



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103025884 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201180036683. 0

(56) 对比文件

(22) 申请日 2011. 07. 26

CN 1468250 A , 2004. 01. 14,

(30) 优先权数据

审查员 酒向飞

61/367, 809 2010. 07. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 01. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/045333 2011. 07. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/018610 EN 2012. 02. 09

(73) 专利权人 特里安尼公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 马赛厄斯·瓦布尔 奈杰尔·基林

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006. 01)

C12P 21/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书24页 附图11页

(54) 发明名称

转基因动物和使用方法

(57) 摘要

本发明包括具有包括被引入的部分人免疫球蛋白区的基因组的非人脊椎动物细胞和非人哺乳动物,所述被引入的区包括人 V_H 编码序列和基于非人哺乳动物的内源性基因组的非编码 V_H 序列。

1. 一种工程化的小鼠免疫球蛋白基因座,所述工程化的小鼠免疫球蛋白基因座缺失所述小鼠免疫球蛋白基因座的可变区基因区段、被插入嵌合免疫球蛋白基因区段的阵列,其中所述嵌合免疫球蛋白基因区段的每一个都包括人免疫球蛋白编码序列和基于小鼠内源性免疫球蛋白可变区基因座的非编码序列,其中所述工程化的小鼠免疫球蛋白基因座包括人 V_H 、 D_H 和 J_H 编码序列,或 V_L 和 J_L 编码序列,其中 L 是指 λ 或 κ 。

2. 一种用于产生具有包含根据权利要求 1 所述的工程化的小鼠免疫球蛋白基因座的基因组的转基因小鼠的方法,所述方法包括:

a) 将一个或多个位点特异性重组酶的两个或多个靶向位点引入小鼠胚胎干细胞的免疫球蛋白基因座中以及在包括 V、D 和 J 基因区段,或 V 和 J 基因区段的所述基因座的部分的上游将至少一个位点整合并在包括 V、D 和 J 基因区段,或 V 和 J 基因区段的所述基因座的部分的下游将至少一个位点整合;

b) 提供包括部分人免疫球蛋白可变区的载体,所述部分人免疫球蛋白可变区包括嵌合免疫球蛋白基因区段的阵列,其中所述嵌合免疫球蛋白基因区段的每一个都包括人 V_H 、 D_H 、 J_H 、 V_L 或 J_L 编码序列,其中 L 是指 λ 或 κ ,和基于小鼠内源性免疫球蛋白可变区基因座的非编码序列,整个部分人免疫球蛋白可变区侧翼为位点特异性重组位点,其中所述重组位点能够与在步骤 a) 中被引入所述小鼠胚胎干细胞的那些位点重组;

c) 引入步骤 b) 的所述载体和能够识别步骤 b) 的所述载体中的所述重组酶位点的位点特异性重组酶;

d) 允许在所述小鼠胚胎干细胞的所述基因组和所述部分人免疫球蛋白可变区之间发生重组事件,导致用所述部分人免疫球蛋白可变区替换所述内源性免疫球蛋白可变区;和

e) 利用在步骤 d) 中产生的所述小鼠胚胎干细胞来产生包括所述部分人免疫球蛋白可变区基因座的转基因小鼠。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,还包括通过引入识别第一组位点特异性重组位点的重组酶来从所述小鼠基因组缺失所述内源性免疫球蛋白可变区基因座的一部分的步骤,其中所述基因组中的这样的缺失在原位留下不能在所述引入步骤之后和所述提供步骤之前彼此重组的第二组位点特异性重组位点。

转基因动物和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 7 月 26 日提交且通过引用并入本文的美国临时专利申请第 61/367,809 号的益处。

发明领域

[0003] 本发明涉及转基因脊椎动物,且更具体地涉及用于发展人治疗学的转基因脊椎动物。

[0004] 发明背景

[0005] 在以下论述中,为了背景和介绍的目的,将描述某些文章和方法。被包含在本文中的任何内容不应被理解为“承认”现有技术。申请人明确保留适当时表明本文引用的文章和方法在适用法定条款下不构成现有技术的权利。

[0006] 编码人和小鼠免疫球蛋白的基因已经被广泛表征。Berman 等人 (1988)EMBO J. 7 : 727-738 描述了包括 $V_{H,D}$ 和 J_H 基因区段的人 Ig V_H 基因座。Sakano 等人 (1981)Nature290 : 562-565 描述了免疫球蛋白重链基因的多样性区段。Blankenstein 和 Kruwink (1987) Eur. J. Immunol. 17 :1351-1357 描述了小鼠可变重链区。转基因动物例如具有变化的免疫球蛋白基因座的小鼠的产生,允许将这样的转基因动物用于各种研究和开发应用,例如用于药物发现和对各种生物系统的基础研究。带有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠的产生被描述在国际申请 W090/10077 和 W090/04036 中。W090/04036 描述了具有整合人免疫球蛋白“小型(mini)”基因座的转基因小鼠。W090/10077 描述了用于产生转基因动物的包含免疫球蛋白显性控制区的载体。

[0007] 已经开发用人免疫球蛋白序列替换内源性小鼠免疫球蛋白区,以产生用于药物发现目的的部分人抗体或完全人抗体的大量方法。这样的小鼠的实例包括被描述在以下中的那些,例如,美国专利第 7,145,056 号;第 7,064,244 号;第 7,041,871 号;第 6,673,986 号;第 6,596,541 号;第 6,570,061 号;第 6,162,963 号;第 6,130,364 号;第 6,091,001 号;第 6,023,010 号;第 5,593,598 号;第 5,877,397 号;第 5,874,299 号;第 5,814,318 号;第 5,789,650 号;第 5,661,016 号;第 5,612,205 号;和第 5,591,669 号。完全人源化免疫球蛋白的小鼠中的许多具有低于正常速率的抗体产生,这是由于较低效的 V(D)J 重组和由部分基因互补(partial gene complement)造成的有限的抗体产生。由于个体小鼠外显子用同线性(syntenic)的人对应物替换的途径,小鼠编码序列已经用人序列“交换”的其他完全人源化免疫球蛋白的小鼠的产生是非常费时的和高成本的。

[0008] 基于前述内容,明显的是,对有效产生人抗体的高效的和有成本效益的方法存在需求。更特别地,本领域中对包括人免疫球蛋白区的非人脊椎动物和具有适当地响应抗原的能力的转基因动物存在需求。

[0009] 发明概述

[0010] 根据前述目的,提供了能够产生具有人 V 区的抗体的转基因非人动物。

[0011] 提供该概述来以简化形式介绍概念的选择,所述概念在下文在详细描述中进一步

描述。该概述不意图确定所要求保护的主题的关键或必要特征，也不意图用于限制所要求保护的主题的范围。从包括在附图中阐明的和所附的权利要求中界定的那些方面的以下书面详细描述，所要求保护的主题的其他特征、细节、实用性和优点将是明显的。

[0012] 本发明包括非人脊椎动物细胞和非人脊椎动物，所述非人脊椎动物细胞和非人脊椎动物具有包括被引入的部分人免疫球蛋白区(partially human immunoglobulin region)的基因组，所述被引入的区包括人免疫球蛋白可变区基因座编码序列和基于非人脊椎动物的内源性免疫球蛋白可变区基因座的非编码序列。优选地，本发明的转基因细胞和动物具有内源性免疫球蛋白区的一部分或全部被除去的基因组。

[0013] 最少地，在非人脊椎动物中生产人单克隆抗体要求宿主具有将表达人免疫球蛋白重链蛋白的至少一个基因座和将表达人免疫球蛋白轻链蛋白的一个基因座。

[0014] 在一些方面，部分人免疫球蛋白可变区基因座包括人 V_H 编码序列和基于非人脊椎动物的内源性 V_H 区的非编码 V_H 序列。在这些方面，部分人免疫球蛋白可变区基因座还包括人 D 和 J 基因编码序列和基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 D 和 J 基因序列。在这些方面，从所述脊椎动物宿主基因组缺失内源性 V_H 、D 和 J 序列的一部分或全部。

[0015] 在其他方面，免疫球蛋白区包括被引入的区，所述被引入的区包括人 V_L 编码序列和基于非人脊椎动物的内源性 V_L 区的非编码 V_L 序列。更优选地，包括人 V_L 编码序列的被引入的部分人免疫球蛋白区还包括人 J 基因编码序列和基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 J 基因序列。

[0016] 在某些方面，脊椎动物是哺乳动物，且优选地，哺乳动物是啮齿动物，例如，小鼠或大鼠。在其他方面，脊椎动物是禽类，例如，鸡。

[0017] 在一个具体的方面，本发明提供了一种用于产生包括部分人免疫球蛋白区的非人脊椎动物细胞的方法，所述方法包括：a) 将两个或更多个重组酶靶向位点引入非人脊椎动物细胞中以及在包括内源性免疫球蛋白可变区基因座的基因组区的上游将至少一个位点整合入所述细胞的基因组中并在包括所述内源性免疫球蛋白可变区基因座的基因组区的下游将至少一个位点整合入所述细胞的基因组中；和 b) 将包括人免疫球蛋白可变区编码序列和基于非人脊椎动物宿主的内源性免疫球蛋白可变区的非编码序列的部分人免疫球蛋白可变区基因座经由重组酶介导的交换引入非人脊椎动物宿主细胞中。

[0018] 在该方法的具体的方面，被引入的部分人免疫球蛋白区包括人 V_H 基因编码区，且还包括 i) 人 D 和 J 基因编码序列和 ii) 基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 D 和 J 基因以及前 DJ 序列。优选地使用重组酶靶向位点来将部分人免疫球蛋白区引入宿主细胞中，所述重组酶靶向位点在内源性 V_H 免疫球蛋白基因的上游和内源性 D 和 J 基因区的下游被引入。

[0019] 在其他方面， V_H 基因编码区（至少部分地）源自其他来源 - 例如，它们可以是合理地或以其他方式设计的序列、是人序列和其他设计序列的组合的序列、或来自其他物种例如非人灵长类的序列。

[0020] 在又一个具体的方面，被引入的部分人免疫球蛋白区包括人 V_L 基因编码区，且还包括 i) 人 J 基因编码序列和 ii) 基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 J 基因序列。优选地使用重组酶靶向位点将部分人免疫球蛋白区引入宿主细胞中，所述重组酶靶向位点在内源性 V_L 免疫球蛋白基因的上游和内源性 J 区的下游被引入。优选地，所述重组

酶位点与一个或多个选择性标记一起被引入。

[0021] 优选地,部分人免疫球蛋白区作为单一核酸被合成,且作为单一核酸区被引入非人脊椎动物宿主细胞中。部分人免疫球蛋白区还可以以两个或更多个毗连区段(contiguous segment)被合成,且以这些离散区段(discrete segment)被引入脊椎动物宿主细胞中。优选地,所述可变基因区是 V_H 基因区。部分人核酸还可以使用重组方法来产生,且在将所述核酸引入非人脊椎动物宿主细胞之前被分离。

[0022] 在另一个优选的方面,该方法还提供在步骤 b) 之前缺失侧翼为两个被引入的重组酶位点的基因组区。

[0023] 在另一个方面,本发明提供了用于产生包括部分人免疫球蛋白区的非人脊椎动物细胞的方法,所述方法包括:a) 将不能够彼此重组的两个或更多个位点特异性重组位点引入非人脊椎动物宿主的细胞的基因组中,其中至少一个重组位点在内源性免疫球蛋白可变区基因座的上游被引入,且至少一个重组位点在内源性免疫球蛋白可变区基因座的下游被引入;b) 提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区具有 i) 人免疫球蛋白可变区编码序列和 ii) 基于宿主细胞的内源性免疫球蛋白可变区的非编码序列,其中所述部分人区侧翼为在 a) 的宿主细胞的内源性可变免疫球蛋白区的侧翼的相同的两个位点特异性重组位点;c) 将步骤 b) 的载体以及能够识别两个重组酶位点的位点特异性重组酶引入细胞;d) 允许在 a) 的细胞的基因组和部分人免疫球蛋白区之间发生重组事件,导致用部分人免疫球蛋白区基因座替换内源性免疫球蛋白可变区基因座。在该方法的具体的方面,部分人免疫球蛋白区包括 V_H 免疫球蛋白基因编码序列,且还包括 i) 人 D 和 J 基因编码序列和 ii) 基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 D 和 J 基因以及前 DJ 序列。重组酶靶向位点在内源性 V_H 免疫球蛋白基因的上游和内源性 D 和 J 基因序列的下游被引入。

[0024] 在该方法的另一个具体的方面,方法还提供了在步骤 c) 之前缺失侧翼为两个被引入的重组酶位点的基因组区。

[0025] 在另一个方面,本发明提供一种用于产生包括部分人免疫球蛋白区的非人脊椎动物细胞的方法,所述方法包括:a) 将不能够彼此重组的两个或更多个位点特异性重组位点引入非人脊椎动物宿主的细胞的基因组中,其中至少一个重组位点在内源性 V_H 免疫球蛋白区的上游被引入,且至少一个重组位点在所述内源性 V_H 免疫球蛋白区的下游被引入;b) 提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区具有 i) 人 V_H 编码序列和 ii) 基于所述宿主细胞的所述内源性 V_H 区的非编码序列,其中所述部分人区侧翼为在 a) 的所述宿主细胞的所述内源性 V_H 免疫球蛋白区的侧翼的相同的两个位点特异性重组位点;c) 将步骤 b) 的所述载体以及能够识别所述两个重组酶位点的位点特异性重组酶引入所述细胞中;和 d) 允许在 a) 的所述细胞的所述基因组和所述部分人免疫球蛋白区之间发生重组事件,导致用所述部分人免疫球蛋白区替换所述内源性 V_H 免疫球蛋白区。

[0026] 在该方法的一个具体的方面,其中所述第一重组酶位点可以在包括所述内源性 V_H 免疫球蛋白基因的基因组区的上游被引入,且所述第二重组酶位点可以在包括所述内源性 V_H 免疫球蛋白基因的基因组区的下游被引入。

[0027] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述部分人免疫球蛋白区还可以包括 i) 人 D 和 J 基因编码序列和 ii) 基于所述非人宿主的所述内源性基因组的非编码 D 和 J 基因以及前 DJ 序列。

[0028] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了在步骤 c) 之前缺失侧翼为所述两个被引入的重组酶位点的所述基因组区。

[0029] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述细胞可以是胚胎干 (ES) 细胞。

[0030] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了选择包括所述部分人免疫球蛋白区的细胞和分离所述细胞。

[0031] 在另一个方面,本发明提供一种用于产生包括部分人免疫球蛋白可变区基因座的非人脊椎动物细胞的方法,所述方法包括:a) 将不能够彼此重组的两个或更多个位点特异性重组位点引入非人脊椎动物宿主的细胞的基因组,其中至少一个重组位点在内源性 V_L 免疫球蛋白区的上游被引入,且至少一个重组位点在所述内源性 V_L 免疫球蛋白区的下游被引入;b) 提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区具有 i) 人 V_L 编码序列和 ii) 基于所述宿主细胞的所述内源性 V_L 区的非编码序列,其中所述部分人区侧翼为在 a) 的所述宿主细胞的所述内源性 V_L 免疫球蛋白区的侧翼的相同的两个位点特异性重组位点;c) 将步骤 b) 的所述载体以及能够识别所述两个重组酶位点的位点特异性重组酶引入所述细胞中;和 d) 允许在 a) 的所述细胞的所述基因组和所述部分人免疫球蛋白区之间发生重组事件,导致用所述部分人免疫球蛋白区替换所述内源性 V_L 免疫球蛋白区。

[0032] 在该方法的一个具体的方面,其中所述第一重组酶位点可以在包括所述内源性 V_L 免疫球蛋白基因的基因组区的上游被引入,且所述第二重组酶位点可以在包括所述内源性 V_L 免疫球蛋白基因的基因组区的下游被引入。

[0033] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述部分人免疫球蛋白区还可以包括 i) 人 J_L 基因编码序列和 ii) 基于所述非人宿主的所述内源性基因组的非编码 J_L 基因序列。

[0034] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了在步骤 c) 之前缺失侧翼为所述两个被引入的重组酶位点的所述基因组区。

[0035] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述细胞可以是哺乳动物胚胎干 (ES) 细胞。

[0036] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述细胞可以是禽类原生生殖细胞。

[0037] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了选择包括所述部分人免疫球蛋白区的细胞和分离所述细胞。

[0038] 本发明提供了用于产生转基因非人脊椎动物细胞的又一种方法,所述方法包括:a) 提供具有包括两组位点特异性重组位点的基因组的非人脊椎动物细胞,所述两组位点特异性重组位点不能够彼此重组,且在宿主基因组的内源性免疫球蛋白区的一部分的侧翼;b) 通过引入识别第一组位点特异性重组位点的重组酶来缺失基因组的内源性免疫球蛋白可变区基因座的一部分,其中基因组中的这样的缺失保留第二组位点特异性重组位点;c) 提供包括侧翼为第二组位点特异性重组位点的部分人免疫球蛋白可变区基因座的载体,所述部分人免疫球蛋白可变区基因座包括人编码序列和基于内源性免疫球蛋白可变区的非编码序列;d) 将步骤 c) 的载体和能够识别第二组重组酶位点的位点特异性重组酶引入细胞中;和 e) 允许在细胞的基因组和部分人免疫球蛋白可变区基因座之间发生重组事件,导致用部分人免疫球蛋白可变区基因座替换内源性免疫球蛋白可变区基因座。

[0039] 优选地,用于上述方法中的每一个中的非人哺乳动物细胞是哺乳动物细胞,且更优选地是哺乳动物胚胎干 (ES) 细胞。在其他方面,细胞可以是禽类细胞,且优选地是禽类原生生殖细胞。

[0040] 一旦细胞已经经历内源性免疫球蛋白可变区基因座的替换,包括被引入的部分人免疫球蛋白可变区的细胞就被选择和优选地被分离。在本发明的优选的方面,细胞是非人哺乳动物胚胎干(ES)细胞,且被分离的ES细胞然后被利用来产生表达部分人免疫球蛋白可变区基因座的转基因非人哺乳动物。在其他方面,细胞是原生殖细胞,且被分离的生殖细胞然后被利用来产生表达部分人免疫球蛋白可变区的转基因非人禽类。

[0041] 在另一个方面,本发明提供一种用于产生包括部分人免疫球蛋白区的非人脊椎动物细胞的方法,所述方法包括:a)将不能够彼此重组的两个位点特异性重组位点引入非人脊椎动物宿主的细胞的基因组中;b)提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区具有i)人 V_H 编码序列和ii)基于内源性 V_H 区的非编码序列,其中所述部分人区侧翼为a)的所述宿主细胞的基因组中的相同的两个位点特异性重组位点;c)将步骤b)的所述载体以及能够识别所述两个重组酶位点的位点特异性重组酶引入所述细胞中;d)允许在a)的所述细胞的所述基因组和所述部分人免疫球蛋白区之间发生重组事件,导致用所述部分人免疫球蛋白区替换所述内源性 V_H 免疫球蛋白区。

[0042] 在该方法的一个具体的方面,其中所述部分人免疫球蛋白区还可以包括i)人D和J基因编码序列和ii)基于所述非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码D和J基因以及前DJ序列。

[0043] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了在步骤c)之前缺失侧翼为所述两个被引入的重组酶位点的所述基因组区。

[0044] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述细胞可以是哺乳动物胚胎干(ES)细胞。

[0045] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述细胞可以是禽类原生殖细胞。

[0046] 在该方法的另一个具体的方面,其中所述方法还提供了选择包括所述部分人免疫球蛋白可变区基因座的细胞和分离所述细胞。

[0047] 在具体的方面,本发明提供了一种用于产生包括部分人免疫球蛋白区的非人哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:a)提供具有包含两个位点特异性重组位点的基因组的非人哺乳动物胚胎干(ES)细胞,所述两个位点特异性重组位点不能够彼此重组,且在免疫球蛋白区的一部分的侧翼;b)提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区包括人免疫球蛋白可变区编码序列和基于内源性免疫球蛋白可变区的非编码序列,所述部分人区侧翼为在ES细胞中的免疫球蛋白区的一部分的侧翼的相同的两个位点特异性重组位点;c)使ES细胞和所述载体与能够识别两个重组酶位点的位点特异性重组酶在适当的条件下接触以促进重组事件,导致在ES细胞中用部分人免疫球蛋白区替换内源性免疫球蛋白区的一部分。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了一种用于产生包括部分人免疫球蛋白区的转基因非人哺乳动物的方法,所述方法包括:a)将不能够彼此重组的一个或多个位点特异性重组位点引入非人脊椎动物宿主的细胞的基因组中;b)提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区具有i)人可变编码序列和ii)基于内源性可变区的非编码序列,其中部分人区侧翼为与被引入a)的宿主细胞的基因组的那些位点特异性重组位点相同的位点特异性重组位点;c)将步骤b)的载体和能够识别一组重组酶位点的位点特异性重组酶引入细胞中;d)允许在a)的细胞的基因组和部分人免疫球蛋白区之间发生重组事件,导致用部分人免疫球蛋白区替换内源性免疫球蛋白可变区;e)选择包括部分人免疫球蛋白区

的细胞 ;和 f) 利用该细胞来产生包括部分人免疫球蛋白区的转基因动物。

[0049] 在具体的方面,部分人免疫球蛋白区包括人 V_H 编码区、人 D 和 J 基因编码序列、和基于非人脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码 D 和 J 基因以及前 DJ 序列。然后,位点特异性重组位点在内源性 V_H 免疫球蛋白基因的上游和内源性 D 和 J 基因区的下游被引入。

[0050] 本发明提供了用于产生包括部分人免疫球蛋白区的转基因非人动物的另一种方法,所述方法包括 :a) 提供具有包括两组位点特异性重组位点的基因组的非人脊椎动物细胞,所述两组位点特异性重组位点不能够彼此重组,且在宿主基因组的内源性免疫球蛋白可变区基因座的一部分的侧翼 ;b) 通过引入识别第一组位点特异性重组位点的重组酶来缺失宿主基因组的内源性免疫球蛋白区的一部分,其中基因组中的这样的缺失保留第二组位点特异性重组位点 ;c) 提供包括部分人免疫球蛋白可变区基因座的载体,所述部分人免疫球蛋白可变区基因座具有人编码序列和基于内源性免疫球蛋白可变区基因座的非编码序列,所述内源性免疫球蛋白可变区基因座侧翼为第二组位点特异性重组位点 ;d) 将步骤 c) 的载体和能够识别所述第二组位点特异性重组位点的位点特异性重组酶引入细胞中 ;e) 允许在细胞的基因组和部分人免疫球蛋白可变区之间发生重组事件,导致用部分人免疫球蛋白可变区替换内源性免疫球蛋白区 ;f) 选择包括部分人免疫球蛋白可变区的细胞 ;和 g) 利用该细胞来产生包括部分人免疫球蛋白可变区的转基因动物。

[0051] 本发明提供了用于产生包括部分人免疫球蛋白区的转基因非人哺乳动物的又一种方法,所述方法包括 :a) 提供具有包含两个位点特异性重组位点的基因组的非人哺乳动物胚胎干 (ES) 细胞,所述两个位点特异性重组位点不能够彼此重组,且在免疫球蛋白区的一部分的侧翼 ;b) 提供包括部分人免疫球蛋白区的载体,所述部分人免疫球蛋白区包括人可变编码序列和基于内源性可变基因区的非编码序列,所述部分人区侧翼为在 ES 细胞中的免疫球蛋白区的一部分的侧翼的相同的两个位点特异性重组位点 ;c) 使所述 ES 细胞和所述载体与能够识别两个重组酶位点的位点特异性重组酶在适当的条件下接触以促进重组事件,导致在 ES 细胞中用部分人免疫球蛋白区替换内源性免疫球蛋白区的一部分 ;d) 选择包括核酸的被替换的部分的 ES 细胞和使用所述胚胎干细胞 ;和 e) 利用该细胞来产生包括部分人免疫球蛋白可变区基因座的转基因动物以产生杂合的部分人动物。

[0052] 在本发明的具体的方面,转基因非人脊椎动物是哺乳动物,且优选地,哺乳动物是啮齿动物,例如,小鼠或大鼠。在其他方面,转基因非人脊椎动物是禽类,例如,鸡。

[0053] 本发明的目的是提供表达被引入的免疫球蛋白可变区基因座的非人脊椎动物细胞和非人转基因哺乳动物,所述被引入的免疫球蛋白可变区基因座具有人可变区编码序列和基于内源性宿主基因组的非编码序列。

[0054] 此外,目的是从能够表达具有人 V_H 序列的部分人抗体的转基因动物提供 B- 细胞,其中这样的 B- 细胞被永生化的提供对特定抗原特异性的单克隆抗体的来源。

[0055] 又一个目的是提供从 B 细胞克隆的人可变区,以用于生产和 / 或优化用于诊断和治疗用途的抗体。

[0056] 本发明的另外的目的是提供能够产生具有人可变区序列的部分人单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0057] 在下面更详细地描述这些和其他方面、目的和特征。

[0058] 附图简述

[0059] 图 1 阐明了阐述来自本发明的优选实施方案的一种示例性方法的流程图。

[0060] 图 2 是阐明经由同源性靶向载体将第一组位点特异性重组位点引入非人哺乳动物细胞的基因组的示意图。

[0061] 图 3 是阐明经由同源性靶向载体将第一组位点特异性重组位点引入非人哺乳动物细胞的基因组的另一个示意图。

[0062] 图 4 是阐明经由同源性靶向载体将第二组位点特异性重组位点引入非人哺乳动物细胞的基因组的示意图。

[0063] 图 5 是阐明缺失宿主细胞的内源性免疫球蛋白区的示意图。

[0064] 图 6 是阐明经由位点特异性靶向载体引入部分人免疫球蛋白区的示意图。

[0065] 图 7 是阐明使用位点特异性靶向载体引入包括另外的小鼠序列的部分人免疫球蛋白区的示意图。

[0066] 图 8 是阐明将包括另外的小鼠序列的部分人免疫球蛋白区引入小鼠重链区中的示意图。

[0067] 图 9 是阐明将包括另外的小鼠序列的部分人免疫球蛋白区引入小鼠 κ 区中的示意图。

[0068] 图 10 是阐明将包括另外的小鼠序列的部分人免疫球蛋白区引入小鼠 λ 区中的示意图。

[0069] 图 11 是阐明经由位点特异性靶向载体引入包括人 V_H 小基因 (minigene) 的部分人免疫球蛋白区的示意图。

[0070] 定义

[0071] 本文使用的术语意图具有如由本领域普通技术人员理解的平常的和普通的意思。除非特别表明, 否则以下定义意图帮助阅读者理解本发明, 但不意图改变或以其他方式限制这样的术语的意思。

[0072] 如本文使用的“部分人 (partially human)”是指具有来自人和非人哺乳动物两者的序列的核酸或包括具有来自人和非人哺乳动物两者的序列的核酸的动物。在本发明的部分人序列的上下文中, 部分人核酸具有人免疫球蛋白编码区的序列和基于非人哺乳动物的内源性免疫球蛋白区的非编码序列的序列。当关于来自非人哺乳动物的内源性非编码序列使用时的术语“基于”是指, 对应于非编码序列且与宿主哺乳动物的内源性基因座的非编码序列共有相对高的同源性程度的序列, 宿主哺乳动物例如从其得到 ES 细胞的哺乳动物。优选地, 非编码序列与正向其引入包括该非编码序列的部分人分子的非人脊椎动物宿主细胞的内源性基因座中存在的相应的非编码序列共有至少 80%, 更优选地 90% 同源性。

[0073] 术语“同源性靶向载体”是指包括编码靶向序列的核酸、位点特异性重组位点和任选的选择性标记基因的载体, 其用于在宿主细胞中利用同源性介导的重组来修改免疫球蛋白区。例如, 同源性靶向载体可以用在本发明中以将位点特异性重组位点引入宿主细胞基因组的特定区。

[0074] 如本文使用的术语“免疫球蛋白可变区”是指编码抗体分子的可变区的全部或一部分或控制抗体分子的表达的调控性核苷酸序列的全部或一部分的核苷酸序列。重链的免疫球蛋白区可以包括但不限于 V、D、J 和转换区的全部或一部分, 包括内含子。轻链的免疫球蛋白区可以包括但不限于 V 和 J 区、它们的上游侧翼序列、与轻链恒定区基因相关联

(associated with)或邻近的内含子。

[0075] “位点特异性重组”是指在两个相容的重组位点之间的重组过程,包括以下三个事件中的任一个:a) 缺失侧翼为该重组位点的预选的核酸;b) 反转侧翼为重组位点的预选的核酸的核苷酸序列;和c) 相互交换(reciprocal exchange)位于不同核酸分子上的最接近重组位点的核酸区。应理解,如果核酸分子中的一个或两个是环形的,则核酸区段的这种相互交换导致整合事件。

[0076] 术语“靶向序列”是指与细胞的基因组中在待修改的免疫球蛋白区的区域侧翼或在待修改的免疫球蛋白区的区域邻近出现的DNA序列同源的序列。侧翼或邻近序列可以在基因座本身内或在宿主细胞的基因组中的编码序列的上游或下游。靶向序列被插入用于转染的重组DNA载体中,使得插入细胞基因组中的序列例如重组位点的序列侧翼为载体的靶向序列。

[0077] 如本文使用的术语“位点特异性靶向载体”是指包括编码位点特异性重组位点的核酸、部分人核酸和任选的选择性标记基因的载体,其用于使用重组酶介导的位点特异性重组来修改宿主中的内源性免疫球蛋白区。靶向载体的重组位点适合于与已经插入宿主细胞的基因组序列中(例如,经由同源性靶向载体)、邻近待修改的免疫球蛋白区的另一个相应的重组位点进行位点特异性重组。将部分人序列整合入免疫球蛋白区中的重组位点导致内源性区被引入的部分人区替换。

[0078] 本文使用术语“转基因”来描述已经或即将被人工插入细胞且特别地是脊椎动物宿主动物的细胞的基因组中的遗传物质。如本文使用的术语“转基因”是指部分人核酸,例如,以表达构建体和/或靶向载体的形式的部分人核酸。

[0079] 对于“转基因动物”,是指具有作为在其细胞的一部分中的染色体外元件存在或稳定地整合入其种系DNA中(即,在其大部分或全部细胞的基因组序列中)的外源性核酸序列的非人动物,通常哺乳动物。在本发明中,通过根据本领域熟知的方法对例如宿主动物的胚胎或胚胎干细胞进行遗传操作来将部分人核酸引入这样的转基因动物的种系。

[0080] “载体”包括无论是自我复制的还是不是自我复制的、可以用于转化或转染细胞的质粒和病毒以及任何DNA或RNA分子。

[0081] 发明详细描述

[0082] 除非另外表明,否则本文描述的技术的实践可以采用在本领域内实践的技术人员的技术内的有机化学、聚合物技术、分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学和测序技术的常规技术和说明。这样的常规技术包括聚合物阵列合成、多核苷酸的杂交和连接、和使用标记检测杂交。合适技术的具体阐明可以通过参考本文的实施例得到。然而,当然还可以使用其他等效常规程序。这样的常规技术和描述可以见于标准实验室手册,例如Green等人编辑(1999),Genome Analysis:A Laboratory Manual Series(第I-IV卷);Weiner, Gabriel, Stephens编辑(2007),Genetic Variation:A Laboratory Manual;Dieffenbach,Dveksler编辑(2003),PCR Primer:A Laboratory Manual;Bowtell和Sambrook(2003),DNA Microarrays:A Molecular Cloning Manual;Mount(2004),Bioinformatics:Sequence andGenome Analysis;Sambrook和Russell(2006),Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual;以及Sambrook和Russell(2002),Molecular Cloning:A Laboratory Manual(全部来自Cold Spring

Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (第 4 版) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London; Nelson 和 Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 第 3 版, W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.; 和 Berg 等人 (2002) Biochemistry, 第 5 版, W.H. Freeman Pub., New York, N.Y., 它们全部为了所有的目的通过引用以其整体并入本文。

[0083] 注意如本文和在所附的权利要求中使用的, 除非上下文另外清楚地指示, 否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指示物。因此, 例如, 对“一个基因座”的提及是指一个或多个基因座, 且对“该方法”的提及包括对本领域技术人员已知的等效步骤和方法的提及, 等等。

[0084] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思相同的意思。为了描述和公开可以与目前所描述的发明结合使用的装置、制剂和方法学的目的, 本文提及的所有出版物通过引用并入。

[0085] 当提供值的范围时, 应理解, 在该范围的上限和下限之间的每一个插入值 (intervening value) 和在该所述范围中的任何其他所述值或插入值被包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围中, 且还被包括在本发明内, 服从所述范围中的任何特别地排除的限值。当所述范围包括限值中的一个或两个时, 排除那些被包括的限值中的任一个或两个的范围也被包括在本发明中。

[0086] 在以下描述中, 阐述许多具体的细节以提供对本发明的更充分的理解。然而, 对本领域技术人员来说将明显的是, 在没有这些具体的细节中的一个或多个的情况下可以实践本发明。在其他情况中, 没有描述熟知的特征和本领域技术人员熟知的程序以避免使本发明不清楚。

[0087] 大体的发明

[0088] 在体液免疫系统中, 通过在被称为 V(D)J 重组的过程中 IgH(Igh) 和 IgL 链 (Igl) 基因座位的组合和接合多样化来产生多样化抗体谱。在正在发育的 B 细胞中, 在重链基因座的一个 D 基因区段和一个 J 基因区段之间发生第一重组事件, 且在这两个基因之间的 DNA 被缺失。该 D-J 重组接着是从新形成的 DJ 复合物的上游的区接合一个 V 基因, 形成重排的 V(D)J 基因。现在从单个 B 细胞的基因组缺失在新的 V(D)J 基因的 V 区段和 D 区段之间的所有其他基因。该重排的基因最终在 B 细胞表面上作为 IgH 多肽被表达, 其与 IgL 联合以形成 B 细胞受体。鼠科动物和人 Ig 基因座是高度复杂的, 跨越约 2Mb 的区域, 包含若干恒定区基因区段、J 基因区段、D 基因区段和较大数量的可变基因。

[0089] 本发明提供包括被引入的部分人核酸的非人脊椎动物细胞, 被引入的部分人核酸包括人可变区的编码区和来自脊椎动物宿主基因组的非编码序列, 例如, 当宿主哺乳动物是小鼠时, 小鼠基因组的非编码序列。该部分人核酸允许转基因动物产生包括人 V_H 区的重链谱, 而保留可以在帮助促进有效的抗体产生和抗原识别的特定宿主基因组中的间插序列内见到的调控序列和其他元件。本发明包括使用包括人编码序列和来自 V_H 基因座的非人非编码序列两者的合成的或重组产生的部分人区。

[0090] 因为本发明的方法可以利用在工程化基因组内的两组或更多组位点特异性重组位点, 所以重组步骤允许向部分人基因座进行多重插入。

[0091] 在本发明的优选的方面,待被引入宿主脊椎动物细胞中的该部分人区包括全部或相当大数量的已知的人 V_H 基因。然而,在一些情况下,可能期望能够使用一小组这样的 V_H 基因,且在具体的情况下,甚至至少一个人 V_H 编码序列可以用于本发明的细胞和动物中。

[0092] 本发明的优选的方面包括包含部分人免疫球蛋白基因座的非人哺乳动物和哺乳动物细胞,部分人免疫球蛋白基因座包括人 V_H 基因且还包括 D 和 J 基因人编码区和基于非人哺乳动物宿主的内源性基因组的前 DJ 序列。在某些方面,被引入的部分人区可以包括一个或多个完全重组的 V(D)J 区段。

[0093] 在本发明的具体的方面,转基因非人哺乳动物包括被引入的核酸,被引入的核酸包括具有基于非人哺乳动物宿主基因座中的间插序列的间插序列的多个人 V_H 基因以及人 D 和 J 基因的人编码区。在特别优选的方面,部分人核酸包括人 V_H 基因、基于非人哺乳动物宿主的基因组例如小鼠基因组的前 D 区、以及人 D 和 J 外显子。

[0094] 在示例性的实施方案中,如在实施例部分中更详细阐述的,小鼠的全部内源性 V_H 免疫球蛋白基因座(包括 J558 基因座)被缺失,且小鼠的 J558 V_H 区基因座的 V_H 外显子被包括 44 个人 V_H 基因的核酸代替,其因此,被点缀有对应于小鼠的非编码序列的非编码区。完整的被引入的免疫球蛋白 V_H 区还包括人 D 和 J 外显子以及 V_H 基因。在该方面,10Kb 前 D 区包括小鼠序列,而 D 和 J 区包括人编码序列。优选地, D 和 J 区作为包括人 D 基因和人 J 基因的人 DJ 编码区被提供。

[0095] 本发明的方法利用同源重组和位点特异性重组的组合来产生本发明的细胞和动物。同源性靶向载体首先用于在内源性免疫球蛋白基因座的所需位置处将位点特异性重组位点引入宿主哺乳动物基因组中。经由相关联的靶向序列与基因组 DNA 在体内的同源重组将位点特异性重组位点插入基因组序列优选地不会修改由转染细胞表达的抗体分子的氨基酸序列。该方法保持免疫球蛋白基因的正确转录和翻译,这在插入重组位点和任选的任何另外的序列例如选择性标记基因之后产生所需的抗体。然而,在一些情况下,可以将重组酶位点和其他序列插入免疫球蛋白基因座序列中,使得抗体分子的氨基酸序列通过插入而被改变,但抗体仍保留用于所需目的足够功能性,且本发明设想也包括这样的插入。

[0096] 示例性的同源重组方法学被描述在美国专利第 6,689,610 号;第 6,204,061 号;第 5,631,153 号;第 5,627,059 号;第 5,487,992 号;和第 5,464,764 号中,它们中的每一个通过引用以其整体并入。

[0097] 在本发明的具体的方面,同源性靶向载体可以用来替换在同源性基因组内的某些序列以及引入位点特异性重组位点和选择性标记。例如,用于在 V_H 基因区的 3' 引入元件的同源性靶向可以用于使用人等效物替换小鼠前 D 和 DJ 序列。

[0098] 位点特异性重组

[0099] 位点特异性重组不同于一般的同源重组,因为重组酶识别所需要的短的特异性 DNA 序列是发生重组的唯一位点。位点特异性重组需要专用的重组酶来识别位点和在这些位点处催化重组。许多噬菌体和酵母衍生的位点特异性重组系统,各自包括重组酶和特异性同源位点,已经被表明在真核细胞中对于 DNA 整合的目的起作用,且因此适合用于本发明中,且这些包括位点特异性重组酶的酪氨酸家族的噬菌体 P1 Cre/lox、酵母 FLP-FRT 系统和 Dre 系统。这样的系统和使用方法被描述在例如美国专利第 7,422,889 号;第 7,112,715 号;第 6,956,146 号;第 6,774,279 号;第 5,677,177 号;第 5,885,836 号;第

5,654,182号;和4,959,317号中,它们通过引用并入本文,以教导使用这样的重组酶的方法。重组酶介导的盒式交换(RMCE)程序通过使用野生型和突变的loxP(或FRT等)位点连同阴性选择的组合来促进。然而,当仅使用非突变位点和/或在没有选择的情况下时,重组酶介导的盒式交换程序将发生。但效率是非常低的,因为有利于切除而不是插入反应且(没有结合阳性选择)将不存在适当突变的细胞的富集。

[0100] 已知酪氨酸家族的其他系统例如噬菌体 λ Int整合酶、HK2022整合酶以及另外属于重组酶的单独的丝氨酸家族的系统例如噬菌体phiC31、R4Tp901整合酶在哺乳动物细胞中使用它们相应的重组位点起作用(Tranche, F. 等人2002),且还可适用于本发明。

[0101] 本发明的方法优选地利用位点特异性重组位点,该位点特异性重组位点利用相同的重组酶,但不会促进在位点之间的重组。例如,Lox P位点和突变的Lox P位点可以被整合入宿主的基因组中,但将Cre引入宿主中将不会使这两个位点有利于重组;相反,LoxP位点将与另一个LoxP位点重组,且突变的位点将仅与另一个同样突变的LoxP位点重组。这样的突变的重组位点的实例包括包含反向重复序列的组的那些或包括具有突变的间隔序列的重组位点的那些。例如,两类变异重组酶位点可用于工程化稳定的Cre-loxP整合重组。两者采用在8bp间隔区内或在13-bp反向重复序列内的Cre识别序列中的序列突变。间隔突变体例如lox511(Hoess RH等人,Nucleic Acids Res1986,14:2287-2300)、lox5171和lox2272(Lee G和Saito I, Gene1998,216:55-65)、m2、m3、m7和m11(Langer SJ等人,Nucleic Acids Res2002,30:3067-3077)容易地与它们自己重组,但与野生型位点具有显著降低的重组率。该类突变体通过重组酶介导的盒式交换(RMCE)使用不互相作用的Cre-Lox重组位点和不互相作用的FLP重组位点而被开发用于DNA插入(Baer A和Bode J, Curr Opin Biotechnol2001,12:473-480;Albert H等人, Plant J1995,7:649-659;Seibler J和Bode J, Biochemistry1997,36:1740-1747;Schlake T和Bode J, Biochemistry1994,33:12746-12751)。

[0102] 反向重复突变体表示第二类变异重组酶位点。例如,LoxP位点可以包含在左反向重复序列(LE突变体)或右反向重复序列(RE突变体)中的改变的碱基。LE突变体lox71在左反向重复序列的5'端具有从野生型序列改变成TACCG的5bp(Araki K等人, Nucleic Acids Res1997,25:868-872)。同样地,RE突变体lox66具有改变成CGGTA的五个最3'端碱基(3'-most base)。反向重复突变体用于将质粒插入片段整合入具有LE突变体的染色体DNA,其中LE突变体被指定为“靶”染色体loxP位点,“供体”RE突变体重组入其中。重组后的loxP位点以顺式定位,在所插入的区段的侧翼。重组机制是使得重组后的一个loxP位点是双重突变体(包含LE和RE反向重复突变两者),且另一个是野生型(Lee L和Sadowski PD, Prog Nucleic Acids Res Mol Biol2005,80:1-42;Lee L和Sadowski PD, J Mol Biol2003,326:397-412)。双重突变体充分地不同于野生型位点,其不被Cre重组酶识别,且插入的区段不被切除。

[0103] 在某些方面,位点特异性重组位点可以被引入内含子而不是编码核酸区或调控序列中。这可以在将位点特异性重组位点插入动物细胞的基因组中之后避免疏忽地干扰适当的抗体表达所需的任何调控序列或编码区。

[0104] 位点特异性重组位点的引入可以通过常规同源重组技术来实现。这样的技术被描述在参考文献,例如诸如Sambrook和Russell(2001)(Molecular cloning:a laboratory

manual 第 3 版 (Cold Spring Harbor, N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press) 和 Nagy, A. (2003). (Manipulating the mouse embryo:a laboratory manual, 第 3 版 (Cold Spring Harbor, N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press)。Frederic P.Miller, Agnes F.Vandome 和 John McBrewster 的 Genetic Recombination:Nucleic acid, Homology(biology), Homologous recombination, Non-homologous end joining, DNA repair, Bacteria, Eukaryote, Meiosis, Adaptive immune system, V(D)J recombination(平装本 -2009 年 12 月 23 日)。

[0105] 特异性重组入基因组可以使用设计为如本领域已知的阳性或阴性选择的载体来促进。为了利于识别已经经历替换反应的细胞,可以采用适当的遗传标记系统,且通过例如使用选择性培养基来选择细胞。然而,为了确保基因组序列在替换间隔的两个端点处或邻近两个端点基本上不含外来核酸序列,期望在选择包含被替换的核酸的细胞之后,可以除去标记系统/基因。

[0106] 在本发明的方法的一个优选的方面,已经发生内源性免疫球蛋白的全部或一部分的替换的细胞,在暴露于毒素或药物之后被阴性地选择。例如,保留 HSV-TK 的表达的细胞可以通过适当使用核苷类似物例如更昔洛韦来选择。在本发明的另一个方面,包括内源性免疫球蛋白区的缺失的细胞可以通过使用标记基因而被阳性地选择,标记基因可以在重组事件之后或由于重组事件而任选地被从细胞除去。可以被使用的阳性选择系统是基于使用标记基因例如 HPRT 的两个非功能部分,这两个非功能部分通过重组事件而被结合在一起。在进行成功的替换反应之后,使这两个部分实现功能关联(functional association),且其中功能上重新构建的标记基因在侧翼的任一侧上为另外的位点特异性重组位点(其不同于用于替换反应的位点特异性重组位点),使得使用适当的位点特异性重组酶,可以从基因组切除标记基因。

[0107] 重组酶可以作为纯化蛋白或在细胞内被瞬时表达以便提供重组酶活性的构建体而被提供。可选择地,细胞可以用于产生转基因动物,该转基因动物可以与表达所述重组酶的动物杂交,以便产生缺乏标记基因和相关联的重组位点的后代。

[0108] 转基因动物的产生

[0109] 在具体的方面,本发明提供用于产生包括被引入的部分人免疫球蛋白区的转基因动物的方法。

[0110] 在一个方面,用于替换内源性免疫球蛋白基因的宿主细胞是胚胎干(ES)细胞,该胚胎干(ES)细胞然后可以用于产生转基因哺乳动物。因此,根据一个方面,本发明的方法还包括:分离包括被引入的部分人免疫球蛋白区的胚胎干细胞和使用所述 ES 细胞来产生包含被部分替换的免疫球蛋白基因座的转基因动物。

[0111] 在另一个实例,转基因动物是禽类,且使用原生殖细胞来生产动物。因此,根据另一个方面,本发明的方法还包括:分离包括被引入的部分人免疫球蛋白区的原生殖细胞和使用所述生殖细胞来产生包含被部分替换的免疫球蛋白基因座的转基因动物。用于生产这样的转基因禽类的方法被公开在例如美国专利第 7,323,618 号和第 7,145,057 号,它们通过引用并入本文。

实施例

[0112] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开内容和描述,且不意图限制发明人认为是他们的发明的内容的范围,它们也不意图表示或暗示下面的实验是所进行的所有实验或唯一实验。本领域技术人员应明白,可以对如在具体的实施方案中所显示的本发明进行许多变化和/或修改,而不偏离如广泛描述的本发明的精神或范围。因此,呈现的实施方案在各个方面应被认为是说明性的而不是限制性的。

[0113] 已经努力确保关于所使用的术语和数字(例如,载体、量、温度等)的准确性,但应考虑到一些实验误差和偏差。除非另外表明,否则份是重量份,分子量是重均分子量,温度是以摄氏度计,且压力是大气压或接近大气压。

[0114] 实施例阐释了通过在重组位点侧翼的 5' 载体和 3' 载体两者的靶向和合成的 DNA 的引入。在阅读说明书之后,对本领域技术人员将是明显的是,可以首先发生 5' 载体靶向,接着发生 3' 载体靶向,或可以发生 3' 载体靶向,接着发生 5' 载体靶向。在一些情况下,靶向可以同时用双检测机制来进行。

[0115] 实施例 1:将部分人免疫球蛋白区引入小鼠基因组的 V_H 基因座位。

[0116] 在图 1-6 中阐明用部分人免疫球蛋白区替换哺乳动物基因组的一部分的示例性方法。图 1 示出阐明本发明的方法的该示例性方面的不同步骤的流程图。该方法提供了将第一位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组中,其可以在哺乳动物基因组的内源性 V_H 区的 5' 或 3' 被引入。然后,这接着是将第二位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组 102,第二位点特异性重组位点与第一位点特异性重组位点组合位于内源性免疫球蛋白区侧翼。侧翼的内源性区被缺失 104,且包括人序列和非人序列两者的合成核酸经由重组酶介导的交换被引入 106。

[0117] 阐明将部分人小鼠-人免疫球蛋白区引入小鼠 ES 细胞的基因组的基因座的示例性方法在图 2-6 中更详细地阐明。在图 2 中,提供包括嘌呤霉素磷酸转移酶-胸苷激酶融合蛋白 (puro Δ TK) 203 的同源性靶向载体 201,嘌呤霉素磷酸转移酶-胸苷激酶融合蛋白 (puro Δ TK) 203 侧翼为两个不同的重组酶识别位点,例如,对于 F1p 和 Cre 的 FRT207 和 loxP205,和分别不具有与未修饰位点 207 和 205 重组的能力的例如对于 FRT209 和 loxP211 的修饰位点。靶向载体包括人白喉毒素受体 (hDTR) cDNA217,以供在未来的步骤中表达被引入的构建体的细胞的阴性选择中使用。靶向载体还任选地包括视觉标记,例如绿色荧光蛋白 (GFP) (未示出)。区 213 和 215 分别与内源性小鼠基因座中的毗连区 (contiguous region) 223 的 5' 和 3' 部分同源,内源性小鼠基因座中的毗连区 223 是包括小鼠内源性 V_H 基因的基因组区 219 的 5'。同源性靶向载体 201 被引入 202 小鼠 ES 细胞,小鼠 ES 细胞具有包括免疫球蛋白区的内源性 V_H 基因 219、前 D 区 221、J 基因区 225 和恒定基因区 227 的免疫球蛋白区 229。同源性靶向载体 201 的位点特异性重组位点和 hDTR cDNA217 被整合 204 入小鼠基因组中小鼠内源性 V_H 基因区的 5'。

[0118] 图 3 实际上阐明与图 2 相同的方法,除了加入另外的一组位点特异性重组位点,例如,用于与 Dre 重组酶一起使用的 Rox 位点 331 和修饰的 Rox 位点 333。在图 3 中,提供包括嘌呤霉素磷酸转移酶-胸苷激酶融合蛋白 303 的同源性靶向载体 301,嘌呤霉素磷酸转移酶-胸苷激酶融合蛋白 303 侧翼为重组酶识别位点 FRT307、loxP305 和 Rox331,以及分别不具有与未修饰位点 307、305 和 331 重组的能力的对于 FRT309、loxP311 和 Rox333 的

修饰位点。靶向载体还包括人白喉毒素受体 (hDTR) cDNA317。区 313 和 315 分别与内源性小鼠基因座中的毗连区 323 的 5' 部分和 3' 部分同源,内源性小鼠基因座中的毗连区 323 位于包括小鼠内源性 V_H 基因的基因组区 319 的 5'。同源性靶向载体 301 被引入 302 小鼠免疫球蛋白区 329,小鼠免疫球蛋白区 329 包括免疫球蛋白区的内源性 V_H 基因 319、前 D 区 321、J 基因区 325 和恒定基因区 327。同源性靶向载体 301 的位点特异性重组位点和 hDTR cDNA317 被整合 304 入小鼠基因组中小鼠内源性 V_H 基因区的 5'。

[0119] 如图 4 阐明的,提供了第二同源性靶向载体 401,第二同源性靶向载体 401 包括次黄嘌呤转磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 小基因 435 和新霉素抗性基因 437 以及对于 F1p 和 Cre 的重组酶识别位点 FRT407 和 loxP405,重组酶识别位点 FRT407 和 loxP405 具有与从第一同源性靶向载体整合的 FRT407 和 loxP405 位点重组的能力。区 431 和 433 分别与内源性小鼠基因座中的毗连区 441 的 5' 部分和 3' 部分同源,内源性小鼠基因座中的毗连区 441 位于包括小鼠内源性 V_H 、D 和 J 基因的基因组区的 3' 和恒定基因区的 5'。同源性靶向载体 401 被引入 402 修改的小鼠免疫球蛋白区,该修改的小鼠免疫球蛋白区包括内源性 V_H 基因 419、前 D 区 421、J 基因区 425 和恒定基因区 427。同源性靶向载体 401 的位点特异性重组位点和 HPRT 小基因 435 以及新霉素抗性基因 437 被整合 404 入小鼠基因组中小鼠内源性 V_H 基因区的 5'。

[0120] 一旦重组位点被引入宿主哺乳动物的基因组,然后通过引入对应于基因组中的位点特异性重组位点的重组酶中的一种(在该实施例中为 FLP 或 Cre),使免疫球蛋白域的内源性区经历重组。如图 5 阐明的,当 FLP 被引入 502 时,包含位点特异性重组位点 (509、511、507 和 505) 和 puro Δ TK 基因 503 的区被保留,且另外的 FLP 重组位点 507 现在存在于其他两个重组位点 507 和 505 的 3'。包括 hDTR517、内源性免疫球蛋白域 (519、521、525) 以及使用第二同源性靶向载体引入的 HPRT527 和 Neo529 基因的位于重组位点 3' 的区被缺失。当 Cre 用于重组酶介导的缺失 504 时,缺失的区域是相同的,但仅一个位点特异性重组位点 507 直接继续保留在 puro Δ TK 基因的 3'。该程序取决于已经在相同的染色体上而不是在其同源物上(即,以顺式而不是以反式)发生的第二靶向。如果靶向以反式发生,则细胞在 Cre 重组之后将对阴性选择不敏感。

[0121] 对于缺失内源性免疫球蛋白区的初级筛选可以通过 DNA 印迹来进行,或使用聚合酶链反应 (PCR) 初筛来进行,所述聚合酶链反应 (PCR) 初筛被用 Southern 筛选和 / 或天然等位基因丢失 qPCR 筛选 (loss-of-native allele qPCR screen) 的次级筛选 (secondary screen) 所支持。HPRT 将允许 HPRT 缺陷的 ES 细胞中的 (6- 硫鸟嘌呤依赖性) 阴性选择。免疫球蛋白区被缺失的 ES 细胞可以通过阴性选择使用 hDTR 基因来选择。

[0122] 图 6 阐明将部分人序列引入修饰的小鼠基因组。包括待被引入哺乳动物宿主基因组的部分人免疫球蛋白区 610 的位点特异性靶向载体 629 被引入 602 包括位点特异性重组位点 (609、611、607 和 605) 和 puro Δ TK 基因 603 的具有已缺失的内源性免疫球蛋白区的基因组区 601。位点特异性靶向载体包括部分人免疫球蛋白区,该部分人免疫球蛋白区包括 i) V_H 区 619,其包括 44 个人 V_H 编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列; ii) 10kb 前 DJ 区 621,其包括小鼠序列; 和 iii) DJ 区 625,其包括人 D 和 J 基因编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列。部分人免疫球蛋白区侧翼为将允许与修饰的内源性基因座重组的重组位点 (609、611、605 和 607)。在引入适当的重组酶 604 之后,部分人免疫球蛋白区在

恒定基因区 627 的上游被整合入基因组。

[0123] 对于引入部分人免疫球蛋白区的初级筛选可以通过 DNA 印迹来进行,或使用 PCR 初筛来进行,所述 PCR 初筛被用 Southern 筛选和 / 或天然等位基因丢失 qPCR 筛选的次级筛选所支持。作为重组事件的一部分的 HPRT 基因 605 的缺失将允许使用 (6- 硫鸟嘌呤依赖性) 阴性选择来鉴定未经历重组事件的细胞。

[0124] 实施例 2 :将部分人免疫球蛋白区引入小鼠基因组。

[0125] 在某些方面,部分人免疫球蛋白区将包括如实施例 1 所描述的元件,但具有另外的序列,例如,在战略上被加入以引入另外的调控序列,以确保在被引入的免疫球蛋白区内的所需的间距,以确保某些编码序列与邻近被替换的免疫球蛋白区的其他序列足够并置 (juxtaposition) 等的序列。图 7 阐明将第二示例性的部分人序列引入如图 2-5 产生的和上面实施例 1 所描述的修饰的小鼠基因组。

[0126] 包括待被引入哺乳动物宿主基因组的部分人免疫球蛋白区 710 的位点特异性靶向载体 729 被引入 702 包括位点特异性重组位点 (709、711、707 和 705) 和 puro Δ TK 基因 703 的具有已缺失内源性免疫球蛋白区的基因组区 701。位点特异性靶向载体包括部分人免疫球蛋白区,该部分人免疫球蛋白区包括 i) V_H 区 719,其包括 1-43 个人 V_H 编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列 ;ii) 10kb 前 DJ 区 721,其包括小鼠序列 ;iii) DJ 区 725,其包括人 D 和 J 编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列 ;和 iv) 小鼠非功能 J_H 基因区。部分人免疫球蛋白区侧翼为将允许与修饰的内源性基因座重组的重组位点 709、711、705 和 707)。在引入适当的重组酶 704 之后,部分人免疫球蛋白区在恒定基因区 727 的上游被整合入基因组。

[0127] 如实施例 1 所描述的,对于引入部分人免疫球蛋白区的初级筛选可以通过 DNA 印迹来进行,或使用 PCR 初筛来进行,所述 PCR 初筛被用 Southern 筛选和 / 或天然等位基因丢失 qPCR 筛选的次级筛选所支持。作为重组事件的一部分的 HPRT 基因 705 的缺失将允许使用 (6- 硫鸟嘌呤依赖性) 阴性选择来鉴定未经历重组事件的细胞。

[0128] 实施例 3 :将部分人免疫球蛋白区引入小鼠基因组的免疫球蛋白重链基因座位。

[0129] 图 8 中阐明使用部分人免疫球蛋白区替换哺乳动物基因组的一部分的方法。该方法利用将第一位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组,接着将第二位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组。两个位点在 V_H 、 D_H 和 J_H 区基因区段的整个簇的侧翼。使用相关联的位点特异性重组酶缺失侧翼的内源性区,如本文描述的。

[0130] 用于在野生型小鼠免疫球蛋白区 801 的 V_H 、 D_H 和 J_H 区基因区段簇的任一侧上引入位点特异性重组酶位点的靶向载体 803、805 包括另外的位点特异性重组酶位点,该另外的位点特异性重组酶位点已经被修饰,使得其仍被重组酶有效地识别,但将不与未修饰位点重组。该位点在靶向载体中的定位使得在缺失 V_H 、 D_H 和 J_H 区基因区段簇之后,其可以用于 DNA 的非天然段移动到修饰的 V_H 基因座中的第二位点特异性重组事件。使用位点特异性重组酶使 DNA 移动到基因座中的过程被称为“重组酶介导的盒式交换”。在该实施例中,非天然 DNA 是包括人序列和非人序列两者的合成核酸。

[0131] 两个基因靶向载体被构建以完成刚才概述的过程。载体之一 803 在最远端的可变区基因区段的上游包括从基因座的 5' 端获得的小鼠基因组 DNA。另一个载体 805 在 J 区基因区段附近包括从基因座内获得的小鼠基因组 DNA。

[0132] 5' 载体 803 的按从 5' 至 3' 的次序的主要特征如下:在偶联于来自多瘤病毒的两个突变的转录增强子的修饰的单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因启动子的转录控制下的编码白喉毒素 A(DTA) 亚基的基因;定位在重链基因座中的最远端的可变区基因区段的上游的 4.5Kb 小鼠基因组 DNA;J 区基因区段(失效的);Flp 重组酶的 FRT 识别序列;包含小鼠 Polr2a 基因启动子的一段基因组 DNA;翻译起始序列(嵌入“Kozak”共有序列中的甲硫氨酸密码子);Cre 重组酶的突变的 loxP 识别序列(已知为 lox5171 位点);转录终止/多聚腺苷酸序列;Cre 重组酶的 loxP 识别序列;在来自小鼠磷酸甘油酸激酶 1 基因的启动子的转录控制下的编码由融合至胸苷激酶的截短形式的给予对嘌呤霉素的抗性的蛋白组成的融合蛋白(pu-TK)的基因;和定位为接近于载体中的 4.5Kb 序列且以天然相对定向布置的 3Kb 小鼠基因组 DNA。

[0133] 3' 载体 805 的按从 5' 至 3' 的次序的主要特征如下:在偶联于来自多瘤病毒的两个突变的转录增强子的修饰的单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因启动子的转录控制下的编码白喉毒素 A(DTA) 亚基的基因;包含小鼠 J 区基因区段的 3.7Kb 小鼠基因组 DNA,该 3.7Kb 小鼠基因组 DNA 被定向为使得定位为最接近重链可变区基因区段的区的端部最接近载体中的 DTA 基因;在小鼠 Polr2a 基因启动子的转录控制下的编码人黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基转移酶(HPRT)的小基因;在小鼠磷酸甘油酸激酶 1 基因启动子的控制下的新霉素抗性基因;Cre 重组酶的 loxP 识别序列;和 2.1Kb 小鼠基因组 DNA,其在基因组中的定位为刚好在 3.7Kb 片段的下游且以与在小鼠基因组中的配置相同的配置定向这两个片段。

[0134] 小鼠胚胎干(ES)细胞(源自 C57Bl/6NTac 小鼠)根据广泛使用的程序通过使用 3' 载体 805 电穿孔来转化。在电穿孔之前,载体 DNA 用 NotI 限制性内切酶来线性化。已转染的细胞被铺板,且在 ≥ 24 小时之后,将它们放置在使用新霉素类似物 G418 的药物选择下。在一个多星期之后在抗药性 ES 细胞集落变得凭肉眼可见之后,将抗药性 ES 细胞集落用物理方法从它们的板提取。将这些选定的集落解聚,重新铺板在微孔板上,并培养若干天。此后,分开细胞克隆中的每一个,使得细胞中的一些可以作为档案(archive)被冷冻,且其余为分析的目的用于分离 DNA。

[0135] 来自 ES 细胞克隆的 DNA 通过 PCR 利用广泛使用的基因-靶向测定设计来筛选。使用四个测定,且在每一种情况下,PCR 寡核苷酸引物序列中的一个映射(map)在 3' 载体 805 和基因组 DNA 之间共有的同一性的区域外部,而另一个映射在载体中的基因组同一性的两个臂之间的新 DNA 内(即,在 HPRT 或 neo 基因元件中)。根据标准设计,这些测定被设计为检测仅在源自转染细胞的细胞克隆中存在的 DNA 段,转染细胞已经经历在 3' 重靶向载体(3' heavy targeting vector)和基因组之间完全合理的同源重组。

[0136] 使用 3' 载体 805 进行两次单独的转染。这些中的第一次使用四个 PCR 测定从筛选的约 300 个克隆产生总共两个阳性克隆。第二次也从所筛选的约 300 个克隆产生总共六个阳性克隆。来自两次转染的总共六个 PCR- 阳性克隆被选择用于增殖,随后使用 DNA 印迹测定来进一步分析。

[0137] DNA 印迹测定根据广泛使用的程序使用三个探针和用多种限制性内切酶消化的基因组 DNA 来进行,多种限制性内切酶被选择为使得探针和消化的组合允许克隆中被靶向的基因座的结构被鉴定为被同源重组适当地修饰。探针中的一个映射在 3' 重靶向载体和基因组 DNA 之间共有的同一性的区域的一侧侧翼的 DNA 序列;第二探针映射在同一性的区域

的外部但在其另一侧；且第三探针映射在载体中的基因组同一性的两个臂之间的新 DNA 内（即，在 HPRT 或 neo 基因元件中）。

[0138] ES 细胞的六个 PCR- 阳性克隆使用被设计为辨别在小鼠 ES 细胞中出现的最通常出现的染色体畸变的原位荧光杂交程序来核型分析。具有这样的畸变的克隆被从进一步使用中排除。基于 DNA 印迹数据被判断为具有预期的正确基因组结构且基于核型分析也不具有可检测的染色体畸变的 ES 细胞克隆，被选择用于进一步使用。

[0139] 用 5' 载体 803 来修饰可接受的克隆，除了使用嘌呤霉素选择代替 G418/ 新霉素选择之外，使用在设计上与 3' 载体 805 使用的那些程序和筛选测定基本上相同的程序和筛选测定。PCR 测定、探针和消化还被定制为匹配通过 5' 载体 805 修饰的基因组区。

[0140] 已经以预期方式通过 3' 重载体和 5' 重载体两者突变的 ES 细胞克隆，即，携带两个工程化突变的双靶向细胞在载体靶向之后被分离。克隆必须已经在同一染色体而不是同源染色体上经历基因靶向（即，由靶向载体产生的工程化突变必须是以顺式在同一 DNA 链上而不是以反式在单独的同源 DNA 链上）。通过分析程序例如中期染色体涂染（metaphase spread）的荧光原位杂交，使用与存在于两个基因靶向载体中在它们的基因组同一性的臂之间的新 DNA 杂交的探针，来辨别具有顺式布置的突变的克隆和具有反式布置的那些。两种类型的克隆还可以通过如下方式被彼此辨别：用表达 Cre 重组酶的载体转染它们和然后比较在针对通过 5' 载体 803 引入的胸苷激酶基因的更昔洛韦选择下存活的集落数量以及通过“亲缘种选择”筛选程序来分析存活克隆的抗药性表型，在“亲缘种选择”筛选程序中测试来自该克隆的细胞中的一些对嘌呤霉素或 G418/ 新霉素的抗性。在该类型的实验中，具有顺式布置的突变的细胞预期比具有反式布置的细胞产生多约 10^3 个更昔洛韦抗性克隆。大部分所得到的顺式衍生的更昔洛韦抗性克隆还对嘌呤霉素和 G418/ 新霉素两者敏感，与应保留对两种药物的抗性的反式衍生的更昔洛韦抗性克隆相反。在重链基因座中具有顺式布置的工程化突变的细胞的双靶向克隆被选择用于进一步使用。

[0141] 细胞的双靶向克隆用表达 Cre 重组酶的载体来转染，且随后将被转染的细胞放置在更昔洛韦选择之下，如在上面概述的分析实验中的。将细胞的更昔洛韦抗性克隆分离，并通过 PCR 和 DNA 印迹来分析通过 5' 重靶向载体和 3' 重靶向载体产生的两个工程化突变之间的预期的缺失的存在。在这些克隆中，Cre 重组酶使得在通过两个载体引入重链基因座中的 loxP 位点之间发生重组 802 以产生在 807 中示出的构建体。因为 loxP 位点在两个载体中以相同的相对定向被布置，所以重组导致包括在两个 loxP 位点之间的完整基因组间隔的 DNA 环的切除。该环并不包含复制起点且因此在有丝分裂期间将不被复制，且因此当它们经历克隆增殖时将从细胞的克隆丢失。所得到的克隆携带最初在两个 loxP 位点之间的 DNA 缺失。

[0142] 在免疫球蛋白重链基因座的两个同源拷贝中的一个中携带序列缺失的 ES 细胞克隆用 Cre 重组酶表达载体连同包括部分人免疫球蛋白重链基因座的一段 DNA809 来再转染 804，部分人免疫球蛋白重链基因座包含 V、D 和 J 区基因区段。这段 DNA809 的主要特征如下：lox5171 位点；新霉素抗性基因开放阅读框（缺乏起始甲硫氨酸密码子，但在框内且与 lox5171 位点中的不间断的开放阅读框毗连）；转录终止 / 多聚腺苷酸序列；FRT 位点；44 个人重链可变区基因区段的阵列，每一个由嵌入小鼠非编码序列的人编码序列组成；来自刚好在小鼠重链基因座中的 D 区基因区段的簇的上游的 7.5Kb 基因组 DNA 段；包含人 D 和

J 区基因区段的 58Kb DNA 段 ; 以与 lox5171 位点相反的相对定向的 loxP 位点。

[0143] 将被转染的克隆放置在 G418 选择之下, G418 选择富集已经经历重组酶介导的盒式交换过程的细胞克隆, 在重组酶介导的盒式交换过程中部分人供体 DNA809 以其整体被整合入在 loxP 和 lox5171 位点之间被缺失的免疫球蛋白重链基因座中, 以产生在 811 阐明的 DNA 区。来自 5' 载体 803 的剩余元件经由 FLP 介导的重组 806 来除去, 导致如 813 所示的最终的人源化基因座。

[0144] G418 抗性 ES 细胞克隆通过 PCR 和 DNA 印迹来分析, 以确定它们是否已经经历预期的重组酶介导的盒式交换过程而没有不需要的重排或缺失。具有预期的基因组结构的克隆被选择用于进一步使用。

[0145] 根据标准程序, 将在小鼠重链基因座中携带部分人免疫球蛋白重链 DNA813 的 ES 细胞克隆显微注射入来自品系 DBA/2 的小鼠胚泡中, 以产生部分 ES 细胞衍生的嵌合小鼠。对其皮毛 (coat) 具有最高水平的 ES 细胞衍生的贡献的雄性嵌合小鼠将被选择用于与雌性小鼠交配。此处选择的雌性小鼠将具有 C57Bl/6NTac 品系, 且还将携带编码在它们的种系中被表达的 Flp 重组酶的转基因。对来自这些交配的后代分析部分人免疫球蛋白重链基因座的存在, 和分析在重组酶介导的盒式交换步骤中产生的侧翼为 FRT 的新霉素抗性基因的丢失。携带部分人基因座的小鼠将用于建立小鼠群体。

[0146] 实施例 4 : 将部分人免疫球蛋白区引入小鼠基因组的免疫球蛋白 κ 链基因座位。

[0147] 图 9 中阐明使用部分人免疫球蛋白区替换哺乳动物基因组的一部分的另一种方法。该方法提供将第一位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组, 其可以在哺乳动物基因组的 V_k 和 J_k 区基因区段的主要簇的 5' 或 3' 被引入 ; 接着将第二位点特异性重组位点引入哺乳动物基因组, 其与第一位点特异性重组位点组合在 V_k 和 J_k 区基因区段的整个簇的侧翼。然后可以使用相关联的位点特异性重组酶来缺失和替换侧翼的内源性区。

[0148] 用于在 V_k 和 J_k 区基因区段簇 901 的任一侧上引入位点特异性重组酶位点的靶向载体还包括另外的位点特异性重组酶位点, 该另外的位点特异性重组酶位点已经被修饰, 使得其仍被重组酶有效地识别, 但将不与未修饰位点重组。该位点在靶向载体中的定位使得在缺失 V_k 和 J_k 区基因区段簇之后, 其可以用于第二位点特异性重组事件, 其中 DNA 的非天然段经由重组酶介导的盒式交换移动到修饰的 V_k 基因座。在该实施例中, 非天然 DNA 是包括人序列和非人序列两者的合成核酸。

[0149] 两个基因靶向载体被构建以完成刚才概述的过程。载体 903 中的一个在最远端的可变区基因区段的上游包括从基因座的 5' 端获得的小鼠基因组 DNA。另一个载体 905 在 J 区基因区段附近包括从基因座内获得的小鼠基因组 DNA。

[0150] 5' 载体 903 的主要特征如下 : 在偶联于来自多瘤病毒的两个突变的转录增强子的修饰的单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因启动子的转录控制下的编码白喉毒素 A (DTA) 亚基的基因 ; 定位在 κ 链基因座中的最远端的可变区基因区段的上游的 6Kb 小鼠基因组 DNA ; Flp 重组酶的 FRT 识别序列 ; 包含小鼠 Polr2a 基因启动子的一段基因组 DNA ; 翻译起始序列 (嵌入 “Kozak” 共有序列中的甲硫氨酸密码子) ; Cre 重组酶的突变的 loxP 识别序列 (已知为 lox5171 位点) ; 转录终止 / 多聚腺苷酸序列 ; Cre 重组酶的 loxP 识别序列 ; 在来自小鼠磷酸甘油酸激酶 1 基因的启动子的转录控制下的编码由融合至胸苷激酶的截短形式的给予对嘌呤霉素的抗性的蛋白组成的融合蛋白 (pu-TK) 的基因 ; 和定位为接近于载体中的

6Kb 序列且以天然相对定向布置的 2.5Kb 小鼠基因组 DNA。

[0151] 3' 载体 905 的主要特征如下：在偶联于来自多瘤病毒的两个突变的转录增强子的修饰的单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因启动子的转录控制下的编码白喉毒素 A (DTA) 亚基的基因；从 κ 基因座 J 区基因区段附近获得的 6Kb 小鼠基因组 DNA，该 6Kb 小鼠基因组 DNA 被定向为使得定位为最接近 κ 可变区基因区段的片段的端部最接近载体中的 DTA 基因；在小鼠 Polr2a 基因启动子的转录控制下的编码人黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 的小基因；在小鼠磷酸甘油酸激酶 1 基因启动子的控制下的新霉素抗性基因；Cre 重组酶的 loxP 识别序列；3.6Kb 小鼠基因组 DNA，其在基因组的定位为刚好在也被包括在载体中的 6Kb 片段的下游且以与小鼠基因组相同的相对方式定向这两个片段。

[0152] 源自 C57Bl/6NTac 小鼠的小鼠胚胎干 (ES) 细胞根据广泛使用的程序通过使用 3' 载体 905 电穿孔来转染。在电穿孔之前，载体 DNA 用 NotI 限制性内切酶来线性化。已转染的细胞被铺板，且在 ≥ 24 小时之后，将它们放置在使用新霉素类似物 G418 的药物选择下。在一个多星期之后在抗药性 ES 细胞集落变得凭肉眼可见之后，将抗药性 ES 细胞集落用物理方法从它们的板提取。将这些选定的集落解聚，重新铺板在微孔板上，并培养若干天。此后，分开细胞克隆中的每一个，使得细胞中的一些可以作为档案被冷冻，且其余为分析的目的用于分离 DNA。

[0153] 来自 ES 细胞克隆的 DNA 通过 PCR 利用广泛使用的基因-靶向测定设计来筛选。使用四个测定，且在每一种情况下，PCR 寡核苷酸引物序列中的一个映射在 3' 载体 905 和基因组 DNA901 之间共有的同一性的区域外部，而另一个映射在载体中的基因组同一性的两个臂之间的新 DNA 内（即，在 HPRT 或 neo 基因元件中）。根据标准设计，这些测定被设计为检测仅在源自转染细胞的细胞克隆中存在的 DNA 段，转染细胞已经经历 3' 载体 905 和基因组之间完全合理的同源重组。

[0154] 用 3' 载体 905 进行一次转染，且这使用四个 PCR 测定从筛选的约 300 个克隆产生总共十七个阳性克隆。

[0155] 来自转染的总共六个 PCR- 阳性克隆被选择用于增殖，随后使用 DNA 印迹测定来进一步分析。DNA 印迹测定根据广泛使用的程序来进行；它们包括三个探针和用多种限制性内切酶消化的基因组 DNA，多种限制性内切酶被选择为使得探针和消化的组合允许得出关于以下的结论：克隆中的被靶向的基因座的结构和其是否已经被同源重组适当地修饰。探针中的一个映射在 3' κ 靶向载体和基因组 DNA 之间共有的同一性的区域的一侧侧翼的 DNA 序列；第二探针也映射同一性的区域的外部但在其另一侧；且第三探针映射在载体中的基因组同一性的两个臂之间的新 DNA 内（即，在 neo 基因中）。DNA 印迹确定对应于 κ 基因座的正确突变的（通过与 3' κ 靶向载体同源重组）部分的预期的 Eco911 产生的 DNA 片段的存在，如通过外部探针中的一个和通过新霉素探针探测的（数据未示出）。外部探针探测突变片段且还探测来自同源染色体上的免疫球蛋白 κ 基因座的非突变拷贝的野生型片段。

[0156] ES 细胞的六个 PCR- 阳性克隆也使用被设计为辨别在小鼠 ES 细胞中出现的最通常出现的染色体畸变的原位荧光杂交程序来核型分析。具有这样的畸变的一个克隆被从进一步使用中排除。基于 DNA 印迹数据被判断为具有预期的正确基因组结构的两个核型上正常的克隆，被选择用于进一步使用。

[0157] 使用 5' 载体 903 来修饰两个克隆,除了使用嘌呤霉素选择代替 G418/ 新霉素选择之外,使用在设计上与 3' 载体 905 使用的那些程序和筛选测定基本上相同的程序和筛选测定,且方案还被定制为匹配通过 5' 载体 903 修饰的基因组区。5' 载体 903 转染实验的目标是分离已经以预期方式被 3' 载体 905 和 5' 载体 903 两者突变的 ES 细胞克隆,即,携带两个工程化突变的双靶向细胞。在这些克隆中,Cre 重组酶使得在通过两个载体引入 κ 基因座的 loxP 位点之间发生重组 902,以产生以 907 示出的构建体。

[0158] 此外,克隆必须已经在同一染色体而不是同源染色体上经历基因靶向,即,由靶向载体产生的工程化突变必须是以顺式在同一 DNA 链上而不是以反式在单独的同源 DNA 链上。通过分析程序例如中期染色体涂染的荧光原位杂交,使用与存在于两个基因靶向载体中在它们的基因组同一性的臂之间的新 DNA 杂交的探针,来辨别具有顺式布置的突变的克隆和具有反式布置的那些。两种类型的克隆还可以通过如下方式被彼此辨别:用表达 Cre 重组酶的载体转染它们和比较在针对通过 5' 载体 903 引入的胸苷激酶基因的更昔洛韦选择下存活的集落数量以及通过“亲缘种选择”筛选程序来分析存活克隆的抗药性表型,在“亲缘种选择”筛选程序中测试来自该克隆的细胞中的一些对嘌呤霉素或 G418/ 新霉素的抗性。

[0159] 在该类型的实验中,具有顺式布置的突变的细胞预期比具有反式布置的细胞产生多约 10^3 更昔洛韦抗性克隆。大部分所得到的顺式衍生的更昔洛韦抗性克隆还应对嘌呤霉素和 G418/ 新霉素两者敏感,与应保留对两种药物的抗性的反式衍生的更昔洛韦抗性克隆相反。在 κ 链基因座中具有顺式布置的工程化突变的细胞克隆被选择用于进一步使用。

[0160] 细胞的双靶向克隆用表达 Cre 重组酶的载体来转染,且随后将被转染的细胞放置在更昔洛韦选择之下,如在上面概述的分析实验中的。将细胞的更昔洛韦抗性克隆分离,并通过 PCR 和 DNA 印迹来分析通过 5' 载体 903 和 3' 载体 905 产生的两个工程化突变之间的预期的缺失的存在。在这些克隆中,Cre 重组酶使得在通过两个载体引入 κ 链基因座中的 loxP 位点之间发生重组。因为 loxP 位点在两个载体中以相同的相对定向被布置,所以重组导致包括在两个 loxP 位点之间的完整基因组间隔的 DNA 环的切除。该环将不包含复制起点且因此在有丝分裂期间将不被复制,且因此当它们经历克隆增殖时将从细胞的克隆丢失。所得到的克隆携带最初在两个 loxP 位点之间的 DNA 缺失。具有预期的缺失的克隆将被选择用于进一步使用。

[0161] 在免疫球蛋白 κ 链基因座的两个同源拷贝中的一个中携带序列缺失的 ES 细胞克隆将用 Cre 重组酶表达载体连同包括部分人免疫球蛋白 κ 链基因座的一段 DNA909 来再转染 904,部分人免疫球蛋白 κ 链基因座包含 V 和 J 区基因区段。这段 DNA(被称为“K-K”)的主要特征如下:lox5171 位点;新霉素抗性基因开放阅读框(缺乏起始甲硫氨酸密码子,但在框内且与 lox5171 位点中的不间断的开放阅读框毗连);转录终止/多聚腺苷酸序列;FRT 位点;39 个人 κ 可变区基因区段的阵列,每一个 κ 可变区基因区段由嵌入小鼠非编码序列的人编码序列组成;来自刚好在小鼠 κ 链基因座中的 J κ 区基因区段的簇的上游的 13.5Kb 基因组 DNA 段;包含嵌入小鼠非编码 DNA 中的 5 个人 J 区基因区段的 2Kb DNA 段;以与 lox5171 位点相反的相对定向的 loxP 位点。

[0162] 在第二独立的实验中,部分人 DNA909 的可选择的段用于代替 K-KDNA。该 DNA(被称为“L-K”)的主要特征如下:lox5171 位点;新霉素抗性基因开放阅读框,其缺乏起始甲

硫氨酸密码子,但在框内且与 lox5171 位点中的不间断的开放阅读框毗连;转录终止/多聚腺苷酸序列;FRT 位点;38 个人 λ 可变区基因区段的阵列,每一个 λ 可变区基因区段由嵌入小鼠非编码序列的人编码序列组成;来自刚好在小鼠 κ 链基因座的 J 区基因区段的簇的上游的 13.5Kb 基因组 DNA 段;包含嵌入小鼠非编码 DNA 中的 5 个人 J λ 区基因区段的 2Kb DNA 段;以与 lox5171 位点相反的相对定向的 loxP 位点。

[0163] 将来自 K-K 和 L-K 转染实验的被转染的克隆放置在 G418 选择之下,G418 选择富集已经经历重组酶介导的盒式交换过程的细胞克隆,在重组酶介导的盒式交换过程中部分人供体 DNA 以其整体被整合入在 loxP 和 lox5171 位点之间被缺失的免疫球蛋白 κ 链基因座中, loxP 和 lox5171 位点分别通过 3' 载体 905 和 5' 载体 903 放置在那里。图 9 中以 911 阐明使用 K-K 序列产生的 DNA 区。来自 5' 载体 903 的剩余元件经由 FLP 介导的重组 906 来除去,导致如 913 所示的最终的人源化基因座。

[0164] G418 抗性 ES 细胞克隆通过 PCR 和 DNA 印迹来分析,以确定它们是否已经经历预期的重组酶介导的盒式交换过程而没有不需要的重排或缺失。具有预期的基因组结构的 K-K 和 L-K 克隆两者被选择用于进一步使用。

[0165] 根据标准程序,将各自在小鼠 κ 链基因座中携带部分人免疫球蛋白 DNA 的 K-K ES 细胞克隆和 L-K ES 细胞克隆显微注射入来自品系 DBA/2 的小鼠胚泡中,以产生部分 ES 细胞衍生的嵌合小鼠。对其皮毛具有最高水平的 ES 细胞衍生的贡献的雄性嵌合小鼠被选择用于与雌性小鼠交配。用于交配的所选择的雌性小鼠具有 C57Bl/6NTac 品系,且还将携带编码在它们的种系中被表达的 Flp 重组酶的转基因。对来自这些交配的后代分析部分人免疫球蛋白 κ 链基因座的存在,和分析在重组酶介导的盒式交换步骤中产生的侧翼为 FRT 的新霉素抗性基因的丢失。携带部分人基因座的小鼠将用于建立 K-K 和 L-K 小鼠群体。

[0166] 如实施例 3 所描述生产的携带部分人(即,人源化的)重链基因座的小鼠可以与携带人源化的 κ 链基因座的小鼠配种(breed)。它们的后代进而在最终产生对于两个人源化基因座是纯合的(即,对于重链和 κ 人源化的)小鼠的方案中配种。这样的小鼠产生由人可变域和小鼠恒定域组成的部分人重链。它们还产生由人 κ 可变域和来自它们的 κ 基因座的小鼠 κ 恒定域组成的部分人 κ 蛋白。从这些小鼠回收的单克隆抗体由与人 κ 可变域配对的人可变域组成。

[0167] 配种方案的变化形式包括产生这样的小鼠:对于人源化的重链基因座是纯合的,但在 κ 基因座处是杂合的,使得在一个染色体上它们具有 K-K 人源化的基因座且在另一个染色体上它们具有 L-K 人源化的基因座。这样的小鼠产生由人可变域和小鼠恒定域组成的部分人重链。它们还产生由人 κ 可变域和来自它们的 κ 基因座中的一个的小鼠 κ 恒定域组成的部分人 κ 蛋白。从另一个 κ 基因座,它们将产生由人 λ 可变域和小鼠 κ 恒定域组成的部分人 λ 蛋白。从这些小鼠回收的单克隆抗体由在一些情况下与人 κ 可变域配对且在其他情况下与人 λ 可变域配对的人可变域组成。

[0168] 实施例 5:将部分人免疫球蛋白区引入小鼠基因组的免疫球蛋白 λ 链基因座位。

[0169] 图 10 中阐明使用部分人免疫球蛋白区替换哺乳动物基因组的一部分的一种方法。该方法提供了通过包括靶向载体 1003 的同源重组过程,从野生型小鼠免疫球蛋白 λ 基因座 1001 缺失约 194Kb DNA,靶向载体 1003 与在 V2 基因区段上游和紧邻 J3、C3、J1 和 C1 基因区段的 V1 基因区段下游的基因座共有同一性。载体用设计为允许随后的位点特异性

重组的元件替换 194Kb DNA, 其中 DNA 的非天然段经由重组酶介导的盒式交换 1002 移动到修饰的 V_L 基因座。在该实施例中, 非天然 DNA 是包括人序列和非人序列两者的合成核酸。

[0170] 用于完成 194Kb 缺失的基因靶向载体 1003 的主要特征如下: 阴性选择基因, 例如编码白喉毒素的 A 亚基的基因或单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 来自 λ 基因座中的小鼠 V2 可变区基因区段的 5' 的 4Kb 基因组 DNA; FRT 位点; 包含小鼠 Polr2a 基因启动子的基因组 DNA 段; 翻译起始序列 (嵌入“Kozak”共有序列的甲硫氨酸密码子); Cre 重组酶的突变的 loxP 识别序列 (已知为 lox5171 位点); 转录终止 / 多聚腺苷酸序列; 编码给予对嘌呤霉素的抗性的蛋白的开放阅读框; 该开放阅读框将在相对于 Polr2a 启动子和紧接于其的翻译起始序列的反义链上; 开放阅读框还将后接其自己的转录终止 / 多聚腺苷酸序列; Cre 重组酶的 loxP 识别序列; 在与嘌呤霉素抗性基因开放阅读框相同的反义链上的翻译起始序列 (嵌入“Kozak”共有序列中的甲硫氨酸密码子); 鸡 β 肌动蛋白启动子和巨细胞病毒早期增强子元件, 其被定向为使得其引导嘌呤霉素抗性开放阅读框的转录, 且翻译在 loxP 位点的下游的起始密码子处起始, 且继续返回通过 loxP 位点进入嘌呤霉素开放阅读框, 全部在相对于 Polr2a 启动子和紧接于其的翻译起始序列的反义链上; Flp 重组酶的突变识别位点, 已知为“F3”位点; 包含 J3、C3、J1 和 C1 基因区段和周围序列的 7.3Kb 基因组 DNA; 第二阴性选择基因, 例如编码白喉毒素的 A 亚基的基因或单纯疱疹病毒胸苷激酶基因。

[0171] 小鼠胚胎干 (ES) 细胞 (源自 C57Bl/6NTac 小鼠) 根据广泛使用的程序通过用靶向载体 1003 电穿孔来转染 1002。所得到的构建体 1005 将在 196Kb 区用来自靶向载体 1003 的序列替换天然 DNA。

[0172] 在电穿孔之前, 载体 DNA 用罕见切割限制性内切酶来线性化, 罕见切割限制性内切酶仅在原核质粒序列或与其相关联的多聚接头处切割。已转染的细胞被铺板, 且在 ≥ 24 小时之后, 将它们放置在使用嘌呤霉素的药物选择下。在一个多星期之后在抗药性 ES 细胞集落变得凭肉眼可见之后, 将抗药性 ES 细胞集落用物理方法从它们的板提取。将这些选定的集落解聚, 重新铺板在微孔板上, 并培养若干天。此后, 分开细胞克隆中的每一个, 使得细胞中的一些可以作为档案被冷冻, 且其余为分析的目的用于分离 DNA。

[0173] 来自 ES 细胞克隆的 DNA 通过 PCR 利用广泛使用的基因-靶向测定设计来筛选。使用四个测定, 且在每一种情况下, PCR 寡核苷酸引物序列中的一个映射在靶向载体和基因组 DNA 之间共有的同一性的区域外部, 而另一个映射在载体中的基因组同一性的两个臂之间的新 DNA 内 (即, 在 puro 基因中)。根据标准设计, 这些测定检测仅在源自转染细胞的细胞克隆中存在的 DNA 段, 转染细胞已经经历在靶向载体 1003 和天然 DNA1001 之间完全合理的同源重组。

[0174] 来自转染 1002 的约六个 PCR- 阳性克隆被选择用于增殖, 随后使用 DNA 印迹测定来进一步分析。DNA 印迹包括三个探针和来自这些克隆的已经用多种限制性内切酶消化的基因组 DNA, 多种限制性内切酶被选择为使得探针和消化的组合允许识别 DNA 是否已经被同源重组适当地修饰。

[0175] ES 细胞的六个 PCR- 阳性克隆使用被设计为辨别在小鼠 ES 细胞中出现的最通常出现的染色体畸变的原位荧光杂交程序来核型分析。显示出畸变迹象的克隆被从进一步使用中排除。基于 DNA 印迹数据被判断为具有预期的正确基因组结构的核型上正常的克隆, 被选择用于进一步使用。

[0176] 在免疫球蛋白 λ 链基因座的两个同源拷贝中的一个中携带缺失的 ES 细胞克隆将用 Cre 重组酶表达载体连同包括部分人免疫球蛋白 λ 链基因座的一段 DNA1007 段来再转染 1004, 部分人免疫球蛋白 λ 链基因座包含 V、J 和 C 区基因区段。这段 DNA1007 的主要特征如下:lox5171 位点;新霉素抗性基因开放阅读框(缺乏起始甲硫氨酸密码子,但在框内且与 lox5171 位点中的不间断的开放阅读框毗连);转录终止/多聚腺苷酸序列;FRT 位点;38 个人 λ 可变区基因区段的阵列,每一个人 λ 可变区基因区段由嵌入小鼠 λ 非编码序列中的人 λ 编码序列组成;J-C 单元的阵列,其中每一个单元由嵌入在来自小鼠 λ 基因座的非编码序列内的人 J λ 区基因区段和小鼠 λ 恒定域基因区段组成(人 J 区基因区段将是编码 J1、J2、J6 和 J7 的那些,而小鼠 λ 恒定域基因区段将是 C1 和 / 或 C2 和 / 或 C3);Flp 重组酶的突变识别位点,已知为“F3”位点;给予潮霉素抗性的开放阅读框;该开放阅读框在构建体中位于相对于免疫球蛋白基因区段编码信息的反义链上;以与 lox5171 位点相反的相对定向的 loxP 位点。

[0177] 将被转染的克隆放置在 G418 和 / 或潮霉素选择之下, G418 和 / 或潮霉素选择富集已经经历重组酶介导的盒式交换过程的细胞克隆,在重组酶介导的盒式交换过程中部分人供体 DNA 以其整体被整合入在 loxP 和 lox5171 位点之间被缺失的免疫球蛋白 λ 链基因座中, loxP 和 lox5171 位点通过基因靶向载体放置在那里。来自靶向载体 1003 的剩余元件经由 FLP 介导的重组 1006 来除去,导致如 1011 所示的最终的人源化基因座。

[0178] G418/潮霉素抗性 ES 细胞克隆通过 PCR 和 DNA 印迹来分析,以确定它们是否已经经历预期的重组酶介导的盒式交换过程而没有不需要的重排或缺失。具有预期的基因组结构的克隆将被选择用于进一步使用。

[0179] 根据标准程序,将在小鼠 λ 链基因座中携带部分人免疫球蛋白 DNA1011 的 ES 细胞克隆显微注射入来自品系 DBA/2 的小鼠胚胎中,以产生部分 ES 细胞衍生的嵌合小鼠。对其皮毛具有最高水平的 ES 细胞衍生的贡献的雄性嵌合小鼠被选择用于与雌性小鼠交配。此处所选择的雌性小鼠将具有 C57Bl/6NTac 品系,其携带编码在它们的种系中被表达的 Flp 重组酶的转基因。对来自这些交配的后代分析部分人免疫球蛋白 λ 链基因座的存在,和分析在重组酶介导的盒式交换步骤中产生的侧翼为 FRT 的新霉素抗性基因和侧翼为 F3 的潮霉素抗性基因的丢失。携带部分人基因座的小鼠将用于建立小鼠群体。

[0180] 在一些方面,使包括人源化的重链和 κ 基因座的小鼠(如实施例 3 和 4 所描述的)与携带人源化的 λ 基因座的小鼠配种。从该类型配种方案产生的小鼠对于人源化的重链基因座是纯合的,且可以对于 K-K 人源化的基因座或 L-K 人源化的基因座是纯合的。可选择地,它们可以在 κ 基因座处是杂合的,在一个染色体上携带 K-K 基因座而在另一个染色体上携带 L-K 基因座。这些小鼠中的每一个对于人源化的 λ 基因座将是纯合的。从小鼠回收的单克隆抗体由在一些情况下与人 κ 可变域配对且在其他情况下与人 λ 可变域配对的人可变域组成。 λ 可变域将得自人源化的 L-K 基因座或人源化的 λ 基因座。

[0181] 实施例 6:将部分人免疫球蛋白小基因引入小鼠基因组。

[0182] 在某些其他方面,部分人免疫球蛋白区将包括人可变域小基因,例如图 11 中阐明的人可变域小基因。此处,代替包括所有的或基本上所有的人 V_H 基因的部分人免疫球蛋白区,小鼠免疫球蛋白区被包括较少的人 V_H 基因,例如 1-43 个人 V_H 基因的小基因 1119 替换。

[0183] 包括将被引入哺乳动物宿主基因组的部分人免疫球蛋白区 1110 的位点特异性靶

向载体 1129 被引入 1102 包括位点特异性重组位点 (1109、1111、1107 和 1105) 和 puro Δ TK 基因 1103 的已缺失内源性免疫球蛋白区的基因组区 1101。位点特异性靶向载体包括部分人免疫球蛋白区,该部分人免疫球蛋白区包括 i) V_H 区 1119,其包括所有的 44 个人 V_H 编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列;ii) 10kb 前 DJ 区 721,其包括小鼠序列;iii) DJ 区 1125,其包括人 D 和 J 编码区和基于小鼠基因组内源性序列的间插序列;和 iv) 小鼠非功能 J_H 基因区。部分人免疫球蛋白区侧翼为将允许与修饰的内源性基因座重组的重组位点 1109、1111、1105 和 1107)。在引入适当的重组酶 1104 之后,部分人免疫球蛋白区在恒定基因区 1127 的上游被整合入基因组。

[0184] 如实施例 1 所描述的,用于引入部分人免疫球蛋白可变区基因座的初级筛选可以通过 DNA 印迹来进行,或使用 PCR 初筛来进行,所述 PCR 初筛被用 Southern 筛选和 / 或天然等位基因丢失 qPCR 筛选的次级筛选所支持。作为重组事件的一部分的 HPRT 基因 1105 的缺失将允许使用 (6- 硫鸟嘌呤依赖性) 阴性选择来鉴定未经历重组事件的细胞。

[0185] 前述内容仅阐明本发明的原理。应明白,本领域技术人员将能够设计各种排列,这些排列虽然没有在本文明确描述或示出,但体现本发明的原理且被包括在本发明的精神和范围内。此外,本文所述的所有实施例和条件性语言主要意图帮助阅读者理解本发明的原理和由本发明人贡献以利于本领域的概念,且应被理解为不限于这样具体叙述的实施例和条件。此外,叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的本文所有陈述,意图包括其结构和功能等效物两者。另外,意图这样的等效物包括目前已知的等效物和将来开发的等效物两者,即,进行相同功能的、与结构无关的所开发的任何元件。因此,本发明的范围不意图被限于本文示出的和描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附的权利要求来体现。在以下权利要求中,依据 35 U.S.C. §112, ¶6, 除非使用术语“手段(means)”,否则其中所述的特征或元件中没有一个应被理解为手段 - 加 - 功能(means-plus-function) 限制。

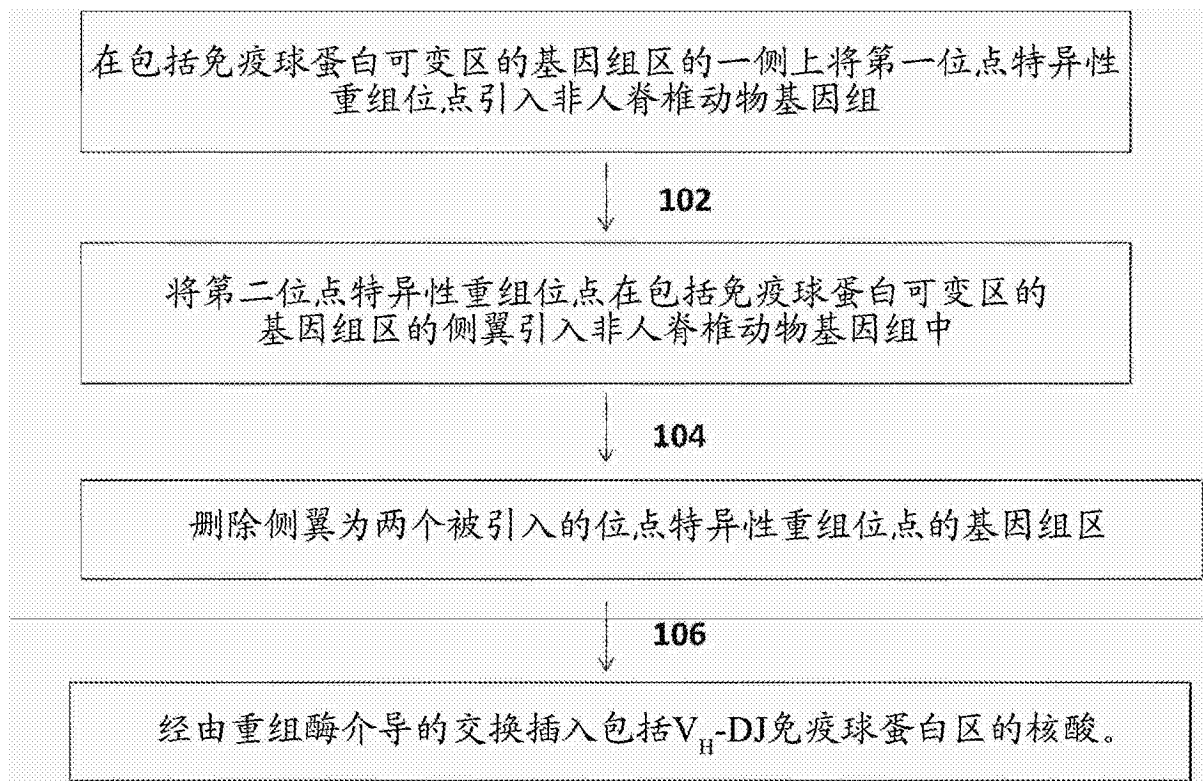


图 1

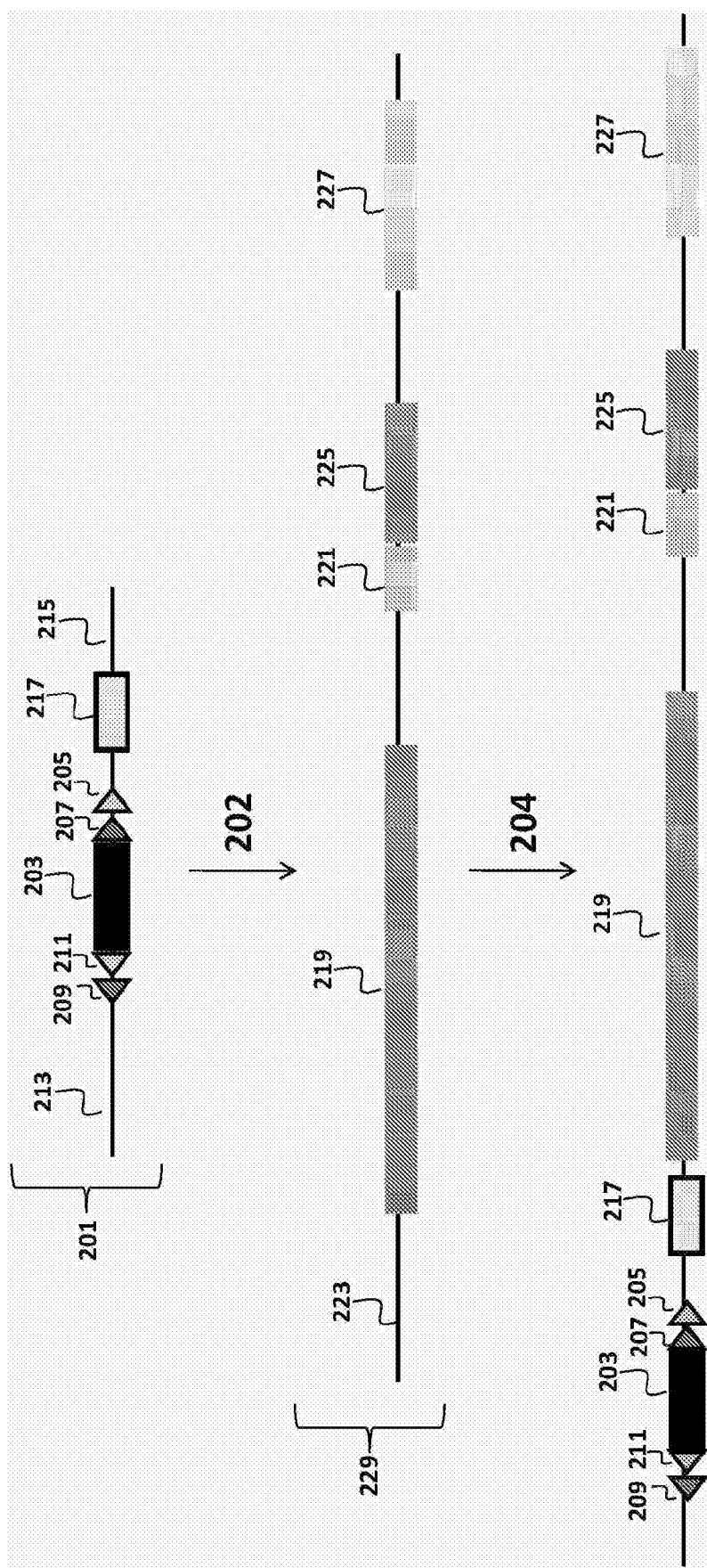


图 2

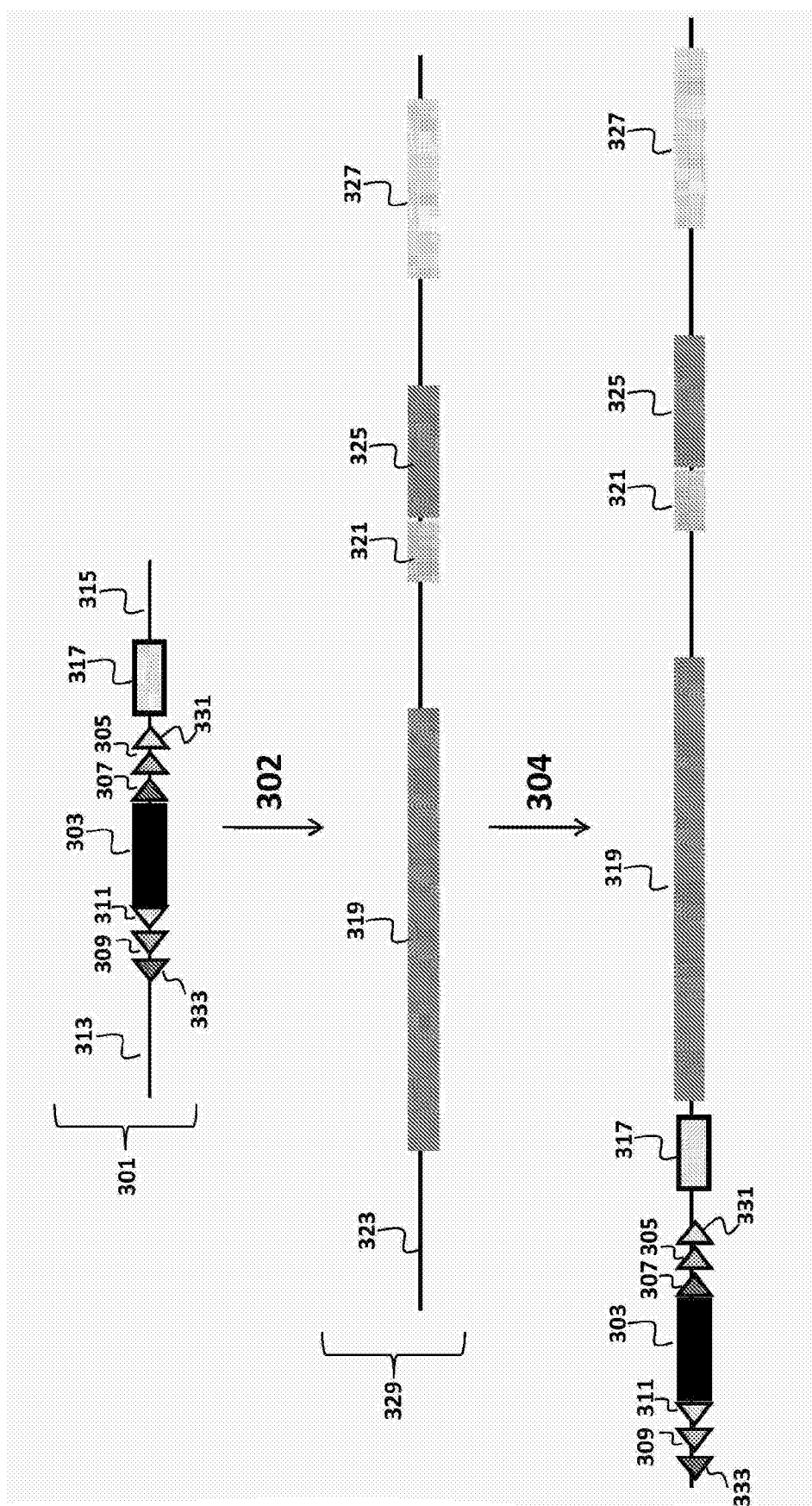


图 3

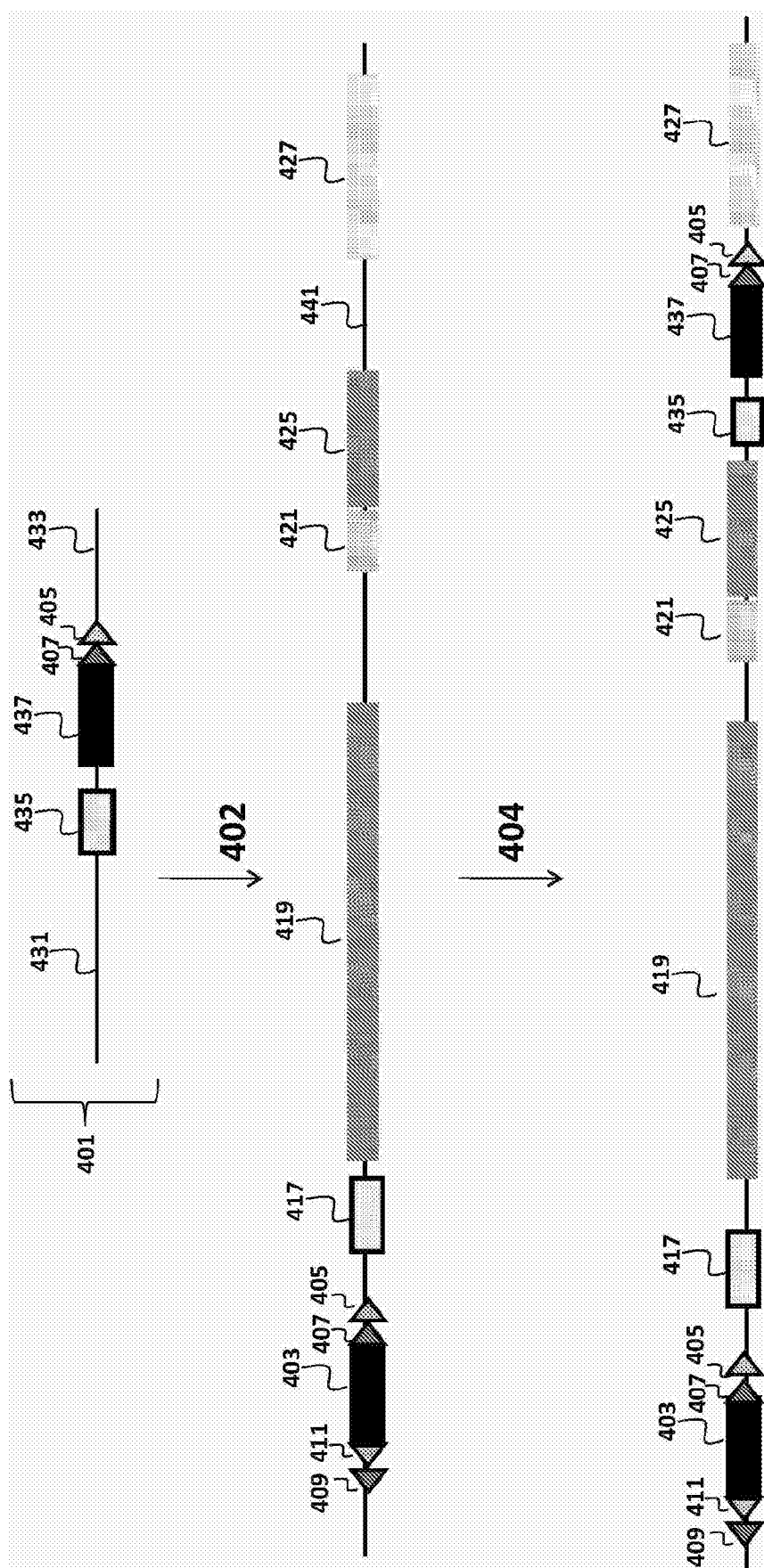


图 4

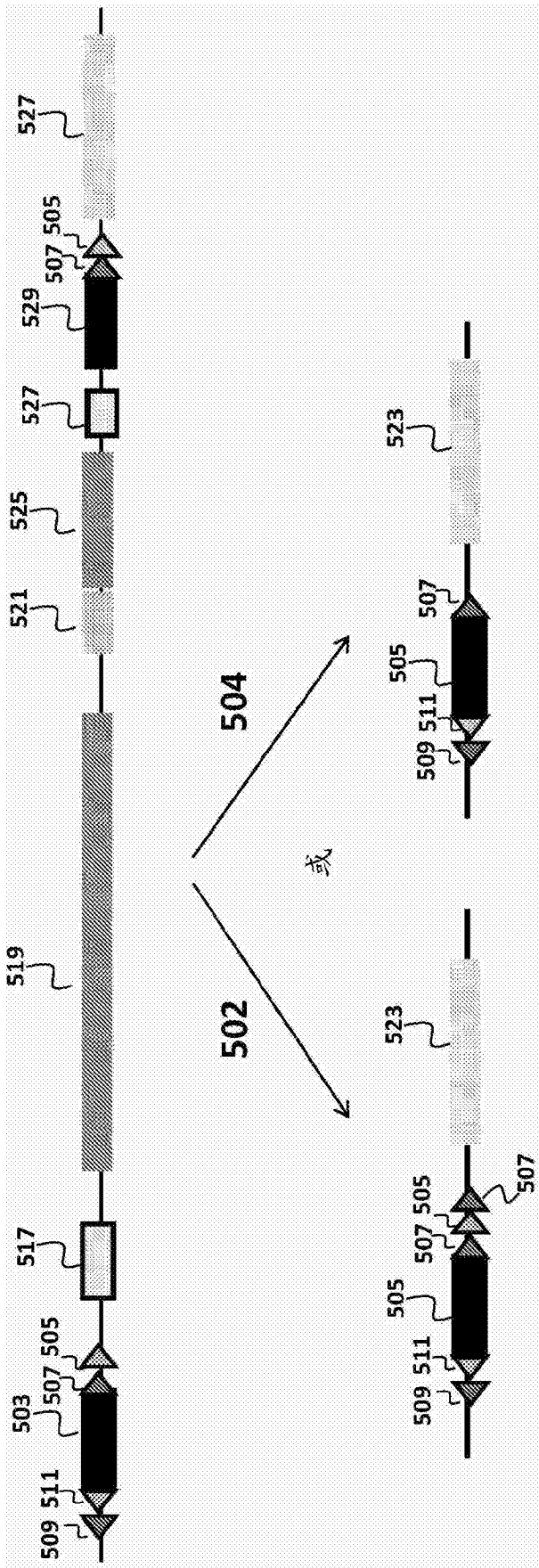


图 5

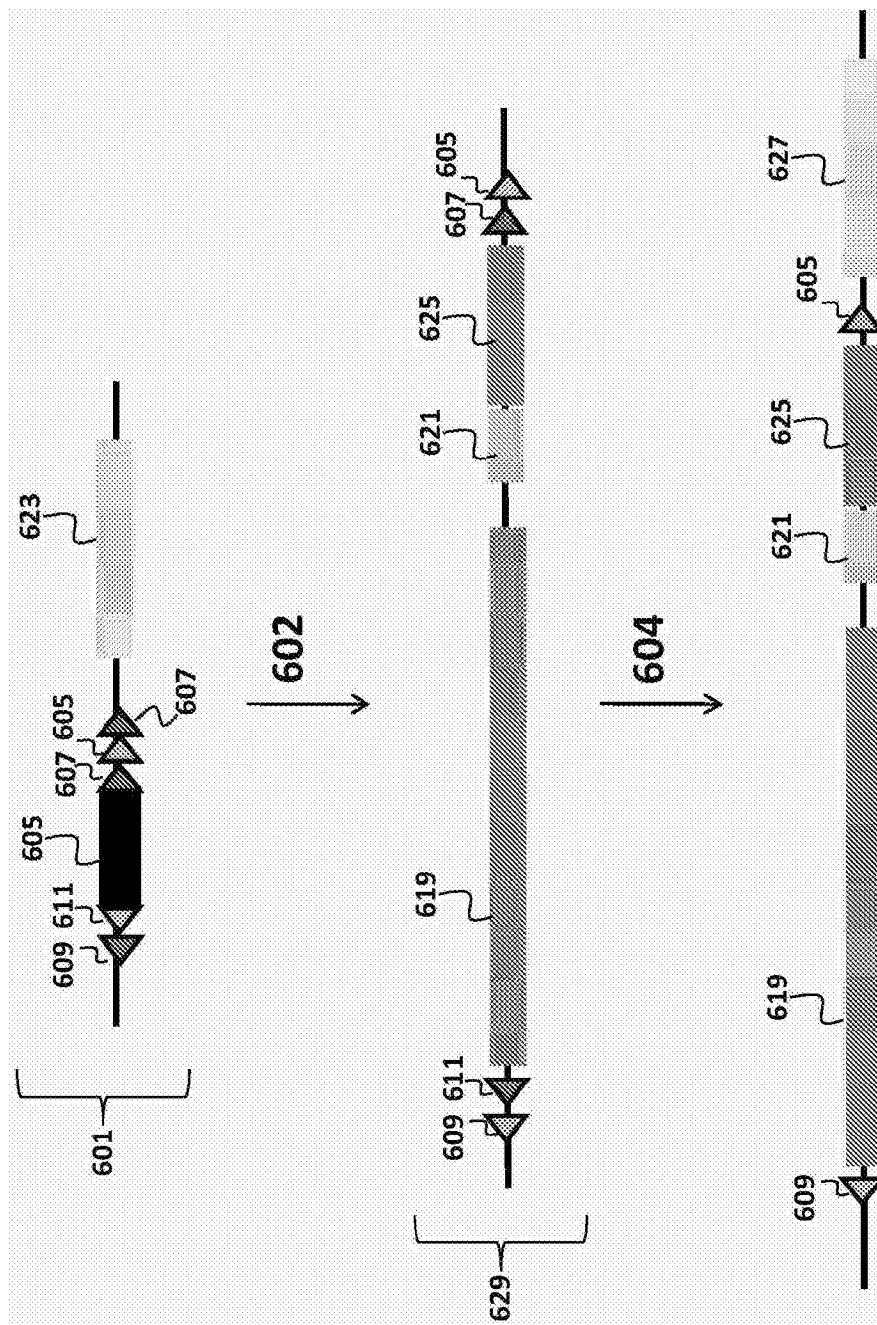


图 6

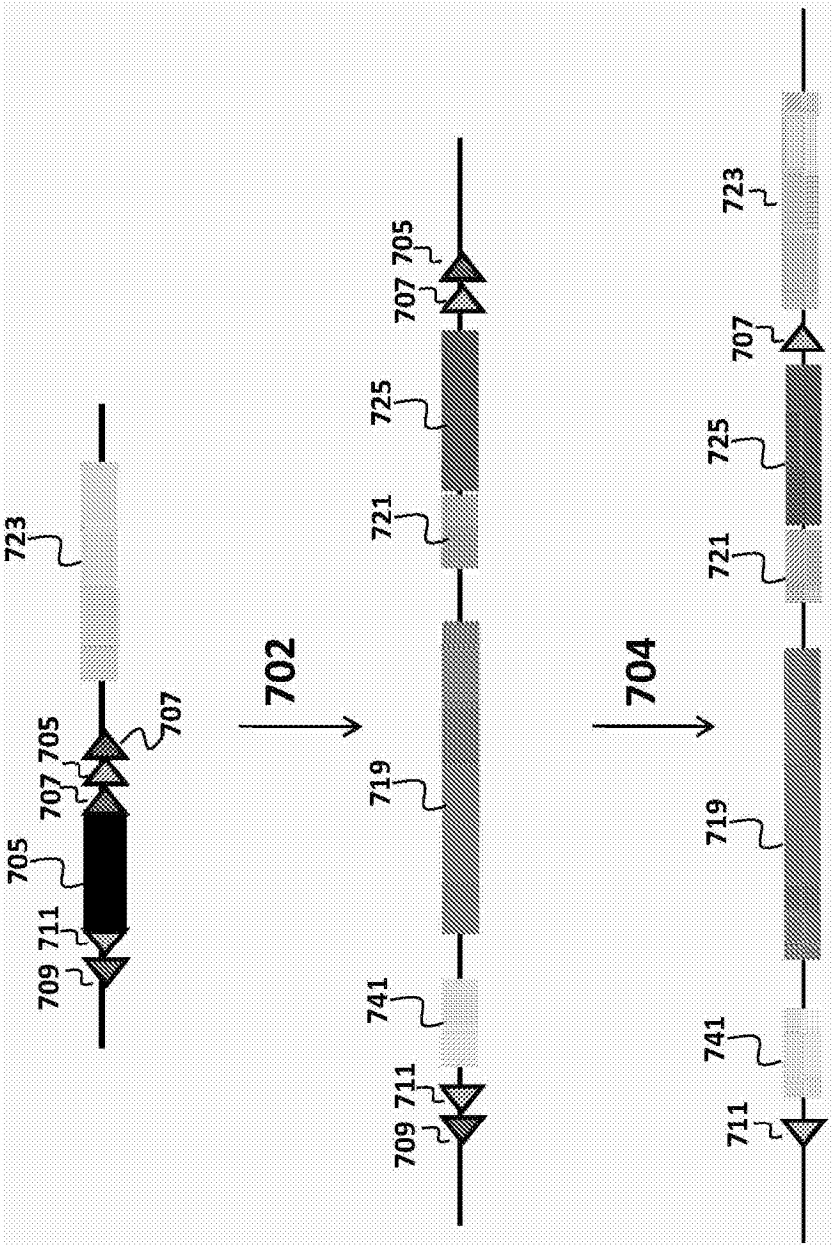


图 7

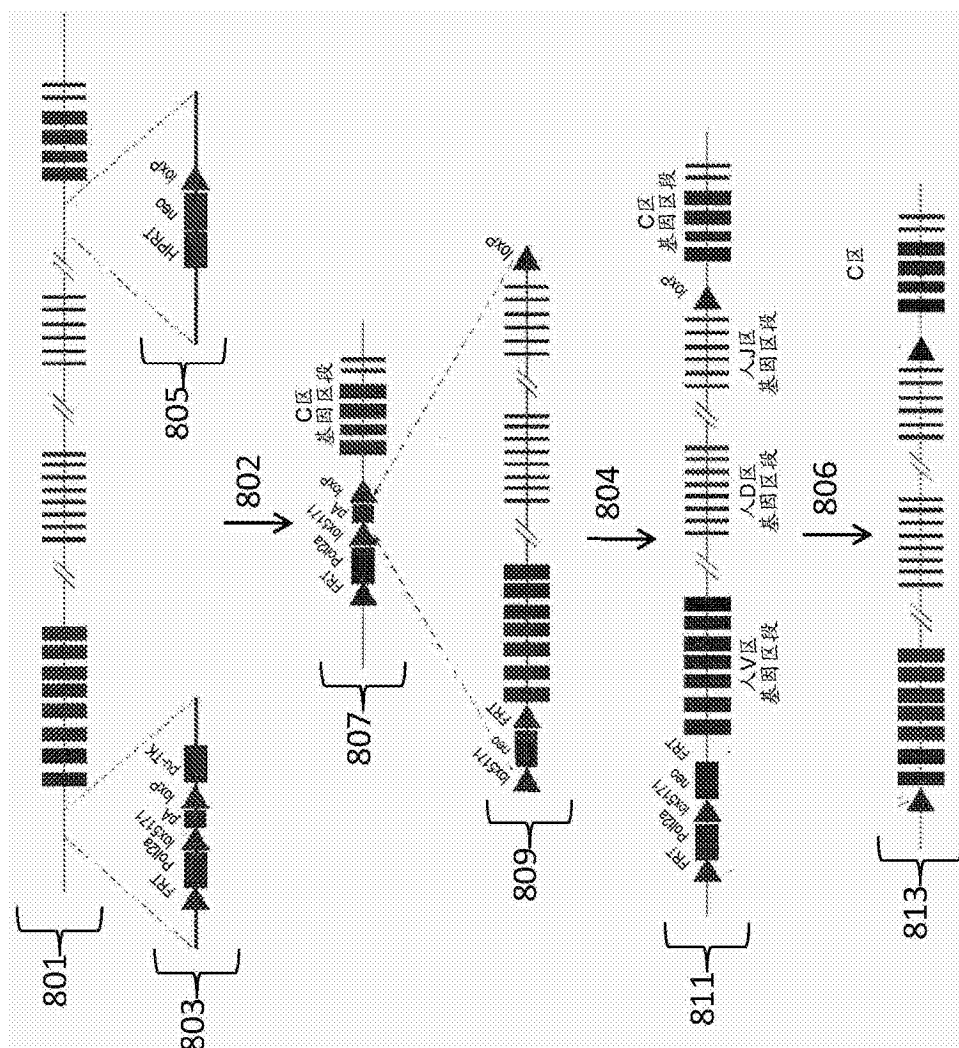


图 8

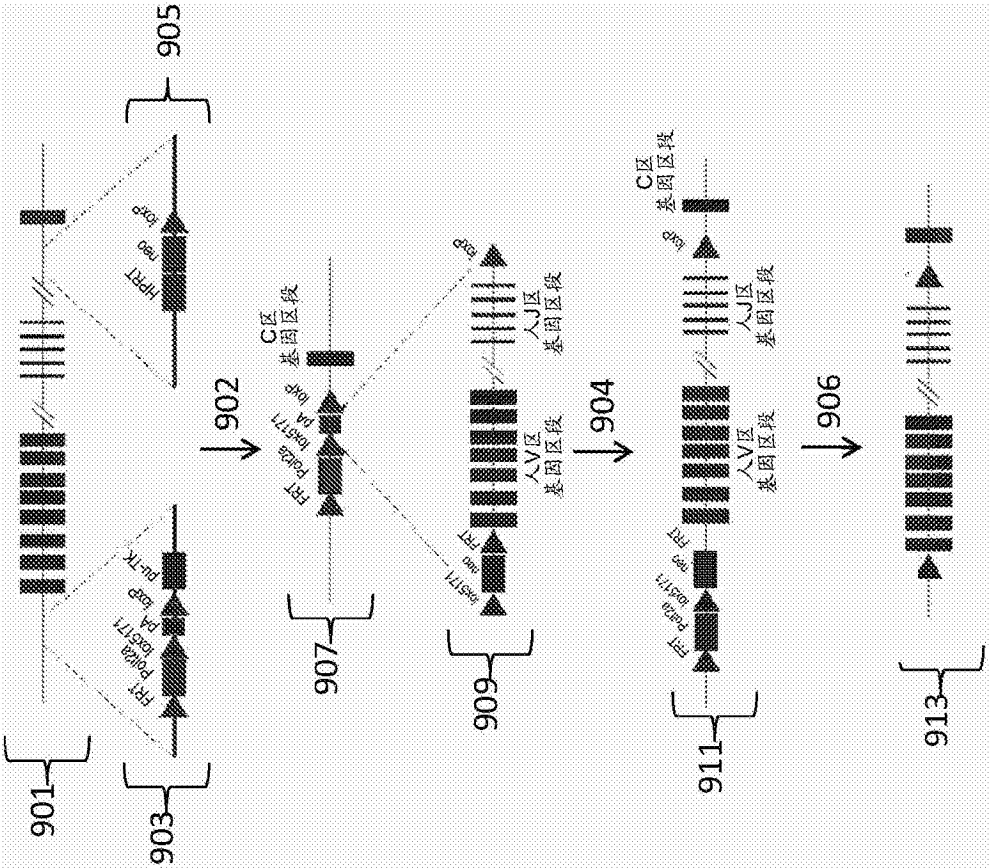


图 9

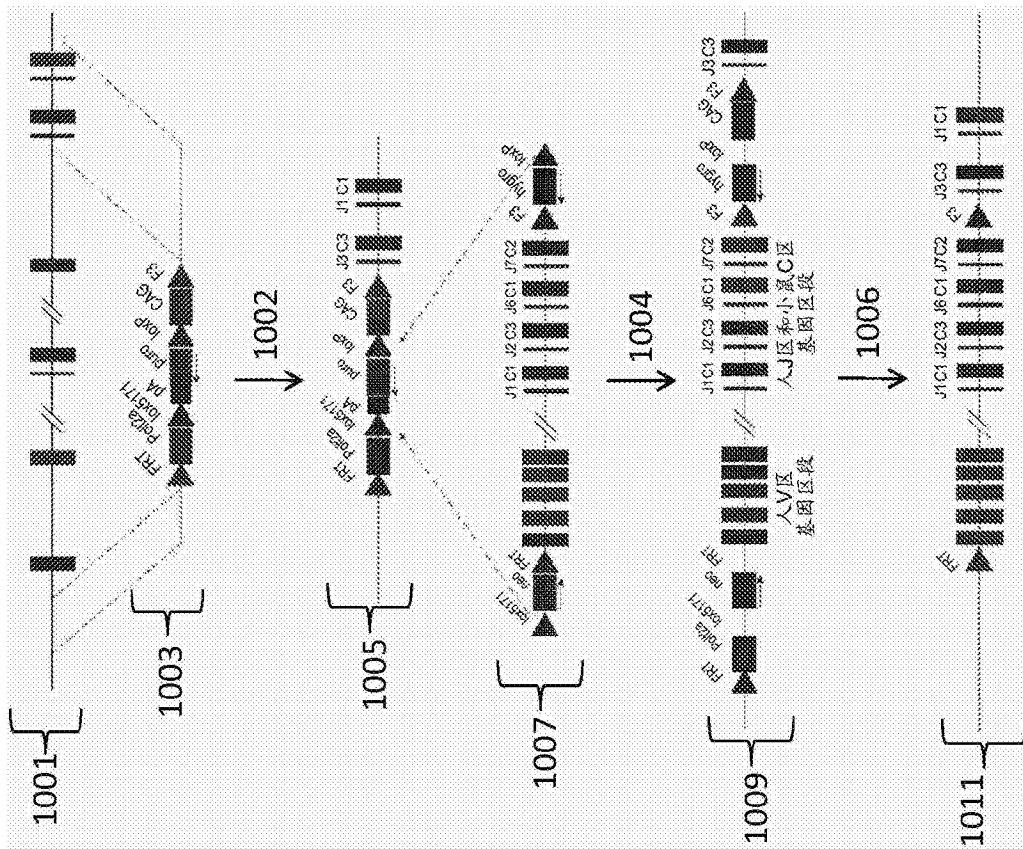


图 10

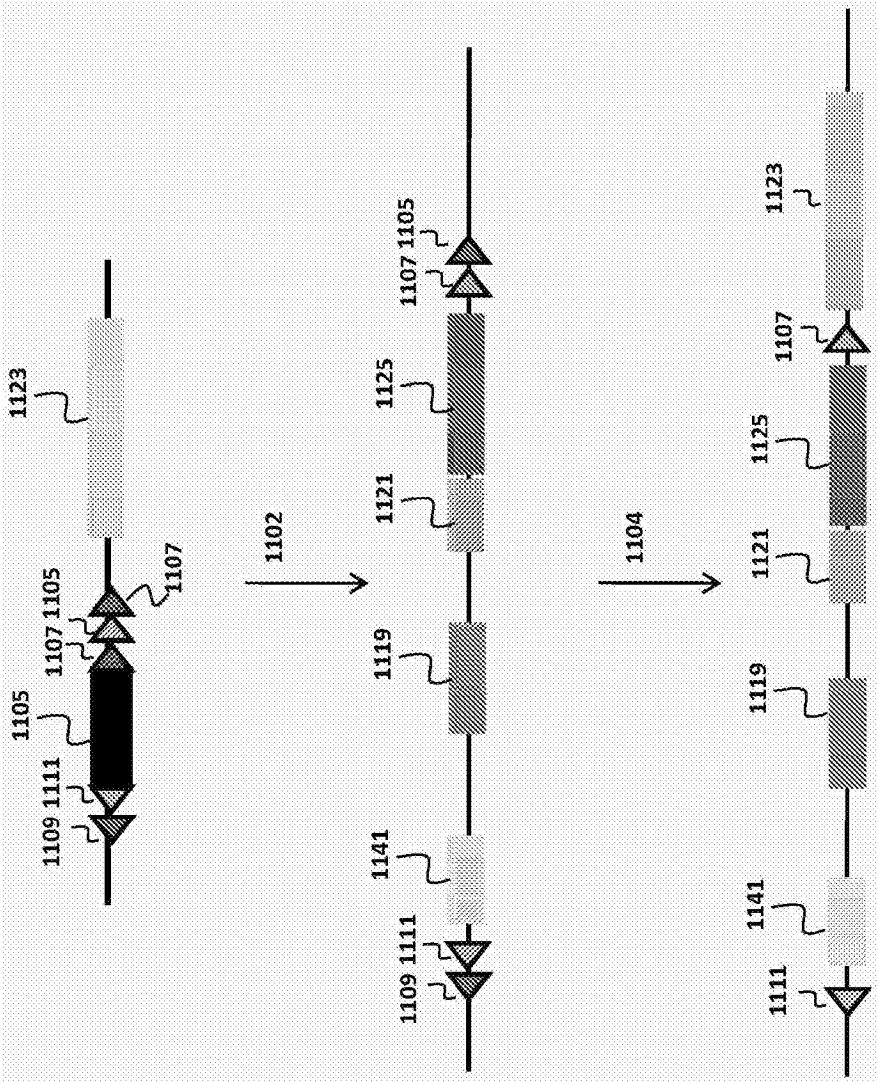


图 11