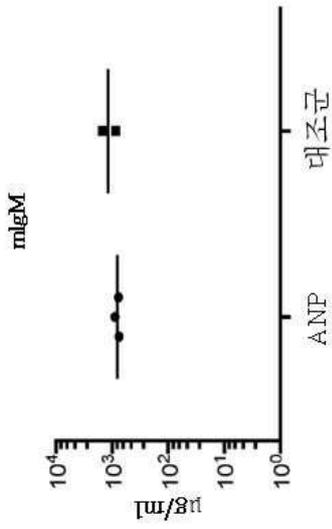


\*1:25로 희석된 혈청. 항-마우스 IgG 항체에 의해 검출됨

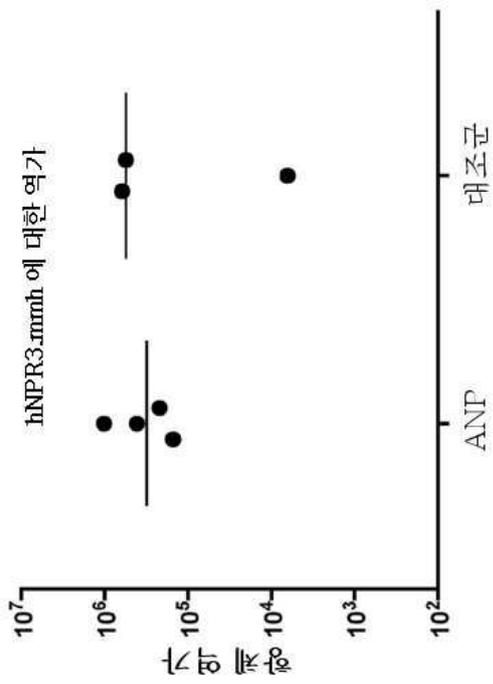
도면8a



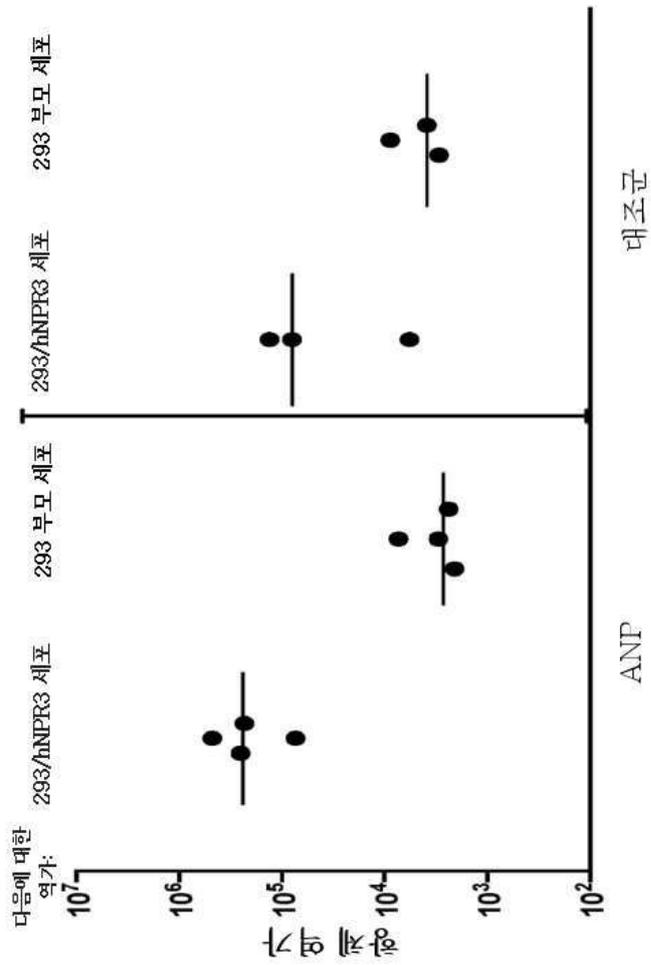
도면8b



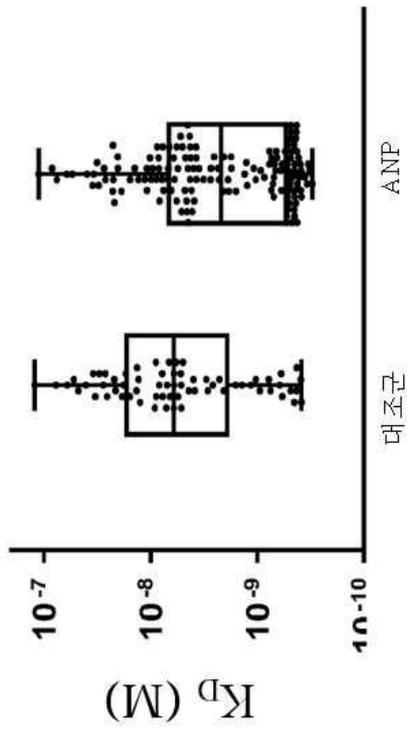
도면9



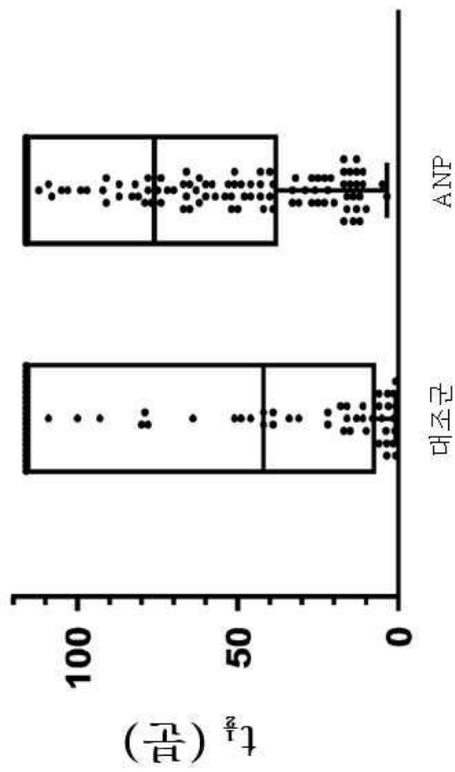
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Mastaitis, Jason

Murphy, Andrew J.

McWhirter, John

Voronina, Vera

Gromada, Jesper

<120> NUCLEIC ACIDS ENCODING ANCHOR MODIFIED ANTIBODIES AND USES  
THEREOF

<130> 009108.507W01/10507W001

<150> 63/129,893

<151> 2020-12-23

<150> 63/219,402

<151> 2021-07-08

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 855

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gagacagga cagacgtagg ccaagagagg ggaaccagag aggaaccaga ggggagagac 60

agagcagcaa gcagtggatt gtccttgac gacccagca tgagtcctt ctccaccacc 120

accgtgagct tctctctttt actggcattc cagctcctag gtcagaccag agctaatacc 180

atgtacaatg ccgtgtccaa cgcagacctg atggatttca agaatttgct ggaccatttg 240

gaagaaaaga tgcctttaga agatgaggtc gtccccccac aagtgtcag tgagccgaat 300

gaagaagcgg gggtgctct cageccctc cctgaggtgc ctcctggac cggggaagtc 360

agcccagccc agagagatgg aggtgccctc gggcggggcc cctgggactc ctctgatcga 420

tctgccctcc taaaagcaa gctgagggcg ctgctcactg cccctcgag cctgcggaga 480

tccagctgct tcggggcag gatggacagg attggagccc agagcggact gggctgtaac 540

agcttccggt actgaagata acagccaggg aggacaagca gggctgggcc tagggacaga 600

ctgcaagagg ctctgtccc ctgggtctc tgetgcattt gtgtcatctt gttgccatgg 660

agtttgatc atccatcta agctgcagct tcctgtcaac acttctcaca tcttatgcta 720  
 actgtagata aagtggttg atggtgactt cctcgcctct cccaccccat gcattaaatt 780  
 ttaaggtaga acctcacctg ttactgaaag tggtttgaaa gtgaataaac ttcagcacca 840  
 tggacagaag acaaa 855

<210> 2

<211> 151

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val  
 20 25 30  
 Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu  
 35 40 45  
 Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser  
 50 55 60  
 Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala  
 85 90 95  
 Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser  
 115 120 125  
 Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr  
 145 150

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Ser Phe Arg Tyr

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4S DNA sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(15)

<400> 4

ggt ggc ggc ggt agc

15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 107

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gcagctacag gtaaggggct tcctagtcct aaggctgagg aagggatcct ggtttagtta

60

aagaggattt tattcacccc tgtgtcctgt ccacaggtgt ccagtcc

107

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Val Gln Ser

<210> 8

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANP-VH1-69 without leader

<220><221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 8

aac agc ttc cgg tac ggt ggc ggc ggt agc cag gtc cag ctg gtg cag 48

Asn Ser Phe Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln  
 1                    5                    10                    15

tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc 96

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys  
                   20                    25                    30

aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat gct atc agc tgg gtg cga 144

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg

35                    40                    45

cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ggc atc atc cct atc 192

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile

50                    55                    60

ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att 240

Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile

65                    70                    75                    80

acc acg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg 288

Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

85                    90                    95

aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg aga gac 327  
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp

100 105

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Asn Ser Phe Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln

1 5 10 15

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys

20 25 30

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg

35 40 45

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile

50 55 60

Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile

65 70 75 80

Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

85 90 95

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp

100 105

<210> 10

<211> 583

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANP-VH1-69 Cas9/BHR donor

<400> 10

ctcgagcagc tacaggtaag gggcttccta gtcctaaggc tgaggaaggg atcctggttt 60

agttaaagag gattttattc acccctgtgt cctgtccaca ggtgtccagt ccaacagctt 120

ccggtacggt ggcggcggtg gccaggtcca gctggtgcag tctggggctg aggtgaagaa 180

gcctgggtcc tcggtgaagg tctcctgcaa ggcttctgga ggcaccttca gcagctatgc 240  
 tatcagctgg gtgcgacagg cccctggaca agggcttgag tggatgggag g gatcatccc 300  
 tatctttggt acagcaaact acgcacagaa gttccagggc agagtcacga ttaccacgga 360  
 cgaatccacg agcacagcct acatggagct gaggcagcctg agatctgagg acacggccgt 420  
 gtattactgt gcgagagaca cagtgtgaaa acccacatcc tgagagtgc aaaaaccctg 480

agggcggcgg cggaattcaa gcttcttagg cgccggcgag aaggcagctg tgccgggctg 540  
 aggagatgac aggggttatt aggtttaagg ctgtttactc gag 583

<210> 11  
 <211> 19726  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 11

aagcttatct ctctgttct cagactcatc taggaatttc agaaatttct gttctagcat 60  
 ctcttccage tttgtctcc aacctcatt ctcttcttc ttttttttt taaattatat 120  
 gttctctgtc ttttaaaaa actttttaa attaggtatt tatgtcattt acatttccaa 180  
 tgctatccca aaagtccac ccacgtccc caaccacta tcccaccac ccaactccac 240

ttcttggccc tggcattcac agtgtactga gacatataaa gtttgcacaa ccaatgggcc 300  
 tctctttcca ctgatggccg actaggccat ctctgatac atatcgagct agagacacga 360  
 gattctgggg gtactgggta gttcatattg ttgttccacc tataggggtg cagatccttt 420  
 tagctccttg ggiactttct ctagctctc cattgggggc cctgtgatcc atccaatagc 480  
 tgactgtgag catccacttc tgtgtttgct aggccccaga tagtctcaca agagacagct 540  
 atatctgggt cctttcagca aaatcttct agtgtatgca acggtgtcag agtttgaag 600  
 ctgattatgg gatggatccc cggatatggc attctctagt tggttcatcc ttttgtctca 660

gctccaaact ttgtctctgt aactccttcc atgggtgttt tgttcccagt tctaaggagg 720  
 ggcaaagtat ccacactttg gtcttcattc ttcttgagtt tcatgtgttt tgcaaattgt 780  
 atcttatatc ttgggtattc taagtttctg ggctaatac cacttatcag tgagtacaca 840  
 ttgtgtgagt tcttttgtga ttgggttacc tcaactcagta tgatgccctc caggctccatc 900  
 catttgccta ggaatttcat aaattcattc ttttaatatag ctcaagtagta ctccattgtg 960  
 tagatgtacc acattttctg tattcattcc tctgttgagg ggcatctggg ttctttccag 1020  
 ctcttggtca ttataaataa ggctgctatg aacatagtgg agcatgtgac ctcttaccg 1080

gttgggacat ctctggata tatgcccagg agaggtattg ctggatcttc cggtagtact 1140

atgtccaatt ttctgaggaa ctgacaaaact gatttccaga gtggttagta ccagcttgca 1200  
 atcccaccaa caatgagagg agtgttcgtc tttctccaca tctcaccag catgctgctg 1260  
 tcacctgaat ttttgatgct tagccattct gactggtgtg aggtggaatc tcagggttgt 1320  
 tttgatttgt atttccctga tgattaaagga tctgaacat tttctcaggt gcttctcagc 1380  
 cattcagtat tctttaggta agaattcttt gtttagctct aagccccatt tttttaatgg 1440  
 ggttatttga ttttctggag tccaccttct tgagtTTTTT tttccatttt ttattacata 1500  
  
 atttctcaa ttacatttcc aatgctatcc caaaagtccc ccataccctc cccccccaa 1560  
 ttccctacce accccttccc atttttttgg ccttggegtt ccctgtact ggggcatata 1620  
 aagtttgtgt gtccaatggg cttctcttcc cagtgatggc tgactaggcc atcttttgat 1680  
 acatatgcag ctagagtcaa gagctcccgg gtactggta gttcataatg ttgttccacc 1740  
 tatagggttg cagatccctt tagcttcttg ggtactttct ctactctctc cattgggagc 1800  
 cctgtgatcc atccaatagc tgactgtgag catccacttc tgtgtttgct aggccccggc 1860  
 atagtctcac aagagacagc tacatctggg tccttttgat aaaatcttgc tagtgtatgc 1920  
  
 aagggtgtca gcatttggaa gctgattatg ggtgggatcc ctggatatgg cagtctctac 1980  
 atggtccatc cttttgtctc agctccaaac tttgtctctg taacttcttc catgagtgtt 2040  
 ttgttcccaa ttctaaggag gggcatagtg tccacacttc attcttcatt ctctctgagt 2100  
 ttcatgtgtt tagcaaatg tatcttataat ctgggtatc ctaggttttg ggctaatac 2160  
 cacttatcag tgagtacata ttgtgtgagt tcctttgtaa atgtgttacc tctcagga 2220  
 tgacgccctc caggccatc catttggcta ggaatttcat aaattcattc tttttaatag 2280  
 ctgagtagta ctccattgtg taaatgtacc acattttctg tactcattcc tctgttgagg 2340  
  
 ggcatctggg ttctttatag gttctggcta ttataaataa ggttgctatg aacatagtgg 2400  
 agcatgtgtc ctcttaccg gttgagacat ctctggata tatgccagg cgaggtattg 2460  
 ctggatcctc cggtagtact atgtccaatt ttctgaggaa ctgccagact gatttccaga 2520  
 gtggttgtac aagcctgcac tctaccaac aatggaggag tgttctctt tctccacatc 2580  
 cacgccagca tctgctgca cctgaatttt tgatcttagc cattctgact ggtgtgaggt 2640  
 ggaatctcag ggttgttttg atttgcattt ccctgatgat taaggatgtt gaacattttt 2700  
 ttcaggtgct tctctgcat tcggtattcc tcaggtgaga attctttgtt cagtctgag 2760  
  
 cccattttt taatgggggtt atttgatttt ctgaagtcca ccttcttgag ttctttat 2820  
 atgttgata ttagtccct atctgattta cgatagtaa agatccttc ccaatctgtt 2880  
 ggtgtcttt tctcttatt gacgtgtct tttgccttgc agaaactttg gagtgagttc 2940  
 tttatatata ttggatatta gtcccctatc tgatttagga taggtaaaga tcctttccca 3000

atctgttggg gacctttttg tcttattgac ggtgtctttt gccttcgaga atctttgcaa 3060  
 ttttatgagg tcgcatttgt caattctcga tcttacagca caagtcattg ctgttctgtt 3120  
 caggaatfff tctctgtgac ccatactctc gaggccttta cctgctttct cctctatatg 3180  
  
 tttgagtgtc tctggtttaa tgtggagttc cttaatccac ttagatttga ccttagtaca 3240  
 aggagatagg aatggatcaa ttcgcattct tctacatgat aaccgctagt tgtgccagca 3300  
 ccatttgttg ataatgctgt cttttttcca ctggatggtt tttgctccct tgtctaagat 3360  
 caagtgacca taggtgtgtg ggttcatttc tgggtcttca attctatttc attggctctac 3420  
 ttgtctgttg ttataaccagt accatgcaga ttttatcaca attgctctgt agtagagttt 3480  
 taggtcagge atggtgatta caccagaggt tttttttatc cttgagcaga gtttttgcta 3540  
 tcctaggttt tigtattttt cagatgaatt tgcagattgc cttttccagt tcgttgaaga 3600  
  
 attgagttgg aatfffatg gggattgcat tgaatctgta gattgctttg gcaatatagc 3660  
 ctttttact atattgatcc tgccaatcca tgagcatggg agatctttcc atcttctcaa 3720  
 atcttcttta atttctttct tcagagactt gaagttcttg tcatacagat ctttcaactc 3780  
 cttagttaga gtcacgctaa ggtatfffat attatttgtg actattgaga aggggtgtgt 3840  
 ttcctaatt tctttctcag cctgtttatc ctttgtgtac agaaaagcca ttgacttgtg 3900  
 ttagttaate tcatatccag ctacttcact gaagcggttt atcaggttta ggagtctct 3960  
 ggtgtaatff ttagggcac tcatatatac tatcatatca tctgcaaaaa gtgacatfff 4020  
  
 gacttcttcc tttccaatff gtatccctt gatctccttt tgttgcgaa ttgctctggc 4080  
 aaggacatca agtactatat tgaataggta gggagaaaaat cggcaccctt gctagtccc 4140  
 tgatfffatg aggattgctt caagttctc accatffact ttgatgttgg ctactggttt 4200  
 gctgttgaat gctttttatc atgttttaggt atggccttg aattcctgat ctttccaaga 4260  
 cttttatcat gaaaggggtg tggatfffat caaatgcttt ctccagcctt tcattctgag 4320  
 gttgtgtctg tctttttccc tgagatgggt ttctgtgaa cagcaaaatg ttgggtcctg 4380  
 tttgtgtage ccgtctgtta ttctatgtct ttttattggg gatttgagtc cattgatatt 4440  
  
 aagatatatt aaggaaaagt aattgttgc tctattatt tttgtttta aagttggcat 4500  
 tctgttcttg tgctgtctt cttttagggt tgttgaagga ttcctttctt gctttttcta 4560  
 ggtcgtgggt tccatccttg tattcatttt ttttctgtta ttatccttg aaggactgga 4620  
 ttcattggata gataatgtgt gaatttgggt ttgtcttggga atacttttgt tctccatct 4680  
 acggtaatg agagtttggc tgggtatagt agcctgggct ggcaattgtg ttgtcttagt 4740  
 gtctatataa tgtctgtcca ggatcttctg gctttcatag tctgtgggtga aaaatctgg 4800

gtaattctga taggcttgcc tttatatggt acttgaatth ttcacttact gcttttaata 4860  
  
 ttctttcttt atttagtgca ttgtgtgtc tgattattat gtgtcgggag gaatttcttt 4920  
 tctgggccag tctatttggg gttctgtagg cttcttgat gttcacgggc atctctttct 4980  
 ttaggtttgg gaagttttct tctataattt tgttgaagat atttctggc ccttcaagtt 5040  
 gaaaatgttc attctcatct actcctatta ttcgtatggt tggctctctc attgtgtcct 5100  
 ggatttctg gatgttttga gttaggatct ttttgcatth tccattttct ttgattgttg 5160  
 tgcagatggt ctctatggaa tcttctgcac ctgatattct ctcttccatc tctttagtc 5220  
 tgttctgat gctcgcact atggttccag atttctttcc tagggtttct atctccagtg 5280  
  
 ttgccccact ttgggttttc tgtatagtgt ctacttccct ttttagatct agtatggttt 5340  
 tgttcatttc catcacctgt ttgggtgtgt tttctgttt tcttttaag acttgcaact 5400  
 ctttagcaga gttctctgtt atttaagtga gttattaaag tcttcttga tgtccagtac 5460  
 cataattgtg agatatgctt taaatcaa gtctaggttt ttgggtgtgt tggggtgccc 5520  
 tggactggct gatttgggag tgctgcattc tgatgatggt gattggtctt gttttctgct 5580  
 agtaagatc ttacatctgc ctttcccat ctgtaatct ctggagtcag ttgttaaagt 5640  
 tgtctctggt taaagcttgt tctctctgtg attctgttat tctcttccag cagacctggg 5700  
  
 agactagctc tttctgagt ttcagtgttc agagcactct ctgcaggcag gatttctct 5760  
 ttcaggaag gtgcacagat atctggtgtt cagatttgc tctggcaga agatgatggc 5820  
 ctgaaacagg acctgtccca gaagctgtta gcttctgtag tcaacactgt cacctgtgca 5880  
 gactagtctc ggtggagtcc gggaaccaag atgtctctg cagatgctct ggcattccct 5940  
 tctgggccgg gtgatcacct ctctctggc aggaagggtg ccttgggtgc tggaaaccga 6000  
 aaaggggct gcctcagaag ctctgtggct actgcctgtc ccagaagctg ttagcttctg 6060  
 tagtccacac tctcacctgt gcagactagt cttggtggag tctgggaacc aagatgtctc 6120  
  
 ccgcagatgc tccagccatt ctctctttc tgttcttat tttgacctat gaaatcctgg 6180  
 acatatagtt ctagtgttgc ttgtaatctc ttttctaagc caaggaatth tttttatcta 6240  
 gggcacaatc ttttgagaag acatattaaa tcaagagaat aaatattgca agaccaataa 6300  
 atgataaggt atctattttc tttaaatcca tgcctgtcaa accattcaa atatctcac 6360  
 ataaagccaa aaagatattt attgtgttcc catcttagt tgagttcaag tcaatattt 6420  
 ggtgccattt tgttgcagta aatctctaac acaaatatgc ctgggcaatg aaaacacaac 6480  
 tcagttaata tgaatacaga ttgttcagat ctaccactac actaccatct tcttcatcta 6540

agagaccct tagaacttgc agtttctcca ggccttgtgc ttctgcgctg cttttcttct 6600  
 tcttctctt ctacattgct tctctcataa acctacttct tttttccct ccttctgttc 6660  
 catcttccct tttatctgcc caatcattag ctctccttta ttttacaat taaggtgtga 6720  
 agccggtttc taggaaatca cctgagtgc gacttgttcc ttgttcagag ccacgcacag 6780  
 gagaacagaa ttaacatcaa atataattat cccagggtc atccacaaca cgtgcatcct 6840  
 ataagatcac cacggactaa tgctggctct caattacaac ataaacaaca aaaacccac 6900  
 atatatgtgg aaacaaatcg aactatacaa agaatcaatg aaaccaggag cttgttcttt 6960  
  
 gagaaaaatc aacaagatag ataaacctt agccagacta accagagggc acagagacag 7020  
 tatccaaatt aataaagtca gaaatgaaag gaagacataa caatgaaata tatcttaaaa 7080  
 taattaatct gttttagtac tattagcagt tgaatatatt aaaatcatgt tctacaacg 7140  
 tggattatt attgataatt ttctactgt gcttgaatt agcattttct taatgtttaa 7200  
 cttcaaagag tttttgctat tttgaaatat taacatata cttactgata aaataattc 7260  
 cctcctaaca aactgataa tctttttta agtaactga ttattagaca atgtacacag 7320  
 atataaatg tgttttaaat actctcccac tgcaggtgg tatcatatag ggcctttgaa 7380  
  
 tatatttta aatgtattat ttgtaatat ttatggtctc tcctatgctt atttctgaaa 7440  
 gaatattttg tatgttttga aacaatttag tatttaacat tagatatagg atcctcagtt 7500  
 atggatagta ttaaatatc attaatgata tttttaaggt ataaaaggat atgaatataa 7560  
 aagttaaca aattttatgt attattgat tctaaaaata ctcaatatta ttaatagtt 7620  
 tgatgtttaa aatgcattta aataataaaa acatttaaaa aaataaaatc aagaaatgag 7680  
 gtctaaagca gaggtcaagg aaaatgagga atagaaaaat agtaaaaatc aatatgtcca 7740  
 tttattcaag gaaagctcct acatagacat tgcaccagat tagcaaatat tatggtcctc 7800  
  
 atattagttt aagttaggag actatgctta tgttatctat ttacattcta aggagcctag 7860  
 acatttgtga atggattaca ttataagagg aggatgtcta cttaaagtagg catgaacgcc 7920  
 tgtgcattgc accctatgag ttccatcagc attccatgat tggagtatga agaacagcat 7980  
 tatagacatt acccagaacc ttagtggttc tagaatgcca agataaaaaca atctaactt 8040  
 ctggatagta gggataaatg ttctatatac atcagaattc actggtgcc tgaggatgtt 8100  
 accctgctaa ctgacaatc acaggacatc acatggattc tgataagttg cagaaaagag 8160  
 gagatgcatt caattggfcc tctctcttct aagctgcaat attaggtgca tccaatttgt 8220  
  
 gaacttcaat ttagattaca atagacatga ataactgaa ttcatgtagt acatatttt 8280  
 gttttaatat gagttaccat tgttcagaaa attaaataca catgatcaca tattcctaca 8340  
 tagtctgtt agttttcac atctctggga caatattcca aatatctctc tcattagtga 8400

aaataatcaac tactgtaaag cttagctaac atgcctttgc aggaataaga acatcctgga 8460  
 ttgaaagcta cacagggaga tgtaaaactt tctaagcaca cacattctcc atccattagg 8520  
 atcatggctc atgagatfff tctctctctc ttcttcccat taaatgcatg tacatgcagg 8580  
 ttgggaaaca gattgtgttg cagaatacat ttgcttgatt tccacttct tctcaatgca 8640  
  
 aatatttttg aagtgttaat tttgctgtga gtaccacagt ggttcttgct ctttctgttg 8700  
 actcctgtct gtgaatgttc caggaattca cacatggaca cacgtggggc tgcactctgag 8760  
 ctccagactc actgtttgcc ttctgtctc agctgctctg gccagggcac agcctcgtga 8820  
 attcaacaaa gaccctgac tctcttgttt acacctcatt acaaatggga actgttagag 8880  
 gtggacccaa ctgcatttcc atgaggaaag cacatgagtt tgagagggtc gttgatgata 8940  
 aggtagaaac aactttaatt cataggctga gatatcagtc atcacctcca gataaacaag 9000  
 agccatttct tctgcatct gagccctgta agcacactag ctttaggaat atgttactgc 9060  
  
 tgaagtcaga ttgggcaact tcatagtata caatagaaaa tctacctgca gatgagttca 9120  
 gaaccagcag ggggcacaat ggggccaaga atccctagca gagagatgtg gtgtgtgtgc 9180  
 aggggactct gcatcctctg tggtttctt tcttaactta catgtacctg tagtgattga 9240  
 catgtaacgt ttccacgctc aaacctgtg aagatacttt gctaaacct tcaaagattt 9300  
 atgttttctt gatgtgtgca tgtgtgtatt cttttttgtt tttagacaca gggtttctct 9360  
 gtgtagtctt ggctgcctg gaactcactc tgtagaccag gctggcctcg aactcagaaa 9420  
 tctgcctgct tctgcctccc aagtgtgaa gttaaagaca tgtgccacca ttgcctggcc 9480  
  
 atgtgtgtat tcttgatgca ctcttctgtt gacagataca cagtttattt ccataattta 9540  
 tttattgtga tgggtctgca ataactcatt atgtacaaat gtttctgaag tatatttagt 9600  
 tttggctatt tgggtgatta ttttttctt tctagtatat agcattttgg aaaggtagat 9660  
 attaatgtga tglatgggaa ggaggctgta aattctaata acttagctgc ttttgaatt 9720  
 tgcctcaat tctatcatcc ttgtaaccac cttaaatcca tctattagcc ttgtcacaag 9780  
 tgagccactg tctcaggctg caaatctttt tatagattag gtcgtgatgt tacatccaca 9840  
 gcctctgcac aatgctcagg ggtgggatat gggatgaatt ccctcagaca gcattaggac 9900  
  
 ttggatctca gcagactgat tcttgacca aatgtctctt cttctctagc aggagtaagt 9960  
 ccttatctaa gatgtactct gctcatgaat atgcaaatca attgagtcta tgggtgtaaa 10020  
 tatagggatg tctacacccc tcaaaaactt aagatcactg tcgtcttcac agtcacagga 10080  
 gtacacagga catcaccatg tgttggagct glatcatcct cttctgtta gcaacagctg 10140  
 cacgtaaggg gcttacagta gcaggcttga ggtctggcca tacactcatg tgacaatgac 10200  
 atccactctg tccttccctt cacaggtgtg cactcccagg tccagctgca gcagtctggg 10260

gctgagctgg tgaggcctgg ggcctcagtg aagatttcct gcaaggcttt tggctacacc 10320  
  
 ttcacaaacc atcatataaa ctgggtgaag cagaggcctg gacaggcct ggactggatt 10380  
 ggatatatta atccttataa tgattatact agctacagaa ccagaagttc aagggaagg 10440  
 ccacattgac tglagacaaa tcctccagca cagcctatat ggagcttagc agcctgacat 10500  
 ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gacacagtgc tacaacaca tcctgagtgt 10560  
 gtcagaaacc ctggaggaga agcaagcaga gctggaatgg agatgacaga aagattatca 10620  
 tttagacttg ctcagaaaga gaaatttga atgccattt attgcctctt ccttacagta 10680  
 ctatagtgcc tgtttttgtt gacattttca aactaatte caaagtcact accacaattt 10740  
  
 acaatcacat aaaaagcaag caaggataac attattttct gtgcttactt gccatttata 10800  
 ttcttgctta ttctcatctc actgaggtea tattgggaca ttaaatttct ggggttactt 10860  
 tttattaaaa atttttcatt attcattcac tttacatcct tctagtcttc ctctcacaca 10920  
 tggcctatcc ctttctctc tgagaggatg gagccctccc tacctcgtta tcccctacc 10980  
 caggcacatc aagtgtctgc agtactagga atattctctg tcaatgctgc cagacaaggc 11040  
 agacaagtta ggggatcagg attcacagga aggcaacagc ttgagggaca gcccctactg 11100  
 aagttattgg tggattcaca tgaagactga gttgcacatc tgctacatat attcaggggt 11160  
  
 cctatttaca gctcaagtag actcttgttg gtggtttagt ctcttagaac cccaagtgtc 11220  
 caggttagtt gactctgtgg gtcttcttt ggagttccta tcccctccag atccctcagt 11280  
 tcttctccca actcttccat aagacaccg taggtccatc caatgtttgg ttttgggttt 11340  
 ttctgcatct gcttcagtea gctgctgggt ggagcatctc tgaggataat tatgagaagc 11400  
 tcttatgtgc aagcataaca ggatatcatt attagtgtca gggactgggt cttggccatg 11460  
 ggatgggtct caagtttggc cagttatttg gccattccca cagtctctga taatctttgt 11520  
 ccctgcattt ctgttagaca ggaaaaatat tgggttgaaa gttttgtggg tgggttggcg 11580  
  
 tctctattgc tccactgggc ttctttctgg atataggagt ttgcctctc aggttcata 11640  
 ttcccaaagt agtgtgtcac actaaggtea ctccataca gagggacact cattctcttg 11700  
 ccacgtctct gtccacctc attggacctg aggttctga atcatacaga actgcatgtg 11760  
 tgcaaccaca cagaacaagg ctatctatca gaggcctacc ataccaggac catcaaggtt 11820  
 caccttactc ccaatactga ctacaaaaag aacatcaagg accaatgcag tctatatgga 11880  
 taaacacact tgaagaaca caaacaagat tgagggaac atgacacctc caaagcatac 11940  
 ctaaccgagt acagcatgcc ctggatatcc taacacaatc aaaacacaag aaagttacct 12000

taaatccagt cttataaagg tgatgaaggc ctttaaatag gaaatgaatt aatccttagg 12060  
 ataatacagg acaatacatt cgaacagata gaggtcttta ggaggaaaga aataaatccc 12120  
 tcaaagacat acatgaaaat acaattaaac aggtgaaagt aataactaca atgggtgaag 12180  
 acctaaaaat ggaaatagaa gcaataaagt aacacaaact tagaatcttg aaggtggaaa 12240  
 acctagaaa caggaatact agatgcaagg atgatatctt ctaggccat ccatttgctt 12300  
 gcacaattta tcatgtcctt gcttttaata gttgaacagt atttcattgt ttaaatgaac 12360  
 cacatgttct gtctccattc tctggatgag ggggtgagca agttttcca cattctggct 12420  
  
 attacaata gagctgctat gaacctagta gaaaacatat cctgtgtatg gtggagagt 12480  
 ttggagtata tcaccaagag tgttatagct gggtcttcat gtagaactat tcctaatttt 12540  
 ctgagaaatc ccaagtcaga tttctagaat ggttgttcaa gtgttcactc caaccatcaa 12600  
 tggaggactg ttttcttgc cagcatgtgc tgtattttga gttttgatc ctagccagt 12660  
 ttatctgca tttcacactt agatatggac tatggtacag gacagagaga aaccaacctt 12720  
 ctactacca ggatattcta cctgctacca atttatttat ttatttattt atttatttat 12780  
 ttatttattt atttatttat attagagaac aacacatgc agtttagaag aagtactaag 12840  
  
 acgtcagtga tgttatactg tgcctaacct tgcattgtac aatctcagct tcaggtlaag 12900  
 acagtcatg actcttatgc agtccaact gttttctgat tgtatttatg gtctattgcc 12960  
 taggaatgac ctctctcaa ataaacatgg tcaaaagccc atggcctgag atgacagagc 13020  
 ccctagtaga ccctagtgt atttctgaag tttagatatac ataagactt ataaatattt 13080  
 atgtttatac aatagattag agctgctctc agccatgacc aaggagcttc tgtgttcaat 13140  
 gaataatgat tgatgcagac attcgtgagt ggtcaaagtg gtgagaatga ttagagagtc 13200  
 ctgagccaca caagcgttaa tgatatgaac tttccaatat attaactgta ttaatgaata 13260  
  
 aatgcagaca tcatatgaga tctcattagt agttcttagg tattgcattt ttatatacaa 13320  
 ttatgcataat cagtlacatta tagtgtataa aggaaattgt ctgacataat agagaaaaat 13380  
 aggacagtca agaacaacaaa gagtagaaat tatgggtgaa atatgcagtg tgaatatatt 13440  
 acatgaaaat ttaaccata tgtaaaattg ttatttttgt ttttcagaat gagtttgctc 13500  
 attctttgac atttttattc ctgtgtgaaa tatatcagga tcatatgtat cccattctga 13560  
 tggctgact tccactggga atttccaata tatctcttcc aactaactga ccagtttctt 13620  
 tttttcttat tttctctctt tctcgttttg ttttgctttg ttttgtttt caagacaggg 13680  
  
 tttctctgtg tagctctggc tgcctctgaa ctactttgt agatcaggct ggcttcgagc 13740  
 tcataaatcc acttgcctct gcctctgag tctggtgatt aaaggagtgg ctaccacgcc 13800  
 cggctagttt tttttttct tataagaaca acatttactg gatggtcact tacatattca 13860

gaggttcagt caattattat caaggcagaa gcatggcagt ggtccagtag tcatggcact 13920  
 ggggaaggag ctgagagatc tacatcttgc tccaaagga aagaggaata gtctgacttc 13980  
 catgtgtttc agaggagggt ttcatttccc acccccacag tgacacactt cctccaacac 14040  
 ggccacacct cctaataatg ccactcttgg atcaagcata ttcacaccac aaaggaaagt 14100  
  
 ttagagataa acattaagaa aattaatgaa gtcattttat cttatatgct caacatgact 14160  
 agtacttaaa accataatit tacatgtaca atatttcatg gcataacata tttttatata 14220  
 ttttattaga tattttcttt atttatattt caaatgtgat accctttccc aattcccctc 14280  
 caaaaatccc ctatgccttc cctcatagc cagctcccaa acccaccac tectgctttc 14340  
 tggctctggc attcccctat actggggcat aaaaccttca caggaccaag tgcctcttct 14400  
 ccattgatgg ccaattaggc catcctctgc tacatatgca gctagagcca tgagtccac 14460  
 catgtgtttt ctttgattgg tggtttagtt ccagggagct ctgggggtat tggttagttc 14520  
  
 atattgttcc tcctatgggg ctgcaaacc tttcagcccc ttgggtatit tttctagctc 14580  
 cttcattggg gaccctgtgc tccatccaat ggatgagtga gcctccactt ttgtatttgt 14640  
 caggaactgg cagagtctct caggagacaa ttatatcagg ctectgtcag caaaatcteg 14700  
 ttggcatctg caatagtgtc tgggtttggt ggttgtttat gggatggatt tctgggtggg 14760  
 gcagtctctg gattgtcatt cttttagtct ctgcttccac ctttgtcttt gtaactccat 14820  
 ccatgggtat tttgttcccc cttcaagaa ggatcaaaat atccacactt tagtcttctc 14880  
 tcttcttgag tctcatgtgt ttttcaaatt gtatcttggg tattctgagc ttctaggcta 14940  
  
 atatccactt atcagtgagt gattatcatg tctgttcttt tgtgattgag ttacctcact 15000  
 tagcatgata tcctccaggf ctatccattt gtctaagaat ttcataaagt cattgtcttt 15060  
 aatagctgca tegtactcaa ttgtgtaaaf gcaccacatt ttcctttatcc attcctctgt 15120  
 tgagggacac ttggtttttc ccagettctg gttattataa ataaggctgc tatgaacata 15180  
 gtggaacatg tgccttagt acatgttga acatcttctg ggtatatgcc caggagtggf 15240  
 attgctggat cttctggtgg tactatgtcc aaatttttgg ggaaccatca aactgatttc 15300  
 ctgagtgggt gtacaagctt gcaatcccac accagcaata gtggaatgtt catctttgtc 15360  
  
 caagtcttg ccagcatctg ctgtcacctg agtttttgat cttagccatt cttactggtg 15420  
 tgagggtgaa tcttgggggtt gttttgattt gcatttccct gatgtttaag ggttttgaac 15480  
 atttttaggf gcttattaga catttggat tcctcagttt agaaatcttt gtttagctct 15540  
 gtaccacatt tttgaatagg gttatttggf tttctggagt ctaacttctt gagtcttttg 15600  
 tacatattgg atattagccc tctatcagat ttagaattag taaggatctt tcccacaaact 15660  
 gttgggtggt cttttgtctt attgacagtg tactttgcct tagagaagct ttgcaatit 15720

atgaggtccc atttgtcaat tcttgatcct atagtacaag ccattggtct tttgttcagg 15780

aatTTTTccc atgtgtccat atgttcaagg catttcccca ctttctccac tacaagtttt 15840

agtgtctctg gttttatgtg gaggtccttg atccacttag atttgagctt tgtacaagga 15900

gataagaatg galagattca cattcttcta catgctctct gccagttgag ctagcaccat 15960

ttgttgaaaa tgcTgtcttt tttttccccc actggatggt ttttagctct tttggccaag 16020

atcaagtgac cattgggtgTg tgggttcatt tcttggtcct caattctagt tcaTtgactt 16080

acctgtttgt cactgtacaa ggaccatgca gctTTTTtca caattgctct gtagtacagc 16140

ttgaggtctg ggatggTgat tctaccagag agattctttt actgtTgtga ataatttttg 16200

ctatcatagg atattttttt atttcagatg aatttacaaa ttgctctttc taactctgtg 16260

aacaattgag ttggaatttt gattgtgatt gctttgaata ctcaagatat aatttacaaa 16320

acacatgaaa cttaacaagg actactaaag tgcagatact tgcTccttc ttagaagggg 16380

gaacaaaata cccatagatg gagttacaga gacaaagttc ggagcagaga ctataggaac 16440

gaccatccag aggtccacct ggggatccat catgtaaaca accacccaaa acagacacta 16500

ttgtggatgc caagaagaac ttgctgacag gagtctgata tagctgtctc ttgagagct 16560

ctgccagggc ctcagaaagt ggaggtcac agccatccat tggatggagc acaggtccc 16620

caatgaagga gctagagaaa gtactcaagg agctgaaggg gtttgagcc ccataggagg 16680

aacaacaata tgaactaacc agtaccCCA gagctccctg ggactaaacc accaatcaaa 16740

gaaaacacat ggagggactt gaagctcttg ctgcatttat agcagaggat ggcctagatg 16800

gtcatcaatg ggaggagagg tcaatggtcc tgggaaggTt ccatgcccc aTatagggga 16860

atgccagggc caggaagcag gagtgggtgg gctggggatc agggaggggg agatgatagg 16920

gcattttcag tggggaaact aggaaagagg ataacattta aaatataaat aaagaaaata 16980

tctaattaaa aaggattacc tatgtgcatg ggagctcatg agcagcaggg gTcactctaa 17040

ggccaataat ccacatagag cgatgagctg tgtgtgaaca ggactctgta tcctctgtgg 17100

tttctttct taagtgtatt aactgatctg tccagctgtg attgacatgt gatgtctcca 17160

tgctcaagcc cagTaaagat tctctgttaa ataccttaca gacttatgtt tacttgtttt 17220

tatttgcttt tcatattttt ttaaaaagtc atacaatgta ttctaataac tcattctccc 17280

atctccaatt tattctaagt tttcttaac tcatccaacc acacactttt taattctgat 17340

aaagcaccC ccccccaaa aaaaaacca accaaccaaa aaaaaaaaa gccaaggaat 17400

ttaaaagggg attgaaagca aataaaaact aaacaaaaa gtaaaaacta cacacacaca 17460

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacactca cacacacaca cacacaccac 17520  
acacacacac acccatgcac gaacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 17580  
acacacacac acacatggaa tccagtaaaa ccacaactct ttacccatga tacacaggaa 17640  
aatataagtc aaacaaacag aatggaagaa ggtggtatta taaaaatgtc tgcacaaata 17700  
ccattaagtt cttttcttg ttggctacca actgctaagc ctgtctcct tgattaattg 17760  
tgcttatcat ccctatgaa ctccattgga ggacactaat ttttcttct gtctccagga 17820  
attgaagtgt tgcagaactc tcagtagctt ttttacctg cacaatacag cctctaatcc 17880  
  
aaccagtga aattaccaca tgagagactt ccaaatgaaa gaacaggtaa agttgtctac 17940  
tggcaagctt agtaatatca tgtaaatgcc ttagaattta atgacatatg tcatcctctg 18000  
aggtaataa atccatttg gtgcatatat acctgaact caccactaac ataatacaac 18060  
aattaaaaa ttccaacatg gatgcagagg aatccctgag ggacatttgt tgatttgtga 18120  
gcacaatata attttttt ggggggaaa tgtctgaatg ttaactctt accagtgata 18180  
atctattcta ttaatgtgta cataggtagc actaattaaa atcactgtgt tatcaggtaa 18240  
tgaaacagag gaagtaggat gctgggaaac agacttttgg aaggtcccaa gggaaaccac 18300  
  
agggacctag tggatgata ttatggtgag agtcctgaga gtggcatag attatagcat 18360  
atctcatatg caattgaaa tttcaagaa tgaatcct tatgaaatat agaaataaca 18420  
actttactta tgiacatata ctccatagta caatttttac actgtgcata tttctcctgt 18480  
aacatctggt tctcctatt ttctttatt ctctagaca atttactga tacaatctca 18540  
tgttttgta taaatagtg tatataacta ttaatacat aagctgttaa tgagtcttca 18600  
ttaatgtctg tgatttttt attgicttaa ttaatactat tatctctaat tgcacccaca 18660  
ttttcaaaag caatgtaaat ttcttactca tttctgttca aaaactctg ttgttgtatc 18720  
  
attaccatgc cttagtgata aaatectttc ttgacacatc tatagctatt getataattt 18780  
agttattgat gatcctcctg caataatcat tgataggtaa atattttaag cacttttact 18840  
tttagtcatt ttagtgagat ttgaagtagt atataacctg ttggaaagc aatattaat 18900  
tccatataatg tgaagaaga cgctaaaact aaaaacatta gccacttta gatatcttct 18960  
ccttcttctt ctctctctc ttctctctt tctctctctt ctctctctc ttctctctt 19020  
tctctctctt ctctctctt tctctctctt ctctctctc ttctctctt ctctctctt 19080  
ctctctctc ctctctctc ttctctctt ctctctctc ttctctctt ctctctctc 19140  
  
ttctctctt ctctctctc ttctctctt ctctctctc ttctctctt ctctctctc 19200  
ttctctctt tctctctctt tttctctctt tctctctctc tttctctctt tctctctctc 19260  
ttctctctt tctctctctc tttctctctt ctctctctc ttctctctc tctctctctc 19320

ccttcacctt ccccttcctt cctctttccc ttccccttct ccttctctc aatctacaat 19380  
 ctgttaacat attaacatgt cccagagtag agcaacagac tcaggtcaaa catctactga 19440  
 gaaatttgcc catgtagtta acatctacag catctgtcta ggggttacia aaagtctatg 19500  
 ggatacaatt cctcagaaag gaataggatt tggacctgag catactgctg cctaacacat 19560  
  
 gaaatggcag ttctttcca gctggactag gtccttaact aagaatgca ctgctcatga 19620  
 atatgcaaat tacccaagtc tatggcagta aatacagaga tgtccacacc ctgaagacia 19680  
 cctatgaaca atgttctctc cacagtcctt gaagacactg attcta 19726  
 <210> 12  
 <211> 7928  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 12  
 ctgagcattg cagactaatc ttggatattt gtccttgagg gagccggctg agagaagttg 60  
 ggaaataaac tgtctagggg tctcagagcc tttaggacag attatctcca catctttgaa 120  
 aaactaagaa tctgtgtgat ggtgttggig gagtccctgg atgatgggat agggactttg 180  
  
 gaggctcatt tgaggagat gctaaaacia tcctatggct ggagggatag ttggggctgt 240  
 agttggagat tttcagtttt tagaataaaa gtattagctg cggaatatac ttcaggacca 300  
 cctctgtgac agcatttata cagtatccga tgcataggga caaagagtgg agtggggcac 360  
 tttctttaga tttgtgagga atgttccaca ctagattgtt taaaacttca tttgttgaa 420  
 ggagagctgt cttagtattt gagtcaaggg agaaaggcat ctagcctcgg tctcaaaagg 480  
 gtagttgctg tctagagagg tctggaggag cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac 540  
 agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga 600  
  
 aaaatagtta aactactgga ctttaaaatg tgagagggtt ttcaagtact cattttttta 660  
 aatgtccaaa attcttgtca atcagtttga ggtcttgttt gtgtagaact gatattactt 720  
 aaagtttaac cgaggaatgg gagtgagctt ctctcataac ctattcagaa ctgactttta 780  
 acaataataa attaagtttc aatatTTTTT aaatgaattg agcaatgttg agttggagtc 840  
 aagatggccc atcagaacca gaacacctgc agcagctggc aggaagcagg tcatgtggca 900  
 aggctatttg gggaagggaa aataaaacca ctaggtaaac ttgtagctgt ggtttgaaga 960  
 agtggttttg aaacactctg tccagcccca ccaaccgaa agtccaggct gagcaaaaca 1020  
  
 ccacctgggt aatttgcatt tctaaaataa gttgaggatt cagccgaaac tggagaggtc 1080  
 ctcttttaac ttattgagtt caacctttta attttagctt gtagtattct agtttcccca 1140

aacttaagtt tatcgacttc taaaatgtat ttagaattca ttttcaaaat taggttatgt 1200  
aagaaattga aggactttag tgtctttaat ttctaataata tttagaaaac ttcttaaaat 1260  
tactctatta ttcttcctc tgattattgg tctccattca attcttttcc aataaccgaa 1320  
gcatttacag tgactttggt catgatcttt tttagttggt tgttttgctt tactattaag 1380  
actttgacat tctggcaca acggcttcac aaatctttt caagaccact ttctgagtat 1440

tcattttagg agaaagactt tttttttaa tgaatgcaat tatctagact tatttcagtt 1500  
gaacatgctg gtgggtggt gagaggacac tcagtcagtc agtgacgtga agggcttcta 1560  
agccagtcca catgctctgt gtgaactccc tctggcctg cttattgttg aatgggcca 1620  
aggctcgaga ccaggctgct gctgggtagg cctggacttt gggtctccca ccagacctg 1680  
ggaatgatg gtgtggctt ctgccacca tccacctggc tgctcatgga ccagccagcc 1740  
tcggtggctt tgaaggaaca attccacaca aagactctgg acctctccga aaccaggcac 1800  
cgcaaatggt aagccagagg cagccacagc tgtggctgct gctcttaaag cttgtaaact 1860

gtttctgctt aagagggact gagtcttcag tcattgcttt agggggagaa agagacattt 1920  
gtgtgcttt tgagtaccgt tgtctgggtc actcacattt aactttcctt gaaaaactag 1980  
taaaagaaaa atgttgctg ttaaccaata atcatagagc tcatggtact ttgaggaaat 2040  
cttagaaagc gtgtatacaa ttgtctggaa ttatttcagt taagtgtatt agttgaggta 2100  
ctgatgctgt ctctacttca gttatacatg tgggtttgaa ttttgaatct attctggctc 2160  
ttcttaagca gaaaatttag ataaaatgga tacctcagtg gtttttaatg gtgggtttaa 2220  
tatagaagga atttaaattg gaagctaatt tagaatcagt aaggaggac ccaggctaag 2280

aaggcaatcc tgggattctg gaagaaaaga tgtttttagt ttttatagaa aacactacta 2340  
cattcttgat ctacaactca atgtggttta atgaattga agttgccagt aatgtactt 2400  
cctggttggt aaagaatggt atcaaaggac agtgcttaga tccgaggtga gtgtgagagg 2460  
acaggggctg gggatggat acgcagaagg aaggccacag ctgtacagaa ttgagaaaga 2520  
atagagacct gcagttgagg ccagcaggtc ggctggacta actctccagc cacagtaatg 2580  
accagacag agaaagccag actcataaag cttgctgagc aaaattaagg gaacaaggtt 2640  
gagagccta gtaagcgagg ctctaaaaag cacagctgag ctgagatggg tgggcttctc 2700

tgagtcttc taaaatgctc taaactgagg tgattactct gaggtagca aagctgggct 2760  
tgagccaaaa tgaagtagac tgtaatgaac tggaatgagc tgggccgcta agctaacta 2820  
ggctggctta accgagatga gccaaactgg aatgaacttc attaacttag gttgaataga 2880  
gctaaactct actgcctaca ctggactgtt ctgagctgag atgagctggg gtgagctcag 2940  
ctatgctacg ctgtgttggg gtgagctgat ctgaaatgag atactctgga gtgagctgaga 3000

tggggtgaga tggggtgagc tgagctgggc tgagctagac tgagctgagc tagggtgagc 3060  
 tgagctgggt gagctgagct aagctggggt gagctgagct gagcttggt gagctagggt 3120  
  
 gagctgggct gagctggggt gagctgagct gagctggggt aagctgggat gagctggggt 3180  
 gagctgagct gagctggagt gagctgagct gggtgagct ggggtgagct gggtgagct 3240  
 gggtgagct gggtgagct ggggtgagct gagctggggt gagctgagct gagctggggt 3300  
 gagctgagct gagctggggt gagctggggt gagctgagct ggggtgagct gagctgagct 3360  
 ggggtgagct gagctggggt gagctgagct gagctggggt gagctgagct gagctgagct 3420  
 gagctgagct ggggtgagct gagctgagct gagctggggt gagctggggt gagctgagct 3480  
 gagctggagt gagctgagct gggtgagct ggggtgagct gggtgagct ggggtgagct 3540  
  
 gagctgagct gagctgagct ggggtgagct gagctgagct ggggtgagct gagctggggt 3600  
 gagctgggct gagctgagct gagctgagct gagctgagct gagctgagct gagctgagct 3660  
 gagctgagct gagctgagct gagctgagct gagctggggt gagctgagct gagctgggct 3720  
 gagctggggt gagctgggct gagctgggct gagctgggct gagctggggt gagctgagct 3780  
 ggggtgagct gagctgagct gggtgagct gagctgagct ggggtgagct gagctgagct 3840  
 ggggtgagct gagctgagct gagctggggt gagctgagct gagctgggct gagcagggt 3900  
 gagctggggt gagctgagct gagctggggt gagctgggct gagctgggct gagctgagct 3960  
  
 gagctgggct gagctgggct gagctgggct gagctgggct gagctgggct gagctggggt 4020  
 gagctgagct ggggtgagct ggggtgagct gagctggggt gagctgagct ggggtgagct 4080  
 gagctgagct ggggtgagct gagctggggt gagctgagct gagctggggt gagctgagct 4140  
 gagctggggt gagctgagct aggggaact gggtgggtg agctggagtg agctgagctg 4200  
 aggtgaactg ggggtgagccg ggatgtttg agttgagctg gggtaaagt agctgaactg 4260  
 gggtaaactg ggatgagctg tgggtgagcgg agctggattg aactgagctg tgtgagctga 4320  
 gctggggtca gctgagcaag agtgagtga gctggctggc cagaaccaga atcaattagg 4380  
  
 ctaagtgagc cagattgtgc tgggatcagc tgtactcaga tgagctggga tgaggtagc 4440  
 tgggatgagc tgggtagct gacatggatt atgtgaggct gagctagcat gggtggcct 4500  
 agctgatgag ctaagcttga atgagcgggg ctgagctgga ctgagatgtg ctgactgag 4560  
 ctgtactgga tgatctggtg tagggtgatc tggactcaac tgggctggct gatgggatgc 4620  
 gccaggttga actaggctca gataagttag gctgagtagg gcctggttga gatggttcgg 4680  
 gatgagctgg gaaaagatgg actcggacca tgaactgggc tgagctgggt tgggagacca 4740

tgaattgagc tgaactgagt gcagctggga taaactgggt tgagctaaga atagactacc 4800

tgaattgtgc caaactcggc tgggatcaat tggaaattat caggatttag atgagccgga 4860

ctaaactatg ctgagctgga ctggttggat gtgttgaact ggctgctgc tgggctggca 4920

tagctgagtt gaacttaaat gaggaaggct gagcaaggct agcctgcttg catagagctg 4980

aactttagcc tagcctgagc tggaccagcc tgagctgagt aggtctaaac tgagttaaaa 5040

atcaacaggg ataattaac agctaattta acaagcctga ggtctgagat tgaatgagca 5100

gagctgggat gaactgaatg agttcacca ggctggacc agttaggcta ggacctggt 5160

ctatagagc agactgtgtg ctacagtgga gtttcaagat gattccatga gtctccccg 5220

cccccaacat aaccacctt cctctacc tacacgcctg tctggtgtgt aatcccagc 5280

tttgtgtgct gatacagaag cctgagcccc tccccacct ccacctacct attactttgg 5340

gatgagaata gtctcccag ccagtgtctc agagggaagc caagcaggac aggcccaagg 5400

ctacttgaga agccaggatc taggcctctc cctgagaacg ggtgttcatg ccctagagt 5460

tggctgaagg gccagatcca cctactctag aggcattctc ccctgtctgt gaaggcttc 5520

aaagtacgt tctgtggct agaaggcagc tccatagccc tctgcagtt tctctctgta 5580

taccaggttc acctactacc atatctagcc ctgcctgct taagagtagc aacaaggaaa 5640

tagcagggtg tagagggatc tctgtctga caggaggcaa gaagacagat tcttaccct 5700

ccatttctct ttiatccctc tctggctctc agagagtcag tcttcccaa atgtcttccc 5760

cctgtctcc tgcgagagcc ccctgtctga taagaatctg gtggccatgg gctgcctggc 5820

ccgggacttc ctgcccagca ccatttctt cacctggaac taccagaaca aactgaagt 5880

catccagggt atcagaacct tccaacact gaggacaggg ggcaagtacc tagccacctc 5940

gcaggtgttg ctgtctccca agagcatcct tgaaggtca gatgaatacc tggatgcaa 6000

aatccactac ggaggcaaaa acaaagatct gcatgtgccc attccaggtg agaaccaaac 6060

cctcccagca ggggtgccca ggcccaggca tggcccagag ggagcagcgg ggtggggctt 6120

aggccaagct gagctcacac cttgacctt cattccagct gtcgagaga tgaaccccaa 6180

tgtaaatgtg ttcgtccac cacgggatgg cttctctggc cctgcaccac gcaagctaa 6240

actcatctgc gaggccagca acttactcc aaaaccgatc acagtatcct ggctaaagga 6300

tgggaagctc gtggaatctg gcttaccac agatccgtg accatcgaga acaaaggatc 6360

cacacccaa acctacaagg tcataagcac acttaccatc tctgaaatcg actggctgaa 6420

cctgaatgtg tacacctgcc gtgtggatca caggggtctc acctcttga agaactgtc 6480

ctccacatgt gctgccagtg agtggcctgg gctaagccca atgcctagcc ctcccagatt 6540  
 agggaagtcc tctacaatt atggccaatg ccaccagac atggtcattt gtccttgaa 6600  
 ctttggtccc ccagagtggc caaggacaag aatgagcaat aggcagtaga ggggtgagaa 6660  
 tcagctggaa ggaccagcat cttcccttaa gtaggtttgg gggatggaga ctaagctttt 6720  
 ttccaacttc acaactagat atgtcataac ctgacacagt gttctcttga ctgcaggtcc 6780  
 ctccacagac atcctaacct tcaccatccc cccctccttt gccgacatct tcctcagcaa 6840  
 gtccgctaac ctgacctgic tggctcaaa cctggcaacc tatgaaacce tgaatatctc 6900

ctgggcttct caaagtggtg aacctgga aaccaaatt aaaatcatgg aaagccctcc 6960  
 caatggcacc ttcagtgcta aggggtggc tagtgtttgt gtggaagact ggaataacag 7020  
 gaaggaattt gtgcgtactg tgactcacag ggatctgctt tcaccacaga agaaatcat 7080  
 ctcaaaacce aatggtaggt atccccctt ccttccctt ccaattgcag gaccttctc 7140  
 gtacctcata gggagggcag gtcccttcc acctatcct cactactgic ttcatttaca 7200  
 gaggtgcaca aacatccacc tgctgtgtac ctgctgccac cagctcgtga gcaactgaac 7260  
 ctgagggagt cagccacagt cacctgctg gtgaagggt tctctctgc agacatcagt 7320

gtgcagtggc ttcagagagg gcaactcttg cccaagaga agtatgtgac cagtgccccg 7380  
 atgccagagc ctggggcccc aggettctac tttaccaca gcatcctgac tgtgacagag 7440  
 gaggaatgga actccggaga gacctatacc tgtgtttag gccacgagc cctgccacac 7500  
 ctggtgaccg agaggaccgt ggacaagtcc actggtaac ccacactgta caatgtctcc 7560  
 ctgatcatgt ctgacacagg cggcacctgc tattgacat gctagcgtc aaccaggcag 7620  
 gccctgggtg tccagttgct ctgtgtatgc aaactaacca tgtcagagtg agatgttgca 7680  
 tttataaaa attagaaata aaaaaatcc attcaaacgt cactggtttt gattatacaa 7740

tgctcatgcc tgetgagaca gttgtgtttt gcttgctctg cacacacct gcatactgic 7800  
 ctccaccctg gcccttctc taccttgcca gtttctcct tgtgtgtgaa ctcagtcagg 7860  
 cttacaacag acagagtatg aacatcgat tctccagct acttctagat atatggctga 7920  
 aagcttgc 7928

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLSG

<400> 13

Gly Leu Ser Gly

1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> linker - GGGGS

<400> 14

Gly Leu Ser Gly Ser Gly

1                    5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker - GLSGLSGS

<400> 15

Gly Leu Ser Gly Leu Ser Gly Ser

1                    5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLSGLSGLSG linker

<400> 16

Gly Leu Ser Gly Leu Ser Gly Leu Ser Gly

1                    5                    10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLSGGSLSG

<400> 17

Gly Leu Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly

1                    5                    10

<210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' detect VH1-69 FR3  
 <400> 18  
 acagaagttc cagggcagag 20  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' up detect spec  
 <400> 19  
 tgtccactgg gttcgtgcct t 21  
 <210> 20  
 <211>  
 > 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' down detect spec  
 <400> 20  
 cagtatcagc ccgtcact t 21  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' VH1-69 overlap detect  
 <400> 21  
 taaccctgt catctctc 19  
 <210> 22  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' DNA Target (PAM)  
 <400> 22

ggatcctggt ttagttaaag agg 23

<210> 23  
 <211> 42  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' VH1-69 Cas9 crRNA  
 <400> 23  
 ggaucugggu uuaguuaaag guuuuagagc uaucguguuu ug 42  
 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' DNA Target(PAM)  
 <400> 24  
 gacaaaaacc ctgagggaga agg 23  
 <210> 25  
 <211> 42  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3 VH1-69 Cas9 crRNA  
 <400> 25  
 gacaaaaacc cugagggaga guuuuagagc uaucguguuu ug 42  
 <210> 26  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' up detect VH1-69  
 <400> 26  
 ctgtgaaata ccctgcctc 19  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' up detect spec  
 <400> 27  
 tgtccactgg gttcgtgcct t 21  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 5' down detect spec  
 <400> 28  
 cagtatcagc ccgtcact t 21  
  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3'down detect M1116(h70)  
 <400> 29  
 cccccctttg ctctctttct 20  
 <210> 30  
 <211> 80  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VH1-69 MreI del Joiner Oligo  
 <400> 30  
 gtgaaaacc acatcctgag agtgacaaaa acctgaggg agaaggcagc tgtgccgggc 60  
 tgaggagatg acaggggtta 80  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> 5' detect VH1-69 FR3  
 <400> 31  
 acagaagttc cagggcagag 20  
 <210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3'down detect M1116(h70)

<400> 32

ccccctcttg ctctctttct

20