



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년04월03일  
(11) 등록번호 10-0891634  
(24) 등록일자 2009년03월27일

(51) Int. Cl.  
C12N 15/64 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)  
A01K 67/027 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-7012809(분할)  
(22) 출원일자 2007년06월07일  
심사청구일자 2007년07월05일  
번역문제출일자 2007년06월07일  
(65) 공개번호 10-2007-0085842  
(43) 공개일자 2007년08월27일  
(62) 원출원 특허 10-2001-7015876  
원출원일자 2001년12월10일  
심사청구일자 2005년06월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/015782  
국제출원일자 2000년06월08일  
(87) 국제공개번호 WO 2000/76310  
국제공개일자 2000년12월21일  
(30) 우선권주장  
09/329,582 1999년06월10일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
W01998024893 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
아브게닉스, 인크.  
미국 94555 캘리포니아주 프레몬트 덤바톤 씨클 7601  
(72) 발명자  
그린 라리 엘  
미국 캘리포니아주 94131 샌프란시스코 70 크레스틀린 드라이브아파트먼트 12  
이바노브 블라디미르 이  
미국 캘리포니아주 94555 프레몬트 타나거 코몬 4275  
테비스 씨 지오프리  
미국 캘리포니아주 94010 부르링감 벵쿠버 애비뉴 1132  
(74) 대리인  
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김지윤

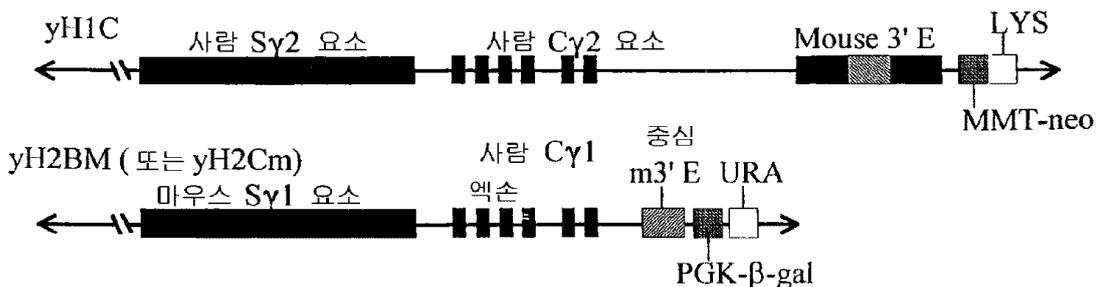
(54) 비동종형 스위치 영역에 의해 인간 항체의 특정 이소타입을생산하는 트랜스제닉 동물

(57) 요약

본 발명은 원하는 거의 모든 항원에 의한 면역화에 반응하는 원하는 이소타입의 완전한(fully) 인간 항체를 트랜스제닉 동물에서 제공한다. 상기 동물에 존재하는 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자는 원하는 중쇄 이소타입을 암호화하는 엑손을 포함하고 이 엑손이 상이한 중쇄 이소타입의 불변 영역 유래의 스위치 세그먼트(즉, 비동종형 스위치 영역)에 작동가능하게 연결된 인간 불변 영역 유전자 세그먼트를 포함한다. 상기 추가 불변 영역 세그먼트는 스위치 영역 및 인간 불변 영역을 암호화하는 세그먼트를 포함하고, 여기서 불변 영역 암호화 세그먼트는 정상적으로는 연결되지 않는 스위치 영역, 즉 비동종형 스위치 영역에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 트랜스유전자에서, 비동종형 스위치 영역은 불변 영역 암호화 세그먼트와 상이한 종 유래의 스위치 영역일 수 있다. 본 발명의 스위치 영역 및 막 엑손은 인간 감마-2 불변 영역을 포함할 수 있고, 분비형 불변 영역 엑손은 인간 감마-1 또는 인간 감마-4 불변 영역으로부터 유래될 수 있다.

대표도

y2Bm 대 yH1C 의 C $\gamma$  영역 구조



(81) 지정국

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

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

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

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

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

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

인간 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터로서, 상기 인간 불변 영역은 상부에서 하부 방향 순서로 스플라이스 어셉터 부위(splice acceptor site), 인간 CH1, C<sub>힌지(hinge)</sub>, CH2 및 CH3 엑손, 및 인간 막(membrane) 엑손을 포함하고, 상기 CH1, C<sub>힌지</sub>, CH2 및 CH3 엑손은 하나의 이소타입에서 유래하며, 상기 막 엑손은 상이한 이소타입에서 유래하고, 상기 서열은 상기 불변 영역의 스플라이스 어셉터 부위의 상부에 loxP 부위를 더 포함하는 것인 벡터.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 불변 영역의 분비된 형태를 암호화하는 것인 벡터.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 인간 막 엑손이 인간 감마-2 서열인 것인 벡터.

**청구항 4**

제1항에 있어서, CH1, C<sub>힌지</sub>, CH2 및 CH3 엑손이 인간 감마-1 불변 영역, 인간 감마-3 불변 영역, 인간 감마 4-불변 영역, 인간 알파-1 불변 영역, 인간 알파-2 불변 영역, 및 인간 입실론 불변 영역으로 구성된 군에서 선택된 인간 불변 영역을 암호화하는 것인 벡터.

**청구항 5**

제1항에 있어서, CH1, C<sub>힌지</sub>, CH2 및 CH3 엑손이 인간 감마-1 불변 영역을 암호화하는 것인 벡터.

**청구항 6**

제1항에 있어서, CH1, C<sub>힌지</sub>, CH2 및 CH3 엑손이 인간 감마-4 불변 영역을 암호화하는 것인 벡터.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 벡터가 불변 영역 유전자의 하부에 전사 종결자(transcriptional terminator) 서열을 더 포함하는 것인 벡터.

**청구항 8**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 벡터가 선별가능한 마커를 더 포함하는 것인 벡터.

**청구항 9**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 벡터가 효모 인공 염색체(YAC)인 것인 벡터.

**청구항 10**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 11**

제10항에 있어서, CRE 재조합효소(recombinase) 또는 CRE 재조합효소를 암호화하는 벡터를 더 포함하는 것인 숙주 세포.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 효모 세포인 것인 숙주 세포.

**청구항 13**

제10항에 있어서, 배아 줄기(ES) 세포인 것인 숙주 세포.

**청구항 14**

시험관내 또는 생체내 클래스-스위칭(class-switching)을 겪는 불멸화된 세포를 생산하는 방법으로서,

(a) 인간 염색체 14번 상의 면역글로불린 중쇄 좌위의 D 세그먼트 유전자로부터, J 세그먼트 유전자와 불변 영역 유전자 C $\mu$ 를 통해 계속되는 인접 영역의 DNA 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 하이브리도마를 생산하는 단계로서, 상기 DNA 단편은 하나 이상의 인간 V 세그먼트 유전자에 작동가능하게 연결되고, 상기 DNA 단편은 추가 불변 영역 유전자에 추가적으로 작동가능하게 연결되며, 상기 추가 불변 영역 유전자는 스위치 영역 및 인간 불변 영역 암호화 엑손을 포함하고, loxP 부위가 스위치 영역의 3' 및 CH1 엑손의 5'에 삽입되는 것인 단계;

(b) 상기 하이브리도마에 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 벡터를 도입하는 단계; 및

(c) 상기 하이브리도마에 CRE 재조합효소 또는 CRE 재조합효소를 발현하는 벡터를 도입하는 단계로서, CRE 재조합효소는 loxP 부위들간의 재조합을 매개하여 클래스-스위칭을 발생시키는 것인 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

인간 염색체 14번 상의 면역글로불린 중쇄 좌위의 D 세그먼트 유전자로부터, J 세그먼트 유전자와 불변 영역 유전자 C $\mu$ 를 통해 계속되는 인접 영역의 DNA 서열을 포함하는 DNA 단편; 및 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 벡터를 포함하는 불멸화된 세포로서, 상기 DNA 단편은 하나 이상의 인간 V 세그먼트 유전자에 작동가능하게 연결되고, 상기 DNA 단편은 추가 불변 영역 유전자에 추가적으로 작동가능하게 연결되며, 상기 추가 불변 영역 유전자는 스위치 영역 및 인간 불변 영역 암호화 엑손을 포함하고, loxP 부위가 스위치 영역의 3' 및 CH1 엑손의 5'에 삽입되는 것인 세포.

**청구항 16**

제15항에 있어서, CRE 재조합효소 또는 CRE 재조합효소를 암호화하는 벡터를 더 포함하는 것인 세포.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 하이브리도마인 것인 세포.

**청구항 18**

하나 이상의 체세포 및/또는 하나 이상의 생식 세포가 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 벡터를 포함하는 것인 키메라 또는 트랜스제닉 비인간 동물 및 그 자손.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 비인간 동물이 마우스인 것인 비인간 동물.

**청구항 20**

제19항에 따른 동물에서 유래된 세포.

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- <9> 본 발명은 비동족형 스위치 영역에 의해 인간 항체의 특정 이소타입을 생산하는 트랜스제닉 동물에 관한 것이다.
- <10> 단클론성 항체(mAb)를 발견하고[G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497(1975)] 4반세기 후에야 비로소 이의 치료 용도를 인식하였다. 단클론성 항체는 현재 이식, 암, 감염성 질환, 심장혈관 질환 및 염증에 있어서 치료법으로 인정되었다. 다수의 단클론성 항체는 광범위한 질환 전조를 치료하는 임상적 치료의 후기 단계에 참여하고 있다. 그 결과 mAb는 최근 발달면에서 가장 큰 부류의 약물 중 하나를 대표한다.
- <11> mAb의 유용성은 복합체 표적의 특이적 인식 및 상기 표적에 대한 고친화성 결합력의 유래이다. 상이한 C<sub>H</sub> 이소타입은 상이한 효과인자 기능을 보유하기 때문에, mAb 이소타입을 원하는 효과인자 기능에 맞추는 것이 바람직하다. 예를들면, 효과인자 기능을 갖는 불변 영역을 보유하는 mAb, 예컨대 인간 IgG<sub>1</sub>을 사용하여 표적 세포에 보체 의존성 세포독성 또는 항체 의존성 세포독성을 야기시킬 수 있다. 대안으로, 효과인자 기능을 거의 결여한 불변 영역을 갖는 mAb, 예컨대, 인간 IgG<sub>2</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>를 사용하여, 리간드에 결합하여 이를 중화시킴으로써 또는 수용체 결합 부위를 차단함으로써 신호전달을 차단시킬 수 있다.
- <12> 단클론성 항체에 대한 다수의 치료 적용에는, 특히 자가면역 또는 암과 같은 만성 질환의 경우, 반복적인 투여가 필요하다. 마우스는 면역화하는데 편리하고 대부분의 인간 항원을 외래물질로 인식하기 때문에, 치료 잠재력을 갖는 인간 표적에 대한 mAb는 통상 쥐로부터 유래된다. 그러나, 쥐 mAb는 인간 치료법에 고유의 단점을 갖는다. 쥐 mAb는 인간 항체보다 인체내 순환 반감기가 더 짧기 때문에 mAb의 치료 수준을 유지하기 위해서는 더 자주 투여가 필요하다. 더욱 결정적으로, 쥐 면역글로불린의 반복된 투여는 인간 면역계가 마우스 단백질을 외래물질로 인식하여 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 형성시킬지도 모르는 가능성을 형성한다. 기껏해야, HAMA 반응의 결과는 반복된 투여시 쥐 항체가 신속하게 제거되어 치료법을 유용하지않게 할 것이다. HAMA 반응은 심각한 알러지 반응을 야기시킬 수 있을 가능성이 더 크다. 이러한 감소된 효능 및 안정성의 가능성은 쥐 mAb의 면역원성을 감소시키기 위한 다수의 기법을 발달시켜왔다.
- <13> 마우스에서 형성된 항체의 면역원성을 감소시키기 위해, 인간화로 현재 알려진 공정에서 인간 단백질 서열로 쥐 단백질 서열을 치환하려는 다양한 시도가 있어왔다. 인간화 제1 시도는 재조합 항체를 제작하는 분자생물학적 기법을 사용하였다. 예를들면, 합텐에 특이적인 마우스 항체 유래의 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 항체 프레임워크에 이식하여 CDR 치환을 수행하였다. 새로나온 항체는 CDR 서열에 의해 전달되는 결합 특이성을 보유하였다. [P.T. Jones 등, Nature 321:522-525(1986)를 참조하라]. 다음 수준의 인간화는 전체 마우스 VH 영역(HuVnp)을 인간 불변영역(예,  $\gamma$ 1)과 결합시키는 단계를 포함한다.[S.L. Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, pp.6851-6855(1984)]. 이러한 키메라 항체는 여전히 30% 이상의 이종발생성 서열을 함유하며 종종 전체 이종발생성 항체보다 약간 더 작은 면역원성을 갖는다. [M. Bruggemann 등, J. Exp. Med., 170, pp.2153-2157(1989)].
- <14> 이어서, 마우스 내로 인간 면역글로불린 유전자를 도입하여 인간 서열을 갖는 항체와 함께 항원에 반응할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 생산하려는 시도가 수행되었다. [Bruggemann 등, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713(1989)를 참조하라]. 이러한 시도들은 입수가 가능한 클로닝 운반체에 의해 안정하게 유지될 수 있는 DNA의 양에 의해 제한된다고 생각되었다. 결국, 다수의 연구자들은 제한된 수의 V 영역 유전자를 함유하고 천연형 또는 생식계열형 배치와 비교하여 유전자들 사이의 공간적 거리가 변경된 미니-좌위를 생산하는데 집중하였다. [Lonberg 등의 미국특허 제5,569,825호 (1996) 참조하라]. 이들 연구에 의하면 마우스에서 인간 서열 항체를 생산하는 것은 가능하나 성장하는 항체 요법의 요구를 충족시키기 위해 이들 트랜스제닉 동물로부터 충분히 다양한 결합 특이성 및 효과 인자 기능(이소타입)을 얻는 것과 관련하여서는 심각한 장애가 있다.
- <15> 추가적인 다양성을 제공하기 위해, 인간 Ig 좌위의 거대한 생식계열 단편들을 트랜스제닉 포유류 안으로 추가하는 작업을 수행하였다. 예를들면 효모 인공 염색체(YAC) 클로닝 벡터를 사용하여 인간 게놈의 재배열되지 않은 생식계열에서 발견되는 것과 동일한 간격으로 배열된 대부분의 인간 V, D 및 J 영역 유전자와, 인간 C<sub>H</sub> 및 C<sub>δ</sub> 불변영역을 마우스 안으로 도입하였다. [Kucherlapati 등의 PCT 특허출원 WO 94/02602을 참조하라]. 클래스-스위치 재조합에 필요한 인간 감마-2 불변 영역을 암호화하는 서열 및 상류 서열을 포함하는 22kb DNA 단편을 나

중에 전술한 트랜스유전자에 첨가하였다. 게다가,  $V_k$ ,  $J_k$  및  $C_k$  영역 유전자를 포함하고 또 인간 게놈의 재배열되지 않은 생식계열에서 발견된 간격과 거의 동일하게 배열된 인간 카파 좌위의 일부도 YAC을 사용하여 마우스 안으로 도입하였다. 유전자 표적화를 사용하여 쥐 IgH & 카파 경쇄 면역글로불린 유전자 좌위를 불활성화시켰고, 이러한 유전자과파(knockout) 계통을 상기 트랜스제닉 계통과 교배하여 인간  $V$ ,  $D$ ,  $J$ ,  $C_\mu$ ,  $C_\delta$  및  $C\gamma 2$  불변영역뿐만아니라 인간  $V_k$ ,  $J_k$  및  $C_k$  영역 유전자 모두를 불활성화된 쥐 면역글로불린 백그라운드 상에 보유하는 마우스 계통을 생성하였다. [Kucherlapati 등의 PCT 특허출원 WO 94/02602 참조; 또한 Mendez 등, Nature Genetics 15:146-156(1997) 참조].

<16> 내인성 좌위의 유전자 표적화 및 트랜스제닉 계통의 교배와 결합하여 클로닝 벡터로서 효모 인공 염색체는 항체 다양성 문제점의 해결책 하나를 제공하였다. 수개의 잇점이 이 접근법에 의해 얻어졌다. 한 잇점은 YAC을 사용하여 수백 kb의 DNA를 숙주 세포 내로 전달시킬 수 있다는 것이었다. 따라서, YAC 클로닝 운반체를 사용하면 전체 인간 Ig 중쇄 및 경쇄 영역의 상당한 부분을 트랜스제닉 동물 내로 포함시켜서 인간한테 유용한 잠재적인 다양성 수준에 접근할 수 있다. 이 접근법의 또다른 잇점은 다수의 V 유전자가 쥐 면역글로불린 생산이 결여된 마우스에서 완전한 B 세포 발달을 회복시키는 것으로 보여졌다. 이는 이들 재구성된 마우스가 임의의 소정 면역원에 대한 강력한 인간 항체 반응을 개시하는데 필요한 세포를 구비한다는 것을 보증한다. [Kucherlapati 등의 PCT 특허출원 WO94/02602; L.Green and A. Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495(1998)을 참조하라]. 또다른 잇점은 효모 내 고 빈도수의 상동성 재조합을 사용하여 YAC 상으로 서열을 결실 또는 삽입시킬 수 있는 점이다. 이것은 YAC 트랜스유전자의 용이한 조작을 제공한다.

<17> 전술한 바와 같이, 인간 항체를 생산하는 포유류를 형성시키기 위해 존재하는 전략이 수개 있다. 특히, GenPharm International, Inc. 및 Medical Research Council의 작업에 의해 대표되는 "미니좌위" 접근법, Abgenix, Inc.(이전에는 Cell Genesys)의 작업에 의해 대표되는 Ig 좌위의 거대하고 실질적인 생식계열 단편들의 YAC 도입, 및 Kirin Beer kabushiki Kaisha의 작업에 의해 대표되는 미세세포 융합의 사용을 통한 좌위 전부 또는 거의 전부의 도입이 있다.

<18> 미니좌위 접근법의 경우, 외인성 Ig 좌위는 Ig 좌위 유래의 조각들(개별적인 유전자들)을 포함함으로써 모방된다. 따라서, 하나 이상의  $V_H$  유전자, 하나 이상의  $D_H$  유전자, 하나 이상의  $J_H$  유전자,  $\mu$  불변영역, 및 제2 불변영역(바람직하게는 감마 불변 영역)이 동물 내로의 삽입을 위한 구조체 내로 형성된다. 이 접근법은 Surani 등의 미국특허 제5,545,807호 및 Lonberg and Kay의 미국특허 제5,545,806호, 제5,625,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 제5,770,429호, 제5,789,650호 및 제5,814,318호, Krimpenfort and Berns의 미국특허 제5,591,669호, Berns 등의 미국특허 제5,612,205호, 제5,721,367호, 제5,789,215호, Choi and Dunn의 미국특허 제5,643,763호, GenPharm International 미국특허출원 일련번호 제07/574,748호(1990. 8. 29. 출원) 제07/575,962호(1990. 8. 31. 출원), 제07/810,279호(1991. 12. 17. 출원), 제07/853,408호(1992. 3. 18. 출원), 제07/904,068호(1992. 6. 23. 출원), 제07/990,860호(1992. 12. 16. 출원), 제08/053,131호(1993. 4. 26. 출원), 제08/096,762호(1993. 7. 22. 출원), 제08/155,301호(1993. 11. 18. 출원), 제08/161,739호(1993. 12. 3. 출원), 제08/165,699호(1993. 12. 10. 출원), 제08/209,741호(1994. 3. 9. 출원)에 기재되어 있거나 이 작업들과 관련이 있다(상기 문헌은 본 명세서에 인용되어 있음). 또한 유럽특허번호 0 546 073 B1, 국제특허출원번호 WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, 및 WO 98/24884를 참조하라(상기 문헌은 모두 본 명세서에 인용됨). 나아가 Taylor 등의 문헌["A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins", Nucleic Acids Research 20:6287-6295(1992)], Chen 등의 문헌["Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the  $J_H$  locus" International Immunology 5:647-656(1993)], Tuailon 등의 문헌["Analysis of direct and inverted DJ rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus" J. Immunol. 154:6453-6465(1995)], Choi 등의 문헌["Trnasgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome" Nature Genetics 4:117-123(1993)], Lonberg 등의 문헌["Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications" Nature 368:856-859(1994)], Taylor 등의 문헌["Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM" International Immunology 6:579-591(1994)], Tuailon 등의 문헌["Analysis of direct and inverted  $DJ_H$  rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus" J. Immunol. 154:6453-6465(1995)] 및 Fishwild 등의 문헌["High-avidity human IgG monoclonal antibodies

from a novel strain of minilocus transgenic mice" Nature Biotech. 14:845-851(1996)]을 참조하라(상기 문헌들은 모두 본 명세서에 인용되어 있음).

- <19> YAC 도입과 관련하여, Green 등의 문헌[Nature Genetics 7:13-21(1994)]은 인간 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위 각각의 245kb 및 190 kb-크기의 생식계열형 배치 단편(중심 가변 및 불변 영역 서열을 함유함)을 함유하는 YAC의 생산을 기재하고 있다. Id. Green 등의 작업은 최근 인간 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위 각각의 메가베이스 크기의 생식계열형 배치 YAC 단편들을 도입시킴으로써 약 80% 이상의 인간 항체 레파토리 도입을 확장시켜 Xenomouse<sup>TM</sup> 마우스를 생산하였다. Mendez 등의 문헌[Nature Genetics 15:146-156(1997)], Green and Jakobovits의 문헌[J. Exp. Med. 188:483-495(1998)], 및 미국특허출원 일련번호 제08/759,620호(1996. 12. 3. 출원)를 참조하라(상기 문헌은 모두 본 명세서에 인용되어 있음). 이러한 접근법은 미국특허출원 일련번호 제 07/466,008호(1990. 1. 12. 출원), 제07/610,515호(1990. 11. 8. 출원), 제07/919,297호(1992. 7. 24. 출원), 제07/922,649호(1992. 7. 30출원), 제08/031,801호(1993. 3. 15. 출원), 제08/112,848호(1993. 8. 27. 출원), 제08/234,145호(1994. 4. 28. 출원), 제08/376,279호(1995. 1. 20. 출원), 제08/430,938호(1995. 4. 27. 출원), 제08/464,584호(1995. 6. 5. 출원), 제08/464,582호(1995. 6. 5. 출원), 제08/463,191호(1995. 6. 5. 출원), 제08/462,837호(1995. 6. 5. 출원), 제08/486,853호(1995. 6. 5. 출원), 제08/486,857호(1995. 6. 5. 출원), 제08/486,859호(1995. 6. 5. 출원), 제08/462,513호(1995. 6. 5. 출원), 제08/724,752호(1996. 10. 2. 출원), 제08/759,620호(1996. 12. 3. 출원)에 더 논의되고 자세히 서술되어 있다. 또한, 문헌[Mendez 등 Nature Genetics 15:146-156(1997)] 및 문헌[Green and Jakobovits J.Exp.Med. 188:483-495(1998)]를 참조하라. 또한, 유럽특허 EP 0 463 151 B1(1996. 6. 12. 등록공개), 국제특허출원 제WO 94/02602호(1994. 2. 3. 공개), 국제특허출원 제WO 96/34096호(1996. 10. 31. 공개) 및 제WO 98/24893호(1998. 6. 11. 공개)도 참조하라. 상기 인용된 각 특허, 특허출원 및 문헌의 내용은 모두 본 명세서에 인용되어 있다.
- <20> 미세세포 융합 접근법과 관련하여 인간 염색체 일부 또는 전부는 유럽 특허출원 EP 0 843 961 A1에 기재된 바와 같이 마우스 안으로 도입될 수 있다(상기 문헌은 본 명세서에 인용되어 있음). 이 접근법을 사용하여 형성되고 인간 Ig 중쇄 좌위를 함유하는 마우스는 일반적으로 하나 이상의 인간 불변 영역 유전자들을 그리고 잠재적으로는 모든 인간 불변 영역 유전자를 보유할 것이라고 이해될 것이다. 따라서, 이러한 마우스는 다수의 상이한 불변 영역을 갖는, 특정 항원에 결합하는 항체를 생산할 것이다. 따라서, 특정 효과인자 기능에 바람직한 불변 영역을 미리선별할 방법이 없다.
- <21> 또한, 트랜스염색체는 유사분열상 그리고 감수분열상 불안정하다. 그 결과, 인간 IgH, 인간 IgK 또는 이들 모두의 트랜스염색체는 80%까지 달하는 빈도수로 손실된다. 이는 비정상적으로 높은 회수율의 마우스 Igλ mAb 및 하이브리도마 불안정성을 산출한다.
- <22> 항체들의 시험관내 이소타입 스위치에 대한 기법이 존재한다. 오직 IgG1 이소타입만을 생산하는 트랜스제닉 마우스로부터 생산된 항체, 다수의 IgG 이소타입들을 생산하는 트랜스제닉 마우스로부터 생산된 항체, 또는 파아지 디스플레이 기법으로 생산된 항체는 원하는 항원 특이성 및 친화도를 갖을 수 있으나 원하는 효과인자 기능을 갖을 수는 없다. 이 예로서, 적어도 항체의 중쇄의 가변 영역과 가장 적당하게는 항체의 경쇄 전부가 클로닝되어야 한다.
- <23> 클로닝 방법은 게놈 DNA를 라이브러리로부터 회수하는 것, cDNA를 라이브러리로부터 회수하는 것, 특이 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 게놈 DNA를 회수하는 것, 및 특이 올리고뉴클레오티드 프라이머와 주형으로써 cDNA를 사용한 PCR(RT-PCR)을 포함한다. 각 방법은, 특히 PCR계 방법은 클론을 서열분석하여 항체 암호화 서열의 믿을만한 재생산을 확인하는 것이 필요하다. 이어서, 중쇄의 가변 영역은 DNA 라이게이션을 통해 원하는 불변 영역의 유전자에 작동가능하게 연결되어야 한다. 이어서, 조작된 VH-CH 유전자는 프로모터-인핸서 및 폴리 아데닐화 부위와 같은 발현 제어 영역에 작동가능하게 연결되어야 한다. 또한 항체의 Ig 경쇄의 경우도 이러한 발현 구조체가 필요하다.
- <24> 발현 구조체(들)은 전사 및 번역을 위해 적당한 숙주 세포 내로 안정하게 형질감염되어 분비형의 조작된 mAb를 생산하여야 한다. 통상, 적어도 광범위한 스크리닝을 수행하여 또다른 실험 및 차후 제조를 위해 mAb를 충분한 수준으로 발현하는 세포계의 클론을 찾아야 한다. 가장 바람직하게는, DNA 증폭과 같은 방법론이 사용되어 항체 발현 구조체의 복제수를 상승시켜 mAb의 발현 수준을 높여야 한다.
- <25> 마지막으로, 재-조작된 mAb를 재검사하여 원하는 성질을 보유하며 원하는 기능(예, 특이성, 친화도 및 효과인자 기능의 존재 또는 부재)을 갖는지를 확인하여야 한다. 이소타입 스위치를 위한 또다른 기법이 존재하나, mAb 이소타입을 재-조작하는 이러한 프로그램 전부가 분자 생물학 및 조직 배양에서 실험 및 전문적 지식을 필요로 하

고, 노동 집약적이며 시간이 걸리며 고비용이고, 특허되거나 출원중인 지적 재산에 의해 보호되고 있어 실시가능하더라도 부가적인 실시료를 필요로 한다. 따라서, 하나의 이소타입으로부터 다른 이소타입으로의 mAb 제조작업은 전문적 지식, 추가의 금전적 지출을 필요로 하며, 전임상 및 임상 시도에 단클론성 항체의 발달을 느리게 한다.

- <26> 원하는 C $\gamma$  이소타입을 갖는 mAb를 생산하는 기법을 선형적으로 보유함으로써, 항체 제조작업에 대한 요구를 불필요하게 한다. 오직 C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 4 또는 C $\gamma$ 1만을 각각 생산하는 3개의 상이한 Xenomouse 계통을 보유함으로써, 트랜스제닉 마우스를 사용할 수 있으며 이어서 이를 면역화하여 원하는 친화도, 항원 특이성 및 원하는 이소타입을 갖으며 원하는 효과인자 기능을 갖는 mAb를 선형적으로 생산할 수 있다. 이것은 단클론성 항체에 기초한 치료법의 발달에 효율성 및 사용자-친화성을 증가시킨다. 분자 생물학 또는 항체 조작법에 있어서 어떠한 전문적 지식도 필요하지 않다. 항원 특이 mAb는 추가의 금전적 및 시간적 소비 없이 직접 전임상 연구에 취할 수 있으며 그 결과 개발비용을 감소시키고 치료 mAb 개발의 시간 스케줄을 가속시킨다.
- <27> 본 발명은 바람직한 특이성 외에 트랜스제닉 마우스로부터 미리 선택된 인간 항체 이소타입을 수득하는 문제점을 해결하는 것에 관한 것이며, 이는 사용될 항체의 치료 목적에 적합하다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <28> 본 발명은, 발명의 일면에서 원하는 거의 모든 항원에 의한 면역화에 반응하는 원하는 이소타입의 고친화도의 완전한(fully) 인간 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 비인간 동물을 제공함으로써 상기 언급한 문제점을 해결한다. 전술한 트랜스제닉 비인간 동물은 체세포 및 생식세포에, 재배열시 원하는 이소타입의 완전한 인간 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자를 보유한다.
- <29> 전술한 동물 안에 있는 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자는, 원하는 중쇄 이소타입을 암호화하는 엑손을 포함하며 상이한 중쇄 이소타입의 불변 영역의 유래의 스위치 세그먼트(즉, 비동종형 스위치 영역)에 작동가능하게 연결된 인간 불변 영역 유전자 세그먼트를 포함한다.
- <30> 전술한 트랜스제닉 비인간 동물은 또한 체세포 및 생식세포에서 인간 면역글로불린 경쇄 트랜스유전자를 보유한다. 바람직한 구체예에서, 트랜스제닉 비인간 동물의 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위가 불활성화되어 이 동물은 내인성 중쇄 또는 경쇄를 생산할 수 없다. 특히 바람직한 구체예에서, 비인간 트랜스제닉 동물은 마우스이다.
- <31> 또다른 일면에서, 본 발명은 재배열시 원하는 이소타입의 인간 중쇄를 암호화하는 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자를 제공한다. 본 발명의 트랜스유전자는 적어도 인간 면역글로불린 중쇄 좌위의 제1 D 세그먼트 유전자로부터 시작하여 J 세그먼트 유전자 및 상기 좌위의 C $\mu$ 를 통과한 불변 영역 유전자까지 계속되는 인간 염색체 14의 DNA 서열과 동일한 DNA 서열을 포함한다. 본 발명의 트랜스유전자의 경우 전술한 DNA 단편은 추가 불변 영역 세그먼트에 작동가능하게 연결되고 부가적인 불변 영역 세그먼트로 이소타입 스위칭할 수 있다. 상기 추가 불변 영역 세그먼트는 스위치 영역 및 인간 불변 영역 암호화 세그먼트를 포함하며, 여기서 불변 영역 암호화 세그먼트는 정상적으로는 연결되지 않는 스위치 영역 즉 비동종형 스위치 영역에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 트랜스유전자에서, 전술한 DNA 단편 및 불변 영역 세그먼트는 하나 이상의 인간 V 세그먼트 유전자에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 일 구체예에서, 트랜스유전자는 효모 인공 염색체(YAC)이다.
- <32> 본 발명의 트랜스유전자에서, 비동종형 스위치 영역은 불변 영역 암호화 세그먼트와 상이한 종 유래의 스위치 영역일 수 있다. 일 구체예에서, 비동종형 스위치 영역은 인간 감마, 알파 또는 입실론 불변 영역을 암호화하는 인간 불변 영역에 작동가능하게 연결된 마우스 스위치 영역이다. 바람직한 일 구체예에서, 스위치 영역은 마우스 감마-1 스위치 영역이다. 더욱 바람직한 구체예에서, 스위치 영역은 마우스 감마-1 스위치 영역이고 인간 불변 영역 암호화 세그먼트는 감마-1 또는 감마-4 불변 영역을 암호화한다. 특히 바람직한 구체예에서, 트랜스유전자는 yH2Bm 효모 인공 염색체(YAC) 또는 yH2Cm YAC이다.
- <33> 다른 구체예에서, 비동종형 스위치 영역 및 불변 영역 암호화 세그먼트 모두는 인간 서열이고, 비동종형 스위치 영역은 불변 영역 세그먼트와 상이한 이소타입의 인간 불변 영역으로부터 유래된 것이다. 바람직한 구체예에서, 스위치 영역은 인간 감마-2 스위치 영역이고 불변 영역 암호화 세그먼트는 감마-2 이외의 이소타입이다. 더욱 바람직한 구체예에서, 본 발명의 트랜스유전자는 인간 감마-2 스위치 영역 및 인간 감마-1 또는 인간 감마-4 불변 영역 암호화 세그먼트를 포함한다. 특히 바람직한 구체예에서, 트랜스유전자는 yHG1 YAC 또는 yHG4 YAC이다.

- <34> 또다른 구체예에서, 본 발명의 트랜스유전자는 인간 비동족형 스위치 영역 및 인간 불변 영역 암호화 세그먼트를 포함하며, 여기서 스위치 영역 및 불변 영역 암호화 세그먼트의 막 엑손은 동일한 인간 불변 영역 이소타입에서 유래되고 분비형 불변 영역 엑손은 상이한 이소타입에서 유래된다. 또한, 본 발명의 트랜스유전자는 인간 비동족형 스위치 영역 및 인간 불변 영역 암호화 세그먼트를 포함하며, 여기서 스위치 영역은 제1 이소타입에서 유래된 것이며 분비형 불변 영역 엑손은 제2 이소타입에서 유래되고 막 불변 영역 엑손은 제3 이소타입에서 유래된다.
- <35> 바람직한 구체예에서, 스위치 영역 및 막 엑손은 인간 감마-2 불변 영역에서 유래된다. 특히 바람직한 구체예에서, 스위치 영역 및 막 엑손은 인간 감마-2 불변 영역에서 유래되고 분비형 불변 영역 엑손은 인간 감마-1 또는 인간 감마-4 불변 영역에서 유래된다. 바람직한 구체예에서, 트랜스유전자는 yHG1/2 YAC 또는 yHG4/2 YAC이다.
- <36> 다른 구체예에서, 본 발명의 임의의 상기 트랜스유전자는 다수의 상이한 인간 VH 유전자를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 트랜스유전자는 50% 이상의 인간 생식계열 VH 유전자를 포함한다. 또다른 구체예에서, 트랜스유전자는 40% 이상의 상이한 인간 VH 유전자를 포함한다. 바람직하게, 트랜스유전자는 66% 이상 상이한 인간 VH 유전자를 포함한다. 가장 바람직하게, 트랜스유전자는 인간 중쇄 좌위의 인간 VH 영역 전부를 포함한다. 또다른 구체예에서, 트랜스유전자는 상당수의 상이한 인간 VH 유전자를 포함하여, 접합부 다양성 또는 체세포 돌연변이 현상을 고려하지 않아도 트랜스유전자가 적어도  $1 \times 10^5$  개의 상이한 기능적인 인간 면역글로불린 중쇄 서열 조합을 암호화할 수 있다. 또다른 구체예에서, 트랜스유전자 내 인간 VH 유전자의 수는 트랜스유전자를 함유하는 트랜스제닉 마우스에서 50%이상의 야생형 마우스 B-세포 집단을 생산할 정도로 충분하다.
- <37> 나아가, 본 발명의 트랜스유전자는 비동족형 스위치 영역을 함유하는 불변 영역 유전자의 3'에 위치하는 쥐 3' 인헨서를 포함한다. 일 구체예에서, 쥐 3' 인헨서는 천연 인헨서의 약 0.9kb 중심 영역이다. 다른 구체예에서, 3' 인헨서는 중심 영역을 포함하는 쥐 인헨서의 약 4kb 영역이다. 또다른 구체예에서, 트랜스유전자는 마우스 주요 인헨서 좌위를 포함한다.
- <38> 다른 일면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 비인간 동물을 생산하는 방법을 제공한다. 이 방법에 따르면, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 트랜스유전자는 비인간 동물의 생식계열로 도입되어 체세포 및 생식세포에 트랜스유전자를 갖는 트랜스제닉 비인간 동물을 생산한다. 인간 중쇄 트랜스제닉 동물을, 인간 면역글로불린 경쇄 트랜스유전자를 함유하는 트랜스제닉 비인간 동물과 교배하면, 본 발명의 인간 중쇄 트랜스유전자 및 인간 경쇄 트랜스유전자를 함유하는 트랜스제닉 비인간 동물이 생산된다. 전술한 트랜스제닉 비인간 동물 중 하나는 불활성화된 중쇄 및/또는 경쇄 좌위를 갖는 동물과 교배하여 완전한 인간 항체를 생산하고 내인성 항체를 생산할 수 없는 트랜스제닉 비인간 동물을 생산할 수 있다.
- <39> 일 구체예에서, 본 발명의 트랜스유전자는 차후 포배 안으로 삽입되는 배아 줄기(ES) 세포 안으로 도입된다. 본 발명의 트랜스유전자를 함유하는 ES 세포를 갖는 포배는 이어서 수술로 비인간 동물의 자궁으로 도입되어 키메라 비인간 동물을 생산한다. 키메라 동물을 교배하여 본 발명의 트랜스유전자를 생식계열 전달하여 체세포 및 생식세포가 본 발명의 트랜스유전자를 함유하는 트랜스제닉 비인간 동물을 생산한다. 따라서, 본 발명의 또다른 일면은 본 발명의 트랜스유전자를 포함하는 ES 세포 및 세포의 일부 또는 전부에 트랜스유전자를 갖는 비인간 동물에 관한 것이다.
- <40> 또다른 일면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 비인간 동물에서 관심있는 항원에 특이적이며 원하는 이소타입을 갖는 고친화도의 완전한 인간 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 이 방법에 따르면, 본 발명의 트랜스제닉 비인간 동물을 동물의 B-세포에 의한 항원 생산을 유도하는 조건하에 관심있는 항원과 접촉시킨다. 원하는 이소타입을 갖는 고친화도의 완전한 인간 항원-특이적인 항체를 트랜스제닉 비인간 동물의 혈류로부터 수집할 수 있다.
- <41> \*대안으로, 본 발명의 방법에 따라, 항체 생산 B-세포는 동물로부터 수집하고 항체의 연속적인 생산을 위해 당 업계에 알려진 임의의 방법으로 불멸화시킬 수 있다. 일 구체예에서, B-세포는 마우스 골수 세포계와 융합시켜 항체 분비 하이브리도마를 생산한다. 이러한 하이브리도마를 스크리닝하여 고친화도의 완전한 인간 항원-특이적인 항체를 분비하는 하이브리도마를 선별할 수 있다.
- <42> 또다른 일면에서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 동물로부터 수집된 항체 생산 B-세포에서 유래된 하이브리도마를 제공한다.
- <43> 또한, 본 발명의 항체는 원하는 항체를 발현하는 B-세포의 발현에 의해, 클로닝된 인간 면역글로불린 유전자에

의해, 파아지-디스플레이에 의해 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 방법에 의해 생산될 수 있다.

**발명의 구성 및 작용**

- <44> 본 발명은 원하는 이소타입의 인간 면역글로불린 중쇄를 생산하기 위한 신규의 트랜스유전자에 관한 것이며 상기 유전자를 포함하는 배아 줄기(ES) 세포 및 트랜스제닉 비인간 동물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 트랜스제닉 비인간 동물을 생산하는 방법 및 본 발명의 트랜스제닉 동물에서 관심있는 항원에 반응하는 원하는 이소타입의 완전한 인간 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- <45> 본 발명의 트랜스유전자 및 트랜스제닉 비인간 동물은 다양한 이소타입 또는 클래스의 완전한 인간 항체를 생산하는데 유용하다. 이러한 항체들의 치료 용도의 경우, 개별적인 항체 이소타입의 상이한 효과인자 기능은 특정 이소타입의 사용으로 원하는 치료 효과를 얻을 수 있게 한다. 따라서, 관심있는 항원으로 면역화시킨 후 단일 이소타입의 항체를 생산하는 트랜스제닉 비인간 동물의 계통을 생산하는 것은 바람직하다.
- <46> 본 명세서에 기재된 본 발명을 더욱 잘 이해하기 위해서 하기에서 상세히 설명한다. 설명에는 다음과 같은 용어가 사용된다.
- <47> 유전자 영역 - 특정 폴리펩티드 사슬을 생산 또는 선택하는데 관여하는 DNA; 불변 유전자에 선행할 뿐만아니라 암호화 영역의 상류 및 하류, 선행 및 후속하는, 프로모터, 인핸서, 스위치 영역 및 암호화 세그먼트 또는 엑손 사이의 인트론과 같은 개재 서열을 포함한다.
- <48> 유전자 세그먼트 - 면역글로불린 중쇄 불변 영역과 같은 다중-엑손 유전자에 있는 암호화 세그먼트. 예컨대, 인간 면역글로불린 중쇄 감마 불변 영역의 분비형에 대한 유전자는 4개의 유전자 세그먼트: CH1, H, CH2 및 CH3를 함유한다.
- <49> 생식계열 배치 - 임의의 체세포성 유전자 재배열이 일어나기 이전의 면역글로불린 유전자 세그먼트의 배열 및 간격.
- <50> 클레나우 단편 - 통상 이.콜리 유래의 효소 폴리머라제 I의 큰 단편. 이 단편은 임의의 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성을 보유하지 않고 오직 폴리머라제 활성만을 보유한다. 이 단편은 DNA 분자의 단부를 채우는데 사용하여 블런트 단부를 형성시킬 수 있다.
- <51> 라이브리리 - DNA계 벡터(예, 박테리아에서의 플라스미드, 이.콜리에서의 람다 박테리오파아지, 이.콜리에서의 P1 박테리오파아지, 이.콜리에서의 박테리아성 인공 염색체, 사카로미세스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae)에서의 효모 인공 염색체, 배양 세포에서의 포유류 인공 염색체, 체세포 하이브리드에서의 포유류 염색체 단편) 상에서 통상 증식된 클로닝된 DNA 단편의 혼합물.
- <52> 링크 - 제한 부위 및, 예컨대 클로닝을 용이하게 하고/하거나 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 단편의 골격 부위를 형성하기 위해 더 큰 DNA 분자에 첨가될 수 있는 기타 특성을 보유하도록 고안된 합성 DNA 단편.
- <53> 라이브리리의 스크리닝 - 라이브러리에서 클로닝된 DNA의 특정 서열을 탐색하는 공정.
- <54> 불임 전사체 - 필요한 체세포성 유전자 세그먼트 재배열 또는 클래스 스위치 제조함으로써 번역되는 않는다고 여겨지는 Ig 좌위로부터 생산된 전사체. IgM을 생산하는 B 세포 또는 pre-B 세포에서, 예컨대 세포가 어떤 이소타입으로 스위치되고 어떤 이소타입을 생산할 것인지를 가능성있게 제시하는 CH 유전자에 해당하는 생식계열 mRNA 전사체일 수 있다.
- <55> 벡터 - 외래 DNA를 숙주로 수송하는데 사용되고 상기 숙주에서 복제되어 숙주를 형질전환시키는 DNA 분자. 유용한 벡터는 비제한적으로 바이러스(원핵세포 및 진핵세포), 박테리아성 플라스미드 또는 인공 염색체를 포함한다.
- <56> 효모 인공 염색체(YAC) - 벡터가 효모 세포에서 생체내 복제 및 유지되도록하는 효모 염색체 요소들로부터 유래된 클로닝 운반체. 효모 요소는 중심체, 자치적인 복제 서열, 한쌍의 텔로미어, 효모 선별 마커, 및 통상 박테리아성 복제 기원 및 박테리아내 YAC 벡터 팔들의 복제 및 선별을 위한 선별 마커를 포함한다. YAC을 사용하여 적어도 2000kb까지의 DNA 삽입체를 클로닝하고 유지시킬 수 있다.
- <57> XENOMOUSE의 개발
- <58> Xenomouse는 마우스 IgH 및 Igk 좌위가 불활성화되고 기능적인 메가베이스-크기의 인간 IgH 및 Igk 트랜스유전자로 트랜스제닉 마우스이다. Xenomouse의 형성 및 특성규명은 문헌[Mendez 등, Genomics 26:294-307(1995);

Mendez 등, Nature Genetics, 15, pp.146-156(1997); Green 등, Nature Genetics 7:13-21(1994); Kucherlapati 등의 국제특허출원 제WO 94/02602호(1994. 2. 3. 공개) 참조]에 기재되어 있다. 더욱 구체적으로, 마우스 배아 줄기 세포에서 상동성 재조합에 의한 마우스 IgM 및 Igk 좌위 중 주요 요소를 결실시키고 이어서 돌연변이를 생식계열로 전달하고 교배하여 불활성화된 양 좌위가 동종접합성인 마우스(DI 마우스)를 생성하였다. 이러한 마우스는 마우스 IgH 및 Igk 사슬을 만들 수 없으며 골수내 B 세포 발달이 proB/preB-I 단계에서 정지되어 있다[Green 등, Nature Genetics, 7, pp. 13-21(1994); Green and Jakobovits, J.Exp.med., 188:483(1998)]. 효모 인공 염색체 상에서 클로닝된 인간 IgH 및 Igk 좌위를 효모 스페로플라스트-ES 세포 융합을 통해 ES 세포 안으로 도입시켰다[Jakobovits 등, nature 362:255-258(1993)]. 생식계열로의 전달 및 차후 DI 백그라운드 상으로의 교배 이후, 인간 IgH 및 Igk YAC 트랜스유전자, yH1C 및 yK2는 기능적으로 그들의 쥐 대응물을 대신할 수 있었으며 B 세포 발달을 도울 수 있었다. 게다가, 이들 마우스는 완전한 인간 IgM $\kappa$  및 IgG2 $\kappa$  항체 및, 궁극적으로 치료 잠재능을 갖는 항원-특이적인 고친화도의 완전한 인간 IgG2 $\kappa$  단클론성 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하였다.

<59> yH1C 트랜스유전자

<60> 인간 IgH 트랜스유전자, yH1C는 66 VH, D 요소들 전부, J 요소들 전부, C $\mu$  및 C $\delta$ , 조절 요소들 전부를, 모두 생식계열형 배치부로 구성하고 있다. 효모 내 상동성 재조합을 사용하여 yH1C의 3' 단부에 스위치 조절 요소를 포함하는 인간  $\gamma$ 2 유전자를 함유하는 2kb 단편, 및 마우스 3' 인헨서 요소를 함유하는 4kb 단편이 추가되었다 [Mendez 등, Nature Genetics 15:146-156(1997) 참조, 본 명세서에 인용되어 있음]. 좌측 YAC 팔은 효모 선별 마커 ADE2, 포유류 선별 마커에 대한 발현 카세트를 운반하고, 우측 YAC 팔은 효모 선별 마커 LYS2 및 포유류 선별 마커 Neo(약물 G418에 대한 내성을 암호화함)에 대한 발현 카세트를 운반한다. 후자는, 그 프로모터, MMT (마우스 메탈로티오닌)가 대개 ES 세포에서 비기능적이기 때문에, ES 세포에서 비기능적이다. 다른 세포 유형에서, MMT 프로모터는 정상적인 생리 조건하에서 매우 낮은 수준으로 전사를 구동하며, 높은 수준의 전사를 위해 중금속, 예컨대 Cd가 필요하다. 게다가, 이 구조체로 형질감염된 ES 세포는 더 낮은 수준의 G418에도 내성을 나타내지 못하게 된다.

<61> B-세포 발달

<62> B-세포 발달은 골수에서 D 및 J 유전자의 결실성 재조합과 함께 개시된다. 이어서, V 유전자는 DJ와 결합하여 VDJ를 형성하고, VDJ가 전사되어 스플라이스된 VDJC $\mu$  전사체를 생산한다. 만일 전사체가 프레임 내 있으면,  $\mu$  사슬은 번역시 합성된다. 유사하게 그리고 일반적으로 V $\mu$ DJ $\mu$  재조합되고 이어서  $\mu$  사슬과 그 대응 경쇄이 성공적으로 쌍을 이룬 후, Ig 경쇄 좌위는 그 V 및 J 유전자 세그먼트를 재배열한다. 골수 내 성공적인 B 세포 발달은 세포 표면에 IgM $\kappa$  또는 IgM $\lambda$ 를 발현하는 B 세포를 산출한다. 마우스의 경우는 95%의 B 세포가 IgM $\kappa$ 를 발현하고; 인간의 경우는 약 60%의 세포가 IgM $\kappa$ 를 발현한다.

<63> 이들 IgM 생산 B 세포는 주요 면역 레파토리를 형성하고 외래 항원을 인식하기 위한 면역 감시를 수행한다. 마우스의 경우 또는 인간의 경우 이들 IgM 생산 B 세포는 이어서 IgM에서 IgG 또는 IgA, 또는 IgE 이소타입으로 이소타입 클래스-스위치를 겪을 수 있다. 클래스 스위치의 빈도수는 면역 반응동안 증가한다. 마우스 및 인간은 각각 4개의 상이한 이소타입의 IgG에 대한 유전자를 갖는다. 마우스에서는 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3이고, 인간에서는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4이다. 인간은 2개의 IgA 이소타입, IgA1 및 IgA2와 하나의 IgE 이소타입을 갖는다. 마우스의 경우, 각 평균 6500, 4200 및 1200 $\mu$ g/ml의 IgG1, IgG2a 및 IgG2b과 260 $\mu$ g/ml의 IgA가 있다. 인간의 경우 총 IgG 중 약 70%는 IgG1이고, 18%는 IgG2이고 8%는 IgG3이고 3%는 IgG4이다. 인간의 경우 총 IgA에서 약 80%는 IgA1이고, 20%는 IgA2이다.

<64> 항체의 효과인자 기능

<65> 상이한 이소타입은 상이한 효과인자 기능을 갖는다. 이러한 기능상 차이는 다양한 면역글로불린 이소타입들의 구별되는 3차원 구조에 반영되어 있다[P.M. Alzari 등, Annual Rev. Immunol. 6:555-580(1988)]. 예컨대, 인간 IgG1 및 IgG3 이소타입은 보체 매개성 분해 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)에 관여하며, IgG2 및 IgG4는 효과인자 기능이 전혀 또는 거의 알려져 있지 않다[Snapper and F.D. Finkelman, Fundamental Immunology 3d Ed., pp. 837-863]. 상이한 효과인자 기능은 상이한 IgG 이소타입과 관련이 있기 때문에, 최상의 치료적 이익을 제공하는 mAb의 이소타입 및 결합특이성을 선택할 수 있다는 것은 바람직하다. 예를들면, 만일 mAb로 사이토킨 반응을 중화하거나 수용체의 활성을 차단시키고자 한다면, IgG2 또는 IgG4와 같이 효과인자 기능을 결여한 mAb가 바람직하다. 한편, mAb가 세포 표면 상의 항원에 결합함으로써 세포를 치사시키는 것이 바람직한 경우는 특이적인 효과인자 기능 즉 ADCC 또는 CML을 갖는 IgG1과 같은 mAb가 바람직하다. 따라서, 완전한 인간 단클론성 항체를

형성하도록 조작된 트랜스제닉 마우스는 그 결과 형성되는 단클론성 항체의 이소타입을 조절하는 것이 바람직하다. 이 경우, 오직 원하는 인간 항체 이소타입만을 생산하는 특정 트랜스제닉 마우스 계통을면역화시킴으로써 특정 항체 이소타입을 선별할 수 있다. 이러한 마우스는 확실히 형성된 임의의 항원-특이적인 IgG mAb가 원하는 효과인자 기능을 보유한다. 이는 가변 영역을 분리(클로닝)하고 원하는 CH 유전자에 상기 VH 영역을 연결하는 것을 포함하여 불변 영역을 변화시키기 위한 항체 유전자의 차후 재조작을 배제한다.

<66> 본 발명의 일구체예에서, yH1C 인간 IgH YAC, C $\gamma$ 2 상의 단일 C $\gamma$  유전자는 다른 CH 유전자로 치환된다. 예컨대, 완전한 인간 C $\gamma$ 2 유전자를 운반하는 22kb 단편 대신에 인간 CH 유전자를 운반하는 다른 삽입체를 문헌[Mendez 등, Nature Genetics 15:146-156(1997)]의 표적화 벡터 안으로 클로닝할 수 있다. 인간 C $\gamma$ 1-4 유전자를 서열 분석하고 인간 게놈 DNA에 대한 박테리오파아지 람다 라이브러리로부터 분리하고 이어서 약 20-25 kb의 EcoRI 단편 상에서 수집할 수 있다[J.W. Ellison 등, Nucleic Acids Res., 13:4071-4079(1982); J. Ellison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:1984-1985(1982); S. Huck 등, Nucleic Acids Res., 14:1779-1789(1986); J.Ellison 등, DNA, 1:11-18(1981)을 참조하라. 상기 문헌들은 모두 본 명세서에 인용되어 있음]. 유사하게, 마우스 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2a, C $\gamma$ 2b 및 C $\gamma$ 3에 대한 서열들도 모두 알려져 있다[H.Hayashida 등, EMBO Journal, 3:2047-2053(1984) 참조하라. 상기 문헌은 본 명세서에 인용되어 있음].

<67> 클래스 스위치

<68> IgM으로부터 IgG, IgA 또는 IgE로의 클래스 스위치 재조합(CSR)은 C $\delta$ 를 제외한 모든 IgH 불변 영역의 5'에 존재하는 직렬 정방향 반복 스위치 부위들 사이에서 일어나는 결실성 재조합 사건에 의해 매개된다. 스위치 영역은 I 프로모터, I 엑손 및 역방향의 반복 서열에 인접한 한 세트의 정방향 반복체들로 구성되어 있다고 알려져 있다. 인헨서 및 사이토킨 반응 서열은 I 프로모터 근방 영역에 위치한다고 알려져 있다. 마우스 C $\gamma$ 1 유전자에서 하류 역방향 반복체의 바로 3'에 위치하는 하나 이상의 전사 인헨서는 가정의 것이다[J.P. Manis 등, J.Exp.Med. 188:1421-1431(1998)]. 또한, JH 및 Cm 사이에 위치하는 인헨서, iEM이 필요하다. 전사는 I 프로모터에서 개시하고 I 엑손을 통해 C 유전자의 단부까지 진행된다. 이 전사체는 프로세싱되어 I 엑손이 CH 엑손으로 스플라이스된 비암호화 불임 전사체를 산출한다. 스위치 영역을 통과하는 전사는 클래스 스위치 재조합에 필요하다. 인간 및 마우스 S $\mu$  및 S $\gamma$  영역을 서열 분석하였으며, 이 서열은 Genbank 데이터베이스로부터 공개적으로 입수가 가능하다.

<69> 마우스에서, 림포킨 및 활성화인자의 상이한 조합은 IgM으로부터 개별적인 CH 유전자로의 클래스 스위치에 매우 상이한 효과를 준다. 예컨대, 시험관내 LPS 및 인터루킨-4의 조합은 IgG1 및 IgE로의 클래스 스위치를 유도하고 IgG2b 및 IgG3으로의 스위치를 억제한다. CSR에 영향을 주는 다른 림포킨은 비제한적으로 IL-5, TGF- $\beta$ , 인터페론- $\gamma$ 를 포함한다. 이들 림포킨은 2차 림프 조직의 배중심에 있는 항원 제시 T-세포 및 모낭수지상 세포와 같은 헬퍼 세포에 의해 생체내 분비된다. 이들 림포킨은 CSR이전에 바람직하게는 대응하는 I 프로모터의 활성화를 통해 이들이 반응하는 CH 유전자의 전사를 조정한다. 예를들면, 마우스 C $\gamma$ 1 I 프로모터 내 IL-4 반응 요소가 지도화되었다[Rothman 등, Int. Immunol 2. pp. 621-627(1990)]. 인간 스위치 영역의 림포킨 반응성은 마우스와 같이 잘 특성규명되지 않았다. 그러나, 상이한 인간 스위치 (S) 영역도 상이한 림포킨 및 활성화인자에 대하여 상이하게 반응할 것이다. 이는 부분적으로 인간 혈청 내 상이한 수준의 IgG 서브클래스 공급원일 수 있다.

<70> 비동종형 스위치

<71> 마우스 및 인간 S 영역의 실질적이고 가능성있는 감별 반응성의 견지에서, 림포킨 및 다른 활성화인자에 대해, 인간 항체를 생산하는 트랜스제닉 마우스에서 CSR를 제어하는 이중성 스위치 영역을 갖는 것이 바람직하다. 예를들면, Ig $\gamma$ 1은 마우스에서 가장 풍부한 클래스의 IgG이다. 또한 CSR가 인간 S $\mu$  영역으로부터 마우스 S $\gamma$ 1으로 일어날 수 있다고 알려져 있다[Taylor 등, Int. Immunol, 6, pp. 579-591(1994)]. 분자생물학의 표준 도구와, 잘 특성규명되고 클로닝된 마우스 S $\gamma$ 1 서열을 사용하면[Mowatt and Dunnick, J. Immuno., 136, pp:2574-2683(1986), Genbank 허가번호#M12389], 인간 CH 암호화 서열, 예컨대 인간 C $\gamma$ 1에 기능적으로 연결된 마우스 S $\gamma$ 1을 보유하는 DNA 벡터를 조작할 수 있다. 마우스 3' 인헨서를 포함하는 서열은 인간 CH 암호화 서열의 하류에 포함된다. m3'E 서열은 4kb XbaI 단편 또는 900bp Stu I 단편일 수 있으며, 양자 모두 중심 DNase I 과민 부위들, HS1, 2를 포함한다[Dariavach 등, Eur. J. Immunol. 21, pp.1499-1504(1991); Petterson 등, Immunobiol., 198, pp.236-248(1997)]. yH1C과의 5' 및 3' 인접 상동성 및 적당한 선별 마커를 보유함으로써, 이러한 벡터는 효모 내로 생체내 재조합되어 yH1C 상의 인간 C $\gamma$ 2 유전자를 대체할 수 있다. 이 방법으로 조작된 YAC은 yH1C의 완전한 VH, Dh, Jh, C $\mu$  및 C $\delta$  전부를 보유하나, 키메라 CH 유전자를 보유한다: 마우스 S $\gamma$ 1 요소는 인간 IgM으로부터 하류 인간 CH 암호화 서열로 스위치를 제어한다.

<72> 다른 구체예에서, 분비형 및 막-결합형 C<sub>H</sub> 유전자의 엑손들 전부를 포함하는 인간 C<sub>γ</sub>2 암호화 서열은 다른 인간 C<sub>H</sub> 유전자로 치환된다. 이 방법에서, 인간 S<sub>γ</sub>2 서열은 C<sub>μ</sub>로부터 하류 C<sub>H</sub> 유전자로의 CSR을 조절한다. hSg2 서열은 yH1C에서 안정하나 다른 인간 S 서열들(이들 중 몇몇은 더 긴 직렬 배열의 S 반복체를 보유함)은 덜 안정할 수 있다고 알려져 있다. 또한, 인간 C<sub>γ</sub>2 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스에서의 CSR이 효과적이며 높은 혈청 수준으로 인간 IgG2를 형성하고 그 결과 완전한 인간 IgG2 mAb들을 생산한다고 알려져 있다. 따라서, 바람직한 안정성을 갖는 인간 S<sub>γ</sub>2를 보유하고 항원 공격에 생체내 반응하며, 다른 이소타입, 예컨대 C<sub>γ</sub>1 또는 C<sub>γ</sub>4로 CSR을 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 이를 달성하기 위해, 하기 요소를 갖는 벡터를 제작한다: 예컨대 인간 S<sub>γ</sub>2 및 인간 C<sub>γ</sub>2 암호화 엑손 1 사이에 위치하는 5' 상동성, C<sub>γ</sub>2이외의 인간 CH 유전자, 마우스 3' 인헨서, 효모 선별 마커 및 YAC 팔 내 3' 표적화 상동성. 이러한 벡터는 yH1C를 운반하는 효모 안으로 도입되고, 표적화된 재조합체를 선별하고 스크리닝한다. 이들 예에서 다수의 변형이 당업자에 의해 형성될 수 있다고 이해되어야 하며, 이러한 예는 이종성 S 영역에 의해 유래된 CSR를 보유한 트랜스제닉 마우스를 얻고자하는데에만 오직 사용되는 것으로 제시하는 것을 의미하지는 않는다고 이해되어야 한다.

<73> 인헨서의 역할

<74> S 영역에 부가하여, 다른 cis 조절 요소가 CSR에 필요하다고 알려져 있거나, 필요할 수 있다. iEm이 필요하다고 언급되었다. 또한, 정상 수준의 IgG를 발현하기 위해 필요한 인헨서가 마우스 S<sub>γ</sub>1의 3' 역방향 반복체 및 C<sub>H</sub>1 엑손 사이에 존재하는 것으로 가정되었다. 이 인헨서는 마우스 및 인간 내 다른 C<sub>H</sub> 유전자에 보존될 수 있으며, 이 간격은 이종성 스위치 서열을 통해 CSR을 위해 고안된 임의의 벡터 내에서 유지되어야 한다[Elenich 등, J.Immunol. 157, pp. 176-182(1996); Cunningham 등, Int. Immunol., 10, pp.1027-1037(1998)]. 또한, 마우스 및 인간에서 C<sub>α</sub> 유전자의 3'의 인헨서들의 집단도 중요하다. 마우스의 경우 C<sub>α</sub>의 하류에 있는 40kb 영역은 4개의 인헨서 요소를 함유하며, 이들의 특징은 DNase I 과민 부위(HS)이다. 이들 인헨서는 5'에서 3' 방향이며, C<sub>α</sub>로부터 4kb 하류에 있는 HS3a; C<sub>α</sub> 3'으로부터 15kb에 있는 HS1, 2(문헌 및 이 명세서에 m3'E로 알려져 있음); C<sub>α</sub>3'으로부터 25kb에 있는 HS3b; 및 C<sub>α</sub> 3'으로부터 30kb에 있는 HS 4, ca이고; HS1,2, HS3a 및 HS3b는 활성화된 B 세포 및 혈장 세포에서 발현을 증대한다. HS4는 B 세포 발달 진행에 걸쳐 활성화나 yH1C YAC이 HS4를 결여하기 때문에 분명히 없어도 되는 것이지만, 마우스에서 효과적인 B 세포 발달을 여전히 도와준다. 함께, 이들 요소는 상승적으로 작용하여 전사를 증대시킬 수 있으며 마우스 및 인간 내 IgH 좌위에 대한 좌위 제어 영역(LCR)을 형성하는 것으로 가정된다. 개별적인 HS 단위체의 기능에는 다소의 축퇴성이 있다고 가정되어 왔다. 이들 요소의 손상되지 않는 활성화는 CSR에 필요할 수 있으나, HS1, 2 및 HS3a는 개별적으로 CSR에 없어도 된다[J.P. Manis 등, J. Exp. Med. 188:1421-1431(1998) 참조].

<75> HS1, 2(3'E)가 이 세트 중 가정 먼저 발견된 인헨서이었다. HS1,2 부위 및, AP-1과 같은 전사 인자의 공통 결합 도메인에 상동성이 있는 서열은 900 bp Stu-I 단편 상에서 분리될 수 있다[Dariavich 등, Eur. J. Immunol., 21, pp. 1499-1504(1991); Genbank 허가번호 #X62778]. 마우스 내 3'E는 래트의 3'와 반대로 배향되어 있으며, 이는 다른 인헨서와 같이 그 기능이 배향 비의존적임을 암시한다. 그러나, 3'E는 위치 의존적 활성을 나타내며 프로모터로부터 더 멀리 위치한 경우 더욱 효과적으로 전사를 증대시키는 것으로 보여져 왔다[Gene, 136, pp. 349-353(1993)]. 인간 Cg2 유전자의 3'에 위치한 HS1, 2과 함께 900bp StuI 단편을 포함하는 4kb XbaI 단편이 트랜스제닉 마우스 내 CSR 및 IgG2의 높은 수준 발현을 도와줄 수 있다고 알려져 있다[Mendez 등, Nature Genetics 15:146-156(1997)].

<76> 강력한 프로모터(PGK)를 마우스 IgH 3' LCR 내로 삽입하면 몇몇 IgG 이소타입(IgG2a, IgG3, IgG2b)으로의 클래스 스위치를 그만두게하고 다른 이소타입(IgG1, IgA)의 발현을 낮출 수 있다. 흥미롭게도, 프로모터 및 이의 발현된 유전자도 LCR의 제어하에 놓인다: PGK-유래의 발현 구조체는 하향 조절되고 활성화된 B-세포에서 상향 조절될 수 있다[J.P. Manis 등, J. Exp. Med. 188:1421-1431(1998)]. 따라서, 강력한 구성성 프로모터인 PGK에 의해 유도되는 β-gal 발현 구조체를 마우스 3'E 중심 구조체의 3'에 그리고 이에 인접한 채 운반하는 YAC 트랜스유전자에서(900bp StuI), PGK-β-gal 구조체의 결실과 동시에 ES 세포 계층으로 삽입되는 YAC에 대해 스크리닝하는 것이 유익할 수 있다. β-gal에 대한 프라이머를 사용한 PCR에 의해 또는 β-gal 유전자를 프로브로 한 서던 블롯에 의해 수행될 수 있다.

<77> 면역글로불린 막 엑손

<78> 각 IgH 이소타입 및 클래스의 2개의 형태, 분비형(s) 및 막형(m)은 B 세포에 의해 만들어질 수 있다. Ig(s) 및 Ig(m)은 IgH 전사체의 대체(alternative) 스플라이싱에 의해 합성된다. 두개의 막 엑손은 각 인간 IgG 유전자의

CH 엑손으로부터 2kb 하류에 위치한다. 소수성 막통과 서열 및 약 3개 아미노산의 짧은 세포질 꼬리는 막 엑손에 의해 암호화된다. CH3으로부터 제1 막 엑손으로의 대체 스플라이싱은 그 결과 막 결합형 IgG를 산출한다. 막 결합형 Ig는 B 세포내 다른 단백질, 예컨대, 다른 것들 중 Igα, Igβ 및 CD45와 상호작용하여 신호 전달할 수 있는 B 세포 수용체(BCR)로 지칭되는 복합체를 형성한다. 세포의 환경에(예컨대, 수용성) 또는 항원 제시 세포 상에 제시된 IgG의 V 영역에 의한 항원의 결합은 신호 전달을 유도할 수 있다. BCR에 의한 이러한 신호 전달은 B 세포의 활성화 및 궁극적으로 2차 면역 반응에서 효과적인 친화도 성숙화 및 배중심 형성을 유도한다.

<79> 부가적으로, BCR의 Ig에 의한 항원 결합은 세포내이입, 헬퍼 세포로의 제시를 위해 MHC 분자에 의한 항원 단편의 프로세싱 및 제시를 유도할 수 있다. 분명히, 기능적인 BCR의 효과적인 조립은 효과적인 1차 및 2차 면역 반응에 필수적이다.

<80> 인간 IgG1 막 엑손은 BCR의 다른 성분들과 잘 복합체를 구성하지 않을 수 있으며 그 결과 마우스와 같이 효과적으로 신호를 보낼 수 없는 키메라 BCR를 산출할 수 있다[G. Pluschke 등, J. Immunol. Methods, 215, pp.27-37(1998)]. 분비형 및 막형의 IgG1을 암호화하는 인간 엑손들을 모두 갖는 인간 IgG1 구조체를 마우스 IgG2a 좌위에 삽입하여 마우스 C $\gamma$ 2a 엑손 모두가 치환되고 인간 암호화 엑손으로의 CSR을 마우스 S $\gamma$ 2a 영역의 제어하에 있게 하였다. 키메라 인간 IgG1(마우스 VDJ-인간 IgG1)은 마우스 IgG2a보다 100x 작은 수준으로 발현되었고, 항원 특이 mAb들은 회수되지 않았다. 따라서, 비록 마우스 S $\gamma$ 2a에 의해 유도된 클래스 스위치가 일어났다고 하더라도 정상 면역 반응이 손상되었다. 달리, 분비형 인간 IgG1을 암호화하는 엑손을 사용하여 분비형의 마우스 IgG1을 암호화하는 엑손만을 치환하였다. 이 구조체는 분비형 IgG1의 인간 엑손들 모두를 함유하나 하류 마우스 막 엑손이 완전한 키메라 IgG1 중쇄 유전자를 생산하였다. 클래스 스위치는 마우스 S $\gamma$ 1 영역에 의해 유도되었다. 막결합형 Ig는 마우스 V-인간  $\gamma$ 1 CH1-CH3-마우스 C $\gamma$ 1(mem)이다. 이 트랜스제닉 마우스에서, 인간 IgG1의 혈청 수준은 정상의 미경험 마우스에서의 마우스 IgG1과 같다. 따라서, 마우스 S $\gamma$ 1은 효과적인 클래스 스위치를 유도할 수 있고, 마우스 IgG1 막 엑손은 적어도 인간  $\gamma$ 1 CH1-CH3 엑손과 함께 기능할 수 있다. 본 발명자는 항원-특이적인 mAb 생산에 대해 마우스를 시험하지 않았다. 이전 구조체에서와 같이, 형성된 IgG1 mAb는 키메라 이었다: 마우스 VDJ는 분비형의 인간 C $\gamma$ 1에 기능적으로 연결되어 있다.

<81> 이들 결과에 의해, C $\gamma$ 1의 분비형 및 막형 모두를 암호화하고 인간 IgH 좌위(V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub>, C <sub>$\mu$</sub> , C <sub>$\delta$</sub>  및 S $\gamma$  영역들)에 기능적으로 연결된 인간 C $\gamma$ 1 엑손들의 완전한 세트는, 막결합형 인간 IgG1의 비효율적인 조립이 완전히 기능적인 BCR을 산출할 수 없기 때문에 부적당하게 기능할 수 있다. 따라서, 인간 C $\gamma$ 1 막 엑손을 기능적인 BCR로 효과적으로 조립하는 것으로 알려진 다른 이소타입의 엑손으로 치환하는 것이 바람직하다. 이러한 엑손은 마우스 C $\gamma$ 1 엑손 또는 다른 쥐 C 막 엑손을 포함할 수 있다. 달리, 인간 C $\gamma$ 2 막 엑손은, XenoMouse G2가 분비형 IgG2를 높은 수준으로 보유하고 고 친화도의 항원-특이적인 mAb를 효과적으로 생산하기 때문에, 마우스의 BCR에서 잘 기능할 것으로 예상된다. 따라서, 인간 C $\gamma$ 2 막 엑손은 기능적으로 인간 C $\gamma$ 1 CH1-CH3 엑손에 연결될 수 있다. 막 엑손의 서열은 알려져 있다[h $\gamma$ 1의 경우 X52847; h $\gamma$ 2의 경우 AB006775].

<82> 벡터 제작

<83> 일구체예에서, 표적화 벡터는 오직 CH1-CH3 엑손만을 yH1C YAC 안으로 도입하여 생성한다. 모든 인간 CH1-CH3 서열 뿐만아닐 인트론 및 인접 DNA가 유용하여[J.W. Ellison 등, Nucleic Acids Res., 13:4071-4079(1982); J.Ellison 등, Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 79:1984-1985(1982); S. Huck 등, Nucleic Acids Res., 14:1779-1789(1986); J. Ellison 등, DNA, 1:11-18(1981)참조, 상기 문헌들은 본 명세서에 인용되어 있음], 모든 제한 부위가 전자적으로 지도화되고 표적화 벡터가 제작될 수 있다. 이러한 벡터는 인간 C $\gamma$ 2 CH1 엑손의 5' 상동성 상류, 효모에서의 양성/음성 선별 마커를 위한 발현 구조체(URA3), 5' 표적화 상동성의 정방향 반복체, 인간 C $\gamma$ 1 엑손 CH1-CH3을 함유하는 서열 및 3' 표적화 상동성을 함유한다. 이 벡터는 yH1C를 운반하는 효모 내로 형질감염되고 상동성 재조합이 양성적으로 우라실 결핍 평판 상에서 선별되고 이어서 서던 브릿 하이브리드화 또는 PCR에 의해 스크리닝되어 인간 C $\gamma$ 2 CH1-CH3 엑손의 결실 및 인간 C $\gamma$ 1 CH1-CH3의 부수적인 획득에 대해 시험하였다. 일단 확인되면, URA3 유전자의 결실을 5'-플로로우라실로 선별할 수 있다. 이러한 결실은, 효모 내 정방향 반복 서열들 사이의 염색체내 재조합이 효과적이기 때문에 높은 빈도수( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ )로 발생한다고 예상된다. URA3 유전자의 결실은 클래스 스위치 재조합 및 항체 발현을 위해 기능적인 배치로 완전한 인간 IgH를 복구한다. 이러한 조작을 성취하기 위한 다른 전략들이 존재한다는 것은 명백하다. 또한, 다른 인간 C $\gamma$  유전자, 예컨대 인간 C $\gamma$ 4를 인간 C $\gamma$ 2 좌위 안으로 조작하고자 하는 동기도 있을 수 있다.

<84> CRE-LOX 매개성 클래스 스위치

- <85> CRE-lox 시스템은 DNA를 미리 정한 부위로 표적화하여 삽입하도록 한다. P1 박테리오파지에서 유래된 CRE 재조합효소는 loxP 부위들 사이에서 DNA내 또는 DNA간 재조합을 진행하게 한다[B. Sauer 등, New Biologist 2:441-449(1990); S.Fukushige 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7905-7909(1992); Y.-P.Zou 등, Current Biol., 4:1099-1103(1994)]. lox P 부위(서열: TA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TA(서열번호 1))를 yH YAC의 DNA안으로 도입시킨다. 상기 서열은 하류 S 영역, 예컨대, Sg2의 3' 역방향 반복체의 3'에 그리고 하류 Cg 유전자, 예컨대 Cg1의 CH1 엑손의 스플라이스 수령체 서열의 5'에 위치시킨다. lox P 부위를 효모에서의 상동성 재조합을 통해 YAC 안으로 직접 삽입할 수 있으며, 본 명세서에서 이전에 기술한 것처럼 더 큰 표적화 벡터 안으로 통합시킬 수 있다. 상기 부위를 YAC 표적화 벡터와 같은 것에 통합시킬 때, lox P 부위는 표적화 상동성, 예컨대 5' 표적화 상동성을 증폭하기 위해 사용된 PCR 프라이머 상으로 도입시킬 수 있으며, 시험관내 연결되는 올리고뉴클레오티드로서 삽입될 수 있다. 2개의 loxP 부위 사이의 상동성 재조합은 배향 의존적이기 때문에, 제1 loxP 부위를 YAC안으로 삽입시키는 배향을 유의해야 하는 것이 중요하다.
- <86> 제2 상에서, 대체적인 C $\gamma$  유전자 삽입을 위한 플라스미드 벡터가 형성된다. 이 벡터의 중심에 도입될 Cg 유전자 및 도입을 가능하게 하는 loxP 부위를 운반하는 카세트가 있다: 이 카세트는 YAC에서와 동일한 5'-3' 배향으로 있는 loxP 부위로 시작하고, YAC 상의 Cg의 상류에 있는 loxP 삽입 부위에 대응하는 CH1의 상류 DNA가 뒤따르고, 제2 막 엑손의 3'에 있는 폴리아데닐화 부위의 하류까지 CH1 엑손 스플라이스 수령체가 완전한 상태에서 CH1을 통과하는 생식계열형 배치가 계속된다. 예컨대, 약 7kb Hind III 단편은 모든 인간 Cg 유전자들에 필요한 DNA 모두를 포획할 것이다. 달리, 전사 및 번역에 대해 적당한 3' 신호들(비번역 영역, 폴리아데닐화 부위)을 포함하는 CH1-CH3 엑손만이 분비형 mAb만을 형성하기 위해 사용할 수 있다. 전사를 통해 가능성 있는 관독을 폐지하기 위해, 진행세포형 전사 종결인자 서열을 벡터 상의 CH 유전자의 하류에 첨가할 수 있다. 형질전환체의 선별을 용이하게 하기 위해 푸로마이신 또는 하이그로마이신과 같은 선별 마커에 대한 발현 카세트를 CH 유전자의 하류에 첨가할 수 있다.
- <87> 일단 loxP 부위로 조작된 yH 트랜스유전자를 운반하는 트랜스제닉 마우스로부터 하이브리도마가 형성되면, CRE-lox 매개성 클래스 스위치가 동시-형질감염(예컨대, 전기천공 또는 리포펙션), 환형화된 삽입벡터, 그리고 정제된 CRE 재조합효소 또는 CRE 발현 벡터에 의해 유도될 수 있다. 동시-형질감염된 세포에서, CRE는 신규 CH 유전자를 좌위에 삽입시키는 것을 매개할 것이며, 여기서 전사되고 원하는 mAb 특이성을 암호화하는 VHDJH의 상류에 시스로(in cis) 스플라이스된다. 전사 종결인자는 CH 유전자 하류에서 계속 전사되는 것을 배제한다. 벡터가 선별 마커를 보유한다면, 형질감염된 하이브리도마는 적당한 약물로 선별될 수 있고, 이어서 ELISA에 의해 푸울 또는 개별적인 클론을 원하는 신규 이소타입의 mAb에 대해 스크리닝할 수 있다. 만일, 벡터가 선별 마커를 결여한다면, ELISA에 의해 형질감염된 하이브리도마의 푸울을 스크리닝하고, 원하는 이소타입을 생산하는 하이브리도마를 상기 푸울로부터 서브클로닝할 수 있다. 만일 치환 CH 유전자가 막 결합형 IgH도 암호화한다면, 하이브리도마는 유동 세포계측에 의해 스크리닝 및 분류할 수 있다.
- <88> \*몇몇 예에서, 2개의 상이한 이소타입의 단일 항원-특이적인 mAb들을 보유하는 것이 바람직하며, 이때 하나의 이소타입은 ADCC 또는 CML과 같은 하나의 활성을 보유하고 다른 이소타입은 효과인자 기능을 결여하나 에피토프 특이성 및 친화도와 같은 동일한 항원-결합 특성을 갖는다. 이러한 목적은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 분자적으로 클로닝하고 이어서 이들을 적당한 불변 영역에 기능적으로 연결하고, mAb를 생성하기 위한 세포내로 형질감염시킴으로써 성취될 수 있다. 그러나, 이러한 프로세스는 노동 및 시간 집약적이다. 달리, 상기 기술된 CRE-lox 프로세스를 사용하면, 단클론성 항체는 효과적으로 하이브리도마 내에서 생체내 클래스-스위치할 수 있다.
- <89> 마우스 계통
- <90> 하기 마우스 계통은 본 명세서에 기술되고/되거나 사용된다.
- <91> 이중 불활성화된 (DI) 계통
- <92> 마우스의 DI 계통은 기능적인 내인성 마우스 Ig를 생산하지 않는 마우스이다. 바람직한 구체예에서, DI 마우스는 불활성화된 마우스 J $\mu$  영역 및 불활성화된 마우스 C $\kappa$  영역을 보유한다. 이 계통의 제작은 다른 문헌에 자세히 논의되어 있다. 예컨대, DI 계통을 형성하는데 사용되는 기법은 미국특허출원 일련번호 제07/466,008호(1990. 1. 12. 출원), 제07/610,515호(1990. 11. 8. 출원), 제07/919,297호(1992. 7. 24. 출원), 제08/031,801호(1993. 3. 15. 출원), 제08/112,848호(1993. 8. 27. 출원), 제08/234,145호(1994. 4. 28. 출원), 제08/724,752호(1996. 10. 2. 출원)에 자세히 기술되어 있다. 또한, 유럽특허 EP 0 463 151 B1(1996. 6. 12 특허됨), 국제특허출원 제WO 94/02602호(1994. 2. 3. 공개), 국제특허출원 제WO 96/34096호(1996. 10. 31. 공개),

PCT 출원 번호 PCT/US96/05928(1996. 4. 29. 출원)을 참조하라. 상기 인용된 특허 및 특허출원 각각의 내용은 본 명세서에 인용되어 있다. DI 마우스는 매우 미성숙한 B-세포 발달을 갖는다. 마우스는 성숙한 B-세포를 생산하지 않고, 오직 pro-B 세포만을 생산한다[Green and Jakobovits, J. Exp. Med., 188, pp.483-495(1998)].

<93> XenoMouse I 계통

<94> XenoMouse I 계통의 설계, 제작 및 분석은 문헌[Green 등, Nature Genetics, 7:13-21(1994)]에 자세히 논의되었다. 이러한 마우스는 DI 백그라운드에 대하여 인간 IgM<sub>k</sub> 항체를 생산하였다. 이 마우스는, B-세포 발달을 거의 또는 전혀 보여주지 않는 DI 계통과 비교할 때, 향상된 B-세포 기능을 보여주었다. 마우스의 XenoMouse I 계통은 항원 공격에 대해 상당히 큰 면역 반응을 유발하는 반면 오직 20-25%의 야생형 마우스가 B-세포를 생산하였고 이들은 항원에 대해 제한된 반응을 보유하고 있었다. 양 특성은 이들의 제한된 V-유전자 레퍼토리와 관련이 있는 것으로 보인다.

<95> L6 계통

<96> L6 계통은 내인성 마우스 Ig의 DI 백그라운드에 대하여 인간 IgM<sub>k</sub> 항체를 생산하는 마우스이다. L6 마우스는 삽입된 인간 중쇄 및 삽입된 인간 카파 경쇄를 함유한다. L6 계통은 이종으로 불활성화된 백그라운드(L6H)에 대하여 중쇄 삽입체를 포함하는 마우스와 이종으로 불활성화된 백그라운드(L6L)에 대하여 카파 경쇄 삽입체를 보유하는 마우스를 교배함으로써 형성된다. 중쇄 삽입체는 V<sub>H</sub> 6-1에서 시작하여 V<sub>H</sub> 3-65로 끝나는 약 66개 V<sub>H</sub> 세그먼트들을 함유하고, 주요 D 유전자 집단(약 32), J<sub>H</sub> 유전자(6), 인트론에 있는 인헨서(Em), C<sub>μ</sub> 및 C<sub>δ</sub>로부터 약 25kb 지나서까지를 생식계열형 배치로 포함하는 YAC 유래의 약 970kb의 완전한 인간 DNA 삽입체로 구성되어 있다. 경쇄 삽입체, yK2는 V<sub>K</sub>-B3에서 시작하여 V<sub>K</sub>-Op11에서 끝나는 약 32개 V<sub>K</sub> 유전자를 함유하는 YAC 유래의 약 800kb의 완전한 인간 DNA 삽입체로 구성되어 있다. 800kb의 삽입체는 V<sub>K</sub>-Lp-13에서 시작하여 V<sub>K</sub>-Lp-5에서 끝나는 약 100kb의 결실을 포함한다. 그러나, DNA는 V<sub>K</sub>-Lp-13 내지 100kb 지난 V<sub>K</sub>-Op1의 생식계열형 배치로 있으며, 또한 J<sub>K</sub> 유전자, 인트론내 및 3' 인헨서, 불변 C<sub>k</sub> 유전자 및 Kde를 함유한다[Mendez 등, Nature Genetics, 15, pp.146-156(1997)]. 게다가, L6 마우스는 인간 카파 경쇄의 우세한 발현, 성숙 B-세포의 큰 집단 및 정상 수준의 IgM<sub>k</sub> 인간 항체를 나타낸다[Green and Jakobovits, J. Exp. Med., 188, pp. 483-495(1998)].

<97> XenoMouse IIa 계통

<98> XenoMouse IIa 마우스는 DI 백그라운드에 대하여 생식계열형 배치로 메가베이스-크기의 인간 Ig 좌위를 갖춘 제 2세대 XenoMouse<sup>TM</sup> 계통을 대표하며, 이 마우스는 기능적인 내인성 Ig를 생산하지 않는다. 본질적으로, 이 마우스는 부가적으로 인간 C<sub>γ</sub>2 유전자를 그 전체 스위치 서열 및 조절성 서열 그리고 시스로의 마우스 3' 인헨서와 함께 포함하는 것을 제외하고는, L6 계통의 제작화와 동일하다. 마우스는 약 1020kb의 중쇄 및 약 800kb의 카파 경쇄 좌위를 함유하며, 중쇄 유전자(약 66개 V<sub>H</sub>) 및 카파 경쇄 유전자(약 32개 V<sub>K</sub>)를 포함한 대부분의 인간 가변 영역 유전자, 인간 중쇄 불변 영역 유전자(μ, δ 및 γ) 및 카파 불변 영역 유전자(C<sub>k</sub>) 그리고 동정된 주요 조절성 요소들 전부를 포함한다. 이들 마우스는 그 계놈 안으로 도입된 전 범위의 가변 유전자들에 접근할 수 있는 것으로 보인다. 게다가, 이들은 효과적인 클래스 스위치, 체세포성 과변이, 인간 카파 경쇄의 우세 발현, 성숙 B-세포의 거대 개체군수 및 정상 수준 IgM<sub>k</sub> 및 IgG<sub>k</sub> 인간 항체를 나타낸다. 이러한 마우스는 인간 IL-8, 인간 EGF 수용체(EGFR) 및 인간 중양 괴사 인자-α(TNF-α)를 포함한 다중 면역원들에 대해 왕성한 인간 항체 반응을 개시하여 결국 항원-특이적이며 서브-나노몰의 친화도를 갖는 완전한 인간 mAb을 산출한다. 최종 결과는 결정적으로 XenoMouse<sup>TM</sup>가 원하는 모든 특이성을 갖는 광범위한 항원에 대한 고친화도의 완전한 인간 치료 mAb들의 신속한 분리를 위한 우수한 공급원이라는 것을 입증한다.

<99> 상기 도입부로부터 이해되는 바와 같이, XenoMouse II 계통은 성숙 B-세포 발달을 겪고 항원 공격에 대해 강력한 성인-인간-유사 면역 반응을 개시하는 것처럼 보인다. 또한, L6 계통도 성숙 B-세포 발달을 겪는 것으로 나타난다. XenoMouse II 계통인 경우, 현저하게 상이한 B-세포 발달 프로필이 관찰된다. 이 차이 때문에, 동물 안으로 도입된 가변 영역의 양 및 복잡성이 B-세포의 성숙 및 발달 그리고 성인-인간-유사 면역 반응의 형성을 유도하는데 중요한 것처럼 보인다. 따라서, 인간 항체를 형성하기 위한 계통들의 유용성에 부가하여, 계통들은 정상 면역 반응에서 인간 항체의 생산 및 기능 뿐만아니라, 자가면역 질환 및 기타 장애의 비정상적인 반응 특성을 연구하는데 중요한 도구를 제공한다.

<100> 가변 영역 - 양적 다양성

<101> 항체의 특이성(즉, 광범위한 항원 및 게다가 광범위하고 독립적인 그 에피토프에 대해 항체를 형성하는 능력)은 중쇄(V<sub>H</sub>) 및 카파 경쇄(V) 계놈 상의 가변 영역 유전자에 의존적이다. 인간 중쇄 계놈은 대략 95개 V<sub>H</sub> 유전자를 포함하며, 이중 41개는 면역글로불린 분자의 인간 중쇄의 가변 영역을 암호화하는 기능적인 유전자이다. 게다가, 인간 경쇄 계놈은 대략 40개의 V<sub>K</sub> 유전자를 그 인접 단부 상에 포함하며, 이들 중 25개는 면역글로불린 분자의 인간 카파 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 기능적인 유전자이다. 본 발명자는 항체의 특이성이 가변 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 유전자들을 다수 포함함으로써 강화될 수 있다는 것을 확인하였다.

<102> 인간 Ig 좌위의 상당한 부위를 보유하는 트랜스제닉 마우스가 본 발명에 따라 제공되며, 인간 중쇄 좌위 및 인간 카파 경쇄 좌위 모두를 포함하는 것이 바람직하다. 따라서, 바람직한 구체예에서 10% 이상의 인간 V<sub>H</sub> 및 V<sub>K</sub> 유전자가 사용된다. 더욱 바람직하게는, 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70% 이상의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>K</sub> 유전자가 사용된다. 바람직한 구체예에서, 인간 V<sub>K</sub> 경쇄 계놈의 인접 영역 유래의 32개 유전자 및/또는 인간 IgH 좌위의 V<sub>H</sub> 부위 유래의 66개 유전자 각각을 포함하는 중쇄 및 경쇄 구조체를 사용한다. 이해될 수 있는 바와 같이, 유전자는 순차적으로, 즉 인간 계놈내에서 발견되는 순서로 또는 서열을 벗어나서, 즉 인간 계놈에서 발견되는 것과 다른 순서로 또는 이들의 조합으로 포함될 수 있다. 따라서, 예로서, 좌위 중 인간 V<sub>H</sub> 또는 인간 V<sub>K</sub> 영역의 전체적으로 연속적인 부위를 사용할 수 있거나, V<sub>H</sub> 또는 V<sub>K</sub> 계놈에 있는 다양한 V 유전자를 생략하면서 연속적인 전체 배열을 유지할 수 있거나 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>K</sub> 계놈 내 V 유전자를 재정리할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 전체 인간 좌위는 인간에서 발견되는 실질적인 생식계열형 배치로 마우스 계놈 내로 삽입된다. 임의의 경우에서, 이것이 예상되며 본 명세서에 기술된 결과에 의하면, V<sub>H</sub> 및 V<sub>K</sub> 계놈 유래의 유전자들의 다양한 배열을 포함하는 것은 항체 특이성을 강화시키고 결국 항체 친화도를 강화시킨다는 것을 입증한다.

<103> 이러한 마우스가 전체 인간 D<sub>H</sub> 영역, 전체 인간 J<sub>H</sub> 영역 및 인간 mu 불변 영역을 더 포함하는 것이 바람직하며, 부가적으로 항체의 부가적인 이소타입을 암호화하고 형성하기 위한 다른 인간 불변 영역을 갖출 수 있다. 이러한 이소타입은  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  및  $\delta$ 를 암호화하는 유전자, 그리고 적당한 스위치 및 조절성 서열을 갖는 유전자를 암호화하는 다른 불변 영역을 포함할 수 있다. 이해되는 바와 같이, 그리고 하기에서 자세히 논의되는 바와 같이, 스위치 및 조절성 서열의 다양성은 임의의 특정 불변 영역의 선택과 함께 사용할 수 있다.

<104> 하기 표는 무작위 V-D-J 연결 및 카파 경쇄와의 조합에 엄격하에 기초하여, N-부가, 결실 또는 체세포성 돌연변이 현상을 고려하지 않고, 인간 내에서 가능한 항체 조합의 다양성을 제시한다. 이들 고려사항을 기초하면, 인간에서는 임의의 특정 이소타입으로된  $7 \times 10^5$  이상의 가능한 항체 조합이 존재한다.

**표 1**

영역	중쇄	카파경쇄
기능적인 가변 영역 "V"	~41	25
기능적인 다양성 영역 "D"	≥23	--
이음부 "J"	6	5
조합(V×D×J)	5,658	125
총조합(HC 조합×LC 조합)	$7.1 \times 10^5$	

<106> 본 발명의 바람직한 구체예와 관련하여, 마우스에서의 약 34개의 기능적인 V<sub>H</sub> 유전자와 18개의 기능적인 및 V<sub>K</sub> 유전자를 전량 D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub> 및 J<sub>K</sub> 유전자와 함께 포함함으로써, 가능성있는 항체 생산의 다양성은  $4.2 \times 10^5$  정도의 상이한 항체이다. 이전과 마찬가지로, 이러한 계산은 N-부가 또는 체세포성 돌연변이 현상을 고려하지 않은 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 마우스(예, L6 및 XenoMouse II 계통)는 상당한 항체 다양성을 제공할 것으로 이해된다. 바람직한 구체예에서, 마우스는 N-부가 또는 체세포성 돌연변이를 고려하지 않아도,  $2 \times 10^5$  이상의 상이한 중쇄 V-D-J 조합 및 카파 경쇄 V-J 조합을 제공하는 능력을 보유하도록 고안한다.

<107> 가변 영역 - 질적 다양성

- <108> 양적 다양성에 부가하여, V-유전자의 양적 선택(즉, 많은 수의 다양한 V-유전자) 및/또는 V-유전자의 질적 선택(즉, 특정 V-유전자의 선택)은 본 발명자가 본 명세서에서 "질적 다양성"이라 지칭하는 것에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 본 명세서에 사용된 "질적 다양성"은 접합부 다양성 및/또는 체세포성 돌연변이 현상이 도입되는 경우 V-D-J 재배열에 있어서 다양성을 지칭한다. 중쇄 재배열 동안, 몇몇 효소(RAG-1, RAG-2 및 기타 가능한 효소들)가 항체 유전자의 암호화 영역을 나타내는 DNA를 절단하는데 관여한다. V-D 및 D-J 유전자 엑손들 사이에 N-말달 뉴클레오티드 부가에 관여하는 말달 테옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제(Tdt) 활성은 상향 조절된다. 유사한 효소들 및 기타 효소들(SCID 및 기타 DNA 수선 효소들)은 이들 암호화 세그먼트의 접합부에서 일어나는 결실(들)에 관여한다. 접합부의 다양성은 N-부가 사건 및 상보성 결정 영역 3(CDR3)의 형성 모두에 관여한다. 이해되는 바와 같이, CDR3은 D 영역을 가로질러 위치하고 V-D 및 D-J 접합부 사건을 포함한다. 따라서, D-J 재배열 및 V-D 재배열 동안 N-부가 및 결실은 CDR3 다양성에 책임이 있다.
- <109> N-부가 및 CDR3 부가에 의해 형성된 접합부 다양성은 항체 특이성을 발달시키는데 분명한 역할을 한다.
- <110> 본 발명에 따르면, 재배열된 V-D-J 유전자 서열은 예상되는 성인-인간 N-부가 길이와 비교할만한 N-부가 길이를 보여준다. 나아가, CDR3 서열에 해당하는 개방형 해독틀(ORF)에 걸친 아미노산 서열은 예상되는 성인-인간 CDR3 길이와 비교할만한 CDR3 길이를 보여준다. 이러한 데이터는 양적 가변 영역 다양성 및/또는 질적 가변 영역 다양성이 인간-유사 접합부 다양성을 산출한다는 것을 제시한다. 이러한 접합부 다양성은 더 많은 인간-유사 항체 특이성을 유도한다고 예상된다.
- <111> 가변 영역- 친화도
- <112> 본 발명자는 결정적으로 증가된 가변 영역을 포함하는 것과 항원 특이성 사이의 직접적이고 우발적인 관련을 입증하지 않았으나, 이러한 다양성을 제공함으로써 광범위한 배열의 항원에 대한 면역 반응을 개시하는 마우스의 능력이 가능하고 강화된다고 보이며 이렇게 예상된다. 게다가, 이러한 마우스는 개별적인 항원 및 면역원 상의 광범위한 배열의 에피토프에 면역 반응을 개시하도록 더 많이 갖췄다고 보인다. 본 발명의 데이터로부터 본 발명에 따라 제공된 항체는 또한 강화된 친화도를 보유한다고 보여진다. 이러한 데이터는 본 발명에 따른 마우스 및 XenoMouse I 계통 사이에서의 비교뿐만 아니라, GenPharm 인터내셔널 및 MRC의 공개된 결과의 고려사항도 포함한다. 상기 언급한 바와 같이 XenoMouse I 계통과 관련하여, 이러한 마우스는 서브-정상 B-세포를 생산하고 항원에 대해 오직 제한된 반응을 보유한다. 이러한 결과는 부분적으로 제한된 V-유전자 레파토리와 관련이 있는 것처럼 보인다. 유사하게, GenPharm International 및 MRC에 의해 보고된 결과들은 다양한 항원에 대한 제한된 반응을 암시한다.
- <113> 본 발명의 기작에 대한 임의의 특정 이론 또는 양식에 구애되지 않으나, 강화된 친화도는 다수의 복잡한 V 영역들이 제공된 결과로 보여진다. 본 발명의 데이터로부터 더 큰 수의 V-유전자를 제공하고/하거나 V-유전자의 질을 선택하면 접합부 다양성(N-부가 및 상보성 결정 영역 3("CDR3") 다양성의 형성)을 강화시키며, 이것은 성인-인간-유사 면역 반응에 전형적인 것이며 항체의 친화도 성숙에 상당한 역할을 한다. 또한 이러한 항체는 친화도를 강화시킬 수 있는 체세포성 돌연변이 현상에서 더욱 효과적이고 효율적일 수 있다. 접합부 다양성 및 체세포성 돌연변이 현상 각각은 하기에서 더욱 자세히 논의되어 있다.
- <114> 친화도와 관련하여, 다수의  $V_H$  및  $V_K$  유전자를 사용(즉,  $V_K$  경쇄 계놈의 인접 영역 상의 32개 유전자 및 계놈의  $V_H$  부위 상의 66개 유전자의 이용)함으로써 유도된 항체 친화 속도 및 상수는  $0.50 \times 10^{-6}$  이상, 바람직하게는  $2.00 \times 10^{-6}$  이상, 더욱 바람직하게는  $4.00 \times 10^{-6}$  이상의 결합 속도( $k_a, M^{-1}S^{-1}$ );  $1.00 \times 10^{-4}$  이상, 바람직하게는  $2.00 \times 10^{-4}$  이상, 더욱 바람직하게는  $4.00 \times 10^{-4}$  이상의 해리 속도( $k_d, S^{-1}$ ); 및  $1.00 \times 10^{-10}$  이상, 바람직하게는  $2.00 \times 10^{-10}$  이상, 더욱 바람직하게는  $4.00 \times 10^{-10}$  이상의 해리 상수(M)를 산출한다.
- <115> 바람직하게도 이러한 마우스는 기능적인 내인성 면역글로불린을 추가로 생산하지 않는다. 이것은 내인성 중쇄 및 경쇄 좌위의 불활성화(또는 유전자 파괴)에 의한 바람직한 구체예에서 수행된다. 예를들면, 바람직한 구체예에서, 마우스 중쇄 J-영역 및 마우스 카파 경쇄 J-영역 및  $C_K$ -영역은 상기 영역을 치환 또는 결실하는 상동성 재조합 벡터를 사용하여 불활성화시킨다.
- <116> 가변 영역 - B-세포 발달
- <117> B-세포 발달은 문헌[Klaus B Lymphocytes(IRL Press (1990)) 및 Chapters 1-3 of T.Honjo 등, Immunoglobulin Genes (Academic Press Ltd. San Diego, CA(1989))]에 설명되어 있다. 통상, 포유류에서 B-세포 및 T-세포 림프

구를 포함한 혈액 세포 발달은 공통적인 다면발현성 줄기 세포로부터 유래된다. 이어서, 림프구는 공통되는 림프성 조상 세포로부터 진화된다. 초기 임신 기간 이후, B-세포 개시는 간으로부터 골수로 이동하고 골수에서 포유류 일생에 걸쳐 유지된다.

<118> B-세포의 생활 사이클에서, 통상 인식가능한 최초 세포는 골수에서 발견되는 pro-pre-B-세포이다. 이러한 세포는 중쇄 V-D-J 재배열을 시작하였으나, 아직 단백질을 생산하지는 않는다. 이어서 세포는 더 크고, 신속하게 분할되는 pre-B-세포 I로 진화되며, 이 세포는 세포질적으로  $\mu$  세포이다. 이어서, 이 pre-B-세포 I는 분할을 그만두고, 수축하고 경쇄 V-J 재배열을 수행하여 표면 IgM을 발현하는 pre-B-세포 II가 되고, 미성숙 B-세포로서 골수를 떠난다. 대부분의 신생 미성숙 B-세포는 계속해서 발달하고 표면 IgD를 생산하며, 이것은 주로 비장에 거주하는 완전한 성숙 면역적격의 말초 B-세포로서 분화 및 발달이 종결된 것을 제시한다[Hardy and Rolink, Ann. NY Acad. Sci., 764, pp.19-24(1995); Rolink and Melchers, Immunol. Lett., 54, pp.157-161(1996)]. 그러나, 델타 불변 영역을 제거하여 여전히 면역적격 세포를 획득할 수 있다.

<119> B-세포 분화 및 발달은 표면 마커를 사용하여 모니터링하고/하거나 그 자취를 추적할 수 있다. 예를들어, B220 항원은 pre-B-세포 I 또는 II와 비교하여 성숙 B-세포에서 상대적으로 풍부하게 발현된다. 따라서, B200<sup>+</sup>이고 표면 IgM<sup>+</sup>( $\mu$ <sup>+</sup>)인 세포를 사용하여 성숙 B-세포의 존재를 결정할 수 있다. 게다가, 세포는 표면 IgD 발현( $\delta$ <sup>+</sup>)에 대해 스크리닝할 수 있다. 또다른 항원, 열안정 항원은 pre-B-세포 I에 의해 후기 발달 단계에서 발현된다.

**표 2**

마커	골수			비장	
	pro-pre-B-세포	pre-B-세포 I	pre-B-세포 II 신생 B-세포	미성숙 B-세포	성숙 B-세포
B220	+	+	+	+	++
HSA	-	+	+	hi	lo
$\mu$	-	-	+	+	+
$\delta$ *	-	-	-	-	+

<121> \* 트랜스유전자 상 C $\delta$  유전자의 기능적인 카피의 존재를 가정함

<122> B-세포 마커의 사용을 통해 상기 언급한 바와 같이, B-세포의 발달 및 분화를 모니터링하고 평가할 수 있다.

<123> 본 발명자는 DI 마우스(중쇄 V-D-J 재배열 또는 경쇄 V-J 재배열을 겪지 않는 마우스)가 성숙 B-세포를 생산하지 않는다는 것을 전에 확인한 바 있다. 사실, 이러한 마우스를 pro-pre-B-세포의 생산에서 정지되고 B-세포는 결코 골수로부터 비장을 포함한 말초 조직으로 이동하지 않는다. 따라서, B-세포 발달 및 항체 생산은 완전히 억제된다. 동일한 결과가 오직 중쇄만이 불활성화된 마우스에서 관찰된다-- B-세포 발달 및 분화는 골수에서 정지된다.

<124> 본 발명의 Xenomouse I 계통은 기능적이고 다소 성숙한 B-세포를 생산하였다. 그러나, 골수 및 말초 조직 양쪽에서 B-세포의 수는 야생형 마우스와 비교하여 상당히 감소되었다.

<125> 대조적으로, 본 발명의 Xenomouse II 계통 및 L6 계통은 예상외로 거의 완전한 B-세포 재구성을 보유한다. 따라서, 본 발명에 따라 본 발명자는 가변 영역 유전자의 양적 포함 또는 질적 포함을 통해 B-세포 분화 및 발달이 크게 재구성될 수 있다는 것을 확인하였다. B-세포 분화 및 발달의 재구성은 면역계 재구성을 제시한다. 통상, B-세포 재구성은 야생형 대조군과 비교된다. 따라서, 바람직한 본 발명의 구체예에서, 삽입된 인간 가변 영역을 갖는 마우스 집단은 야생형 마우스와 비교할 때 50% 이상의 B-세포 재구성을 보유한다.

<126> XENOMOUSE에 의한 이소타입 스위치

<127> 본 명세서에 자세히 논의한 바와 같이, 예상되는 바와 같이, Xenomouse II 마우스는  $\mu$  이소타입을 암호화하는 인간 트랜스유전자로부터 감마-2 이소타입을 암호화하는 트랜스유전자로의 효율적이고 효과적인 이소타입 스위치를 겪는다. 진술한 바와 같이, 본 발명에 따른 마우스는 부가적으로 추가 이소타입 형성을 위한 다른 인간 불변 영역을 갖출 수 있다. 이러한 이소타입은  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ 를 암호화하는 유전자 및 기타 불변 영역 암호화 유전자를 포함할 수 있다. 대체가능한 불변 영역은 동일한 트랜스유전자 상, 즉 인간  $\mu$  불변 영역

의 하류에 포함될 수 있으며, 달리 이러한 다른 불변 영역은 다른 염색체 상에 포함될 수도 있다. 이러한 다른 불변 영역이 트랜스유전자를 암호화하는 인간  $\mu$  불변 영역을 포함하는 염색체와 동일한 염색체에 포함되는 경우 다른 이소타입(들)로의 cis-스위치가 수행될 수 있다. 한편, 이러한 다른 불변 영역이 트랜스유전자를 암호화하는  $\mu$  불변 영역을 함유하는 염색체와 상이한 염색체에 포함되는 경우 다른 이소타입(들)로의 트랜스-스위치가 수행될 수 있다. 이러한 배열은 광범위한 배열의 항원들에 대한 항체들을 형성하기 위한 마우스를 고안 및 재구성하는데 커다란 융통성을 제공한다.

<128> 불변 영역은 이와 관련된 알려진 스위치 및 조절성 영역을 보유한다고 이해될 것이다. 쥐 및 인간 불변영역 유전자 모두가 서열분석되었고 1989년 공개되었다. 문헌[Honjo 등 "Constant Region Genes of the Immunoglobulin Heavy Chain and the Molecular Mechanism of Class Switching" in Immunoglobulin Genes(Honjo 등, eds., Academic Press(1989), 본 명세서에 인용되어 있음)]을 참조하라. 예컨대, 미국특허출원 일련번호 제07/574,748호(상기 문헌은 본 명세서에 인용되어 있음)에서, 인간 감마-1 불변 영역의 클로닝을 선행기술로부터 알려진 서열 정보에 기초하여 예상하였다. 재배열되지 않고, 스위치되지 않은 유전자에서 전체 스위치 영역은 최초  $\gamma$ -1 불변 엑손의 5'단부로부터 5kb 이하에서 시작하는 서열에 포함되어 있었다. 따라서, 스위치 영역도 문헌[Ellison 등, Nucleic Acids Res. 10:4071-4079(1982)]에 개시된 5' 5.3 kb Hind III 단편에 포함되었다. 유사하게, 문헌[Takahashi 등, Cell 29:671-679(1982)]도 Ellison에서 개시된 단편이 스위치 서열을 포함하였다고 보고하였으며, 이 단편은 7.7kb HindIII 내지 BamHI 단편과 함께 중쇄 이소타입 스위치 트랜스 유전자 재구성에 필요한 서열 모두를 포함하여야 한다.

<129> 따라서, 선택된 임의의 인간 불변 영역은 부적당한 실험없이 본 발명에 따라 용이하게 마우스 내로 도입될 수 있다. 이러한 불변 영역은 그들의 천연 스위치 서열(즉, 각각의 인간  $\gamma_{1, 2, 3}$  또는 4 불변 영역과 인간  $\gamma_{1, 2, 3}$  또는 4 스위치 서열)과 연결될 수 있거나 다른 스위치 서열(즉,  $\gamma_4$  불변 영역과 인간  $\gamma_2$  스위치 서열)과 연결될 수 있다. 예를들면 마우스, 인간 또는 래트와 같은 다양한 3' 인핸서 서열도 사용할 수 있다. 유사하게 다른 조절성 서열도 포함될 수 있다.

<130> 생체내 이소타입 스위치의 대안으로 및/또는 이에 부가하여, B-세포는 "키메라" 항체의 분비에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를들면, 완전한 인간 IgM 항체들을 생산하는 것에 부가하여 L6 마우스는 다양한 감마(즉, 마우스 IgG1, 2,3,4)등과 같은 마우스 불변 영역과 쌍을 이룬 완전한 인간 중쇄 V, D, J 영역들을 보유하는 항체들을 생산한다. 이러한 항체는 그 자체만으로 매우 유용하다. 예를들면, 인간 불변 영역은 당업계에 잘 알려진 시험관내 이소타입 스위치 기법을 통해 항체들 상에 포함될 수 있다. 대안으로 및/또는 이에 부가하여, 마우스 불변 영역을 전혀 또는 거의 함유하지 않는 이러한 항체의 단편(즉, F(ab) 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편)을 제조할 수 있다.

<131> 상기 논의한 바와 같이, 항체 생산에 가장 중요한 인자는 원하는 항원 또는 항원 상의 에피토프에 대한 특이성이다. 비로소 이때부터 항체의 클래스는 치료 요구에 따라 중요해진다. 다른 말로, 항체의 치료 지수가 특정 이소타입 또는 클래스를 제공함으로써 강화될 것인가라는 질문을 고려하면 보체 고착 등과 같은 논점이 제기되고, 이어서 항체의 특정 클래스 또는 이소타입을 선택하게 한다. 감마 불변 영역은 항체의 친화도 성숙화에 조력한다. 그러나, 트랜스유전자 상에 인간 감마 불변 영역을 포함하는 것은 이러한 성숙화를 성취하는데 필요한 것은 아니다. 오히려, 이 프로세스는  $\mu$  암호화된 트랜스유전자 상으로의 트랜스-스위치된 마우스 감마 불변 영역과 함께 진행되는 것처럼 보인다.

<132> 실시예 1

<133> 쥐(murine)  $\gamma_1$ -인간  $\gamma_4$  또는 쥐  $\gamma_1$ -인간  $\gamma_1$ 을 위한 YAC 벡터

<134> 모 YAC yH1C의 표적화 대체 벡터는 인간  $\gamma_2$  스위치 요소 및 인간 CH  $\gamma_2$  엑손을 쥐  $\gamma_1$  스위치 요소 및 인간 C  $\gamma_1$  엑손 또는 인간 C  $\gamma_4$  엑손으로 대체하여 제조하였다(도 1). 상기 벡터는 pMuShu1 및 pMuShu4로 지칭되었다(도 5). 상기 벡터는 pACYC117로 알려진 저 카피 수 클로닝 벡터를 사용하여 제작하였다. 상기 벡터 pACYC117은 메사추세츠주 베버리에 소재하는 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 인크.로부터 입수가 가능하고, 상기 서열은 서열 수탁 번호 진뱅크 #X 06402로 진뱅크 서열 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 저 카피 수 복제 기원은 E. Coli내에서 증식하는 경우 플라스미드 DNA의 바람직하지 않은 재배열 또는 결실을 방지하는데 유용하다.

<135> 제1 단계는 표적화 벡터에 필요한 요소를 수용하기 위하여 링커를 pACYC117내로 도입하는 것이었다. 링커는 다음의 제한 부위를 포함한다: NheI-SalI-SamI-NotI-EcoRI-XbaI-SacI-BamHI.

<136> 링커의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 2)은 다음에 제시된다:

- <137> 5'-cta gtc gac aaa tat tcc ccg ggc ggc cgc tta cgt atg aat tca gcg cgc ttc tag aac tcg agt gag ctg
- <138> 링커의 상보적 스트랜드의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 3)은 다음에 제시된다:
- <139> 5'-gat cga gct cac tcg agt tct aga agc gcg ctg aat tca tac gta agc ggc cgc ccg ggg aat att tgt cga
- <140> **제한 효소**
- <141> 다른 제시가 없으면 모든 제한 효소는 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 인크.(메사추세츠주, 베버리)에서 구입하였다. 또한, 모든 제한 효소 절단 조건은 다음 조건에 따라 표준화되었다: DNA 1 ug을 1 시간동안 제한 효소 5 유닛을 사용하여 적절한 제한 완충액 20 ul내에서 절단하였다. 제한 완충액은 특정 효소에 대한 제조자에 의하여 특정되고 그 조성물은 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 인크.(메사추세츠주, 베버리)에서 입수한 상품 칼타그에서 제공된다.
- <142> 링커를 도입하기 위하여, pACYC177은 제조자의 지시에 따라 제한 효소 NheI/BamHI로 절단하였다. 상술된 이 링커는 아가로스 겔상에서 분리된 pACYC177의 2208 bp 단편과 연결하고 진클린 키트(Bio 101)(캘리포니아주, 비스타에 소재)를 사용하여 정제하였다. 상기 방법은 NheI 및 BamHI 제한 부위를 포함하는 벡터의 비-필수 부위만을 제거하였다.
- <143> 다음 단계는 YAC를 함유하는 효모 세포의 선택을 위하여 마커로서 이것의 프로모터 및 암호화 서열과 함께 효모 URA3 유전자를 도입하는 것이었다. 프로모터와 암호화 서열을 함유하는 URA3 유전자의 DNA 1971 bp 단편은 미국 모식균 배양물 수집소(ATCC) 칼타그 제67379호(버지니아주 마나사스에 소재)로부터 입수할 수 있는 pYAC4에서 획득하였고 상기 서열은 기탁번호 #U01086을 사용하여 진뱅크에서 입수할 수 있다. 또한 URA3 단편은 표적화를 위한 충분한 3' 상동성을 제공한다. 플라스미드 pYAC4는 제조자 지시에 따라 제한 효소, SalI 및 MscI으로 절단하였다. 이와 유사하게, 벡터-링커 조합, pACYC177/링커는 제조자 지시에 따라 SalI 및 SmaI로 절단하였다. 이후 절단된 2개의 제한 뉴클레오티드 DNA, pACY177 및 URA3를 함께 연결하여 Int2를 생성하였다.
- <144> 다음 단계는 제조자 지시에 따라 Int2를 XbaI 및 SacI로 먼저 절단함으로써 베타-갈락토시다제 유전자(베타 Gal)를 도입하는 것이었다. 베타 Gal 유전자는 셀 제네시스, 인크.(캘리포니아주 포스터 시티에 소재)로부터 입수할 수 있는 벡터 pGK 베타 Gal로부터 클로닝하였다. DNA pGK 베타 Gal을 제한 효소, XbaI 및 SacI로 절단하였다. pGK 베타 Gal로부터 선형화된 Int2 및 2553 kb 단편을 함께 연결하여 Int3으로 명명되는 다음 중간체를 생성하였다.
- <145> 상기 베타 Gal 발현 구조체는 불완전하다. 베타 Gal의 결실된 부분은 제한 효소 SacI 및 NcoI로 pGK 베타 Gal 플라스미드를 절단함으로써 얻는다. pGK 베타 gal 절단에서 생성된 1165 kb 단편은 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분리되고, 상기 단편은 에티뮴 브로마이드 염색된 겔로부터 절단하고 진클린 키트(Bio 101)(Vista, CA)를 사용하여 상술된 바와 같이 정제하였다. 유사하게, Int3는 제조자 지시에 따라 제한 효소 SacI로 절단하였다. 선형화된 Int3을 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분리하였다. pGK 베타 gal에서 유래한 1165 bp 단편 및 선형화된 Int3을 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 인크.에서 구입한 효소 T4 DNA 리가아제를 사용하여 함께 연결하였다. DNA 단편은 재분리하고 클레노우 단편으로 처리하여 단부를 블런트시켰다. SacI 블런트 단부에 블런트를 연결시키는 효소 NcoI를 사용하여 선형화된 DNA를 환형화시켜 Int4를 생성하였다.
- <146> **5' 상동성 도입**
- <147> 표적화 재조합을 위한 5' 상동성 영역은 3' 단부의 구조에 의하여 A-267-C10 YAC의 서열로부터 분리하였으며, 이는 플라스미드 ppKM1c내로 이미 클로닝되었다[참조, Mendex 등, Nature Genetics 15:146-156 (1997)]. A287-C10 YAC는 인간 V<sub>H</sub>6 유전자에 대한 PCR 프라이머를 사용하여 워싱턴 유니버시티 인간 YAC 라이브러리(미주리주 세인트 루이스에 소재하는 워싱턴 유니버시티)로부터 DNA 풀을 스크리닝하여 분리하였다. A287-C10 YAC의 분리 및 특성 규명은 1994년 2월 3일에 공개된 Kucherlapait 등의 국제 특허 출원 W094/02602에 상세하게 설명되어 있으며, 그 개시는 본원에 참고로 통합된다.
- <148> Int4는 제한 효소 NotI 및 SnaBI로 절단한 후 다음과 같은 송아지 장 포스파타제로 처리하였다: 제한 절단 반응액 20 ul 중에 DNA 1 ug, 송아지 장 포스파타제 5 유닛(뉴 잉글랜드 바이오랩스., Beverly, MA). 효소 및 DNA는 30분 동안 30°C에서 항온처리한 후, 또 30분동안 65°C에서 가열하여 포스파타제를 변성시켰다. 벡터 ppKM1c를 제한 효소, EcoRI으로 절단한 후, 클레노우 단편으로 처리하여 블런트 단부를 만들어 EcoRI 부위를 제거하였다. 선형화된 ppKM1c는 제조자 지시에 따라 분리하여 제한 효소 NotI로 절단하였다. 약 1 kb 5' 상동성의 단편을 분리하였다. 다음, 1 kb 단편을 NotI 및 SnaBI으로 절단된 Int4와 함께 연결시켰다. 이러한 DNA 제조물

을 Int5라고 명명하였다.

- <149>  $\gamma$ 1 및  $\gamma$ 4 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 암호화 엑손, 막통과 엑손 및 약 3 kb의 하류 서열(각각 ~7 kb)을 pBR322로부터 유래한 2개의 중간 DNA를 통하여 대체 벡터내로 도입하였다.
- <150> 먼저, pBR322를 HindIII로 절단하고 송아지 장 포스타타제(CIP)로 처리하고 P1 클론 #1737(G1)의  $\gamma$ 1 서열을 함유하는 약 7 kb의 HindIII 단편과 연결되었다. P1 파아지 클론을 계놈 시스템, 인크.(미주리주 세인트 루이스)에서 구입하였다. 이것은 중간 플라스미드 pCG12를 생성하였다.
- <151> 제2 중간체는 제한 효소, HindIII 및 BamHI로 pBR322를 절단하여 제작하였다. 3986 kb 단편은 송아지 장 포스타타제로 처리하고 계놈 시스템, 인크.(St. Louis, MO)에서 구입한 BAC 클론 #176E10의 인간  $\gamma$ 4 서열을 함유하는 약 7 kb HindIII/BamHI 단편과 연결하였다. 상기 중간체 플라스미드는 pCG43이라 명명하였다.
- <152> 표적화 벡터의 구조체를 완성하기 위하여 신규한 링커를 Int5의 XbaI 제한 부위내로 클로닝시켰다. 링커는 다음의 제한 부위를 갖는다: XbaI · kill-MfeI-SspI-HindIII-SnaBI-BclI-XhoI-MluI-Xba · kill. Int5로 클로닝되는 링커를 갖는 Int5 는 Int6로 명명되었다. 링커 서열번호: 4는 하기에 제시된다:
- <153> 5' cta ggc aat tga taa tat taa gct tta cgt atc tga tca tcc tgc aga cgc gtg
- <154> 상보적 스트랜드 서열(서열번호: 5):
- <155> 5' cgt taa cta tta taa ttc gaa atg cat aga cta gta gga gct ctg cgc acg atc
- <156> 링커는 Int6 내에서 다음과 같이 배향되었다:
- <157> A287-SnaBI(ex)-EcoRI-BssHII-XbaI(ex)-MfeI-HingIII-BclI-XhoI-MluI-pGK-베타 Gal
- <158> 제한 부위 XbaI · kill은 특정 XbaI 부위가 대형 DNA내로 연결시 제거될 것임을 시사한다. 링커는 XbaI 부위내로 연결될 수 있으나 그 부위가 연결시 제거되도록 편리하게 설계된다. 링커를 함유하는 특정 XbaI 부위는 링커를 먼저 클로닝한 후 다음 쌍의 제한 효소로 DNA를 분리 절단하여 측정하였다: NotI 및 HindIII; XbaI 및 SphI; 및 MluI 및 SphI. 링커의 도입은 하나의 XbaI 부위를 제거한다. Int6내 링커의 위치는 신규하게 도입된 HindIII 부위와 Int5내에 존재하는 NotI 부위 사이의 거리에 의하여 결정되었다.
- <159> **마우스  $\gamma$ 1 스위치 영역의 클로닝:**
- <160> 플라스미드 EH10은 미시간 유니버시티에서 입수하였고, HindIII/EcoRI 단편상에 쥐  $\gamma$ 1 스위치 영역을 포함하는 pBR322계 플라스미드이다(M.R. Mowatt 등, J.Immunol. 136:2647-2683 (1983)]. 이 플라스미드는 제한 효소 EcoRI 및 HindIII로 절단하였고 마우스  $\gamma$ 1을 포함하는 10 kb 단편을 상기와 같이 분리하고 정제하였다.
- <161> **pMSL4의 제작**
- <162> pMSL1의 제작은 3식 라이게이션을 포함한다. 제1 요소는 상술된 바와 같이 EcoRI 및 HindIII 절단된 EH10로부터 분리된 마우스  $\gamma$ 1 스위치를 함유하는 10 kb 단편이었다. 제2 요소는 BamHI 및 EcoRI으로 절단된 pBR322이었다. 제3 요소는 약 7 kb HindIII 및 BanHI 단편상에 인간  $\gamma$ 4를 포함하는 pBR322계 플라스미드 pCG43이었다. 3가지 모두는 함께 연결하여 pMSL4를 생성하였다.
- <163> **pMSL1의 제작**
- <164> pMSL1의 제작은 또한 3식 연결을 포함하였다. 제1 요소는 상술된 바와 같이 EcoRI 및 HindIII로 절단된 EH10로부터 분리된 마우스  $\gamma$ 1 스위치를 포함하는 10 kb 단편이었다. 제2 요소는 EcoRI 및 BamHI으로 절단된 pBR322이었다. 제3 요소는 약 7 kb 단편의 3' 단부상에 HindIII 부위로 HindIII kill-HamHI 링커를 도입함으로써 변형되는 인간  $\gamma$ 1의 약 7 kb 단편을 포함하는 pBR322계 플라스미드 pCG12이었다. 따라서 BamHI 및 HindIII로 이중 절단후 변형된 플라스미드는 7 kb HindIII/BamHI 단편을 방출하였으며, 이것은 이후 3 조각 라이세이션에서 사용된다.
- <165> **마우스 3' 인헨서**
- <166> 본 발명자는 pIB내로 클로닝된 쥐 3' 인헨서(HSIg2)를 함유하는 pIBgamma2 표적화 벡터의 4 kb MluI 단편으로부터 StuI 제한 효소 절단에 의하여 인헨서의 0.9 kb 중심부를 분리하였다[M.J. Mendez 등, Nature Genetics, 15:146-156 (1997)].
- <167> 본 발명자는 제한 효소 XhoI로 Int6를 절단한 후, 클레노우 단편으로 처리하여 블런트 단부를 생성하였다. 본

발명자는 생성된 선형 Int6를 쥐 3' 인헨서의 0,9 kb StuI 단편과 연결시켜서 Int7을 생성하였다. 본 발명자는 EcoRI를 사용하여 표본 클론상에 제한 절단을 수행함으로써 클로닝 반응을 입증하였다. 또한, 본 발명자는 NcoI; NcoI 및 HindIII; 및 HindIII 및 PvuII 절단과 0.9 bp Stu I 단편의 공지된 제한 맵에 의하여 바람직한 배향의 단편을 확인하였다.

<168> 본 발명자는 또다른 링커를 플라스미드 Int7내로 도입하였다. 본 발명자는 Int7을 MfeI 및 SnaBI(이중 절단)으로 절단한 후, 송아지 장 포스파타제로 처리하였다. 다음에, 본 발명자는 라이게이션 반응을 수행하고 중간체 Int8을 생성함으로써 다음 링커를 도입하였다: Int7내로 링커를 도입한 제한 부위는 다음과 같다: MfeI·kill-HindIII-SnaBI-BclII-BglIII-BamHI-BalII-NheI·kill. 또한, MfeI·kill은 대형 DNA내로 연결시 MfeI 부위가 제거되었음을 시사한다.

<169> 링커의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 6):

<170> 5' aat taa gct tgt acg tac tga tca aga tct gga tcc aga tct

<171> 상보적 스트랜드의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 7):

<172> 5' aga tct gga tcc aga tct tga tca gta cgt aca agt t

<173> **표적화 벡터**

<174> 완전한 표적화 벡터는 제한 효소 SceI 및 HindIII로 Int8을 절단한 후 송아지 장 포스파타제로 처리하여 제작하였다. 플라스미드 pMSL1 및 pMSL4는 제한 효소 SceI 및 HindIII로 부분 절단하였다. 17 kb 단편은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의하여 분리하였다. 정제된 17 kb 단편을 Int8와 연결하여 도 5에 제시된 최종 표적화 벡터를 제작하였다.

<175> **실시예 2**

<176> **yHIC YAC상  $\gamma$ 1 또는  $\gamma$ 4 구조체의 표적화**

<177> TV1 또는 TV4 벡터(5 ug DNA)는 제한 효소 NotI로 절단하여 선형화시켰다(도 5). DNA를 페놀 추출후 페놀/클로로포름 추출에 의하여 정제하였다. 다음에, DNA를 에탄올로 침전시키고 이후 이 DNA 를 사용하여 LiAc 형질전환 프로토콜에 의하여 yHic YAC을 함유하는 효모 클론을 형질전환시켰다[참조, Schiestl, R.H. 등, Curr. Genet. 16, 339-346 (1989)]. 형질전환체는 SC-URA 아가 배지 플레이트상에서 평판배양하고 콜로니가 나타날 때까지 또는 약 5-6일간 22°C에서 항온배양하였다. SC-URA 플레이트는 우라실이 결핍된 효모 성장 배지를 함유하므로 자신의 고유 우라실을 생성할 수 있는 효모 콜로니에 대하여 선별한다. 유사하게, SC-LYS 플레이트는 라이신이 결핍된 효모 성장 배지를 함유하므로 자신의 고유 라이신을 생성할 수 있는 효모 콜로니에 대하여 선택한다. 생성된 콜로니는 LYS 마커의 결손을 찾기 위하여-유전자 시험용-SC-URA 플레이트상 및 SC-LYS 플레이트상에서 재채택하였다. SC-URA 상에서 성장하지만 SC-LYS 상에서는 성장하지 않는 클론을 48시간동안 22°C YPDA 배지에서 성장시켰다. YAC DNA를 분리하고 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의하여 분석하여 바람직한 이소타입 대체물이 예상대로 발생하는지를 평가하였다. 이 경우에, 인간  $\gamma$ 1 또는  $\gamma$ 4 CH 엑손은 인간  $\gamma$ 2 CH 암호화 엑손을 대체해야 한다(도 1). 여기서 사용된 효모 배지는 BIO 101(Vista, CA)로부터 입수한 보충물로부터 제조되었다.

<178> 상기 분석에 사용된 PCR 프라이머는 다음과 같다:

<179> HG1: 5' cac acc gcg gtc aca tgg c (서열번호: 8)

<180> HG3: 5' cta ctc tag ggc acc tgt cc (서열번호: 9)

<181> PCR 반응은 다음과 같은 35 사이클로 구성된다: 사이클당 94°C에서 15초, 60°C에서 45초 및 72°C에서 90초. HG1 프라이머는 콘센서스 인간 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 4 배열상에서 뉴클레오티드 181에 위치하였고 프라이머 HG3는 상기 배열의 뉴클레오티드 994에 위치하였다. 상기 프라이머는 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 및 C $\gamma$ 4 이소타입에서 DNA를 증폭할 것이다.

<182> 인간 C $\gamma$  유전자내 제한 부위 다형성(polymorphism)에 기인하여, 주형 DMA의 특정 이소타입은 PCR 생성물을 제한 절단하여 DNA 단편의 유일한 세트 생성함으로써 측정할 수 있다. 예를 들면, C $\gamma$ 2 DNA가 PCR 생성물에 대한 주쇄라면 제한 효소 PvuII는 PCR 생성물을 2개의 단편 621 bp 및 196 bp로 절단하지만, C $\gamma$ 1 또는 C $\gamma$ 4가 주쇄라면 생성물을 절단하지 않는다. 이와 유사하게, C $\gamma$ 1이 얻어진 경우 제한 효소 Eco47III는 PCR 생성물을 2개 단편 438 bp 및 379 bp로 절단한다. 최종적으로, C $\gamma$ 4가 얻어지는 경우 제한 효소 Bg1III는 PCR 생성물을 2개의

단편 686 bp 및 125 bp로 제한 절단한다. 이러한 식으로 3개의 모든 IgG 이소타입이 구별될 수 있다.

<183> 특성 규명의 다음 단계로, 원하는 IgG 이소타입뿐만 아니라 정확한 유전학을 나타내는 모든 효모 클론은 서던 블롯 분석에 의하여 추가로 스크린되었다[J. Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Chapter 9, 31-45, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]. 각 클론에 대하여 DNA 표본 5 ug은 제한 효소 HindIII, EcoRI 및 Bam HI로 밤새 절단하였다. yHIC YAC DNA는 대체 벡터상에서 최초 표적으로서 작용하며, 대조구로서 사용되었다. 절단된 DNA는 0.8% 아가로스 겔상에서 분리되었고, 에티뮴 브로마이드로 염색되었고 인화되어 나일론 막(진 스크린 하이브리드화 막, NEN 라이프 사이언스)상에 전이되었다. 다음, YAC 후보는 다음 Ig 유전자로부터 하이브리드화 프로브를 사용하여 서던 블롯상에서 체크하였다: D, mu, J, delta, 쥐 3' 인헨서, Cg1, 4, V1-6. [참조예, M.J.Mendez 등, Genomics 26, 294-307 (1995); M.J. Mendez 등, Nature genetics vol 15, 146-156 (1997) (V3 프로브)]

<184> 다음 프로브는 서던 블로팅을 위하여 사용된다:

<185> HG1: CAC ACC GCG GTC ACA TGG C (서열번호: 8)

<186> HG3: CTA CTC TAG GGC ACC TGT CC (서열번호: 9)

<187> 상기 프라이머는 감마 1, 2 및 4를 위한 ~ 820 bp 단편을 증폭시킬 것이다. 이들은 높은 상동성을 보유하므로 이중 하나는 프로브로서 사용될 수 있다.

<188> VH5를 증폭시키기 위하여 다음 프라이머를 사용하였다:

<189> VH5A: 5' GTC GAC GGG CTC GGG GCT GGT TTC TCT (서열번호: 10)

<190> VH5B: 5' GGG CCC TGA TTC AAA TTT TGT GTC TCC (서열번호: 11)

<191> HPRT를 위하여 다음 프라이머를 사용하였다:

<192> REP3: 5' CTG GAG TCC TAT TGA CAT CGC C (서열번호: 12)

<193> REP4: 5' GGT TCT TTC CGC CTC AGA AGG (서열번호: 13)

<194> 또한, 최종적으로 Cmu를 증폭시키기 위하여, 다음 프라이머를 사용하였다:

<195> Jm1: 5' GCT GAC ACG TGT CCT CAC TGC (서열번호: 14)

<196> Jm4: 5' CCC CAG TTG CCC AGA CAA CGG (서열번호: 15)

<197> 최종적으로, 본 발명자는 CHEF 겔 펄스-필드 겔 전기영동을 사용하여 YAC의 일반적인 구조적 통합을 확인하였다[CHEF DR-II, Bio Rad Life Science, Hercules, CA].

<198> 본 발명자는 인간 C $\gamma$ 4를 암호화하는 YAC를 yH2Cm으로 지칭하고 C $\gamma$ 1을 암호화하는 YAC를 yH2Bm으로 지칭하였다.

<199> **실시예 3**

<200> **yHIC YAC를  $\gamma$ 1(TV G1) 및  $\gamma$ 4(TV G4)로 개선하기 위한 벡터의 제작**

<201> yHIC YAC를 yHG1 및 yHG4로 개선하기(retrofit) 위하여 표적화 벡터 제조를 위한 벡터 제작은 도 6에 도식적으로 나타낸다. 표적화 벡터는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(Beverly, MA)에서 입수한 pACYC177(진뱅크 #X06402)의 백본상에서 제작하였다. 본 발명자는 쥐 3' 인헨서의 클로닝을 용이하게 하기 위하여, 링커를 pACYC177에 도입하였다.

<202> 본 발명자는 링커 Int9를 함유하는 벡터를 pACYC177로 명명하였다. 링커내 제한 효소 클로닝 부위의 배열은 다음과 같다: HindIII-SalI-MluI-PacI-FseI-HindIII. 링커 뉴클레오티드 서열(서열번호: 16)은 다음과 같다:

<203> 5' agc ttg tcg aca cgc gtt taa tta agg ccg gcc a

<204> 상보성 스트랜드의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 17):

<205> 5' agc ttg gcc ggc ctt aat taa acg cgt gtc gac a

<206> 본 발명자는 약 4 kb MluI 단편으로서 yHIC 표적화 벡터로부터 쥐 3' 인헨서를 클로닝하였다. 4 kb 인헨서 단편은 상술된 링커로 변형된 pACYC177의 MluI 부위내로 클로닝하였고 상기 DNA는 Int10으로 명명하였다. 쥐 3' 인

헨서의 적절한 배향은 제한 효소 NgoMI 및 EagI로 예상되는 클론을 절단함으로써 측정하였다.

<207> **5' 상동성 영역의 증폭**

<208> 5' 상동성 영역은 pIB감마2 표적화 벡터의 적절한 부분을 PCR 증폭시켜 획득하였다[M.R.Mowatt 등, J.Immunol. 136:2647-2683 (1983)]. 5' 상동성 영역을 증폭하기 위하여 사용되는 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다[참조 진뱅크 기탁번호 M12389]:

<209> 프라이머 1: 5' tgg tgg ccg aga agg cag gcc a (서열번호: 18)

<210> 프라이머 2: 5' ccg cgg gca tgc aac ttc gta taa tgt atg cta tac gaa gtt att gtg  
gga cag agc tgg gcc cag g (서열번호: 19)

<211> 프라이머 2는 lox p 요소뿐만 아니라 SacII 및 SphI 부위를 포함한다. 5' 상동성 영역은 다음 PCR 조건을 사용하여 PCR 증폭시켰다: 94°C에서 3초간, 55°C에서 30초간 및 72°C에서 60초간의 20 사이클. 이 영역을 TA-TOPO 벡터내로 클로닝한 후 서열결정하였다. TA-TOPO는 인비트로젠, 인크.(Carlsbad, CA)에서 입수한다.

<212> 5' 상동성에 대한 프라이머는 다음에 제시된다:

<213> \*서열 1: gtc tgg ccc ctc tgc tgc (서열번호: 20)

<214> 서열 2: cac cca taa aag gct gga (서열번호: 21)

<215> 역방향 서열1: acg gct cat gcc cat tgg (서열번호: 22)

<216> 역방향 서열2: tag tga gtg ggc ctg act (서열번호: 23)

<217> 본 발명자는 생성된 서열을 인간 스위치  $\gamma$  2 서열(진뱅크 #U39934)과 비교하여 이것의 동일성을 결정하였다.

<218>  **$\gamma$ 4 암호화 및 3' 상동성 영역의 클로닝**

<219> 본 발명자는 제한 효소 SacII를 사용하여 플라스미드 pCG43의 부분 효소 절단을 수행함으로써 인간  $\gamma$ 4 암호화 엑손 및 3' 상동성 영역을 획득하였다. 본 발명자는 이어서 제한 효소 BamHI로 플라스미드 pGS43을 절단하고 정제된 약 7 kb 단편을 5' 상동성 함유 TA 벡터내로 클로닝하였다. 본 발명자는 상기 중간체 재조합 DNA 분자를 IntI G4로 명명하였다.

<220> IntI G4는 BamHI로 절단하고 송아지 장 포스파타제로 처리한 후 벡터를 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분리하였다. 분리된 벡터는 상술된 바와 같이 pIB 감마2 유래의 3.4 kb BamHI 단편과 연결하였다. 삽입체의 배향은 이중 절단 NotI/HindIII에 의하여 결정되었다. HindII 부위는 절단후 단편의 크기에 의하여 결정되는 바와 같이 3.4 kb BamHI 단편의 5' 단부으로 결정되었다.

<221> 다음 본 발명자는 pACYC177/인헨서 플라스미드내에 링커의 배향을 결정할 필요가 있었다. 이것은 SmaI와 제2 효소(SalI, MluI, PacI, 및 FseI)중의 하나로 pACYC177/링커를 이중 절단한 패널을 제조함으로써 수행하였다. 링커 배향은 생성된 단편의 크기에 의하여 결정하였다.

<222> pACYC177/인헨서 플라스미드내 제한 부위의 위치는 다음과 같다: ClaI/SmaI(pACYC177)-HindIII-FseI-PacI-MluI-((인헨서:PstI-PvuII-EcoRI-NcoI-NheI-ApaI))-MluI-SalI)-PfmI(pACYC177).

<223> 다음 단계는 URA3 유전자를 PACYC177/인헨서 플라스미드내로 클로닝하는 것이다. 이것의 목적은 선별성 효모 마커 및 3' 상동성을 갖는 표적화 벡터를 개선하여 상동성 재조합을 유도하는 것이다. URA3 유전자를 클로닝하기 위하여, Int2(최초 TV1 및 TV4를 위하여 제작, 실시예 1에서 설명)는 SacII/SalI를 사용하여 절단하였다. 이와 유사하게, pACYC177/인헨서 플라스미드는 SacII/SalI로 절단하였다. Int2 절단에서 생성된 3.8 kb 단편 및 pACYC177/인헨서에서 생성된 5 kb 단편을 아가로스 겔 전기영동상에서 분리하여 함께 연결시켰다. 생성된 플라스미드는 pACYC177 백본내 인헨서 및 URA3 유전자를 함유한다. 다음 단계는 2개 이상의 링커를 클로닝된 3.4 kb Bam HI 단편을 갖는 Int1 G4내로 도입하는 것이다. 생성된 중간체는 Int2 G4로 명명하였다.

<224> 링커는 다음과 같다: NotIkill-FseI-NotIkill 및

<225> 링커 서열:

<226> GGCCATGGCCGGCCAT (서열번호: 24)

<227> TACCGGCCGGTACCGG (서열번호: 25)

- <228> 제2 링커는 다음의 제한 부위를 갖는다:
- <229> BamHI-KpnI-EcoRV-MfeI-FseI-SfiI-BamHIkill:
- <230> GATCCGGTACCGATATCCAATTGGGCCGGCCGATATAGGCCT (서열번호: 26)
- <231> GCCATGGCTATAGTTAACCCGGCCGGCGGTATATCCGGACTAG (서열번호: 27)
- <232> 링커 1을 도입하는 목적은 NotI 부위중 하나를 제거하고 최종 클로닝 단계를 위한 FseI 부위를 제공하는 것이다. 또한, 이것은 유일한 NotI 부위를 갖는 최종 표적화 벡터를 남겨두며, NotI 부위는 형질전환 이전에 표적화 벡터를 선형화시키는 데 사용되었다. 제2 링커를 사용하여 1.5 kb BamHI/EcoRI 단편, yH1C YAC의 완전한 하류 영역을 회복시키는데 필요한 최종 단편을 클로닝하였다.
- <233> 링커 2는 Bam HI로 부분 절단에 의하여 도입하였다. IntI G4(클로닝된 3.4 kb BamHI 단편 보유)는 BamHI로 부분적으로 절단되고 부분 절단은 13 kb 단편으로서 아가로스 겔상에서 분리하였다. 13 kb 단편은 송아지 장 포스파타제로 처리하고 링커로 연결하였다. 링커의 위치 및 이것의 배향(3.4 BamHI 단편의 3' 단부에서 정확한 BamHI 부위로 들어가는지 여부)은 MfeI 및 NotI(이중 절단)으로 클론을 절단함으로써 결정되었다. MfeI 부위는 링커와 함께 도입되고, NotI 부위는 벡터내에 존재한다. 상대적 단편 크기는 링커의 위치 및 배향의 동정을 가능하게 한다. 링커로 개선된 플라스미드는 현재 Int3 G1 및 Int 3 G4이다.
- <234> 다음 단계는 pIB감마2 플라스미드의 BamHI/EcoRI 이중 절단에 의하여 획득한 1.5 kb 단편인 Int3 G4 플라스미드 내로 클로닝하는 것이다. 1.5 kb 단편을 Int3 G4의 BamHI 부분 절단/MfeI 절단내로 클로닝하였다. 방향성 클로닝이기 때문에, 배향 결정은 이 단계에서 요구되지 않는다. 생성된 플라스미드는 Int4 G4로 명명하였다.
- <235> 다음 단계는 제한 부위 NotIkill-FseI-NotIkill를 갖는 링커를 도입하는 것이다. Int4 G4를 NotI로 절단하고 송아지 장 포스파타제로 처리하여 아가로스 겔에서 분리하고 링커로 연결하였다. 생성된 플라스미드는 Int5 G4로 명명하였다. 또한, 이 단계에서는 링커 배향을 결정할 필요가 없다. 결과적으로 유일한 NotI 부위가 제거되고 하나의 FseI 부위를 추가하였다. FseI 부위의 도입 목적은 5' 상동성 영역에서 1.5 kb 단편에서 pACYC177/인헨서/URA3 플라스미드에 걸치는 단편을 클로닝하는 것을 허용하는 것이다.
- <236> 최종 클로닝 단계는 Int5 G4를 FseI로 부분 절단하고 아가로스 겔에서 13 kb 단편을 분리하여 pACYC177/인헨서/URA3의 유일한 FseI 부위내로 연결하는 것이다. 상기 삽입체의 배향은 NotI/FseI로의 이중 제한 절단에 의하여 결정하였다. 최종 표적화 벡터는 TV G4로 명명하였다.
- <237> 인간 C $\gamma$ 1 암호화 엑손 및 3' 상동성의 영역으로 yH1C YAC을 개선하기 위한 TV G1 표적화 벡터를 제작하기 위하여, 본 발명자는 TV G4의 제작을 위하여 상술한 바와 같은 방법을 사용한다. 본 발명자는 플라스미드 pCG12로부터 3' 상동성 영역 및 C $\gamma$ 1 암호화 엑손을 얻는다.
- <238> **실시예 4**
- <239> **비동족형 스위치를 위한 yH1C YAC의 표적화를 위하여 표적화 벡터 TV G1/2 및 TV G4/2의 제작**
- <240> 다음, 본 발명자는 벡터, TV G1/2를 제작하였다. 이 벡터는 인간 스위치  $\gamma$ 2 영역 DNA 5 kb의 하류에 부착된 인간  $\gamma$ 1 CH 암호화 엑손의 키메라 구조체를 갖는다(도 3). 또한, 상기 벡터는  $\gamma$ 1 CH 암호화 엑손의 3'에 위치한 인간  $\gamma$ 2 막통과 엑손을 함유한다(도 3). 상기 벡터는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(메사추세츠주 베버리)에서 입수한 pACYC177 벡터계이다. 본 발명자는 다음의 방법을 사용하여 우리가 TV G1/2라 명명하는 벡터를 제작하였다:
- <241> 1. 먼저, pIB감마2 5 ug을 제한 효소, HindIII 및 BamHI로 절단하고, 6.5 kb 단편을 아가로스 겔상에서 분리하였다. 벡터, pIB감마2는 2개의 EcoRI 제한 효소 부위에 의하여 인접된  $\gamma$ 2를 보유한 인간 게놈 DNA 22 kb를 함유하며, 이를 미리 사용하여 yH1C를 생성하였다. 6.5 kb 단편은 이후 인비트로젠, 인크.(캘리포니아주 칼스바드)에서 pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터내로 연결하였다. pCR2.1은 BamHI/HindIII로 플라스미드 1 ug을 절단하고 송아지 장 포스파타제로 처리하여 제조하며 아가로스 겔에서 분리하였다.
- <242> 생성된 플라스미드(6.5 kb 단편 + pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터)는 제한 효소 XmnI로 부분 절단한 후 제한 효소 HindIII로 절단하였다. XmnI로의 절단은  $\gamma$ 2 종지 코돈의 상류 75 bp에서 일어난다. 따라서,  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2 키메라 유전자의 4번째 엑손은 2개의 3'  $\gamma$ 2 막 엑손 및  $\gamma$ 2 75 bp를 포함한다.  $\gamma$ 1및  $\gamma$ 2의 암호화 영역은 이러한 75 bp 영역을 통하여 동일하고 영향은 없다.
- <243> 3. 다음은 pCG12 5 ug를 HindIII 및 XmnI 제한 효소로 절단하고 1.7 kb 단편을 아가로스 겔 전기영동에 의하여

분리하였다. 벡터 pCG12는 실시예 1에 설명된 바와 같이, 인간  $\gamma$ 1의 약 7 kb를 함유한다.

- <244> 4. pCG12에서 입수한  $\gamma$ 1의 암호화 서열의 대부분을 포함하는 1.7 kb HindIII/XmnI 단편은 단계 2에서처럼 HindIII/XmnI 부분 절단된 벡터(6.5 kb 단편 + pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터)내로 연결하였다.
- <245> 5. 생성된 플라스미드는 막통과 엑손을 포함한  $\gamma$ 2의 하류 영역에 부착된  $\gamma$ 1의 암호화 영역의 키메라 서열을 포함한다. 본 발명자는 Eco47III로 제한 절단하여 플라스미드의 조성을 증명하였다.
- <246> 6. 실시예 3에서 설명된 바와 같이, 클로닝된 5' 상동성을 갖는 pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터는 SacII 및 BamHI로 절단하였다. 이와 유사하게, 본 발명자는 SacII 및 BamHI(이중 절단)으로 단계 5에 설명된 플라스미드를 절단하고 플라스미드의 약 5 kb 단편을 5' 상동성을 갖는 pCR2.1 벡터내로 클로닝하였다. 이어서 본 발명자는 생성된 벡터를 SacII로 절단하여, 단계 5에 설명된 벡터로부터 입수한 상기 부위 단편내로 클로닝하였다. 본 발명자는 SphI 절단에 의하여 SacII 삽입체의 배향을 결정하였다. 생성된 플라스미드는 pCR2.1 벡터내에서 5' 상동성 영역으로부터 하류에 키메라  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2 C<sub>H</sub> 엑손을 포함한다. 본 발명자는 상기 벡터를 TA G1/2로 명명하며, 이는 TA 클로닝 벡터로 공지된 pCR2.1로부터 유래하고, 키메라  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2 C<sub>H</sub> 엑손을 포함함을 나타낸다.
- <247> 7. 본 발명자는 효모 선별 마커, URA3 유전자를 가지고 단계 6에 설명된 클로닝된 5' 상동성을 갖는 pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터를 다음과 같이 개선시켰다:
- <248> a. 본 발명자는 SalI로 Int 2(실시예 2에 기재)를 절단하여 URA3 유전자를 획득하였다. SalI 절단의 생성물을 클레노우 단편으로 추가 반응시켜 블런트 단부를 생성하였다. 이 생성물을 SacI로 연속적으로 절단한다.
- <249> b. 단계 6에서 생성된 pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터는 BamHI으로 절단하고 이후 클레노우 단편으로 절단하고 추가로 SacI로 절단하였다.
- <250> c. 7(a)에서 획득한 URA3 유전자는 7(b)처럼 제조한 pCR<sup>TM</sup>2.1 벡터내로 연결하였다. 생성된 벡터는 NotI 부위에 의하여 인접된(하나는 Int2내 링커에서 유래하고 다른 하나는 pCR2.1내 본래 존재하는 것) 하류 URA3 유전자를 갖는 5' 상동성 영역을 함유한다.
- <251> 8. 본 발명자는 단계 7에서 생성된 플라스미드로부터 NotI 단편을 절단하고 Int1의 NotI 부위내로 이것을 클로닝하였다(또한 TV1 및 TV4 클로닝에 사용됨). 본 발명자는 EcoRI 절단을 사용하여 NotI 단편의 정확한 배향을 결정하였다. 생성된 플라스미드는 본 발명자가 Int3로 지칭한 것으로서, 저 카피 기원 백그라운드(pACYC177)에서 하류에 이쓴 URA3 유전자를 보유한 5' 상동성 영역을 갖는다.
- <252> 9. G1/2 키메라 YAC를 위한 최종 표적화 벡터의 제작을 마무리하기 위하여, 본 발명자는 pCR2.1 백그라운드(단계 6에서 제조)중 G1/2 키메라 IgG 불변 영역 및 클로닝된 5' 상동성을 보유한 벡터를 EcoRI 제한 효소로 부분적으로 절단한 후, SacI 제한 효소로 다시 절단하였다. 본 발명자는 5' 상동성 및 키메라 G1/2 IgG 불변 영역을 함유하는 8 kb 단편을 분리하고 이것을 Int3의 EcoRI 및 SacI 부위내로 클로닝한다. 이 결과는 TV G1/2 표적화 벡터를 산출하였다. 삽입 배향을 결정할 필요가 없으며, 이는 본 발명자가 방향성 클로닝에 의하여 단편을 도입하였기 때문이다.
- <253> 대안적 방법으로, 단계 7 후 본 발명자는 단계 7에서 설명된 플라스미드에서 5'상동성 및 URA3 유전자를 XbaI로 제거한다. 이후 본 발명자는 5'상동성 및 URA3 유전자를 단계 6에 설명된 플라스미드의 XbaI 부위로 클로닝하여도 7에 제시된 TV G1/2 벡터를 생성한다.
- <254> 본 발명자는 TV G4/2 표적화 벡터를 제작하며, 이는 상술된 방법을 일부 변형하여 인간 스위치  $\gamma$ 2 영역 DNA 및 인간  $\gamma$ 2 CH 암호화 엑손의 5 kb 하류에 부착된 인간  $\gamma$ 4 암호화 엑손(도 4)을 갖는 키메라 구조체를 보유한다.
- <255> 단계 1에서 생성된 플라스미드는 제한 효소 XmnI로 부분 절단시킨 후 제한 효소 HindIII로 절단하였다. XmnI로의 절단은  $\gamma$ 2 종지 코돈의 상류 75 bp에서 일어난다. 따라서,  $\gamma$ 4/ $\gamma$ 2 키메라 유전자의 4번째 엑손은 2개의 3'  $\gamma$ 2 막 엑손과 더불어  $\gamma$ 2의 75 bp를 초기에 함유한다. 상기 영역내  $\gamma$ 4와  $\gamma$ 2 사이에 단일 염기 쌍의 차이가 존재하여 이것은 단일 아미노산 변형을 일으킨다. 이것을 정정하기 위하여, 본 발명자는 클론테크 래보러토리 인크.(캘리포니아주 팔로 알토)의 지정된 돌연변이유발 키트를 사용하여 인간 감마 2 유전자에서 C를 T로 위치 지정된 돌연변이유발법을 수행한다.

- <256> 본 발명자는 2개의 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수신을 수행하였다:  $\gamma$ 2에서  $\gamma$ 4로 서열을 스위치하는 데 필요한 뉴클레오티드를 대체하는 것과 클로닝된 키메라 G4/2 7 kb 단편을 갖는 pCR2.1 벡터내에서 NotI 부위를 제거하기위한 보조적 올리고뉴클레오티드.
- <257> C를 T로 대체하기 위하여 본 발명자는 다음의 올리고뉴클레오티드를 사용한다:
- <258> CCTCTCCCTGTCTCTGGGTAATGAGTGCC
- <259> 볼드체 T 잔기는 최초 플라스미드내 C를 대체한 것이다.
- <260> 제2 올리고뉴클레오티드(NotI 부위를 제거)는 다음과 같다:
- <261> TATCCATCACA CTGGCGACCGCTCGAGCAT
- <262> 상기 올리고는 NotI 부위(볼드체)를 포함하며, 이 부위를 파괴하기 위하여 G를 A로 대체하였다. 본 발명자는 정확한 뉴클레오티드가 대체되었음을 확인하기위하여 플라스미드의 일부를 서열결정한다.
- <263> **실시예 5**
- <264> **표적화 방법**
- <265> 본 발명자는 상술된 벡터, TV1, TV4, TV G1, TV G4, TV G1/2 및 TV G4/2를 선형화시키고, 이들을 사용하여 yH1C YAC를 보유한 효모 세포 배양물을 리튬 아세테이트 형질전환법에 의하여 형질전환시켰다. 본 발명자는 이어서 선형화된 벡터를 사용하여 하기와 같이 yH1C상에서 표적화된 유전자를 대체하여 신규한 YAC들, yH2Bm, yH2Cm, yHG1, yHG4, yHG1/2 및 yHG4/2 각각을 생성하였다(도 1-4). 본 발명자는 URA3 마커의 통합을 선택하기 위하여 형질전환후 SC-URA 배지상에 효모 세포를 평판배양하였다. 본 발명자는 펄스-필드 겔 전기영동을 사용하여 YAC 통합에 대하여 생성된 임의의 클론을 체크하였다. 또한, 본 발명자는 서던 블롯에 의하여 클론을 분석하여 구조 및 통합을 증명하였다.
- <266> yHG1/2의 경우에, 생성된 YAC내 URA3 유전자는 5' 상동성 서열에 인접되었으며, 이를 본 발명자가 다음과 같이 제거하였다.
- <267> 본 발명자는 5개의 FOA로 아가 플레이트상에 yHG1/2 YAC를 함유하는 효모 배양물을 플레이트하였다(URA에 대한 음성 선별). 본 발명자는 상술한 개요에서처럼 서던 블롯 및 펄스 필드 겔에 의하여 통합성에 대하여 생성된 5개의 FOA-내성 클론을 체크하였다.
- <268> 본 발명자는 상술된 방법에 따라 TV G1 벡터 및 TV G4/2 벡터를 사용하여 각각 yHG1 및 yHG4/2 YAC를 생성한다.
- <269> **실시예 6**
- <270> **ES 세포내로 yH2BM YAC의 도입**
- <271> 본 발명자는 하기에 설명된 효모 스페로플라스트(spheroplast) 융합을 통하여 YAC, yH2BM을 마우스 배아 줄기(ES) 세포내로 도입하였다.[참조, B. Birren 등, Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volume 3, Cloning Systems, "Chapter 5: Introduction of YACs into mammalian cells by spheroplast fusion", 548-550, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]. yH2BM 함유 효모 세포는 0.15 mg/ml에서 자이모라제(zymolase) 20T을 사용하여 세포벽을 제거하였다. 상기 yH2BM 스페로플라스트를 HPRT-결핍성 E 14.TG3B1 마우스 ES 세포와 융합하여 다음에 기재된 바와 같이 배양하였다[참조, Tsuda 등, Genomics 42:413-421 (1997)]. HAT 선별은 융합 후 48시간에 시작하였다. HPRT-양성 ES 세포 클론은 1 클론/15-20 $\times$ 10<sup>6</sup> 융합 세포의 빈도로 선별하였다. 21개의 HAT 내성 콜로니는 계능 분석을 위하여 증식되었고 서던 및 CHEF 블롯 분석에 의하여 YAC 통합에 대하여 분석하였다. ES 세포 단독 및 효모 스페로플라스트 단독을 융합한 대조 실험에서는 어떠한 콜로니도 검출되지 않았다. 자세한 방법은 다음과 같다:
- <272> **효모 스페로플라스트 제조**
- <273> 세포벽 제거 과정에서 50% 이하가 결실되기 때문에 효모 세포를 여유있게 제조하였다. 5  $\times$  10<sup>7</sup> ES 세포의 융합을 위하여, 약 5 $\times$ 10<sup>9</sup> 효모 세포가 필요하다.
- <274> 본 발명자는 냉동 저장액으로 선별 배지(SC-)를 집중하여 약 5  $\times$  10<sup>6</sup> 세포/ml의 출발 접종을 제공한다. 본 발명자는 혈구계수기를 사용하여 배양액에서 세포 밀도를 결정하였다. 본 발명자는 밤새 250 rpm에서 교반하면서 23

℃에서 세포를 성장시켰다. 또한 14℃ 또는 18℃에서 항온배양하여 YAC 안정성을 증가시킬 수 있다. 30℃에서 배양은 YAC중 일부 Ig 유전자 단편의 결실을 일으킬 수 있다. 아침에, 배양물 밀도는  $2 \times 10^7$  세포/ml이었다. 본 발명자는 YPDA(풍부) 배지로  $1 \times 10^7$  세포/ml까지 점진적으로 제조하여 2-3 시간동안 항온배양하였다. 이 단계에서 배양물 밀도는  $2 \times 10^7$  세포/ml를 초과하지 않아야 하며, 이는 지속적으로 성장하는 효모가 효율적이고 완전한 세포벽 제거를 위하여 필요하기 때문이다.

<275> 본 발명자는 살균 50 ml 튜브내로 원하는 양( $5 \times 10^9$  세포를 제공하기 위한)의 배양물을 넣고, 실온에서 5-10 분간 1000-2000g(2300-2500 rpm, Jouan GR 4-22 원심분리기)에서 원심분리하여 상청액을 폐기하였다. 다른 방법으로는, 대량 세포를 대량 원뿔형 원심분리 튜브내에서 펠렛화 시킬 수 있다.

<276> 본 발명자는 효모 세포의 각 튜브에 평균  $H_2O$  20 ml를 첨가하고, 볼텍싱(또는 피펫)에 의하여 세포를 재현탁시키고, 상기와 같이 원심분리하여, 상청액을 폐기하였다. 다음에, 본 발명자는 효모 세포의 각 튜브에 1 M 소비톨 20 ml를 첨가하고 볼텍싱(또는 피펫)에 의하여 세포를 재현탁시키고 상기와 같이 원심분리하여 상청액을 폐기하였다. 본 발명자는 새로 첨가된 2-메르캅토에탄올의 1:500 희석액을 함유하는 SPE 완충액(1 M 소비톨, 10 mM 나트륨 포스페이트, 10 mM EDTA)내 세포를 최종 세포 농도  $5 \times 10^8$  세포/ml로 재현탁시켰다.

<277> 본 발명자는 5% (w/v) SDS 90 ul를 갖는 이전 세포 현탁액 10 ul와 1 M 소비톨 90 ul를 갖는 또다른 세포 현탁액 10 ul를 혼합하였다. 본 발명자는 혈구계수기로 각 혼합물의 세포 농도를 결정하였다. 이전 상술된 효모 세포 현탁액을 30℃로 가온하였다. 각 효모 세포 현탁액 1 ml에 대하여 자이몰라제-20T(ICN)의 100 mg/ml 저장액 1.5 ul를 첨가하였다. 본 발명자는 30℃에서 고정시켜 항온처리하고 5분 간격으로 5%(w/v) SDS 90 ul와 세포 현탁액 10 ul를 배합하고 혈구계수기로 세포 농도를 결정하였다. 본 발명자는 SDS 처리의 존재시 남아있는 세포 수의 감소를 모니터링하였다(소비톨의 존재하에서 초기 세포 농도와 비교).

<278> 세포 95%가 SDS에서 용해되는 경우, 5분간 실온에서 200-300 g(1000-1200 rpm, Jouan GR4-22 원심분리기)에서 5분간 표본을 즉시 원심분리하고 상청액을 조심스럽게 제거한다(펠렛은 매우 헐거워야 하며 세포의 일부 유실이 일어날 것임). 세포벽 제거(자이몰라제 첨가 후 단계)를 위한 총 시간은 통상 5 내지 20 분이다.

<279> 본 발명자는 역위 또는 조심스런 피펫팅에 의하여 STC 완충액(0.98M 소르비톨, 10mM 트리스, 10mM  $CaCl_2$ ) 20 ml 중에 스페로플라스트를 부드럽게 재현탁하고, 200-300g(1000-1200 rpm, Jouan GR4-22 원심분리기)에서 표본을 원심분리하여, 상청액을 조심스럽게 제거하였다. 본 발명자는 한번에 이 과정을 반복하였다. 본 발명자는 STC중  $2.5 \times 10^8$  세포/ml에서 스페로플라스트를 재현탁하고 이것을 단계 14에서 사용될때까지 실온에(또는 얼음) 방치하였다.

<280> **ES 세포와의 융합**

<281> 본 발명자는 스페로플라스트 현탁액의 스페로플라스트  $2.5 \times 10^6$  을 함유하는 1 ml를 15-ml 튜브로 이전하고, 실온에서 5분동안 200-300 g(1000-1200 rpm, Jouan GR4-22 원심분리기)에서 1ml 원심분리하였다. 본 발명자는 드론-아웃 유리 피펫을 사용하여 천천히 통기시켜 상청액 모두를 제거하였다. 반수평 위치에서 튜브를 가지고, 본 발명자는 스페로플라스트 펠렛을 제거하지 않으면서 ES 세포( $5 \times 10^6$  세포/ml) 1 ml를 부드럽게 첨가하였다. 스페로플라스트:ES 세포 비는 25:1 내지 50:1로 매우 다양할 수 있다.

<282> 본 발명자는 다음과 같이 미리 ES 세포를 제조하였다: 본 발명자는 100-mm 평판당  $6 \times 10^8$  ES 세포의 출발 밀도 및 표준 ES 배지(DMEM 고도의 글루코스, 100 유닛/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신, L-글루타민 2 mM, 2-메르캅토에탄올 100 um, 쥐 백혈병 저해 인자[ESGRO™] 1000 유닛/ml 및 15% 열-비활성 태아 송아지 혈청)로 마우스 1차 공급자로 피복된 평판에서 ES 배양을 개시하였다. 표준 성장 조건에서 48시간 방치 후, 배양물을 트립신 처리하고 생성된 세포를 사용하여 겔라틴-피복된 평판상에 100-mm 평판당  $10^7$  ES 세포로 배양시켰다. 16 내지 24 시간 동안 계속 성장시켰다. 융합하기 4시간 전에 본 발명자는 새로운 배지로 ES 평판상 배지를 교체하였다. 융합 직전, 본 발명자는 세포를 트립신 처리하고 실온에서 무혈청 ES 배지로 3회 세척하여 무혈청 ES 배지에서  $5 \times 10^6$  세포/ml로 재현탁시켰다.

<283> 본 발명자는 실온에서 3분동안 300 g(1200 rpm Jouan GR4-22 원심분리기)에서 결합 스페로플라스트/ES 세포 표

본을 원심분리하고 드론-아웃 유리 피펫을 사용하여 모든 배지를 조심스럽게 통기시켰다.

<284> 본 발명자는 세포 펠렛을 헐겁게 하기 위하여 튜브를 부드럽게 툭툭 친 후, P1000 팁을 사용하여 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50%(w/v) PEG 1500(pH 8.0; 등, 비링거 만하임 783641) 0.5 ml(37°C로 미리가열됨)를 천천히 첨가하였다. 상기 용액을 첨가하는 동안, 본 발명자는 피펫 팁으로 세포를 부드럽게 혼합하였다. 모든 용액을 첨가한 후, 본 발명자는 세포 현탁액을 피펫으로 한번 천천히 흡입 방출하였다. 본 발명자는 실온에서 90초동안 세포 현탁액을 항온배양하였다. 본 발명자는 튜브 바닥에서 무혈청 ES 배지 5 ml를 피펫팅하여 이를 천천히 첨가하였다. 본 발명자는 실온에서 30분간 세포를 항온배양하고 30분후에 세포 현탁액을 실온에서 3분간 300 g(1200 rpm Jouan GR4-22 원심분리기)에서 3분간 원심분리한 후 드론 아웃 유리 피펫을 사용하여 모든 배지를 조심스럽게 통기시켰다.

<285> 본 발명자는 표준 ES 배지 10 ml중에 세포를 재현탁시켰고 전체 표본(~ 5×10<sup>6</sup> ES 세포)을 100-mm 마우스 일차 공급기-피복된 평판상에 평판배양하였다. 최초 시도로 너무 많은 콜로니가 생성된다면, 각 100-mm 평판상에 평판배양된 표본의 양을 하향 조절할 것이 요구될 것이다.

<286> 본 발명자는 표준 ES 세포 성장 조건하에서 밤새 평판을 항온처리한 후 새로운 ES 배지로 배지를 교체하였다.

<287> 48시간동안 배양후(스페로플라스트 융합 후), 본 발명자는 적절한 선택 조건(즉, YAC상에 존재하는 특이적 포유동물 선별 마커에 의하여 검색됨)하에서 성장을 개시하였다. 본 발명자는 배지를 2일마다 교체하였다. 본 발명자는 표준 방법마다 증식을 위하여 마우스 일차 공급기-피복된 평판상에 ES 콜로니를 찍어서 평판배양하였다. 본 발명자는 통상 10-15일간 ES 콜로니를 관찰한 후 스페로플라스트를 융합시켰다.

<288> 여기서, yH2Bm-함유 효모와 ES 세포 융합에서 유래된 7개의 ES 세포 클론(표 3에서 1 내지 7로 인용)은 전체 삽입체에 걸쳐있는 프로브에 의하여 검출되는 모든 예상되는 EcoRI 및 BamHI yH2 단편을 포함하는 것으로 관찰되었다. 표3에서 제시된 바와 같이, 다음 인간 유전자는 트랜스제닉 마우스 생성 이전에 ES 세포 DNA의 특성 규명의 일부로서 ES 세포 계통에서 검출되었다: 모든 상이한 V<sub>H</sub> 측은 V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4, V<sub>H</sub>5 및 V<sub>H</sub>6; 인간 D<sub>H</sub> 및 J<sub>H</sub>; 인간 C<sub>μ</sub> C<sub>δ</sub> 불변 영역; 마우스 스위치 γ 1(mS γ 1) 및 인간 C γ 1 C<sub>H</sub> 엑손으로 검출되었다.

**표 3**

<289>

h 또는 <sup>1</sup> m 유전자	ES 세포 클론						
	1	2	3	4	5	6	7
V <sub>H</sub> 1	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 2	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 3	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 4	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 5	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 6	+	+	+	+	+	+	+
D <sub>H</sub>	+	+	+	+	+	+	+
J <sub>H</sub>	+	+	+	+	+	+	+
C <sub>μ</sub>	+	+	+	+	+	+	+
C <sub>δ</sub>	+	+	+	+	+	+	+
mS γ 1	+	+	+	+	+	+	+
C γ 1	+	+	+	+	+	+	+

<290> <sup>1</sup>m 은 마우스 유전자 (mS γ 1)를 나타낸다.

<291> 실시예 7

<292> yH2BM YAC를 함유한 ES 세포를 마우스내로 도입

<293> YAC yH2BM DNA를 함유하는 ES 세포로부터 키메라 마우스를 생성하기 위하여, 본 발명자는 포배를 미세주입한 후 교배시켰다. 본 발명자는 실시예 5에 제시된 YAC yH2BM DNA를 함유하는 ES 세포를 분리하고, 키메라 마우스

의 생성을 위해 증식시켰다. 다음에, 본 발명자는 yH2BM-함유 ES 세포 클론을 마우스 C57B1/6 포배내로 미세주입하였다[참조 B. Hogaan 등, "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Section D, Introduction of New Genetic Information, "Injection of Cells into the Blastocyst", 188-196, (1986) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)]. 키메라 자손은 털 색으로 구별하였다.

**표 4**

<294>

클론	주입된 배아 수	살아있는 본 펌스 수	키메라 수	키메라 교배 수	생식계열 수
2BM-1	162	16	15	8	4
2BM-2	144	5	5	3	2
2BM-3	335	20	15	6	0
2BM-4	261	6	4	3	0
2BM-5	344	15	15	7	1
2BM-6	382	27	27	8	6
2BM-7	201	29	27	7	5

<295>

표 4는 7개의 상이한 yH2BM을 함유하는 ES 세포계를 사용하여 트랜스제닉 마우스를 생성에 대한 데이터를 요약하였다. 7개 클론 중 5개를 마우스 생식계열을 통하여 이전하였다.

<296>

**실시예 8**

<297>

**yK2:D1 마우스와 yH2BM YAC DNA를 함유하는 마우스의 교배**

<298>

\*내인성 항체의 부재시 인간 항체를 생산하는 마우스를 생성하기 위하여, 본 발명자는 이중-불활성(DI) 마우스 계통과 yK2-트랜스제닉 마우스를 교배시켰다. DI 마우스 계통은 유전자 표적화-불활성화된 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 좌위에 대한 동종접합성이며, 따라서 항체 생성에 불충분하다[참조 Jakobovits 등, Nature 362:255-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7: 13-21 (1994)]. 본 발명자는 D1 마우스와 yK2-트랜스제닉 마우스 계통 중 하나인 J23.1를 교배하여 동종접합성 불활성 마우스 중쇄 및 카파 쇠 백그라운드(yK2:D1)에서 yK2 YAC에 대한 이중접합성 또는 동종접합성 마우스를 생성하였다. yH2BM YAC에 대하여 반접합성인 신규한 XenoMouse를 생성하기 위한 교배 계획은 하기에 제시된다. XenoMouse 슷컷과 XenoMouse 암컷의 후속 교배는 yH2BM 및/또는 yK2에 대한 반접합성 또는 동종접합성인 XenoMouse 자손을 생산한다. 이러한 자손으로부터 모두 yH2BM 및 yK2에 대하여 동종접합성인 암컷과 슷컷의 교배는 XenoMouse yH2BM의 참 교배주를 생성할 것이다.

<299>

**XenoMouse H2BM 교배 계획**

<300>

1 세대: (YK2:D1으로 교배되는 키메라 또는 트랜스제닉 것)

<301>

$yH2BM^+; yK2^-; mJ_H^{+/+}; mCk^{+/+} \times yH2BM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<302>

2 세대: (XenoMouse 이중접합체 x YK2:D1)

<303>

$yH2BM^+; yK2^-; mJ_H^{+/-}; mCk^{+/-} \times yH2BM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<304>

3세대: (대부분 XenoMouse X yK2:D1 또는 XenoMouse X yK2:D1)

<305>

$yH2BM^+; yK2^+; mJ_H^{+/-}; mCk^{-/-} \times yH2BM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<306>

$yH2BM^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-} \times yH2BM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<307>

XenoMouse:  $yH2BM^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<308>

본 발명자는 서던 블롯 분석에 의하여 XenoMouse H2BM 계통에서 인간 중쇄 및 카파 쇠 YAC의 통합을 확인하였다. 분석되는 모든 XenoMouse H2BM 계통에서, yH2BM은 명백한 결실 또는 재배열 없이 여러 세대를 통하여 변형없이 전이되었다.

<309> 실시예 9

<310> 플로우 사이토메트리 분석

<311> Xenomouse H2BM 트랜스제닉 마우스를 추가로 특성규명하기 위하여, 말초 혈액 및 비장 림프구를 8-10 주령 마우스 및 대조구로부터 분리하였다. 이 세포는 림포라이트 M (Accurate)(San Diego, CA)로 정제하였고, 정제된 항-마우스 CD32/CD16 Fc 수용체(Pharmlingen, 01241D)(San Diego, CA)로 처리하여 Fc 수용체에 대한 비특이적 결합을 차단하였다. 다음에, 이 세포를 다양한 항체로 염색하여 FACStar<sup>PLUS</sup> (Becton Dickinson, CELLQuest software)상에서 분석하였다. Xenomouse H2BM 세포를 염색하는데 사용되는 항체의 패널은 다음을 포함하였다: Cychrome(Cys) 항-B220(Pharmlingen, 01128A); 플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC) 항-인간 IgM(Pharmlingen, 34154X); FITC 항-마우스 IgM(Pharmlingen, 02204D).

<312> 3개의 상이한 Xenomouse H2BM 계통의 4마리 동물에서 유래한 림프구를 평가하고 다음 표 5에서 나타난 바와 같이 플로우 사이토메트리를 사용하여 야생형 B6/129 마우스와 비교하였다.

<313> 계통 XM-2BM-1, XM-2BM-2 및 XM-2BM-6은 야생형 마우스에 비하여 B-세포 구역에서 약 60-80% 재구성을 나타냈다(표 5). yH2BM YAC DNA를 갖는 트랜스제닉 마우스는 상당한 인간 항체 및 면역계 발전을 보여준다.

표 5

<314>

계통	B220 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> 의 %	B 세포 평균 %
XM-2BM-1 #1	34	24
XM-2BM-1 #2	24	
XM-2BM-1 #3	19	
XM-2BM-1 #4	17	
XM-2BM-2 #1	28	28
XM-2BM-2 #2	27	
XM-2BM-2 #3	29	
XM-2BM-2 #4	27	
XM-2BM-6 #1	27	25
XM-2BM-6 #2	28	
XM-2BM-6 #3	22	
XM-2BM-6 #4	23	
WT B6X129 #1	40	39
WT B6X129 #2	38	
WT B6X129 #3	35	
WT B6X129 #4	43	

<315> 실시예 10

<316> 비면역화 마우스내 인간 항체의 혈청 수준

<317> 비면역화 마우스 혈청내 인간 항체의 결정을 위하여 ELISA를 수행하였다. 면역분석을 위한 더욱 자세한 정보 및 방법에 있어서 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, "Immunoassay", 553-614p, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 인간 면역글로블린의 농도는 다음의 포획 항체를 사용하여 결정하였다: 마우스 항-인간 IgM(CGI/ATCC, HB-57)(Manassas, VA). ELISA 실험에 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9050-05)(Birmingham, AL), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05)(Birmingham, AL)이었다. 인간 Ig의 정량화를 위해 사용된 표준은 인간 IgM<sub>h</sub>(Cappel, 13000)(Costa Mesa, CA) 및 인간 IgG1(Calbiochem 400126)(San Diego, CA)이었다.

<318> 표 6에 제시된 바와 같이 Xenomouse H2BM 마우스는 면역화의 부재시 상당한 기본 수준의 인간 IgM 및 인간 IgG

모두를 생성하였다.

표 6

<319>

XenoMouse H2BM내 hIg γ 1 및 hIgM의 정량화			
		Ig γ 1	IgM
		ug/ml	ug/ml
XM-2BM-7	B-781-2	298	140
	H-850-1	172	101
	H-850-2	250	110
XM-2BM-1	H-908-1	1.3	70
	H-908-5	0.35	51
	H-953-8	3.7	81
XM-2BM-2	H-873-2	0.8	38
	H-873-3	1.5	52
	H-873-4	1.7	90
XM-2BM-6	H-910-4	1	68
	H-911-3	0.8	47
	H-912-4	0.3	44

<320>

**실시예 11**

<321>

**면역화 및 하이브리도마 생성**

<322>

8 내지 10 주령 XenoMouse H2BM 6마리의 균을 꼬리의 기저에 피하 또는 기타 투여 경로(복강내, 발바닥 등)로 재조합 인간 IL-8 10 ug 또는 TNF- α 또는 CEM 세포(CD147용) 5 ug로 면역화시켰다. 항원은 1차 면역화를 위하여 완전 프로인트(Freund's) 보충액내에서 에멀션화하고 추가적 면역화를 위하여 불완전 프로인트 보충액내에서 에멀션화한다. 동물 면역화에 대한 상세한 정보 및 방법에 있어서 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 5, "Immunizations", 53-138, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화는 적어도 3회 부스터 면역화를 위하여 3-4 주 간격으로 수행하였다(boosts).

<323>

단클론성 항체를 제조하는 경우, 마우스에 융합이전 4일째 PBS내 항원 또는 세포의 최종 주사를 투여하였다. 단클론성 항체를 제조하는 데 더욱 자세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 6, "Monoclonal Antibodies", 139-244, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화된 마우스로부터 림프절 림프구는 비-분비성 골수종 NSO 세포계[S. Ray, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5548-5551 (1994)] 또는 P3-X63-Ag8.653 골수종으로 융합하고, 이전에 설명된 바와 같이 HAT 선별을 수행한다[G. Galfre, 등, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)].

<324>

표 7은 상기 실시예 6-8에 따라 제조되고 재조합 인간 IL-8, TNF- α 또는 CEM 세포(CD147용) 5 ug로 면역화된 트랜스제닉 마우스가 인간 IgG1 단클론성 항체를 생성하였음을 보여주었다.

<325>

**실시예 12**

<326>

**항체 특이성 및 이소타입의 평가**

<327>

본 발명자는 트랜스제닉 마우스가 항원-특이성 항체를 생성하는지 결정하기 위하여 ELISA를 수행하였다(표 7). 본 발명자는 마우스 혈청 및 하이브리도마 상층액에서 분리된 항체의 항원 특이성 및 이소타입을 항원-특이성 항체를 포획하기 위한 재조합 인간 IL-8, CD147 및 TNF- α 을 사용하여 결정하였다[참조, Coligen 등, Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in Current Protocol, Immunology (1994)]. 본 발명자는 다음 포획 항체를 사용하여 인간 면역글로블린의 농도를 결정하였다: 토끼 항-인간 IgG(서던 바이오테크놀로지,

6145-01). ELISA 실험에서 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(칼타그, MH1015)(Burlingame, CA), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05) 및 염소 항-인간 카파-바이오틴(백터 BA-3060)이었다. 인간 및 마우스 Ig의 정량화를 위하여 사용된 표준은 인간 IgG<sub>1</sub>(Calbiochem, 400122), 마우스 IgM $\kappa$ (Cappel, 13000), 인간 IgG<sub>2</sub> $\kappa$ (Calbiochem, 400122), 마우스 IgG $\kappa$ (Cappel 55939), 마우스 IgM $\kappa$ (Sigma, M-3795), 및 마우스 IgG<sub>1</sub> $\lambda$ (시그마, M-9019)이다.

<328> 표 7은 상기 실시예 6-8에 따라서 생성되고 재조합 인간 IL-8, TNF- $\alpha$  또는 CEM 세포(CD147용) 5ug으로 면역화된 트랜스제닉 마우스가 예측되는 이소타입 및 항원 특이성을 갖는 인간 IgG1 단클론성 항체를 생성함을 보여준다.

표 7

<329>

융합	동물 수	XM 마우스 yH2BM 마우스 =G1	세포 $\times 10^6$ 수	하이브리도마 수			
				IgG2	IgG4	IgG1	IgM
	IL-8						
(CEM21)CD147	10	G1-1	325			1	1
(CEM22)CD147	14	G1-1	198				15
IL8-16	10	G1-5	243			20	5
IL8-17	12	G1-6	268			31	5
IL8-18	10	G1-1	213			10	
IL8-19	10	G1-2	136			4	
	TNF-a						
TNF-38	10	G1-1/2	179 ing.			1	3
			116 popl.			2	6
TNF-39	10	G1-6	180			4	6

<330> 실시예 13

<331> yH2CM YAC의 ES 세포내로 도입

<332> 본 발명자는 실시예 6에 상세하게 설명된 바와 같이 효모 스페로플라스트 융합에 의하여 YAC, yH2CM을 마우스 배아 줄기(ES) 세포로 도입하였다[참조, B. Birren 등, Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volume 3, Cloning Systems, Chapter 5: "Introduction of YACs into mammalian cells by spheroplast fusion," 548-550, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]. 일반적으로, yH2CM 함유 효모 세포는 1.5 mg/ml 에서 자이몰라제 20T를 사용하여 세포벽을 제거하였다. yH2CM 스페로플라스트를 문헌[참조, Jakobovist 등, Nature 362:225-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994); E. Robertson in Teratocarcinoms and Embryonic Stem Cells, 71-112, TRL, Oxford (1987)]과 같이 배양된 HPRT-결핍 E 14.TG3B1 마우스 ES 세포와 융합하였다. HAT 선택은 융합후 48 시간에 개시하였다. HPRT-양성 ES 세포 클론은 1 클론/15-20 $\times 10^6$  융합된 세포의 빈도로 선택하였다. HAT 내성 콜로니는 게놈 분석을 위하여 증식되고 서던 및 CHEF 블롯 분석을 사용하여 YAC 통합에 대하여 분석하였다. ES 세포와 효모 스페로플라스트의 융합 모형을 사용한 대조구 시험에서 어떠한 콜로니도 검색되지 않았다.

<333> yH2CM-함유 효모와 ES 세포 융합에서 유래된 10개의 ES 세포 클론(표 8에서 클론 1-10으로 표시)은 전체 삽입체에 걸치는 프로브에 의하여 검색되는 모든 예측되는 EcoRI 및 BamHI yH2 단편을 포함한다. 표 8에서 제시된 바와 같이, 본 발명자는 트랜스제닉 마우스 세대 이전에 ES 세포 DNA의 특성규명의 일부로서 ES 세포 게놈내 다음의 인간 유전자를 검색하였다: 모든 상이한 V<sub>H</sub> 족은 V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4, V<sub>H</sub>5 및 V<sub>H</sub>6; 인간 D<sub>H</sub>, 및 J<sub>H</sub>; 인간 C<sub>H</sub> 및 C<sub>H</sub> 불변 영역; 마우스 스위치  $\gamma$  1(mS  $\gamma$  1) 및 인간 C $\gamma$  4 C<sub>H</sub> 엑손이 검색될 수 있다.

표 8

<334>

h또는 유전자	ES 세포 클론									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1-
V <sub>H</sub> 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V <sub>H</sub> 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D <sub>H</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J <sub>H</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C <sub>μ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C <sub>δ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mS <sub>γ</sub> 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C <sub>γ</sub> 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<335>

<sup>1</sup><sub>m</sub> - 마우스 유전자(mS<sub>γ</sub> 1)를 나타냄

<336>

실시예 14

<337>

yH2CM YAC 함유 ES 세포를 마우스내로 도입

<338>

YAC yH2CM DNA를 함유한 ES 세포로부터 키메라 마우스를 생성하기 위하여, 포배를 미세주입한 후 교배하였다. YAC yH2CM DNA를 함유한 ES 세포는 실시예 6에서 설명한 바와 같이 분리하고 키메라 마우스의 생성을 위하여 증식시켰다. 다음에, yH2CM-보유 ES 세포 클론은 마우스 C57B1/6 포배내로 미세주입하였다[참조, B. Hogan 등, "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Section D, Introduction of New Genetic Information, "Injection of Cells into the Blastocyst", 188-196, (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]. 키메라 자손을 털 색으로 확인하였다.

표 9

<339>

클론	주입된 배아 수	살아있는 새끼 수	키메라 수	키메라 교배 수	생식계열 수
2CM-1	381	26	24	8	4
2CM-2	399	26	14	10	5
2CM-3	224	21	10	5	0
2CM-4	217	21	14	4	0
2CM-5	276	19	15	9	0
2CM-6	296	18	12	2	0
2CM-7	269	22	16	6	0
2CM-8	133	12	12	9	0
2CM-9	177	5	3	1	0

<340>

표 9는 9개의 상이한 yH2CM 함유 ES 세포계를 사용하여 트랜스제닉 마우스를 생성에 대한 데이터를 요약하였다. 9개 클론 중 2개는 마우스 생식계열을 통하여 이전되었다.

<341>

실시예 15

<342>

yK2:D1 마우스와 yH2CM YAC DNA를 함유하는 마우스의 교배

<343>

내인성 항체의 부재시 인간 항체를 생성하는 마우스를 생성하기 위하여, yK2-트랜스제닉 마우스를 이중-불활성

(DI) 마우스 계통과 미리 교배시켰다. DI 마우스 계통은 표적화 불활성화된 마우스 중쇄 및 카파 쇠 좌위 유전자에 대한 동종접합성이므로, 항체 생성에 불충분하였다[참조, Jakobovits 등, Nature 362:255-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994)]. yK2-트랜스제닉 마우스 계통중의 하나인 J23.1은 DI 마우스와 교배하여 동종접합성 불활성화된 마우스 중쇄 카파 쇠 백그라운드(yK2:DI)상에서 yK2 YACs에 대하여 반접합성 또는 동종접합성 마우스를 생성하였다. yH2CM YAC에 대한 반접합성인 신규한 XenoMouse를 생성하기 위한 교배 계획은 다음과 같다. XenoMouse 숫컷과 XenoMouse 암컷의 후속 교배는 yH2CM 및/또는 yK2에 대한 반접합성 또는 동종접합성인 XenoMouse 자손을 생산한다. 이들 자손으로부터 yH2CM 및 yK2 모두에 대하여 동종접합성인 암컷과 숫컷의 교배는 XenoMouse H2CM의 참 교배주를 생산할 것이다.

**<344> XenoMouse H2CM 교배 계획**

**<345> 1세대: (YK2:DI으로 교배되는 키메라 또는 트랜스제닉 것)**

**<346>  $yH2CM^+; yK2^-; mJ_H^{+/+}; mCk^{+/+}$  X  $yH2CM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$**

**<347> 2 세대: (제노이종접합체 x YK2:DI)**

**<348>  $yH2BM^+; yK2^+; mJ_H^{+/-}; mCk^{+/-}$  X  $yH2CM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$**

**<349> 3 세대: (대부분 XenoMouse ×yK2:DI 또는 XenoMouse ×yK2:DI)**

**<350>  $yH2CM^+; yK2^+; mJ_H^{+/-}; mCk^{-/-}$  X  $yH2CM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$**

**<351>  $yH2CM^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$  X  $yH2CM^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$**

**<352> XenoMouse:  $yH2CM^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$**

**<353> XenoMouse H2CM 계통에서 인간 중쇄 및 카파 쇠 YAC의 통합은 서던 블롯 분석에 의하여 확인되었다. 분석된 모든 XenoMouse H2CM 계통에서, yH2CM은 명백한 결실 또는 재배열없이 여러 세대를 통하여 변형없이 이전되었다.**

**<354> 실시예 16**

**<355> 플로우 사이토메트리 분석**

**<356> XenoMouse H2CM 트랜스제닉 마우스를 추가로 특성규명하기 위하여, 말초 혈액 및 비장 림프구를 8-10 주령 마우스 및 대조구로부터 분리하였다. 이 세포는 림포라이트 M (Accurate)(San Diego, CA)상에서 정제하였고, 정제된 항-마우스 CD32/CD16 Fc 수용체(Pharmingen, 01241D)(San Diego, CA)로 처리하여 Fc 수용체에 대한 비특이적 결합을 차단하였다. 다음에, 이 세포를 다양한 항체로 염색하여 FACStar<sup>PLUS</sup> (Becton Dickinson, CELLQuest software)상에서 분석하였다. XenoMouse H2CM 세포를 염색하는데 사용되는 항체의 패널은 다음을 포함한다: Cychrome(Cys) 항-B220(Pharmingen, 01128A); 플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC) 항-인간 IgM(Pharmingen, 34154X); FITC 항-마우스 IgM(Pharmingen, 02204D).**

**<357> 2개의 상이한 XenoMouse H2CM 계통의 2마리 동물에서 유래한 림프구를 평가하고 다음 표 10에 나타난 바와 같이 플로우 사이토메트리를 사용하여 야생형 B6/129 마우스와 비교하였다.**

**<358> 계통 XM2Cm-2 동종접합체는 B-세포 구역에서 약 80-100% 재구성을 나타냈다(표 10). yH2CM YAC DNA를 보유한 트랜스제닉 마우스는 상당한 인간 항체 및 면역계 발전을 나타낸다. 대조구 129×B6, DI, XenoMouse 2a 이중접합성 및 동종접합성은 yH2CM YAC에 대한 마우스 동종접합성 및 이중접합성과 비교하였다.**

**표 10**

**<359>**

ID	% B220 <sup>+</sup> <sub>μ</sub> <sup>+</sup>
129×B6	22.2
129×B6	24.8
129×B6	24.5
DI	0.6

XM2A-5 이중접합체	29.2
XM2A-5 이중접합체	23.7
XM2A-5 동종접합체	23.4
XM2A-5 동종접합체	25.5
XM2Cm-2 이중접합체	19.3
XM2Cm-2 이중접합체	19.2
XM2Cm-2 동종접합체	29.8
XM2Cm-2 동종접합체	23.6
평균 129×B6	23.8±1.4
DI	0.6
평균 XM2A-5 이중접합체	26.5±3.9
평균 XM2A-5 동종접합체	24.5±1.5
평균 XM2Cm-2 이중접합체	19.3±0.1
평균 XM2Cm-2 동종접합체	26.7±4.4

<360> 실시예 17

<361> 비면역화된 마우스내에서 인간 항체의 혈청 수준

<362> 비면역화된 마우스 혈청내 인간 항체의 측정을 위하여 ELIS A를 수행하였다. 면역분석시 더욱 상세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, "Immunoassay", 553-614, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 인간 면역글로블린의 농도는 다음의 포획 항체를 사용하여 결정하였다: 마우스 항-인간 IgM(CGI/ATCC, HB-57)(Manassas, VA). ELISA 실험에 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG<sub>1</sub>-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9050-05)(Birmingham, AL), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05)(Birmingham, AL)이었다. 인간 Ig의 정량화를 위해 사용된 표준은 인간 IgM<sub>k</sub>(Cappel, 13000)(Costa Mesa, CA) 및 인간 IgG1(Calbiochem 400126)(San Diego, CA)이었다.

<363> 표 11a와 11b에 제시된 바와 같이 줄 15-30, XenoMouse H2CM는 면역화의 부재시 상당한 기본 수준의 인간 IgM 및 인간 IgG 모두를 생성하였다.

표 11a

<364>

마우스 ID	hIgM(ug/ml)	hIgG2(ug/ml)	hIgG4(ug/ml)
1 129×B6			
2 129×B6			
3 129×B6			
4 DI			
5 DI			
6 DI			
7 XM2A-5	89.5	37.6	
8 XM2A-5	97.1	37.6	
9 XM2A-5	98.0	409.7	
10 XM2A-5	85.1	18.2	
11 XM2A-5	72.0	423.1	
12 XM2A-5	74.3	273.3	
13 XM2A-5	98.6	16.8	
14 XM2A-5	126.8	28.8	
XenoMouse H2CM			
15 XM2Cm-1	109.4		33.2
16 XM2Cm-1	83.6		187.1
17 XM2Cm-1	84.9		665.3
18 XM2Cm-1	88.7		61.3

표 11b

<365>

마우스 ID	hIgM(ug/ml)	hIgG(ug/ml)	hIgG4(ug/ml)
19 XM2Cm-1	93.1		177.2
20 XM2Cm-1	79.4		36.9
21 XM2Cm-1	80.4		91.2
22 XM2Cm-1	76.9		238.6
23 XM2Cm-2	35.2		20.9
24 XM2Cm-2	35.4		88.8
25 XM2Cm-2	28.0		42.5
26 XM2Cm-2	25.0		20.6
27 XM2Cm-2	66.8		23.0
28 XM2Cm-2	28.1		14.8
29 XM2Cm-2	27.3		30.1
30 XM2Cm-2	32.6		69.3
129×B6	N.D.	N.D.	N.D.
DI	N.D.	N.D.	N.D.
XM2A-5	97.7 ± 17.2	155.6 ± 182.1	N.D.
XM2Cm-1	87.1 ± 10.4	N.D.	186.4 ± 208.0
XM2Cm-2	34.8 ± 13.5	N.D.	38.8 ± 26.7

<366> 실시예 18

<367> 면역화 및 하이브리도마 생성

<368> 8 내지 10 주령 XenoMouse H2CM 6마리의 균을 꼬리 기저에 피하로 재조합 인간 IL-6 또는 IL-8 10 ug로 면역화 시켰다. 항원은 1차 면역화를 위하여 완전 프로인트 보충액내에서 에멀션화하고 추가적 면역화를 위하여 불완전 프로인트 보충액내에서 에멀션화한다. 동물 면역화에 대한 상세한 정보 및 방법에 있어서 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 5, "Immunizations", 53-138, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화는 적어도 3회 부스터 면역화를 위하여 3-4 주 간격으로 수행하였다(boosts).

<369> 단클론성 항체를 제조하는 경우, 마우스는 용합 4일전에 PBS내 항원 또는 세포의 최종 주사를 주입하였다. 단클론성 항체를 제조하는 데 더욱 자세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 6, "Monoclonal Antibodies", 139-244, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화된 마우스로부터 림프절 림프구는 비-분비성 골수종 NSO 세포계[S. Ray, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5548-5551 (1994)] 또는 P3-X63-Ag8.653 골수종 세포와 융합하고, 이전에 설명된 바와 같이 HAT 선별을 수행한다[G. Galfre, 등, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)].

<370> 표 12는 상기 실시예 14-16에 따라 제조되고 재조합 인간 IL-6 또는 IL-8로 면역화된 트랜스제닉 마우스를 인간 IgG4 단클론성 항체를 생성하였다.

<371> 실시예 19

<372> 항체 특이성 및 이소타입의 평가

<373> 본 발명자는 트랜스제닉 마우스가 항원-특이성 항체를 생성하는지 측정하기 위한 ELISA를 수행하였다(표 12). 또한 본 발명자는 생성된 인간 항체 이소타입을 측정하였다(표 12). 항원-특이성 항체를 포획하기 위한 재조합 인간 IL-6 또는 IL-8을 사용하여 마우스 혈청 및 하이브리도마 상청액에서 분리된 항체상에서 항원 특이성 및 이소타입을 측정하였다[참조, Coligan 등, Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in Current Protocol, Immunology (1994)]. 다음 포획 항체를 사용하여 인간 및 마우스의 면역글로블린의 농도를 결정하였다: 토끼 항-인간 IgG(서던 바이오테크놀로지, 6145-01). ELISA 실험에서 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(칼타그, MH1015)(Burlingame, CA), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05) 및 염소 항-인간 카파-바이오틴(백터, BA-3060)이었다. 인간 및 마우스 Ig의 정량화를 위하여 사용된 표준은 인간 IgG<sub>1</sub>(Calbiochem, 400122), 인간 IgM $\kappa$ (Cappel, 13000), 인간 IgG<sub>2</sub> $\kappa$ (Calbiochem, 400122), 마우스 IgG $\kappa$

(Cappel 55939), 마우스 IgMκ (Sigma, M-3795), 및 마우스 IgG<sub>4</sub>λ (시그마, M-9019)이다.

<374> 표 12는 상기 실시예 14-16에 따라서 생성되고 재조합 인간 IL-6 또는 IL-8 으로 면역화된 트랜스제닉 마우스가 예측되는 이소타입 및 항원 특이성을 갖는 인간 IgG4 단클론성 항체를 생성함을 보여준다.

**표 12**

융합	동물 수	XM 마우스 yH2CM 마우스=G4	세포 × 10 <sup>6</sup> 수	하이브리도마 수			
				IgG2	IgG4	IgG1	IgM
	IL-6						
IL6-1	12	G4-2	132		13		
	IL-8						
IL8-13	10	G4 1-2	66		27		
IL8-14	10	G4 1-2	41		7		
IL8-15		G4 1-2	41		14		

<376> 실시예 20

<377> yHG1/2 YAC의 ES 세포내로 도입

<378> 본 발명자는 실시예 6에 설명된 바와 같이 효모 스페로플라스트 융합에 의하여 YAC, yHG1/2을 마우스 배아 줄기 (ES) 세포로 도입하였다[참조, B. Birren 등, Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volume 3, Cloning Systems, Chapter 5: "Introduction of YACs into mammalian cells by spheroplast fusion," 548-550, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]. 일반적으로, yHG1/2 함유 효모 세포는 0.15 mg/ml에서 자이몰라제 20T를 사용하여 세포벽을 제거하였다. yHG1/2 스페로플라스트를 배양된 HPRT-결핍 E 14.TG3B1 마우스 ES 세포와 융합하였다[참조, Jakobovist 등, Nature 362:225-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994); E. Robertson in Teratocarcinoms and Embryonic Stem Cells, 71-112, IRL, Oxford (1987)]. HAT 선별은 융합후 48 시간에 개시하였다. HPRT-양성 ES 세포 클론을 선택하였다. HAT 내성 콜로니는 계놈 분석을 위하여 증식되고 서던 및 CHEF 블롯 분석을 사용하여 YAC 통합에 대하여 분석하였다. 대조구 실험은 ES 세포 단독과 효모 스페로플라스트 단독의 융합 "모형"이었다.

<379> 본 발명자는 전체 삽입체에 걸치는 프로브로 서던 블롯을 사용하여 yHG1/2-함유 효모와 ES 세포 융합에서 유래된 4개의 ES 세포 클론을 실험하여, 이 클론이 모든 예측되는 EcoRI, HindIII 및 BamHI yH2 단편을 포함하는지 측정하였다. 본 발명자는 4개의 모든 ES 세포 클론이 고유의 YAC를 함유하고 있음을 발견하였다. 본 발명자는 트랜스제닉 마우스 세대 이전에 ES 세포 DNA의 특성규정의 일부로서 ES 세포 계놈내 다음의 인간 유전자를 검색하였다: 모든 상이한 V<sub>H</sub> 족(V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4, V<sub>H</sub>5 및 V<sub>H</sub>6); 인간 D<sub>H</sub>, 및 J<sub>H</sub>; 인간 C<sub>μ</sub> 및 C<sub>δ</sub> 불변 영역; 인간 스위치 γ2(hSγ2) 및 인간 Cγ1 C<sub>H</sub> 엑손이 검색될 수 있다(도 8 및 표 13 참조).

**표 13**

ES 클론	D	μ	Cγ	Cδ	Sg	3'e	J	V 2	V 3	V 4	V 5	V 6
1번 Z 72.12.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2번 Z 72.7.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3번 Z 72.8.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4번 Z 70.17.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<381> yH3B YAC와 융합 후 ES 클론의 서던 블롯 분석

<382> 실시예 21

<383> yHG1/2 YAC 함유 ES 세포의 마우스내로 도입

<384> YAC yHG1/2 DNA를 함유한 ES 세포로부터 키메라 마우스를 생성하기 위하여, 본 발명자는 포배를 미세주입한 후 교배하였다. YAC yHG1/2 DNA를 함유한 ES 세포는 실시예 6에서 설명한 바와 같이 분리하고 키메라 마우스의 생성을 위하여 증식시켰다. 다음에, 본 발명자는 yHG1/2-보유 ES 세포 클론을 마우스 C57B1/6 포배내로 미세주입하였다[참조, B. Hogan 등, "Manipulating the Mouse Embryl: A Laboratory Manual", Section D, Introduction of New Genetic Information, "Injection of Cells into the Blastocyst", 188-196, (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]. .

<385> 실시예 22

<386> yK2:D1 마우스와 yHG1/2 YAC DNA를 함유하는 마우스의 교배

<387> 내인성 항체의 부재시 인간 항체를 생산하는 마우스를 생성하기 위하여, yK2-트랜스제닉 마우스를 이중-불활성(DI) 마우스 계통과 미리 교배하였다. DI 마우스 계통은 표적화-불활성화된 마우스 중쇄 및 카파 쇠 좌위 유전자에 대하여 동종접합성이므로, 항체 생성에 불충분하다[참조, Jakobovits 등, Nature 362:255-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994)]. yK2-트랜스제닉 마우스 계통중의 하나인 J23.1은 D1 마우스와 교배하여 동종접합성 불활성 마우스 중쇄 및 카파 쇠 백그라운드(yK2:DI)상에서 yK2 YACs에 대하여 반접합성 또는 동종접합성 마우스를 생성하였다. yHG1/2 YAC에 대한 반접합성인 신규한 XenoMouse를 생성하기 위한 교배 계획은 다음과 같다. XenoMouse 숫컷과 XenoMouse 암컷의 후속 교배는 yHG1/2 및/또는 yK2에 대한 반접합성 또는 동종접합성인 XenoMouse 자손을 생산한다. 이들 자손으로부터 yHG1/2 및 yK2 모두에 대하여 모두 동종접합성인 암컷과 숫컷의 교배는 XenoMouse HG1/2의 참 교배주를 생산할 것이다.

<388> XenoMouse yHG1/2 교배 계획

<389> 1세대: (YK2:D1으로 교배되는 키메라 또는 트랜스제닉 것)

<390>  $yHG1/2; yK2^-; mJ_H^{+/+}; mCk^{+/+} \times yHG1/2^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<391> 2 세대: (XenoMouse 이중접합체 x YK2:D1)

<392>  $yHG1/2^+; yK2^+; mJ_H^{+/-}; mCk^{+/-} \times yHG1/2^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<393> 3 세대: (대부분 XenoMouse  $\times$  yK2:D1 또는 XenoMouse  $\times$  yK2:DI)

<394>  $yHG1/2^+; yK2^+; mJ_H^{+/-}; mCk^{-/-} \times yHG1/2^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<395>  $yHG1/2^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-} \times yHG1/2^-; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<396> XenoMouse:  $yHG1/2^+; yK2^+; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<397> XenoMouse H2CM 계통에서 인간 중쇄 및 카파 쇠 YAC의 통합은 서던 블롯 분석에 의하여 확인되었다. 분석된 모든 XenoMouse HG1/2M 계통에서, yHG1/2은 명백한 결실 또는 재배열없이 여러 세대를 통하여 변형없이 이전되었다.

<398> 실시예 23

<399> 플로우 사이토메트리 분석

<400> XenoMouse HG1/2 트랜스제닉 마우스를 추가로 특성규명하기 위하여, 말초 혈액 및 비장 림프구를 8-10 주령 마우스 및 대조구로부터 분리하였다. 이 세포는 림포라이트 M (Accurate)(San Diego, CA)상에서 정제하였고, 정제된 항-마우스 CD32/CD16 Fc 수용체(Pharmingen, 01241D)(San Diego, CA)로 처리하여 Fc 수용체에 대한 비특이적 결합을 차단하였다. 다음에, 이 세포를 다양한 항체로 염색하여 FACStar<sup>PLUS</sup> (Becton Dickinson, CELLQuest software)상에서 분석하였다. XenoMouse HG1/2M 세포를 염색하는데 사용되는 항체의 패널은 다음을 포함한다:

Cychrome(Cys) 항-B220(Pharmingen, 01128A); 플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC) 항-인간 IgM(Pharmingen, 34154X); FITC 항-마우스 IgM(Pharmingen, 02204D).

<401> 상이한 Xenomouse H2G1/2M 계통의 4마리 동물에서 유래한 림프구를 평가하고 플로우 사이토메트리를 사용하여 야생형 B6/129 마우스와 비교하였다.

<402> yHG1/2 YAC DNA를 갖는 트랜스제닉 마우스는 상당한 인간 항체 및 면역계 발전을 나타낼 것이다. 대조군 129×B6, DI, Xenomouse 2a 이중접합성 및 동종접합성은 yHG1/2 YAC에 대한 마우스 동종접합성 및 이중접합성과 비교한다.

<403> **실시예 24**

<404> **비면역화된 마우스내에서 인간 항체의 혈청 수준**

<405> 비면역화된 마우스 혈청내 인간 항체의 측정을 위하여 ELISA를 수행하였다. 면역분석을 위한 더욱 자세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, "Immunoassay", 553-614, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 인간 면역글로블린의 농도는 다음의 포획 항체를 사용하여 결정하였다: 마우스 항-인간 IgM(CGI/ATCC, HB-57)(Manassas, VA). ELISA 실험에 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9050-05)(Birmingham, AL), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05)(Birmingham, AL)이었다. 인간 Ig의 정량화를 위해 사용된 표준은 인간 IgM<sub>κ</sub>(Cappel, 13000)(Costa Mesa, CA) 및 인간 IgG1(Calbiochem 400126)(San Diego, CA)이었다.

<406> **실시예 25**

<407> **면역화 및 하이브리도마 생성**

<408> 8 내지 10주령 Xenomouse yHG1/2 6마리의 군을 꼬리 기저에 선택 항원 10 ug로 면역화시켰다. 항원은 1차 면역화를 위하여 완전 프로인트 보충액내에서 에멀션화하고 추가적 면역화를 위하여 불완전 프로인트 보충액내에서 에멀션화한다. 동물 면역화에 대한 상세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 5, "Immunizations", 53-138, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화는 적어도 3회 부스터 면역화를 위하여 3-4 주 간격으로 수행하였다(boostes).

<409> 단클론성 항체를 제조하는 경우, 마우스는 융합 4일전에 PBS내 항원 또는 세포의 최종 주사를 투여하였다. 단클론성 항체를 제조하는데 더욱 자세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 6, "Monoclonal Antibodies", 139-244, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화된 마우스로부터 림프절 림프구는 비-분비성 골수종 NSO 세포계[S. Ray, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5548-5551 (1994)] 또는 P3-X63-Ag8.653 골수종 세포와 융합하고, 이전에 설명된 바와 같이 HAT 선별을 수행한다[G. Galfre, 등, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)].

<410> **실시예 26**

<411> **항체 특이성 및 이소타입의 평가**

<412> 본 발명자는 트랜스제닉 마우스가 항원-특이성 항체를 생성하는지 측정하기 위한 ELISA를 수행하였다. 또한 본 발명자는 항원-특이성 항체를 포획하기 위한 항원을 사용하여 마우스 혈청 및 하이브리도마 상청액에서 분리된 항체상에서 항원 특이성 및 이소타입을 결정하였다[참조, Coligan 등, Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in Current Protocol, Immunology (1994)]. 다음의 포획 항체를 사용하여 인간 및 마우스의 면역글로블린의 농도를 결정하였다: 토끼 항-인간 IgG(서던 바이오테크놀로지, 6145-01). ELISA 실험에서 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(칼타그, MH1015)(Burlingame, CA), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05) 및 염소 항-인간 카파-바이오텐(벡터, BA-3060)이었다. 인간 및 마우스 Ig의 정량화를 위하여 사용된 표준은 인간 IgG<sub>1</sub>(Calbiochem, 400122), 인간 IgM<sub>κ</sub>(Cappel, 13000), 인간 IgG<sub>2</sub>κ(Calbiochem, 400122), 마우스 IgGκ(Cappel 55939), 마우스 IgMκ(Sigma, M-3795), 및 마우스 IgG<sub>4</sub>λ(시그마, M-9019)이다.

<413> 상기 실시예 20-22에 따라서 생성되고 항원으로 면역화된 트랜스제닉 마우스가 예측되는 이소타입 및 항원 특이성을 갖는 인간 IgG<sub>1</sub> 단클론성 항체를 생성함을 보여준다.

<414> **실시예 27**

<415> **yHG4 YAC의 ES 세포내로 도입**

<416> 본 발명자는 실시예 6에 설명된 바와 같이 효모 스페로플라스트 융합에 의하여 YAC, yHG4을 마우스 배아 줄기 (ES) 세포내로 도입하였다[참조, B. Birren 등, Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volume 3, Cloning Systems, Chapter 5: "Introduction of YACs into mammalian cells by spheroplast fusion," 548-550, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]. 일반적으로, yHG4 함유 효모 세포는 1.5 mg/ml에서 자이클라제 20T를 사용하여 세포벽을 제거하였다. yHG4 스페로플라스트를 배양된 HPRT-결핍 E 14.TG3B1 마우스 ES 세포와 융합하였다[참조, Jakobovist 등, Nature 362:225-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994); E. Robertson in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, 71-112, TRL, Oxford (1987)]. HAT 선별은 융합후 48 시간에 개시하였다. HPRT-양성 ES 세포 클론을 선택하였다. HAT 내성 콜로니는 계능 분석을 위하여 증식되고 서던 및 CHER 블롯 분석에 의하여 YAC 통합에 대하여 분석하였다. 대조구 실험은 ES 세포 단독과 효모 스페로플라스트 단독의 융합 "모형"이었다.

<417> 본 발명자는 전체 삽입체에 걸치는 프로브를 사용하여 yHG4-함유 효모와 ES 세포 융합에서 유래된 8개의 ES 세포 클론을 실험하여, 이 클론이 모든 예측되는 EcoRI 및 BamHI yH2 단편을 포함하는지 측정하였다. 본 발명자는 yHG4 YAC가 8개 모두의 클론에서 고유함을 발견하였다. 본 발명자는 트랜스제닉 마우스 세대 이전에 ES 세포 DNA의 특성규명의 일부로서 ES 세포 계능내 다음의 인간 유전자를 검색하였다: 모든 상이한 V<sub>H</sub> 족(V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4, V<sub>H</sub>5 및 V<sub>H</sub>6); 인간 D<sub>H</sub>, 및 J<sub>H</sub>; 인간 C<sub>μ</sub> 및 C<sub>δ</sub> 불변 영역; 인간 스위치  $\gamma$  2(hS  $\gamma$  2) 및 인간 C $\gamma$  4 C<sub>H</sub> 엑손이 검색될 수 있다.

<418> **실시예 28**

<419> **yHG4 YAC 함유 ES 세포의 마우스내로 도입**

<420> YAC yHG4 DNA를 함유한 ES 세포로부터 키메라 마우스를 생성하기 위하여, 본 발명자는 포배 미세주입 후 교배시켰다. 본 발명자는 YAC yHG4 DNA를 함유한 ES 세포를 실시예 6에서 설명한 바와 같이 분리하고, 이를 증식시켜 키메라 마우스를 생성하였다. 다음에, 본 발명자는 yHG4-보유 ES 세포 클론을 마우스 C57B1/6 포배내로 미세주입하였다[참조, B. Hogan 등, "Manipulating the Mouse Embryl: A Laboratory Manual", Section D, Introduction of New Genetic Information, "Injection of Cells into the Blastocyst", 188-196, (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]. 본 발명자는 털 색에 의하여 키메라 자손을 확인하였다.

<421> 생식세포계 이전을 획득하였다. 본 발명자는 인간 V6에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR에 의하여 yHG4 트랜스제닉 마우스를 확인하였다.

<422> **실시예 29**

<423> **yK2:D1 마우스와 yHG4 YAC DNA를 함유하는 트랜스제닉 마우스의 교배**

<424> 내인성 항체의 부재시 인간 항체를 생산하는 마우스를 생성하기 위하여, yK2-트랜스제닉 마우스를 이중-불활성 (DI) 마우스 계통과 미리 교배시켰다. DI 마우스 계통은 표적화-불활성된 마우스 중쇄 및 카파 쇠 좌위 유전자에 대하여 동종접합성이므로, 항체 생성에 불충분하다[참조, Jakobovits 등, Nature 362:255-258 (1993); Green 등, Nature Genetics 7:13-21 (1994)]. yK2-트랜스제닉 마우스 계통중의 하나인 J23.1은 D1 마우스와 교배하여 동종접합성 불활성 마우스 중쇄 및 카파 쇠 백그라운드(yK2:DI)상에서 yK2 YACs에 대하여 반접합성 또는 동종접합성 마우스를 생성하였다. yHG4 YAC에 대한 반접합성인 신규한 XenoMouse를 생성하기 위한 교배 계획은 다음과 같다. 반접합성 XenoMouse 숫컷과 반접합성 XenoMouse 암컷의 후속 교배는 yHG4 및/또는 yK2에 대한 동종접합성인 XenoMouse 자손을 생산한다. 이들 자손으로부터 yHG4 및 yK2 모두에 대하여 모두 동종접합성인 암컷과 숫컷의 교배는 XenoMouseG4의 참 교배주를 생산할 것이다.

<425> **XenoMouse G4 교배 계획**

<426> 1세대: (YK2:D1으로 교배되는 키메라 또는 트랜스제닉 것)

<427>  $yHG4^+; yK2^-; mJ_H^+; mCk^{+/+} \times yHG4^-; yK2^-; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$

<428> 2 세대: (XenoMouse 이중접합체 x YK2:D1)

- <429>  $yHG4^{+}; yK2^{+}; mJ_H^{+/-}; mCk^{+/-}$  **X**  $yHG4^{-}; yK2^{+}; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$
- <430> 3 세대: (대부분 XenoMouse  $\times yK2:D1$  또는 XenoMouse  $\times yK2:DI$ )
- <431>  $yHG4^{+}; yK2^{+}; mJ_H^{+/-}; mCk^{-/-}$  **X**  $yHG4^{-}; yK2^{+}; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$
- <432>  $yHG4^{+}; yK2^{+}; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$  **X**  $yHG4^{-}; yK2^{+}; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$
- <433> XenoMouse:  $yHG4^{+}; yK2^{+}; mJ_H^{-/-}; mCk^{-/-}$
- <434> XenoMouse G4 계통에서 인간 증쇄 및 카파 쇠 YAC의 통합은 서던 블롯 분석에 의하여 확인되었다. 분석된 모든 XenoMouse G4 계통에서, yHG4은 명백한 결실 또는 재배열없이 여러 세대를 통하여 변형없이 이전되었다.
- <435> **실시예 30**
- <436> **플로우 사이토메트리 분석**
- <437> XenoMouse G4 트랜스제닉 마우스를 추가로 특성규명하기 위하여, 말초 혈액 및 비장 림프구를 8-10 주령 마우스 및 대조구로부터 분리하였다. 이 세포는 림포라이트 M (Accurate)(San Diego, CA)상에서 정제하였고, 정제된 항-마우스 CD32/CD16 Fc 수용체(Pharmingen, 01241D)(San Diego, CA)로 처리하여 Fc 수용체에 대한 비특이적 결합을 차단하였다. 다음에, 이 세포를 다양한 항체로 염색하여 FACStar<sup>PLUS</sup> (Becton Dickinson, CELLQuest software)상에서 분석하였다. XenoMouse G4 세포를 염색하는데 사용되는 항체의 패널은 다음을 포함한다: Cychrome(Cys) 항-B220(Pharmingen, 01128A); 플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC) 항-인간 IgM(Pharmingen, 34154X); FITC 항-마우스 IgM(Pharmingen, 02204D).
- <438> 3개의 상이한 XenoMouse G4 계통의 4마리 동물에서 유래한 림프구를 평가하고 플로우 사이토메트리를 사용하여 야생형 B6/129 마우스와 비교하였다.
- <439> G4 YAC DNA를 갖는 트랜스제닉 마우스는 상당한 인간 항체 및 면역계 발전을 나타낼 것이다. 대조구 129 $\times$ B6, DI, XenoMouse 2a 이중접합성 및 동종접합성은 G4 YAC에 대한 동종접합성 및 이중접합성 마우스와 비교한다.
- <440> **실시예 31**
- <441> **비면역화된 마우스내 인간 항체의 혈청 수준**
- <442> 비면역화된 마우스 혈청내 인간 항체의 측정을 위하여 ELISA를 수행하였다. 면역분석을 위한 더욱 자세한 정보 및 방법에 있어서 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, "Immunoassay", 553-614 p, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 인간 면역글로블린의 농도는 다음의 포획 항체를 사용하여 결정하였다: 마우스 항-인간 IgM(CGI/ATCC, HB-57)(Manassas, VA). ELISA 실험에 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9050-05)(Birmingham, AL), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05)(Birmingham, AL)이었다. 인간 Ig의 정량화를 위해 사용된 표준은 인간 IgM<sub>k</sub>(Cappel, 13000)(Costa Mesa, CA) 및 인간 IgG1(Calbiochem 400126)(San Diego, CA)이었다.
- <443> **실시예 32**
- <444> **면역화 및 하이브리도마 생성**
- <445> 8 내지 10 주령 XenoMouse yHG4 6마리의 균을 꼬리 기저 또는 다른 투여 경로(복강내, 발바닥 등)에 항원 10 ug 로 면역화시켰다. 항원은 1차 면역화를 위하여 완전 프로인트 보충액내에서 에멀선화하고 추가적 면역화를 위하여 불완전 프로인트 보충액내에서 에멀선화한다. 동물 면역화에 대한 상세한 정보 및 방법에 있어서 문헌 [Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, "Immunizations", 53-138, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화는 적어도 3회 부스터 면역화를 위하여 3-4 주 간격으로 수행하였다(boosts).
- <446> 단클론성 항체를 제조하는 경우, 마우스는 융합 4일전에 PBS내 항원 또는 세포의 최종 주사를 주입하였다. 단클론성 항체를 제조하는데 더욱 자세한 정보 및 방법은 문헌[Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual,

Chapter 6, "Monoclonal Antibodies", 139-244p, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]을 참조한다. 면역화된 마우스로부터 림프절 림프구는 비-분비성 골수종 NS0 세포계[S. Ray, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5548-5551 (1994)] 또는 P3-X63-Ag8.653 골수종과 융합하고, 이전에 설명된 바와 같이 HAT 선별을 수행한다[G. Galfre, 등, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)].

<447> **실시예 33**

<448> **항체 특이성 및 이소타입의 평가**

<449> 트랜스제닉 마우스가 항원-특이성 항체를 생성하는지 측정하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 또한 생성된 인간 항체 이소타입을 확인하는 것이 바람직하다. 항원-특이성 항체를 포획하기 위한 재조합 항원을 사용하여 마우스 혈청 및 하이브리도마 상청액에서 분리된 항체상에서 항원 특이성 및 이소타입을 결정하였다[참조, Coligan 등, Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in Current Protocol, Immunology (1994)]. 다음의 포획 항체를 사용하여 인간 및 마우스 면역글로블린의 농도를 결정하였다: 토끼 항-인간 IgG(서던 바이오테크놀로지, 6145-01). ELISA 실험에서 사용된 검출 항체는 마우스 항-인간 IgG1-HRP(칼타그, MH1015)(Burlingame, CA), 마우스 항-인간 IGM-HRP(서던 바이오테크놀로지, 9020-05) 및 염소 항-인간 카파-바이오틴(벡터, BA-3060)이었다. 인간 및 마우스 Ig의 정량화를 위하여 사용된 표준은 인간 IgG<sub>1</sub>(Calbiochem, 400122), 마우스 IgM $\kappa$ (Cappel, 13000), 인간 IgG<sub>2</sub> $\kappa$ (Calbiochem, 400122), 마우스 IgG $\kappa$ (Cappel 55939), 마우스 IgM $\kappa$ (Sigma, M-3795), 및 마우스 IgG<sub>4</sub> $\lambda$ (시그마, M-9019)이다.

<450> 상기 실시예 27-29에 따라서 생성되고 항원으로 면역화된 트랜스제닉 마우스는 예측되는 이소타입 및 항원 특이성을 갖는 인간 IgG4 단클론성 항체를 생성한다.

<451> **생물학적 물질**

<452> 다음 생물학적 물질은 상기 실시예와 관련하여 개시되고 논의되었으며 본 발명에 따라 제조되고 사용될 수 있는 물질의 예시이다:

- <453> · ppKM1C (yH1C 표적화 벡터)
- <454> · p1B (표적화 벡터)
- <455> · TV1 (yH2Bm 제조를 위하여 yH1C 표적화를 위한 mSg1-hCg1 플라스미드 DNA 벡터)
- <456> · TV4 (yH2Cm 제조를 위하여 yH1C 표적화를 위한 mSg1-hCg4 플라스미드 DNA 벡터)
- <457> · TV G1 (yHG1 제조를 위하여 yH1C 표적화를 위한 hCg1 플라스미드 DNA 벡터)
- <458> · TV G4 (yHG4 제조를 위하여 yH1C 표적화를 위한 hCg1 플라스미드 DNA 벡터)
- <459> · yH2Cm (mSg1-hCg4 YAC)(ATCC에 수탁번호 PTA-2161로 기탁)
- <460> · yH2Bm (mSg1-hCg1 YAC)(ATCC에 수탁번호 PTA-2163으로 기탁)
- <461> · yH2G1 (hSg2-hCg1 YAC)
- <462> · yH2G4 (yH3C로도 명명)(hSg2-hCg4 YAC)(ATCC에 PTA-2160으로 기탁)
- <463> · yH3B (yHG1/2로도 명명)(hSg2-hCg1-hCg2(TM) YAC)(ATCC에 수탁번호 PTA-2162로 기탁)
- <464> · ES-yH2Cm 클론 1
- <465> · ES-yH2Cm 클론 2
- <466> · ES-yH2Bm 클론 1
- <467> · ES-yH2Bm 클론 2
- <468> · ES-yH2Bm 클론 3
- <469> · ES-yH2Bm 클론 4
- <470> · ES-yH2Bm 클론 5

- <471> · ES-yH2Bm 클론 6
- <472> · ES-yH2Bm 클론 7
- <473> · ES-yH2Bm 클론 8
- <474> · ES-yH2Bm 클론 9

**발명의 효과**

<475> 본 발명의 트랜스제닉 동물은 원하는 거의 모든 항원에 의한 면역화에 반응하는 원하는 이소타입의 완전한 인간 항체를 제공할 수 있다.

**참고 문헌**

<476>

<477> 특허, 특허출원, 논문, 교과서 등을 포함하는 본원에서 인용된 모든 참고 문헌은 본원에서 전체가 참고로 통합된다. 또한, 다음의 문헌들도 상기 참고 문헌에 인용된 문헌을 포함하여 본원에서 전체가 참고로 통합된다.

M.J. Mendez <u>et al.</u> , "Functional Transplant of Megabase Human Immunoglobulin Loci Recapitulates Human Antibody Response in Mice," <i>Nature Genetics</i> , 15:146-156 (1997)
G.T. Williams <u>et al.</u> , "Membrane Immunoglobulin Without Sheath or Anchor," <i>Molecular Immunology</i> , 30:1427-1432, (1993)
G.T. Williams <u>et al.</u> , "The $\alpha/\beta$ Sheath and Its Cytoplasmic Tyrosine Are Requires For Signaling By The B-cell Antigen Receptor But Not for Capping or For Serine/Threonine-Kinase Recruitment," <i>Immunology</i> , 91:474-478 (1994)
A.R. Venkitaraman <u>et al.</u> , "The B-cell Antigen Receptor of the Five Immunoglobulin Classes," <i>Nature</i> , 352:777-781 (1991)
G.T. Williams <u>et al.</u> , "The Sequence of The $\mu$ Transmembrane Segment Determines the Tissue Specificity of the Transport of Immunoglobulin M to The Cell Surface," <i>J. Exp. Med.</i> 171:947-952 (1990)
S. Pettersson <u>et al.</u> , "A Second B cell-specific Enhancer 3' of The Immunoglobulin Heavy-chain Locus," <i>Nature</i> , 344:165-168 (1990)

<478>

<p>P. Dariavach <u>et al.</u>, "The Mouse IgH 3' -Enhancer," <i>Eur. J. Immunol.</i>, 21:1499-1504 (1991)</p>
<p>G.P. Cook <u>et al.</u>, "Regulated Activity of the IgH Intron Enhancer (Ep) in the T Lymphocyte Lineage," <i>International Immunology</i>, 7:89-95 (1995)</p>
<p>K.B. Meyer <u>et al.</u>, "The Igk 3' -Enhancer Triggers Gene Expression in Early B Lymphocytes but Its Activity is Enhanced on B cell Activation," <i>International Immunology</i>, 8:1561-1568 (1996)</p>
<p>M.S. Neuberger <u>et al.</u>, "Recombinant Antibodies Possessing Novel Effector Functions," <i>Nature</i>, 312:604-608 (1984)</p>
<p>C.I. Bindon <u>et al.</u>, "Human Monoclonal IgG Isotypes Differ in Complement Activating Function at the Level of C4 As Well AS C1q," <i>J. Exp. Med.</i>, 168:127-142 (1988)</p>
<p>S. Huck <u>et al.</u>, "Sequence of a Human Immunoglobulin Gamma 3 Heavy Chain Constant Region Gene: Comparison With the Other Human C<math>\gamma</math> Genes," <i>Nucleic Acids Research</i>, 14: 1779-1789 (1986)</p>
<p>J. Ellison <u>et al.</u>, "Nucleotide Sequence of a Human Immunoglobulin C<math>\gamma_4</math> Gene," <i>DNA</i>, 1: 11-18 (1981)</p>
<p>J.W. Ellison <u>et al.</u>, "The Nucleotide Sequence of a Human Immunoglobulin C<math>\gamma_1</math> Gene," <i>Nucleic Acids Research</i>, 10:4071-4079 (1982)</p>
<p>J. Ellison <u>et al.</u>, "Linkage and Sequence Homology of Two Human Immunoglobulin <math>\gamma</math> Heavy Chain Constant Region Genes," <i>Immunology</i>, 79:1984-1988 (1982)</p>
<p>H. Hayashida <u>et al.</u>, "Concerted Evolution of the Mouse Immunoglobulin Gamma Chain Genes," <i>The EMBO Journal</i>, 3:2047-2053 (1984)</p>

<p>A. Jakobovits <i>et al.</i>, "Analysis of Homozygous Mutant Chimeric Mice: Deletion of the Immunoglobulin Heavy-chain Joining Region Blocks B-cell Development and Antibody Production," <i>Genetics</i>, 90:2551-2555 (1993)</p>
<p>A. Jakobovits, "The Long-Awaited Magic Bullets: Therapeutic Human Monoclonal Antibodies From Transgenic Mice," <i>Exp. Opin. Invest. Drugs</i>, 7:607-614 (1998)</p>
<p>P.T. Jones <i>et al.</i>, "Replacing The Complementarity-determining Regions in a Human Antibody with Those From a Mouse," <i>Nature</i>, 321:522-525 (1986)</p>
<p>M.S. Neuberger <i>et al.</i>, "Isotype Exclusion and Transgene Down-regulation in Immunoglobulin-<math>\lambda</math> Transgenic Mice," <i>Nature</i>, 338:350-352 (1989)</p>
<p>M. Brüggemann <i>et al.</i>, "(A Repertoire of Monoclonal Antibodies with Human Heavy Chains from Transgenic Mice," <i>Immunology</i>, 86:6709-6713 (1989)</p>
<p>C.J. Jolly <i>et al.</i>, "Rapid Methods for the Analysis of Immunoglobulin Gene Hypermutation: Application to Transgenic and Gene Targeted Mice," <i>Nucleic Acids Research</i>, 25:1913-1919 (1997)</p>
<p>C. J. Jolly <i>et al.</i>, "The Targeting of Somatic Hypermutation," <i>Immunology</i>, 8:159-168 (1996)</p>
<p>S. Pettersson <i>et al.</i>, "Cellular Selection Leads to Age-Dependent and Reversible Down-regulation of Transgenic Immunoglobulin Light Chain Genes," <i>International Immunology</i>, 1:509-516 (1989)</p>
<p>K.B. Meyer <i>et al.</i>, "The I<math>\kappa</math> 3' -Enhancer Triggers Gene Expression in Early B Lymphocytes but its Activity is enhanced on B Cell Activation," <i>International Immunology</i>, 8:1561-1568 (1996)</p>

G.P. Cook <u>et al.</u> , "Regulated Acticity of the IgH Intron Enhancer (E $\mu$ ) in the T Lymphocyte Lineage," <i>International Immunology</i> , 7:89-95 (1995)
C.J. Jolly <u>et al.</u> , "The Targeting of Somatic Hypermutation," <i>Immunology</i> , 8:159-168 (1996)
S. Pettersson <u>et al.</u> , "Cellular Selection Leads to Age-dependent and Reversible Down-regulation of Transgenic Immunoglobulin Light Chain Genes," <i>International Immunology</i> , 1:509-516 (1989)
L.E. Reid <u>et al.</u> , "A Single DNA response element can confer inducibility by both $\alpha$ - and $\gamma$ -interferon," <i>Biochemistry</i> , 86:840-844 (1989)
J. Stavnezer <u>et al.</u> , "Immunoglobulin Heavy-chain Switching May be Directed by Prior Induction of Transcripts from Constant-region genes," <i>Immunology</i> , 85:7704-7708 (1988)
F.C. Mills <u>et al.</u> , "Sequences of Human Immunoglobulin Switch Regions: Implications for Recombination and Transcription," <i>Nucleic Acids Research</i> , 18:7305-7316 (1990)
P. Rothman <u>et al.</u> , (Structure and Expression of Germline Immunoglobulin $\gamma$ 3 Heavy Chain Gene Transcripts: Implications for Mitogen and Lymphokine Directed class-switching," <i>International Immunology</i> , 2:621-627 (1990)
P. Sideras <u>et al.</u> , "Production of Sterile Transcripts of C $\gamma$ Genes in an IgM-producing Human Neoplastic B Cell Line that Switches to IgG-producing Cells," <i>International Immunology</i> , 1:632-642 (1989)
J.P. Manis <u>et al.</u> , "Class Switching in B Cells Lacking 3' Immunoglobulin Heavy Chain Enhancers," <i>J. Exp. Med.</i> , 188: 1421-1431 (1998)

<481>

J. Durdik <u>et al.</u> , "Isotype Switching by a Microinjected $\mu$ Immunoglobulin Heavy Chain Gene in Transgenic Mice," <i>Immunology</i> , 86:2346-2350 (1989)
N. Takahashi <u>et al.</u> , "Structure of Human Immunoglobulin Gamma Genes: Implications for Evolution of a Gene Family," <i>Cell</i> , 29:671-679 (1982)
J. Zhang <u>et al.</u> , "A Selective Defect in IgG2b Switching as a Result of Targeted Mutation of the Iy2b Promoter and Exon," <i>The EMBO Journal</i> , 12:3529-3537: (1993)
S. Jung <u>et al.</u> , "Shutdown of Class Switch Recombination by Deletion of a Switch Region Control Element," <i>Science</i> , 259: 984-987 (1993)
L. Xu <u>et al.</u> , "Replacement of Germ-line $\epsilon$ promoter by Gene Targeting Alters Control of Immunoglobulin Heavy Chain Class Switching," <i>Immunology</i> , 90:3705-3709 (1993)
A. Bottaro <u>et al.</u> , "S Region Transcription <i>per se</i> Promotes Basal IgE Class Switch Recombination But Additional Factors Regulate the Efficiency of the Process," <i>The EMBO Journal</i> , 13:665-674 (1994)
F.C. Mills <u>et al.</u> , "Human IgS $\gamma$ Regions and Their Participation in Sequential Switching to IgE," <i>The Journal of Immunology</i> , 155:3021-3036 (1995)
S.C. Li <u>et al.</u> , "Expression of I $\mu$ -C $\gamma$ Hybrid Germline Transcripts Subsequent to Immunoglobulin Heavy Chain Class Switching," <i>International Immunology</i> , 6:491-497 (1994)
Q. Pan <u>et al.</u> , "Characterization of Human $\gamma$ 4 Switch Region Polymorphisms Suggest a Meiotic Recombinational Hot Spot Within the Ig Logus: Influence of S Region Length on IgG4 Production," <i>The Journal of Immunology</i> , 161:3520-3526 (1998)

T. Honjo <i>et al.</i> , "Constant-Region Genes of the Immunoglobulin Heavy Chain and the Molecular Mechanism of Class Switching," <i>Immunoglobulin Genes</i> , (1989)
N. Lonberg <i>et al.</i> , "Human Antibodies from Transgenic Mice," <i>Intern. Rev. Immunol.</i> , 13:65-93 (1995)
G. Pluschke <i>et al.</i> , "Generation of Chimeric Monoclonal Antibodies from Mice that Carry Human Immunoglobulin C $\gamma$ 1 Heavy or C $\kappa$ Light Chain Gene Segments," <i>Journal of Immunological Methods</i> , 215:27-37 (1998)
M. Brügemann <i>et al.</i> , "The Immunogenicity of Chimeric Antibodies," <i>J. Exp. Med.</i> , 170:2153-2157 (1989)
F.A. Harding <i>et al.</i> , "Class Switching in Human Immunoglobulin Transgenic Mice," <i>GenPharm International</i> ,
N. Lonberg <i>et al.</i> , "Antigen-specific Human Antibodies from Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," <i>Nature</i> , 368:856-859 (1994)
A. Cattaneo <i>et al.</i> , "Polymeric Immunoglobulin M is Secreted by Transfectants of Non-lymphoid Cells in the Absence of Immunoglobulin J Chain
A.L. Defranco, "The Complexity of Signaling Pathways Activated by the BCR," <i>Current Opinion in Immunology</i> , 9:296-308 (1997)
V. Arulampalam <i>et al.</i> , "The Enhancer Shift: A Model to Explain the Developmental Control of IgH Gene Expression in B-lineage Cells," <i>Immunology Today</i> , 18:549-554 (1997)
S. Pettersson <i>et al.</i> , "Temporal Control of IgH Gene Expression in Developing B Cells by the 3' Locus Control Region," <i>Immunobiol.</i> , 198:236-248 (1997)

<p>K. Kuze <u>et al.</u>, "Characterization of the Enhancer Region for Germline Transcription of the Gamma 3 Constant Region Gene of Human Immunoglobulin," <i>International Immunology</i>, 3:647-655 (1991)</p>
<p>R. Mocikat <u>et al.</u>, "The effect of the Rat Immunoglobulin Heavy-chain 3' Enhancer is position Dependent," <i>Gene</i>, 136:349-353 (1993)</p>
<p>P. Dariavach <u>et al.</u>, "The Mouse IgH 3' -Enhancer," <i>Eur. J. Immunol.</i>, 21:1499-1504 (1991)</p>
<p>J.S. Michaelson <u>et al.</u>, "Identification of 3' <math>\alpha</math>-hs4, a Novel Ig Heavy Chain Enhancer Element Regulated at Multiple Stages of B Cell Differentiation," <i>Nucleic Acids Research</i>, 23:975-981 (1995)</p>
<p>S. Pettersson <u>et al.</u>, "A Second B Cell-specific Enhancer 3' of the Immunoglobulin Heavy-chain Locus," <i>Nature</i>, 344:165-168 (1990)</p>
<p>V. Arulampalam <u>et al.</u>, "Elevated Expression Levels of an Ig Transgene in Mice Links the IgH 3' Enhancer to the Regulation of IgH Expression," <i>International Immunology</i>, 8:1149-1157 (1996)</p>
<p>S. Delphin <u>et al.</u>, "Characterization of an Interleukin 4 (IL-4) Responsive Region in the Immunoglobulin Heavy Chain Germline <math>\epsilon</math> Promoter: Regulation by NF-IL-4, a C/EBP Family Member and Nf-<math>\kappa</math>B/p50," <i>J. Exp. Med.</i>, 181:181-192 (1995)</p>
<p>P. Matthias <u>et al.</u>, "The Immunoglobulin Heavy Chain Locus Contains Another B-Cell-Specific 3' Enhancer Close to the <math>\alpha</math> Constant Region," <i>Molecular and Cellular Biology</i>, 13:1547-1553 (1993)</p>
<p>R. Lieberson <u>et al.</u>, "An Enhancer at the 3' End of the Mouse Immunoglobulin Heavy Chain Locus," <i>Nucleic Acids Research</i>, 19:933-937 (1991)</p>

P. Dariavach <u>et al.</u> , "The Mouse IgH 3' -Enhancer," <i>Eur. J. Immunol.</i> , 21:1499-1504 (1991)
J.S. Michaelson <u>et al.</u> , "Regulation of 3' IgH Enhancers by a Common Set of Factor, Including κB-Binding Proteins," <i>The Journal of Immunology</i> , 156:2828-2839 (1996)
J. Chen <u>et al.</u> , "Mutations of the Intronic IgH Enhancer and its Flanking Sequences Differentially Affect Accessibility of the J <sub>H</sub> Locus," <i>The EMBC Journal</i> , 12:4635-4645 (1993)
M. Cogné <u>et al.</u> , "A Class Switch Control Region at the 3' End of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus," <i>Cell</i> , 77: 737-747 (1994)
S. Huck <u>et al.</u> , "Sequence of a Human Immunoglobulin Gamma 3 Heavy Chain Constant Region Gene: Comparison with the Other Human C <sub>γ</sub> Genes," <i>Nucleic Acids Research</i> , 13:1779-1789 (1986)
J.W. Ellison <u>et al.</u> , "The Nucleotide Sequence of a Human Immunoglobulin C <sub>γ</sub> Gene," <i>Nucleic Acids Research</i> , 10:4071-4079 (1982)
J. Ellison <u>et al.</u> , "Linkage and Sequence Homology of Two Human Immunoglobulin γ Heavy Chain Constant Region Genes," <i>Immunology</i> , 79:1984-1988 (1982)
J.B. Bolen, "Protein Tyrosine Kinases in the Initiation of Antigen Receptor Signaling," <i>Current Opinion in Immunology</i> , 7:306-311 (1995)
L. O'Rourke <u>et al.</u> , "Co-receptors of B Lymphocytes," <i>Current Opinion in Immunology</i> , 9:324-329 (1994)
T. Kurosaki, "Molecular Mechanisms in B Cell Antigen Receptor Signaling," <i>Current Opinion in Immunology</i> , 9:309-318 (1997)

<p>B.E. Pearson <u>et al.</u>, "Expression of the Human <math>\beta</math>-amyloid Precursor Protein Gene from a Yeast Artificial Chromosome in Transgenic Mice," <i>Genetics</i>, 90:10578-10582 (1993)</p>
<p>J.F. Loring <u>et al.</u>, "Rational Design of an Animal Model for Alzheimer's Disease: Introduction of Multiple Human Genomic Transgenes to Reproduce AD Pathology in a Rodent," <i>Neurobiology of Aging</i>, 17:173-182 (1996)</p>
<p>J.J. MacQuitty, "The Real Implications of Dolly," <i>Nature Biotechnology</i>, 15:294 (1997)</p>
<p>M.T.F. Huang, "Gene Targeting Technology for Creating Transgenic Models of Lymphopoiesis," <i>Laboratory Animal Science</i>, 43:156-159 (1993)</p>
<p>J.J. MacQuitty, "GenPharm's Knockout Mice," <i>Science</i>, 257:1188 (1992)</p>
<p>M.T.F. Huang, "T Cell Development in CD3-<math>\zeta</math> Mutant Mice," <i>Intern. Rev. Immunol.</i>, 13:29-41 (1995)</p>
<p>L.D. Taylor <u>et al.</u>, "A Transgenic Mouse That Expresses a Diversity of Human Sequence Heavy and Light Chain Immunoglobulins," <i>Nucleic Acids Research</i>, 20:6287-6295 (1992)</p>
<p>D.M. Fishwild <u>et al.</u>, "High-avidity Human IgG<math>\kappa</math> Monoclonal Antibodies from a Novel Strain of Minilocus Transgenic Mice," <i>Nature Biotechnology</i>, 14:845-851 (1996)</p>
<p>L.D. Taylor <u>et al.</u>, "Human Immunoglobulin Transgenes Undergo Rearrangement, Somatic Mutation and Class Switching in Mice that Lack Endogenous IgM," <i>International Immunology</i>, 6:579-591 (1994)</p>

<486>

<p>N. Tuailleon <u>et al.</u>, "Human Immunoglobulin Heavy-chain Minilocus Recombination in Transgenic Mice: Gene-segment Use in <math>\mu</math> and <math>\gamma</math> Transcripts," <i>Immunology</i>, 90:3720-3724 (1993)</p>
<p>N. Lonberg <u>et al.</u>, "Antigen-specific Human Antibodies from Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," <i>Nature</i>, 368:856-859 (1994)</p>
<p>M.J. Shlomchic <u>et al.</u>, "The Role of B Cells in <i>lpr/lpr</i>-induced Autoimmunity," <i>J. Exp. Med.</i>, 180:1295-1306 (1994)</p>
<p>L. Pricop <u>et al.</u>, "Antibody Response Elicited by T-dependent and T-independent Antigens in Gene Targeted <math>\kappa</math>-deficient Mice," <i>International Immunology</i>, 6:1839-1847 (1994)</p>
<p>Y. Liu <u>et al.</u>, "Gene-targeted B-deficiency Mice Reveal a Critical Role for B Cells in the CD4 T Cell Response," <i>International Immunology</i>, 7:1353-1362 (1995)</p>
<p>T.K. Choi <u>et al.</u>, "Transgenic Mice Containing a Human Heavy Chain Immunoglobulin Gene Fragment Cloned in a Yeast Artificial Chromosome," <i>Nature Genetics</i>, 4:117-123 (1993)</p>
<p>S.D. Wager <u>et al.</u>, "Antibody Expression from the Core Region of the Human IgH Locus Reconstructed in Transgenic Mice Using Bacteriophage <math>\phi</math>1 Clones," <i>Genomics</i>, 35:405-414 (1996)</p>
<p>S.D. Wagner <u>et al.</u>, "The Diversity of Antigen-specific Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice Bearing Human Immunoglobulin Gene Miniloci," <i>Dur. J. Immunol.</i>, 24:2672-2681 (1994)</p>
<p>S.D. Wagner <u>et al.</u>, "Antibodies Generated from human Immunoglobulin Miniloci in Transgenic Mice," <i>Nucleic Acids Research</i>, 22:1389-1393 (1994)</p>

N.P. Davies et al., "Creation of Mice Expressing Human Antibody Light Chains by Introduction of a Yeast Artificial Chromosome Containing the Core Region of the Human Immunoglobulin  $\kappa$  Locus," *Bio/Technology*, 11:91-914 (1993)

F.D. Batista et al., "Affinity Dependence of the B Cell Response to Antigen: A Threshold, a Ceiling, and the Importance of Off-Rate," *Immunity*, 8:751-759 (1998)

M. R. Ehrenstein et al., "Targeted Gene Disruption Reveals a Role for Natural Secretory IgM in the Maturation of the Primary Immune Response," *Immunology*, 95:10089-10093 (1998)

C. Milstein et al., "Both DNA Strands of Antibody Genes are Hypermutation Targets," *Immunology*, 95:8791-8794 (1998)

J.E. Sale et al., "TdT-Accessible Breaks Are Scattered over the Immunoglobulin V Domain in a Constitutively Hypermutating B Cell Line," *Immunity*, 9:859-869 (1998)

M.S. Neuberger, "Antigen Receptor Signaling Gives Lymphocytes a Long Life," *Cell*, 90:971:973 (1997)

B. Goyenechea et al., "Cells Strongly Expressing Ig $\kappa$  Transgenes Show Clonal Recruitment of Hypermutation: A Role for Both MAR and the Enhancers," *The EMBO Journal*, 16:3987-3994 (1997)

Y.M. The et al., "The Immunoglobulin (Ig)  $\alpha$  and Ig $\beta$  Cytoplasmic Domains Are Independently Sufficient to Signal B Cell Maturation and Activation in Transgenic Mice," *J. Exp. Med.*, 185:1753-1758 (1997)

J. Yélamos et al., "Targeting of Non-Ig Sequences in Place of the V Segment by Somatic Hypermutation," *Nature*, 376:225-229 (1995)

S.D. Wagner <u>et al.</u> , "Codon bias Targets Mutation," <i>Nature</i> , 376:732 (1995)
N. Klix <u>et al.</u> , "Multiple Sequences from Downstream of the Jx Cluster Can Combine to Recruit Somatic Hypermutation to a Heterologous, Upstream Mutation Domain," <i>Eur. J. Immunol.</i> , 28:317-326 (1996)
M. Neuberger <u>et al.</u> , "Mice Perform a Human Repertoire," <i>Nature</i> , 386:25-26 (1997)
N.P. Davies <u>et al.</u> , "Targeted Alterations in Yeast Artificial Chromosomes for Inter-species Gene Transfer," <i>Nucleic Acids Research</i> , 20:2693-2698 (1992)
M. Brüggemann <u>et al.</u> , "Strategies for Expressing Human Antibody Repertoires in Transgenic Mice," <i>Immunology Today</i> , 17:391-397 (1996)
X. Zou <u>et al.</u> , "Dominant Expression of a 1.3 Mb Human I $\kappa$ k Locus Replacing Mouse Light Chain Production," <i>The FASEB Journal</i> , 10:1227-1232 (1996)
I.K. Jarmer <u>et al.</u> , "Chimaeric Monoclonal Antibodies Encoded by the Human V $\mu$ 26 Gene From Naïve Transgenic Mice Display a Wide Range of Antigen-binding Specificities," <i>Immunology</i> , 88:174-182 (1996)
X. Zou <u>et al.</u> , "Subtle Differences in Antibody Responses and Hypermutation of $\lambda$ Light Chains in Mice with a Disrupted $\kappa$ Constant Region," <i>Eur. J. Immunol.</i> , 25:2154-2162 (1995)
A.V. Popov <u>et al.</u> , "Yeast Colony Size Reflects YAC Copy Number," <i>Nucleic Acids Research</i> , 25:2039-2040 (1997)
N.P. Davies <u>et al.</u> , "Extension of Yeast Artificial Chromosomes by Cosmid Multimers," <i>Nucleic Acids Research</i> , 21:767-768 (1993)

C. Bützler <i>et al.</i> , "Rapid Induction of B-cell Lymphomas in Mice Carrying a Human IgH/c-MYC/CAC," <i>Oncogene</i> , 14:1383-1388 (1997)
A.V. Popov <i>et al.</i> , "Assembly and Extension of Yeast Artificial Chromosomes to Build Up a Large Locus," <i>Gene</i> , 177:195-201 (1996)
H. Waldmann <i>et al.</i> , "Monoclonal Antibodies for Immunosuppression," <i>Monoclonal Antibody Therapy Prog Allergy</i> , 45:16-30 (1988)
M. Brüggemann <i>et al.</i> , "Designer Mice: The Production of Human Antibody Repertoires in Transgenic Animals," <i>generation of Antibodies by Cell and Gene Immortalization</i> , 7:33-40 (1993)
A.G. Betz <i>et al.</i> , "Discriminating Intrinsic and Antigen-selected Mutational hotspots in Immunoglobulin V Genes," <i>Immunology Today</i> , 14:405-409
M. Brüggemann <i>et al.</i> , "Construction, Function and Immunogenicity of Recombinant Monoclonal Antibodies," <i>Behring, Inst. Mitt.</i> , 87:21-14 (1990)
M. Brüggemann <i>et al.</i> , "Production of Human Antibody Repertoires in Transgenic Mice," <i>Current Opinion in Biotechnology</i> , 8:455-458 (1997)
K.B. Meyer <i>et al.</i> , "The Immunoglobulin $\kappa$ Locus Contains a Second, Stronger B-cell-specific Enhancer Which is Located Downstream of the Constant Region," <i>The EMBO Journal</i> , 8:1959-1964 (1989)
M. Brüggemann <i>et al.</i> , "Sequence of a Rat Immunoglobulin $\gamma_2$ Heavy Chain Constant Region cDNA: Extensive Homology to Mouse $\gamma_3$ ," <i>Eur. J. Immunol.</i> , 18:317-319 (1988)
M. Brüggemann <i>et al.</i> , "Human Antibody Production in Transgenic Mice: Expression fro 100 kb of the Human IgH Locus," <i>Eur. J. Immunol.</i> , 21:1323-1326 (1991)

M. Brüggemann, "Evolution of the Rate Immunoglobulin Gamma Heavy-chain Gene Family," *Gene*, 74:473-482 (1988)

R. Sitia *et al.*, "Regulation of Membrane IgM Expression in Secretory B Cells: Translational and Post-translational Events," *The EMBO Journal*, 6:3969-3977 (1987)

M.J. Sharpe *et al.*, "Somatic Hypermutation of Immunoglobulin  $\kappa$  may depend on Sequences 3' of C $\kappa$  and Occurs on Passenger Transgenes," *The EMBO Journal*, 10:2139-2145 (1991)

S. Biocca *et al.*, "Expression and Targeting of Intracellular Antibodies in Mammalian Cells," *The EMBO Journal*, 9:101-108 (1990)

K.J. Patel *et al.*, "Antigen Presentation by the B Cell Antigen Receptor Is Driven by the  $\alpha/\beta$  Sheath and Occurs Independently of Its Cytoplasmic Tyrosines," *Cell*, 74:939-946 (1993)

K.B. Meyer *et al.*, "The Importance of the 3' -Enhancer Region in Immunoglobulin  $\kappa$  Gene Expression," *Nucleic Acids Research*, 18:5609-56115 (1990)

A.G. Betz *et al.*, "Elements Regulating Somatic Hypermutation of an Immunoglobulin  $\kappa$  Gene: Critical Role for the Intron Enhancer/Matrix Attachment Region," *Cell*, 77:239-248 (1994)

J.O. Mason *et al.*, "Transcription Cell Type Specificity Is Conferred by an Immunoglobulin V $\kappa$  Gene Promoter That Includes a Functional Consensus Sequence," *Cell*, 41:479-487 (1985)

M.S. Neuberger *et al.*, "Activation of Mouse Complement by Monoclonal Mouse Antibodies," *Eur. J. Immunol.*, 11:1012-1016 (1981)

<491>

M.R. Walker *et al.*, "Interaction of Human IgG Chimeric Antibodies with the Human FcRI and FcRII Receptors: Requirements for Antibody-Mediated Host Cell-Target Cell Interaction," *Molecular Immunology*, 26:403-411 (1989)

M. Brüggemann *et al.*, "Comparison of the Effector Functions of Human Immunoglobulins Using a Matched Set of Chimeric Antibodies," *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)

R. Sherman-Gold, "Monoclonal Antibodies: The Evolution from '80s Magic Bullets to Mature, Mainstream Applications as Clinical Therapeutics," *Genetic Engineering News*, 17 (1997)

<492>

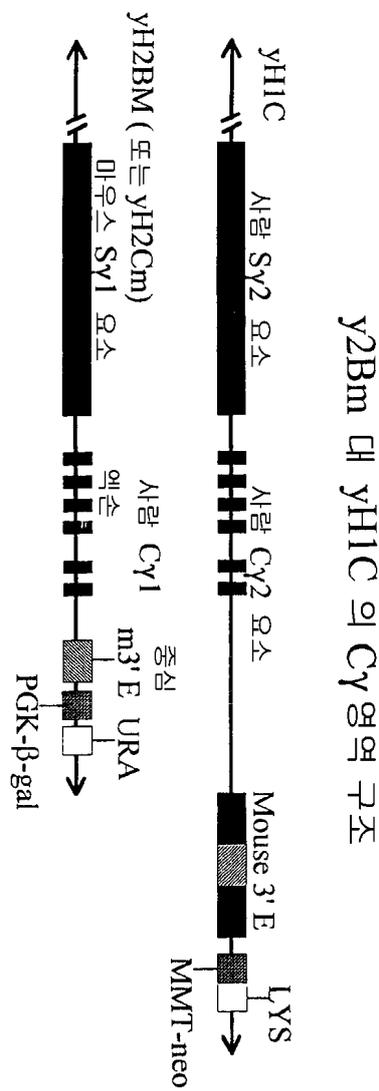
**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 yH1C 및 yH2Bm(또는 yH2Cm) 효모 인공 염색체(YAC)의 개략도이다.

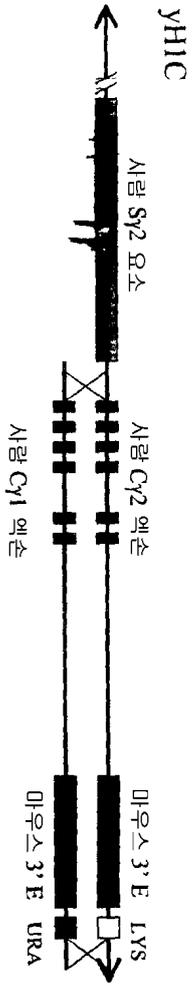
- <2> 도 2는 yH1C 및 yHG1 효모 인공 염색체(YAC)의 개략도이다.
- <3> 도 3은 yH1C 및 yHG1/2 효모 인공 염색체(YAC)의 개략도이다.
- <4> 도 4는 yH1C 및 yHG4/2 효모 인공 염색체(YAC)의 개략도이다.
- <5> 도 5는 yH1C를 yHG1 및 yHG4 YAC로 새로이 개선하기 위한 표적화 벡터(TV1 및 TV4)의 개략도이다.
- <6> 도 6은 yH1C를 yHG1/2 및 yHG4/2 YAC로 새로이 개선하기 위한 표적화 벡터의 제작을 나타낸다.
- <7> 도 7은 yH1C를 yHG1/2 및 yHG4/2 YAC로 새로이 개선하기 위한 표적화 벡터(TV G1/2 및 TV G4/2)의 개략도이다.
- <8> 도 8은 yH3B YAC과 융합된 ES 클론(클론 Z 70.17.1)의 서던 블롯 분석을 보여준다.

도면

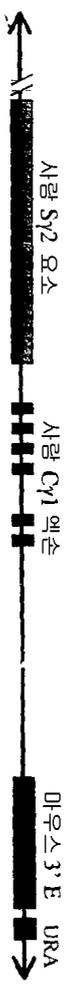
도면1



### Cy2 에서 Cy1 로 YH1C 를 개선하기



YHG1

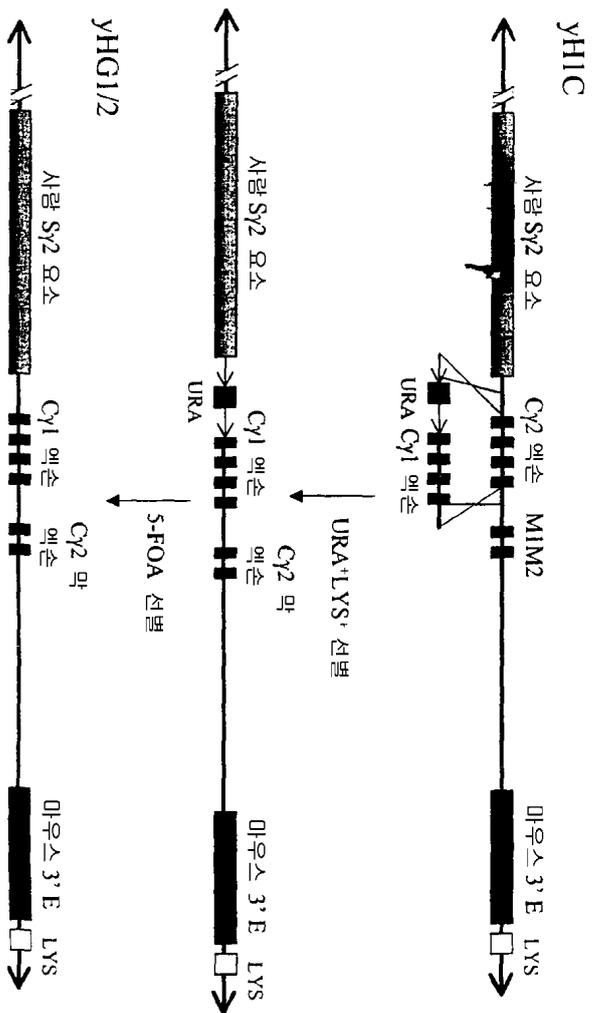


시람 Cy4 엑손을 갖는 것을 제외하고는 상기와 같이 제조된 표적화 벡터

YHG4



### Cy2 에서 Cy1로 yH1C를 최소한으로 개선하기



도면3



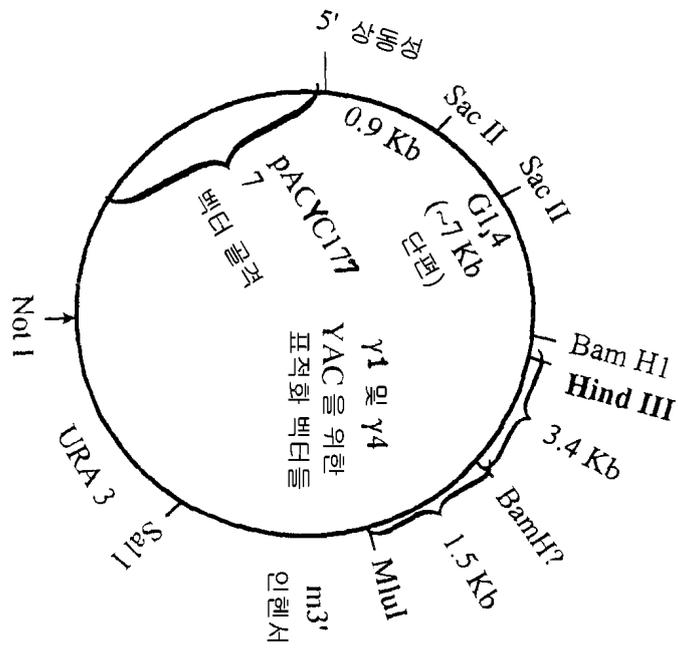
도면5

YHIC를 yH2Bm 및  
yH2CM YACS으로  
개선하기 위한 표적화 벡터

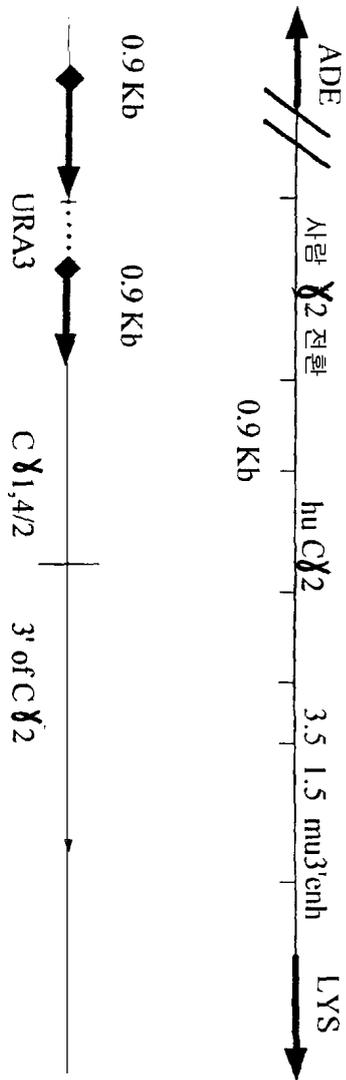
양 벡터는 PACYC177  
벡터에 기초함

(크기 ~ 23 Kb)

Not I 부위를 사용하여  
벡터를 선형화한 후  
형질전환시킴



TV G1 및 TV G4 YAC의 벡터 제작



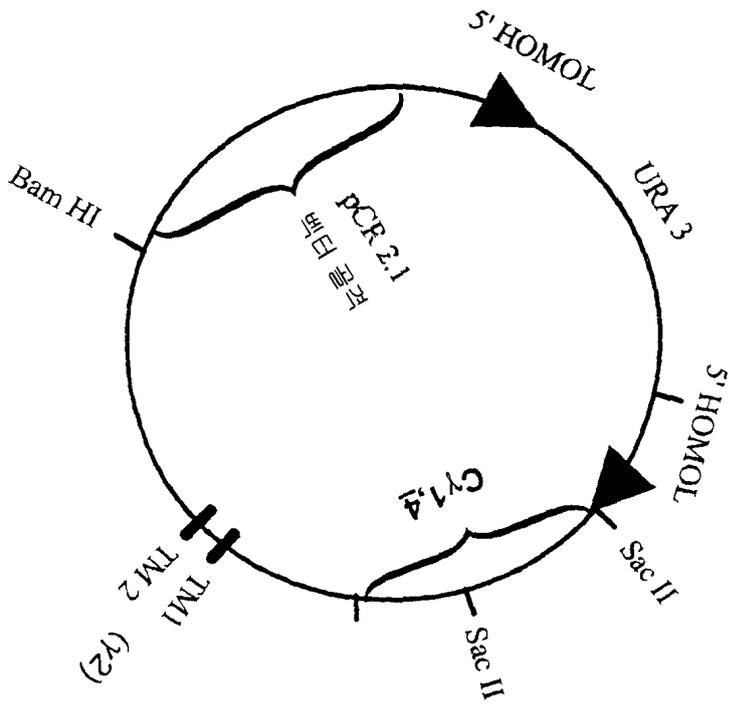
도면6

도면7

감마 1 및 4의 양호화  
영역 및 감마 2의 막돌과  
도메인을 갖는 YAC의  
표적화 벡터

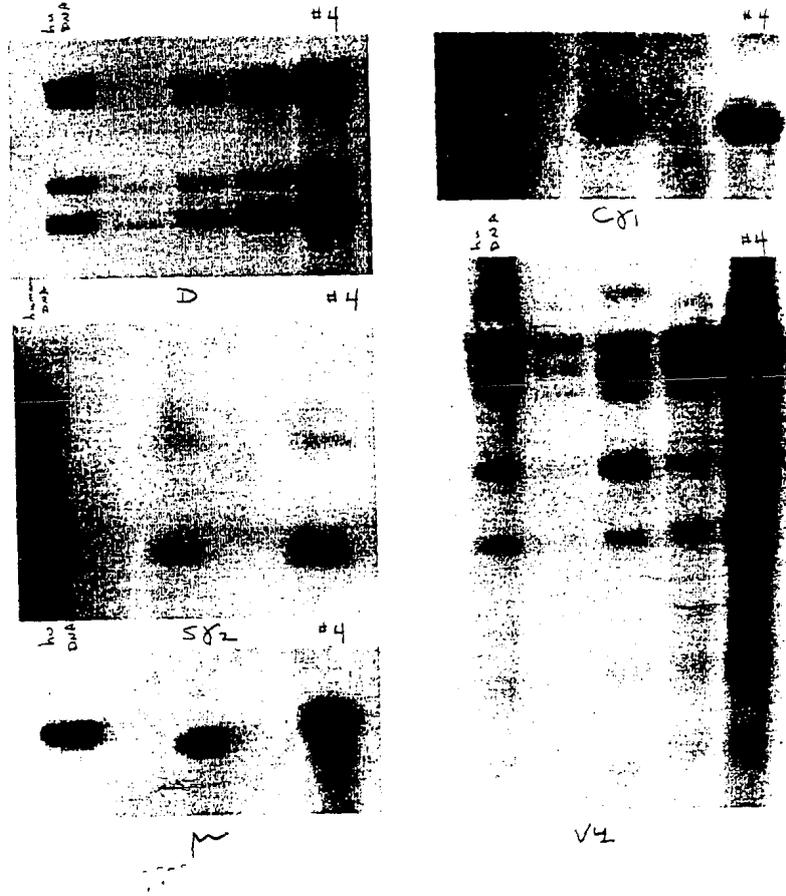
PCR 2.1 클로닝 벡터에  
기초함  
(INVITROGEN)

TV G1/2 및 TV G4/2



도면8

yH3BYAC과 융합된 ES 클론의 서던 블롯 분석 (클론 Z 70.17.1)



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABGENIX, INC.

<120> TRANSGENIC ANIMALS FOR PRODUCING SPECIFIC ISOTYPES OF HUMAN ANTIBODIES VIA NON-COGNATE SWITCH REGIONS

<130> CELL 4.21 CIP PCT

<140>

<141>

<150> 09/329,582

<151> 1999-06-10

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Unknown Organism

<220>  
 <223> Description of Unknown Organism: Lox P site

<400> 1  
 acttcgtata gcatacatta tacgaagtta ta 32

<210> 2  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 2  
 ctagtcgaca aatattcccc gggcgccgc ttacgtatga attcagcgcg cttctagaac 60  
 tcgagtgage tc 72

<210> 3  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Complimentary strand

<400> 3  
 gatcgagctc actcgagttc tagaagcgcg ctgaattcat acgtaagcgg cgcgccgggg 60  
 aatattgtc ga 72

<210> 4  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 4  
ctaggcaatt gataatatta agctttacgt atctgatcat cctcgagacg cgtg 54

<210> 5  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Complementary strand

<400> 5  
cgттаactat tataattcga aatgcataga ctagtaggag ctctgcgcac gatc 54

<210> 6  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 6  
aattaagctt gtacgtactg atcaagatct ggatccagat ct 42

<210> 7  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Complementary strand

<400> 7

agatctggat ccagatcttg atcagtagt acaagtt

37

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8

cacaccgagg tcacatggc

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9

ctactctagg gcacctgtcc

20

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10

gtcgacgggc tcgggctgg tttctct

27

<210> 11  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11  
gggccctgat tcaaattttg tgtctcc 27

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12  
ctggagtcct attgacatcg cc 22

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13  
ggttctttcc gcctcagaag g 21

<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14

gctgacacgt gtctcactg c

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15

ccccagttgc ccagacaacg g

21

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 16

agcttgtcga cacgcgttta attaaggccg gcca

34

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Complementary strand

<400> 17

agcttggccg gccttaatta aacgcgtgtc gaca 34

<210> 18  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18  
 tggtagccga gaaggcaggc ca 22

<210> 19  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19  
 ccgcgggcat gcaacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttattgtggg acagagctgg 60  
 gccccagg 67

<210> 20  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20  
 gtctggcccc tctgtgtc 18

<210> 21

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21  
 cacccataaa aggctgga 18

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22  
 acggctcatg cccattgg 18

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 23  
 tagtgagtgg gcctgact 18

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 24  
 ggccatggcc ggccat 16

<210> 25  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 25  
 ggccatggcc ggccat 16

<210> 26  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 26  
 gatccggtac cgatatcaa ttgggccggc cggccatata ggcct 45

<210> 27  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 27  
 gatcagcct atatggccgg cggcccaat tggatatcgg taccg 45

<210> 28  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 28  
 cctctcctg tctctggga aatgagtgcc 30

<210> 29  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 29  
 tatccatcac actggcgacc gctcgagcat 30

<210> 30  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 30  
 gcagagcctg ctgaattctg gctg 24

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31

gtaatacaca gccgtgtcct cg

22