



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 31 456 T2** 2008.07.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 354 034 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 31 456.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/45293**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 987 182.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/043478**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.11.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **06.06.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/00** (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

250340 P 30.11.2000 US

(73) Patentinhaber:

**Medarex, Inc., Milpitas, Calif., US; Kirin Beer K.K.,
Tokio/Tokyo, JP**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**TOMIZUKA, Kazuma, Takasaki-shi, Gunma
370-0849, JP; ISHIDA, Isao, Isehara, Kanagawa
259-1136, JP; LONBERG, Nils, Woodside, CA
94062, US; HALK, Ed, Sunnyvale, CA 94087, US**

(54) Bezeichnung: **TRANSCHROMOSOMALE TRANSGEN-NAGETIERE ZUR HERSTELLUNG VON HUMANEN ANTI-KÖRPERN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die Erfindung liegt auf den technischen Gebieten von transgenen Tieren, molekularer Immunologie und Medizin.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Antikörper repräsentieren eine Klasse von therapeutischen Molekülen mit Anwendungen auf vielen unterschiedlichen Gebieten, einschließlich Transplantation, kardiovaskulären Erkrankungen, infektiösen Erkrankungen, Krebs und Autoimmunität (Goldenberg, M., 1999, Clin. Ther. 21:309-318; Present, D., et al., 1999, New Engl. J. Med. 340:1398-1405; Targan, S., et al., 1997, New Engl. J. Med. 337:1029-1035; Davis, T., et al., 1999, Blood 94:88a; Saez-Llorens, X., et al., 1998, Pediatr. Infect. Dis. J. 17:787-791; Berard, J., et al., 1999, Pharmacotherapy 19:1127-1137; Glennie, M., et al., 2000, Immunol. Today 21:403-410; Miller, R., 1982, New Engl. J. Med. 306:517-522; Maini, R., et al., 1999, Lancet, 354:1932-1939). Die Entwicklung der Hybridom-technologie ermöglichte die Isolierung von monoklonalen Nagetier-Antikörpern (ebenfalls bezeichnet als MAbs) als therapeutische Kandidaten-Moleküle (Kohler, G., und Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497). Allerdings zeigten frühe Untersuchungen unter Beteiligung des Einsatzes von nicht-humanen monoklonalen Antikörpern für Humantherapie in vivo, dass Mensch-Anti-Maus-Antikörper(HAMA)-Antworten die Anwendung derartiger Mittel beschränken konnten (Schroff, R., et al., 1985, Cancer Res. 45, 879-885; Shawler, D., et al., 1985, J. Immunol. 135:1530-1535). Es wird daher anerkannt, dass eine Verringerung der Immunogenität von therapeutischen Antikörpern wünschenswert ist. Rekombinante DNA-Technologien sind eingesetzt worden, um die Immunogenität von nicht-humanen Antikörpern zu verringern (Boulianne, G., et al., 1984, Nature 312, 643-646; Morrison, S., et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6851-6855; Riechmann, L., et al., 1988, Nature 332:323-327; Jones, P., et al., 1986, Nature 321: 522-525; Queen, C., et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). Es wird jedoch ebenfalls erkannt, dass vollständig humane monoklonale Antikörper eine potenzielle Quelle von geringer Immunogenität therapeutischer Mittel zur Behandlung von Krankheiten des Menschen sind (Little, M., et al., 2000, Immunol. Today 21:364-70). Die Verwendung von transgenen Mäusen, welche humane Immunglobulin(Ig)-Loci in ihrer Keimbahn-Konfiguration tragen, ermöglicht die Isolierung von vollständig humanen, monoklonalen Hochaffinitäts-Antikörpern, welche gegen eine Vielzahl von Zielen gerichtet sind, einschließlich humanen Selbst-Antigenen, für welche das normale humane Immunsystem tolerant ist (Lonberg, N., et al., 1994, Nature 368:856-9; Green, L., et al., 1994, Nature Genet. 7:13-21; Green, L., & Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188:483-95; Lonberg, N., und Huszar, D., 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Bruggemann, M., et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21:1323-1326; Fishwild, D., et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez, M., et al., 1997, Nat. Genet. 15:146-156; Green, L., 1999, J. Immunol. Methods 231:11-23; Yang, X., et al., 1999, Cancer Res. 59:1236-1243; Bruggemann, M., und Taussig, MJ., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458, 1997). Humane Antikörper lassen sich, basierend auf der leichten Kette (kappa und lambda) und der schweren Kette (IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ und IgM) in eine Vielzahl von unterschiedlichen Klassen einteilen. Diese unterschiedlichen Klassen sehen potenziell verschiedene therapeutische Anwendungen vor. Zum Beispiel weisen die verschiedenen Schwereketten-Isotope unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Komplement und mit zellbasierenden Fc-Rezeptoren auf. Einige der Schwereketten-Klassen (IgM und IgA) können auch Multimere bilden, wodurch die Wertigkeit von Fc- und V-Region-Wechselwirkungen erhöht wird. Es ist deshalb wünschenswert, eine Plattform zur Erzeugung humaner monoklonaler Antikörper von allen Isotypen zu besitzen. Allerdings war die erhebliche Größe der humanen Ig-Loci (1-2Mb) ein Haupthindernis für die Einbringung von ganzen Loci in transgene Mäuse, um vollständige diverse humane Antikörper-Repertoires zu rekonstituieren, weil die Klonierung von über-Megabasen großen DNA-Fragmenten, welche ganze humane Ig-Loci überspannten, sogar bei der Verwendung von künstlichen Hefe-Chromosomen schwierig war. Seit kurzem erleichterte eine neue Vorgehensweise unter Verwendung eines humanen Chromosoms selbst als Vektor für die Transgenese den Transfer der vollständigen IgH- und Igk-Loci in transgene Mäuse, ohne die Notwendigkeit zur Klonierung von DNA-Fragmenten in künstliche DNA-Vektoren (Tomizuka, K., et al., 1997, Nature Genet. 16:133-143; Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. 97:722-727). Tomizuka et al. (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727) zeigten die Einführung von zwei transmittierbaren bzw. übertragbaren humanen Chromosomen-Fragmenten (hCFs), wobei eines den Immunglobulin(Ig)-Schwereketten-Locus (IgH, ~1,5 Mb) und das andere den κ-Leichtketten-Locus (Igk, ~2 Mb) enthielt, in einen transgenen Maus-Stamm, dessen endogene IgH- und Igk-Loci inaktiviert worden waren. In den resultierenden Doppel-transchromosomischen(Tc)/Doppel-Knockout(KO)-Mäusen behielt ein wesentlicher Anteil der somatischen Zellen beide hCFs bei, und der Rescue hinsichtlich des Defekts in der Ig-Produktion wurde durch eine Expression von Schwer- und Kappa-Leicht-Ketten von humanem Ig auf hohem Niveau, in Abwesenheit von Schwer- und Kappa-Leicht-Ketten der Maus gezeigt. Darüber hinaus ähnelten die Se-

rum-Expressionsprofile von vier humanen Ig- γ -Subklassen denjenigen, welche in Menschen beobachtet werden. Die transgenen Mäuse entwickelten eine antigenspezifische Human-Antikörperantwort nach Immunisierung mit humanem Serumalbumin (HSA), und HSA-spezifische humane monoklonale Antikörper mit verschiedenen Isotypen wurden aus ihnen erhalten. Die Untersuchung von Tomizuka et al., (ebenda) demonstrierte auch die Instabilität von hChr.2-abgeleiteten hCF, enthaltend den Ig κ -Locus (hCF(2-W23)) in Mäusen. Die beobachtete Instabilität des κ -Transchromosoms könnte ein Hindernis für eine optimale Human-Kappa-Leichtketten-Expression und die Produktion von human-kappa-positiven Hybridomen sein. Tatsächlich waren Zwei-Drittel der Anti-HSA-Hybridome, welche aus einer Doppel-Tc/KO-Maus erhalten wurden, Maus-Lambda-positiv (m λ^+), und eine Mehrheit (83%) von IgG/m λ -Hybridomen hatten festgestelltermaßen das hCF(2-W23) verloren. Deshalb besteht ein Bedarf nach transgenen Tieren, welche Charakteristika beibehalten, die durch die Transchromosomen vermittelt werden, welche von Tomizuka et al. (ebenda) beschrieben wurden, insbesondere Tiere, welche im Wesentlichen das vollständige Repertoire von humanen Schwereketten-Isotypen exprimieren und des Weiteren eine verbesserte Stabilität von eingebrachten humanen Sequenzen aufzeigen, was eine erhöhte Effizienz beim Erhalten von vollständig humanen Antikörpern erlaubt.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0003] Die Erfindung sieht eine transgene Maus vor, die zwei humane Immunglobulin-Loci umfasst, wobei ein humaner Immunglobulin-Locus ein humaner Schwereketten-Locus ist, welcher auf einem Transchromosom lokalisiert ist, und der andere humane Immunglobulin-Locus ein Abschnitt eines humanen Leichtketten-Locus-Transgens ist, welcher stabil in das nicht-humane Säuger-Genom integriert ist. In manchen transgenen Mäusen ist der humane Leichtketten-Locus mit einem endogenen Säugerchromosom assoziiert. In manchen transgenen Mäusen liegt der humane Schwereketten-Locus von einem Transchromosom vor, und der humane Leichtketten-Locus ist mit einem endogenen Säugerchromosom assoziiert. In manchen derartigen transgenen Mäusen ist wenigstens ein Teil des humanen Leichtketten-Locus in einen YAC-Vektor kloniert. In manchen transgenen Mäusen ist der humane Schwereketten-Locus im hCF(SC20) enthalten, und der humane Leichtketten-Locus ist in dem humanen Kappa-Leichtketten-Locus-Transgen KCo5 enthalten. In transgenen Mäusen sind der endogene Säuger-Schwereketten-Locus und mindestens ein Säuger-Leichtketten-Locus inaktiviert. In manchen derartigen transgenen Mäusen sind der endogene Säuger-Schwereketten-Locus und der Kappa-Leichtketten-Locus inaktiviert.

[0004] In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In einigen transgenen Mäusen handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des Fc γ RIIB-Gens.

[0005] Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Erzeugung einer Vielzahl von B-Zellen, welche humane Antikörpersequenzen exprimieren, wobei das Verfahren umfasst: Bereitstellen der transgenen Maus und Immunisieren der transgenen Maus, um eine Vielzahl von B-Zellen zu erzeugen, welche humane Antikörpersequenzen exprimieren. In einigen solchen Verfahren ist das Transchromosom ein Fragment des humanen Chromosoms 14. In einigen solchen Verfahren ist das humane Transchromosom ein humanes Chromosomenfragment SC20 (hCF(SC20)). Einige solche Verfahren umfassen ferner das Absammeln der Vielzahl von B-Zellen, welche Sequenzen exprimieren, die humane Antikörper exprimieren. Einige solcher Verfahren umfassen ferner das Fusionieren der Vielzahl von B-Zellen mit immortalisierten Zellen unter Bildung von Hybridomen. Andere derartige Verfahren umfassen ferner das Absammeln der humanen Antikörper-Sequenzen aus den Hybridomen. In einigen solchen Verfahren werden die humanen Antikörper-Sequenzen gereinigt. Einige derartige Verfahren umfassen ferner das Sammeln der Sequenzen, welche humane Antikörper codieren. In einigen derartigen Verfahren handelt es sich bei den Sequenzen, welche humane Antikörper codieren, um Vollängen-Formen. In manchen Verfahren werden die humane Antikörper codierenden Sequenzen in transfizierten Zellen exprimiert. In manchen derartigen Verfahren umfasst der humane Leichtkette-Locus nicht rearrangierte Sequenzen des natürlichen humanen Kappa-Leichtkette-Locus. In manchen solchen Verfahren ist der humane Kappa-Leichtkette-Locus das inserierte KCo5-Transgen. In einigen derartigen Verfahren umfasst die Vielzahl von B-Zellen mindestens eine erste B-Zelle, welche einen Antikörper mit einem ersten Isotyp, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, codiert. In manchen Verfahren ist der IgA-Isotyp IgA₁ oder IgA₂. In einigen Verfahren ist der IgG-Isotyp IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄. In manchen derartigen Verfahren umfasst die Vielzahl von B-Zellen ferner mindestens eine zweite B-Zelle, codierend einen Antikörper mit einem zweiten Isotyp, welcher unterschiedlich zum ersten Isotyp ist, gewählt aus der Gruppe, welche aus IgA, IgD, IgE, IgG und IgM besteht. Bei einigen Verfahren umfasst die Vielzahl von B-Zellen mindestens fünf B-Zellen, welche jeweils einen Antikörper mit einem verschiedenen Isotyp codieren, wobei die Isotypen der Antikörper IgA, IgD, IgE, IgG bzw. IgM sind. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegen Autoantigen erhöht. In einigen derartigen Verfahren

handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0006] Die Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz vor, welcher an ein vorbestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Immunisieren einer transgenen Maus der Erfindung mit einem vorbestimmten Antigen; und Gewinnen des Antikörpers mit humaner Sequenz aus der immunisierten Maus. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegen Autoantigen erhöht. In einigen solchen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0007] Die durch Ausführen der Erfindung erhaltenen Antikörper mit humaner Sequenz können verschiedene Antikörperisotypen, oder Mischungen davon, umfassen, wie etwa IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD und IgE. Die Antikörper mit humaner Sequenz können eine Volllängen-Form sein (z. B. ein IgG₁-, IgG₄-, IgA₁- oder ein IgA₂-Antikörper) oder können lediglich einen antigenbindenden Bereich einschließen (z. B. ein Fab-, F(ab')₂-, Fv- oder Fd-Fragment). Einige Antikörper mit humaner Sequenz sind rekombinante Antikörper mit humaner Sequenz. Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung können typischerweise an vorbestimmte Antigene mit Gleichgewichts-Assoziierungskonstanten (K_a) von mindestens 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} und 10^{12} M^{-1} binden. Einige Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung sind monoklonal. Einige Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung sind antigenspezifisch.

[0008] Die Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Erzeugung antigenspezifischer Hybridome, welche Antikörper mit humaner Sequenz sezernieren, vor, wobei das Verfahren umfasst: Immunisieren der transgenen Maus der Erfindung mit einem vorbestimmten Antigen; Fusionieren von Lymphozyten aus der transgenen Maus mit immortalisierten Zellen unter Bildung von Hybridomzellen; und Bestimmen der Bindung des von den Hybridomzellen hergestellten Antikörpers an das vorbestimmte Antigen. In einigen derartigen Verfahren sezernieren mehr als 50% der antigenspezifischen Hybridomklone Antikörper, welcher humane Schwere- und humane Leichtkette aufweist. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In einigen derartigen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0009] Die Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz vor, welcher an ein vorbestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Immunisieren einer transgenen Maus der Erfindung mit einem vorbestimmten Antigen; und Screenen von gebildeten Hybridomzellen hinsichtlich des Vorhandenseins von antigenreaktiven Antikörpern. In einigen solchen Verfahren werden die Hybridomzellen bei einer größeren Effizienz als 20% subkloniert. In einigen solchen Verfahren werden die antigenreaktiven Antikörper aus dem Hybridom in Kultur sezerniert. In manchen derartigen Verfahren sind die antigenreaktiven Antikörper im Wesentlichen rein. In manchen Verfahren werden die im Wesentlichen reinen Antikörper zur therapeutischen Verwendung formuliert. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In manchen solchen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0010] Die Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Herstellung von rearrangierten Immunglobulin-Sequenzen vor, umfassend: Bereitstellen einer transgenen Maus der Erfindung und Gewinnen der rearrangierten humanen Immunglobulinsequenzen aus der transgenen Maus. In einigen Verfahren umfasst der Gewinnungs-Schritt das Absammeln von B-Zell-Lymphozyten, enthaltend die rearrangierten humanen Immunglobulinsequenzen, aus der transgenen Maus. In solchen Verfahren umfasst der Gewinnungs-Schritt das Isolieren und Amplifizieren von mRNA aus B-Zell-Lymphozyten, um cDNA zu erzeugen. Einige derartige Verfahren umfassen ferner das Isolieren und Amplifizieren von Sequenzen der variablen Region von Schwer- und Leichtkette aus der cDNA. Die Erfindung stellt ferner isolierte Nukleinsäuren bereit, welche diese amplifizierten Sequenzen der schweren variablen Region aus der cDNA codieren. Die Erfindung stellt des Weiteren isolierte Nukleinsäuren bereit, welche die amplifizierten Sequenzen der variablen Leichtketten-Region aus der cDNA codieren. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In manchen solchen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0011] In einem anderen Aspekt sieht die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, welche die Antikörper mit humaner Sequenz, oder antigenbindende Bereiche, der Erfindung codieren, vor. Folglich werden auch rekombinante Expressionsvektoren, welche die Antikörper codierenden Nukleinsäuren der Erfindung einschließen, und Wirtszellen (oder Nachkommen dieser Wirtszellen), welche mit solchen Vektoren transfiziert sind, von der Erfindung eingeschlossen, wie auch Verfahren zur Herstellung der Antikörper der Erfindung durch Kultivieren die-

ser Wirtszellen. Einige solche Verfahren umfassen das Kultivieren der Wirtszellen unter solchen Bedingungen, dass die Nukleinsäure exprimiert wird; und das Gewinnen der Nukleinsäure aus der kultivierten Wirtszelle oder ihrem Kulturmedium. Manche Wirtszellen sind Eukaryoten. Manche derartige Expressionsvektoren umfassen eine Nukleinsäure, welche die Sequenzen der variablen Schwer- und Leichtketten-Region der Erfindung codiert, wobei die Sequenzen der variablen Schwer- und Leichtketten-Region funktionsfähig mit einer regulatorischen Sequenz verbunden sind, welche die Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle steuert.

[0012] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung einer humanen Antikörper-Display-Bibliothek bereit, wobei das Verfahren umfasst: Einführen eines Immunogens in die transgene Maus der Erfindung; Isolieren einer Population von Nukleinsäuren, welche die humanen Antikörperketten codieren, aus lymphatischen Zellen der transgenen Maus; und Bilden einer Bibliothek von Display-Packungen, welche die Antikörperketten präsentieren, wobei ein Bibliotheksmitglied eine Nukleinsäure umfasst, codierend eine Antikörperkette, und die Antikörperkette von der Packung präsentiert wird. In einigen derartigen Verfahren fehlt der transgenen Maus ein nachweisbarer Titer gegenüber dem Immunogen, wenn der Isolierungsschritt durchgeführt wird. In einigen derartigen Verfahren ist das Immunogen eine Nukleinsäure. In manchen derartigen Verfahren codiert die Nukleinsäure einen membrangebundenen Rezeptor. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In manchen derartigen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0013] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz, oder eines Fragmentes davon, welcher an ein vorbestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Immunisieren einer transgenen Maus der Erfindung mit einem vorbestimmten Antigen; Auffangen von Antikörper-V-Region-Sequenzen aus der immunisierten transgenen Maus; Klonieren der aufgefundenen V-Regionen in einen DNA-Vektor unter Erzeugung einer Expressionsbibliothek; und Exprimieren der Bibliothek, um V-Region-Sequenzen zu identifizieren, welche einen Antikörper, oder ein Fragment davon, codieren, welcher an das vorbestimmte Antigen bindet. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber Autoantigen erhöht. In einigen solchen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0014] Die Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz, oder eines Fragmentes davon, vor, welcher an ein vorbestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Immunisieren einer transgenen Maus der Erfindung mit einem vorbestimmten Antigen; Isolieren von cDNA, codierend mindestens eine humane Antikörper-V-Region, aus B-Zellen der immunisierten transgenen Maus oder aus Hybridomen, welche durch Fusion der B-Zelle und einer unsterblichen bzw. immortalisierten Zelle erzeugt wurden; Klonieren der cDNA in einen Expressionsvektor; Einbringen des Vektors in eine Wirtszelle; Kultivieren der Wirtszelle; und Auffangen des Antikörpers mit humaner Sequenz, oder Fragmentes davon, aus der Wirtszelle oder deren Kulturmedium. In manchen solchen Verfahren wird der Isolierungsschritt durch PCR durchgeführt. In einigen derartigen Verfahren wird der Isolierungsschritt durch cDNA-Bibliotheks-Screening unter Verwendung von mindestens einer DNA-Sonde durchgeführt. In einigen derartigen Verfahren wird der Isolierungsschritt durch Phagendisplay-Bibliotheks-Screening durchgeführt. In manchen derartigen Verfahren codiert die cDNA Vollängen-Antikörper mit humaner Sequenz. In manchen Verfahren ist der Isotyp des gewonnenen Antikörpers mit humaner Sequenz verschieden von dem Isotyp von Antikörper-produzierenden Zellen der immunisierten transgenen Maus. In einem anderen Aspekt umfasst die transgene Maus ferner eine Mutation eines Gens, wobei die Mutation die Immunantwort gegenüber einem Autoantigen erhöht. In einigen derartigen Verfahren handelt es sich bei der Mutation um die Inaktivierung des FcγRIIB-Gens.

[0015] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Verbesserung der Stabilität einer transchromosomischen Maus-Hybridomzelle bereit, welche einen humanen Antikörper exprimiert, der mit einem vorbestimmten Antigen reaktiv ist, wobei das Verfahren umfasst: Kreuzen bzw. Züchten einer ersten Maus, wobei die erste Maus einen ersten humanen Immunglobulin-Locus auf einem Transchromosom umfasst, zusammen mit einer zweiten Maus, wobei die zweite Maus einen zweiten humanen Immunglobulin-Locus umfasst, der innerhalb eines endogenen Maus-Chromosoms inseriert ist; Erhalten einer dritten Maus aus der Züchtung, wobei die dritte Maus beide, sowohl den ersten als auch den zweiten, humanen Immunglobulin-Locus umfasst; Immunisieren der dritten Maus oder ihrer Nachkommen, welche sowohl den ersten als auch den zweiten humanen Immunglobulin-Locus beibehalten, mit einem vorbestimmten Antigen; Auffangen von B-Zellen aus der immunisierten Maus; und Fusionieren der B-Zellen mit immortalisierten Zellen, um Hybridomzellen zu erhalten, welche den humanen Antikörper, der mit dem vorbestimmten Antigen reaktiv ist, exprimieren. Einige solche Verfahren umfassen fernerhin: Kultivieren der Hybridomzellen in Medien; Testen der Medien, um die Gegenwart von Hybridomzellen zu identifizieren, welche mit dem vorbestimmten Antigen reaktive humane Antikörper exprimieren;

Verdünnen der Hybridomzellen; und Kultivieren der verdünnten Hybridomzellen, um klonale Zelllinien zu erhalten, welche monoklonalen humanen Antikörper exprimieren, der mit dem vorbestimmten Antigen reaktiv ist. In manchen derartigen Verfahren werden die klonalen Zelllinien aus mindestens 50% der identifizierten Hybridomzellen erhalten.

[0016] Eine Maus-Hybridomzelle, welche gemäß der Erfindung hergeleitet wurde, kann einen Antikörper mit humaner Sequenz sezernieren, der einen IgA-Isotyp aufweist, welcher mit einer Gleichgewichts-Assoziationskonstante (K_a) von wenigstens 10^{10} M^{-1} an ein spezifiziertes Antigen bindet.

[0017] Ein gemäß der Erfindung hergeleiteter Antikörper mit humaner Sequenz, der einen IgA-Isotyp aufweist, kann an ein spezifiziertes Antigen mit einer Gleichgewichts-Assoziationskonstante (K_a) von wenigstens 10^{10} M^{-1} binden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] [Fig. 1](#). Entwurf für einen Cmu-Targeting-Vektor. A) Genomische Maus-DNA für die Cmu-Region. B) Ein Cmu-Targeting-Vektor. C) Die genomische Maus-DNA, homolog rekombiniert mittels des Cmu-Targeting-Vektors.

[0019] [Fig. 2](#). Serumkonzentrationen von humanem Ig μ -, γ -, κ - und Maus-Lambda-Ketten in den Doppel-TC/KO- und durch Kreuzung gezüchteten bzw. Kreuzungs-Mäusen.

[0020] [Fig. 3](#). Serumkonzentrationen von Anti-CD4-Human-Ig γ in den immunisierten Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen am Tag 34.

[0021] [Fig. 4](#). Serumkonzentrationen von Anti-CD4-Human-Ig κ in den immunisierten Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen am Tag 34.

[0022] [Fig. 5](#). Zeitverlauf der Anti-CD4-Human-Ig γ -Antwort in den Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen, welche den höchsten Serumtiter unter jeder Gruppe ($N = 5$) am Tag 34 zeigten.

[0023] [Fig. 6](#). Zeitverlauf der Anti-CD4-Human-Ig κ -Antwort in den Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen, welche den höchsten Serumtiter unter jeder Gruppe ($N = 5$) am Tag 34 zeigten.

[0024] [Fig. 7](#). Wachstumskurve und Produktion von humanem monoklonalen Anti-CD4-Antikörper der KM2-3-Hybridomzellen.

[0025] [Fig. 8](#). Serumkonzentrationen von Anti-GCSF-Human-Ig γ in den immunisierten Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen am Tag 34.

[0026] [Fig. 9](#). Serumkonzentrationen von Anti-GCSF-Human-Ig κ in den immunisierten Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen am Tag 34.

[0027] [Fig. 10](#). Zeitverlauf der Anti-GCSF-Human-Ig γ -Antwort in den Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen, welche den höchsten Serumtiter unter jeder Gruppe ($N = 5$) am Tag 34 zeigten.

[0028] [Fig. 11](#). Zeitverlauf der Anti-GCSF-Human-Ig κ -Antwort in den Doppel-TC/KO- und Kreuzungs-Mäusen, welche den höchsten Serumtiter unter jeder Gruppe ($N = 5$) am Tag 34 zeigten.

[0029] [Fig. 12](#). Dosis-Antwort-Kurven von humanen monoklonalen Anti-CTLA-4-Antikörpern hinsichtlich Blockierungsaktivität.

[0030] [Fig. 13](#). Inhibition der CTLA-4(Biotin)-Bindung an B7.2-Zellen mit monoklonalen Antikörpern.

[0031] [Fig. 14](#). Verstärkte Antworten gegen Rinder-C-IV im Serum von Kreuzungs-(Fc)-Mäusen.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

DEFINITIONEN

[0032] Der Ausdruck "Transchromosom" bezieht sich auf ein Chromosom oder ein Fragment davon, welches in eine Zelle einer Maus überführt werden kann. Eine exemplarische Zelle, in welche die Transchromosom(en) eingebracht werden, ist eine ES-Zelle. Ein Transchromosom kann einen selektierbaren Marker umfassen und kann aus von der Maus verschiedenen Spezies abgeleitet werden. Ein Transchromosom kann einen Abschnitt eines humanen Chromosoms umfassen. Die Begriffe "transchromosomisch" oder "Transchromosom" bedeuten "ein Transchromosom behaltend" oder "von einem Transchromosom sein".

[0033] Die Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung werden in einer transgenen Maus hergestellt, die zur Herstellung von mehreren Isotypen von humanen (z. B. monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpern (z. B. IgM, IgD, IgG, IgA und/oder IgE) gegen eine Vielfalt von Antigenen mittels Durchlaufen einer V-D-J-Rekombination, und, für Nicht-IgM/Nicht-IgD-Antikörper, eines Isotyp-Switchings bzw. -Wechsels fähig ist. Folglich schließen verschiedene Aspekte der Erfindung Antikörper und Antikörperfragmente, und pharmazeutische Zusammensetzungen davon, ein, sowie transgene Mäuse und B-Zellen und Hybridome zur Herstellung derartiger monoklonaler Antikörper.

[0034] Außer es ist angegeben, werden die Begriffe "Patient" oder "Subjekt" austauschbar verwendet und beziehen sich auf Säugetiere, wie etwa menschliche Patienten und nicht-menschliche Primaten, sowie Versuchstiere, wie Kaninchen, Ratten und Mäuse oder andere Tiere.

[0035] Der Begriff "Behandeln" schließt die Verabreichung der Verbindungen oder Mittel der vorliegenden Erfindung ein, um den Ausbruch der Symptome, Komplikationen bzw. Leiden oder der biochemischen Indizien einer Krankheit zu verhindern oder zu verzögern, die Symptome zu lindern oder eine weitere Entwicklung der Krankheit, des Leidens oder der Störung (z. B. Autoimmunkrankheit) aufzuhalten oder zu verhindern. Die Behandlung kann eine prophylaktische (zum Verhindern oder Verzögern des Ausbruchs der Krankheit, oder zur Verhinderung der Ausprägung ihrer klinischen oder subklinischen Symptome) oder therapeutische Unterdrückung oder Linderung von Symptomen nach der Manifestation der Krankheit sein.

[0036] Im Allgemeinen bezieht sich der Ausdruck "gut toleriert bzw. gut verträglich" auf die Abwesenheit von nachteiligen Änderungen im Gesundheitszustand, welche als Ergebnis der Behandlung auftreten und Behandlungsentscheidungen beeinflussen würden.

[0037] Der Begriff "Lymphozyt", wie hierin verwendet, besitzt die normale Bedeutung auf dem Fachgebiet und bezieht sich auf einen Beliebigen der mononukleären, nicht-phagozytischen Leukozyten, welche in Blut, Lymphe und lymphoiden Geweben gefunden werden, d. h. B- und T-Lymphozyten.

[0038] Der Ausdruck "Subpopulationen von T-Lymphozyten" oder "T-Zell-Untergruppe(n)" bezieht sich auf T-Lymphozyten oder T-Zellen, welche durch die Expression von bestimmten Zelloberflächen-Markern gekennzeichnet sind (siehe Barclay, A. N., et al. (Hrsg.), 1997, THE LEUKOCYTE ANTIGEN FACTS BOOK, 2. AUSGABE, Academic Press, London, Großbritannien; diese Bezugsstelle wird hierin für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen).

[0039] Die Begriffe "mit cytotoxischen T-Lymphozyten assoziiertes Antigen-4", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4-Antigen" und "CD152" (siehe z. B. Murata, 1999, Am J. Pathol. 155:453-460) werden austauschbar verwendet und schließen Varianten, Isoformen, Spezieshomologe von humanem CTLA-4 und Analoge, welche mindestens ein gemeinsames Epitop mit CTLA-4 aufweisen (siehe z. B. Balzano, 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32), ein.

[0040] Die vollständige cDNA-Sequenz von humanem CTLA-4 hat die Genbank-Zugangsnummer L15006. Die Region der Aminosäuren 1-37 ist das Leader-Peptid; 28-161 ist die extrazelluläre V-ähnliche Domäne; 162-187 ist die Transmembrandomäne; und 188-223 ist die cytoplasmatische Domäne. Varianten der Nukleotidsequenz sind berichtet worden, einschließlich einer G-zu-A-Transition an der Position 49, einer C-zu-T-Transition an der Position 272, und einer A-zu-G-Transition an der Position 439. Die vollständige DNA-Sequenz von Maus-CTLA-4 besitzt die EMBL-Zugangsnummer X05719 (Brunet et al., 1987, Nature 328:267-270). Die Region von Aminosäure 1-35 ist das Leader-Peptid.

[0041] Der Begriff "Epitop" bedeutet eine Proteindeterminante, die zur spezifischen Bindung an einen Anti-

körper in der Lage ist. Epitope bestehen üblicherweise aus chemisch aktiven Oberflächengruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren- oder Zuckerseitenketten, und weisen üblicherweise spezifische dreidimensionale Strukturmerkmale sowie spezifische Ladungsmerkmale auf. Es werden Konformations- und Nicht-Konformations-Epitope dahingehend unterschieden, dass die Bindung der Ersteren, aber nicht der Letzteren, in Gegenwart von denaturierenden Lösungsmitteln verloren geht.

[0042] Ein intakter "Antikörper" umfasst mindestens zwei schwere (H)-Ketten und zwei leichte (L)-Ketten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Schwerekette besteht aus einer variablen Schwereketten-Region (hierin abgekürzt als VH) und einer konstanten Schwereketten-Region. Die konstante Schwereketten-Region ist aus drei Domänen aufgebaut, CH1, CH2 und CH3. Jede leichte Kette ist aus einer variablen Leichtketten-Region (hierin abgekürzt als VL) und einer konstanten Leichtketten-Region aufgebaut. Die konstante Leichtketten-Region besteht aus einer Domäne CL. Die VH- und VL-Regionen können weiter in Regionen mit Hypervariabilität, bezeichnet als Komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR), unterbrochen bzw. durchsetzt mit Regionen, welche stärker konserviert sind, bezeichnet als Gerüstregionen (FR, framework regions), unterteilt werden. Jede VH und VL ist aus drei CDRs und vier FRs aufgebaut, welche vom Aminoterminus zum Carboxylterminus in der folgenden Reihenfolge angeordnet sind: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten enthalten eine Bindungsdomäne, welche mit einem Antigen wechselwirkt. Die konstanten Regionen der Antikörper können die Bindung des Immunglobulins an Wirtsgewebe oder Faktoren vermitteln, einschließlich verschiedener Zellen des Immunsystems (z. B. Effektorzellen) über zelluläre Rezeptoren, wie Fc-Rezeptoren (z. B. FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII und FcRn) und der ersten Komponente (C1q) des klassischen Komplementsystems. Der Begriff Antikörper schließt antigenbindende Bereiche eines intakten Antikörpers ein, welche die Fähigkeit beibehalten, das Antigen zu binden. Beispiele von antigenbindenden Abschnitten schließen (i) ein Fab-Fragment, ein einwertiges Fragment, bestehend aus den VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen; (ii) ein F(ab')₂-Fragment, ein zweiwertiges Fragment, das zwei Fab-Fragmente umfasst, welche durch eine Disulfidbrücke an der Gelenkregion verknüpft sind; (iii) ein Fd-Fragment, welches aus den VH- und CH1-Domänen besteht; (iv) ein Fv-Fragment, bestehend aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers, (v) ein dAb-Fragment (Ward et al., 1989, Nature 341:544–546), welches aus einer VH-Domäne besteht; und (vi) eine isolierte Komplementaritäts-bestimmende Region (CDR) ein. Obwohl die zwei Domänen des Fv-Fragmentes, VL und VH, von separaten Genen codiert werden, können sie darüber hinaus unter Anwendung rekombinanter Verfahren durch einen synthetischen Linker verknüpft werden, welcher ermöglicht, dass sie als eine einzelne Proteinkette hergestellt werden, in welcher die VL- und VH-Regionen sich unter Bildung einwertiger Moleküle paaren (bekannt als Einzelketten-Fv (scFv); siehe z. B. Bird et al., 1988, Science 242:423–426; und Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5879–5883). Derartige Einzelketten-Antikörper sind bei Bezugnahme auf den Begriff "Antikörper" eingeschlossen. Fragmente können durch rekombinante Techniken oder enzymatische oder chemische Spaltung von intakten Antikörpern hergestellt werden.

[0043] Der Ausdruck "Antikörper mit humaner Sequenz" schließt Antikörper ein, welche variable und konstante Regionen (falls vorhanden) aufweisen, die von humanen Immunglobulinsequenzen abgeleitet sind. Die Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung können Aminosäurereste einschließen, welche nicht von humanen Keimbahn-Immunglobulinsequenzen codiert werden (z. B. Mutationen, die mittels statistischer oder ortsspezifischer Mutagenese in vitro oder durch somatische Mutation in vivo eingebracht werden). Allerdings wird mit dem Ausdruck "Antikörper mit humaner Sequenz", wie hierin verwendet, nicht beabsichtigt, Antikörper einzuschließen, bei welchen ganze CDR-Sequenzen, ausreichend zur Vermittlung von Antigen-spezifität und abgeleitet aus der Keimbahn einer anderen Säugerspezies, wie einer Maus, auf humane Gerüstsequenzen gepfropft bzw. verpflanzt worden sind (d. h. humanisierte Antikörper).

[0044] Die Begriffe "monoklonaler Antikörper" oder "monoklonale Antikörperzusammensetzung" beziehen sich auf eine Präparation von Antikörpermolekülen einer einzigen molekularen Zusammensetzung. Eine monoklonale Antikörperzusammensetzung zeigt eine einzige Bindungsspezifität und Affinität für ein bestimmtes Epitop. Folglich bezieht sich der Ausdruck "humaner monoklonaler Antikörper" auf Antikörper, welche eine einzige Bindungsspezifität aufzeigen, welche variable und konstante Regionen (falls vorhanden) aufweisen, abgeleitet aus humanen Keimbahn-Immunglobulinsequenzen. In einer Ausführungsform werden die humanen monoklonalen Antikörper durch ein Hybridom hergestellt, welches eine B-Zelle, die aus einem transgenen nicht-humanen Tier, z. B. einer transgenen Maus, erhalten wurde, aufweisend ein Genom, das ein humanes Schwerekette-Transgen und ein Leichtkette-Transgen umfasst, fusioniert mit einer immortalisierten Zelle, einschließt.

[0045] Der Begriff "diklonaler Antikörper" bezieht sich auf eine Präparation von mindestens zwei Antikörpern gegen ein Antigen. Typischerweise binden die verschiedenen Antikörper an verschiedene Epitope.

[0046] Der Begriff "oligoklonaler Antikörper" bezieht sich auf eine Präparation von 3 bis 100 verschiedenen Antikörpern gegen ein Antigen. Typischerweise binden die Antikörper in einer derartigen Präparation an einen Spielraum von verschiedenen Epitopen.

[0047] Der Begriff "polyklonaler Antikörper" bezieht sich auf eine Präparation von mehr als 1 (zwei oder mehr) verschiedenen Antikörpern gegen ein Antigen. Eine derartige Präparation schließt Antikörper ein, welche an einen Spielraum von verschiedenen Epitopen binden.

[0048] Die Erfindung liefert die Grundlage für die Herstellung von Antikörpern mit humaner Sequenz gegen eine Vielzahl von Antigenen, einschließlich humanen Antikörpern gegen humanes CTLA-4, humanes G-CSF, humanes HSA, humanes CD4 und humanen EGFR. Die Human-Antikörper dieser Erfindung schließen Antikörper ein, welche Signale blockieren oder antagonisieren, die von Zelloberflächenrezeptoren, wie dem humanen CTLA-4-Rezeptor und dem humanen CD4-Corezeptor, transduziert werden. Einige dieser Antikörper können an ein Epitop auf humanem CTLA-4 binden, sodass CTLA-4 an der Wechselwirkung mit einem humanen B7-Gegenrezeptor gehindert wird. In ähnlicher Weise können einige der Antikörper an ein Epitop auf humanem CD4 binden, sodass CD4 an der Wechselwirkung mit humanem Klasse-II-MHC gehindert wird. Weil die Wechselwirkung von humanem CTLA-4 mit humanem B7 ein Signal transduziert, welches zur Inaktivierung von T-Zellen führt, die den humanen CTLA-4-Rezeptor tragen, induziert, erhöht oder verlängert der Antagonismus der Wechselwirkung in effektiver Weise die Aktivierung von T-Zellen, welche den humanen CTLA-4-Rezeptor tragen, wodurch eine Immunantwort verlängert oder verstärkt wird. Ein "Blockierungs-Antikörper" bezieht sich auf einen Antikörper, welcher die Bindung von löslichem humanen CTLA-4 an zellexprimierten humanen B7-Ligand um mindestens 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% oder 99,9% unter Bedingungen verringert, bei welchen das Verhältnis von Antikörper-Kombinierungs-Stelle zu humaner CTLA-4-Liganden-Bindungsstelle größer als 1:1 ist, und die Konzentration an Antikörper größer als 10^{-8} M ist.

[0049] Die Erfindung sieht ferner IgA-Antikörper mit humaner Sequenz gegen eine Vielzahl von humanen Antigenen vor. Beispielhafte IgA-Antikörper schließen [solche gegen] CD4, G-CSF, CTLA-4 und EGFR ein. Weil IgA-Antikörper Dimere bilden können, können derartige IgA-Antikörper verbesserte Vernetzungseigenschaften aufweisen.

[0050] Andere Antikörper-Präparationen, die manchmal als mehrwertige Präparationen bezeichnet werden, binden an Zelloberflächenrezeptoren, wie humanen CTLA-4, in einer solchen Weise, dass mehrere humane CTLA-4-Rezeptoren auf derselben Zelle vernetzt werden.

[0051] Eine Vernetzung kann auch durch Kombinieren von löslichen zweiwertigen Antikörpern mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten bewerkstelligt werden. Diese polyklonalen Antikörper-Präparationen umfassen mindestens zwei Paare von Schwer- und Leichtketten, welche an verschiedene Epitope auf dem Antigen binden, sodass ein Signal als Ergebnis von Antikörper-vermittelter Vernetzung transduziert werden kann.

[0052] Der Ausdruck "rekombinanter humaner Antikörper" schließt alle Antikörper mit humaner Sequenz der Erfindung ein, welche durch rekombinante Mittel hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, wie etwa Antikörper, isoliert aus einem Tier (z. B. einer Maus), welche hinsichtlich humaner Immunglobulin-Gene (weiter nachstehend beschrieben) transgen ist; Antikörper, exprimiert unter Anwendung eines rekombinanten Expressionsvektors, der in eine Wirtszelle transfiziert wurde, Antikörper, isoliert aus einer rekombinanten, kombinatorischen humanen Antikörper-Bibliothek, oder Antikörper, welche durch andere Mittel hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, welche das Spleissen von humanen Immunglobulin-Genesequenzen an andere DNA-Sequenzen beinhalten. Derartige rekombinanten humanen Antikörper besitzen variable und konstante Regionen (falls vorhanden), welche aus humanen Keimbahn-Immunglobulinsequenzen abgeleitet sind. Solche Antikörper können jedoch einer In-vitro-Mutagenese (oder, wenn ein hinsichtlich humaner Ig-Sequenzen transgenes Tier verwendet wird, einer somatischen In-vivo-Mutagenese) unterzogen werden, und daher sind die Aminosäuresequenzen der VH- und VL-Regionen der rekombinanten Antikörper Sequenzen, welche, obgleich sie aus humanen Keimbahn-VH- und -VL-Sequenzen abgeleitet und damit verwandt sind, nicht natürlich innerhalb des humanen Antikörper-Keimbahnrepertoires in vivo existieren können.

[0053] Ein "heterologer Antikörper" wird in Bezug auf die transgene Maus definiert, welche einen derartigen Antikörper produziert. Dieser Ausdruck bezieht sich auf einen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz oder eine codierende Nukleinsäuresequenz aufweist, die derjenigen entspricht, welche in einem Organismus, bei dem es sich nicht um die transgene Maus handelt, und im Allgemeinen von einer anderen Spezies als [derjenigen] der transgenen Maus, vorgefunden wird.

[0054] Ein "heterohybrider Antikörper" bezieht sich auf einen Antikörper, aufweisend eine leichte und schwere Kette von unterschiedlicher Organismen-Herkunft. Zum Beispiel ist ein Antikörper, der eine humane Schwerkette, assoziiert mit einer Maus-Leichtkette, aufweist, ein heterohybrider Antikörper.

[0055] Der Begriff "im Wesentlichen rein" oder "isoliert" bezieht sich auf eine Objekt-Spezies (z. B. einen Antikörper der Erfindung), welche identifiziert und von einer Komponente ihrer natürlichen Umgebung getrennt und/oder rückgewonnen worden ist, sodass die Objekt-Spezies die vorherrschende vorhandene Spezies ist (d. h. sie auf einer molaren Basis häufiger ist als jedwede andere einzelne Spezies in der Zusammensetzung); eine "im Wesentlichen reine" oder "isolierte" Zusammensetzung bedeutet auch, dass die Objekt-Spezies mindestens etwa 50% (auf einer molaren Basis) aller vorhandenen makromolekularen Spezies ausmacht. Eine im Wesentlichen reine oder isolierte Zusammensetzung kann mehr als etwa 80 bis 90 Gew.-% aller makromolekularen Spezies, die in der Zusammensetzung vorhanden sind, umfassen. Eine isolierte Objekt-Spezies (z. B. Antikörper der Erfindung) kann auch zu essenzieller bzw. wesentlicher Homogenität gereinigt sein (Kontaminanten-Spezies können durch herkömmliche Nachweisverfahren nicht in der Zusammensetzung nachgewiesen werden), wobei die Zusammensetzung im Wesentlichen aus Derivaten einer einzigen makromolekularen Spezies besteht. Zum Beispiel kann ein isolierter Antikörper gegen humanes CTLA-4 im Wesentlichen frei von anderen Antikörpern sein, welchen eine Bindung an humanes CTLA-4 fehlt und welche an ein anderes Antigen binden. Ferner kann ein isolierter Antikörper, der spezifisch an ein Epitop, eine Isoform oder Variante von humanem CTLA-4 bindet, nichtsdestotrotz Kreuz-Reaktivität zu anderen verwandten Antigenen aufweisen, z. B. aus anderen Spezies (z. B. CTLA-4-Spezieshomologe). Darüber hinaus ist ein isolierter Antikörper der Erfindung im Wesentlichen frei von anderem zellulären Material (z. B. mit Nicht-Immunglobulin assoziierte Proteine) und/oder Chemikalien.

[0056] "Spezifische Bindung" bezieht sich auf die präferenzielle Bindung eines Antikörpers an ein spezifiziertes Antigen relativ zu anderen nicht-spezifizierten Antigenen. Der Ausdruck "bindet spezifisch (oder selektiv) an einen Antikörper" bezieht sich auf eine Bindungsreaktion, welche bestimmend für die Gegenwart des Proteins in einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Stoffen ist. Typischerweise bindet der Antikörper mit einer Assoziationskonstante (K_a) von mindestens etwa $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ oder 10^7 M^{-1} oder etwa 10^8 M^{-1} bis 10^9 M^{-1} oder etwa 10^{10} M^{-1} bis 10^{11} M^{-1} oder höher, und bindet an das spezifizierte Antigen mit einer Affinität, welche mindestens zweimal größer ist als seine Affinität für die Bindung an ein nicht-spezifisches Antigen (z. B. BSA, Casein), das verschieden von dem spezifischen Antigen oder einem nah verwandten Antigen ist. Die Ausdrücke "Antikörper, erkennend ein Antigen" und "Antikörper, spezifisch für ein Antigen" werden hierin austauschbar mit dem Begriff "ein Antikörper, der spezifisch an ein Antigen bindet" verwendet. Ein vorbestimmtes Antigen ist ein Antigen, welches vor der Selektion eines Antikörpers, der an dieses Antigen bindet, gewählt wird.

[0057] Der Ausdruck "bindet spezifisch" oder "binden spezifisch", bei Bezugnahme auf ein Peptid, bezieht sich auf ein Peptidmolekül, welches eine intermediäre oder hohe Bindungsaffinität, ausschließlich oder hauptsächlich, für ein Zielmolekül aufweist. Der Ausdruck "bindet spezifisch an" bezieht sich auf eine Bindungsreaktion, welche für das Vorhandensein eines Zielproteins in Gegenwart einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Stoffen bestimmend ist. Unter bestimmten Assaybedingungen binden somit die spezifizierten Bindungseinheiten präferenziell an ein besonderes Zielprotein und binden nicht in einem signifikanten Ausmaß an andere Komponenten, welche in einer Testprobe vorhanden sind. Eine spezifische Bindung an ein Zielprotein unter solchen Bedingungen kann eine Bindungseinheit erfordern, welche hinsichtlich ihrer Spezifität für ein besonderes Zielantigen ausgewählt bzw. selektiert ist. Eine Vielzahl von Assay-Formaten kann angewandt werden, um Liganden zu selektieren, welche mit einem bestimmten Protein spezifisch reaktiv sind. Zum Beispiel werden Festphasen-ELISA-Immunassays, Immunpräzipitation, Biacore und Western-Blot angewandt, um Peptide zu identifizieren, welche mit dem Antigen spezifisch reagieren. Typischerweise wird eine spezifische oder selektive Reaktion wenigstens das Zweifache des Hintergrundsignals oder -rauschen und noch typischer mehr als das 10-Fache des Hintergrunds sein.

[0058] Der Ausdruck "hohe Affinität" für einen Antikörper bezieht sich auf eine Gleichgewichts-Assoziationskonstante (K_a) von mindestens etwa 10^7 M^{-1} , mindestens etwa 10^8 M^{-1} , mindestens etwa 10^9 M^{-1} , mindestens etwa 10^{10} M^{-1} , mindestens etwa 10^{11} M^{-1} oder mindestens etwa 10^{12} M^{-1} oder größer, z. B. bis zu 10^{13} M^{-1} oder 10^{14} M^{-1} oder größer. Allerdings kann eine "Hochaffinitäts"-Bindung für andere Antikörperisotypen variieren.

[0059] Der Begriff " K_a ", wie hierin verwendet, bezeichnet beabsichtigtermaßen die Gleichgewichts-Assoziationskonstante einer jeweiligen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. Diese Konstante weist die Einheit von $1/\text{M}$ auf.

[0060] Der Begriff " K_d ", wie hierin verwendet, bezeichnet beabsichtigtermaßen die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante einer jeweiligen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. Diese Konstante besitzt die Einheit von M.

[0061] Der Begriff " k_a ", wie hierin verwendet, bezeichnet beabsichtigtermaßen die kinetische Assoziationskonstante einer jeweiligen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. Diese Konstante weist die Einheit von 1/Ms auf.

[0062] Der Begriff " k_d ", wie hierin verwendet, bezeichnet beabsichtigtermaßen die kinetische Dissoziationskonstante einer jeweiligen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. Diese Konstante besitzt die Einheit 1/s.

[0063] "Jeweilige Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen" bezieht sich auf die experimentellen Bedingungen, unter denen die Gleichgewichts- und kinetischen Konstanten gemessen werden.

[0064] "Isotyp" bezieht sich auf die Antikörper-Klasse, welche von den Genen der konstanten Schwervketten-Region codiert wird. Die Schwervketten werden als Gamma, Mu, Alpha, Delta oder Epsilon klassifiziert und definieren den Isotyp des Antikörpers als IgG, IgM, IgA, IgD bzw. IgE. Zusätzliche strukturelle Variationen kennzeichnen getrennte Subtypen von IgG (z. B. IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄) und IgA (z. B. IgA₁ und IgA₂).

[0065] "Isotyp-Switching bzw. -Wechsel" bezieht sich auf das Phänomen, durch welches die Klasse, oder der Isotyp, eines Antikörpers sich von einer Ig-Klasse zu einer der anderen Ig-Klassen verändert.

[0066] "Nicht-gewechselter Isotyp" bezieht sich auf die Isotypklasse der Schwervkette, welche produziert wird, wenn kein Isotyp-Switching stattgefunden hat; das CH-Gen, welches den nicht-geswitchten Isotyp codiert, ist typischerweise das erste CH-Gen unmittelbar stromabwärts des funktionell rearrangierten VDJ-Gens. Das Isotyp-Switching ist als klassisches oder nicht-klassisches Isotyp-Switching klassifiziert worden. Das klassische Isotyp-Switching findet durch Rekombinationsereignisse statt, welche mindestens eine Switch-Sequenzregion in dem Transgen beteiligen. Nicht-klassisches Isotyp-Switching kann zum Beispiel durch homologe Rekombination zwischen humanem σ_μ und humanem Σ_μ stattfinden (δ -assoziierte Deletion). Alternative nicht-klassische Switching-Mechanismen, wie Intertransgen- und/oder Interchromosomal-Rekombination, können, unter anderen, auftreten und ein Isotyp-Switching bewirken.

[0067] Der Begriff "Switch-Sequenz" bezieht sich auf diejenigen DNA-Sequenzen, welche für Switch-Rekombination verantwortlich sind. Eine "Switch-Donor"-Sequenz, typischerweise eine μ -Switch-Region, liegt 5' (d. h. stromaufwärts) zu der Konstruktregion, welche während der Switch-Rekombination deletiert werden soll. Die "Switch-Akzeptor"-Region liegt zwischen der zu deletierenden Konstruktregion und der konstanten Ersatz-Region (z. B. γ , ϵ und dergleichen). Da es keine spezifische Stelle gibt, an welcher die Rekombination stets stattfindet, ist die letztendliche Gensequenz nicht in typischer Weise aus dem Konstrukt vorhersagbar.

[0068] "Glykosylierungs-Muster" ist als das Muster von Kohlenhydrateinheiten definiert, welche kovalent an ein Protein, genauer gesagt an ein Immunglobulin-Protein, gebunden sind. Ein Glykosylierungs-Muster eines heterologen Antikörpers kann als im Wesentlichen ähnlich zu Glykosylierungs-Mustern gekennzeichnet werden, welche natürlich auf Antikörpern vorkommen, die von der Spezies des nicht-humanen transgenen Tiers produziert werden, wenn der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet erkennen würde, dass das Glykosylierungs-Muster des heterologen Antikörpers zu dem Muster der Glykosylierung in der Spezies des nicht-humanen transgenen Tiers ähnlicher ist als zu der Spezies, aus der die CH-Gene des Transgens abgeleitet wurden.

[0069] Der Begriff "natürlich vorkommend", wie auf ein Objekt angewandt, bezieht sich auf die Tatsache, dass ein Objekt in der Natur gefunden werden kann. Zum Beispiel ist eine Polypeptid- oder Polynukleotidsequenz, welche in einem Organismus (einschließlich Viren) vorhanden ist, der aus einer Quelle in der Natur isoliert werden kann und der nicht vom Menschen im Laboratorium absichtlich modifiziert worden ist, natürlich vorkommend.

[0070] Der Ausdruck "Immunglobulin-Locus" bezieht sich auf ein genetisches Element oder einen Satz von verknüpften genetischen Elementen, welche Information umfassen, die von einer B-Zelle oder einem B-Zell-Vorläufer verwendet werden kann, um ein Immunglobulin-Peptid zu exprimieren. Dieses Peptid kann ein Schwervketten-Peptid, ein Leichtketten-Peptid oder die Fusion eines Schwer- und eines Leichtketten-Peptids sein. Im Fall eines nicht-rearrangierten Locus, werden die genetischen Elemente von einem B-Zell-Vorläufer assembliert bzw. zusammengefügt, um das Gen zu bilden, welches ein Immunglobulinpeptid codiert. Im Fall eines rearrangierten Locus ist ein Gen, welches ein Immunglobulinpeptid codiert, innerhalb des Locus enthal-

ten.

[0071] Der Begriff "rearrangiert" bezieht sich auf eine Konfiguration eines Schwereketten- oder Leichtketten-Immunglobulin-Locus, worin ein V-Segment unmittelbar benachbart zu einem D-J- oder J-Segment in einer Konformation positioniert ist, welche im Wesentlichen eine vollständige VH- bzw. VL-Domäne codiert. Ein rearrangierter Immunglobulin-Gen-Locus kann durch Vergleich mit Keimbahn-DNA identifiziert werden; ein rearrangierter Locus weist mindestens ein rekombiniertes Heptamer/Nonamer-Homologieelement auf.

[0072] Der Begriff "nicht-rearrangiert" oder "Keimbahn-Konfiguration" in Bezug auf ein V-Segment bezieht sich auf die Konfiguration, worin das V-Segment nicht rekombiniert ist, sodass es unmittelbar benachbart zu einem D- oder J-Segment ist.

[0073] Die Begriffe "Nukleinsäure" oder "Nukleinsäuremolekül" beziehen sich auf ein Desoxyribonukleotid- oder Ribonukleotid-Polymer in entweder einzel- oder doppelsträngiger Form, und können, außer es ist anders lautend eingeschränkt, bekannte Analoge von natürlichen Nukleotiden beinhalten, welche in einer ähnlichen Weise wie natürlich vorkommende Nukleotide funktionieren können.

[0074] Der Begriff "isolierte Nukleinsäure" in Bezug auf Nukleinsäuren, welche Antikörper oder Antikörper-Abschnitte (z. B. VH, VL, CDR3), welche an das Antigen binden, codieren, bezieht sich beabsichtigtermaßen auf eine Nukleinsäure, in welcher die den Antikörper oder Antikörper-Abschnitt codierenden Nukleotidsequenzen frei von anderen Nukleotidsequenzen sind, welche Antikörper oder Antikörper-Abschnitte codieren, die von zum Beispiel CTLA-4 verschiedene Antigene binden, wobei diese anderen Sequenzen die Nukleinsäure in humaner genomischer DNA in natürlicher Weise flankieren können.

[0075] Der Begriff "im Wesentlichen identisch" im Kontext von zwei Nukleinsäuren oder Polypeptiden bezieht sich auf zwei oder mehr Sequenzen oder Untersequenzen, welche mindestens etwa 80%, etwa 90%, etwa 95% oder höhere Nukleotid- oder Aminosäure-Rest-Identität aufweisen, wenn sie verglichen und hinsichtlich einer maximalen Übereinstimmung aligniert bzw. parallel ausgerichtet werden, wie gemessen unter Anwendung des folgenden Sequenzvergleich-Verfahrens und/oder durch visuelle Betrachtung. Solche "im Wesentlichen identischen" Sequenzen werden typischerweise als homolog betrachtet. Die "wesentliche Identität" kann über eine Sequenzregion existieren, welche mindestens etwa 50 Reste lang ist, über eine Region von mindestens etwa 100 Resten, oder über eine Region von mindestens etwa 150 Resten, oder über die volle Länge der zwei zu vergleichenden Sequenzen. Wie nachstehend beschrieben, können beliebige zwei Antikörpersequenzen unter Verwendung des Nummerierungs-Schemas in Kabat nur in einer Weise aligniert werden. Deshalb besitzt, für Antikörper, die prozentuale Identität eine einzige und gut definierte Bedeutung.

[0076] Aminosäuren aus den variablen Regionen der reifen Schwer- und Leichtketten von Immunglobulinen werden als Hx bzw. Lx bezeichnet, wobei x eine Zahl ist, welche die Position einer Aminosäure gemäß des Schemas von Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 und 1991), angibt. Kabat listet viele Aminosäuresequenzen für Antikörper für jede Subgruppe auf, und listet die am häufigsten auftretenden Aminosäuren für jede Rest-Position in dieser Subgruppe auf, um eine Konsensussequenz aufzustellen. Kabat verwendet ein Verfahren zur Zuweisung einer Rest-Nummer an jede Aminosäure in einer aufgelisteten Sequenz, und dieses Verfahren zur Zuweisung von Rest-Nummern ist auf dem Fachgebiet zum Standard geworden. Kabat's Schema ist auf andere Antikörper, welche in seinem Kompendium nicht eingeschlossen sind, durch Alignieren des fraglichen Antikörpers mit einer der Konsensussequenzen in Kabat unter Bezug auf konservierte Aminosäuren erweiterbar. Die Verwendung des Kabat'schen Nummerierungssystems identifiziert ohne Weiteres Aminosäuren an äquivalenten Positionen in verschiedenen Antikörpern. Zum Beispiel besetzt eine Aminosäure an der L50-Position eines humanen Antikörpers die zu einer Aminosäure-Position L50 äquivalente Position eines Maus-Antikörpers. Dergleichen werden Nukleinsäuren, welche Antikörperketten codieren, aligniert, wenn die Aminosäuresequenzen, codiert von den jeweiligen Nukleinsäuren, gemäß der Kabat'schen Nummerierungs-Konvention aligniert werden. Eine alternative, strukturelle Definition ist von Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883; und Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651-663 (1989), was hierin für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen wird, vorgeschlagen worden.

[0077] Der Begriff "hybridisiert selektiv (oder spezifisch) an" bezieht sich auf die Bindung, Doppelstrangbildung oder Hybridisierung eines Moleküls an eine jeweilige Nukleotidsequenz unter stringenten Hybridisierungsbedingungen, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch (z. B. gesamte zelluläre oder Bibliotheks-DNA oder -RNA) vorhanden ist, wobei die jeweilige Nukleotidsequenz beim mindestens 10-Fachen des Hintergrunds nachgewiesen wird. In einer Ausführungsform kann von einer Nukleinsäure bestimmt werden, in-

nerhalb des Umfangs der Erfindung zu liegen, durch deren Fähigkeit, unter stringenten Bedingungen an eine Nukleinsäure zu hybridisieren, von welcher anderweitig bestimmt wurde, innerhalb des Umfangs der Erfindung zu liegen (wie den hierin beschriebenen, exemplarischen Sequenzen).

[0078] Der Ausdruck "stringente Hybridisierungsbedingungen" bezieht sich auf Bedingungen, unter welchen eine Sonde an ihre Ziel-Subsequenz, typischerweise in einem komplexen Nukleinsäuregemisch, aber nicht an andere Sequenzen in bedeutsamen Mengen hybridisieren wird (ein positives Signal (z. B. Identifizierung einer Nukleinsäure der Erfindung) ist etwa das 10-Fache der Hintergrund-Hybridisierung). Stringente Bedingungen sind sequenzabhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Eine umfangreiche Richtlinie für die Hybridisierung von Nukleinsäuren findet man z. B. in Sambrook, Hrsg., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2. AUSGABE), Band 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, Hrsg., John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, TEIL I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, Hrsg.: Elsevier, N. Y. (1993).

[0079] Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen gewählt, um etwa 5–10°C niedriger als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einem definierten Ionenstärken-pH zu sein. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nuklein-Konzentration), bei welcher 50% der zum Ziel komplementären Sonden an die Zielsequenz im Gleichgewicht hybridisieren (da die Zielsequenzen im Überschuss vorhanden sind, werden, bei der T_m , 50% der Sonden im Gleichgewicht besetzt). Stringente Bedingungen werden diejenigen sein, bei welchen die Salzkonzentration weniger als etwa 1,0 M Natriumion ist, typischerweise etwa 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder andere Salze) bei pH 7,0 bis 8,3, und die Temperatur mindestens etwa 30°C für kurze Sonden (z. B. 10 bis 50 Nukleotide) und mindestens etwa 60°C für lange Sonden (z. B. größer als 50 Nukleotide) ist. Stringente Bedingungen können auch durch die Zugabe von destabilisierenden Mitteln, wie Formamid, erzielt werden, wie es in Sambrook (nachstehend zitiert) beschrieben wird. Für eine Hochstringenz-Hybridisierung ist ein positives Signal mindestens das Zweifache des Hintergrunds, vorzugsweise das 10-Fache der Hintergrund-Hybridisierung. Beispielhafte Hochstringenz- oder stringente Hybridisierungsbedingungen schließen ein: 50% Formamid, 5 × SSC und 1% SDS, inkubiert bei 42°C, oder 5 × SSC und 1% SDS, inkubiert bei 65°C, mit einem Waschschrift in 0,2 × SSC und 0,1% SDS bei 65°C. Für eine selektive oder spezifische Hybridisierung ist ein positives Signal (z. B. Identifizierung einer Nukleinsäure der Erfindung) etwa das 10-Fache der Hintergrund-Hybridisierung. Stringente Hybridisierungsbedingungen, welche angewandt werden, um Nukleinsäuren innerhalb des Umfangs der Erfindung zu identifizieren, schließen z. B. Hybridisierung in einem Puffer, der 50% Formamid, 5 × SSC und 1% SDS umfasst, bei 42°C, oder Hybridisierung in einem Puffer, der 5 × SSC und 1% SDS umfasst, bei 65°C, ein, beides mit einem Waschschrift von 0,2 × SSC und 0,1% SDS bei 65°C. In der vorliegenden Erfindung können genomische DNA oder cDNA, umfassend Nukleinsäuren der Erfindung, in standardmäßigen Southern-Blots unter stringenten Bedingungen unter Verwendung der hier offenbarten Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden. Zusätzliche stringente Bedingungen für solche Hybridisierungen (um Nukleinsäuren innerhalb des Umfangs der Erfindung zu identifizieren) sind diejenigen, welche eine Hybridisierung in einem Puffer von 40% Formamid, 1 M NaCl, 1% SDS, bei 37°C einschließen.

[0080] Allerdings ist die Auswahl eines Hybridisierungsformats nicht kritisch – es ist die Stringenz der Waschbedingungen, welche die Bedingungen festlegt, die bestimmen, ob eine Nukleinsäure innerhalb des Umfangs der Erfindung liegt. Die zum Identifizieren von Nukleinsäuren innerhalb des Umfangs der Erfindung verwendeten Waschbedingungen schließen z. B. eine Salzkonzentration von etwa 0,02 Molar, bei pH 7, und eine Temperatur von mindestens etwa 50°C oder etwa 55°C bis etwa 60°C; oder eine Salzkonzentration von etwa 0,15 M NaCl bei 72°C während etwa 15 Minuten; oder eine Salzkonzentration von etwa 0,2 × SSC bei einer Temperatur von mindestens etwa 50°C oder etwa 55°C bis etwa 60°C, während etwa 15 bis etwa 20 Minuten, ein; oder der Hybridisierungskomplex wird zweimal mit einer Lösung mit einer Salzkonzentration von etwa 2 × SSC, enthaltend 0,1% SDS, bei Raumtemperatur während 15 Minuten gewaschen und dann zweimal mit 0,1 × SSC, enthaltend 0,1% SDS, bei 68°C während 15 Minuten gewaschen; oder äquivalente Bedingungen. Siehe Sambrook, Tijssen und Ausubel für eine Beschreibung von SSC-Puffer und äquivalenten Bedingungen.

[0081] Der Begriff "Sequenzidentität" bezieht sich auf eine Messung bzw. ein Maß der Ähnlichkeit zwischen Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen und kann unter Anwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren, wie denjenigen, die nachstehend beschrieben sind, gemessen werden:

[0082] Die Begriffe "identisch" oder Prozent-"Identität", im Kontext von zwei oder mehr Nukleinsäuren oder Polypeptidsequenzen, beziehen sich auf zwei oder mehr Sequenzen oder Subsequenzen, welche gleich sind

oder einen spezifizierten Prozentgehalt von Aminosäureresten oder Nukleotiden aufweisen, welche die gleichen sind (d. h. 60% Identität, vorzugsweise 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% Identität über eine spezifizierte Region, bei Vergleich und Alignierung hinsichtlich maximaler Übereinstimmung über ein Vergleichsfenster, oder designierte Region, wie gemessen unter Anwendung eines der folgenden Sequenzvergleichs-Algorithmen oder durch manuelles Alignment und visuelle Betrachtung).

[0083] Der Ausdruck "im Wesentlichen identisch", im Kontext von zwei Nukleinsäuren oder Polypeptiden, bezieht sich auf zwei oder mehr Sequenzen oder Subsequenzen, welche mindestens [von mindestens] 60%, häufig mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 80%, weiter bevorzugt mindestens 90% oder mindestens 95% Nukleotid- oder Aminosäurerest-Identität aufweisen, wenn sie verglichen und hinsichtlich maximaler Übereinstimmung aligniert werden, wie gemessen unter Anwendung eines der folgenden Sequenzvergleichs-Algorithmen oder durch visuelle Betrachtung. Vorzugsweise existiert die wesentliche Identität über eine Region der Sequenzen, welche eine Länge von mindestens etwa 50 Basen oder Resten aufweist, weiter bevorzugt über eine Region von mindestens etwa 100 Basen oder Resten, und am stärksten bevorzugt sind die Sequenzen über wenigstens etwa 150 Basen oder Reste hinweg im Wesentlichen identisch. In einer am stärksten bevorzugten Ausführungsform sind die Sequenzen über die gesamte Länge der codierenden Regionen hinweg im Wesentlichen identisch.

[0084] Für den Sequenzvergleich dient eine Sequenz typischerweise als eine Referenzsequenz, mit der Testsequenzen verglichen werden. Wenn ein Sequenzvergleichs-Algorithmus verwendet wird, werden die Test- und Referenzsequenzen in einen Computer eingegeben, Subsequenz-Koordinaten werden zugewiesen, falls notwendig, und die Sequenz-Algorithmus-Programmparameter werden zugeordnet. Es können Standard-Programmparameter verwendet werden, oder alternative Parameter können vorgegeben werden. Der Sequenzvergleichs-Algorithmus berechnet dann die prozentualen Sequenzidentitäten für die Testsequenzen relativ zu der Bezugssequenz, basierend auf den Programmparametern. Für den Sequenzvergleich von Nukleinsäuren und Proteinen können die Algorithmen BLAST und BLAST 2.0 und die nachstehend erörterten Standard-Parameter verwendet werden.

[0085] Ein "Vergleichsfenster", wie hierin verwendet, schließt den Bezug auf ein Segment von einer beliebigen aus der Zahl von fortlaufenden Positionen ein, die aus der Gruppe bestehend aus 20 bis 600, in der Regel etwa 50 bis etwa 200, noch üblicher etwa 100 bis etwa 150 gewählt sind, in welchem eine Sequenz mit einer Referenzsequenz mit der gleichen Zahl an fortlaufenden Positionen verglichen werden kann, nachdem die zwei Sequenzen optimal aligniert sind. Verfahren zur Alignierung von Sequenzen für den Vergleich sind im Fachbereich allgemein bekannt.

[0086] Die optimale Alignierung von Sequenzen für den Vergleich kann z. B. durch den lokalen Homologie-Algorithmus von Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, durch den Homologie-Alignierungsalgorithmus von Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, durch das „Suche-nach-Ähnlichkeit“-Verfahren von Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, durch computerisierte Implementierungen dieser Algorithmen (FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information), GAP, BEST-FIT, FASTA und TFASTA im Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch manuelle Alignierung und visuelle Inspektion (siehe z. B. Ausubel et al., 1987 (1999 Ergänzung), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.) durchgeführt werden.

[0087] Ein bevorzugtes Beispiel eines Algorithmus, welcher geeignet zur Bestimmung der prozentualen Sequenzidentität und der Sequenzähnlichkeit ist, ist der FASTA-Algorithmus, welcher in Pearson, W. R., & Lipman, D. J., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444, beschrieben wird. Siehe auch W. R. Pearson, 1996, Methods Enzymol. 266:227–258. Bevorzugte Parameter, welche in einem FASTA-Alignment von DNA-Sequenzen verwendet werden, um die Prozent-Identität zu berechnen, sind optimiert, BL50-Matrix 15: -5, k-Tuple = 2; Verknüpfungs-Strafwert = 40, Optimierung = 28; Lückenstrafwert -12, Lückenlängen-Strafwert = -2; und Breite = 16.

[0088] Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für einen Algorithmus, der für die Bestimmung der prozentualen Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit geeignet ist, sind die BLAST- und BLAST 2.0.-Algorithmen, die bei Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389–3402, bzw. Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403–410, beschrieben sind. BLAST- und BLAST 2.0 werden mit den hier beschriebenen Parameter verwendet, um die prozentuale Sequenzidentität für die Nukleinsäuren und Proteine der Erfindung zu bestimmen. Software für die Durchführung von BLAST-Analysen ist öffentlich über das National Center for Biotechnology Information verfügbar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dieser Algorithmus beinhaltet zuerst die Identifizierung von Sequenz-

paaren mit hoher Wertung bzw. Punktezahl (HSPs) durch Identifizieren von kurzen Worten der Länge W in der Abfragesequenz, welche entweder einer positiv bewerteten Schwellenwertpunktzahl T entsprechen oder dieser genügen, bei Alignierung mit einem Wort der gleichen Länge in einer Datenbanksequenz. T wird als der Nachbarschafts-Wort-Punktzahlschwellenwert bezeichnet (Altschul et al., weiter oben). Diese anfänglichen Nachbarschaftsworttreffer dienen als Ankerpunkte zum Start von Suchläufen, um längere HSPs zu finden, welche diese enthalten. Die Worttreffer werden in beiden Richtungen entlang jeder Sequenz erweitert, soweit wie die kumulative Alignierungs-Punktzahl erhöht werden kann. Die kumulativen Punktzahlen werden für Nukleotidsequenzen unter Verwendung der Parameter M (Belohnungspunktzahl für ein Paar von übereinstimmenden Resten; immer > 0) und N (Strafpunktzahl für nicht übereinstimmende Reste; immer < 0) berechnet. Für Aminosäuresequenzen wird eine Punktzahl- bzw. Bewertungsmatrix verwendet, um die kumulative Punktzahl zu errechnen. Die Erweiterung der Worttreffer in jeder Richtung wird gestoppt, wenn: die kumulative Alignierungs-Punktzahl um die Größe X gegenüber ihrem maximal erreichten Wert abfällt; die kumulative Punktzahl auf null oder darunter geht infolge der Anhäufung von Alignierungen eines oder mehrerer Reste mit negativer Punktzahl; oder das Ende einer der Sequenzen erreicht ist. Die BLAST-Algorithmusparameter W , T und X bestimmen die Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Alignierung. Das BLASTN-Programm (für Nukleotidsequenzen) verwendet als Standards bzw. Vorgaben eine Wortlänge (W) von 11, eine Erwartung (E) von 10, $M = 5$, $N = -4$ und einen Vergleich beider Stränge. Für Aminosäuresequenzen verwendet das BLASTP-Programm als Standards eine Wortlänge von 3 und eine Erwartung (E) von 10, und die BLOSUM62-Punktzahlmatrix (siehe Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), Alignierungen (B) von 50, eine Erwartung (E) von 10, $M = 5$, $N = -4$ und einen Vergleich beider Stränge.

[0089] Der BLAST-Algorithmus leistet auch eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen (siehe z. B. Karlin & Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5873–5787). Ein Maß für die Ähnlichkeit, das durch den BLAST-Algorithmus geliefert wird, ist die kleinste Summen-Wahrscheinlichkeit ($P(N)$), welche einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit vorsieht, mit welcher eine Übereinstimmung zwischen zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen zufällig auftreten würde. Zum Beispiel gilt eine Nukleinsäure als ähnlich mit einer Referenzsequenz, wenn die kleinste Summen-Wahrscheinlichkeit in einem Vergleich der Test-Nukleinsäure mit der Referenz-Nukleinsäure weniger als etwa 0,2, stärker bevorzugt weniger als etwa 0,01, und am meisten bevorzugt weniger als etwa 0,001 beträgt.

[0090] Ein anderes Beispiel eines nützlichen Algorithmus ist PILEUP. PILEUP erstellt eine mehrfache Sequenz-Alignierung aus einer Gruppe von verwandten Sequenzen unter Anwendung progressiver, paarweiser Alignierungen, um die Beziehung und die prozentuale Sequenzidentität aufzuzeigen. Es trägt auch einen Baum oder ein Dendrogramm auf, welches die Clustering-Verhältnisse, die zur Erstellung der Alignierung angewandt werden, zeigt. PILEUP verwendet eine Vereinfachung der progressiven Alignierungsmethode von Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351–360. Die angewandte Methode ähnelt der Methode, wie von Higgins & Sharp, 1989, CABIOS 5:151–153, beschrieben. Das Programm kann bis zu 300 Sequenzen alignieren, jede mit einer maximalen Länge von 5000 Nukleotiden oder Aminosäuren. Die Mehrfach-Alignierungsprozedur beginnt mit der paarweisen Alignierung der zwei ähnlichsten Sequenzen und liefert einen Cluster von zwei alignierten Sequenzen. Dieser Cluster wird dann mit der/dem nächsten stärkstverwandten Sequenz oder Cluster von alignierten Sequenzen aligniert. Zwei Cluster von Sequenzen werden durch eine einfache Erweiterung der paarweisen Alignierung von zwei einzelnen Sequenzen aligniert. Das End-Alignment wird durch eine Reihe von progressiven, paarweisen Alignierungen erreicht. Das Programm wird durch Benennen spezifischer Sequenzen und ihrer Aminosäure- oder Nukleotidkoordinaten für Regionen des Sequenzvergleichs und durch Benennen der Programmparameter laufen gelassen. Mit Hilfe von PILEUP wird eine Referenzsequenz mit anderen Testsequenzen verglichen zur Bestimmung des prozentualen Sequenzidentitätsverhältnisses unter Verwendung der folgenden Parameter: Standard-Lückengewicht (3,00), Standard-Lückenlängengewicht (0,10) und gewichtete Endlücken. PILEUP kann aus dem GCG-Sequenzanalyse-Softwarepaket, z. B. Version 7.0 (Devereaux et al., 1984, Nuc. Acids Res. 12:387–395, erhalten werden.

[0091] Eine anderes bevorzugtes Beispiel eines Algorithmus, welcher für mehrfache DNA- und Aminosäure-Sequenz-Alignments geeignet ist, ist das CLUSTALW-Programm (Thompson, J. D., et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 22:4673–4680). ClustalW vollführt mehrfache paarweise Vergleiche zwischen Gruppen von Sequenzen, und assembliert sie, basierend auf der Homologie, in ein Mehrfach-Alignment. Lücken-Offen- und Lücken-Verlängerungs-Strafwerte waren 10 bzw. 0,05. Für Aminosäure-Alignments kann der BLOSUM-Algorithmus als eine Protein-Wichtungs-Matrix verwendet werden (Henikoff und Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89:10915–10919).

[0092] Die Nukleinsäuren der Erfindung können in ganzen Zellen, in einem Zelllysats oder in einer teilweise gereinigten oder im Wesentlichen reinen Form vorhanden sein. Eine Nukleinsäure wird "isoliert" oder "im We-

sentlichen rein gemacht", wenn sie von anderen zellulären Komponenten oder anderen Kontaminanten, z. B. anderen zellulären Nukleinsäuren oder Proteinen, durch Standardtechniken abgereinigt wurde, einschließlich alkalischer/SDS-Behandlung, CsCl-Bandierung, Säulen-Chromatographie, Agarosegelelektrophorese und anderen, die im Fachgebiet allgemein bekannt sind (Siehe z. B. Sambrook, Tijssen und Ausubel, was hierin erörtert und für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen wird). Die Nukleinsäuresequenzen der Erfindung und andere Nukleinsäuren, welche zur Ausführung dieser Erfindung verwendet werden, ob RNA, cDNA, genomische DNA oder Hybride davon, können aus einer Vielzahl von Quellen isoliert, gentechnisch verändert, amplifiziert und/oder rekombinant exprimiert werden. Ein beliebiges rekombinantes Expressionssystem kann verwendet werden, einschließlich, zusätzlich zu bakteriellen, beispielsweise Hefe-, Insekten- oder Säuger-Systemen. Alternativ dazu können diese Nukleinsäuren in vitro chemisch synthetisiert werden. Techniken für die Manipulierung von Nukleinsäuren, wie z. B. Subklonierung in Expressionsvektoren, Markierung von Sonden, Sequenzierung und Hybridisierung sind in der wissenschaftlichen und Patent-Literatur allgemein beschrieben, siehe z. B. Sambrook, Tijssen und Ausubel. Nukleinsäuren können durch eine beliebige einer Anzahl von dem Fachmann auf dem Gebiet gut bekannten allgemeinen Methoden quantifiziert werden. Diese schließen z. B. analytische biochemische Verfahren, wie NMR, Spektrophotometrie, Radiographie, Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (TLC), und Hyperdiffusions-Chromatographie, verschiedene immunologische Verfahren, wie Flüssigkeits- oder Gel-Präzipitationsreaktionen, Immunodiffusion (einzeln oder doppelt), Immunelektrophorese, Radio-Immun-Assays (RIAs), Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISAs), Immunfluoreszenz-Assays, Southern-Analyse, Northern-Analyse, Dot-Blot-Analyse, Gelelektrophorese (z. B. SDS-PAGE), RT-PCR, quantitative PCR, andere Nukleinsäure- oder Ziel- oder Signal-Amplifikationsverfahren, Radiomarkierung, Szintillationszählung und Affinitätschromatographie ein.

[0093] Die Nukleinsäurezusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, während häufig in einer nativen Sequenz (außer für modifizierte Restriktionsstellen und dergleichen), aus entweder cDNA, genomischer [DNA] oder Mischungen davon, können gemäß Standardtechniken mutiert werden, um Gensequenzen vorzusehen. Für codierende Sequenzen können diese Mutationen Aminosäuresequenzen beeinflussen, falls gewünscht. Insbesondere werden DNA-Sequenzen in Betracht gezogen, welche im Wesentlichen homolog sind zu oder abgeleitet sind aus nativen V-, D-, J-, konstanten, Wechsel(Switches)- und anderen derartigen Sequenzen, welche hierin beschrieben sind (wobei "abgeleitet" darauf hinweist, dass eine Sequenz zu einer anderen Sequenz identisch ist oder daraus modifiziert wurde).

[0094] Eine Nukleinsäure ist "funktionsfähig verknüpft", wenn sie in eine funktionelle Beziehung mit einer anderen Nukleinsäuresequenz platziert wird. Zum Beispiel ist ein Promotor oder Enhancer funktionsfähig mit einer codierenden Sequenz verknüpft, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst. In Bezug auf transkriptions-regulatorische Sequenzen bedeutet "funktionsfähig verknüpft", dass die verknüpften DNA-Sequenzen fortlaufend sind, und falls notwendig zwei protein-codierende Regionen verknüpfen, fortlaufend und im Leseraster. Für Switch-Sequenzen bedeutet funktionsfähig verknüpft, dass die Sequenzen in der Lage sind, eine Switch-Rekombination zu bewirken.

[0095] Der Begriff "Vektor" bezieht sich beabsichtigtermaßen auf ein Nukleinsäuremolekül, fähig zum Transportieren einer anderen Nukleinsäure, an welche es verknüpft worden ist. Ein Typ von Vektor ist ein "Plasmid", was sich auf einen zirkulären doppelsträngigen DNA-Kreis bezieht, in welchen zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Ein anderer Typ von Vektor ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren sind fähig zur autonomen Replikation in einer Wirtszelle, in welche sie eingeführt werden (z. B. bakterielle Vektoren mit einem bakteriellen Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z. B. nicht-episomale Säugervektoren) können in das Genom einer Wirtszelle nach Einbringung in die Wirtszelle integriert werden, und werden dadurch gemeinsam mit dem Wirtsgenom repliziert. Darüber hinaus sind bestimmte Vektoren in der Lage, die Expression von Genen zu lenken, an welche sie funktionsfähig verknüpft sind. Solche Vektoren werden hierin als "rekombinante Expressionsvektoren" (oder einfach "Expressionsvektoren") bezeichnet. Im Allgemeinen liegen Expressionsvektoren mit Anwendbarkeit in rekombinanten DNA-Techniken häufig in der Form von Plasmiden vor. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Form von Vektor ist. Allerdings schließt die Erfindung beabsichtigtermaßen derartige andere Formen von Expressionsvektoren ein, wie virale Vektoren (z. B. replikationsdefekte Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierte Viren), welche äquivalenten Funktionen dienen.

[0096] Der Begriff "rekombinante Wirtszelle" (oder einfach "Wirtszelle") bezieht sich auf eine Zelle, in welche ein rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Es versteht sich, dass mit solchen Begriffen beabsichtigt wird, nicht nur auf die jeweilige vorliegende Zelle, sondern auch auf die Nachkommen einer solchen

Zelle Bezug zu nehmen. Weil bestimmte Modifikationen in nachfolgenden Generationen entweder auf Grund von Mutation oder Umwelteinflüssen auftreten können, kann eine solche Nachkommenschaft, in Wirklichkeit, nicht identisch zur Eltern- bzw. Stammformzelle sein, wobei sie jedoch immer noch innerhalb des Umfangs des Ausdrucks "Wirtszelle", wie hierin verwendet, eingeschlossen ist.

[0097] Eine "Markierung" ist eine Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel detektierbar ist. Zum Beispiel schließen nützliche Markierungen ^{32}P , fluoreszierende Farbstoffe, elektronendichte Reagenzien, Enzyme (z. B. wie sie üblicherweise in einem ELISA verwendet werden), Biotin, Digoxigenin oder Haptene und Proteine, für die Antiseren oder monoklonale Antikörper verfügbar sind, ein (z. B. können die Polypeptide der Erfindung detektierbar gemacht werden durch z. B. Einbau einer radioaktiven Markierung in das Peptid, und zum Detektieren von Antikörpern, die mit dem Peptid spezifisch reaktiv sind, verwendet werden).

[0098] Der Begriff "Sortieren" im Zusammenhang von Zellen, wie hierin verwendet, bezieht sich sowohl auf physikalische Sortierung der Zellen, wie sie z. B. unter Verwendung eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiers bewerkstelligt werden kann, als auch auf die Analyse von Zellen, basierend auf der Expression von Zelloberflächenmarkern, z. B. FACS-Analyse, in Abwesenheit von Sortierung.

[0099] Der Ausdruck "Immunzell-Antwort" bezieht sich auf die Antwort von Immunsystem-Zellen auf äußere oder innere Reize (z. B. Antigen, Cytokine, Chemokine und andere Zellen), welche biochemische Veränderungen in den Immunzellen erzeugen, die zu einer Immunzellwanderung, Abtötung von Zielzellen, Phagocytose, Produktion von Antikörpern, anderen löslichen Effektoren der Immunantwortreaktion und dergleichen führen.

[0100] Die Ausdrücke "T-Lymphozyten-Antwort" und "T-Lymphozyten-Aktivität" werden hierin austauschbar verwendet, um auf die Komponente der Immunantwort Bezug zu nehmen, welche von T-Lymphozyten abhängt (d. h. die Proliferation und/oder Differenzierung von T-Lymphozyten zu Helfer-, cytotoxischen Killer- oder Suppressor-T-Lymphozyten, die Vorsehung von Signalen durch Helfer-T-Lymphozyten an B-Lymphozyten, welche Antikörperproduktion verursachen oder verhindern, die Tötung spezifischer Zielzellen durch cytotoxische T-Lymphozyten und die Freisetzung löslicher Faktoren, wie Cytokinen, welche die Funktion anderer Immunzellen modulieren).

[0101] Der Begriff "Immunantwort" bezieht sich auf die konzentrierte Wirkung von Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen, phagozytischen Zellen, Granulozyten und löslichen Makromolekülen, hergestellt von den oben genannten Zellen oder der Leber (einschließlich Antikörpern, Cytokinen und Komplement), welche zur selektiven Beschädigung von, Zerstörung von oder Eliminierung, aus dem menschlichen Körper, von eindringenden Pathogenen, mit Pathogenen infizierten Zellen oder Geweben, Krebszellen oder, in Fällen von Autoimmunität oder pathologischer Entzündung, normalen humanen Zellen oder Geweben führt.

[0102] Komponenten einer Immunantwort können in vitro durch verschiedene Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt sind, nachgewiesen werden. Zum Beispiel (1) können cytotoxische T-Lymphozyten mit radioaktiv markierten Zielzellen inkubiert werden, und die Lyse dieser Zielzellen kann durch die Freigabe von Radioaktivität nachgewiesen werden, (2) können Helfer-T-Lymphozyten mit Antigenen und antigen-präsentierenden Zellen inkubiert werden, und die Synthese und Sekretion von Cytokinen kann durch Standardverfahren gemessen werden (Windhagen, A., et al. 1995, Immunity 2:373–80), (3) können antigenpräsentierende Zellen mit Ganzprotein-Antigen inkubiert werden, und die Präsentation dieses Antigens auf MHC kann entweder durch T-Lymphozyten-Aktivierungsassays oder biophysikalische Verfahren detektiert werden (Harding et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86: 4230–4), (4) können Mastzellen mit Reagenzien inkubiert werden, welche deren Fc-epsilon-Rezeptoren vernetzen, und Histaminfreisetzung kann durch Enzym-Immunoassay gemessen werden (Siraganian et al., 1983, TIPS 4:432–437).

[0103] In ähnlicher Weise können Produkte einer Immunantwort entweder in einem Modellorganismus (z. B. Maus) oder einem menschlichen Patienten auch durch verschiedene Verfahren nachgewiesen werden, welche dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet gut bekannt sind. Zum Beispiel (1) kann die Produktion von Antikörpern in Antwort auf Impfung leicht durch Standardverfahren nachgewiesen werden, welche derzeit in klinischen Laboratorien angewandt werden, z. B. mittels eines ELISA; (2) kann die Migration von Immunzellen zu Entzündungsstellen durch Kratzen der Hautoberfläche und Setzen eines sterilen Behälters zum Einfangen der migrierenden Zellen über der Kratzstelle detektiert werden (Peters et al., 1988, Blood 72:1310–5); (3) kann die Proliferation von mononuklearen Zellen des peripheren Bluts in Antwort auf Mitogene oder die gemischte Lymphozytenreaktion unter Verwendung von ^3H -Thymidin gemessen werden; (4) kann die phagozytische Kapazität von Granulozyten, Makrophagen und anderen Phagozyten in PBMCs gemessen werden, indem die

PBMCs zusammen mit markierten Partikeln in Vertiefungen platziert werden (Peters et al., 1988); und (5) kann die Differenzierung von Immunsystemzellen gemessen werden durch Markieren von PBMCs mit Antikörpern gegen CD-Moleküle, wie CD4 und CD8, und Messen der Fraktion der PBMCs, welche diese Marker exprimieren.

[0104] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Signaltransduktionsweg" oder "Signaltransduktionsereignis" auf mindestens eine biochemische Reaktion, aber noch üblicher auf eine Reihe von biochemischen Reaktionen, welche aus der Wechselwirkung einer Zelle mit einer/einem stimulatorischen Verbindung oder Mittel resultieren. Somit erzeugt die Wechselwirkung einer stimulatorischen Verbindung mit einer Zelle ein "Signal", welches über den Signaltransduktionsweg weitergeleitet wird, was letztendlich zu einer zellulären Antwort führt, z. B. einer oben beschriebenen Immunantwort.

[0105] Ein Signaltransduktionsweg bezieht sich auf die biochemische Beziehung zwischen einer Vielzahl von Signaltransduktionsmolekülen, welche eine Rolle in der Transmission eines Signals von einem Bereich einer Zelle zu einem anderen Bereich einer Zelle spielen. Wie hierin verwendet, schließt der Ausdruck "Zelloberflächenrezeptor" Moleküle und Komplexe von Molekülen ein, die zum Empfangen eines Signals und zur Transmission eines solchen Signals über die Plasmamembran einer Zelle fähig sind. Ein Beispiel eines "Zelloberflächenrezeptors" der vorliegenden Erfindung ist der T-Zell-Rezeptor (TCR) oder die B7-Liganden von CTLA-4.

[0106] Ein Signaltransduktionsweg in einer Zelle kann durch Wechselwirkung einer Zelle mit einem Stimulator initiiert werden, welcher innerhalb oder außerhalb der Zelle vorliegt. Wenn ein externer (d. h. außerhalb der Zelle) Stimulator (z. B. ein MHC-Antigenkomplex auf einer antigenpräsentierenden Zelle) mit einem Zelloberflächenrezeptor (z. B. einem T-Zell-Rezeptor) wechselwirkt, kann ein Signaltransduktionsweg ein Signal über die Zellmembran, durch das Cytoplasma der Zelle und in einigen Fällen in den Zellkern hinein übertragen. Wenn ein innerer (z. B. innerhalb der Zelle) Stimulator mit einem intrazellulären Signaltransduktionsmolekül wechselwirkt, kann ein Signaltransduktionsweg zur Übertragung eines Signals durch das Cytoplasma der Zelle und in einigen Fällen in den Kern der Zelle hinein führen.

[0107] Eine Signaltransduktion kann z. B. durch die Phosphorylierung eines Moleküls; nicht-kovalente allosterische Wechselwirkungen; Komplexierung von Molekülen; die Konformationsänderung eines Moleküls; Calciumfreisetzung; Inositolphosphat-Erzeugung; proteolytische Spaltung; Produktion von zyklischem Nukleotid und Produktion von Diacylglycerid stattfinden. Typischerweise findet eine Signaltransduktion durch die Phosphorylierung eines Signaltransduktionsmoleküls statt.

[0108] Der Begriff "nicht-spezifische T-Zell-Aktivierung" bezieht sich auf die Stimulierung von T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität.

Problem und Lösung

[0109] Um eine verbesserte Stabilität des humanen Kappa-Leichtkette-Locus zu erzielen, wurde die Transchromosom-Technologie mit der früheren Pronukleär-Mikroinjektionstechnologie zur Erzeugung transgener Tiere kombiniert. Das humane Kappa-Leichtkette-Locus-Transgen KCo5 (Fishwild, D., et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14:845–851; U.S.-Patent Nr. 5 770 429) schließt einen wesentlichen Anteil des humanen Kappa-Locus ein und wird stabil in der Maus-Keimbahn und in B-Zellen und Hybridomzellen, welche von dem Transgen abgeleitete humane Kappa-Ketten exprimieren, beibehalten. Dieses Transgen wurde mit dem stabilen hCF(SC20)-Transchromosom kombiniert, zusammen mit funktionellen Inaktivierungsmutationen der endogenen Schwer- und Kappa-Leichtkette-Maus-Loci, wodurch man Tiere erzeugte, welche ein breites Human-Antikörper-Repertoire, einschließlich mehrerer humaner Schwereketten-Isotypen, exprimieren. Daher ermöglicht die verbesserte Stabilität des Leichtketten-Transgens, relativ zu den Doppel-TC/KO-Mäusen (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727), die Gewinnung einer größeren Anzahl von Hybridomen aus jeder Fusion.

[0110] Die Erfindung liefert die Grundlage für die Isolierung von vollständig humanen Antikörpern von jedweden gewünschten Schwereketten-Isotyp, einschließlich IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ und IgM. Insbesondere können mehrere unterschiedliche Antikörper mit hoher Affinität gegenüber vorbestimmten Antigenen aus einer einzelnen transgenen Maus isoliert werden. In diesem Zusammenhang werden die folgenden Erwägungen nützlich sein.

Quellen von Material

[0111] Eine transgene Maus der vorliegenden Erfindung kann auch unter Verwendung von hinterlegtem Material erzeugt werden. Hühner-DT40-Zellen, welche hCF(SC20) beibehalten, sind gemäß dem Budapester Vertrag am 9. Mai 2001 bei der International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan, hinterlegt worden. Die Hinterlegungsnummer lautet FERM BP-7583. Der Zelllinie wurde der Name SC20 zugewiesen.

[0112] Hühner-DT40-Zellen, welche hCF(SC20) enthalten, sind auch beim Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) in Taiwan, am 18. August 1999 hinterlegt worden. Die Hinterlegungsnummer lautet CCRC 960099. Der zugewiesene Zelllinien-Name war SC20(D), bei der Taiwanesischen Hinterlegung. Das hCF(SC20), welches in Hühner-DT-40-Zellen gehalten wird, kann in Maus-ES-Zellen überführt werden, wie beschrieben in WO 00/10383 (EP 1106061). Kurz gesagt, werden Mikrozellen aus Hühner-DT-40-Zellen erzeugt und mit CHO-Zellen fusioniert. Dann können CHO-Zellen, welche das hCF(SC20) enthalten, auf Basis von G418-Resistenz selektiert werden. Die Beibehaltung des hCF(SC20) kann durch PCR- oder FISH-Analyse unter Anwendung von kommerziell erhältlicher humaner COT1-DNA oder für das humane Chromosom 14 spezifischer Sonde bestätigt werden. Danach werden aus den CHO-Zellen, welche das hCF(SC20) enthalten, Mikrozellen erzeugt und mit Maus-ES-Zellen fusioniert. ES-Zellen, welche das hCF(SC20) enthalten, können auf die gleiche Weise wie CHO-Zellen selektiert werden.

[0113] Zellen, welche die KCo5-Transgen-DNA enthalten, sind bei der American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt worden und erhielten die Zugangsnummern, welche am 8. November 2001 angezeigt wurden: 17E1 in Hefe (YAC y17, Medarex KCo5), zugewiesene ATCC-Nr. PTA-3842 (das genetische Material ist ein künstliches Hefe-Chromosom, enthaltend ein Insert des humanen Immunglobulin-Kappa-Variabel-Region-Gen-Locus); pKV4 in E. coli (Medarex KCo5), zugewiesene ATCC-Nr. PTA-3843 (Plasmid, das Gene der variablen Region von humanem Immunglobulin enthält); pKCIB in E coli (Medarex KCo5), zugewiesene ATCC-Nr. PTA-3844 (Plasmid, das Gene der konstanten J-Kappa- und Kappa-Region von humanem Immunglobulin enthält).

[0114] Zellen, welche die DNAs dieses KCo5-Transgens enthalten, sind auch am 22. November 2001 beim Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) in Taiwan hinterlegt worden. Die Hinterlegungsnummern für pKV4, YACy17 und pKCIB sind: CCRC 940383, CCRC 940385 bzw. CCRC 940386.

[0115] Das Transgen KCo5 kann in Mauszellen überführt werden, wie es früher beschrieben wurde (Fishwild, D., ebenda, siehe auch Beispiel 38 in U.S.-Patent Nr. 5 770 429; siehe auch Beispiel 2, nachstehend).

Allgemeine Merkmale von Immunglobulinen

[0116] Es ist bekannt, dass die grundlegende Antikörper-Struktureinheit ein Tetramer von Untereinheiten umfasst. Jedes Tetramer ist aus zwei identischen Paaren von Polypeptidketten aufgebaut, wobei jedes Paar eine "leichte" (etwa 25 kDa) und eine "schwere" Kette (etwa 50–70 kDa) aufweist. Der aminoterminal Bereich von jeder Kette schließt eine variable Region von etwa 100 bis 110 oder mehr Aminosäuren ein, welche hauptsächlich für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Der carboxyterminale Bereich jeder Kette definiert eine konstante Region, welche hauptsächlich für die Effektorfunktion verantwortlich ist.

[0117] Leichtketten werden entweder als Kappa oder Lambda klassifiziert. Schwerketten werden als Gamma, Mu, Alpha, Delta oder Epsilon klassifiziert und definieren den Isotyp des Antikörpers als IgG, IgM, IgA, IgD bzw. IgE. Innerhalb der leichten und schweren Ketten sind die variablen und konstanten Regionen durch eine "J"-Region von etwa 12 oder mehr Aminosäuren verbunden, wobei die Schwereketten auch eine "D"-Region von etwa 1–10 oder mehr Aminosäuren einschließt (siehe allgemein, Fundamental Immunology (Paul, W., Hrsg., 2. Ausg., Raven Press, N. Y. 1989), Kap. 7 (welches hierin in seiner Gesamtheit für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen wird).

[0118] Die variablen Regionen jedes Leichte/Schwere-Kette-Paars bilden die Antikörperbindungsstelle. Daher besitzt ein intakter Antikörper zwei Bindungsstellen. Außer in bifunktionellen oder bispezifischen Antikörpern sind die zwei Bindungsstellen gleich. Die Ketten zeigen alle dieselbe allgemeine Struktur von relativ konservierten Gerüst-Regionen (FR, Framework-Regions), verknüpft durch drei hypervariable Regionen, welche ebenfalls als Komplementaritätsbestimmende Regionen oder CDRs bezeichnet werden. Die CDRs aus den zwei Ketten von jedem Paar werden durch die Gerüst-Regionen fluchtend ausgerichtet, was die Bindung an

ein spezifisches Epitop ermöglicht. Von N-Terminal nach C-Terminal umfassen sowohl leichte als auch schwere Ketten die Domänen FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 und FR4. Die Zuweisung von Aminosäuren an jede Domäne erfolgt gemäß den Definitionen von Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 und 1991), oder Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901–917 (1987); Chotia et al., Nature 342:878–883 (1989).

Die natürlichen humanen Immunglobulin-Loci

[0119] Humane Immunglobuline werden natürlicherweise von drei unterschiedlichen Loci codiert: Schwerekette, Kappa-Leichtkette und Lambda-Leichtkette. Diese natürlichen Loci sind auf den Chromosomen 14, 2 bzw. 22 lokalisiert. Der natürliche humane Schwere-Kette-Locus, lokalisiert bei 14q32.3, nahe dem Telomer des langen Arms des humanen Chromosoms 14, erstreckt sich über ungefähr 1,3 Megabasen und codiert ungefähr 45 exprimierte V-Gensegmente, 27 D-Gensegmente, 6 J-Gensegmente und 9 Gensegmente der konstanten (C) Region. Der natürliche humane Kappa-Leichte-Kette-Locus, lokalisiert bei 2p11.12 auf dem Chromosom 2, erstreckt sich über ungefähr 1,8 Megabasen und umfasst ungefähr 34 exprimierte V-Gensegmente, 5 J-Gensegmente und ein einziges C-Region-Gensegment. Der natürliche humane Lambda-Locus, der bei 22q11.2 lokalisiert ist, erstreckt sich über ungefähr 0,9 Megabasen und codiert ungefähr 30 V-Gensegmente und 4 funktionelle J-C-Paare, welche jeweils ein einzelnes J-Gensegment und ein einzelnes C-Gensegment umfassen. Jeder dieser natürlichen Loci kann auch Deletionen, Insertionen und Einzelnukleotid-Polymorphismen umfassen.

Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch Hybridomfusion

[0120] Die Produktion von monoklonalen Antikörpern kann beispielsweise durch Immunisieren des Tiers mit einem Antigen (z. B. einem humanen Protein-Antigen, wie CD4, G-CSF, HSA, EGFR oder CTLA-4, einem Pathogen-codierten Antigen, einem Toxin oder einem anderen Antigen) bewerkstelligt werden. Ein längeres Polypeptid, welches das Antigen umfasst, oder ein immunogenes Fragment des Antigens oder anti-idiotypische Antikörper gegen einen Antikörper gegen das Antigen können ebenfalls verwendet werden; Siehe Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP New York, NY, 1988), und Mishell und Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, (W. H. Freeman and Co. New York, NY 1980) (beide Bezugsstellen sind für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen). Ein derartiges Immunogen kann aus einer natürlichen Quelle, durch Peptidsynthese oder durch rekombinante Expression erhalten werden. Gegebenenfalls kann das Immunogen angeheftet an oder anderweitig komplexiert mit einem Trägerprotein, wie nachstehend beschrieben, verabreicht werden. Wahlweise kann das Immunogen mit einem Adjuvans verabreicht werden. Mehrere Typen von Adjuvantien können verwendet werden, wie es nachstehend beschrieben ist. Vollständiges Freund'sches Adjuvans, gefolgt von unvollständigem Adjuvans, wird für die Immunisierung von Laboratoriumstieren bevorzugt. Es werden typischerweise Kaninchen oder Meerschweinchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet. Nagetiere (z. B. Mäuse, Ratten und Hamster) werden typischerweise zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Diese Mäuse können transgen sein und können humane Immunglobulin-Gensequenzen umfassen, wie nachstehend beschrieben. Nach der Immunisierung werden die immunisierten Tiere eine Serumantwort gegen das eingeführte Immunogen entwickeln. Diese Serumantwort kann durch Titration von aufgefangenem Serum unter Anwendung einer Vielzahl unterschiedlicher Assays gemessen werden. Ein Beispiel eines häufig verwendeten Assays ist ein ELISA. Die Größe der Serumantwort wird üblicherweise als der Titer bezeichnet. Zum Beispiel gibt ein Titer von 1000 an, dass die Gegenwart von reaktiven Antikörpern durch einen Assay einer 1000fachen Verdünnung des Serums nachgewiesen werden kann. Typischerweise wird die Immunisierung zu einer Serumantwort führen, welche mehrere Größenordnungen höher ist als diejenige, welche in nicht-immunisierten Tieren gefunden wird. Serumantworten von nur einer oder zwei Größenordnungen werden als schwach angesehen und weisen typischerweise auf das Vorhandensein von wenigen B-Zellen hin, die antigenreaktive Antikörper exprimieren. Monoklonale Antikörper werden routinemäßig durch Fusionieren von Lymphozyten mit immortalisierten Zellen (z. B. Myelomzellen) erhalten, wobei Hybridzellen gebildet werden, die als Hybridomzellen bezeichnet werden. Die neu gebildeten Hybridomzellen leiten die Antikörperexpression-Eigenschaften von den Eltern-Lymphozyten und die Wachstumseigenschaften von den immortalisierten Eltern-Zellen ab. Neu gebildete Hybridomzellen werden in Kulturschalen (z. B. 96-Vertiefungs-Platten), welche Kulturmedium umfassen, kultiviert. Der Kulturüberstand (typischerweise ein bis zwei Wochen nach der Fusion) wird hinsichtlich des Vorhandenseins von antigenreaktiven Antikörpern mit dem gewünschten Schwer- und Leichtketten-Isotyp getestet. Die Zellen in dieser primären Kultur werden dann verdünnt und erneut ausplattiert, um Einzelklone von Hybridomzellen zu isolieren, welche eine einzelne Spezies von monoklonalem Antikörper sezernieren. Diese sekundäre Kultur kann weiter subkloniert werden, um tertiäre Kulturen zu erhalten, etc. Die Fraktion von antigenreaktiven Primärkulturen, welche verwendet werden kann, um Hybridomklone durch dieses Verfahren der Subklonierung zu erhalten, liefert ein Maß der Subklonierungseffizienz. Wenn alle

der antigenpositiven primären Hybridomkulturen verwendet werden können, um geklonte Zelllinien abzuleiten, dann ist die Subklonierungseffizienz 100%. Wenn die Immunglobulin-Loci, welche die exprimierten Antikörper codieren, instabil sind, z. B. während der Zellteilung leicht verloren gehen – entweder durch Verlust eines Chromosoms, Chromosomenfragmentes oder Transchromosoms, oder durch deletionale Rekombination eines inserierten Arrays oder durch irgendeinen anderen Mechanismus – dann wird die Subklonierungseffizienz verringert sein (d. h. weniger als 100%). Es ist besonders nützlich, eine Plattform zur Ableitung von monoklonalen Antikörpern zu besitzen, wobei die Subklonierungseffizienz hoch ist (z. B. größer als 20%, vorzugsweise größer als 50%, weiter bevorzugt größer als 80%, am stärksten bevorzugt größer als 90% oder 95%). Antikörper werden hinsichtlich der spezifischen Bindung an das Antigen gescreent. Gegebenenfalls werden die Antikörper weiter hinsichtlich Bindung an eine spezifische Region des Antigens gescreent. Für Protein-Antigene kann das letztere Screening bewerkstelligt werden durch Bestimmen der Bindung eines Antikörpers an eine Kollektion von Deletionsmutanten des Antigen-Peptids und Bestimmen, welche Deletionsmutanten an den Antikörper binden. Die Bindung kann zum Beispiel durch Western-Blot oder ELISA überprüft werden. Das kleinste Fragment, welches eine spezifische Bindung an den Antikörper zeigt, definiert das Epitop des Antikörpers. Allerdings umfassen manche Epitope nicht-fortlaufende Strukturelemente, welche durch Deletion von Elementen außerhalb des eigentlichen Epitops verloren werden können. Alternativ dazu kann die Epitopspezifität durch einen Kompetitions-Assay bestimmt werden, in welchem ein Test- und ein Referenzantikörper um die Bindung an das Antigen konkurrieren. Wenn die Test- und Referenzantikörper konkurrieren, dann binden sie an dasselbe Epitop oder ausreichend naheliegende bzw. proximale Epitope, so dass die Bindung eines Antikörpers die Bindung des anderen stört.

Klonierung von Antikörper codierenden Nukleinsäuren aus B-Zell-Hybridomen

[0121] Nukleinsäuren, welche mindestens die variablen Regionen von schweren und leichten Ketten codieren, können entweder aus immunisierten oder naiven bzw. naturbelassenen transgenen Mäusen kloniert werden. Nukleinsäuren können als genomische oder cDNA aus lymphatischen Zellen derartiger Tiere kloniert werden. Es ist keine Immortalisierung solcher Zellen vor der Klonierung von Immunglobulinsequenzen erforderlich. Üblicherweise wird mRNA isoliert und durch reverse Transkriptionen mit Oligo-dT-Primern amplifiziert. Die cDNA wird dann unter Verwendung von Primern gegen konservierte Regionen von humanen Immunglobulinen amplifiziert. Die Bibliotheken können einfach hinsichtlich Nicht-Mu-Isotypen unter Verwendung eines 3'-Primers angereichert werden, der spezifisch für Nicht-Mu-Sequenzen ist (z. B. IgG oder IgA). Typischerweise umfasst die amplifizierte Population von leichten Ketten mindestens 100, 1000, 10000, 100000 oder 1000000 verschiedene Leichtketten. Dergleichen umfasst die amplifizierte Population von Schwerketten mindestens 100, 1000, 10000, 100000 oder 1000000 unterschiedliche Schwerketten. Zum Beispiel sind, unter Verwendung von IgG-Primern, typischerweise mindestens 90, 95 oder 99% der amplifizierten Schwerketten vom IgG-Isotyp. Nukleinsäuren, welche mindestens die variablen Regionen von schweren und leichten Ketten codieren, können auch aus den oben erwähnten Hybridomen durch verschiedene gut bekannte Verfahren kloniert werden, wie PCR oder Screening von cDNA-Bibliothek(en) mittels einer DNA-Sonde, die spezifisch für konservierte Regionen von humanen Antikörpern ist. Antikörperketten codierende Nukleinsäuren, welche subkloniert werden sollen, können mittels Restriktionsverdau von flankierenden Sequenzen herausgeschnitten werden oder können mittels PCR unter Verwendung von Primern gegen Stellen, welche die codierenden Sequenzen flankieren, amplifiziert werden; Siehe allgemein PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Hrsg.: H. A. Erlich, Freeman Press NY, NY, 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Hrsg.: Innis et al., Academic Press, San Diego, CA, 1990); Mattila et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19:967; Eckert et al., 1991, PCR Methods and Applications 1:17; PCR (Hrsg.: McPherson et al., IRL Press, Oxford). Diese Bezugsstellen und die darin zitierten Bezugsstellen werden hierin für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen.

Rekombinante Expression von Antikörpern

[0122] Nukleinsäuren, welche variable Regionen von leichten und schweren Ketten codieren, gegebenenfalls verknüpft an konstante Regionen, werden in Expressionsvektoren inseriert. Die Leicht- und Schwerketten können in denselben oder unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert werden. Die Antikörperketten codierenden DNA-Segmente sind funktionsfähig an Steuerungssequenzen in den Expressionsvektor(en) verknüpft, welche die Expression von Antikörperketten gewährleisten. Solche Steuerungssequenzen schließen eine Signalsequenz, einen Promoter, einen Enhancer und eine Transkriptionsterminationssequenz ein. Expressionsvektoren sind typischerweise entweder als Episomen oder als integraler Teil des Wirtschromosoms in den Wirtsorganismen replizierbar.

[0123] E. coli ist ein prokaryotischer Wirt, insbesondere zur Expression von Antikörpern der vorliegenden Er-

findung. Andere zur Verwendung geeignete mikrobielle Wirte schließen Bacilli, wie *Bacillus subtilis*, und andere Enterobacteriaceae, wie *Salmonella*, *Serratia*, und verschiedene *Pseudomonas*-Spezies ein. In diesen prokaryotischen Wirten kann man auch Expressionsvektoren herstellen, welche typischerweise Expressions-Steuersequenzen, die mit der Wirtszelle kompatibel sind (z. B. einen Replikationsursprung), und regulatorische Sequenzen, wie ein Laktose-Promotorsystem, ein Tryptophan(trp)-Promotorsystem, ein beta-Lactamase-Promotorsystem oder ein Promotorsystem aus dem Phagen Lambda, enthalten.

[0124] Andere Mikroben, wie Hefe, können ebenfalls für die Expression verwendet werden. *Saccharomyces* ist ein bevorzugter Wirt, wobei geeignete Vektoren Expressions-Steuersequenzen, wie Promotoren, einschließlich 3-Phosphoglyceratkinase oder anderen glykolytischen Enzymen, und einen Replikationsursprung, Terminationssequenzen und dergleichen, wie gewünscht, aufweisen.

[0125] Säugergewebe-Zellkultur kann ebenfalls angewandt werden, um die Antikörper der vorliegenden Erfindung zu exprimieren und herzustellen (Siehe Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, N. Y., 1987)). Eukaryotische Zellen werden bevorzugt, weil eine Reihe von geeigneten Wirtszelllinien, die zum Sezernieren intakter Antikörper in der Lage sind, entwickelt worden sind. Bevorzugte geeignete Wirtszellen zum Exprimieren von Nukleinsäuren, welche die Immunglobuline der Erfindung codieren, schließen ein: mit SV40 transformierte Affennieren-CV1-Linie (COS-7, ATCC CRL 1651); humane embryonale Nieren-Linie (293) (Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.* 36:59); Baby-Hamsternierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); Chinesische Hamstereierstock-Zellen-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:4216); Maus-Sertoli-Zellen (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243–251); Affennierenzellen (CVI ATCC CCL 70); Nierenzellen der afrikanischen Grünen Meerkatze (NERO-76, ATCC CRL 1587); humane Cervixkarzinom-Zellen (HELA, ATCC CCL 2); Hunde-Nierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Leberzellen der Buffalo-Ratte (BRL 3A, ATCC CRL 1442); humane Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); human Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Maus-Mammary-Tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); und TRI-Zellen (Mather et al., 1981, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44–46); Baculovirus-Zellen.

[0126] Die Vektoren, welche die Polynukleotidsequenzen von Interesse (z. B. die schwere und leichte Kette codierenden Sequenzen und Expressions-Steuersequenzen) enthalten, können in die Wirtszelle überführt werden. Üblicherweise wird Calciumchlorid-Transfektion für prokaryotische Zellen angewandt, wohingegen Calciumphosphat-Behandlung oder Elektroporation für andere zelluläre Wirte angewandt werden kann (Siehe im Allgemeinen Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2. Ausgabe, 1989) (durch den Bezug darauf in seiner Gesamtheit für alle Zwecke einbezogen). Wenn schwere und leichte Ketten auf separaten Expressionsvektoren kloniert werden, werden die Vektoren cotransfiziert, um die Expressionen und Zusammenfügung von intakten Immunglobulinen zu erhalten. Nach Einführen von rekombinanter DNA werden Zelllinien, welche Immunglobulinprodukte exprimieren, zell-selektiert. Zelllinien, die zu einer stabilen Expression in der Lage sind, werden bevorzugt (d. h. unverminderte Expressionsspiegel nach fünfzig Passagierungen der Zelllinie).

[0127] Sobald sie exprimiert wurden, können die gesamten Antikörper, ihre Dimere, einzelne Leicht- und Schwereketten oder andere Immunglobulinformen der vorliegenden Erfindung gemäß Standardvorgehensweisen des Fachgebiets gereinigt werden, einschließlich Ammoniumsulfat-Präzipitation, Affinitätsäulen, Säulen-Chromatographie, Gelelektrophorese und dergleichen (Siehe im Allgemeinen Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N. Y., 1982)). Im Wesentlichen reine Immunglobuline von mindestens etwa 90 bis 95% Homogenität werden bevorzugt, und 98 bis 99% oder mehr Homogenität wird am stärksten bevorzugt.

Chimäre und humanisierte Antikörper

[0128] Chimäre und humanisierte Antikörper besitzen die gleiche oder eine ähnliche Bindungsspezifität und Affinität, wie ein Maus- oder sonstiger nicht-humaner Antikörper, der das Ausgangsmaterial für die Konstruktion eines chimären oder humanisierten Antikörpers bereitstellt. Chimäre Antikörper sind Antikörper, deren Leicht- und Schwereketten-Gene, typischerweise durch Gentechnik, aus Immunglobulin-Gensegmenten konstruiert worden sind, die unterschiedlichen Spezies angehören. Zum Beispiel können die variablen (V)-Segmente der Gene aus einem monoklonalen Maus-Antikörper an humane konstante (C)-Segmente, wie IgG₁ und IgG₄, verknüpft werden. Der humane Isotyp IgG₁ wird bevorzugt. Ein typischer chimärer Antikörper ist somit ein Hybridprotein, bestehend aus der V- oder Antigenbindungs-Domäne aus einem Maus-Antikörper und der C- oder Effektor-Domäne aus einem humanen Antikörper.

[0129] Humanisierte Antikörper besitzen Gerüstreste der variablen Region im Wesentlichen von einem humanen Antikörper (bezeichnet als ein Akzeptor-Antikörper) und Komplementaritätsbestimmende Regionen im

Wesentlichen aus einem Maus-Antikörper (bezeichnet als das Donor-Immunglobulin). Siehe Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029–10033, und WO 90/07861, U.S. 5 693 762, U.S. 5 693 761, U.S. 5 585 089, U.S. 5 530 101 und Winter, U.S. 5 225 539 (welche als Bezugstelle in ihrer Gesamtheit für alle Zwecke einbezogen werden). Die konstanten Region(en), falls vorhanden, sind ebenfalls im Wesentlichen oder vollständig aus einem humanen Immunglobulin. Die humanen variablen Domänen werden üblicherweise aus humanen Antikörpern gewählt, deren Gerüstsequenzen ein hohes Ausmaß an Sequenzidentität mit den murinen Variable-Region-Domänen, aus welchen die CDRs abgeleitet wurden, aufzeigen. Die Variable-Region-Gerüstreite der schweren und leichten Kette können aus denselben oder unterschiedlichen humanen Antikörpersequenzen abgeleitet sein. Die humanen Antikörpersequenzen können die Sequenzen von natürlich vorkommenden humanen Antikörpern sein oder können Konsensus-Sequenzen von mehreren humanen Antikörpern sein; siehe Carter et al., WO 92/22653. Bestimmte Aminosäuren von den humanen Variable-Region-Gerüstreiten werden für eine Substitution ausgewählt, basierend auf ihren möglichen Einfluss auf die CDR-Konformation und/oder die Bindung an Antigen. Die Erforschung derartiger möglicher Einflüsse erfolgt durch Modellerstellung, Untersuchung der Merkmale der Aminosäuren an bestimmten Stellen oder empirische Beobachtung der Effekte von Substitution oder Mutagenese von jeweiligen Aminosäuren.

[0130] Wenn sich zum Beispiel eine Aminosäure zwischen einem murinen Variable-Region-Gerüstreit und einem ausgewählten humanen Variable-Region-Gerüstreit unterscheidet, sollten üblicherweise die humane Grundgerüst-Aminosäure durch die äquivalente Gerüst-Aminosäure aus dem Mausantikörper substituiert werden, wenn es vernünftig erwartet werden kann, dass die Aminosäure:

- (1) Antigen direkt nicht-kovalent bindet,
- (2) zu einer CDR-Region benachbart ist,
- (3) anderweitig mit einer CDR-Region wechselwirkt (z. B. innerhalb von etwa 6 Å von einer CDR-Region liegt), oder
- (4) an der VL-VH-Grenzfläche beteiligt ist.

[0131] Andere Kandidaten für eine Substitution sind humane Akzeptor-Gerüstaminosäuren, welche für ein humanes Immunglobulin an dieser Position unüblich sind. Diese Aminosäuren können mit Aminosäuren aus der äquivalenten Position des Maus-Donor-Antikörpers oder aus den äquivalenten Positionen von mehreren typischen humanen Immunglobulinen substituiert werden. Andere Kandidaten für eine Substitution sind humane Akzeptor-Gerüstaminosäuren, welche für ein humanes Immunglobulin an dieser Position unüblich sind. Die Variable-Region-Gerüste von humanisierten Immunglobulinen zeigen üblicherweise mindestens 85% Sequenzidentität zu einer humanen Variable-Region-Gerüstsequenz oder dem Konsensus solcher Sequenzen.

Humane Antikörper

[0132] Gegen spezifische Antigene gerichtete humane Antikörper werden durch eine Vielzahl von Techniken bereitgestellt, welche nachstehend beschrieben sind. Einige humane Antikörper werden durch kompetitive Bindungsexperimente oder anderweitig selektiert, um die gleiche Epitopspezifität wie ein jeweiliger Mausantikörper aufzuweisen, wie etwa einem der monoklonalen Maus[antikörper], die in den Beispielen beschrieben sind. Humane Antikörper können auch nach einer besonderen Epitopspezifität gescreent werden, indem nur ein Fragment des Antigens als das Immunogen verwendet wird, und/oder, im Fall von Proteinantigenen, indem Antikörper gegen eine Kollektion von Deletionsmutanten des Antigens gescreent werden.

Triom-Methodik

[0133] Die grundlegende Vorgehensweise und ein exemplarischer Zellfusionspartner, SPAZ-4, zur Verwendung in diesem Vorgehen sind von Oestberg et al., 1983, Hybridoma 2:361–367; Oestberg, U.S.-Patent Nr. 4 634 664; und Engleman et al., U.S.-Patent 4 634 666, beschrieben worden (von welchen jedes für alle Zwecke in seiner Gesamtheit durch den Bezug darauf einbezogen ist). Die antikörperproduzierenden Zelllinien, die durch dieses Verfahren erhalten werden, werden als Triome bezeichnet, weil sie von drei Zellen abstammen – zwei humanen und einer Maus-Zelle. Am Anfang wird eine Maus-Myelomlinie mit einem humanen B-Lymphozyten fusioniert, um eine nicht-antikörperproduzierende xenogeneische Hybridzelle zu erhalten, wie die SPAZ-4-Zelllinie, die von Oestberg, siehe oben, beschrieben wurde. Die xenogeneische Zelle wird dann mit einer immunisierten humanen B-Lymphozyte fusioniert, um eine antikörperproduzierende Triom-Zelllinie zu erhalten. Es wurde festgestellt, dass Triome Antikörper stabiler herstellen als gewöhnliche Hybridome, die aus humanen Zellen hergestellt wurden.

[0134] Obwohl Triome genetisch stabil sind, produzieren sie Antikörper nicht bei sehr hohen Spiegeln. Die Expressionsspiegel können durch Klonieren von Antikörper-Genen aus dem Triom in einen oder mehrere Ex-

pressionsvektoren und Transformieren des Vektors in Säuger-, Bakterien- oder Hefe-Standardzelllinien erhöht werden.

Transgene Mäuse

[0135] Humane Antikörper gegen eine Vielzahl von Antigenen können auch aus transgenen Mäusen, welche humane Immunglobulin-Loci umfassen, hergestellt werden. Typischerweise können diese Immunglobulin-Loci Antikörper mit im Wesentlichen humaner Sequenz, vorzugsweise 95% oder mehr identisch zu humanen Sequenzen, weiter bevorzugt 98–99% oder mehr identisch, und am stärksten bevorzugt 100% identisch, codieren. Die Immunglobulin-Loci können rearrangiert oder nicht-rearrangiert sein und können Deletionen oder Insertionen relativ zu den natürlichen humanen Immunglobulin-Loci umfassen. Die Loci können genetische Elemente (z. B. nicht-codierende Elemente, wie Enhancer, Promotoren und Switch-Sequenzen, oder codierende Elemente wie die Mu-Konstant-Region-Gensegmente) aus anderen Spezies und aus Nicht-Immunglobulin-Loci, die nicht wesentlich zum codierenden Bereich von Sekundär-Repertoire(nicht-IgM)-Antikörpern beitragen, einschließen. Bevorzugte humane Immunglobulin-Loci durchlaufen DNA-Sequenzänderungen, einschließlich V(D)J-Joining, Schwerketten-Klassenwechsel und somatischer Mutation in lymphoiden Zellen und/oder Lymphoidzellen-Vorläufern in der transgenen Maus, um humane Hochaffinitätsantikörper gegen vorbestimmte Antigene herzustellen. Die in diesen transgenen Mäusen enthaltenen humanen Immunglobulin-Loci schließen vorzugsweise nicht-rearrangierte Sequenzen von natürlichen humanen Schwer- und humanen Leichtketten-Loci ein. Üblicherweise ist der endogene Immunglobulin-Locus von solchen transgenen Mäusen funktionell inaktiviert (U.S.-Patent Nr. 5 589 369; Takeda, S., et al., 1993, EMBO J. 12:2329–366; Jakobovits, A., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:2551–2555; Kitamura, D., und Rajewsky, K., 1992, Nature 356: 154–156; Gu, H., et al., 1991, Cell 65:47–54; Chen, J., et al., EMBO J. 12:821–830; Sun, W., et al., 1994, J. Immunol 152:695–704; Chen, J., et al., 1993, Intl. Immunology 5:647–656; Zou, X., et al., 1995, Eur. J. Immunol 25:2154–2162; Chen, J., et al., 1993, Intl. Immunology 5:647–656; Boudinot, P., et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25:2499–2505; Chen, J., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:4528–4532; Roes, J., and Rajewsky, K., 1991, Intl. Immunology 3:1367–1371; Gu, H., et al., 1993, Cell 73:1155–1164; Taki, S., et al., 1993, Science 262: 1268–71; Kitamura, D., et al., 1991, Nature 350:423–6; Lutz, C., et al., 1998, Nature 393:797–801; Zou, Y., et al., 1994, Current Biology 4:1099–1103; Chen, J., et al., 1993, EMBO J. 12:4635–4645; Serwe, M., und Sablitzky, F., 1993, EMBO J. 12:2321–2327; Sanchez, P., et al., 1994, Intl. Immunology 6:711–719; Zou, Y., et al., 1993, EMBO J. 12:811–820). Die Inaktivierung von endogenen Immunglobulin-Genen kann vorzugsweise z. B. durch zielgerichtete homologe Rekombination erreicht werden. Die exogenen humanen Immunglobulin-Loci können mit den endogenen Mauschromosomen assoziiert sein oder können von (z. B. Teil von, inseriert innerhalb oder angeheftet an) ein(em) eingeführten Transchromosom sein. Transchromosomen werden in eine Zelle als ein nicht-endogenes Chromosom oder Chromosomenfragment, aufweisend ein Centromer und zwei Telomere, eingeführt. Diese Transchromosomen umfassen üblicherweise Telomer- und Centromer-Sequenzen und können Deletionen relativ zum parentalen intakten Chromosom enthalten. Transchromosomen können auch zusätzliche inserierte Sequenzen umfassen. Zum Beispiel können zwei humane Immunglobulin-Loci auf einem einzigen Transchromosom kombiniert werden durch Inserieren von Sequenzen von einem ersten Immunglobulin-Locus (z. B. aus einem YAC-Klon, einem Transchromosom oder einem intakten Chromosom) in ein Transchromosom, das einen zweiten Immunglobulin-Locus umfasst. Dieses Verfahren kann auch wiederholt werden, um alle drei humanen Immunglobulin-Loci auf einem einzigen Transchromosom zu kombinieren. Ein Einzel-Transchromosom, welches zwei oder drei verschiedene Immunglobulin-Loci umfasst, sieht eine genetische Kopplung dieser Loci vor, was die Fraktion von transgener Nachkommenschaft erhöht, die nützlich zur Herstellung von humanen Antikörpern ist. Bevorzugte Formen von Transchromosomen sind diejenigen, welche ausführlich in Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727, Tomizuka, K., et al., 1997, Nature Genetics 16:133–143, und WO 97/07671, WO 98/37757 und WO 00/10383 beschrieben werden, von denen jedes für alle Zwecke in seiner Gesamtheit durch den Bezug darauf einbezogen wird. Transchromosomen können auch integrierte selektierbare Marker (z. B. Neomycin-Resistenzgene) und andere Sequenzen, welche nicht im parentalen intakten Chromosom gefunden werden, einschließen. Im Fall einer Rekombination zwischen einem Transchromosom und einem endogenen Mauschromosom werden Sequenzen aus dem Transchromosom in das endogene Mauschromosom inseriert oder diesem hinzugefügt. Transchromosomen können durch Deletion, Translokation, Substitution und dergleichen modifiziert werden, wie beschrieben in WO 98/37757, EP 0972445 und WO 00/10383, welche hierin durch den Bezug darauf für alle Zwecke einbezogen werden. Zum Beispiel können Transchromosomen spontan im Verlauf der Einbringung in Embryo-Stammzellen (ES) der Maus fragmentiert werden, durch Telomer-gerichtete Trunkierung fragmentiert werden und/oder durch Cre/loxP-ortsspezifische Rekombination oder ähnliche Verfahren transloziert werden. Solche Rekombinations- oder Translokationsereignisse können durch spezifisches Inserieren von Rekombinationsstellen gefördert werden (z. B. loxP-Sequenzen und andere; siehe z. B. Abuin, A., und Bradley, A., 1996, Mol. Cell. Biol. 16:1851–1856; Mitani, K., et al., 1995, Somat. Cell. Mol. Genet. 21:221–231; Li, Z. W., et al.,

1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6158–6162; Smith, A.J., et al., 1995, Nat. Genet. 9:376–385; Trinh, K. R., und Morrison, S. L., 2000, J Immunol. Methods 244:185–193; Sunaga, S., et al., 1997, Mol. Reprod. Dev. 46:109–113; Dymecki, S. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6191–6196; Zou, Y.R., et al., 1994, Curr. Biol. 4:1099–1103; Rudolph, U., et al., 1993, Transgenic Res. 2: 345–355; Rickert, R. C., et al., 1997, Nucleic Acids. Res. 25: 1317–1318). Im Fall von eingeführten loxP-Stellen wird die Expression eines Transgens, das die cre-Rekombinase codiert, die Rekombination zwischen den zwei loxP-Stellen fördern. Transchromosomen können auch ein Fusionschromosom sein, bestehend aus verschiedenen Chromosomenfragmenten, als Ergebnis der oben beschriebenen Translokation. Transchromosomen können autonom sein. Autonome Transchromosomen sind unterschiedlich von, nicht-fortlaufend mit oder nicht inseriert in die endogenen Mauschromosomen. Diese autonomen Transchromosomen umfassen Telomer- und Centromer-Sequenzen, die eine autonome Replikation ermöglichen. Alternativ dazu können Transchromosom-Sequenzen nach Einbringung in Maus-Zellkerne, an/auf Mauschromosomen transloziert werden. Die endogenen Mauschromosomen schließen 19 autosomale Chromosomenpaare und das X- und Y-Chromosom ein.

[0136] Die Einführung von exogenen humanen Immunglobulin-Loci kann durch eine Vielzahl von Verfahren erzielt werden, einschließlich zum Beispiel Mikroinjektion von Halbtage-Embryo-Pronuklei, Transfektion von Embryo-Stammzellen oder Fusion von Embryo-Stammzellen mit Hefe-Sphäroplasten oder Mikronuklei, welche Transchromosomen umfassen. Die aus den oben beschriebenen Verfahren resultierenden transgenen Mäuse sind in der Lage, die eingebrachten exogenen Immunglobulin-Komponenten-Sequenzen funktionell zu reorganisieren und ein Repertoire von Antikörpern verschiedener Isotypen, codiert von humanen Immunglobulin-Genen, zu exprimieren, ohne endogene Immunglobulin-Gene zu exprimieren. Die Herstellung und Eigenschaften von Mäusen mit diesen Merkmalen werden ausführlich beschrieben z. B. von Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); U.S.-Patente Nr. 5 877 397, 5 874 299, 5 814 318, 5 789 650, 5 770 429, 5 661 016, 5 633 425, 5 625 126, 5 569 825, 5 545 806, Nature 48:1547–1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991), WO 94/02602 (1993), WO 96/34096 (1995), WO 96/33735 (1996), WO 98/24893 (1997), U.S.-Patente Nr. 5 939 598, 6 075 181, 6 114 598, Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727, Tomizuka, K., et al., 1997, Nature Genetics 16:133–143, und Tomizuka, K., WO 97/07671, WO 98/37757, WO 00/10383 und JP 2000-42074 (von denen jedes in seiner Gesamtheit für alle Zwecke als Bezugsstelle einbezogen ist). Transgene Mäuse sind besonders geeignet. Monoklonale Antikörper können z. B. durch Fusionieren von B-Zellen aus derartigen Mäusen mit geeigneten immortalen Zelllinien unter Anwendung der herkömmlichen Kohler-Milstein-Technologie hergestellt werden. Man kann auch direkt zu monoklonalen Antikörpern aus individuellen B-Zellen, die aus dem Medium isoliert wurden, unter Verwendung von PCR-Amplifikation der V-Regionen gelangen (Schrader et al., 1997, U.S.-Patent Nr. 5 627 052). Alternativ dazu können FACs-sortierte oder anderweitig angereicherte B-Zell-Präparationen als eine Quelle für RNA oder DNA zur PCR-Amplifikation der V-Region-Sequenzen verwendet werden. Phagen-Display-Verfahren (nachstehend beschrieben) können ebenfalls eingesetzt werden, um humane Antikörpersequenzen aus immunisierten transgenen Mäusen, welche humane Immunglobulin-Loci umfassen, zu erhalten. Die humanen Antikörper-V-Region-Sequenzen, die durch diese Verfahren erhalten werden, können dann verwendet werden, um intakte Antikörper zu erzeugen, welche die Bindungsmerkmale der ursprünglichen Stammform-Antikörper beibehalten. Dieses Verfahren ist nachstehend beschrieben.

Phagen-Display-Verfahren

[0137] Eine weitere Vorgehensweise zum Erhalten humaner Antikörper besteht darin, eine cDNA-Bibliothek aus B-Zellen gemäß des allgemeinen Protokolls zu screenen, welches von Huse et al., 1989, Science 246:1275–1281, dargestellt wurde. Derartige B-Zellen können aus einem Menschen erhalten werden, immunisiert mit dem gewünschten Antigen, Fragmenten, längeren Polypeptiden, enthaltend das Antigen oder Fragmente, oder anti-idiotypischen Antikörpern. Gegebenfalls werden derartige B-Zellen aus einem Individuum erhalten, welches nicht an das Antigen exponiert worden ist. B-Zellen können auch aus transgenen Mäusen erhalten werden, welche humane Immunglobulin-Sequenzen exprimieren. Die transgenen Mäuse können mit einem Antigen oder einer Kollektion von Antigenen immunisiert werden. Die Tiere können auch nicht-immunisiert sein. B-Zell-mRNA-Sequenzen, welche humane Antikörper codieren, werden verwendet, um cDNA unter Verwendung von reverser Transkriptase zu erzeugen. Die V-Region codierenden Segmente der cDNA-Sequenzen werden dann in einen DNA-Vektor kloniert, der die Expression der Antikörper-V-Regionen lenkt. Typischerweise werden die V-Region-Sequenzen spezifisch durch PCR, vor der Klonierung, amplifiziert. Ebenfalls typisch, werden die V-Region-Sequenzen in eine Stelle innerhalb des DNA-Vektors kloniert, welcher so konstruiert ist, dass die V-Region als ein Fusionsprotein exprimiert wird. Beispiele solcher Fusionsproteine schließen m13-Coliphage-Gen 3- und -Gen 8-Fusionsproteine ein. Die Kollektion von klonierten V-Region-Sequenzen wird dann verwendet, um eine Expressionsbibliothek von Antikörper-V-Regionen zu erzeugen. Um eine Expressionsbibliothek zu erzeugen, wird der DNA-Vektor, der die klonierten V-Region-Sequenzen umfasst, ver-

wendet, um eukaryotische oder prokaryotische Wirtszellen zu transformieren. Zusätzlich zu V-Regionen kann der Vektor gegebenenfalls die Gesamtheit oder einen Teil eines viralen Genoms codieren und kann virale Verpackungssequenzen umfassen. In einigen Fällen umfasst der Vektor nicht ein gesamtes Virusgenom, und der Vektor wird dann gemeinsam mit einem Helfervirus oder Helfervirus-DNA-Sequenzen verwendet. Die exprimierten Antikörper-V-Regionen werden in, oder auf der Oberfläche von, transformierten Zellen oder Viruspartikeln aus den transformierten Zellen gefunden. Diese Expressionsbibliothek, welche die Zellen oder Viruspartikel umfasst, wird dann verwendet, um V-Region-Sequenzen zu identifizieren, welche Antikörper oder Antikörperfragmente codieren, die mit vorbestimmten Antigenen reaktiv sind. Um diese V-Region-Sequenzen zu identifizieren, wird die Expressionsbibliothek hinsichtlich Reaktivität der exprimierten V-Regionen mit den vorbestimmten Antigenen gescreent oder selektiert. Die Zellen oder Viruspartikel, welche die klonierten V-Region-Sequenzen umfassen und welche die exprimierten V-Regionen aufweisen, werden durch ein Verfahren gescreent oder selektiert, welches Zellen oder Viruspartikel identifiziert oder anreicht, die V-Regionen aufweisen, welche mit einem vorbestimmten Antigen reaktiv (z. B. Bindungs-Assoziation oder katalytische Aktivität) sind. Zum Beispiel kann radioaktives oder fluoreszierend markiertes Antigen, welches dann an exprimierte V-Regionen bindet, nachgewiesen und verwendet werden, um Zellen oder Viruspartikel zu identifizieren oder zu sortieren. Auch Antigen, welches an eine feste Matrix oder Kügelchen gebunden ist, kann verwendet werden, um Zellen oder Viruspartikel zu selektieren, die reaktive V-Regionen auf der Oberfläche aufweisen. Die so aus der Expressionsbibliothek identifizierten V-Region-Sequenzen können dann zum Lenken der Expression, in einer transformierten Wirtszelle, von einem Antikörper oder Fragment davon verwendet werden, welcher/welches Reaktivität mit dem vorbestimmten Antigen besitzt. Das von Huse beschriebene Protokoll wird in Kombination mit der Phagen-Display-Technologie effizienter gemacht; Siehe z. B. Dower et al., WO 91/17271, und McCafferty et al., WO 92/01047, U.S.-Patente Nr. 5 871 907, 5 858 657, 5 837 242, 5 733 743 und 5 565 332 (von denen jedes für alle Zwecke durch den Bezug darauf in seiner Gesamtheit einbezogen wird). In diesen Verfahren werden Bibliotheken von Phagen produziert, in welchen die Mitglieder (Display-Packungen) verschiedene Antikörper auf ihren Außenoberflächen präsentieren. Antikörper werden üblicherweise als Fv- oder Fab-Fragmente präsentiert. Phagen, welche Antikörper mit einer gewünschten Spezifität präsentieren, können durch Affinitätsanreicherung gegen das Antigen oder Fragment davon selektiert werden. Man kann Phagen-Display, kombiniert mit immunisierten transgenen Mäusen, welche humane Immunglobulin-Gene exprimieren, anwenden, um antigenspezifische Antikörper zu erhalten, selbst wenn die Immunantwort gegen das Antigen schwach ist.

[0138] In einer Variation des Phagen-Display-Verfahrens können humane Antikörper mit der Bindungsspezifität eines ausgewählten murinen Antikörpers produziert werden; siehe zum Beispiel Winter, WO 92/20791. In diesem Verfahren wird entweder die variable Schwer- oder Leichtketten-Region des ausgewählten murinen Antikörpers als Ausgangsmaterial verwendet. Wenn zum Beispiel eine variable Leichtketten-Region als das Ausgangsmaterial gewählt wird, wird eine Phagen-Bibliothek konstruiert, in welcher die Mitglieder dieselbe variable Leichtketten-Region (d. h. das murine Ausgangsmaterial) und eine unterschiedliche variable Schwereketten-Region präsentieren. Die variablen Schwereketten-Regionen werden aus einer Bibliothek von rearrangierten humanen variablen Schwereketten-Regionen erhalten. Ein Phage, der starke spezifische Bindung für CT-LA-4 zeigt (z. B. mindestens 10^8 und vorzugsweise mindestens 10^9 M^{-1}), wird selektiert. Die humane variable Schwereketten-Region aus diesem Phagen dient dann als Ausgangsmaterial zum Konstruieren einer weiteren Phagen-Bibliothek. In dieser Bibliothek präsentiert jeder Phage dieselbe variable Schwereketten-Region (d. h. die Region, welche aus der ersten Display-Bibliothek identifiziert wurde) und eine unterschiedliche variable Leichtketten-Region. Die variablen Leichtketten-Regionen werden aus einer Bibliothek von rearrangierten humanen variablen Leichtketten-Regionen erhalten. Wiederum werden Phagen, welche eine starke spezifische Bindung für das gewählte [] zeigen, selektiert. Künstliche Antikörper, welche ähnlich zu humanen Antikörpern sind, können aus Phagen-Display-Bibliotheken erhalten werden, welche statistische oder synthetische Sequenzen, zum Beispiel in CDR-Regionen, beinhalten.

Auswählen der konstanten Region

[0139] Die variablen Schwer- und Leichtketten-Regionen von chimären, humanisierten oder humanen Antikörpern können an mindestens einen Bereich einer humanen konstanten Region durch verschiedene allgemein bekannte Verfahren verknüpft werden (siehe z. B. Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029–10033 und WO 90/07861; diese Bezugsstellen und darin zitierte Bezugsstellen werden hierin für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen). Die Wahl der konstanten Region hängt teilweise davon ab, ob eine Antikörper-abhängige Komplement- und/oder zellulär vermittelte Toxizität gewünscht ist. Zum Beispiel besitzen die Isotypen IgG₁ und IgG₃ üblicherweise eine größere Komplement-Bindungsaktivität als die Isotypen IgG₂ oder IgG₄. Die Wahl des Isotyps kann auch die Passage des Antikörpers in das Gehirn beeinflussen. Konstante Leichtketten-Regionen können Lambda oder Kappa sein. Antikörper können als Tetramere mit zwei

Leicht- und zwei Schwereketten, als separate Schwereketten, Leichtketten, als Fab, Fab', F(ab')₂ und Fv oder als Einzelkettenantikörper, in denen variable Schwere- und Leichtketten- Domänen durch einen Spacer bzw. Abstandhalter verbunden sind, exprimiert werden.

[0140] Für einige Anwendungen können Nicht-IgG-Antikörper nützlich sein. Wenn zum Beispiel mehrwertige Antikörperkomplexe gewünscht werden, können IgM- und IgA-Antikörper verwendet werden.

Verwendung von partiellen Antikörpersequenzen zum Exprimieren intakter Antikörper

[0141] Antikörper interagieren mit Zielantigenen hauptsächlich über Aminosäurereste, welche in den sechs Schwere- und Leichtketten-Komplementaritätsbestimmungs-Regionen (CDRs) lokalisiert sind. Aus diesem Grund sind die Aminosäuresequenzen innerhalb von CDRs zwischen individuellen Antikörpern verschiedenartiger als Sequenzen außerhalb von CDRs. Weil CDR-Sequenzen für die meisten Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen verantwortlich sind, ist es möglich, rekombinante Antikörper zu exprimieren, welche die Eigenschaften von spezifischen natürlich vorkommenden Antikörpern nachahmen, indem man Expressionsvektoren konstruiert, welche CDR-Sequenzen aus dem spezifischen natürlich vorkommenden Antikörper, gepfropft auf Gerüstsequenzen aus einem anderen Antikörper mit anderen Eigenschaften, einschließen (siehe z. B. Riechmann, L., et al., 1988, Nature 332:323–327; Jones, P., et al., 1986, Nature 321:522–525; und Queen, C., et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10029–10033). Derartige Gerüst-Sequenzen können aus öffentlichen DNA-Datenbanken erhalten werden, welche Keimbahn-Antikörper-Gensequenzen einschließen. Diese Keimbahnsequenzen werden sich von reifen Antikörper-Gensequenzen unterscheiden, weil sie komplett assemblierte variable Gene nicht einschließen werden, welche durch die V(D)J-Verknüpfung während der B-Zellreifung gebildet werden. Keimbahn-Gensequenzen werden sich auch von der Sequenz eines Sekundär-Repertoires-Hochaffinitätsantikörpers an einzelnen Nuldeotiden wegen somatischer Mutationen unterscheiden. Allerdings sind somatische Mutationen nicht gleichmäßig über die variable Region verteilt. Zum Beispiel sind somatische Mutationen im aminoterminalen Bereich der Gerüstregion 1 und im carboxyterminalen Bereich der Gerüstregion 4 relativ selten. Darüber hinaus verändern manche somatische Mutationen die Bindungseigenschaften des Antikörpers nicht signifikant. Aus diesem Grund ist es nicht notwendig, die gesamte DNA-Sequenz eines jeweiligen Antikörpers zu erhalten, um einen intakten rekombinanten Antikörper nachzubilden, der ähnliche Bindungseigenschaften zu denjenigen des ursprünglichen Antikörpers besitzt (siehe PCT/US99/05535, eingereicht am 12. März 1999, was hierin für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen ist). Eine partielle Schwere- und Leichtketten-Sequenz, welche die CDR-Regionen überspannt, ist für diesen Zweck typischerweise ausreichend. Die partielle Sequenz wird verwendet, um zu bestimmen, welche "variable"- und "joining"-Keimbahngensegmente zu den rekombinierten variablen Antikörper-Genen beitragen. Die Keimbahnsequenz wird dann verwendet, um fehlende Abschnitte der variablen Region aufzufüllen bzw. zu ergänzen. Schwere- und Leichtketten-Leadersequenzen werden während der Proteinreifung abgespalten und tragen nicht zu den Eigenschaften des letztendlichen Antikörpers bei. Aus diesem Grund ist es nicht notwendig, die entsprechende Keimbahn-Leadersequenz für Expressionskonstrukte zu verwenden. Um fehlende Sequenzen hinzuzufügen, können klonierte cDNA-Sequenzen mit synthetischen Oligonukleotiden durch Ligation oder PCR-Amplifikation kombiniert werden. Alternativ dazu kann die gesamte variable Region als ein Satz von kurzen überlappenden Oligonukleotiden synthetisiert und durch PCR-Amplifikation kombiniert werden, um einen vollständig synthetischen Klon der variablen Region zu erzeugen. Dieses Verfahren besitzt gewisse Vorteile, wie die Eliminierung oder den Einschluss von jeweiligen Restriktionsstellen, oder die Optimierung von jeweiligen Codons.

[0142] Die Nuldeotidsequenzen von Schwere- und Leichtketten-Transkripten aus einem Hybridom(en) werden verwendet, um einen überlappenden Satz von synthetischen Oligonukleotiden zu entwerfen, um synthetische V-Regionen mit identischen Aminosäure-Codierungsfähigkeiten wie die natürlichen Sequenzen zu erzeugen. Die synthetischen Sequenzen der Schwere- und Kappa-Leicht-Kette können sich auf drei Weisen von den natürlichen Sequenzen unterscheiden: Abschnitte von wiederholten Nukleotidbasen werden unterbrochen, um die Oligonukleotidsynthese und PCR-Amplifikation zu erleichtern; optimale Translationsinitiationsstellen werden gemäß den Regeln von Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867–19870) eingebaut; und HindII-Stellen werden stromaufwärts der Translationsinitiationsstellen erzeugt.

[0143] Sowohl für die variablen Schwere- als auch Leichtketten-Regionen werden die optimierten Sequenzen des codierenden und entsprechenden nicht-codierenden Strangs in Segmente von 30–50 Nukleotiden zerlegt, sodass die Brüche zwischen Nukleotiden für die Sequenz des codierenden Strangs ungefähr beim Mittelpunkt des entsprechenden nicht-codierenden Oligonukleotids auftreten. Somit können, für jede Kette, die Oligonukleotide sich zu überlappenden, doppelsträngigen Sätzen zusammenfügen, welche die gewünschte Sequenz vollständig überspannen. Diese Oligonukleotide werden zu Pools vereinigt, welche Segmente von 150–400

Nukleotiden überspannen. Die Pools werden dann als Matrizen verwendet, um PCR-Amplifikationsprodukte von 150–400 Nukleotiden herzustellen. Typischerweise wird ein einzelner Variable-Region-Oligonukleotidsatz in zwei Pools zerlegt werden, welche getrennt amplifiziert werden, um zwei überlappende PCR-Produkte zu erzeugen. Diese überlappenden Produkte werden dann durch PCR-Amplifikation kombiniert, um die vollständige variable Region zu bilden. Es kann auch wünschenswert sein, ein überlappendes Fragment der konstanten Schwer- oder Leichtkette-Region (einschließlich der BbsI-Stelle der Kappa-Leichtkette oder der AgeI-Stelle der Gamma-Schwerkette) in der PCR-Amplifikation einzuschließen, um Fragmente zu erzeugen, welche leicht in die Expressionsvektor-Konstrukte kloniert werden können.

[0144] Die rekonstruierten variablen Schwer- und Leichtkette-Regionen werden dann mit klonierten Promotor-, Translationinitiations-, Konstant-Region-, 3'-untranslatierten, Polyadenylierungs- und Transkriptionsterminations-Sequenzen kombiniert, um Expressionsvektor-Konstrukte zu bilden. Man kann die Schwer- und Leichtkette-Expressionskonstrukte zu einem einzelnen Vektor vereinigen, cotransfizieren, seriell transfizieren oder separat in Wirtszellen transfizieren, welche dann fusioniert werden, um eine Wirtszelle, die beide Ketten exprimiert, zu bilden.

[0145] Plasmide zur Verwendung bei der Konstruktion von Expressionsvektoren für humanes IgG_k werden nachstehend beschrieben. Die Plasmide wurden so konstruiert, dass PCR-amplifizierte V-Schwer- und V-Kappa-Leichtkette-cDNA-Sequenzen verwendet werden konnten, um vollständige Schwere- und Leichte-Kette-Minigene zu rekonstruieren. Diese Plasmide können verwendet werden, um humane oder chimäre IgG_{1k}- oder IgG_{4k}-Antikörper vollständig zu exprimieren. Ähnliche Plasmide können für die Expression von anderen Schwere-Kette-Isotypen oder für die Expression von Antikörpern, welche Lambda-Leichtketten umfassen, konstruiert werden.

[0146] Das Kappa-Leichtketten-Plasmid pCK7-96 (SEQ ID Nr. 1), welches nachstehend gezeigt wird, schließt die Kappa-Konstante-Region und -Polyadenylierungsstelle ein, so dass Kappa-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, welche HindIII-Stellen stromaufwärts des Initiator-Methionins enthalten, mit HindIII und BbsI verdaut und in mit HindIII und BbsI verdauten pCK7-96 kloniert werden können, um eine vollständige Leichtkette-codierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kassette kann als ein HindIII/NotI-Fragment isoliert und an Transkription-Promotorsequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0147] Das Gamma1-Schwerketten-Plasmid pCG7-96 (SEQ ID Nr. 2) schließt die humane Gamma1-Konstante-Region und -Polyadenylierungsstelle ein, so dass Gamma-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, die HindIII-Stellen stromaufwärts des Initiator-Methionins einschließen, mit HindIII und AgeI verdaut werden können und in mit HindIII und AgeI verdauten pCG7-96 kloniert werden können, um eine vollständige Gamma1-Schwerkette codierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kassette kann als ein HindIII/SalI-Fragment isoliert und an Transkription-Promotorsequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0148] Das Gamma4-Schwerketten-Plasmid pG4HE-96 (SEQ ID Nr. 3) schließt die humane Gamma4-Konstante-Region und -Polyadenylierungsstelle ein, sodass Gamma-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, die HindIII-Stellen stromaufwärts des Initiator-Methionins einschließen, mit HindIII und AgeI verdaut werden können und in mit HindIII und AgeI verdauten pG4HE-96 kloniert werden können, um eine vollständige Gamma4-Schwerkette codierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kassette kann als ein HindIII/EcoRI-Fragment isoliert und an Transkription-Promotorsequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0149] Eine Reihe von unterschiedlichen Promotoren (einschließlich, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, CMV, Ubiquitin, SRalpha und Beta-Actin) kann verwendet werden, um die rekonstruierten Schwer- und Leichtkette-Gene zu exprimieren. Zum Beispiel kann der Vektor pCDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA) mit HindIII und entweder NotI, XhoI oder EcoRI gespalten werden zur Ligation mit entweder der Kappa-, Gamma1- oder Gamma4-Kassette, welche oben beschrieben wurden, um Expressionsvektoren zu bilden, welche direkt in Säugerzellen transfiziert werden können.

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA
TCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG
CTCCCCGAGACGGTCAAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGG
CGCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTG
TACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGC
ATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTC
TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC
CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCGGCCGCGGT
CAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAGCCTGTATCCAGCACAGTCTTGGAAAGAG
GCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGGCTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTC
AGACCTGTTCTGAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAG
CATTGAGTTTACTGCAAGGTGAGAAAAGCATGCAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAGAGCTC
CAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACAT
CAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTT
TCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTT
GTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA

.....

ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGC
CCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACCCCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTC
CACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCT
CCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCT
GTGGTTTCTCTCTTTCCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTC
TCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCT
TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCTCCTCAAACCCACAAGCCTTCT
GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCGTAATC
ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGC

pCG7-96 (SEQ ID Nr. 2)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGA
GGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGAC
ACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGGCCAGCT
CTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCTCCACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGTGG
AAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGC
AAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGA
GAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCCTAACCCAG
GCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGAC
CCTGCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAACTCTCCTCCTCAGCTCGGACACCT
TCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACA
AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAAGCCAGGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGG
CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGT
CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGA
CGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTC
ACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAG
GGCCACATGGACAGAGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAAC
CTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATG
AGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTC
TCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCCGGGCGCCAGCAT
GGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCACGGG
TCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACA

.....

CTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCC
TCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGG
CCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTG
TCCTGTTCTGTGAGCGCCCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAG
GTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGG
TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
TCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
CGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCG
ACCGCTGCGCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGA
AGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG
TCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAG
CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG
TCAGAAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA
TAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA
TTATTATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGT
TTCGGTGTATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT
GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCT
GGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGCACCATATGGACATA
TTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAG
GTGACACTATA

pG4HE (SEQ ID Nr. 3)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCGGGCCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAG
GGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCAGACA
CTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCCCTCTGCGCCCTGGGCCC
AGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTTGACGCTTCCACCAAGGGCCCA

TCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG
CTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGG
CAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACC CGGAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGTCTCA
GGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTAC
CCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGG
AGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGA
CACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGG
TCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGG
ACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCAC
CTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA
AACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTTCAACG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
CCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCGAGGGCC
ACATGGACAGAGGTGAGTCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCT
GTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCACAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGG
GAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGG
GGTCGCGCAGGATGCTTGGCACGTACCCCGTCTACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAA
ATAAAGCACCCACCACTGCCCTGGGCCCCCTGTGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAG
GCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGACATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGG
CCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCACCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGG
CAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGCTGCCCTGGGCTGGGCCAC
GGGAAGCCCTAGGAGCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCTT
GTCCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCCCCCATGCCCACTCGGGGGGATCCCCGGGTACCGA
GCTCGAATTATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTG
ATAAGCCAGGTTAACTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTAT
TGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTAGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAAGTATCGT
CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAA
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT
CTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAGTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC

TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
 TTACCATCTGGCCCCAGTGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTT
 ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG
 CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGT
 TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTCGTTTGGTATGGC
 TTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
 AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA
 CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
 CTTGCCCGGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC
 ATTGGAACACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC
 GATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG
 GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
 TGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAT
 GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTT
 CCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAAT
 AGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACA
 CATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
 GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAG
 CAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATATTGTGTTAGAACGCGGCTACAATTAATA
 CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA

Expression von rekombinanten Antikörpern

[0150] Chimäre, humanisierte und humane Antikörper werden typischerweise durch rekombinante Expression produziert. Rekombinante Polynukleotidkonstrukte schließen typischerweise eine Expressions-Steuerungssequenz ein, die funktionsfähig an die codierenden Sequenzen von Antikörperketten verknüpft ist, einschließlich natürlich assoziierten oder heterologen Promotor-Regionen. Vorzugsweise sind die Expressions-Steuerungssequenzen eukaryotische Promotorsysteme in Vektoren, die fähig zum Transformieren oder Transfizieren eukaryotischer Wirtszellen sind. Sobald der Vektor in den passenden Wirt eingebracht worden ist, wird der Wirt unter Bedingungen gehalten, die zur Expression der Nukleotidsequenzen bei hohem Spiegel und zum Absammeln und Reinigen der kreuzreagierenden Antikörper geeignet sind.

[0151] Diese Expressionsvektoren sind typischerweise in den Wirtsorganismen entweder als Episomen oder als ein integraler Teil der Wirtschromosomen-DNA replizierbar. Üblicherweise enthalten Expressionsvektoren Selektionsmarker, z. B. Ampicillin-Resistenz oder Hygromycin-Resistenz, um die Detektion derjenigen Zellen zu gestatten, welche mit den gewünschten DNA-Sequenzen transformiert wurden.

[0152] E. coli ist ein prokaryotischer Wirt, der besonders nützlich zur Klonierung der DNA-Sequenzen der vorliegenden Erfindung ist. Mikroben, wie Hefe, sind ebenfalls nützlich zur Expression. Saccharomyces ist ein bevorzugter Hefewirt, wobei geeignete Vektoren Expressions-Steuerungssequenzen, einen Replikationsursprung, Terminationssequenzen und dergleichen, nach Bedarf, aufweisen. Typische Promotoren schließen 3-Phosphoglyceratkinase und andere glykolytische Enzyme ein. Induzierbare Hefepromotoren schließen, unter anderen, Promotoren von Alkoholdehydrogenase, Isocytochrom C und Enzymen, welche für Maltose- und Galactoseverwertung verantwortlich sind, ein.

[0153] Säugerzellen sind ein bevorzugter Wirt zum Exprimieren von Nukleotidsegmenten, welche Immunglobuline oder Fragmente davon codieren; siehe Winnacker, FROM GENES TO CLONES (VCH Publishers, NY, 1987). Eine Reihe von geeigneten Wirtszelllinien, die zum Sezernieren von intakten heterologen Proteinen in der Lage sind, sind im Fachgebiet entwickelt worden und schließen CHO-Zelllinien, verschiedene COS-Zelllinien, HeLa-Zellen, L-Zellen und Myelom-Zelllinien ein. Vorzugsweise sind die Zellen nicht-human. Expressionsvektoren für diese Zellen können Expressions-Steuersequenzen, wie einen Replikationsursprung, einen Promotor, einen Enhancer (Queen et al., 1986, Immunol. Rev. 89:49) und notwendige Prozessierungs-Informationsstellen, wie Ribosomenbindungsstellen, RNA-Splice-Stellen, Polyadenylierungsstellen und transkriptionale Terminatorsequenzen, einschließen. Bevorzugte Expressions-Steuersequenzen sind Promotoren, welche aus endogenen Genen, Cytomegalovirus, SV40, Adenovirus, Rinder-Papillomavirus und dergleichen abgeleitet werden; siehe Co et al., 1992, J. Immunol. 148:1149.

[0154] Alternativ dazu können Antikörper codierende Sequenzen in Transgene zur Einbringung in das Genom

eines transgenen Tiers und zur anschließenden Expression in der Milch des transgenen Tiers eingebaut werden (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5 741 957, 5 304 489 und 5 849 992). Geeignete Transgene schließen codierende Sequenzen für leichte und/oder schwere Ketten in funktionsfähiger Verknüpfung mit einem Promotor und Enhancer aus einem Brustdrüsen-spezifischen Gen, wie Casein oder Beta-Lactoglobulin, ein.

[0155] Die Vektoren, welche die DNA-Segmente von Interesse enthalten, können durch allgemein bekannte Verfahren in die Wirtszelle transferiert werden, abhängig vom Typ des zellulären Wirts. Zum Beispiel wird Calciumchlorid-Transfektion üblicherweise für prokaryotische Zellen verwendet, wohingegen Calciumphosphat-Behandlung, Elektroporation, Lipofektion, Biolistik oder viralbasierende Transfektion für andere zelluläre Wirte angewandt werden kann. Andere zum Transformieren von Säugerzellen verwendete Verfahren schließen die Verwendung von Polybrene, Protoplasten-Fusion, Liposomen, Elektroporation und Mikroinjektion ein (siehe allgemein Sambrook et al., siehe oben). Für die Herstellung von transgenen Tieren können Transgene in befruchtete Eizellen mikroinjiziert werden, oder können in das Genom von embryonischen Stammzellen eingebaut werden, und die Zellkerne derartiger Zellen können in entkernte Eizellen überführt werden.

[0156] Sobald sie exprimiert wurden, können Antikörper gemäß Standardvorgehensweisen des Fachgebiets gereinigt werden, einschließlich HPLC-Reinigung, Säulen-Chromatographie, Gelelektrophorese und dergleichen (siehe allgemein Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Modifizierte Antikörper

[0157] Antikörper, welche unter Befolgung der vorliegenden Erfindung erhalten werden, können modifiziert sein. Der Begriff "modifizierter Antikörper" schließt Antikörper, wie monoklonale Antikörper, chimäre Antikörper und humanisierte Antikörper, ein, welche z. B. durch Deletieren, Hinzufügen oder Substituieren von Bereichen des Antikörpers modifiziert worden sind. Zum Beispiel kann ein Antikörper modifiziert werden durch Deletieren der konstanten Region und Ersetzen dieser mit einer konstanten Region, mit welcher beabsichtigt wird, die Halbwertszeit, z. B. Serum-Halbwertszeit, Stabilität oder Affinität des Antikörpers zu erhöhen.

[0158] Der gemäß der Erfindung erhaltene Antikörper kann konjugiert sein bzw. werden und verwendet werden, um eine gegebene biologische Antwort zu modifizieren oder eine biologische Antwort zu erzeugen (z. B. um Effektorzellen zu rekrutieren). Die Arzneimittel-Einheit soll nicht als auf klassische chemische therapeutische Mittel eingeschränkt ausgelegt werden. Zum Beispiel kann die Arzneimittel-Einheit ein Protein oder Polypeptid sein, welches eine gewünschte biologische Aktivität besitzt. Solche Proteine können zum Beispiel ein enzymatisch aktives Toxin oder aktives Fragment davon, wie Abrin, Ricin A, Pseudomonas-Exotoxin oder Diphtherietoxin; ein Protein wie Tumornekrosefaktor oder Interferon-Alpha; oder Modifizierer einer biologischen Antwort, wie zum Beispiel Lymphokine, Interleukin-1 ("IL-1"), Interleukin-2 ("IL-2"), Interleukin-6 ("IL-6"), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor ("GM-CSF"), Granulozyten-Koloniestimulierenden-Faktor ("G-CSF") oder andere Wachstumsfaktoren, einschließen.

[0159] Techniken zum Konjugieren einer derartigen therapeutischen Einheit an Antikörper sind allgemein bekannt, siehe z. B. Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (Hrsg.), S. 243–56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2. Auflage), Robinson et al. (Hrsg.), S. 623–53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (Hrsg.), S. 475–506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (Hrsg.), S. 303–16 (Academic Press 1985), und Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119–58 (1982).

Behandlungsschemen

[0160] Die Erfindung erleichtert die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die einen oder eine Kombination von monoklonalen Antikörpern (intakt oder bindende Fragmente davon) umfassen, formuliert gemeinsam mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger. Einige Zusammensetzungen schließen eine Kombination von mehreren (z. B. zwei oder mehr) monoklonalen Antikörpern oder antigen-bindenden Abschnitten davon ein. In manchen Zusammensetzungen ist jeder der Antikörper oder antigen-bindenden Abschnitte davon der Zusammensetzung ein monoklonaler Antikörper oder ein Antikörper mit humaner Sequenz, welcher an ein distinktes bzw. eindeutiges, im Voraus gewähltes Epitop eines Antigens bindet.

[0161] In prophylaktischen Anwendungen werden pharmazeutische Zusammensetzungen oder Medikamente an einen Patienten, der anfällig für eine Erkrankung oder ein Leiden ist, oder anderweitig dahingehend gefährdet ist (z. B. eine Immunkrankheit), in einer ausreichenden Menge verabreicht, um das Risiko zu eliminieren oder zu vermindern, die Schwere zu verringern oder den Ausbruch der Krankheit zu verzögern, einschließlich biochemischer, histologischer und/oder verhaltensmäßiger Symptome der Krankheit, ihrer Komplikationen und intermediären pathologischen Phänotypen, die sich während der Entwicklung der Krankheit zeigen. In therapeutischen Anwendungen werden Zusammensetzungen oder Medikamente an einen Patient, der dafür in Verdacht steht, unter einer derartigen Krankheit zu leiden, oder bereits darunter leidet, in einer ausreichenden Menge verabreicht, um die Symptome der Krankheit (biochemisch, histologisch und/oder verhaltensmäßig) zu heilen oder wenigstens teilweise aufzuhalten, einschließlich deren Komplikationen und intermediären pathologischen Phänotypen in der Entwicklung der Krankheit. Eine angemessene Menge, um eine therapeutische oder prophylaktische Behandlung zu bewerkstelligen, wird als eine therapeutisch, oder prophylaktisch, wirksame Dosis definiert. Sowohl in prophylaktischen als auch therapeutischen Behandlungsschemen werden Mittel üblicherweise in mehreren Dosierungen verabreicht, bis eine ausreichende Immunantwort erreicht worden ist. Typischerweise wird diese Immunantwort überwacht, und wiederholte Dosierungen werden gegeben, wenn die Immunantwort abzuklingen beginnt.

Effektive Dosierungen

[0162] Wirksame Dosen der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung für die Behandlung von Immunverwandten Leiden und Krankheiten, die hierin beschrieben werden, variieren in Abhängigkeit von vielen unterschiedlichen Faktoren, einschließlich den Methoden zur Verabreichung, der Zielstelle, dem physiologischen Zustand des Patienten, ob der Patient ein Mensch oder ein Tier ist, anderen verabreichten Medikamenten, und davon, ob die Behandlung prophylaktisch oder therapeutisch ist. Üblicherweise ist der Patient ein Mensch, aber nicht-menschliche Säugetiere, einschließlich transgener Säugetiere, können ebenfalls behandelt werden. Die Behandlungs-Dosierungen müssen titriert werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit zu optimieren.

[0163] Für die Verabreichung mit einem Antikörper liegen die Dosierungen im Bereich von etwa 0,0001 bis 100 mg/kg, und noch üblicher von 0,01 bis 5 mg/kg des Wirts-Körpergewichts. Zum Beispiel können Dosierungen 1 mg/kg Körpergewicht oder 10 mg/kg Körpergewicht betragen oder innerhalb des Bereichs von 1–10 mg/kg liegen. Ein beispielhaftes Behandlungsschema beinhaltet eine Verabreichung einmal alle zwei Wochen oder einmal monatlich oder einmal alle 3 bis 6 Monate. Bei manchen Verfahren werden zwei oder mehr monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gleichzeitig verabreicht, wobei in diesem Fall die Dosierung jedes verabreichten Antikörpers innerhalb der angegebenen Bereiche liegt. Antikörper wird üblicherweise bei mehreren Anlässen bzw. Sitzungen verabreicht. Die Intervalle zwischen den einzelnen Dosierungen können wöchentlich, monatlich oder jährlich sein. Die Intervalle können auch unregelmäßig sein, wie angezeigt durch Messen von Blutspiegeln des Antikörpers im Patienten. In einigen Verfahren wird die Dosierung angepasst, um eine Plasma-Antikörperkonzentration von 1–1000 µg/ml und bei manchen Verfahren 25–300 µg/ml zu erzielen. Alternativ dazu kann Antikörper als eine Formulierung mit anhaltender Freisetzung verabreicht werden, wobei in diesem Fall weniger häufige Verabreichungen erforderlich sind. Die Dosierung und die Frequenz variieren abhängig von der Halbwertsdauer des Antikörpers im Patienten. Im Allgemeinen zeigen humane Antikörper die längste Halbwertsdauer, gefolgt von humanisierten Antikörpern, chimären Antikörpern und nicht-humanen Antikörpern. Die Dosierung und Frequenz der Verabreichung kann abhängig davon variieren, ob die Behandlung prophylaktisch oder therapeutisch ist. Bei prophylaktischen Anwendungen wird eine relativ niedrige Dosierung bei relativ seltenen Intervallen über eine lange Zeitdauer verabreicht. Einige Patienten empfangen fortgesetzt eine Behandlung für den Rest ihres Lebens. Bei therapeutischen Anwendungen wird manchmal eine relativ hohe Dosierung bei relativ kurzen Intervallen erfordert, bis der Krankheitsfortschritt vermindert oder beendet ist, und vorzugsweise bis der Patient eine teilweise oder vollständige Verbesserung der Krankheitssymptome zeigt. Danach kann dem Patienten ein prophylaktisches Schema verabreicht werden.

[0164] Dosen für Nukleinsäuren, welche Immunogene codieren, liegen im Bereich von etwa 10 ng bis 1 g, 100 ng bis 100 mg, 1 µg bis 10 mg oder 30–300 µg DNA pro Patient. Dosen für infektiöse virale Vektoren variieren von 10–100, oder mehr, Virionen pro Dosis.

Weg der Verabreichung

[0165] Mittel zum Induzieren einer Immunantwort können durch parenterale, topische, intravenöse, orale, subkutane, intraarterielle, intrakraniale, intraperitoneale, intranasale oder intramuskuläre Methoden zur pro-

phylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung verabreicht werden. Der typischste Verabreichungsweg eines immunogenen Agens ist der subkutane Weg, obwohl andere Wege gleichermaßen effektiv sein können. Der nächsthäufigste Weg ist die intramuskuläre Injektion. Dieser Typ von Injektion wird am typischsten in den Arm- oder Beinmuskeln durchgeführt. Bei manchen Methoden werden Agentien direkt in ein jeweiliges Gewebe injiziert, wo sich Ablagerungen angesammelt haben, zum Beispiel intrakranielle Injektion. Eine intramuskuläre Injektion oder intravenöse Infusion werden für die Verabreichung von Antikörper bevorzugt. In manchen Verfahren werden jeweilige therapeutische Antikörper direkt in den Schädel injiziert. Bei manchen Verfahren werden Antikörper als eine Zusammensetzung oder Vorrichtung mit anhaltender Freisetzung, wie eine MedipadTM-Vorrichtung verabreicht.

[0166] Aus der Erfindung abgeleitete Mittel können wahlweise in Kombination mit anderen Mitteln verabreicht werden, welche wenigstens teilweise effektiv zur Behandlung verschiedener Krankheiten sind, einschließlich verschiedener immun-verwandter Krankheiten. Im Fall von Alzheimer- und Down-Syndrom, bei welchen Amyloid-Ablagerungen im Gehirn auftreten, können Mittel der Erfindung auch in Verbindung mit anderen Mitteln verabreicht werden, welche die Passage der Mittel der Erfindung durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB, Blood-Brain Barrier) erhöhen.

Formulierung

[0167] Aus der Erfindung abgeleitete Mittel können als pharmazeutische Zusammensetzungen verabreicht werden, welche ein aktives therapeutisches Mittel, d. h., und eine Vielzahl von anderen pharmazeutisch annehmbaren Bestandteilen umfassen; Siehe Remington's Pharmaceutical Science (15. Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Die bevorzugte Form hängt von der beabsichtigten Verabreichungsweise und therapeutischen Anwendung ab. Die Zusammensetzungen können ebenfalls, abhängig von der gewünschten Formulierung, pharmazeutisch annehmbare nicht-toxische Träger oder Verdünnungsmittel einschließen, welche als Vehikel definiert werden, die üblicherweise zum Formulieren pharmazeutischer Zusammensetzungen zur Verabreichung an Tiere oder Menschen verwendet werden. Das Verdünnungsmittel wird so gewählt, dass es nicht die biologische Aktivität der Kombination beeinflusst. Beispiele derartiger Verdünnungsmittel sind destilliertes Wasser, physiologische Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, Dextrose-Lösung und Hank'sche Lösung. Zusätzlich dazu kann die pharmazeutische Zusammensetzung oder Formulierung auch andere Träger, Hilfsstoffe oder nicht-toxische, nicht-therapeutische, nicht-immunogene Stabilisatoren und dergleichen einschließen.

[0168] Pharmazeutische Zusammensetzungen können auch große, langsam verstoffwechselte Makromoleküle einschließen, wie Proteine, Polysaccharide, wie Chitosan, Polymilchsäuren, Polyglykolsäuren und Copolymere (wie mit Latex funktionalisierte SepharoseTM, Agarose, Zellulose und dergleichen), polymere Aminosäuren, Aminosäure-Copolymere und Lipidaggregate (wie Öltröpfchen oder Liposomen). Zusätzlich dazu können diese Träger als immunstimulierende Agentien (d. h. Adjuvantien) wirken.

[0169] Für die parenterale Verabreichung können aus der Erfindung abgeleitete Agentien als injizierbare Dosierungen einer Lösung oder Suspension der Substanz in einem physiologisch annehmbaren Verdünnungsmittel mit einem pharmazeutischen Träger verabreicht werden, welcher eine sterile Flüssigkeit sein kann, wie Wasser, Öle, Kochsalzlösung, Glycerol oder Ethanol. Darüber hinaus können Hilfssubstanzen, wie Benetzung- oder Emulgiermittel, Tenside, pH-puffernde Substanzen und dergleichen, in den Zusammensetzungen vorhanden sein. Andere Komponenten von pharmazeutischen Zusammensetzungen sind diejenigen von Petroleum, Ölen von tierischem, pflanzlichem oder synthetischem Ursprung, zum Beispiel Erdnussöl, Sojabohnenöl und Mineralöl. Im Allgemeinen sind Glykole, wie Propylenglykol oder Polyethylenglykol, bevorzugte flüssige Träger, insbesondere für injizierbare Lösungen. Antikörper können in der Form einer Depot-Injektion oder Implantat-Präparation verabreicht werden, welche in einer solchen Weise formuliert werden kann, dass eine anhaltende Freisetzung des Wirkstoffs ermöglicht wird. Eine beispielartige Zusammensetzung umfasst monoklonalen Antikörper bei 5 mg/ml, formuliert in einem aus 50 mM L-Histidin, 150 mM NaCl bestehenden wässrigen Puffer, der mit HCl auf pH 6,0 eingestellt ist.

[0170] Typischerweise werden die Zusammensetzungen als injizierbare Formen, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen, hergestellt; feste Formen, die zur Auflösung in oder Suspension in flüssigen Vehikeln vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Die Präparation kann auch in Liposomen oder Mikroteilchen emulgiert oder verkapselt werden, wie Polylactid, Polyglykolid oder Copolymer, für einen gesteigerten Adjuvans-Effekt, wie oben erörtert (siehe Langer, 1990, Science 249:1527 und Hanes, 1997, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97–119). Die aus dieser Erfindung abgeleiteten Mittel können in der Form einer Depot-Injektion oder Implantat-Präparation verabreicht werden, welche in einer solchen Weise for-

muliert werden kann, dass eine anhaltende oder pulsartige Freigabe des Wirkstoffs gestattet wird.

[0171] Zusätzliche Formulierungen, die für andere Verabreichungswege geeignet sind, schließen orale, intranasale und pulmonäre Formulierungen, Suppositorien und transdermale Anwendungen ein.

[0172] Für Suppositorien schließen Bindemittel und Träger beispielsweise Polyalkylenglykole oder Triglyceride ein; solche Suppositorien können aus Mischungen gebildet werden, die den Wirkstoff in einem Bereich von 0,5% bis 10%, vorzugsweise 1%–2% enthalten. Orale Formulierungen schließen Arzneimittelträger ein, wie pharmazeutische Güteklassen von Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose und Magnesiumcarbonat. Diese Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen mit anhaltender Freisetzung oder Pulvern ein und enthalten 10%–95%, vorzugsweise 25%–70% Wirkstoff.

[0173] Eine topische Anwendung kann zu einer transdermalen oder intradermalen Zuführung führen. Die topische Verabreichung kann erleichtert werden durch gemeinsame Verabreichung des Mittels mit Choleratoxin oder detoxifizierten Derivaten oder Untereinheiten davon oder anderen ähnlichen bakteriellen Toxinen (Siehe Glenn et al., 1998, Nature 391:851). Die Co-Verabreichung kann erzielt werden durch Verwenden der Komponenten als Mischung oder als verknüpfte Moleküle, welche durch chemische Vernetzung oder Expression als ein Fusionsprotein erhalten wurden.

[0174] Alternativ dazu kann eine transdermale Zuführung unter Verwendung eines Haut-Flickens bzw. -Pflasters oder unter Verwendung von Transfersomen (Paul et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25, 3521–24; Cevc et al., 1998, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201–15) erreicht werden.

[0175] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden im Allgemeinen als sterile [Zubereitungen], im Wesentlichen isotonisch und in voller Übereinstimmung mit allen "Good Manufacturing Practice(GMP)"-Regulierungen der U. S. Food and Drug Administration formuliert.

Toxizität

[0176] Vorzugsweise wird eine therapeutisch wirksame Dosis der hierin beschriebenen Proteine einen therapeutischen Nutzen bereitstellen, ohne eine wesentliche Toxizität zu verursachen

[0177] Die Toxizität der hierin beschriebenen Proteine kann durch pharmazeutische Standardverfahren in Zellkulturen oder Versuchstieren bestimmt werden, z. B. durch Ermitteln der LD₅₀ (der Dosis, die für 50% der Population letal ist) oder der LD₁₀₀ (der Dosis, die für 100% der Population letal ist). Das Dosisverhältnis zwischen toxischem und therapeutischem Effekt ist der therapeutische Index. Die aus diesen Zellkultur-Assays und Tierversuchen erhaltenen Daten können bei der Formulierung eines Dosierungsbereichs, der zur Verwendung beim Menschen nicht toxisch ist, verwendet werden. Die Dosierung der hierin beschriebenen Proteine liegt vorzugsweise innerhalb eines Bereichs von Kreislauf-Konzentrationen, welche die effektive Dosis mit geringer oder gar keiner Toxizität einschließen. Die Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs abhängig von der verwendeten Dosierungsform und dem angewandten Verabreichungsweg variieren. Die exakte Formulierung, der Verabreichungsweg und die Dosierung können durch den jeweiligen Arzt im Hinblick auf den Zustand des Patienten ausgewählt werden (Siehe z. B. Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Kap. 1, S. 1).

Kits

[0178] Ebenfalls innerhalb des Umfangs der Erfindung liegen Kits, welche die Zusammensetzungen (z. B. monoklonale Antikörper, Antikörper mit humaner Sequenz, humane Antikörper, multispezifische und bispezifische Moleküle), welche von der Erfindung abgeleitet sind, und Gebrauchsanleitungen umfassen. Das Kit kann ferner mindestens ein zusätzliches Reagenz oder einen oder mehrere zusätzliche von der Erfindung abgeleitete humane Antikörper enthalten (z. B. einen humanen Antikörper, der eine komplementäre bzw. ergänzende Aktivität aufweist, welcher an ein Epitop in dem Antigen, das unterschiedlich zum ersten humanen Antikörper ist, bindet). Kits schließen typischerweise ein Etikett ein, welches die beabsichtigte Verwendung des Inhalts des Kits angibt. Der Begriff Etikett schließt jedwede Beschriftung oder aufgezeichnetes Material, die/das auf oder mit dem Kit geliefert wird oder den Kit anderweitig begleitet, ein.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Erzeugung von Mäusen, bei denen auf Cmu angezielt wird

[0179] Konstruktion eines CMD-Targeting-Vektors. Das Plasmid pICEmu enthält ein EcoRI/XhoI-Fragment des murinen Ig-Schwerkette-Locus, überspannend das mu-Gen, welches aus einer genomischen Balb/C-Lambdaphagen-Bibliothek (Marcu et al., 1980, Cell 22:187) erhalten wurde. Dieses genomische Fragment wurde in die XhoI/EcoRI-Stellen des Plasmids pICEMI9H (Marsh et al., 1984, Gene 32:481-485) subkloniert. Die in pICEmu eingeschlossenen Schwerkette-Sequenzen erstrecken sich stromabwärts von der EcoRI-Stelle, welche direkt 3' zum intronischen mu-Enhancer liegt, bis zur XhoI-Stelle, welche ungefähr 1 kb stromabwärts des letzten Transmembran-Exons des mu-Gens lokalisiert ist; allerdings ist ein wesentlicher Teil der mu-Switch-Wiederholungseinheit-Region durch die Passage in *E. coli* deletiert worden.

[0180] Der Targeting-Vektor wurde wie folgend konstruiert (siehe [Fig. 1](#)). Ein 1,3 kb großes HindIII/SmaI-Fragment wurde aus pICEmu herausgeschnitten und in HindIII/SmaI-verdauten pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert. Dieses pICEmu-Fragment reicht von der HindIII-Stelle, welche ungefähr 1 kb 5' von Cmu1 lokalisiert ist, bis zur SmaI-Stelle, welche innerhalb Cmu1 lokalisiert ist. Das resultierende Plasmid wurde mit SmaI/SpeI verdaut, und das ungefähr 4 kb große SmaI/XbaI-Fragment aus pICEmu, welches von der SmaI-Stelle in Cmu1 3' zur XbaI-Stelle, lokalisiert direkt stromabwärts des letzten Cmu-Exons, reicht, wurde inseriert. Das resultierende Plasmid pTAR1 wurde an der SmaI-Stelle linearisiert, und eine neo-Expressionskassette wurde inseriert. Diese Kassette besteht aus dem neo-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des Maus-Phosphoglyceratkinase(pgk)-Promotors (XbaI/TaqI-Fragment; Adra et al., 1987, Gene 60:65-74) und enthält die pgk-Polyadenylierungsstelle (PvuII/HindIII-Fragment; Boer et al., 1990, Biochemical Genetics 28:299-308). Diese Kassette wurde aus dem Plasmid pKJ1 (beschrieben von Tybulewicz et al., 1991, Cell 65:1153-1163) erhalten, aus welcher die neo-Kassette als ein EcoRI/HindIII-Fragment herausgeschnitten und in EcoRI/HindIII-verdauten pGEM-7Zf(+) subkloniert wurde, um pGEM-7 (KJ1) zu erzeugen. Die neo-Kassette wurde aus pGEM-7 (KJ1) durch EcoRI/SalI-Verdau herausgeschnitten, glattendig gemacht und in die SmaI-Stelle des Plasmids pTAR1 subkloniert, in der entgegengesetzten Orientierung zu den genomischen Cmu-Sequenzen. Das resultierende Plasmid wurde mit NotI linearisiert, und eine Kassette mit Thymidinkinase (tk) von Herpes-Simplex-Virus wurde inseriert, um die Anreicherung von ES-Klonen zu gestatten, welche homologe Rekombinanten trugen, wie beschrieben von Mansour et al., 1988, Nature 336:348-352. Diese Kassette besteht aus den codierenden Sequenzen des tk-Gens, eingefasst von Maus-pgk-Promotor und -Polyadenylierungsstelle, wie es von Tybulewicz et al., 1991, Cell 65:1153-1163, beschrieben wird. Der resultierende CMD-Targeting-Vektor enthält insgesamt ungefähr 5,3 kb Homologie zum Schwerkette-Locus und ist entworfen, um ein mutiertes mu-Gen zu erzeugen, in welches eine neo-Expressionskassette in der einmaligen SmaI-Stelle des ersten Cmu-Exons inseriert worden ist. Der Targeting-Vektor wurde mit PvuI linearisiert, welches innerhalb der Plasmidsequenzen schneidet, und zwar vor einer Elektroporation in ES-Zellen.

[0181] Erzeugung und Analyse von Targeting-behandelten bzw. angezielten ES-Zellen. "AB-1"-ES-Zellen (McMahon, A. P., und Bradley, A., 1990, Cell 62:1073-1085) wurden auf mitotisch inaktiven SNL76/7-Zell-Feder-Schichten (ebenda) im Wesentlichen wie beschrieben kultiviert (Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach (E. J. Robertson, Hrsg.) Oxford, IRL Press, S. 71-112). Der linearisierte CMD-Targeting-Vektor wurde in AB-1 Zellen durch die Verfahren elektroporiert, welche von Hasty et al. beschrieben wurden (Hasty, P. R., et al., 1991, Nature 350:243-246).

[0182] Durch Elektroporation behandelte Zellen wurden in 100-mm-Schalen bei einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/Schale ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden G418 (200 Mikrogramm/ml an aktiver Komponente) und FIAU (5×10^{-7} M) dem Medium zugesetzt, und arzneimittelresistente Klone wurden sich über 8-9 Tage lang entwickeln gelassen. Die Klone wurden abgenommen, mit Trypsin behandelt, in zwei Portionen unterteilt und weiter expandiert. Die Hälfte der aus jedem Klon abgeleiteten Zellen wurde dann eingefroren, und die andere Hälfte hinsichtlich homologer Rekombination zwischen Vektor und Zielsequenzen analysiert.

[0183] Eine DNA-Analyse wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. DNA wurde aus den Klonen isoliert, wie beschrieben von Laird et al. (Laird, P. W., et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19:4293). Die isolierte genomische DNA wurde mit SpeI verdaut und mit einem 915 bp großen SacI-Fragment, Sonde A ([Fig. 1](#)), sondiert, welches an eine Sequenz zwischen dem intronischen mu-Enhancer und der mu-Switch-Region hybridisiert. Die Sonde A detektiert ein 9,9 kb großes SpeI-Fragment aus dem Wildtyp-Locus und eine diagnostische 7,6 kb große Bande aus einem mu-Locus, welcher homolog mit dem CMD-Targeting-Vektor rekombiniert hat

(die neo-Expressionskassette enthält eine Spel-Stelle). Von 1132 G418- und FIAU-resistenten Klonen, welche durch Southern-Blot-Analyse gescreent wurden, zeigten drei die 7,6 kb große Spel-Bande, welche auf die homologe Rekombination am mu-Locus hinweist. Diese drei Klone wurden mit BglII, BstXI und EcoRI weiter verdaut, um zu bestätigen, dass der Vektor homolog in das mu-Gen integriert hatte. Wenn mit der Sonde A hybridisiert wurde, produzieren Southern-Blots von Wildtyp-DNA, welche mit BglII, BstXI oder EcoRI verdaut wurde, Fragmente von 15,7, 7,3 bzw. 12,5 kb, wohingegen die Gegenwart eines angezielten bzw. targetierten mu-Allels durch Fragmente von 7,7, 6,6 bzw. 14,3 kb angezeigt wird. Alle drei positiven Klone, die durch den Spel-Verdau detektiert wurden, zeigten die erwarteten BglII-, BstXI- und EcoRI-Restriktionsfragmente, die für die Insertion der neo-Kassette in das Cmul-Exon diagnostisch sind.

[0184] Erzeugung von Mäusen, welche das mutierte mu-Gen tragen. Die drei targetierten ES-Klone, welche als Nummer 264, 272 und 408 bezeichnet werden, wurden aufgetaut und in C57BL/6J-Blastozysten injiziert, wie beschrieben von Bradley (Bradley, A., 1987, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. (Hrsg.: E. J. Robertson) Oxford: IRL Press, S. 113–151). Injektions-behandelte Blastozysten wurden in die Uteri von pseudoschwangeren Weibchen überführt, um chimäre Mäuse herzustellen, welche eine Mischung von Zellen, abgeleitet aus den Eingangs-ES-Zellen und der Wirts-Blastozyste, repräsentierten. Das Ausmaß des ES-Zellen-Beitrags zur Chimäre kann visuell durch das Ausmaß der aus der ES-Zelllinie abgeleiteten Agouti-Fellfärbung auf dem schwarzen C57BL/6J-Hintergrund abgeschätzt werden. Die Klone 272 und 408 erzeugten nur einen niedrigen Prozentsatz an Chimären (d. h. einen niedrigen Prozentsatz an Agouti-Pigmentierung), aber der Klon 264 erzeugte einen hohen Prozentsatz männlicher Chimären. Diese Chimären wurden mit C57BL/6J-Weibchen gekreuzt, und Agouti-Nachkommen wurden erzeugt, was auf die Keimbahnweitergabe des ES-Zellgenoms hinweist. Ein Screening nach dem angezielten mu-Gen wurde durch Southern-Blot-Analyse von BglII-verdauter DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt (wie oben für die Analyse von ES-Zellen-DNA beschrieben wurde). Ungefähr 50% der Agouti-Nachkommen zeigten eine hybridisierende BglII-Bande von 7,7 kb zusätzlich zur Wildtypbande von 15,7 kb, was eine Keimbahnweitergabe des targetierten mu-Gens zeigte.

[0185] Analyse von transgenen Mäusen hinsichtlich funktioneller Inaktivierung des mu-Gens. Um zu bestimmen, ob die Insertion der neo-Kassette in Cmul das Ig-Schwerkette-Gen inaktiviert hat, wurde eine Klon-264-Chimäre mit einer Maus gekreuzt, welche homozygot für die JHD-Mutation war, welche die Schwerkette-Expression als Ergebnis der Deletion der JH-Gensegmente inaktiviert (Chen et al., 1993, *Immunol.* 5: 647–656). Es wurden vier Agouti-Nachkommen erzeugt. Serum wurde aus diesen Tieren bei einem Alter von einem Monat erhalten und mittels ELISA hinsichtlich Vorhandensein von Maus-IgM geassayt. Zwei der vier Nachkommen fehlte IgM vollständig (Tabelle 1). Die Genotypisierung der vier Tiere durch Southern-Blot-Analyse der DNA aus Schwanzbiopsien mittels BglII-Verdau und Hybridisierung mit Sonde A ([Fig. 1](#)) und mittels StuI-Verdau und Hybridisierung mit einem 475 bp großen EcoRI/StuI-Fragment (ebenda) zeigte, dass die Tiere, welche darin versagten, Serum-IgM zu exprimieren, diejenigen sind, in welchen ein Allel des Schwerketten-Locus die JHD-Mutation und das andere Allel die Cmul-Mutation trägt. Für die JHD-Mutation heterozygote Mäuse zeigen Wildtyp-Spiegel von Serum-Ig auf. Diese Daten verdeutlichen, dass die Cmul-Mutation die Expression des mu-Gens inaktiviert.

TABELLE

Maus	Serum-IgM (Mikrogramm/ml)	Genotyp der Ig-H-Kette
42	< 0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 × BL6 F1	153	+/+
JHD	< 0,002	JHD/JHD

[0186] Die Tabelle 1 zeigt die Spiegel an Serum-IgM, nachgewiesen durch ELISA, für Mäuse, welche sowohl die CMD- als auch die JHD-Mutation (CMD/JHD) tragen, für Mäuse, welche hinsichtlich der JHD-Mutation heterozygot sind (+/JHD), für Wildtyp(129Sv × C57BL/6J)F1-Mäuse (+/+) und für B-Zell-defiziente Mäuse, die für die JHD-Mutation homozygot sind (JHD/JHD).

BEISPIEL 2

Das humane Kappa-Leichtkette-Transgen KCo5

[0187] Die Erzeugung der für humane Kappa-Leichtkette transgenischen Mauslinie KCo5-9272 war bereits beschrieben worden [als] KCo5 (Fishwild, D., et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14, 845–851; Beispiel 38 im U.S.-Patent Nr. 5 770 429). Diese Linie wurde durch Coinjektion eines künstlichen humanen Kappa-Leichtkette-Locus und eines YAC-Klons, der multiple humane V-Kappa-Segmente umfasste, erzeugt. Die YAC-Klon-DNA wurde aus einem Hefestamm isoliert, der ein 450 kb großes künstliches Hefechromosom (YAC) enthielt, welches einen Bereich des humanen V-Kappa-Locus umfasste (ICRF YAC-Bibliothek-Bezeichnung 4 × 17E1). Eine DNA-Sequenzanalyse von aus der YAC-DNA amplifizierten V-Gensegmenten zeigte, dass dieser Klon einen wesentlichen Abschnitt der humanen distalen V-Kappa-Region umfasste, einschließlich ungefähr 32 verschiedenen V-Kappa-Segmenten. Die Analyse eines anderen Isolats dieses Klons (Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191:173–181) bestätigte dieses Ergebnis und zeigte auch, dass dieser Klon ein Beispiel des humanen Kappa-Locus-C-Haplotyps repräsentiert, in welchem der 5'-Bereich des distalen V-Clusters der homologen Region des proximalen V-Clusters ähnelt. Somit stehen die 5'-O-Familien-V-Gensegmente hinsichtlich der Sequenz den homologen proximalen Op-Familien-V-Segmenten nahe.

[0188] Um gereinigte YAC-DNA zur Mikroinjektion in Embryo-Pronuklei zu erhalten, wurde gesamte genomische DNA auf Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die Hefezellen, welche YAC 4 × 17E1 enthielten, wurden vor der Lyse in Agarose eingebettet, und YAC-DNA wurde von chromosomaler Hefe-DNA durch Pulsfeld-Gelelektrophorese getrennt, isoliert und in Halbtags-Embryo-Pronuklei mikroinjiziert.

[0189] Eine Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA zeigte, dass das humane VκA10-Gen (Cox, J., et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827–836; Schable, K., & Zachau, H., 1993, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:1001–1022) in das Genom von KCo5-9272-Mäusen eingebaut ist. Eine PCR-Analyse unter Verwendung von Sonden (Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191:173–181), die für die Region 5 von V-Kappa O1 (m217-1, Genbank X76071; AB129, ccacccataaacactgattc (SEQ ID Nr. 4); AB130, ttgatgcacacctaccagggc (SEQ ID Nr. 5)) und die intergenische Region zwischen V-Kappa L24 und L25 (m138-13, Genbank X72824; AB127, cctgccttacagtgtctgtag (SEQ ID Nr. 6); AB128, ggacagcaacaggacatggg (SEQ ID Nr. 7)) spezifisch sind, enthüllte, dass die 5'- und 3'-Regionen des V-Kappa-Clusters aus dem YAC-Klon 4 × 17E1 in der KCo5-9272-Transgen-Integration eingeschlossen sind. Mäuse der Linie KCo5-9272 wurden dann mit hinsichtlich humaner Schwereketten transgenischen, hinsichtlich endogenem Immunglobulin-Locus mutierten Mäusen gekreuzt, wodurch man Mäuse erhält, welche hinsichtlich Disruptionen der endogenen Schwer- und Kappa-Leichtketten-Loci homozygot und hinsichtlich der humanen Schwereketten-Transgene HC2 oder HC07 (U.S.-Patent Nr. 5 770 429) und des humanen Kappa-Leichtkette-Transgens KCo5 hemi- oder homozygot sind. Tiere, welche hinsichtlich Disruptionen der endogenen Schwer- und Kappa-Leichtketten-Loci homozygot und hinsichtlich humaner Schwer- und κ-Leichtketten-Transgene hemi- oder homozygot sind, werden als Doppel-transgene/Doppel-Deletions-Mäuse bezeichnet.

[0190] Die DNA-Sequenzanalyse von cDNA-Klonen, welche direkt aus den Doppeltransgenen/Doppel-Deletions-Mäusen KCo5 oder aus Hybridomen, die aus diesen Tieren erzeugt wurden, abgeleitet wurden, offenbarte die Expression der folgenden V-Kappa-Gene: L6, A27, O12, O4/O14, A10, L15, L18, L19 und L24.

BEISPIEL 3

Kreuzung

[0191] Das den humanen Schwereketten-Locus enthaltende Chromosom-14-Fragment hCF(SC20) und das humane Kappa-Leichtkette-Transgen wurden durch Kreuzen in einen einzigen Stamm kombiniert. Der hCF(SC20)-transgene Mausstamm war homozygot für Inaktivierungsmutationen des endogenen Schwereketten-Locus (CM2D) und der endogenen Kappa-Leichtkette (CKD). Dieser Stamm war ebenfalls homozygot für die λ1(low)-Mutation (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727). Die CM2D-Mutation umfasst eine Deletion eines 3,7 kb großen BamHI-XhoI-Segments, welches einen Teil von Cmu2, Cmu3-Cmu4 und Mmul und Mmu2 abdeckt. Die CKD-Mutation umfasst eine Deletion eines 2kb großen SacII-BglII-Segments, welches das Ckappa-Exon abdeckt. Über beide Mutationen ist früher berichtet worden (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727). Diese Mäuse wurden mit Mäusen gekreuzt, welche homozygot für die KCo5-9272-Human-Kappa-Transgen-Insertion waren und homozygot für die CMD- und JKD-Disruptionen des endogenen Schwereketten- bzw. Kappa-Ketten-Locus waren. Die CMD-Mutation ist im obenstehenden Beispiel 1 beschrieben. Die JKD-Mutation wird im U.S.-Patent Nr. 5 770 429 und in Chen

et al., 1993, EMBO J. 12:821–830, beschrieben. Nachkommen aus diesen Kreuzungen bzw. Paarungen, welche positiv für das hCF(SC20)-Transchromosom sind (SC20/KCo5-Mäuse oder Kreuzungs-Mäuse), sind hemizygot für sechs verschiedene genetische Modifikationen: SC20, KCo5, CMD, CM2D, JKD und CKD. Weil sowohl die CMD- als auch die CM2D-Mutation des endogenen Schwereketten-Locus eine Expression des Maus- μ -Gens verhindern, und sowohl die JKD- als auch CKD-Mutation des endogenen Kappa-Locus eine Expression von Maus-kappa verhindern, sind diese SC20/KCo5-Mäuse jedoch homozygot für Disruptionen von jedem dieser zwei Loci. Deshalb sind die Mäuse für die Expression von Kappa-Leichtkette enthaltenden Antikörpern von den SC20- und KCo5-Transgenen abhängig. Sie können auch Mensch/Maus-Hybridantikörper bilden, weil der endogene Maus-Lambda-Leichtkette-Locus funktional bleibt. Die Mäuse können auch chimäre Mensch/Maus-Antikörper exprimieren, welche die humane Schwereketten-V-Region und Maus-Sequenzen der konstanten Region vom Nicht- μ -Schwereketten-Isotyp umfassen. Diese chimären Antikörper könnten durch chromosomale Translokationen des humanen SC20-IgH-Locus in den Maus-IgH-Locus gebildet werden, welche durch Klassen-Switching vermittelt werden. Das Auftreten solcher "Trans-Switching"-Ereignisse wurde früher in Mäusen festgestellt, welche Mini-Locus-Schwereketten-Transgene enthalten (Taylor, L., et al., 1994, Int. Immunol. 6:579–591). Eine Kreuzung zwischen 40 männlichen KCo5/CMD/JKD-Mäusen und 98 weiblichen hCF(SC20)/CM2D/CKD-Mäusen führte zu 305 Nachkommen. Eine ELISA-Analyse (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727) von Serumproben, welche aus diesen Nachkommen hergestellt wurden, zeigte, dass 125 von 305 (41%) Nachkommen positiv hinsichtlich der Expression von humaner Ig- μ -Kette waren. Eine weitere Analyse unter Nachweis der humanen Ig-k-Kette zeigte, dass alle μ -positiven Individuen ebenfalls k-positiv waren, was auf die Retention des KCo5-Transgens hinweist (siehe Beispiel 2). Die PCR-Analyse von Schwanz-DNAs unter Verwendung der D14S1419- und D14S1420-Primerpaare (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 722–727) zur Detektion des hCF(SC20) zeigte, dass alle μ -positiven Individuen das hCF(SC20) beibehielten und alle μ -negativen Individuen hinsichtlich des hCF(SC20) negativ waren. Die Transmissions-Effizienz des hCF(SC20) aus den weiblichen hCF(SC20)/CM2D/CKD (41%) stand in Übereinstimmung mit den früher berichteten Daten (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727).

BEISPIEL 4

Expression von humanem Ig in den Seren von Kreuzungsmäusen

[0192] Serumproben, welche aus 6–12 Wochen alten Kreuzungsmäusen hergestellt worden waren, wurden durch ELISAs untersucht, um Konzentrationen an humanen Ig- μ -, - γ -, -k- und Maus- λ -Ketten zu bestimmen (Fig. 2). Verglichen mit den für die endogene C μ -Deletion hemizygoten Mäusen, welche unter ähnlichen Bedingungen gehalten wurden, waren die durchschnittlichen Spiegel an humanem Ig- μ und Ig- γ höher als der Maus- μ -Ketten-Spiegel (273 mg/l) bzw. ein Drittel des Maus- γ -Ketten-Spiegels (590 mg/l). Diese Schwereketten-Expressionsspiegel sind ähnlich zu denjenigen von Doppel-Tc/Doppel-KO-Mäusen (hCF(SC20)/hCF(2-W23)/CM2D/CKD, Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727). Man erwartete, dass ein Viertel der F2-Nachkommen, die durch Paarung zwischen männlichen und weiblichen Kreuzungsmäusen erzeugt werden, homozygot für die m λ C1(λ low)-Mutation ist, weil die erste Generation von Kreuzungsmäusen heterozygot für diese Mutation war. Serumkonzentrationen an humanen Ig-k- und Maus-Ig- λ -Leichtketten wurden mittels ELISA in einundzwanzig F2-Kreuzungsmäusen bestimmt, wie es im früheren Bericht beschrieben wurde (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727). Von 21 untersuchten Mäusen zeigten sechs Mäuse ein niedriges (< 0,1) Maus- λ /Human-k-Verhältnis, welches charakteristisch für Mäuse ist, die hinsichtlich der λ low-Mutation homozygot sind (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727). Somit können diese sechs Kreuzungsmäuse homozygot für die λ (low)-Mutation sein, was nützlich für die effiziente Herstellung von Hybridomen sein kann, welche Antikörper sezernieren, die humane Ig-Schwer- und k-Leichtketten umfassen.

BEISPIEL 5

Produktion von humanen monoklonalen Anti-Human-CD4-Antikörpern

[0193] Immunisierung mit Antigen. Kreuzungsmäuse und Doppel-Tc/KO-Mäuse (n = 5) wurden durch subkutane Injektionen mit 100 μ g löslichem humanen CD4 (sCD4) in vollständigem Freund'schem Adjuvans (Sigma) am Tag 0 immunisiert, worauf Immunisierungen in unvollständigem Freund'schem Adjuvans (Sigma) am Tag 9, 19 und 27 folgten. Eine letzte intravenöse Injektion von 40 μ g sCD4 in PBS wurde am Tag 37 gegeben.

[0194] Humorale Antworten in Mäusen. Serum wurde an den Tagen 0, 16, 26, 34 und 40 abgesammelt. Antigen-spezifisches humanes Ig γ und Ig k wurden durch einen "Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

hinsichtlich Produktion von monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen sCD4 gemessen. Ein detailliertes Protokoll für den ELISA wird in Beispiel 4 beschrieben.

[0195] Antigenspezifische Platten wurden mit Antigen bei 1 µg/ml in Bikarbonat-Puffer (Sigma) über Nacht beschichtet. Antigenspezifisches Igγ und Igκ wurden unter Verwendung von einem [der] humanen monoklonalen IgG, spezifisch für Antigen, als Standard quantifiziert. Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#), [Fig. 4](#), [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) gezeigt. Humane Gamma- und Kappa-Antworten wurden 34 Tage nach dem Beginn der Immunisierungen in Kreuzungsmäusen und Doppel-Tc/Doppel-KO-Mäusen beobachtet.

[0196] Erzeugung von Hybridomen. Splenozyten aus immunisierten Mäusen wurden mit Sp2/0-Ag14-Zellen am Tag 40 fusioniert. Die Zellsuspension wurde in 384-Vertiefungsplatten bei zwanzigtausend Splenozyten pro Vertiefung inokuliert. Die resultierenden Hybridome wurden hinsichtlich Produktion von monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen sCD4 gescreent. Die Ergebnisse sind nachstehend in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Produktion von monoklonalen CD4-Antikörpern

	Kreuzung	Doppel-Tc/KO
Anzahl von Vertiefungen mit Kolonien	1265	720
Anzahl von antigenspezifischen hy/hκ-positiven Vertiefungen	18	4
Anzahl von antigen-spezifischen hy/mlλ-positiven Vertiefungen	0	0
Anzahl von subklonierten parental Vertiefungen	14	1
Effizienz der Subklonierung (%)	88	21

[0197] Die parental Hybridome aus der Kreuzungsmaus wurden durch zwei Runden limitierende Verdünnung mit hoher Effizienz subkloniert. Alle Hybridome aus Kreuzungsmaus sezernierten Human γ/Human κ-Anti-CD4-MAbs, und keines der Hybridome sezernierte Human γ/-Maus λ-Anti-CD4-MAbs. Diese Daten zeigten, dass Kreuzungsmaus dem Doppel-Tc/KO-Stamm hinsichtlich der Erzeugung von antigenspezifischen humanen monoklonalen Antikörpern überlegen ist. Der Isotyp der von diesen subklonierten Hybridomen sezernierten MAbs wurde durch eine Anzahl von ELISAs weiter untersucht. Sieben Vertiefungen waren hy1⁺ und 7 Vertiefungen waren hy4⁺.

[0198] Wachstumskurve und Sekretionsspiegel für einen monoklonalen Anti-CD4-Human-IgG₁-Antikörper in Kulturen von kleinem Maßstab. Einer der Hybridomklone, welcher Anti-CD4-Human-IgG₁κ produzierte, (KM2-3), wurde für die Bestimmung der Wachstumskurve und der Sekretionsspiegel für den humanen monoklonalen Antikörper in Kulturen von kleinem Maßstab verwendet. KM2-3-Hybridomzellen wurden in einer 4 Liter großen Spinnerflasche (Bellco) bei 1×10^5 Zellen/ml am Tag 0 angesetzt. Ein Liter ERDF-Medium, das mit ITS-X (Gibco BRL) und 1% Niedrig-IgG-Serum (Hyclone) versehen war, wurde für die Kultur verwendet. Ein ml Medium wurde jeden Tag abgesammelt, und die Zellzahl und die IgG₁κ-Konzentration wurde durch ELISA gemessen, wie in dem früheren Bericht (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727) beschrieben. Die Ergebnisse wurden in [Fig. 7](#) wiedergegeben. Die geschätzte Produktionsrate belief sich auf 24,6 pg/Zelle/Tag, was innerhalb eines Bereichs liegt, ähnlich zu demjenigen, welcher für hervorragende Maus-Hybridome unter diesen Bedingungen erwartet wird.

BEISPIEL 6

Erzeugung von monoklonalen humanen Anti-Human-G-CSF-Antikörpern

[0199] Immunisierung mit Antigen. Kreuzungsmäuse und Doppel-Tc/KO-Mäuse (n = 5) wurden durch subkutane Injektionen mit 100 µg löslichem humanen G-CSF in TiterMaxGold-Adjuvans (CytRx) am Tag 0, 9, 19, 27 immunisiert. Eine letzte intravenöse Injektion von 20 µg G-CSF in PBS wurde an Kreuzungsmaus und Doppel-Tc/KO-Maus am Tag 37 gegeben.

[0200] Humorale Antworten in jedem Mausestamm. Serum wurde an den Tagen 0, 16, 26, 34 und 40 abgenommen. Konzentrationen von antigenspezifischen humanen Igs wurden mittels ELISA quantifiziert. Antigen-spezifische Platten wurden mit Antigen bei 1 µg/ml in Bikarbonat-Puffer (Sigma) über Nacht beschichtet. Antigen-spezifisches Igγ und Igκ wurden unter Verwendung eines humanen monoklonalen IgG, das spezifisch für G-CSF war, als Standard quantifiziert. Die Ergebnisse sind in [Fig. 8](#), [Fig. 9](#), [Fig. 10](#) und [Fig. 11](#) gezeigt. Die Konzentration an antigenspezifischem hy und hk im Serum von Kreuzungsmäusen war etwa 10-fach höher als diejenige von Doppel-Pc/KO-Mäusen.

[0201] Herstellungen von Hybridomen. Splenozyten aus immunisierten Mäusen wurden mit Sp2/0-Ag14-Zellen am Tag 40 fusioniert, und die resultierenden Hybridome wurden mittels ELISA hinsichtlich Produktion von monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen G-CSF gescreent.

[0202] Die Ergebnisse werden nachstehend in der Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Produktion von monoklonalen G-CSF-Antikörpern

	Kreuzung	Doppel-Tc/KO
Anzahl von Vertiefungen mit Kolo-nien	3880	1580
Anzahl von antigenspezifischen hy/hk-positiven Vertiefungen	13	3
Anzahl von antigenspezifischen hy/ml ⁺ -positiven Vertiefungen	13	0
Anzahl von subklonierten paren-talen Vertiefungen	11	2
Effizienz der Subklonierung (%)	83	64

[0203] Die Hälfte der Anti-G-CSF-IgG herstellenden Hybridome sezernierte Humany/Humank-Anti-G-CSF-MAbs, und die restlichen Hybridome sezernierten Humany/Murinλ-Anti-G-CSF-MAbs. Hybridome, welche hy/hk-Antikörper produzierten, wurden durch zwei Runden limitierendes Verdünnen subkloniert. Weitere ELISA-Experimente zeigten, dass 5, 3 bzw. 3 Vertiefungen hy1⁺, hy2⁺ bzw. hy4⁺ waren.

BEISPIEL 7

Erzeugung von monoklonalen humanen Anti-Humanserumalbumin-Antikörpern

[0204] Kreuzungsmäuse wurden durch intraperitoneale Injektionen mit 50 µg Humanserumalbumin in vollständigem Freund'schen Adjuvans (Sigma) am Tag 0 immunisiert, gefolgt von Immunisierung in unvollständigem Freund'schen Adjuvans (Sigma) am Tag 7, 14 und 21.

[0205] Erzeugung von Hybridomen. Splenozyten aus immunisierten Mäusen wurden mit Sp2/0-Ag14-Zellen am Tag 24 fusioniert, und resultierende Hybridome wurden mittels ELISA hinsichtlich der Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen Antigen gescreent. Zehn Vertiefungen von Hybridomen wurden statistisch aus Anti-Albumin-hy produzierenden Hybridomen gewählt und subkloniert. Alle Hybridome sezernierten Humany/Humank-Anti-Albumin.

[0206] Diese Daten weisen darauf hin, dass Kreuzungsmäuse den Doppel-Tc/Doppel-KO-Mäusen hinsichtlich der Produktion von antigenspezifischen vollständig humanen monoklonalen Antikörpern überlegen sind, da zwei Drittel der aus Doppel-Tc(Doppel-KO-Mäusen erhaltenen Anti-Albumin-IgG-Hybridome ml⁺ waren (Tomizuka, K., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722–727).

Erzeugung von monoklonalen Anti-Human-CTLA-4-Antikörpern

[0207] Antigen. Ein DNA-Segment, das ein Fusionsprotein, umfassend Sequenzen aus den humanen CTLA-4- und den murinen CD3 ζ -Genen, codiert, wurde durch PCR-Amplifikation von cDNA-Klonen zusammen mit verbrückenden synthetischen Oligonukleotiden konstruiert. Das codierte Fusionsprotein enthält die folgenden Sequenzen: i.) humanes CTLA-4 codierende Aminosäuren 1–190 (enthaltend das Signalpeptid, die extrazelluläre Domäne von humanem CTLA-4 und die Gesamtheit der vermutlichen Transmembransequenz von humanem CTLA-4), und ii.) murines CD3 ζ von Aminosäure 52 bis zum Carboxyterminus. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in einem Plasmidvektor kloniert, und die DNA-Sequenz wurde ermittelt. Das klonierte Insert wurde dann in den Vektor pBABE subkloniert (welcher ein Gen enthält, das für Puromycin-Resistenz codiert (Morganstern, JP, und Land, H., 1990, Nucl. Acids Res. 18:3587–96)), um pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ zu erzeugen. pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ wurde in die retrovirale Verpackungslinie ψ -2 transfiziert, und ein Pool von Puromycin-resistenten Zellen wurde selektiert. Diese Zellen wurden mit dem murinen T-Zell-Hybridom BW5147 (ATCC #TIB-47) kokultiviert. Nach 2 Tagen Co-Kultur wurden die nicht-adhärenenten BW5147-Zellen entfernt und hinsichtlich Resistenz gegen Puromycin selektiert. Der Puromycin-resistente Zellpool wurde durch limitierende Verdünnung subkloniert und hinsichtlich Oberflächenexpression von humanem CTLA-4 mittels FACS getestet. Ein Klon, welcher hohe Spiegel an humanem CTLA-4 an der Zelloberfläche exprimierte, wurde selektiert (BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12). Lösliches rekombinantes Antigen, das die extrazelluläre Domäne von humanem CTLA-4 umfasst, wurde von R&D Systems (Kat.-Nr. 325-CT-200) erworben.

[0208] Immunisierung. Drei SC20/KCo5-Kreuzungsmäuse (ID#s 22227, 22230 und 22231) wurden jeweils durch intraperitoneale (i. p.) Injektion von 10^7 bzw. 10^6 gewaschenen vollständigen BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12-Zellen, welche die extrazelluläre Domäne von humanem CTLA-4 exprimieren, immunisiert. Dieses Immunisierungsvorgehen wurde zwei weitere Male mit Intervallen von ungefähr einem Monat für die Mäuse #22227 und 22230 wiederholt. Beim Monat 3 wurde der Maus #22231 eine dritte i. p. Injektion von gewaschenen Gesamt-Zellen gegeben, während den Mäusen #22227 und 22230 jeweils i. p. und subkutan (s. c.) 20 Mikrogramm lösliches rekombinantes Antigen in MPL+TDM-Adjuvans (Sigma Cat. # M6536) injiziert wurde. Die Mäuse wurden dann 10 Tage lang ruhen gelassen, und danach, zwei Tage vor dem Ernten der Milzzellen für die Hybridomfusion, erhielten die Mäuse #22227 und 22230 jeweils (i. v.) Schwanzvenen-Injektionen von 20 Mikrogramm löslichem rekombinanten Antigen zusammen mit i. p.-Injektionen von 20 Mikrogramm löslichem rekombinanten Antigen in MPL+TDM-Adjuvans. Einen Tag vor dem Ernten von Splenozyten gab man diesen Mäusen eine zusätzliche i. v.-Injektion von 20 Mikrogramm löslichem rekombinanten Antigen. Der Maus #22231 wurden 10^6 gewaschene BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12-Zellen in MPL+TDM-Adjuvans i. p. drei Tage vor dem Ernten der Milzzellen verabreicht, gefolgt von 10^7 gewaschenen BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12-Zellen ohne Adjuvans i. p. zwei Tage vor der Fusion.

[0209] Fusion. Milzzellen aus den Mäusen #22227, 22230 und 22231 wurden, in drei separaten Experimenten, mit Maus-Myelomzellen (Linie P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL 1580, oder SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581) durch Standardverfahren fusioniert (Harlow und Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennet et al., 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum New York; Oi und Herzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, Hrsg.: Mishell und Shiigi, S. 357–372. Freeman, San Francisco; Halk, 1984, Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, Hrsg.: Weissbach und Weissbach, S. 766–780, Academic Press, Orlando, FL.) Die Zellen wurden in DMEM, 10% FBS, OPI (Sigma 0-5003), BME (Gibco 21985-023) und 3% Origen "Hybridoma Cloning Factor" (Igen 1G50-0615) kultiviert. HAT- oder HT-Ergänzung wurde dem Medium während dem anfänglichen Wachstum und der Selektion zugegeben.

[0210] Hybridom-Screening. Um Hybridome zu identifizieren, welche mit Antigen reagierende humane IgG-Antikörper sezernieren, wurden ELISA-Platten (Nunc MaxiSorp) über Nacht bei 4°C mit 100 μ l/Vertiefung humaner CD152 Mu-Ig-Fusion (Ancel #501–820) bei 0,2 μ g/ml in PBS beschichtet. Die Platten wurden gewaschen und mit 100 μ l/Vertiefung PBS-Tween blockiert, welches 1% BSA enthält. Fünfzig μ l Zellkultur-Überstand wurden zugesetzt, woran sich eine Inkubation während 1–2 Stunden anschloss. Die Platten wurden gewaschen und dann eine Stunde lang mit 100 μ l/Vertiefung Ziege-Anti-Mensch-Gamma-Schwerkette, welches an alkalische Phosphatase konjugiert war, (Anti-Human-Gamma(fc)-AP, Jackson #109-056-098), inkubiert. Die Platten wurden dreimal in PBS-Tween zwischen jedem Schritt gewaschen. Sechszehn Hybridome wurden identifiziert, welche gamma-positiven, antigenreaktiven Antikörper sezernierten. Diese Klone wurden dann weiter analysiert, um den Gamma-Schwerkette- oder Leichtkette-Isotyp zu bestimmen, sowie die Gegenwart

von kontaminierenden IgM-sezernierenden Zellen (Tabelle 3).

Tabelle 3

Analyse von Schwerkette-Isotypen aus 1°-Hybridom-Vertiefungen, welche antigenreaktive humane IgG-Antikörper umfassen.

Maus-ID #	IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	Igκ	Igλ	Alle IgG
22227	0	4	1	0	3	7	0	8
22230	9	25	8	5	7	48	6	45
22231	1	11	2	3	7	23	1	23
insgesamt	10	40	11	8	17	75	7	76

Hybridom-Überstände wurden zuerst hinsichtlich des Vorhandenseins von antigenreaktivem humanen IgG getestet. Sechundsiebzig positive Überstände wurden dann hinsichtlich antigenreaktiven humanen IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, Igκ und Maus-Igλ getestet. Einfangreagenz: humane CD152-mu-Ig-Fusion (Ancel #501-820). Nachweisreagenzien: Anti-Human-Gamma(fc)-HRP (Jackson # 109-036-098); Anti-Human-Kappa-HRP (Bethyl # A80-115P); Anti-Human-Gamma 1-HRP (Southern Biotech #9050-05); Anti-Human-Gamma 2-HRP (Southern Biotech #9070-05); Anti-Human-Gamma 3-HRP (Southern Biotech #9210-05); Anti-Human-Gamma 4-HRP (Southern Biotech #9200-05); Anti-Humanmu-HRP (Southern Biotech #1060-05).

[0211] Fünfundsiebzig der 76 IgG-antigen-positiven Vertiefungen waren auch positiv für antigenreaktiven humanen Kappa-Leichtkette-Antikörper, während 7 der Vertiefungen positiv für Maus-Lambda enthaltenden Hybridantikörper waren. Allerdings enthielten 6 der 7 lambda-positiven Vertiefungen auch Kappa-Leichtkette, und 3 von diesen drei Vertiefungen waren positiv für kontaminierenden antigen-reaktiven IgM-Antikörper. Weil diese kontaminierenden IgM-Antikörper, [welche] beigetragen haben können, die Lambda-Leichtkette einschließen, gibt es zwischen 3 und 7 IgGλ-Klone aus der Gesamtheit von 76 IgG-Klonen. Somit scheint das endogene Maus-Lambda nur zu 4 bis 9% der antigenreaktiven, IgG-positiven Hybridome beizutragen. Zellen aus 22 der 76 positiven Hybridomvertiefungen wurden dann erneut bei limitierender Verdünnung plattiert, um einzelne Hybridome, welche monoklonalen Antikörper sezernieren, zu subklonieren. Stabile antigenreaktive humane IgG-Subklone wurden von 19 aus 22 der 1°-Hybridome erhalten (siehe nachstehende Tabelle 4).

Tabelle 4

Subklonierung von Anti-CTLA-4-Hybridomen

Klon	OD	Anz. getestete Klone	Anz. Positiv	% Positiv
4C1	0,44	24	5	21%
2E4	1,48	24	9	38%
1H5	1,39	24	14	58%
9C4	1,30	24	5	21%
6D11	3,24	16	10	63%
10H3	1,59	16	2	13%
8H4	3,14	16	7	44%
8G5	1,38	8	3	38%
4A9	1,35	24	20	83%
10E1	1,17	24	3	13%
9F6	1,08	24	0	0%
6B9	1,16	16	5	31%
9B10	2,70	32	9	28%
10D1	0,90	48	6	13%
1B6	1,34	24	9	38%
4C7	1,34	8	2	25%
1D11	0,97	8	0	0%
1B5	2,75	8	3	38%
4E9	1,36	24	1	4%
11H7	0,40	16	0	0%
2D8	1,31	24	10	42%
8F2	1,28	16	5	31%

[0212] Somit wurde eine 86%-ige Subklonierungseffizienz erhalten. Beim Subklonieren wurde es festgestellt, dass eines der 1°-Hybridome 2 getrennte Klone umfasste, welche unterschiedliche IgG-Isotypen aufwiesen (siehe nachstehende Tabelle 5).

Tabelle 5

Isotyp-Analyse von humanen IgG κ -Anti-CTLA-4-Subklonen

Maus	Klon	Eltern-Vertiefungl	IgG $_1\kappa$	IgG $_2\kappa$	IgG $_3\kappa$	IgG $_4\kappa$
22227	8G5	IgG $_1\kappa$	+			-
22227	6B9	IgG $_1\kappa$	+			-
22230	1B5	IgG $_3\kappa$			+	-
22230	2D8	IgG $_1\kappa$	+		-	
22230	6D11	IgG $_4\kappa$				+
22230	8H4	IgG $_4\kappa$				+
22230	9C4	IgG $_3\kappa$			+	-
22230	10H3	IgG $_3\kappa$			+	-
22231	1B6	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	1H5	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	2E4	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	4A9	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	4C 1.1	IgG $_4\kappa$				+
22231	9B10	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	4C7	IgG $_3\kappa$			+	-
22231	10D1.1	IgG $_1\kappa$, IgG $_4\kappa$	+			-
22231	10D1.4	IgG $_1\kappa$, IgG $_4\kappa$				+
22231	10E1	IgG $_4\kappa$				+
22231	8F2	IgG $_1\kappa$	+			-
22231	4E9	IgG $_1\kappa$	+			

[0213] Somit wurden 20 unterschiedliche Subklone erhalten. Alle 20 Klone verwenden die humane κ -Leichtkette und sind vollständig menschlich.

[0214] Monoklonale Antikörper wurden aus fünf der subklonierten Hybridome (1H5, 4A9, 4C1, 8H4 und 10E1) isoliert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, CTLA-4-Bindung an B7.2 zu blockieren ([Fig. 12](#) und [Fig. 13](#)).

[0215] Kurz gefasst, wurde eine ELISA-Platte mit einem B7.2-Ig-Fusionsprotein bei 0,7 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl /Vertiefung) beschichtet (siehe WO 01/14424, welche hierin in ihrer Gesamtheit für alle Zwecke durch den Bezug darauf einbezogen wird). Die Platte wurde gewaschen und in PBS-T + 1% BSA während 30 Minuten blockiert. Antikörper wurde mit einem gleichen Volumen an Biotinmarkiertem CTLA-4-Ig (Ancell #501-030) bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$ gemischt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur vorinkubiert, dann auf die B7.2-beschichtete ELISA-Platte überführt und eine Stunde lang inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und 100 μl /Vertiefung Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (Kirkegaard and Perry Labs 15-30-0) wurde zugesetzt und eine Stunde lang inkubiert. Die Platten wurden mit pnpp-Substrat entwickelt. Die Inhibition der Bindung von Biotinmarkiertem CTLA-4 an B7.2 ist als Antikörperkonzentration gegen die Extinktion bzw. Absorption bei 405 nm aufgetragen. Der Antikörper 10D1 ist ein CTLA-4-spezifisches humanes IgG $_1$ (siehe WO 01/14424). Die Antikörperisotypen sind 1H5.1 (γ_1), 4A9.1 (γ_1), 4C1.1 (γ_4), 8H4.4 (γ_4), 10E1.1(γ_4) und 10D1 (γ_1).

[0216] Von zwei der Antikörper (1H5 und 4A9) wurde festgestellt, blockierende Antikörper zu sein, und von dreien (4C1, 8H4 und 10E1) wurde gefunden, nicht-blockierende Antikörper zu sein ([Fig. 12](#) und [Fig. 13](#)).

[0217] Die Verabreichung von Anti-CTLA-4 kann die T-Zell-vermittelten Immunantworten erhöhen (Krummel, 1995, J. Exp. Med. 182:459–465; Krummel et al., 1996, Int'l Immunol. 8:519–523). Daher können CTLA-4-Antikörper als Adjuvans verwendet werden, um die Immunogenität eines anderen Agens zu erhöhen. Wenn Antikörper gegen CTLA-4 zusammen mit einem anderen Agens verabreicht werden, können die zwei in jeder Rei-

henfolge oder gleichzeitig verabreicht werden. Die Verfahren können für eine Vielzahl von Impfstoffen und Behandlungen angewandt werden, für welche erhöhte Immunantworten vorteilhaft sind; zum Beispiel infektiöse Krankheiten und Krebsarten, einschließlich Melanom, Dickdarmkrebs, Prostatakrebs und Nierenkrebs.

[0218] CTLA-4-Antikörper können auch verwendet werden, um eine T-Zell-vermittelte Immunantwort herunter zu modulieren. Diese Aktivität kann mit mehrwertigen Präparationen von Anti-CTLA-4-Antikörper erhalten werden. Zum Beispiel können Latex-Mikrokugeln, beschichtet mit Anti-CTLA-4 (zur Erhöhung der Wertigkeit des Antikörpers), T-Zell-Proliferation und -Aktivierung inhibieren. Mittel, welche dieselbe Antikörper-Kombinierungsstelle aufweisen, können als ein CTLA-4-Antagonist wirken, wenn sie als ein Fab oder ein lösliches IgG präsentiert werden, und als ein CTLA-4-Agonist wirken, wenn sie in hohem Maße vernetzt sind. Somit können mehrwertige Formen von Anti-CTLA-4-Antikörpern nützliche therapeutische Mittel zur Immunsuppression sein.

[0219] Zusätzlich zur Verknüpfung an Latex-Mikrokugeln oder andere unlösliche Teilchen können die Antikörper miteinander vernetzt oder gentechnisch manipuliert werden, um Multimere zu bilden. Die Vernetzung kann durch direkte chemische Verknüpfung oder durch indirekte Verknüpfung, wie einen Antikörper-Biotin-Avidin-Komplex, erfolgen. Die Vernetzung kann kovalent sein, wobei chemische Verknüpfungsgruppen verwendet werden, oder nicht-kovalent, wobei Protein-Protein- oder sonstige Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendet werden. Gentechnische Vorgehensweisen zur Verknüpfung schließen z. B. die Re-Expression der variablen Regionen von Hochaffinitäts-IgG-Antikörpern in IgM-Expressionsvektoren oder eine beliebige Proteineinheit (z. B. Polylysin und dergleichen) ein. Das Umwandeln eines Hochaffinitäts-IgG-Antikörpers in einen IgM-Antikörper kann einen zehnwertigen Komplex mit sehr hoher Bindungsfreudigkeit erzeugen. IgA₂-Expressionsvektoren können ebenfalls verwendet werden, um mehrwertige Antikörperkomplexe herzustellen. IgA₂ kann Polymere gemeinsam mit J-Kette und sekretorischer Komponente bilden. IgA₂ kann den zusätzlichen Vorteil aufweisen, dass es ferner durch den IgA-Rezeptor CD89 vernetzt werden kann, welcher auf Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Weil ungefähr 2% der Hybridome, die aus den C20/KCo5-Kreuzungsmäusen erzeugt werden, IgA sind, können diese Tiere alternativ dazu verwendet werden, um einen humanen IgA-Isotyp-Anti-CTLA-4-Antikörper direkt zu erzeugen.

[0220] Ein Agonismus kann auch unter Anwendung einiger Präparationen von polyklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 umfassende Antikörper gegen mindestens zwei nicht-überlappende Epitope auf CTLA-4 erhalten werden. Ein Antikörper in einer solchen Präparation, enthaltend zwei Bindungsstellen, kann an zwei Moleküle CTLA-4 binden, um einen kleinen Cluster zu bilden. Ein zweiter Antikörper, der unterschiedliche Bindungsstellen besitzt, kann dann diese kleinen Cluster verknüpfen (aggregieren), um große Cluster zu bilden, wodurch ein Komplex von CTLA-4 (auf der Zelloberfläche) gebildet wird, der ein Signal zu der T-Zelle transduzieren kann, um Aktivierung der T-Zelle, welche CTLA-4 trägt (exprimiert), zu inhibieren, zu verringern oder zu verhindern. Somit zeigen manche Präparationen von polyklonalen Antikörpern einen ähnlichen Agonismus zu den oben beschriebenen mehrwertigen Präparationen.

[0221] Deshalb sind mehrwertige oder polyklonale Präparationen von Anti-CTLA-4-Antikörpern nützlich zum Agonisieren des CTLA-4-Rezeptors, wodurch die Immunantworten unterdrückt werden, die ansonsten durch T-Zellen, welche den CTLA-4-Rezeptor tragen, vermittelt werden. Einige Beispiele von Krankheiten, welche unter Verwendung derartiger mehrwertiger oder polyklonaler Präparationen von Antikörpern behandelt werden können, schließen Autoimmunkrankheit, Transplantat-Abstoßung und Entzündung ein.

BEISPIEL 9

Erzeugung von Anti-Human-EGFR-Antikörpern

[0222] Antigen. Gereinigter löslicher Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) aus humanen Karzinom-A431-Zellen wurde von Sigma Chemical Co. (E3641) erhalten. Die humane Karzinom-A431-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC CRL-1555) erhalten. Ribimol-MPL+TDM-Adjuvans wurde von Sigma Chemical Co. (M-6536) erhalten.

[0223] Immunisierung. Zwei SC20/KCo5-Kreuzungsmäuse (ID#s 22232 und 22239) wurden jeweils durch intraperitoneale (i. p.) Injektion von 10⁷ gewaschenen ganzen humanen Karzinom-A431-Zellen immunisiert. Dieses Immunisierungsvorgehen wurde einen Monat später in beiden Mäusen wiederholt. Bei Monat 4 wurde die Maus 22239 mit 25 µg löslichem EGFR in MPL+TDM-Adjuvans i. p. immunisiert; elf Tage ruhen gelassen, und erhielt dann eine Injektion mit 10 µg EGFR in PBS i. v. plus 10 µg EGFR i. p. in MPL+TDM-Adjuvans. Zwei Tage später erhielt die Maus 22239 weitere 10 µg EGFR in PBS i. v., und am folgenden Tag wurden Spleno-

zyten aus der Maus 22239 für die Fusion abgeerntet. Im Anschluss an die ersten zwei Injektionen mit A431-Zellen wurde die Maus 22232 drei Monate lang ruhen gelassen, und erhielt dann eine i. p.-Injektion mit 10^7 A431-Zellen, welche mit MPL+TDM-Adjuvans vermischt waren. Vier Tage später wurden Milzzellen aus der Maus 22232 für die Fusion abgeerntet.

[0224] Fusion. Milzzellen aus der Maus #22232 und 22239 wurden, in zwei separaten Experimenten, mit entweder der Myelom-Zelllinie P3 X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580; Maus #22239) oder SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581; Maus #22232) fusioniert. Die Fusionen wurden durch im Beispiel 8 dargestellte Standardvorgehensweisen durchgeführt.

[0225] Hybridom-Screening. Die Screening-Vorgehensweisen für EGFR-Hybridome waren ähnlich zu denjenigen, welche für das CTLA-4 im Beispiel 8 verwendet wurden. ELISA-Platten (Nunc MaxiSorp) wurden über Nacht mit 100 μ l pro Vertiefung löslichem EGFR-Antigen bei 1 μ g/ml in PBS beschichtet. Die Platten wurden gewaschen und mit 100 μ l/Vertiefung PBS-Tween, welches 1% BSA enthielt, blockiert. Fünfzig μ l Zellkulturüberstand wurden zugegeben, woran sich eine Inkubation während 1–2 Stunden anschloss. Die Platten wurden gewaschen und dann eine Stunde lang mit 100 μ l/Vertiefung an Ziege-Anti-Human-Gamma-Schwerkette, konjugiert an alkalische Phosphatase (Anti-human gamma (fc) AP; Jackson # 109-056-098), inkubiert. Die Platten wurden dreimal in PBS-Tween zwischen jedem Schritt gewaschen. Fünf und zwei Hybridome, welche Human-IgGk-Anti-EGFR-spezifische Antikörper sezernierten, wurden aus den Maus 22232- bzw. Maus 22239-Fusionen subkloniert. Die Isotypanalyse der schweren und leichten Ketten der EGFR-spezifischen Antikörper schloss vier IgG₁κ-, einen IgG₂κ- und einen IgG₄κ-Antikörper ein.

BEISPIEL 10

Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für gereinigte monoklonale humane IgGk-Antikörper

[0226] Die Hybridome wurden in eRDF kultiviert, welches 1% fötales Rinderserum (IgG-arm) enthielt. Humane MAbs wurden unter Verwendung einer Protein-G-Säule gereinigt. Die Geschwindigkeits-Gleichgewichts-Assoziationskonstanten der gereinigten MAbs für G-CSF und lösliches CD4 wurden unter Verwendung eines BIAcore2000-Instruments bestimmt. Humaner G-CSF (120 RU) oder CD4:Fc (1600 RU) wurde durch kovalente Kopplung über Amingruppen an die Oberfläche des Sensorchips eines BIAcore2000 (BIAcore) gemäß den Anweisungen des Herstellers immobilisiert. Der monoklonale Antikörper wurde über die Antigene strömen gelassen. Der Chip wurde mit Glycin-HCl-Puffer (pH 1,5) oder 4 M MgCl₂ regeneriert, um jedweden restlichen Anti-Human-G-CSF-MAb bzw. Anti-CD4-MAb zu entfernen. Dieser Zyklus wurde wiederholt, wobei (eine) unterschiedliche Konzentration(en) an MAb verwendet wurde(n). Die Bindung an und die Dissoziation von dem Antigen wurden unter Einsatz der Software BIAevaluation 3.0 ermittelt. Der K_a wurde durch Dividieren der k_{assoc} durch die k_{dissoc} berechnet. Wie in der nachstehenden Tabelle 6 gezeigt wird, sind diese Werte mit denjenigen vergleichbar, welche für den murinen Anti-Human-G-CSF-MAb, Klon 3316.111 (R&D), oder den murinen Anti-CD4-MAb, Leu3a (Pharmingen), erhalten wurden.

Tabelle 6

Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für gereinigte humane IgGk- MAbs

MAb	Subklasse	Maus	Antigen	$k_{\text{assoc}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_{\text{dissoc}}(\text{s}^{-1})$	$K_a(\text{M}^{-1})$
#4	IgG ₁	Doppel-Tc/KO	G-CSF	$4,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^9$
#5	IgG ₁	Doppel-Tc/KO	G-CSF	$5,9 \times 10^6$	$5,8 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{10}$
#11	IgG ₄	Kreuzung	G-CSF	$4,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^9$
#21	IgG ₁	Kreuzung	G-CSF	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^8$
#27	IgG ₂	Kreuzung	G-CSF	$1,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^8$
#23	IgG ₁	Kreuzung	CD4	$7,6 \times 10^5$	$5,7 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{10}$
3316.111	Maus	Wildtyp	G-CSF	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^9$
Leu3a	Maus	Wildtyp	CD4	$2,2 \times 10^5$	$7,1 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{10}$

Erzeugung von Kreuzungs(Fc)-Mäusen

[0227] Es ist allgemein bekannt, dass die immunologische Toleranz eine Reaktivität gegen Selbst-Antigene vermeidet, wobei üblicherweise die Produktion von monoklonalen Maus-Antikörpern gegen Fremdartigene verhindert wird, deren Aminosäuresequenzen ähnlich oder identisch zu denjenigen von murinen Gegenstücken sind. Monoklonale Maus-Antikörper, welche an gemeinsame Epitope zwischen humanen Antigenen und ihren murinen Gegenstücken binden, können nützlich sein, weil die Aminosäuresequenzen in der aktiven Stelle von Proteinantigenen dazu neigen, gut konserviert zu sein. Im Allgemeinen kann jedweder Effekt, der durch die In-vivo-Verabreichung dieser Antikörper herbeigeführt wird, in Maus-Modellen leicht untersucht werden. Es ist jedoch auch schwierig gewesen, monoklonale Maus-Antikörper gegen solche gemeinsamen Epitope zu erhalten. Wie oben beschrieben, können die Kreuzungsmäuse der vorliegenden Erfindung zum Erhalten monoklonaler humaner Antikörper gegen verschiedene humane Antigene verwendet werden. Unter gewissen Umständen kann es jedoch schwierig sein, humane monoklonale Antikörper zu erhalten, welche die Fähigkeit aufweisen, an gut konservierte humane Antigene zu binden, oder welche eine Kreuzreaktion mit murinen Gegenstücken aufweisen. Daher werden, in einem anderen Aspekt der Erfindung, zusätzliche Kreuzungsmäuse der Erfindung bereitgestellt, in welchen ein Fcγ-Rezeptor-IIb inaktiviert worden ist. Diese Mäuse, welche hierin als Kreuzungs(Fc)-Mäuse bezeichnet werden, gestatten die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern, welche an gutkonservierte Antigene binden oder welche mit ihren murinen Gegenstücken kreuzreagieren. Biochemische und genetische Untersuchungen zeigen, dass der TypIIb-Niederaffinitäts-Rezeptor für Immunglobulin(Ig)G (FcγRIIB) die zelluläre Aktivierung inhibiert, welche durch Antikörper oder Immunkomplexe ausgelöst wird, und eine wichtige Komponente bei der Verhinderung des Auftretens von Autoimmunität sein kann (Takai, T., et al., 1996, Nature 379:346–349). Hinsichtlich des FcγRIIB, dem inhibitorischen Fc-Rezeptor, defiziente Tiere weisen generalisierte gesteigerte Antikörper-Antworten und eine erhöhte Entzündung in allen Antikörper-vermittelten Klassen von Hypersensitivitätsreaktionen auf (Takai, T., et al., 1996, Nature 379:346–349). Zum Beispiel zeigten die mutanten Mäuse, welche mit Rinder-Kollagen-Typ IV (C-IV) immunisiert wurden, aber nicht Wildtyp-Mäuse, erhöhte Autoantikörper-Antworten gegen C-IV aus der Maus (Nakamura, A., et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899–905). Es gab jedoch keinen Bericht, welcher untersuchte, ob FcγRIIB-Mutanten-Mäuse für eine effiziente Produktion von autoreaktiven monoklonalen Antikörpern verwendet werden könnten. Darüber hinaus gab es keinen Bericht, welcher eine effiziente Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern, die sowohl an humane Antigene als auch murine Gegenstücke binden, in Mäusen zeigt.

[0228] Wie nachstehend beschrieben, wurde die FcγRIIB-Mutation in Kreuzungsmäuse der Erfindung eingekreuzt. Die Immunisierung der resultierenden Kreuzungs(Fc)-Mäuse mit Rinder-C-IV rief Human-Antikörper-Antworten sowohl gegen bovines als auch murines C-IV hervor. Hybridome, welche humane monoklonale Antikörper sezernieren, die sowohl an bovines als auch murines C-IV binden, können ebenfalls erzeugt werden. Deshalb gestatten die Kreuzungs(Fc)-Mäuse die Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern, welche sowohl die eingepfunden Fremdartigene als auch ihre murinen Gegenstücke binden können. Die Kreuzungs(Fc)-Mäuse können auch nützlich zum Erhalten von humanen monoklonalen Antikörpern gegen gut-konservierte Antigene sein. Mäuse, welche für den FcγRIIB-Knockout homozygot sind (Fc(–/–)) (Takai, T., et al., 1996, Nature 379:346–349) wurden von Dr. Toshifumi Takai (Tohoku University, JAPAN) bereitgestellt. Die männlichen Fc(–/–)-Mäuse wurden mit weiblichen Kreuzungsmäusen (wie beschrieben im Beispiel 3) gepaart. Die Beibehaltung des KCo5-Transgens und von hCF(SC20) in jedem F1-Individuum wurde durch ELISAs und PCRs, wie beschrieben in Beispiel 3, untersucht. Genotypen des FcγRIIB-Knockout wurden mittels PCR-Analyse unter Verwendung der drei Primer, wie folgend, bestimmt:

neo, 5'-CTCGTGCTTTACGGTATCGCC (SEQ ID Nr.:8);

5'EC1, 5'-AAACTCGACCCCCCGTGGATC (SEQ ID Nr.:9); und

3'EC1, 5'-TTGACTGTGGCCTTAAACGTGTAG (SEQ ID Nr.:10).

[0229] Genomische DNA-Proben, die man aus einer Schwanzbiopsie herstellte, wurden einer PCR unter Verwendung von AmpliTaq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) unterzogen. In der Standard-Reaktionsmischung, welche die oben genannten drei Primer (jeweils 0,5 pM) enthielt, wurden die Proben während 35 Zyklen amplifiziert: 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 62°C, 30 sec bei 72°C (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer). Die Bandengröße, welche von dem Wildtyp-Allel bzw. dem homozygoten Allel erhalten wird, beläuft sich auf 161 bp bzw. 232 bp. Das F1-Männchen, dessen Genotyp KCo5/CMD oder CM2D(–/+)/CKD oder JKD (–/+)/Fc (–/+) ist, und das Weibchen, dessen Genotyp hCF(SC20)/KCo5/CMD oder CM2D(–/+)/CKD oder JKD (–/+)/Fc (–/+) ist, wurden ausgewählt und für die weitere Züchtung verwendet. Schließlich wurden Mäuse (Kreuzungs(Fc)) erhalten, deren Genotyp hCF(SC20)/KCo5/CMD oder CM2D(–/–)/CKD oder JKD(–/–)/Fc(–/–) ist. Es wurde be-

stätigt, dass die Serum-Expressionsspiegel von humanem Ig- μ und - κ in den Kreuzungs(Fc)-Mäusen vergleichbar zu denjenigen in Kreuzungsmäusen (siehe Beispiel 4) waren.

BEISPIEL 12

Erzeugung von humanen monoklonalen Anti-Maus-Typ IV-Kollagen-Antikörpern

[0230] Immunisierung von Antigen. Rinder-C-IV (Cellmatrix IV) wurde von Nitta Gellatin, Inc. erhalten. Die C-IV-Lösung (3,0 mg/ml in 1 mM HCl, pH 3,0) wurde durch Zugabe von 1 mM NaOH (Endkonzentration) neutralisiert, vor dem Emulgieren mit Freund'schem Adjuvans. Kreuzungsmäuse und Kreuzungs(Fc)-Mäuse wurden an der Schwanzwurzel mit 150 μ g C-IV immunisiert, das in CFA mit Mycobacterium tuberculosis-Stamm H₃₇Rv (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) emulgiert war. Die Mäuse wurden an der gleichen Stelle mit 150 μ g C-IV plus IFA (Wako Pure Chemical industries, Ltd.) 26 und 48 Tage später geboostert (Nakamura, A., et al., 2000, J. Exp. Med. 191:899–905).

[0231] Humorale Antworten in Mäusen. Serum wurde am Tag 58 abgenommen. Antigen-reaktives humanes IgY im Serum wurde gemessen durch ELISAs, wie beschrieben, mit Modifikation (Nakamura, A., et al., 2000, J. Exp. Med. 191:899–905). Antikörper gegen Rinder-C-IV wurden in einem 96-Vertiefungs-Mikroplatten-Assay (Nunc, MaxiSorp), bei welchem die Vertiefungen mit 50 μ l/Vertiefung einer 20- μ g/ml-Lösung von Rinder-C-IV in PBS beschichtet waren, bei 4 Grad über Nacht nachgewiesen. Antikörper gegen C-IV aus der Maus wurden durch die Verwendung des BIOCOAT-"Cellware"-Maus-C-IV-96-Vertiefungs-Platten-Assays (Becton Dickinson Labware) nachgewiesen. Das verdünnte Serum (1:20–1280) wurde bei 50 μ l/Vertiefung zugesetzt und bei 4 Grad über Nacht reagieren gelassen. Die Vertiefungen wurden gewaschen, und an Meerrettichperoxidase gekoppeltes Ziege-Anti-Mensch-IgG(Fc), (Sigma, A0170), wurde bei 4 Grad während 2 Stunden [inkubiert], gewaschen und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang mit 50 μ l TMB-Substrat (Sumitomo Bakelite, ML-1120T) entwickelt. Die OD bei 450 nm wurde unter Verwendung eines Mikroplatten-Lesegeräts (Arvo, Wallac Berthold Japan) abgelesen. Die spezifische Human- γ -Autoantikörper-Antwort gegen Maus-C-IV wurde im Serum von Kreuzungs(Fc)- aber nicht Kreuzungs-Mäusen beobachtet. Gesteigerte Antworten gegen bovines C-IV wurden im Serum von Kreuzungs(Fc)-Mäusen beobachtet ([Fig. 14](#)).

[0232] Fusion und Hybridom-Screening. Die Mäuse erhielten zusätzliche intraperitoneale (KM#1: Kreuzung, FC#1: Kreuzung(Fc)) oder intravenöse (KM#2: Kreuzung, FC#2: Kreuzung(Fc)) Injektionen von 150 μ g Antigen 66 Tage später, und Milzzellen wurden 69 Tage später abgeerntet. Die Milzzellen aus den Mäusen wurden mit Maus-Myelomzellen (Sp2/0-Ag14) durch Standard-Vorgehensweisen fusioniert. Die Zellsuspensionen wurden in 96-Vertiefungs-Platten bei 200000 Splenozyten pro Vertiefung inokuliert. Die Zellen wurden in DMEM, 10% FBS, Insulin, IL-6 kultiviert. HAT- oder HT-Ergänzung wurde dem Medium während des anfänglichen Wachstums und der Selektion zugegeben. Die Hybridome wurden mittels ELISA gescreent. Um Hybridome zu identifizieren, welche Maus-C-IV sezernieren, wurden ELISA-Platten (Nunc MaxiSorp) über Nacht bei 4 Grad mit 50 μ l/Vertiefung Maus-C-IV (Sigma, C0534) bei 40 μ g/ml in PBS beschichtet.

[0233] Fünfzig μ l Zellkulturüberstand wurden zugegeben. Zwei Hybridome, welche hy-positiven, mit Maus-C-IV reaktiven Antikörper sezernierten, wurden aus einer Kreuzungs(Fc)-Maus erhalten und wurden erfolgreich durch limitierende Verdünnung subkloniert (siehe nachstehende Tabelle 7).

Tabelle 7

Produktion von monoklonalen Anti-Kollagen-Typ IV-Antikörpern

Maus ID#	Positive Vertiefungen		
	Anti-Rinder-hy	Anti-Maus-hy	
KM#1	8	0	ip
KM#1	52	0	iv
FC#1	16	0	ip
FC#2	85	2	iv

[0234] Diese Daten zeigen, dass die Kreuzungs(Fc)-Mäuse nützlich für die Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern gegen gut-konservierte Antigene oder Epitope sind.

[0235] Die vorliegende Erfindung soll hinsichtlich des Umfangs nicht durch die beispielartig aufgeführten Ausführungsformen eingeschränkt werden, welche als Veranschaulichungen einzelner Aspekte der Erfindung beabsichtigt sind.

SEQUENZAUFLISTUNG

<110> Tomizuka, Kazuma

Ishida, Isao

Lonberg, Nils

Halk, Ed

<120> Transchromosomale Transgen-Nagetiere zur Herstellung von humanen Antikörpern

<130> 014643-012110US

<140> wird noch zugewiesen

<141> wird noch zugewiesen

<150> US 60/250 340

<151> 2000-11-30

<160> 10

<170> Patentinhaberin Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3881

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Kappa-Leicht-Ketten-Plasmid

<220>

<223> pCK7-96

<400> 1

```

tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg 60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag 120
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
tggcgaaaacc gcacaggact ataaagatac caggcggttc cccttggaag ctccctcggtg 300
cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggataacctgt ccgcttttct cccttcggga 360
agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgtt aggtatctca gttcggtgta ggtcggtcgc 420
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg 480
aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cagacttat cgcactggc agcagccact 540
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt gaagtgggtg 600
cctaactacg gctacactag aaggacagta ttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgta agggattttg 840
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
gaggaacctt tctcagcgat ctgtctatth cggttcaccca tagttgcctg actccccgtc 1020
gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgctgc aatgataccg 1080
cgagaccac gctcacgggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaaggggc 1140
gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcggg 1200
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggttc cattgctaca 1260
ggcatcggtg tgtaacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
tcaaggcgag ttacatgatc cccatgtttg tgcaaaaag cgggttagctc cttegggtcct 1380
ccgactggtt tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggtat ggcagcactg 1440
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgaggt gctcttgccc ggcgtcaata 1560

```

```

cgggataata cgcgcgcaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaacccact 1680
cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
acaggaaggc aaaatgcgcg aaaaaaggga ataaaggcga cacggaaatg ttgaatactc 1800
atactcttc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaacctt taaaaatagg 1980
cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgcggggag cagacaagcc 2100
cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgggcgg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
gagcagattg tactgagagt gcaccatatt cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
agaaaaatcc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgga 2280
tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
ttaagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc 2400
aagctagcgg cgcgggtcca accaccaatc tcaaagcttg gtacccggga gcctgttctc 2460
ccagcacagt cctggaagag gcacagggga aataaaagcg gacggaggct ttccttgact 2520
cagccgctgc ctggtcttct tcagacctgt tctgaattct aaactctgag ggggtcggat 2580
gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa 2640
gccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taagggaatg 2700
ggggaagctg ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg 2760
ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta 2820
tccgcaaaac acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc 2880
tttctcagg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt ccgcccctc gatgagcagt 2940
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgtgaataa cttctatccc agagaggcca 3000
aagtacagtg gaaggtggat aacgcctccc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 3060
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 3120
actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg 3180
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agagggagaa gtgcccccac ctgctcctca 3240
gttccagcct gacccccctc catcctttgg cctctgacct tttttccaca ggggacctac 3300
ccctattgct gtctccagc tcatctttca cctcaccctc ctctcctcc ttggctttta 3360
ttatgctaag gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat ctttgacact gtggtttctc 3420
tctttcctca atttaataat tattatctgt tgtttaccaa ctactcaatt tctcttataa 3480
gggactaaat atgtagtcat cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tcttctatcc 3540
tattttaccc tatcatcttc tgcaagacag tctctcctca aaccacaag ccttctgtcc 3600
tcacagtccc ctgggcccag gatcctcaca tcccaatccg cggccgcaat tcgtaatcat 3660
ggtcatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 3720
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg 3780
cgttgcgctc actgcccgtc ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 3840
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 3881

```

<210> 2

<211> 4723

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Gamma1-Schwer-Ketten-Plasmid

<220>

<223> pCG7-96

<400> 2

```

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccaggcct gaccttggtt ttggggcagg 60
gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtgca cacccaatgc ccatgagccc 120
agacactgga cgctgaacct cgcggacagt taagaaccca ggggcctctg cgccttgggc 180
ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg 240
cccatcggtc ttccccctgg caccctcttc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 300
gggtgacctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 360
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtctacag tctcaggac tctactccct 420

```

cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc	cagacctaca	tctgcaacgt	480
gaatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaagtt	ggtgagaggg	cagcacaggg	540
agggagggtg	tctgtctgaa	gccaggtcca	gcgctcctgc	ctggacgcat	cccggctatg	600
cagccccagt	ccagggcagc	aaggcaggcc	ccgtctgcct	cttcacccgg	aggcctctgc	660
ccgccccact	catgtctagg	gagagggtct	tctggctttt	tccccaggct	ctgggcaggc	720
acaggctagg	tgcctctaac	ccaggccctg	cacacaaagg	ggcagggtgt	gggctcagac	780
ctgccaaag	ccatatccgg	gaggaccctg	cccctgacct	aagcccaccc	caaaggccaa	840
actctccact	ccctcagctc	ggacaccttc	tctcctccca	gattccagta	actcccaatc	900
ttctctctgc	agagcccaaa	tcttgtgaca	aaactcacac	atgcccaccc	tgcctaggta	960
agccagccca	ggcctcgccc	tccagctcaa	ggcgggacag	gtgccttaga	gtagcctgca	1020
tccagggaca	ggccccagcc	gggtgtgtac	acgtccacct	ccatctcttc	ctcagcacct	1080
gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	ttccccccaa	aacccaagga	caccctcatg	1140
atctcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	1200
gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaaagc	aaagcccgcg	1260
gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	1320
tggtgtaatg	gcaaggagta	caagtgcacg	gtctccaaca	aagccctccc	agcccccatc	1380
gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggtgg	acccgtgggg	tgcgaggggc	acatggacag	1440
aggccggctc	ggcccacctc	ctgccctgag	agtgaccgct	gtaccaacct	ctgtccctac	1500
agggcagccc	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccac	1560
gaaccagggtc	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgctgtgga	1620
gtgggagagc	aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	1680
cgacggctcc	ttcttctctc	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggc	ggcagcaggc	1740
gaacgtcttc	tcatgtctcc	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	1800
ctctccctg	tctccgggta	aatgagtgcg	acggccggga	agcccccgct	ccccgggctc	1860
tcgcggtcgc	acgaggatgc	ttggcacgta	ccccctgtac	atacttcccg	ggcgcccagc	1920
atggaataaa	agcaccacgc	gctgccctgg	gcccctgcga	gactgtgatg	gttctttcca	1980
cgggtcaggg	cgagtctgag	gcctgagtg	catgaggag	gcagagcggg	tcccactgtc	2040
ccacactgg	cccaggctgt	gcagggtgtg	ctgggcccc	taggggtggg	ctcagccagg	2100
gggtgccctc	ggcaggggtg	gggatttgcc	agcgtggccc	tccctccagc	agcacctgcc	2160
ctgggctggg	ccacgggaag	ccctaggagc	ccctggggac	agacacacag	cccctgcctc	2220
tgtaggagac	tgtcctgttc	tgtgagcgcc	cctgtcctcc	cgacctccat	gcccactcgg	2280
gggcagcctc	gcaggtcgac	tctagaggat	ccccgggtac	cgagctcgaa	ttcatcgatg	2340
atatcagatc	tgccggtctc	cctatagtga	gtcgtattaa	tttcgataag	ccagggttaac	2400
ctgcattaat	gaatcgccca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgatttgg	gcgtctcttc	2460
gcttccctgc	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	2520
cactcaaagg	cggtaataac	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	2580
tgagcaaaa	gcccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	2640
cataggctcc	gcccccttga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	2700
aaaccagcac	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	2760
cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	2820
gcgctttctc	aatgtctacg	ctgtagggtat	ctcagttcgg	tgtaggctcg	tcgctccaag	2880
ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccagccgct	gcgccttatc	cggtaactat	2940
cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	3000
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	3060
tacggctaca	ctagaaggac	agtatttgg	atctgcgctc	tgtgaagcc	agttaccttc	3120
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtaggttt	3180
tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	3240
ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttgggtcatg	3300
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaatt	aaaaatgaag	ttttaaatca	3360
atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtc	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	3420
cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	3480
ataactcaga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	3540
ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaacacgc	cagccggaag	ggccgagcgc	3600
agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcct	ttaattgttg	ccgggaagct	3660
agagtaagta	gttcgcccag	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	3720
gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	3780
cgagttacat	gatcccccat	gttggtgcaa	aaagcggtta	gtccttcctg	tcctccgatac	3840
gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtggtt	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	3900
tctcttactg	tcatgccatc	cgttaagatgc	ttttctgtga	ctgggtgagta	ctcaaccaag	3960
tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgct	aatacgggat	4020
aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	4080

```

cgaaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 4140
cccaactgat cttcagcatc ttttactttt accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 4200
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 4260
ttcctttttt aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 4320
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 4380
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 4440
acgaggccct ttctgtctgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg acacatgcag 4500
ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa ggggatgccg ggagcagaca agcccgtcag 4560
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag 4620
attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgtag aacgcggcta caattaatac 4680
ataaccttat gtatcatata catacgattt aggtgacact ata 4723

```

<210> 3

<211> 4694

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Gamma4-Schwer-Ketten-Plasmid

<220>

<223> pG4HE

<400> 3

```

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccgggcct gactttggct gggggcaggg 60
agggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccagggtcac acccaatgcc catgagccca 120
gacactggac cctgcatgga ccatcgcgga tagacaagaa ccgaggggcc tctgcgccct 180
ggggccagct ctgtcccaca ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca 240
agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagccg 300
ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtc tggaaactcag 360
gcgccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcttca ggactctact 420
ccctcagcag cgtggtgaac gtgcccctca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca 480
acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag agggccagcac 540
agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctacgccctc ctgcctggac gcaccccggc 600
tgtgcagccc cagccagggg cagcaaggca tgcccctct gtctctcac ccggaggcct 660
ctgaccaccc cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc aggtccggg 720
cagccacagg ctggatgcc ctaccccagg ccctgcgcac acaggggcag gtgctgcgct 780
cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgccct gacctaaagg cccccaaaag 840
gcaaaactct ccactccctc agctcagaca ccttctctcc tccagatct gagtaactcc 900
caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgcc caggtaagcc 960
aaccagggcc tcgcccctca gctcaaggcg ggacagggtg cctagagtag cctgcatcca 1020
gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcac ccacctccat ctcttctca gcacctgagt 1080
tcctgggggg accatcagtc ttctgttccc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct 1140
cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac ccgagggtcc 1200
agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 1260
agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtctgcac caggactggc 1320
tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga 1380
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat ggacagagg 1440
cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt cctacaggg 1500
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1560
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccc gcgacatcgc cgtggagtgg 1620
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1680
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcagggtggc ggaggggaat 1740
gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1800
tcctgtctc tgggtaaatg agtgccaggg ccggcaagcc cccgctcccc gggctctcgg 1860
ggtcgcgga ggtgcttg caggtacccc gtctacatac ttcccaggca ccagcatgg 1920
aaataaagca cccaccactg ccctgggccc ctgtgagact gtgatgggtc tttccacggg 1980
tcaggccgag tctgaggcct gagtgcacat agggaggcag agcgggtccc actgtcccca 2040
cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccacctagg gtgggggtca gccagggggt 2100

```

```

gccctcggca ggggtggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca gctgccctgg 2160
gctggggccac gggaagccct agggagccct ggggacagac acacagcccc tgcctctgta 2220
ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgaccc cccatgcccc ctccggggga 2280
tccccgggta ccgagctcga attcatcgat gatatcgat ctgccgggtct ccctatagtg 2340
agtctgatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 2400
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctcaactgact cgctgcgctc 2460
ggctcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac 2520
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 2580
ccgtaaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cggccccctg acgagcatca 2640
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 2700
gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgcg ttaccggata 2760
cetgtccgct ttttccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 2820
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca 2880
gcccagccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga 2940
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagggt atgtaggcgg 3000
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060
tatctcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 3120
caaacaaacc accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa 3240
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 3360
tgacagttac caatgcttaa tcagtagggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgctc 3420
atccatagtt gcctgactcc cgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccgctccag atttatcagc 3540
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3600
catccagttc attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3660
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 3720
ttcatctcag tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 3780
aaaagcggtt agtccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 3840
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgccat ccgtaagatg 3900
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc 3960
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taatacccg ccacatagca gaactttaaa 4020
agtgtctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 4080
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 4140
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag 4200
ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact cttcctttt caatattatt gaagcattta 4260
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 4320
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 4380
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 4440
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta 4500
agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg 4560
gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatggacat 4620
attgtcgtta gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt 4680
taggtgacac tata 4694

```

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde für die Region 5' von V-Kappa-01

<400> 4

ccacccata aacactgatt c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde für die Region 5' von V-Kappa-01
 <400> 5
 ttgatgcac ctaaccaggg c 21

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde für die intergene V-Kappa-L24-
 und -L25-Region
 <400> 6
 cctgccttac agtgetgtag 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde für die intergene V-Kappa-L24-
 und -L25-Region
 <400> 7
 ggacagcaac aggacatggg 20

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer neo
 <400> 8
 ctcgtgcttt acgtatcgc c 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer 5'EC1
 <400> 9
 aaactcgacc ccccgtagat c 21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer 3'EC1

<400> 10

ttgactgtgg ccttaaacgt gtag

24

Patentansprüche

1. Transgene Maus, umfassend zwei humane Immunglobulin-Loci, wobei ein humaner Immunglobulin-Locus ein auf einem Transchromosom angeordneter humaner Schwere-Kette-Locus ist und der andere humane Immunglobulin-Locus ein Teil eines humanen Leichte-Kette-Locus-Transgens ist, der stabil in das Mausgenom integriert ist und eine humane leichte Kette codiert.

2. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das humane Leichte-Kette-Locus-Transgen einen humanen Leichte-Kette-Kappa-Locus umfasst.

3. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das humane Leichte-Kette-Locus-Transgen nicht rearrangierte Sequenzen des natürlichen humanen Kappa-Leichte-Kette-Locus umfasst.

4. Transgene Maus nach Anspruch 1, wobei wenigstens ein Teil des humanen Leichte-Kette-Locus-Transgens auf einem YAC-Vektor angeordnet ist.

5. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Transchromosom das SC20-Transchromosom ist.

6. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Transgen das KCo5-Transgen ist.

7. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Transchromosom das Transchromosom SC20 ist und das Transgen das Transgen KCo5 ist.

8. Transgene Maus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, ferner umfassend eine Mutation eines Gens, welche die Immunantwort gegen ein Autoantigen erhöht.

9. Transgene Maus nach Anspruch 8, wobei die Mutation das Fc-γ RIIB-Gen inaktiviert.

10. Transgene Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der endogene Säugetier-Schwere-Kette-Locus und wenigstens ein endogener Säugetier-Leichte-Kette-Locus inaktiviert sind.

11. Transgene Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der endogene Säugetier-Schwere-Kette-Locus und der endogene Säugetier-Kappa-Leichte-Kette-Locus inaktiviert sind.

12. Verfahren zur Erzeugung einer Vielzahl von B-Zellen, die humane Antikörpersequenzen exprimieren, wobei das Verfahren das Immunisieren der transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfasst, um eine Vielzahl von B-Zellen zu erzeugen, die Antikörper mit humaner Sequenz exprimieren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, ferner umfassend das Isolieren der Vielzahl von B-Zellen, die Antikörper mit humaner Sequenz exprimieren, aus der transgenen Maus.

14. Verfahren zur Erzeugung von antigenspezifischen Hybridomen, die einen Antikörper mit humaner Sequenz sekretieren, wobei das Verfahren umfasst:
Immunisieren einer transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit einem bestimmten Antigen und Fusionieren von Lymphozyten aus der transgenen Maus mit unsterblichen Zellen unter Bildung von Hybridomzellen; oder
Fusionieren von B-Zellen, die gemäß Anspruch 12 erzeugt wurden, mit unsterblichen Zellen unter Bildung von

Hybridomen; und

Identifizieren von Hybridomen, die einen Antikörper mit humaner Sequenz sekretieren, der spezifisch an das bestimmte Antigen bindet.

15. Verfahren nach Anspruch 14, ferner umfassend das Isolieren der Antikörper mit humaner Sequenz aus den Hybridomzellen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Antikörper mit humaner Sequenz gereinigt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 12, ferner umfassend das Isolieren von Polynukleotiden, die humane Antikörper codieren.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Polynukleotide, welche die humanen Antikörper codieren, Voll-längen-Polynukleotide sind.

19. Verfahren nach Anspruch 18, ferner umfassend das Expressieren der Polynukleotide in einer transfizierten Zelle.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die Vielzahl von B-Zellen wenigstens eine erste B-Zelle umfasst, die einen Antikörper mit einem ersten aus IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM ausgewählten Isotyp exprimiert.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Vielzahl von B-Zellen ferner wenigstens eine zweite B-Zelle umfasst, die einen Antikörper mit einem zweiten Isotyp exprimiert, der von dem ersten aus IgA, IgD, IgE, IgG und IgM ausgewählten Isotyp verschieden ist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die Vielzahl von B-Zellen wenigstens fünf B-Zellen umfasst, die jeweils einen Antikörper mit einem unterschiedlichen Isotyp exprimieren, wobei die Isotypen der Antikörper IgA, IgD, IgE, IgG bzw. IgM sind.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei der IgA-Isotyp IgA₁ oder IgA₂ ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei der IgG-Isotyp IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄ ist.

25. Verfahren nach Anspruch 14, wobei mehr als 50% der antigenspezifischen Hybridomklone einen Antikörper mit einer humanen schweren Kette und einer humanen leichten Kette sekretieren.

26. Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz, der an ein bestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Immunisieren einer transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit einem bestimmten Antigen; und

Isolieren des Antikörpers mit humaner Sequenz aus der immunisierten transgenen Maus; oder

(b) Fusionieren von Lymphozyten aus der transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit unsterblichen Zellen unter Bildung von Hybridomzellen; und

(c) Screenen der gebildeten Hybridomzellen auf das Vorhandensein von antigenreaktiven Antikörpern.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Antikörper mit humaner Sequenz mit einer Gleichgewichtssasoziationskonstante (K_a) von wenigstens 10^8 M^{-1} , wenigstens 10^9 M^{-1} oder wenigstens 10^{10} M^{-1} an ein bestimmtes Antigen bindet.

28. Verfahren nach Anspruch 25, 26 oder 27, wobei die Antikörper mit humaner Sequenz ein IgA-Isotyp oder ein IgG-Isotyp sind.

29. Verfahren nach Anspruch 25, 26 oder 27, ferner umfassend das Isolieren und Modifizieren des Antikörpers mit humaner Sequenz, so dass nur ein Antigenbindungsbereich, beispielsweise ein F(ab')₂-, Fab-, F_v- oder F_d-Fragment, enthalten ist.

30. Verfahren nach Anspruch 26(b), wobei die antigenreaktiven Antikörper von den Hybridomzellen in Kultur sekretiert werden.

31. Verfahren nach Anspruch 26(b) oder 30, wobei die antigenreaktiven Antikörper wesentlich gereinigt werden.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die wesentlich gereinigten Antikörper für die therapeutische Verwendung formuliert werden.
33. Verfahren zur Herstellung von rearrangierten humanen Immunglobulin-Polynukleotiden, umfassend das Erhalten von rearrangierten humanen Immunglobulin-Polynukleotiden aus einer transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Schritt des Erhaltens das Sammeln von B-Zell-Lymphozyten, welche die rearrangierten humanen Immunglobulin-Polynukleotide enthalten, aus der transgenen Maus umfasst.
35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Schritt des Erhaltens das Isolieren und Amplifizieren von mRNA aus B-Zell-Lymphozyten unter Erzeugung einer cDNA umfasst.
36. Verfahren nach Anspruch 35, ferner umfassend das Isolieren und Amplifizieren von Polynukleotiden der variablen Region der schweren und leichten Kette aus der cDNA.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, ferner umfassend:
Kultivieren einer Wirtszelle, die ein Polynukleotid umfasst, das eine rearrangierte humane Immunglobulinsequenz aus einer transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 codiert, unter solchen Bedingungen, dass das Polynukleotid repliziert wird; und
Gewinnen des Polynukleotids aus der kultivierten Wirtszelle oder dessen Kulturmedium.
38. Verfahren zur Erzeugung einer humanen Antikörper-Display-Bibliothek, wobei das Verfahren umfasst:
Einführen eines Immunogens in die transgene Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11;
Isolieren einer Population von Polynukleotiden, die humane Antikörperketten codieren, aus lymphatischen Zellen der transgenen Maus; und
Bilden einer Bibliothek von Display-Einheiten, welche die Antikörperketten präsentieren, wobei ein Bibliotheksmitglied ein Polynukleotid umfasst, das eine Antikörperkette codiert und die Antikörperkette von der Einheit präsentiert wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei das Immunogen ein Nukleinsäuremolekül ist.
40. Verfahren nach Anspruch 38, wobei das Nukleinsäuremolekül einen membrangebundenen Rezeptor codiert.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 40, wobei die transgene Maus keinen nachweisbaren Titer gegen das Immunogen aufweist, wenn der Isolationsschritt durchgeführt wird.
42. Verfahren zur Erzeugung eines Antikörpers mit humaner Sequenz oder eines Fragments davon, der bzw. das an ein bestimmtes Antigen bindet, wobei das Verfahren umfasst:
(a) Isolieren von Sequenzen einer Antikörper-V-Region aus einer transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11, die mit einem bestimmten Antigen immunisiert wurde;
Klonieren der isolierten V-Regionen in einen Vektor, um eine Expressionsbibliothek zu erzeugen; und
Exprimieren der Bibliothek, um V-Region-Sequenzen zu identifizieren, die einen Antikörper oder ein Fragment davon codieren, der bzw. das an das bestimmte Antigen bindet; oder
(b) Klonieren eines isolierten Polynukleotids, das wenigstens eine humane Antikörper-V-Region codiert, in einen Expressionsvektor, wobei das isolierte Polynukleotid aus einer B-Zelle der transgenen Maus nach einem der Ansprüche 1 bis 11, die mit einem bestimmten Antigen immunisiert wurde, oder aus Hybridomen, die durch Fusion der B-Zelle und einer unsterblichen Zelle erzeugt wurden, stammt;
Einführen des rekombinanten Vektors in eine Wirtszelle;
Kultivieren der Wirtszelle, um den Antikörper mit humaner Sequenz oder eines Fragments davon aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium davon zu sammeln.
43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei die klonalen Zelllinien von wenigstens 50% der identifizierten Hybridomzellen erhalten werden.

44. Verfahren nach Anspruch 42 oder Anspruch 43, wobei das Polynukleotid humane Volllängen-Antikörpersequenzen codiert.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 44, wobei das Polynukleotid eine cDNA ist.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei das isolierte Polynukleotid mittels PCR isoliert wird.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei das isolierte Polynukleotid mittels Screenen einer cDNA-Bibliothek unter Verwendung wenigstens einer Nukleinsäuremolekülsonde isoliert wird.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei das isolierte Polynukleotid mittels Screenen einer Phagen-Display-Bibliothek isoliert wird.
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei der gesammelte Antikörper-Isotyp mit humaner Sequenz verschieden von dem Isotyp der Antikörper produzierenden Zellen der immunisierten transgenen Maus ist.
50. Verfahren zur Verbesserung der Stabilität einer transchromosomalen Maus-Hybridomzelle, die einen mit einem bestimmten Antigen reaktiven humanen Antikörper exprimiert, wobei das Verfahren umfasst:
Kreuzen einer ersten Maus, wobei die erste Maus einen ersten humanen Immunglobulin-Locus umfasst, der ein auf einem Transchromosom angeordneter humaner Schwere-Kette-Locus ist, mit einer zweiten Maus, wobei die zweite Maus einen zweiten human Immunglobulin-Locus umfasst, der ein Teil eines humanen Leichte-Kette-Locus-Transgens ist, der stabil in das Mausgenom integriert ist und eine humane leichte Kette codiert, Erhalten einer dritten Maus aus der Kreuzung, wobei die dritte Maus sowohl den ersten als auch den zweiten humanen Immunglobulin-Locus umfasst;
Immunisieren der dritten Maus oder deren Nachkommen, die sowohl den ersten als auch den zweiten humanen Immunglobulin-Locus beibehalten, mit einem bestimmten Antigen;
Sammeln von B-Zellen aus der immunisierten Maus; und
Fusionieren der B-Zellen mit unsterblichen Zellen, um Hybridomzellen zu erhalten, die den mit dem bestimmten Antigen reaktiven humanen Antikörper exprimieren.
51. Verfahren nach Anspruch 50, ferner umfassend:
Kultivieren der Hybridomzellen;
Testen von Hybridomzellkulturmedien, um Hybridomzellen zu identifizieren, die mit dem bestimmten Antigen reaktive humane Antikörper exprimieren;
Verdünnen der Hybridomzellen; und
Kultivieren der verdünnten Hybridomzellen, um klonale Zelllinien zu erhalten, die einen mit dem bestimmten Antigen reaktiven humanen monoklonalen Antikörper exprimieren.
52. Verfahren nach Anspruch 50 oder 51, wobei die erste Maus und die zweite Maus eine Mutation eines Gens umfasst, welche die Immunantwort gegenüber einem Autoantigen erhöht.
53. Verfahren nach Anspruch 52, wobei die Mutation das Fc- γ RIIB-Gen inaktiviert.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen



Erwartete Fragmentgrößen (kb) unter Verwendung von Sonde A		
Restriktions- verdau	Fragmentlänge	
	Wildtyp	Mutante
BglI	15,7	7,7
Bst XI	7,3	6,6
Spe I	9,9	7,6
Eco RI	12,5	14,3

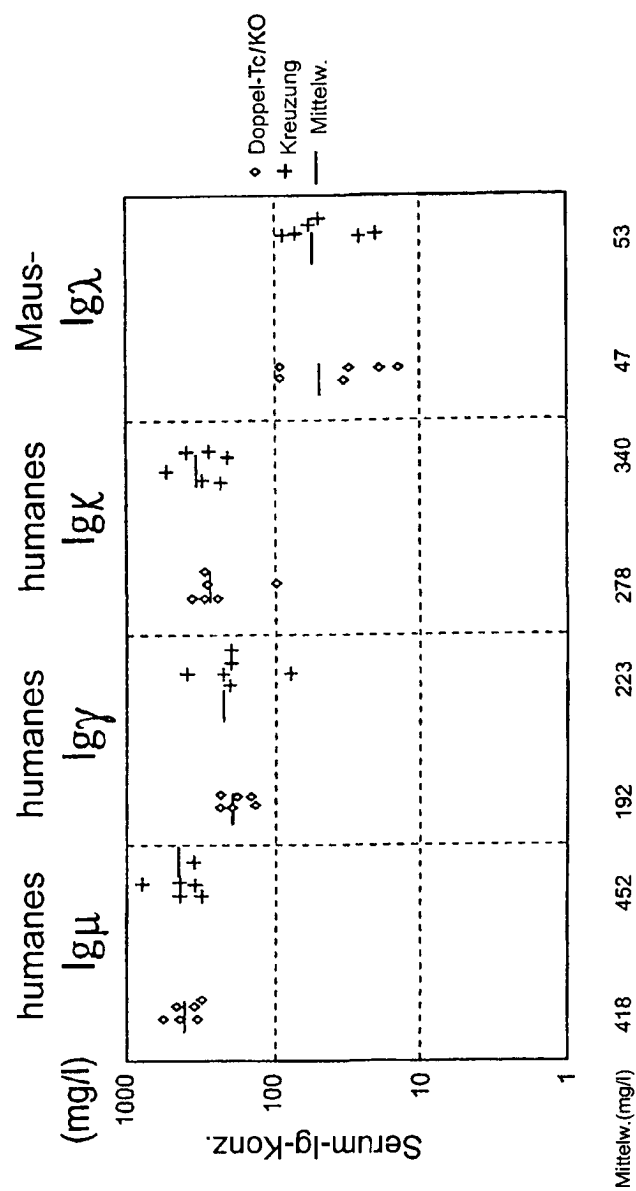


FIG. 2

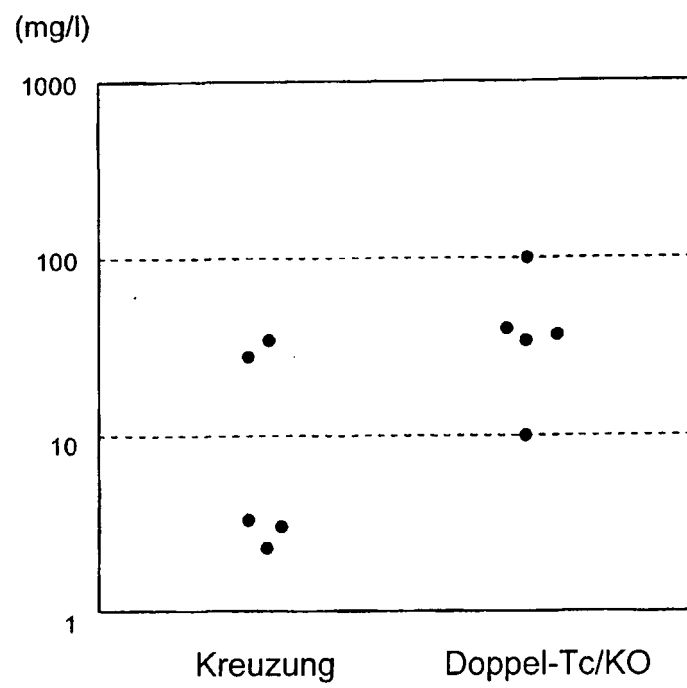


FIG. 3

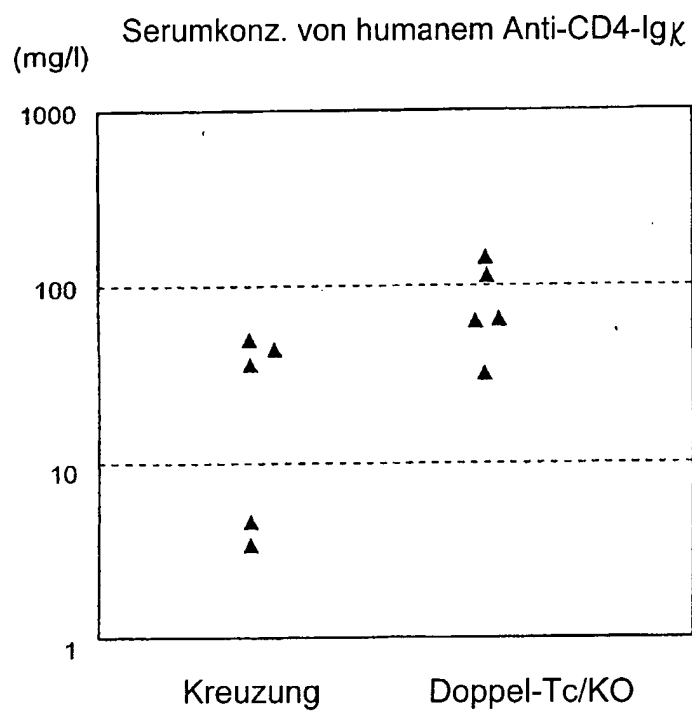


FIG. 4

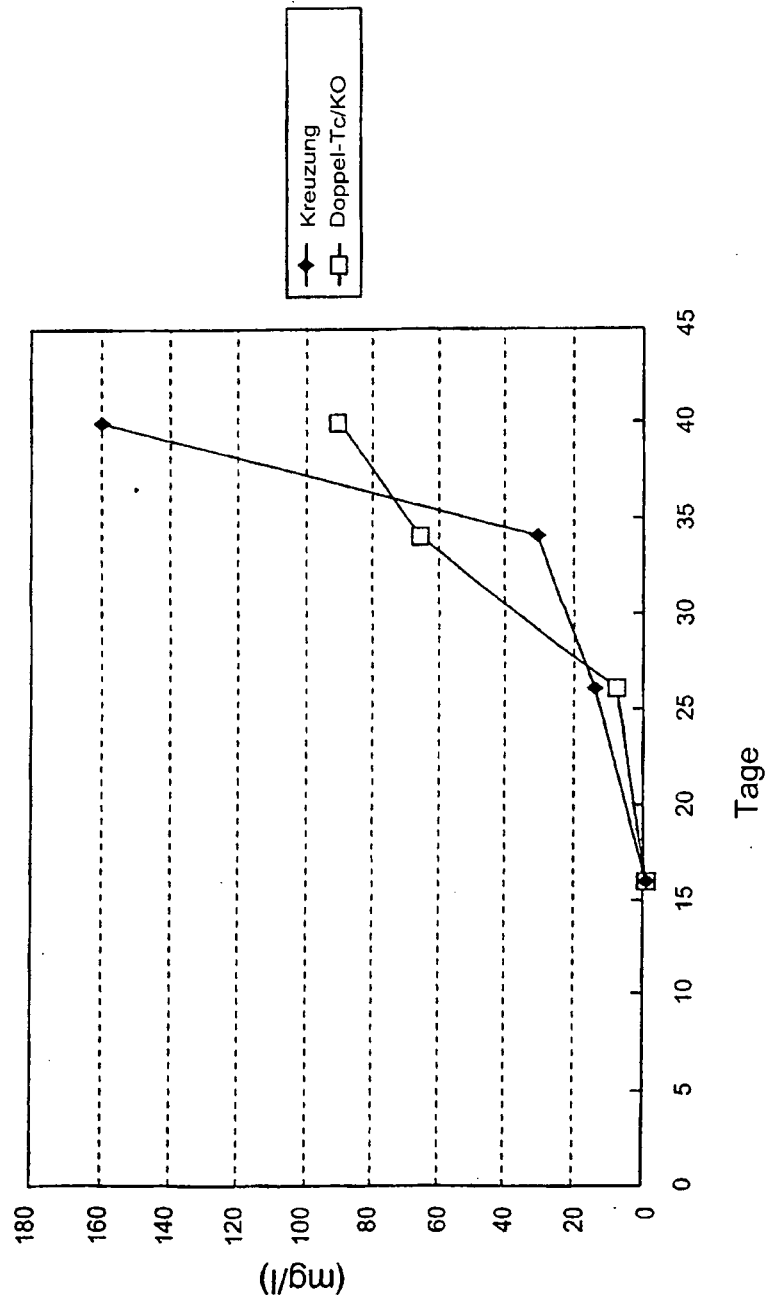


FIG. 5

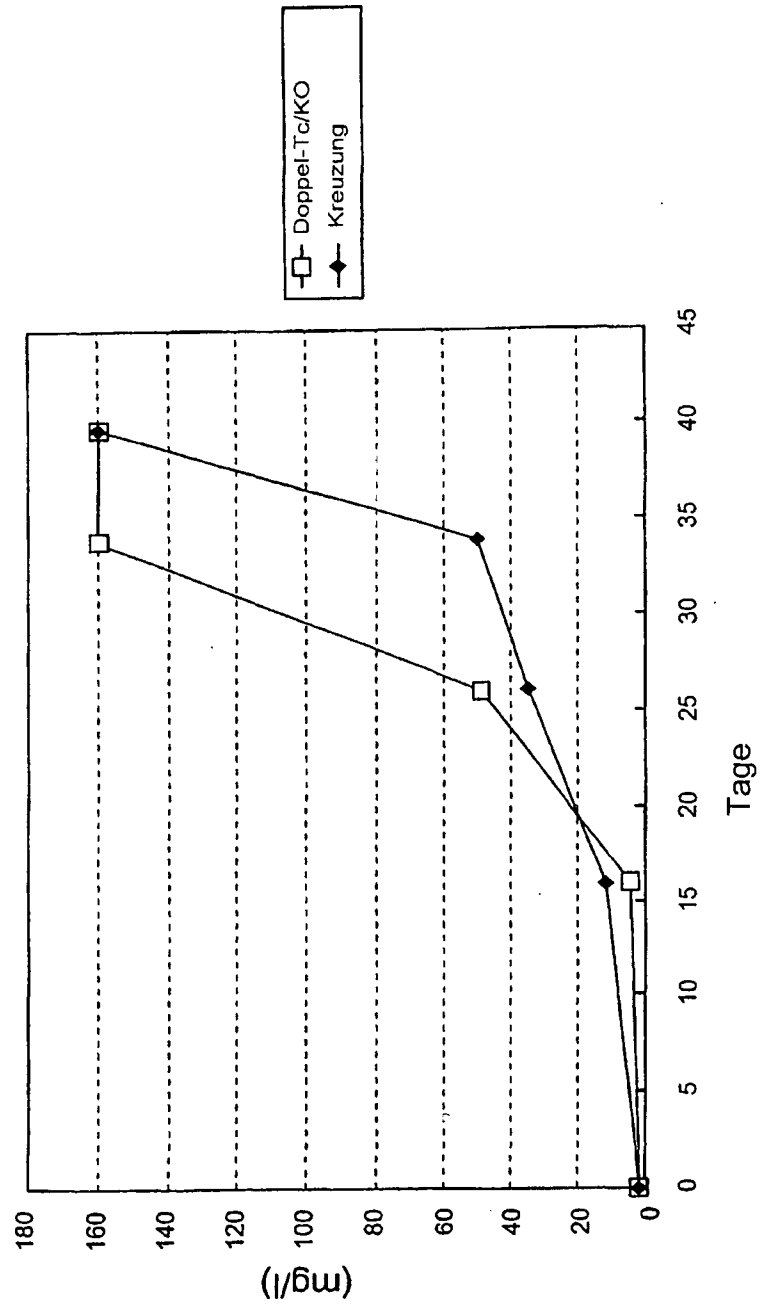


FIG. 6

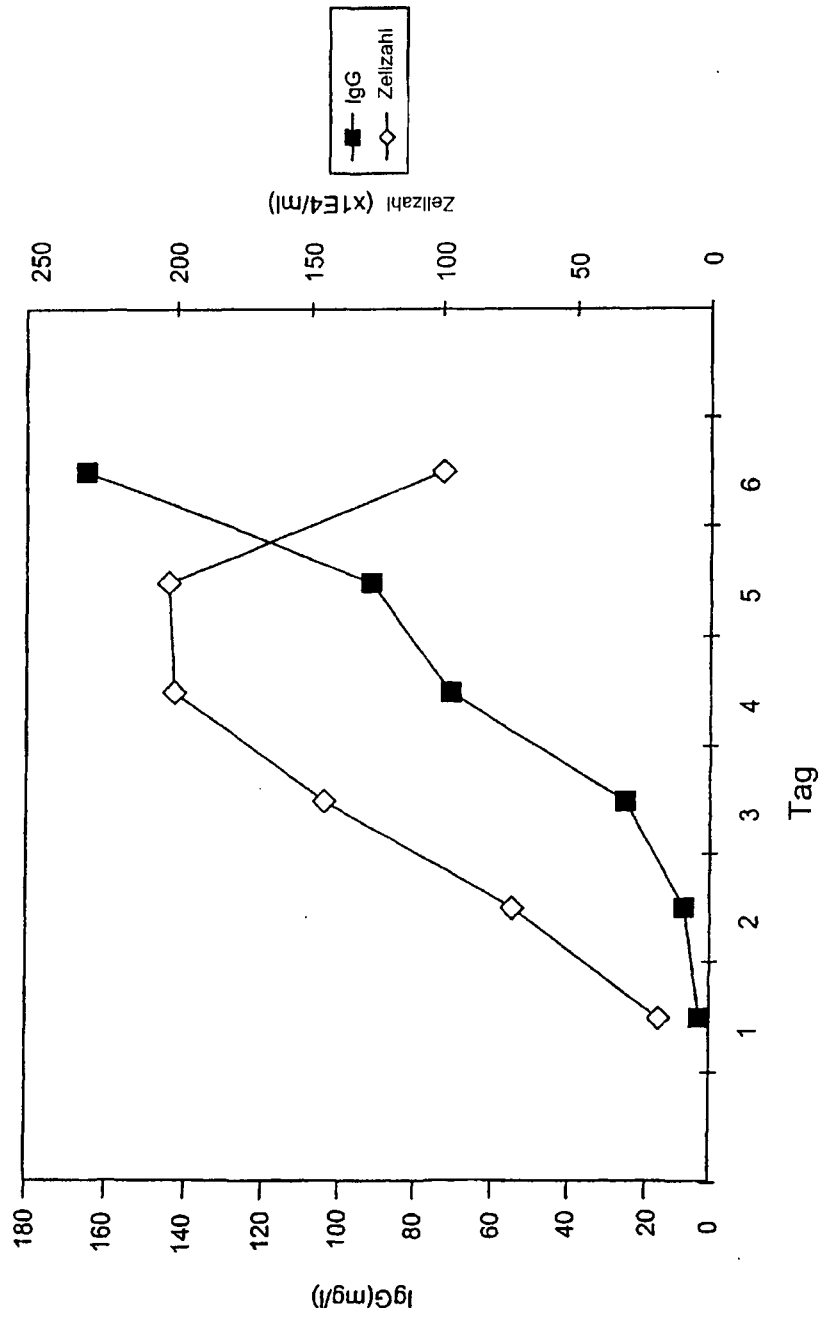


FIG. 7

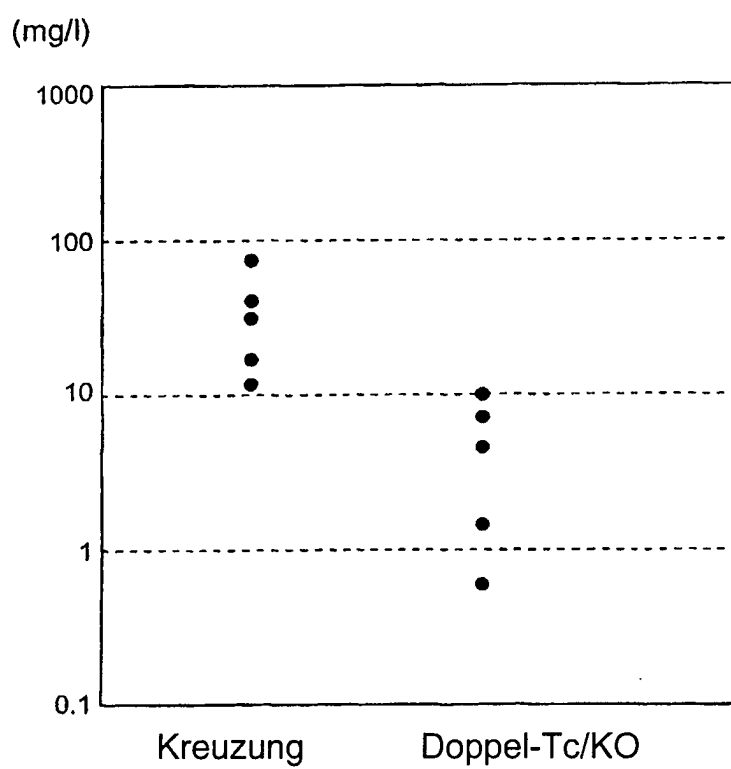


FIG. 8

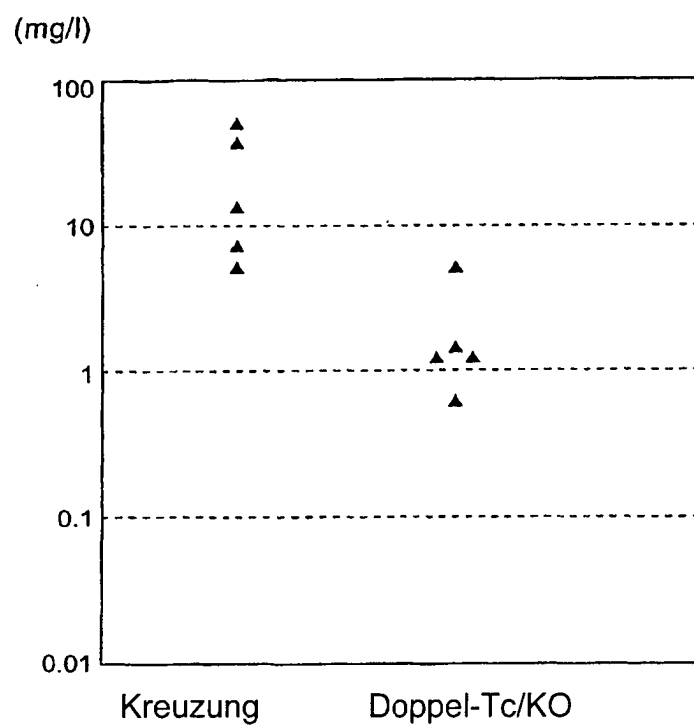


FIG. 9

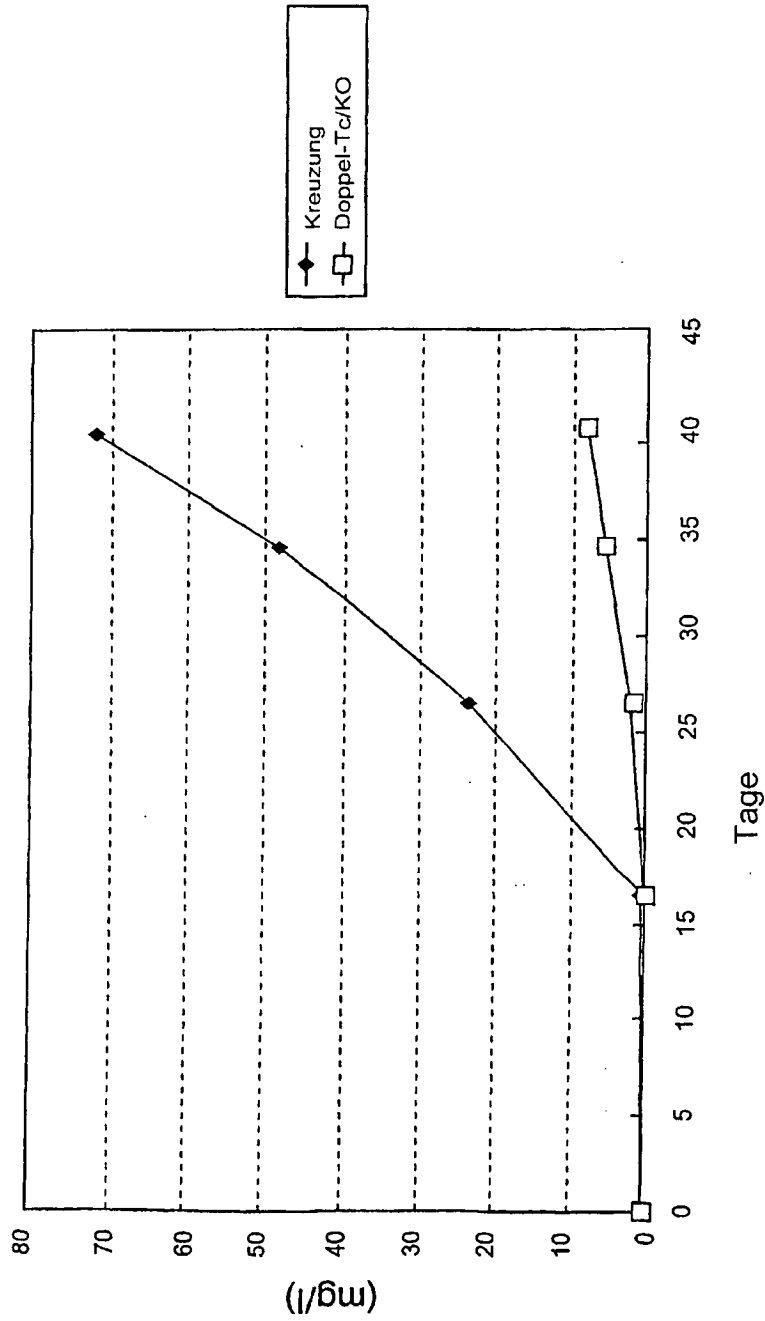


FIG. 10

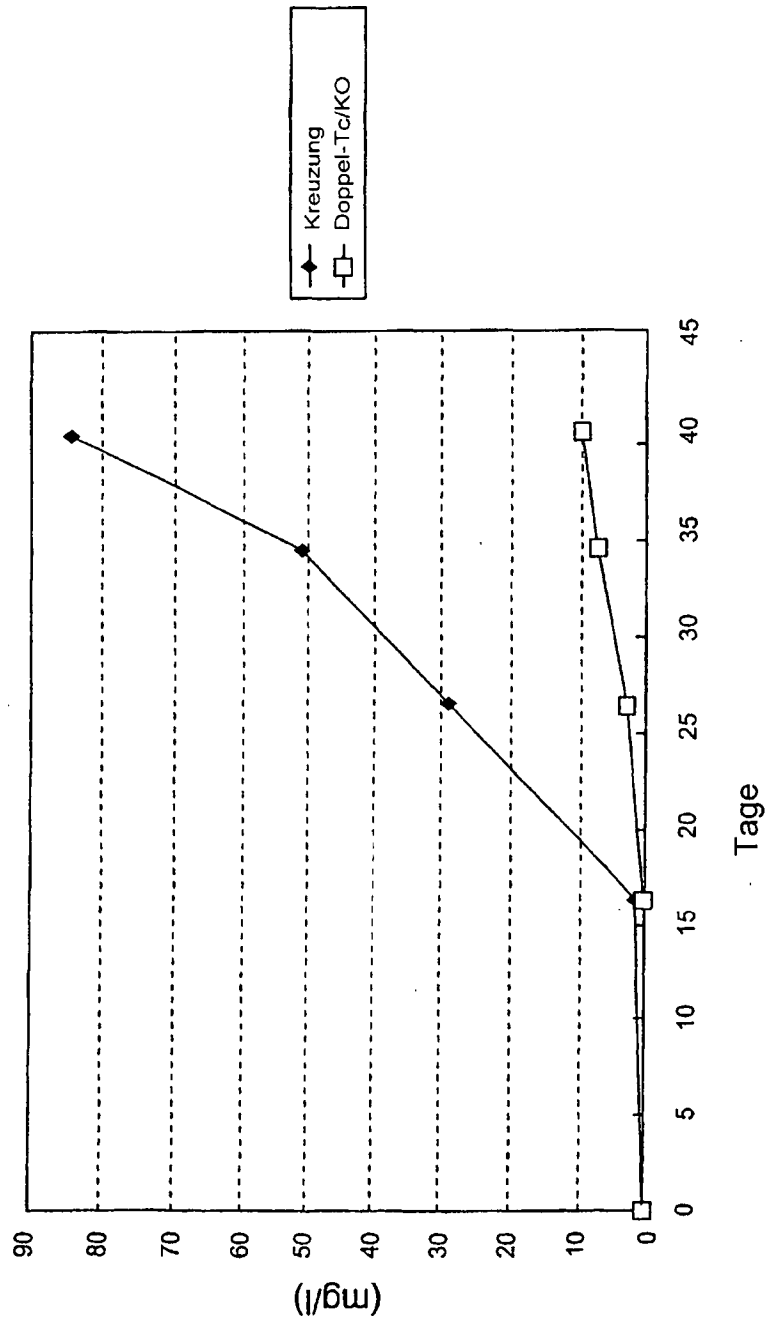


FIG. 11

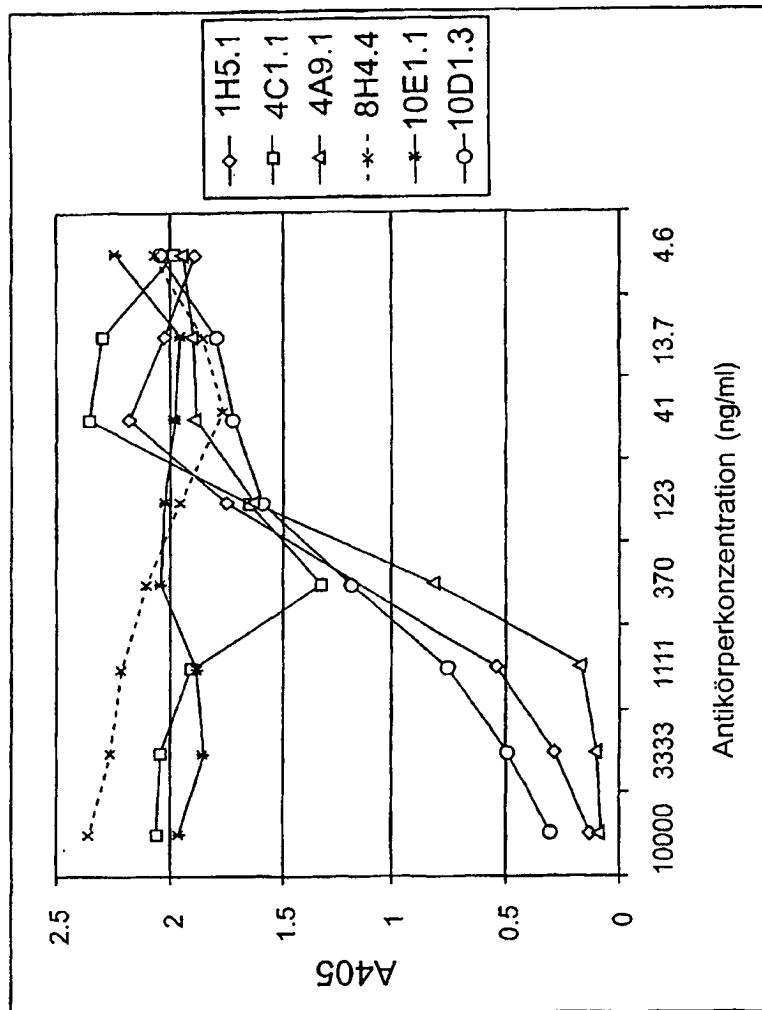


FIG. 12

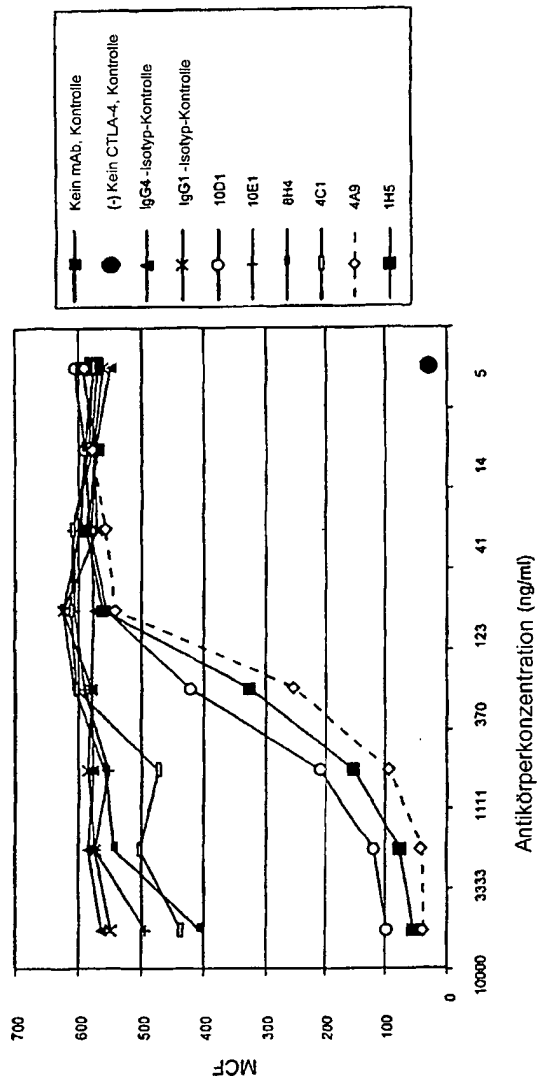


FIG. 13

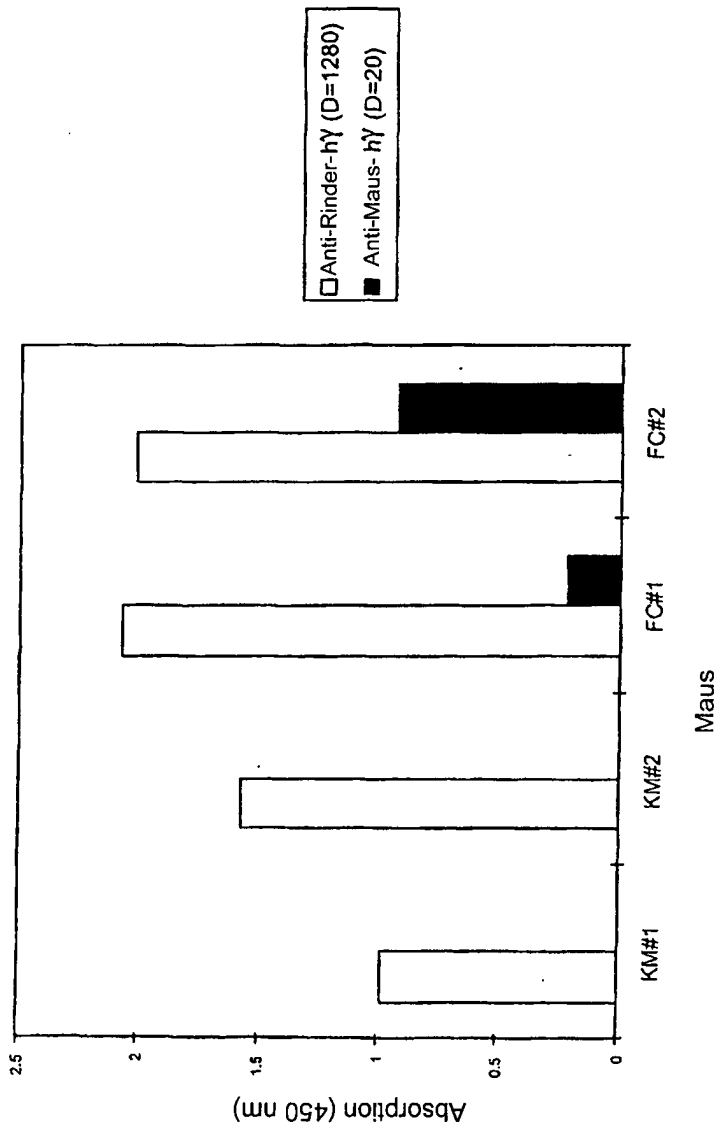


FIG. 14