



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1487996 B

(45) 授权公告日 2010.06.16

(21) 申请号 01822339.7

石田攻 N·伦伯格 E·哈尔克

(22) 申请日 2001.11.30

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(30) 优先权数据

60/250,340 2000.11.30 US

代理人 徐雁漪

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.07.28

(51) Int. Cl.

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)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2001/045293 2001.11.30

(87) PCT申请的公布数据

W02002/043478 EN 2002.06.06

(56) 对比文件

于善谦等. 免疫学导论. 北京: 高等教育出版社德国: 施普林格出版社, 1999, 55-57.

(73) 专利权人 米德列斯公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 协和发酵麒麟株式会社

审查员 陈中伟

(72) 发明人 富塚一磨

权利要求书 1 页 说明书 60 页 附图 14 页

(54) 发明名称

用于生产人类抗体的转基因转染色体啮齿动物

动物染色体相连。例如在所述小鼠中, 所述内源哺乳动物重链基因座和至少一个哺乳动物轻链基因座、以及所述内源哺乳动物重链基因座和 κ 轻链基因座被可以失活。

(57) 摘要

本发明提供一种包含两个人免疫球蛋白基因座的转基因非人类哺乳动物, 优选为啮齿动物, 其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座, 而另一个基因座是人轻链基因座; 并且其中所述基因座中仅一个是转染色体的。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述转染色体是自主型的。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述转染色体包含一个人类 14 号染色体的片段。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述人轻链基因座与内源哺乳动物染色体相连。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述人重链基因座是转染色体的, 并且所述人轻链基因座与内源哺乳动物染色体相连。在某些这样的转基因非人类哺乳动物中, 所述人轻链基因座的至少一部分被克隆到 YAC 载体中。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述人重链基因座包含在 hCF(SC20) 中, 而所述人轻链基因座包含在人 κ 轻链基因座转基因 KCo5 中。在某些转基因非人类哺乳动物中, 所述人轻链基因座是转染色体的, 而所述人重链基因座与内源哺乳

1. 能产生人抗体的小鼠的制备方法,所述小鼠携带转染色体和转基因,所述转染色体包含含人抗体重链基因座的人类 14 号染色体的片段,所述转基因已经插入到小鼠染色体中且具有未经重排的人抗体轻链基因座,该方法包括将携带包含含人抗体重链基因座的人类 14 号染色体的片段的转染色体的小鼠,与携带插入到小鼠染色体中且具有未经重排的人抗体轻链基因座的转基因的小鼠杂交,其中内源小鼠抗体重链基因座和内源小鼠抗体 κ 轻链基因座被失活。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述转染色体是含人重链基因座的人类 14 号染色体的片段。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述转染色体是 hCF(SC20)。

4. 权利要求 1 的方法,其中具有未经重排的人抗体轻链基因座的转基因的至少一部分用 YAC 载体导入小鼠。

5. 权利要求 1 的方法,其中未经重排的人抗体轻链基因座是人抗体轻链 κ 基因座。

6. 权利要求 1 的方法,其中具有未经重排的人抗体轻链基因座的转基因是 KCo5 转基因。

7. 权利要求 1 的方法,所述小鼠携带人染色体片段 SC20 和人抗体 κ 轻链基因座转基因 KCo5,该方法包括将携带人染色体片段 SC20 的小鼠与携带人抗体 κ 轻链基因座转基因 KCo5 的小鼠杂交,其中内源小鼠抗体重链基因座和内源小鼠抗体 κ 轻链基因座被失活。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述转染色体是通过易位形成的、由人类 14 号染色体的片段和不同的染色体片段组成的融合染色体。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述转染色体还含有未经重排的人抗体轻链基因座。

10. 权利要求 1 的方法,该方法还包括基因突变,该突变增强对自身抗原的免疫应答,其中增强对自身抗原免疫应答的基因突变是 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 基因被失活。

用于生产人类抗体的转基因转染色体啮齿动物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2000年11月30日申请的第60/250,340号美国临时申请的优先权,其公开内容通过引用全文结合到本文中。

技术领域

[0003] 本发明属于转基因动物、分子免疫学和医学技术领域。

[0004] 发明背景

[0005] 抗体代表一类应用于包括移植、心血管疾病、传染病、癌症和自身免疫病在内的许多不同领域的治疗分子 (Goldenberg, M., 1999, Clin. Ther. 21 :309-318 ;Present, D. 等, 1999, New Engl. J. Med. 340 :1398-1405 ;Targan, S. 等, 1997, New Engl. J. Med. 337 :1029-1035 ;Davis, T. 等, 1999, Blood 94 :88a ;Saez-Llorens, X. 等, 1998, Pediatr. Infect. Dis. J. 17 :787-791 ;Berard, J. 等, 1999, Pharmacotherapy 19 :1127-1137 ;Glennie, M. 等 2000, Immunol. Today 21 :403-410 ;Miller, R., 1982, New Engl. J. Med. 306 :517-522 ;Maini, R. 等, 1999, Lancet, 354 :1932-1939)。杂交瘤技术的开发使得能够分离啮齿动物单克隆抗体 (也称为 MAb) 作为候选治疗分子 (Kohler, G. 和 Milstein, C., 1975, Nature 256 :495-497)。然而, 涉及将非人类单克隆抗体用于体内人类治疗的早期研究证明, 人抗小鼠抗体 (HAMA) 应答可能限制了这类药物的应用 (Schroff, R. 等, 1985, Cancer Res. 45, 879-885 ;Shawler, D. 等, 1985, J. Immunol. 135 :1530-1535)。因此, 人们认识到, 需要降低治疗性抗体的免疫原性。已经用重组 DNA 技术来降低非人类抗体的免疫原性 (Boulianne, G. 等, 1984, Nature 312, 643-646 ;Morrison, S. 等, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81 :6851-6855 ;Riechmann, L. 等, 1988, Nature 332 :323-327 ;Jones, P. 等, 1986, Nature 321 :522-525 ;Queen, C. 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033)。然而, 人们也认识到, 全人单克隆抗体是用于治疗人类疾病的低免疫原性治疗药的潜在来源 (Little, M. 等, 2000, Immunol. Today 21 :364-70)。在种系构型中带有人免疫球蛋白 (Ig) 基因座的转基因小鼠的应用, 可供分离针对包括人免疫系统正常情况下耐受的人自身抗原在内的多种靶的高亲和性全人单克隆抗体 (Lonberg, N. 等, 1994, Nature 368 :856-9 ;Green, L. 等, 1994, Nature Genet. 7 :13-21 ;Green, L. 和 Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188 :483-95 ;Lonberg, N 和 Huszar, D., 1995, Int. Rev. Immunol. 13 :65-93 ;Bruggemann, M. 等, 1991, Eur. J. Immunol. 21 :1323-1326 ;Fishwild, D. 等, 1996, Nat. Biotechnol. 14 :845-851 ;Mendez, M. 等, 1997, Nat. Genet. 15 :146-156 ;Green, L., 1999, J. Immunol. Methods 231 :11-23 ;Yang, X. 等, 1999, Cancer Res. 59 :1236-1243 ;Bruggemann, M. 和 Taussig, M.J., Curr. Opin. Biotechnol. 8 :455-458, 1997)。人抗体基于轻链 (κ 和 λ) 和重链 (IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 和 IgM) 分为各种各样不同的类别。这些不同类别可能提供不同的治疗应用。例如, 不同重链同种型具有不同的与补体和基于 Fc 受体的与细胞的相互作用。其中某些重链类别 (IgM 和 IgA) 也可以形成多聚体, 因而增加了 Fc 和 V 区相互作用的价位。因此, 理想的是有一个产生所有同种型人单克隆抗

体的平台。然而,人 Ig 基因座 (1-2Mb) 的大尺寸对于将完整基因座导入转基因小鼠以重建完全多样化人抗体库而言是一个主要的障碍,因为甚至应用酵母人工染色体时,包含完整人 Ig 基因座的兆碱基大小的 DNA 片段的克隆也是困难的。最近,一种采用人类染色体自身作为基因转移载体的新方法,促进了将完整 IgH 和 Ig κ 基因座转移到转基因小鼠中,而无需将 DNA 片段克隆到人工 DNA 载体中 (Tomizuka, K. 等, 1997, Nature Genet. 16 :133-143 ; Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. 97 :722-727)。Tomizuka 等 (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727) 证明,将两个可遗传人染色体片段 (hCF) 导入其内源 IgH 和 Ig κ 基因座被失活的转基因小鼠品系中,所述两个染色体片段一个含有免疫球蛋白 (Ig) 重链基因座 (IgH, ~ 1.5 Mb),而另一个含有 κ 轻链基因座 (Ig κ , ~ 2 Mb)。在所得的双转染色体 (Tc)/双敲除 (KO) 小鼠中,相当大比率的体细胞保留两种 hCF,在无小鼠重链和 κ 轻链的情况下人 Ig 重链和 κ 轻链的高水平表达,表明缺乏 Ig 产生时的拯救。另外,4 种人 Ig γ 亚类的血清表达分布型类似在人类中观察到的分布型。所述转基因小鼠在用人血清白蛋白 (HSA) 免疫时产生抗原特异性人抗体应答,并且从这些小鼠中获得具有各种同种型的 HSA 特异性人单克隆抗体。Tomizuka 等 (出处同前) 的研究也证明含有 Ig κ 基因座的 hChr. 2 源性 hCF (hCF (2-W23)) 在小鼠中的不稳定性。所观察到的 κ 转染色体的不稳定性可能是最佳表达人 κ 轻链和产生人 κ 阳性杂交瘤的障碍。实际上,得自双 Tc/KO 小鼠的 2/3 的抗 HSA 杂交瘤是小鼠 λ 阳性 ($m\lambda^+$),并且发现大多数 (83%) IgG/ $m\lambda$ 杂交瘤丢失了 hCF (2-W23)。因此,需要保留 Tomizuka 等 (出处同前) 所述的转染色体所赋予特性的转基因动物,特别是基本上表达整个人重链同种型库、并且也表现出所导入人序列稳定性改善、允许提高获得全人抗体效率的动物。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供包含两个人免疫球蛋白基因座的转基因非人类哺乳动物,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个 是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座;并且其中所述基因座中仅一个是转染色体 (transchromosome) 的。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述转染色体是自主型的。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述转染色体包含一个人类 14 号染色体的片段。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述人轻链基因座与内源哺乳动物染色体相连。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述人重链基因座是转染色体的,并且所述人轻链基因座与内源哺乳动物染色体相连。在某些这样的转基因非人类哺乳动物中,所述人轻链基因座的至少一部分被克隆到 YAC 载体中。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述人重链基因座包含在 hCF (SC20) 中,而所述人轻链基因座包含在人 κ 轻链基因座转基因 KCo5 中。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述人轻链基因座是转染色体的基因座,而所述人重链基因座与内源哺乳动物染色体相连。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述转基因非人类哺乳动物是小鼠。在转基因非人类哺乳动物中,所述内源哺乳动物重链基因座和至少一个哺乳动物轻链基因座被失活。在某些这样的转基因非人类哺乳动物中,所述内源哺乳动物重链基因座和 κ 轻链基因座被失活。

[0008] 另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些转基因非人类哺乳动物中,所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0009] 本发明还提供用于产生多种表达人抗体序列的 B 细胞的方法,所述方法包括:提供包含两个人免疫球蛋白基因座的转基因非人类哺乳动物,其中所述两个人免疫球蛋白基

因座中的一个是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座;并且其中所述基因座中仅一个是转染色体的;并且对所述转基因非人类哺乳动物免疫,以产生多种表达人抗体序列的B细胞。在某些这样的方法中,所述转染色体是人类14号染色体的片段。在某些这样的方法中,所述人转染色体是人染色体片段SC20(hCF(SC20))。某些这样的方法还包括收集多种表达人抗体表达序列的B细胞。某些这样的方法还包括使所述多种B细胞与无限增殖化细胞融合形成杂交瘤。其它这样的方法还包括从所述杂交瘤收集所述人抗体序列。在某些这样的方法中,纯化所述人抗体序列。某些这样的方法还包括收集编码人抗体的序列。在某些这样的方法中,所述编码人抗体的序列是全长的。在某些方法中,所述编码人抗体的序列在转染细胞中表达。在某些这样的方法中,所述人轻链基因座包含得自天然人 κ 轻链基因座的未经重排的序列。在某些这样的方法中,所述人 κ 轻链基因座是插入的KCo5转基因。在某些这样的方法中,所述多种B细胞至少包含编码具有选自以下的第一同种型的抗体的第一B细胞:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。在某些方法中,所述IgA同种型是IgA₁或IgA₂。在某些方法中,所述IgG同种型是IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄。在某些这样的方法中,所述多种B细胞至少包含编码具有选自IgA、IgD、IgE、IgG和IgM的不同于所述第一同种型的第二同种型的抗体的第二B细胞。在某些方法中,所述多种B细胞至少包含5种B细胞,每种B细胞编码一种具有不同同种型的抗体,其中所述抗体的同种型分别为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,所述突变是Fc- γ RIIB基因失活。

[0010] 本发明还提供一种用于产生与预定抗原结合的人序列抗体的方法,所述方法包括下述步骤:用一种预定抗原免疫转基因非人类哺乳动物,其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座,而另一个是人轻链基因座;并且其中所述基因座中仅一个是转染色体的;并且从所述经免疫的非人类哺乳动物中收集所述人序列抗体。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,所述突变是Fc- γ RIIB基因失活。

[0011] 本发明的人序列抗体可以包括各种抗体同种型或其混合物,例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA₁、IgA₂、IgD和IgE。所述人序列抗体可以是全长的(例如IgG₁、IgG₄、IgA₁或IgA₂抗体),或者可以仅包括抗原结合部分(例如Fab、F(ab')₂、Fv或Fd片段)。某些人序列抗体是重组人序列抗体。本发明的人序列抗体通常可以与预定抗原以至少 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 和 10^{12}M^{-1} 的平衡缔合常数(K_a)结合。本发明的某些人序列抗体是单克隆抗体。本发明的某些人序列抗体是抗原特异性的。

[0012] 本发明还提供一种产生分泌人序列抗体的抗原特异性杂交瘤的方法,所述方法包括:用预定抗原免疫所述转基因非人类哺乳动物,其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座;并且其中所述基因座中仅一个是转染色体的;使得自所述转基因非人类哺乳动物的淋巴细胞与无限增殖化细胞融合形成杂交瘤细胞;并且测定所述杂交瘤细胞所产生的抗体与所述预定抗原的结合。在某些这样的方法中,超过50%的所述抗原特异性杂交瘤克隆分泌具有人重链和人轻链的抗体。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,

所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0013] 本发明还提供一种产生与预定抗原结合的人序列抗体的方法,所述方法包括下述步骤:用预定抗原免疫转基因非人类哺乳动物,其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座,其中仅一个基因座是转染色体的;并且筛选所形成的存在抗原反应性抗体的杂交瘤细胞。在某些这样的方法中,所述杂交瘤细胞以超过 20% 的效率亚克隆。在某些这样的方法中,所述抗原反应性抗体由培养物中的杂交瘤分泌。在某些这样的方法中,所述抗原反应性抗体是基本纯的。在某些方法中,配制所述基本纯的抗体用于治疗用途。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0014] 本发明还提供一种产生重排免疫球蛋白序列的方法,所述方法包括:提供一种转基因非人类哺乳动物,其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座,其中仅一个基因座是转染色体的;并且从所述转基因非人类哺乳动物中获得所述经重排的人免疫球蛋白序列。在某些方法中,所述获得步骤包括从所述转基因非人类哺乳动物收集含有所述经重排的人免疫球蛋白序列的 B 淋巴细胞。在这样的方法中,所述获得步骤包括从 B 淋巴细胞中分离和扩增 mRNA,以产生 cDNA。某些这样的方法还包括从所述 cDNA 分离和扩增重链和轻链可变区序列。本发明还提供得自所述 cDNA 的编码这些扩增重链可变区序列的分离的核酸。本发明也提供得自所述 cDNA 的编码所述扩增轻链可变区序列的分离的核酸。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0015] 另一方面,本发明提供本发明的编码所述人序列抗体、或者抗原结合部分的核酸分子。因此,包括本发明抗体编码核酸的重组表达载体和用这类载体转染的宿主细胞(或这些宿主细胞的后代)也包括在本发明中,通过培养这些宿主细胞制备本发明抗体的方法同样也包括在本发明中。某些这样的方法包括在致使所述核酸被表达的条件下培养所述宿主细胞;并且从所述培养的宿主细胞或其培养基中回收所述核酸。某些宿主细胞是真核细胞。某些这样的表达载体包含编码本发明重链和轻链可变区序列的核酸,其中所述重链和轻链可变区序列与控制所述核酸在宿主细胞中表达的调节序列操作上连接。

[0016] 本发明还提供一种产生人抗体展示文库的方法,所述方法包括:将免疫原导入所述转基因非人类哺乳动物中,其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座,其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座,而另一个基因座是人轻链基因座,其中仅一个基因座是转染色体的;从所述转基因非人类哺乳动物的淋巴细胞中分离编码人抗体链的核酸群体;并且生成展示所述抗体链的展示包装文库,其中一个文库成员包含编码抗体链的核酸,而所述抗体链由所述包装展示。在某些这样的方法中,当进行所述分离步骤时,所述转基因非人类哺乳动物缺乏对所述免疫原的可检测效价。在某些这样的方法中,所述免疫原是一种核酸。在某些这样的方法中,所述核酸编码一种膜结合受体。另一方面,所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变,其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中,所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0017] 本发明还提供一种产生与预定抗原结合的人序列抗体或其片段的方法,所述方法

包括下述步骤：用预定抗原免疫转基因非人类哺乳动物，其中所述转基因非人类哺乳动物包含两个人免疫球蛋白基因座，其中所述两个人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座，而另一个基因座是人轻链基因座，其中仅一个基因座是转染色体的；从所述经免疫的转基因非人类哺乳动物中收集抗体 V 区序列；将所收集的 V 区克隆到 DNA 载体中，产生一个表达文库；让所述文库表达，以鉴定编码与所述预定抗原结合的抗体或其片段的 V 区序列。另一方面，所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变，其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中，所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0018] 本发明还提供一种产生与预定抗原结合的人序列抗体或其片段的方法，所述方法包括下述步骤：用预定抗原免疫转基因非人类哺乳动物，其中所述转基因非人类哺乳动物包含至少两个人免疫球蛋白基因座，其中所述人免疫球蛋白基因座中的一个是人重链基因座，而另一个基因座是人轻链基因座；并且其中至少一个基因座是转染色体的；从所述经免疫的转基因非人类哺乳动物的 B 细胞或从通过使所述 B 细胞与无限增殖化细胞融合产生的杂交瘤中，分离编码至少一个人抗体 V 区的 cDNA；将所述 cDNA 克隆到表达载体中；将所述载体导入宿主细胞中；培养所述宿主细胞；并且从所述宿主细胞或其培养基中收集所述人序列抗体或其片段。在某些这样的方法中，所述分离步骤通过 PCR 进行。在某些这样的方法中，所述分离步骤通过用至少一种 DNA 探针筛选 cDNA 文库来进行。在某些这样的方法中，所述分离步骤通过噬菌体展示文库筛选来进行。在某些这样的方法中，所述 cDNA 编码全长人抗体序列。在某些方法中，所收集的人序列抗体同种型不同于所述经免疫的转基因非人类哺乳动物的抗体生产细胞的同种型。另一方面，所述转基因非人类哺乳动物还包含基因突变，其中所述突变增强对自身抗原的免疫应答。在某些这样的方法中，所述突变是 Fc- γ RIIB 基因失活。

[0019] 本发明还提供一种改进表达与预定抗原反应的人抗体的转染色体小鼠杂交瘤细胞的稳定性的方法，所述方法包括：让包含转染色体上的第一人免疫球蛋白基因座的第一小鼠和包含插入内源小鼠染色体中的第二人免疫球蛋白基因座的第二小鼠一起配种；从所述育种中获得第三小鼠，所述第三小鼠既包含所述第一人免疫球蛋白基因座，又包含所述第二人免疫球蛋白基因座；用所述预定抗原免疫所述第三小鼠或其后代；从所述经免疫的小鼠中收集 B 细胞；并且使所述 B 细胞与无限增殖化细胞融合，获得表达与所述预定抗原反应的人抗体的杂交瘤细胞。某些这样的方法还包括：在培养基中培养所述杂交瘤细胞；测试所述培养基，以鉴定表达与所述预定抗原反应的人抗体的杂交瘤细胞的存在；稀释所述杂交瘤细胞；并且培养所述经稀释的杂交瘤细胞，获得表达与所述预定抗原反应的人单克隆抗体的克隆细胞系。在某些这样的方法中，从至少 50% 的经鉴定的杂交瘤细胞获得所述克隆细胞系。

[0020] 另一方面，本发明提供一种分泌具有 IgA 同种型的人序列抗体的小鼠杂交瘤细胞，所述人序列抗体以至少 10^{10}M^{-1} 的平衡缔合常数 (K_a) 与特定抗原结合。

[0021] 另一方面，本发明提供一种具有 IgA 同种型的人序列抗体，所述抗体以至少 10^{10}M^{-1} 的平衡缔合常数 (K_a) 与特定抗原结合。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1. C μ 打靶载体的设计。A) C μ 区的小鼠基因组 DNA。B) C μ 打靶载体。C) 被所述 C μ 打靶载体同源重组的小鼠基因组 DNA。

- [0024] 图 2. 人 Ig μ 、 γ 、 κ 和小鼠 λ 链在双 TC/KO 和杂种小鼠中的血清浓度。
- [0025] 图 3. 抗 CD4 人 Ig γ 在经免疫的双 TC/KO 和杂种小鼠中第 34 天时的血清浓度。
- [0026] 图 4. 抗 CD4 人 Ig κ 在经免疫的双 TC/KO 和杂种小鼠中第 34 天时的血清浓度。
- [0027] 图 5. 在每组 (N = 5) 中显示出最高血清效价的双 TC/KO 和杂种小鼠中在第 34 天时抗 CD4 人 Ig γ 应答的时程。
- [0028] 图 6. 在每组 (N = 5) 中显示出最高血清效价的双 TC/KO 和杂种小鼠在第 34 天时抗 CD4 人 Ig κ 应答的时程。
- [0029] 图 7. KM2-3 杂交瘤细胞的生长曲线和抗 CD4 人单克隆抗体的产生。
- [0030] 图 8. 抗 GCSF 人 Ig γ 在经免疫的双 TC/KO 和杂种小鼠中第 34 天时的血清浓度。
- [0031] 图 9. 抗 GCSF 人 Ig κ 在经免疫的双 TC/KO 和杂种小鼠中第 34 天时的血清浓度。
- [0032] 图 10. 在每组 (N = 5) 中显示出最高血清效价的双 TC/KO 和杂种小鼠在第 34 天时抗 GCSF 人 Ig γ 应答的时程。
- [0033] 图 11. 在每组 (N = 5) 中显示出最高血清效价的双 TC/KO 和杂种小鼠在第 34 天时抗 GCSF 人 Ig κ 应答的时程。
- [0034] 图 12. 抗 CTLA-4 人单克隆抗体的阻断活性的剂量反应曲线。
- [0035] 图 13. 用单克隆抗体抑制 CTLA-4 (生物素) 与 B7.2 细胞的结合。
- [0036] 图 14. 杂种 (Fc) 小鼠血清中对牛 C-IV 的增强的应答。
- [0037] 发明详述
- [0038] 术语“转染色体”是指可以被转移到非人类哺乳动物细胞中的染色体或其片段。一种导入所述转染色体的示例性细胞为 ES 细胞。转染色体可以包含选择标记,并且可以来源于非人类哺乳动物的不同物种。转染色体可以包含人染色体的一部分。术语“转染色体的 (transchromosomal)”或者“转染色体 (transchromosome)”是指“保留转染色体”或“转染色体的 (be of transchromosome)”。
- [0039] 本发明的人序列抗体可以在转基因非人类哺乳动物如转基因小鼠中生产,所述人序列抗体能够通过经历抗体 V-D-J 重组以及对于非 IgM/ 非 IgD 而言的同种型转换,产生针对各种各样抗原的多种人 (例如单克隆或多克隆) 抗体同种型 (例如 IgM、IgD、IgG、IgA 和 / 或 IgE)。因此,本发明的各个方面包括抗体和抗体片段及其药用组合物、以及用于制备这样的单克隆抗体的转基因非人类哺乳动物、B 细胞和杂交瘤。
- [0040] 除非另有说明,术语“患者”或“受治疗者”可互换使用,是指哺乳动物如人类患者和非人类灵长类动物、和实验动物如兔子、大鼠和小鼠、以及其它动物。
- [0041] 术语“治疗”包括给予本发明的化合物或药物,以预防或延迟症状、并发症或疾病的生物化学指标的发生、缓解症状或阻滞或抑制疾病、病症或失调 (例如自身免疫病) 的进一步发展。治疗可以是预防性的 (以预防或延迟疾病发生,或者预防其临床或亚临床症状表现)、或者在疾病表现后症状的治疗性抑制或缓解。
- [0042] 一般而言,短语“很好耐受的”是指在健康状况下没有由于所述治疗而发生的并且可能影响治疗决定的不利变化。
- [0043] 本文使用的术语“淋巴细胞”具有本领域的正常含义,是指在血液、淋巴和淋巴组织中存在的任何单核非吞噬性白细胞,即 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。
- [0044] 短语“T 淋巴细胞亚群”或“T 细胞亚群”是指特征为表达特定细胞表面标记的 T

淋巴细胞或 T 细胞 (参见 Barclay, A. N. 等 (编著), 1997, THE LEUKOCYTE ANTIGEN FACTS BOOK, 2ND. EDITION, Academic Press, London, United Kingdom; 该文献通过引用结合到本文中用于所有目的)。

[0045] 术语“细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 -4”、“CTLA-4”、“CTLA4”、“CTLA-4 抗原”和“CD152”(参见例如 Murata, 1999, Am. J. Pathol. 155 :453-460) 可互换使用, 包括人 CTLA-4 的变异体、同种型、物种同系物和具有至少一种与 CTLA-4 共同的表位的类似物 (参见例如 Balzano, 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7 :28-32)。

[0046] 人 CTLA-4 的完整 cDNA 序列的 Genbank 登记号为 L15006。氨基酸 1-37 的区为前导肽; 38-161 为胞外 V 样结构域; 162-187 为跨膜结构域; 且 188-223 为胞质结构域。所述核苷酸序列的变异体已有报道, 包括 49 位的 G → A 转变、272 位的 C → T 转变和 439 位的 A → G 转变。小鼠 CTLA-4 的完整 DNA 序列的 EMBL 登记号为 X05719 (Brunet 等, 1987, Nature 328 :267-270)。氨基酸 1-35 区为前导肽。

[0047] 术语“表位”是指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子如氨基酸或糖侧链的化学活性表面集合 (surface grouping) 组成, 通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于, 在变性溶剂存在下, 与前者的结合而非与后者的结合丧失。

[0048] 完整的“抗体”至少包含通过二硫键互联的两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链。每条重链由重链可变区 (在此缩写为 VH) 和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 -CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区 (在此缩写为 VL) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 -CL 组成。VH 区和 VL 区还可以进一步细分为散布有更为保守的区 (称为构架区 (FR) 的超变区 (称为互补性决定区 (CDR)。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成, 从氨基末端至羧基末端按以下顺序排布: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有一个与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以通过细胞受体如 Fc 受体 (例如 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIII 和 FcR η) 和经典补系统的第一组分 (C1q), 介导免疫球蛋白与包括免疫系统的各种细胞 (例如效应细胞) 在内的宿主组织或因子的结合。术语抗体包括完整抗体中保留结合抗原能力的抗原结合部分。抗原结合部分的实例包括 (i) Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 包含在铰链区通过二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 由 VH 和 CH1 结构域组成; (iv) Fv 片段, 由抗体一个臂的 VL 和 VH 结构域组成, (v) dAb 片段 (Ward 等, 1989 Nature 341 :544-546), 由一个 VH 结构域组成; 和 (vi) 分离的互补性决定区 (CDR)。此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码, 但可以采用重组方法, 将它们用一个合成接头连接起来, 所述合成接头使它们能够成为一个单一蛋白链, 其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子 (称为单链 Fv (scFv); 参见例如 Bird 等, 1988, Science 242 :423-426; 和 Huston 等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :5879-5883)。这样的单链抗体包括在术语“抗体”范围内。通过重组技术或者酶促或化学切割完整的抗体, 可以制备片段。

[0049] 术语“人序列抗体”包括具有来源于人免疫球蛋白序列的可变区和恒定区 (如果有的话) 的抗体。本发明的人序列抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如通过体外随机诱变或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而, 本文所用的术语“人序列抗体”并不包括其中足以赋予抗原特异性且来源于另一哺乳动物物

种（例如小鼠）种系的完整 CDR 序列已被移植到人构架序列上的抗体（即人源化抗体）。

[0050] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一的结合特异性和亲和性。因此，术语“人单克隆抗体”是指具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区（如果有的话）、显示出单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中，所述人单克隆抗体由杂交瘤产生，所述杂交瘤包括得自具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人类哺乳动物（例如转基因小鼠）、与无限增殖化细胞融合的 B 细胞。

[0051] 术语“双克隆 (diclonal) 抗体”是指针对一种抗原的至少两种抗体的制备物。通常，不同的抗体结合不同的表位。

[0052] 术语“寡克隆 (oligoclonal) 抗体”是指针对一种抗原的 3-100 种不同抗体的制备物。通常，这样一种制备物中的抗体与许多不同的表位结合。

[0053] 术语“多克隆抗体”是指指针对一种抗原的不止一种（两种或两种以上）不同抗体的制备物。通常，这样一种制备物包括与许多不同的表位结合的抗体。

[0054] 本发明提供针对各种各样抗原的人序列抗体，包括抗人 CTLA-4、人 G-CSF、人 HSA、人 CD4 和人 EGFR 的人抗体。本发明的人抗体包括阻断或拮抗由细胞表面受体（如人 CTLA-4 受体和人 CD4 共同受体）所转导信号的抗体。这些抗体中的某些抗体可以与人 CTLA-4 上的表位结合，以抑制 CTLA-4 与人 B7 反受体相互作用。同样所述抗体中的某些抗体可以与人 CD4 上的表位结合，以抑制 CD4 与人 II 类 MHC 相互作用。因为人 CTLA-4 与人 B7 的相互作用转导一种信号，导致带有人 CTLA-4 受体的 T 细胞失活，所以对所述相互作用的拮抗有效诱导、增加或延长带有人 CTLA-4 受体的 T 细胞的活化，从而延长或增强免疫应答。“封闭性抗体”是指在抗体结合位点与人 CTLA-4 配体结合位点之比大于 1 : 1 并且抗体的浓度高于 10^{-8} M 的条件下，将可溶性人 CTLA-4 与表达人 B7 配体的细胞的结合降低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99% 或 99.9% 的抗体。

[0055] 本发明还提供针对各种各样人抗原的人序列 IgA 抗体。示例性的 IgA 抗体包括 CD4、G-CSF、CTLA-4 和 EGFR。因为 IgA 抗体可以形成二聚体，所以这种 IgA 抗体可以具有改进的交联特性。

[0056] 有时称为多价制备物的其它抗体制备物与细胞表面受体如人 CTLA-4 结合，其结合方式使得同一细胞上的多个人 CTLA-4 受体交联。

[0057] 通过组合具有不同表位特异性的可溶性二价抗体，也可以完成交联。这些多克隆抗体制备物包含与所述抗原上不同表位结合的至少两对重链和轻链，使得由于抗体介导的交联而可以转导信号。

[0058] 术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、构建或分离的本发明的所有人序列抗体，例如从对于人免疫球蛋白基因为转基因的动物（例如小鼠）中分离的抗体（在下文有进一步的描述）；利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组组合人抗体文库分离的抗体、或者通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它 DNA 序列上的任何其它方法制备、表达、构建或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区（如果有的话）。然而，可以对这样的抗体进行体外诱变（或者当使用对于人 Ig 序列为转基因的动物时，进行体内体细胞诱变），因此所述重组抗体的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是虽然来源于人种系 VH 和 VL 序列并且与之相关、但可能在体内于

通常情况下并不存在于人抗体种系库中的序列。

[0059] “异源抗体”是对于产生这种抗体的转基因非人类生物体而言定义的。该术语是指具有对应于在不包括所述转基因非人类动物的生物体中存在的、一般得自除所述转基因非人类动物以外的物种的氨基酸序列或编码核酸序列的抗体。

[0060] “异源杂种抗体”是指具有来源于不同生物体的轻链和重链的抗体。例如，与鼠轻链结合的人重链的抗体是一种异源杂种抗体。

[0061] 术语“基本纯的”或“分离的”是指已经鉴定并且从其天然环境组分中分离和 / 或回收使其成为所存在的主要种类的目标种类 (objectspecies) (例如本发明的抗体) (即以摩尔浓度计, 它比组合物中的任何其它个别种类更为丰富); “基本纯”或“分离的”组合物也指其中所述目标种类至少占所存在的所有大分子种类的大约 50% (以摩尔浓度计)。基本纯或分离的组合物也可以占所述组合物中所存在的所有大分子种类重量的大约 80-90% 以上。分离的目标种类 (例如本发明的抗体) 也可以被纯化至基本均质 (在所述组合物中用常规检测法检测不到污染种类), 其中所述组合物基本上由单一大分子种类的衍生物组成。例如, 分离的抗人 CTLA-4 抗体可以基本上不含不与人 CTLA-4 结合而与不同抗原结合的其它抗体。此外, 与人 CTLA-4 的一种表位、同种型或变异体特异性结合的分离的抗体却可能具有与其它相关抗原如得自其它物种的抗原 (例如 CTLA-4 物种同系物) 的交叉反应性。此外, 本发明的分离抗体基本上不含其它细胞物质 (例如非免疫球蛋白相关蛋白) 和 / 或化学物质。

[0062] “特异性结合”是指相对于其它非特定抗原而言, 抗体优先与特定抗原结合。短语与抗体“特异性地 (或选择性地) 结合”是指确定在不均一蛋白质群体和其它生物制品中存在所述蛋白质的结合反应。通常, 所述抗体以至少大约 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 或 $10^7 M^{-1}$ 、或者大约 $10^8 M^{-1}$ – $10^9 M^{-1}$ 、或者大约 $10^{10} M^{-1}$ – $10^{11} M^{-1}$ 或更高的缔合常数 (K_a) 结合, 并且与所述特定抗原的结合亲和力至少两倍于与除所述特定抗原或密切相关抗原以外的非特定抗原 (例如 BSA、酪蛋白) 结合的亲和力。短语“识别一种抗原的抗体”和“对一种抗原特异性的抗体”在此与术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。预定的抗原是在选择与该抗原结合的抗体之前选择出的抗原。

[0063] 短语“特异性结合”当指肽时, 是指具有仅与靶分子或主要与靶分子结合的中等或高结合亲和力的肽分子。短语“特异性结合”是指确定在不均一蛋白质群体和其它生物制品中存在靶蛋白的结合反应。因此, 在指定的测定条件下, 所述特指的结合部分优先与特定靶蛋白结合, 而不以显著量与试验样品中存在的其它组分结合。在这种条件下与靶蛋白的特异性结合可能需要根据其对特定靶抗原的特异性而选择出的一种结合部分。可以使用各种各样的测定形式, 来选择与特定蛋白特异性反应的配体。例如, 使用固相 ELISA 免疫测定、免疫沉淀、Biacore 和蛋白质印迹法来鉴定与所述抗原特异性反应的肽。通常, 特异性或选择性反应将至少两倍于本底信号或噪声, 更通常在 10 倍于本底以上。

[0064] 术语抗体的“高亲和性”是指平衡缔合常数 (K_a) 至少为大约 $10^7 M^{-1}$ 、至少大约 $10^8 M^{-1}$ 、至少大约 $10^9 M^{-1}$ 、至少大约 $10^{10} M^{-1}$ 、至少大约 $10^{11} M^{-1}$ 或者至少大约 $10^{12} M^{-1}$ 或更高, 例如高达 $10^{13} M^{-1}$ 或 $10^{14} M^{-1}$ 或更高。然而, “高亲和性”结合对于其它抗体同种型而言可能改变。

[0065] 本文所用的术语“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡缔合常数。这一常数的单位为 $1/M$ 。

[0066] 本文所用的术语“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。这一常数的单位为 M。

[0067] 本文所用的术语“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的动态 (kinetic) 缔合常数。这一常数的单位为 1/Ms。

[0068] 本文所用的术语“ k_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的动态解离常数。这一常数的单位为 1/s。

[0069] “特定抗体-抗原相互作用”是指测量平衡常数和动态常数的试验条件。

[0070] “同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，分别限定抗体的同种型为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。另外的结构变异鉴定了 IgG (例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄) 和 IgA (例如 IgA₁ 和 IgA₂) 的不同亚型。

[0071] “同种型转换”是指抗体的类别或同种型从一种 Ig 类别变为其它 Ig 类别之一的现象。

[0072] “非转换同种型”是指当不发生同种型转换时产生的重链的同种型类别；编码所述非转换同种型的 CH 基因通常是紧接功能性重排 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。同种型转换分为经典或非经典同种型转换。经典同种型转换通过涉及所述转基因中至少一个转换序列区的重组事件而发生。非经典同种型转换可以通过例如人 σ_μ 和人 Σ_μ (δ 相关缺失) 之间同源重组而发生。可供选择的非经典转换机制例如其中有转基因间和 / 或染色体间重组可能发生，而完成同种型转换。

[0073] 术语“转换序列”是指负责转换重组的那些 DNA 序列。“转换供体”序列通常为 μ 转换区，位于在所述转换重组期间将被缺失的构建体区的 5' (即上游)。“转换受体”区位于构建体待缺失区和取代恒定区 (例如 γ 、 ϵ 等) 之间。由于没有总是发生重组的特定位点，故此最终的基因序列根据所述构建体通常是不可预测的。

[0074] “糖基化模式”定义为与蛋白质共价连接、更具体地说与免疫球蛋白共价连接的糖单位的模式。考虑到本领域技术人员会认识到，与所述转基因 CH 基因来源的物种相比，所述异源抗体的糖基化模式与所述转基因非人类动物物种中的所述糖基化模式更为相似，所以异源抗体的糖基化模式可以被描述为与在所述转基因非人类动物的物种所产生的抗体上正常发生的糖基化模式相似。

[0075] 术语“天然存在的”当用于物体时，是指物体可以在自然界中发现的事实。例如，生物体 (包括病毒) 中存在的、可以从自然界的来源分离并且未经人类在实验室有意修饰的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

[0076] 术语“免疫球蛋白基因座”是指包含 B 细胞或 B 细胞前体可以用以表达免疫球蛋白肽的信息的遗传元件或一组相关的遗传元件。这种肽可以是重链肽、轻链肽，或者是重链肽和轻链肽的融合体。就未经重排的基因座而言，所述遗传元件被 B 细胞前体装配，形成编码免疫球蛋白肽的基因。就经重排的基因座而言，编码免疫球蛋白肽的基因包含在所述基因座中。

[0077] 术语“重排的”是指其中在分别编码基本上完整的 VH 或 VL 结构域的构象中 V 区段紧邻 D-J 或 J 区段定位的重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型。通过与种系 DNA 比较，可以鉴定重排的免疫球蛋白基因座；重排的基因座具有至少一个重组的七聚体 / 九聚体同源性元件。

[0078] 涉及 V 区段的术语“未经重排的”或“种系构型”是指其中 V 区段未经过重组而紧邻 D 区段或 J 区段的构型。

[0079] 术语“核酸”或“核酸分子”是指或者单链形式或者双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,除非另有说明,可以包括可以以与天然存在的核苷酸类似的方式起作用的天然核苷酸的已知类似物。

[0080] 涉及编码与所述抗原结合的抗体或抗体部分(例如 VH、VL、CDR3)的核酸的术语“分离的核酸”,是指其中编码所述抗体或抗体部分的核苷酸序列不合编码与除例如 CTLA-4 以外的抗原结合的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列的核酸,所述其它序列在人基因组 DNA 中可能天然位于所述核酸的侧翼。

[0081] 在两种核酸或多肽方面的术语“基本相同”是指当在最大对应方面进行比较和比对时,采用以下序列比较法和/或通过目测检查测定,具有至少约 80%、约 90%、约 95%或更高的核苷酸或氨基酸残基同一性的两个或两个以上序列或亚序列。这样的“基本相同的”序列通常被认为是同源的。“基本同一性”可以在序列中至少长约 50 个残基的区内、在至少约 100 个残基的区内、或者在至少 150 个残基的区内或者在两个待比较的全长序列内存在。如下所述,通过运用 Kabat 的编号方案,任两个抗体序列可以仅以一种方式进行序列对比。因此,对于抗体而言,同一性百分比具有独特和已有很好定义的含义。

[0082] 得自免疫球蛋白成熟重链和轻链可变区的氨基酸被分别命名为 Hx 和 Lx,其中 x 是依照 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991) 的方案,指定氨基酸位置的数字。Kabat 列出了每个亚组抗体的许多氨基酸序列,并且列出了该亚组中每个残基位置的最常存在的氨基酸,从而产生一个共有序列。Kabat 采用给一个所列序列中的每个氨基酸指定一个残基编号的方法,这种指定残基编号的方法在本领域中已经成为标准。通过以保守氨基酸为坐标将所述抗体与 Kabat 中的共有序列之一进行序列比对,Kabat 方案可延伸至在其纲要中不包括的其它抗体。应用 Kabat 编号系统可容易地标识不同抗体中相同位置上的氨基酸。例如,人抗体 L50 位的氨基酸占据与小鼠抗体氨基酸位置 L50 等同的位置。同样,当依照 Kabat 编号约定(Kabat numbering convention)对由相应核酸编码的氨基酸序列进行比对时,对编码抗体链的核酸进行序列比对。一个可供选择的结构限定已经由 Chothia 等提出(Chothia, 1987 J. Mol. Biol. 196 :901-917 ;Chothia 等,1989, Nature 342 :878-883 ;和 Chothia 等, J. Mol. Biol. 186 :651-663 (1989),所述文献通过引用结合到本文中用于所有目的)。

[0083] 短语“选择性(或特异性)杂交”是指当一种分子与特定核苷酸序列当所述序列存在于复杂混合物(例如总细胞或文库 DNA 或 RNA)中时在严格性杂交条件下的结合、形成双链体或杂交,其中检测到至少约 10 倍于本底的所述特定核苷酸序列。在一个实施方案中,可以根据核酸与在其它情况下确定属于本发明范围内的一种核酸(例如本文所述的示例性序列)在严格性条件下杂交的能力,确定所述核酸在本发明范围内。

[0084] 短语“严格性杂交条件”是指探针将与通常在复杂的核酸混合物中的其靶亚序列杂交、而不与其它序列以显著量(阳性信号(例如本发明核酸的鉴定)约 10 倍于本底杂交)杂交的条件。严格性条件依赖于序列,并且在不同情况下有所不同。较长的序列在较高温度下特异性杂交。关于核酸杂交的多方面的指南在例如以下文献中找到 Sambrook 编著, MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor

Laboratory, (1989) ;CURRENTPROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel 编 著 . John Wiley & Sons, Inc., New York(1997) ;LABORATORY TECHNIQUES INBIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY :HYBRIDIZATIONWITH NUCLEIC ACID PROBES, PART I. Theory and Nucleic AcidPreparation, Tijssen 编著 . Elsevier, N. Y. (1993).

[0085] 一般而言,严格性条件选择为在限定的离子强度 pH 下低于特定序列热解链温度 (T_m) 约 5–10℃。 T_m 为平衡条件下 50% 与靶互补的探针与靶序列杂交的温度 (在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下) (当靶序列过量存在时,在 T_m 下,平衡时有 50% 所述探针被占用)。严格性条件将是其中盐浓度低于约 1.0M 钠离子、通常约 0.01–1.0M 钠离子浓度 (或其它盐)、pH 7.0–8.3 且对于短探针 (例如 10–50 个核苷酸) 温度至少为约 30℃、而对于长探针 (例如超过 50 个核苷酸) 至少为约 60℃的条件。严格性条件也可以通过加入去稳定剂如 Sambrook (下文所述) 所述的甲酰胺来达到。对于高严格性杂交,阳性信号至少两倍于本底、优选 10 倍于本底杂交。示例性的高严格性或严格性杂交条件包括:50% 甲酰胺、5×SSC 和 1% SDS、于 42℃保温,或者 5×SSC 和 1% SDS、于 65℃保温;在 0.2×SSC 和 0.1% SDS 中于 65℃洗涤。对于选择性或特异性杂交,阳性信号 (例如本发明核酸的鉴定) 约 10 倍于本底杂交。用以鉴定本发明范围内的核酸的严格性杂交条件包括例如在包含 50% 甲酰胺、5×SSC 和 1% SDS 的缓冲液中于 42℃杂交,或者在包含 5×SSC 和 1% SDS 的缓冲液中于 65℃杂交,洗涤条件都为 0.2×SSC 和 0.1% SDS、65℃。在本发明中,可以在标准 DNA 印迹中,在严格性条件下用此中公开的核酸序列,鉴定包含本发明核酸的基因组 DNA 或 cDNA。用于这种杂交的其它严格性条件 (用以鉴定本发明范围内的核酸) 是包括在 40% 甲酰胺、1MNaCl、1% SDS 的缓冲液中于 37℃杂交的条件。

[0086] 然而,杂交形式的选择并不重要,正是洗涤条件的严格性建立了确定核酸是否在本发明范围内的条件。用以鉴定本发明范围内的核酸的洗涤条件包括例如约 0.02M 的盐浓度、pH 7 和至少约 50℃或约 55℃至约 60℃的温度;或者约 0.15M NaCl 的盐浓度、72℃达约 15 分钟;或者 0.2×SSC 的盐浓度、至少约 50℃或约 55℃至 60℃的温度达约 15 分钟至约 20 分钟;或者;杂交复合体用盐浓度约 2×SSC、含 0.1% SDS 的溶液于室温洗涤 2 次,每次 15 分钟,然后用含 0.1% SDS 的 0.1×SSC 于 68℃洗涤 2 次,每次 15 分钟;或者等同条件。参见 Sambrook、Tijssen 和 Ausubel 关于 SSC 缓冲液和等同条件的描述。

[0087] 术语“序列同一性”是指氨基酸序列或核苷酸序列之间相似性的度量,可以采用本领域已知的方法例如以下所述的方法测量:

[0088] 涉及两个或两个以上核酸序列或多肽序列的术语“相同”或“同一性”百分率,是指当在比较窗或者指定区域内的最大对应方面进行比较和比对时,采用以下序列比较算法或者通过人工序列比对和目测检查测量,相同或者具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸 (即 60% 同一性、优选 65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性) 的两个或两个以上的序列或亚序列。

[0089] 涉及两种核酸或多肽的短语“基本相同”是指当在最大对应方面进行比较和比对时,采用以下序列比较算法或者通过目测检查测量,核苷酸或氨基酸残基的同一性至少 60%、通常至少 70%、优选至少 80%、最优选至少 90% 或至少 95% 的两个或两个以上的序列或亚序列。优选在长度至少为约 50 个碱基或残基的序列区域内、更优选在至少约 100 个碱基或残基的区域内存在显著同一性,最优选所述序列在至少约 150 个碱基或残基内基本

相同。在一个最优化的实施方案中,所述序列在全长编码区内基本相同。

[0090] 关于序列比较,通常将一个序列作为参比序列,将待测序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将待测序列和参比序列输入计算机,必要时指定亚序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可以使用缺省程序参数,或者可以指定参数。根据所述程序参数,序列比较算法则计算待测序列相对于参比序列的序列同一性百分比。关于核酸和蛋白质的序列比较,可以使用 BLAST 和 BLAST 2.0 算法以及以下论述的缺省参数。

[0091] 本文所用的“比较窗”包括涉及具有选自 20-600、通常约 50-200、更通常约 100-150 的任一数目的连续位置、其中在将一个序列与具有相同数目的连续位置的参比序列在两个序列最佳比对后可以将其进行比较的区段。将序列比对以供比较的方法是本领域众所周知的。可以例如通过以下算法,进行用于比较的最佳序列比对:Smith 和 Waterman 的局部同源性算法,1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman 和 Wunsch 的同源性比对算法,1970, *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法,1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2444; 这些算法的计算机工具 (FASTDB(Intelligenetics)、BLAST(National Center for Biomedical Information)、Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI); 或者人工序列比对和目测检查(参见例如 Ausubel 等, 1987(1999 Suppl.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.)。

[0092] 适合于测定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个优选实例是 FASTA 算法,它在 Pearson, W. R. 和 Lipman, D. J., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2444 中有描述。也参见 W. R. Pearson, 1996, *Methods Enzymol.* 266:227-258。在 DNA 序列的 FASTA 算法中用来计算同一性百分比的优选参数是优选的, BL50 Matrix 15:-5, k-tuple = 2; joining penalty = 40, optimization = 28; gap penalty = -12, gap length penalty = -2; 和 width = 16。

[0093] 适用于测定序列同一性和序列相似性百分比的另一个优选的算法实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,它们分别在 Altschul 等, 1977, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 和 Altschul 等, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 中有描述。使用 BLAST 和 BLAST 2.0 和本文所述的参数,来测定本发明的核酸和蛋白质的序列同一性百分比。用于进行 BLAST 分析的软件公众可通过 the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到。该算法包括首先通过鉴定在查询序列中与数据库序列中相同长度的字串比对时或者匹配或者满足某些正数值最低分值 T 的长度 W 的短字串,来鉴定高分序列配对 (HSP)。T 被称为邻近字串最低分值 (Altschul 等, 参见上文)。这些原始邻近字串命中作为起始搜索以发现含有它们的更长 HSP 的种子。只要累积序列比对分值可以增加,字串命中则以两个方向沿每个序列延伸。对于核苷酸序列,使用参数 M(一对匹配残基的奖分 (reward score); 总是 > 0) 和 N(错配残基的罚分 (penalty score); 总是 < 0), 计算累积分值。对于氨基酸序列,使用打分矩阵来计算累积分值。字串命中在每个方向的延伸当遇到下述情况之一时终止:累积序列比对分值比其获得的最大值低数量 X; 累积分值为零或零以下,这是由于一个或多个负打分残基比对的累积所致;或者到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定所述比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)

使用的缺省字长 (wordlength) (W) 为 11, 期望值 (Expectation) (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$, 并且比较两条链。对于氨基酸序列而言, BLASTP 程序使用的缺省字长 (W) 为 3, 期望值 (E) 为 10, 使用 BLOSUM62 打分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :10915) 序列比对 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$, 并且比较两条链。

[0094] BLAST 算法也进行两个序列之间相似性的统计学分析 (参见例如 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 :5873-5787)。BLAST 算法提供的一种相似性测定是最小和概率 ($P(N)$), 它提供两个核苷酸序列或氨基酸序列可能偶然发生匹配的指标的指标。例如, 如果待测核酸与参比核酸比较中的最小和概率低于大约 0.2, 更优选低于大约 0.01, 最优选低于大约 0.001, 则认为待测核酸与参比序列相似。

[0095] 有用算法的另一个实例是 PILEUP。PILEUP 运用渐近配对序列比对, 由一组相关序列创建多序列比对, 以显示相关性和序列同一性百分比。它也绘出进化树或分枝图 (dendogram), 以显示用来创建所述序列比对的聚类关系。PILEUP 采用 Feng 和 Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35 :351-360 的渐近序列比对方法的简化方法。所使用的方法类似于 Higgins 和 Sharp, 1989, CABIOS 5 :151-153 描述的方法。所述程序可以比对多达 300 个序列, 每个序列最大长度为 5,000 个核苷酸或氨基酸。所述多序列比对法始于两个最为相似序列的配对比对, 产生一组两个经比对的序列。然后该组序列与下一个最相关的序列或下一组经比对的序列进行比对。通过两个个别序列的配对比对的简单延伸, 将两组序列进行比对。通过一系列渐近配对序列比对, 完成最终的序列比对。通过指定具体序列及其序列比较区的氨基酸或核苷酸坐标并且指定程序参数, 运行该程序。例如, 运用 PILEUP, 采用以下参数: 缺省空位加权 (default gap weight) (3.00)、缺省空位长度加权 (default gap lengthweight) (0.10) 和加权末端空位 (weighted end gap), 可以将参比序列与其它待测序列进行比较, 以确定序列同一性关系百分比。可以从 GCG 序列分析软件包得到 PILEUP, 例如 7.0 版本 (Devereaux 等, 1984, Nuc. Acids Res. 12 :387-395)。

[0096] 适用于多 DNA 和氨基酸序列比对的算法的另一优选实例是 CLUSTALW 程序 (Thompson, J. D. 等, 1994, Nucl. Acids. Res. 22 :4673-4680)。ClustalW 在多组序列之间进行多配比较, 然后根据同源性将它们装配为一个多序列比对。Gap open (空位开放) 罚分和 Gap extension (空位拓展) 罚分分别为 10 和 0.05。对于氨基酸序列比对, 可以用 BLOSUM 算法作为蛋白质分子量矩阵 (Henikoff 和 Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :10915-10919)。

[0097] 本发明的核酸以全细胞、细胞裂解液或者部分纯化或基本纯的形式存在。当通过标准技术, 包括碱/SDS 处理、CsCl 分带 (CsCl banding)、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其它方法 (参见例如本文论述的 Sambrook、Tijssen 和 Ausubel 的方法, 所述文献通过引用结合到本文中用于所有目的), 将核酸纯化而使其与其它细胞组分或其它污染物如其它细胞核酸或蛋白质分离时, 则所核酸是“分离的”或者“成为基本纯的”。本发明的核酸序列和用于实施本发明的其它核酸, 无论是 RNA、cDNA、基因组 DNA, 还是其杂合体, 都可以从各种各样的来源分离, 对其遗传工程改造、扩增和 / 或重组表达。可以使用任何重组表达系统, 除细菌外, 包括例如酵母、昆虫或哺乳动物系统。另一方面, 可以在体外化学合成这些核酸。核酸操作的技术如亚克隆到表达载体中、标记探针、测序和杂交, 在科学文献和专利文献中有全面的描述, 参见例如 Sambrook, Tijssen 和 Ausubel。可以采用本领域技术人员

熟知的多种通用方法中的任何一种,对核酸进行分析和定量。这些包括例如分析性生物化学方法例如 NMR、分光光度法、射线照相术、电泳、毛细管电泳、高效液相层析 (HPLC)、薄层层析 (TLC) 和超扩散层析;各种免疫学方法,例如流体或凝胶沉淀素反应、免疫扩散(单向或双向)、免疫电泳、放射免疫测定 (RIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光测定、DNA 印迹分析、RNA 印迹分析、斑点印迹分析、凝胶电泳(例如 SDS-PAGE)、RT-PCR、定量 PCR、其它核酸或靶或信号扩增法、放射性标记、闪烁计数和亲和层析。

[0098] 本发明的核酸组合物虽然通常在天然序列中(除经修饰的限制位点等),但可以依照标准技术,使得自或者 cDNA、基因组或者混合物的本发明的核酸突变,以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可能影响所需的氨基酸序列。具体地说,考虑了与天然 V、D、J、恒定区、转换序列和本文所述的其它这类序列基本同源或来源于所述序列的 DNA 序列(其中“来源于”表示一种序列与另一序列相同或由另一序列经修饰而来)。

[0099] 当将核酸置于与另一核酸序列的功能关系中时,所述核酸被“操作上连接”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则所述启动子或增强子与所述序列操作上连接。关于转录调节序列,操作上连接是指所连接的 DNA 序列相邻,并且必要时使两个蛋白质编码序列相邻并且符合读框地连接。对于转换序列,操作上连接表示所述序列能够影响转换重组。

[0100] 术语“载体”是指能够转运与之连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,质粒是指可以将额外的 DNA 区段连接到其中的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的 DNA 区段可以被连接到所述病毒基因组中。某些载体能够在所导入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如非附加型哺乳动物载体)在被导入宿主细胞后可以整合到宿主细胞的基因组中,从而随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与之操作上连接的基因的表达。这类载体在此被称为“重组表达载体”(或者简称“表达载体”)。一般而言,可用于重组 DNA 技术中的表达载体通常为质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明包括用于等同功能的这样的其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0101] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指其中导入了重组表达载体的细胞。应该理解,这类术语不仅指特定的题述细胞,而且也指这种细胞的后代。因为在后续世代中可能由于或者突变或者环境影响而发生某些修饰,所以这样的后代可能事实上与亲代细胞不完全相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0102] “标记”是可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法检测的组合物。例如,有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如 ELISA 中常用的酶)、生物素、洋地黄毒苷或半抗原以及可得到抗血清或单克隆抗体的蛋白质(例如通过将放射性标记掺入本发明的肽中,可以使本发明的多肽成为可检测的,用本发明的多肽来检测与所述肽特异性反应的抗体)。

[0103] 本文所用的在细胞方面的术语“分类”是指细胞的物理分类(可以采用例如荧光激活细胞分类器来实现)以及基于细胞表面标记表达的细胞分析(例如无分类时的 FACS 分析)。

[0104] 短语“免疫细胞应答”是指免疫系统细胞对外部或内源刺激(例如抗原、细胞因

子、趋化因子和其它细胞) 应答, 在所述免疫细胞中产生生物化学变化, 导致免疫细胞迁移、杀伤靶细胞、吞噬作用、产生抗体、免疫应答的其它可溶性效应物等。

[0105] 术语“T 淋巴细胞应答”和“T 淋巴细胞活性”在此可互换使用, 是指依赖于 T 淋巴细胞的免疫应答组分(即 T 淋巴细胞增殖和 / 或分化为辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性杀伤 T 淋巴细胞或者抑制性 T 淋巴细胞, 辅助性 T 淋巴细胞提供信号给 B 淋巴细胞, 引起或者防止抗体产生, 细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤特定靶细胞, 以及释放调节其它免疫细胞功能的可溶性因子如细胞因子)。

[0106] 术语“免疫应答”是指淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的协同作用, 导致选择性损伤、破坏侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞、或者在自身免疫或病理性炎症的情况下为正常人细胞或组织, 或者将其从人体中清除。

[0107] 免疫应答的组分可以在体外用本领域技术人员熟知的各种方法来检测。例如, (1) 可以将细胞毒性 T 淋巴细胞与放射性标记的靶细胞共同孵育, 然后根据放射性的释放, 检测这些靶细胞的裂解, (2) 可以将辅助 T 淋巴细胞与抗原和抗原呈递细胞共同孵育, 然后用标准方法测量细胞因子的合成和分泌 (Windhagen, A. 等, 1995, Immunity 2 :373-80), (3) 可以将抗原呈递细胞与完整的蛋白质抗原共同孵育, 然后或者通过 T 淋巴细胞激活测定, 或者通过生物物理方法检测所述抗原在 MHC 上的呈递 (Harding 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 86 :4230-4), (4) 可以将肥大细胞与交联其 Fc- ϵ 受体的试剂共同孵育, 然后通过酶免疫测定, 测定组胺释放 (Siraganian 等, 1983, TIPS4 :432-437)。

[0108] 同样, 也可以用本领域技术人员熟知的各种方法, 检测模型生物体(例如小鼠)或者人类患者体内的免疫应答产物。例如, (1) 采用临床实验室中目前使用的标准方法, 例如 ELISA, 可以容易地检测对疫苗接种应答的抗体产生; (2) 通过刮伤皮肤表面, 放置无菌容器来捕获刮伤部位上的迁移细胞, 可以检测免疫细胞到炎症部位的迁移 (Peters 等, 1988, Blood 72 :1310-5); (3) 可以用 3H- 胸苷, 测量对促细胞分裂原应答的外周血单核细胞增殖或混合淋巴细胞反应; (4) 通过将 PBMC 与标记颗粒一起接种到孔中, 可以测量粒细胞、巨噬细胞和 PBMC 中其它吞噬细胞的吞噬能力 (Peters 等, 1988); 以及 (5) 通过用抗 CD 分子(例如 CD4 和 CD8) 抗体标记 PBMC, 并且测量表达这些标记的 PBMC 的比例, 可以测量免疫系统细胞的分化。

[0109] 本文所用的短语“信号转导途径”或“信号转导事件”是指由于细胞与刺激性化合物或因子相互作用而引起的至少一种生物化学反应, 但更通常是一系列生物化学反应。因此, 刺激性化合物与细胞的相互作用, 产生通过所述信号转导途径传递、最终导致细胞应答(例如上述的免疫应答)的“信号”。

[0110] 信号转导途径是指在各种各样在信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分中起作用的信号转导分子之间的生物化学关系。本文所用的短语“细胞表面受体”包括能够接受信号并且将这种信号跨过细胞质膜传递的分子和分子的复合物。本发明的“细胞表面受体”的一个实例是 T 细胞受体 (TCR) 或 CTLA-4 的 B7 配体。

[0111] 细胞中的信号转导途径通过细胞与所述细胞内或细胞外的刺激物的相互作用来起始。如果外来的(即所述细胞之外)刺激物(例如抗原呈递细胞上的 MHC- 抗原复合物)与细胞表面受体(例如 T 细胞受体)相互作用, 则信号转导途径可以将信号穿过所述细胞

的细胞膜传递至所述细胞的胞质,在某些情况下,传递到细胞核中。如果内部的(例如在所述细胞内)刺激物与胞内信号转导分子相互作用,则信号转导途径可以导致信号通过所述细胞的胞质传递,在某些情况下传递到所述细胞的细胞核中。

[0112] 信号转导可以通过例如以下途径发生:分子磷酸化;非共价变构相互作用;分子的复合;分子的构象变化;钙的释放;肌醇磷酸的产生;蛋白酶解;环状核苷酸的产生和二酰甘油酯的产生。通常,信号转导通过使信号转导分子磷酸化而发生。

[0113] 术语“非特异性 T 细胞激活”是指与其抗原特异性无关的 T 细胞的刺激。

[0114] 通用方法

[0115] 为了达到改进人 κ 轻链基因座的稳定性,联合转染色体技术与早期原核微注射技术,来产生转基因动物。人 κ 轻链基因座转基因 KCo5 (Fishwild, D. 等,1996, Nat. Biotechnol. 14 :845-851 ;美国专利第 5,770,429 号) 包括人 κ 基因座相当大的部分,并且稳定地保持在小鼠种系以及表达来源于所述转基因的人 κ 链的 B 细胞和杂交瘤细胞中。将这种转基因与稳定的 hCF(SC20) 转染色体以及小鼠内源重链和 κ 轻链基因座的功能失活突变结合在一起,产生表达包括多种人重链同种型在内的大范围人抗体库的动物。因此,所述轻链转基因相对于双 -TC/KO 小鼠 (Tomizuka, K. 等,2000, Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 97 :722-727) 改进的稳定性,达到从每种融合回收大量的杂交瘤。

[0116] 本发明提供任何所需重链同种型的全人抗体的分离,所述同种型包括 IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 和 IgM。具体地说,从一个转基因非人类哺乳动物中可以分离出对预定抗原具有高亲和性的几种不同抗体。

[0117] 本发明的转基因非人类哺乳动物(优选为小鼠或其它啮齿动物)也可以用保藏的材料产生。保留 hCF(SC20) 的鸡 DT40 细胞已经根据布达佩斯条约,于 2001 年 5 月 9 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心 (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。保藏号为 FERM BP-7583。所述细胞系的名称指定为 SC20。

[0118] 保留 hCF(SC20) 的鸡 DT40 细胞也已经于 1999 年 8 月 18 日保藏于台湾的食品工业研究开发研究所 (FIRDI)。保藏号为 CCRC 960099。所述细胞系的名称在台湾保藏中心指定为 SC20(D)。可以如 W000/10383 (EP 1106061) 中所述,将在鸡 DT-40 细胞中保留的 hCF(SC20) 转移到小鼠 ES 细胞中。简而言之,从鸡 DT-40 细胞产生微细胞,将其与 CHO 细胞融合。然后根据 G418 抗性,可以选择出保留 hCF(SC20) 的 CHO 细胞。可以使用市售的人 COT1 DNA 探针或人 14 号染色体特异性探针,通过 PCR 或 FISH 分析,证实 hCF(SC20) 的保留。此后,从所述保留 hCF(SC20) 的 CHO 细胞产生微细胞,将其与小鼠 ES 细胞融合。以与 CHO 细胞相同的方式,可以选择出保留 hCF(SC20) 的 ES 细胞。

[0119] 保留 KCo5 转基因 DNA 的细胞已经根据布达佩斯条约,于 2001 年 11 月 8 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 给予的保藏号为:酵母中的 17E1(YAC y17, Medarex KCo5) 指定为 ATCC No. PTA-3842 (所述遗传材料为含有人免疫球蛋白 κ 可变区基因座插入片段的酵母人工染色体);大肠杆菌 (E. coli) 中的 pKV4 (Medarex KCo5) 指定为 ATCC No. PTA-3843 (含有人免疫球蛋白可变区基因的质粒);大肠杆菌中的 pKCIB (Medarex

KCo5) 指定为 ATCC No. PTA-3844 (含有人免疫球蛋白 J κ 和 κ 恒定区基因的质粒)。

[0120] 保留 KCo5 转基因 DNA 的细胞也已经于 2001 年 11 月 22 日保藏于台湾的食品工业研究开发研究所 (FIRDI)。pKV4、YACy17 和 pKCIB 的保藏号分别为 :CCRC 940383、CCRC 940385 和 CCRC 940386。

[0121] 可以按照先前已描述的方法,将转基因 KCo5 转移传到小鼠细胞中 (Fishwild, D. 出处同前,也参见美国专利第 5,770,429 号中的实施例 38 ;也参见以下实施例 2)。

[0122] 免疫球蛋白的一般特性

[0123] 已知基本抗体结构单位包含一个亚基四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”链 (大约 25kDa) 和一条“重”链 (大约 50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括一个约 100-110 个或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分限定一个恒定区,主要负责效应子功能。

[0124] 轻链或者分类为 κ 或者分类为 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,将抗体同种型分别确定为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区通过约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括一个约 1 个至 10 多个氨基酸的“D”区。(一般参见 Fundamental Immunology (Paul, W. 编著,2nd ed. Raven Press, N. Y., 1989), Ch. 7 (通过引用全文结合到本文中用于所有目的))。

[0125] 每对轻链 / 重链的可变区构成抗体结合位点。因此,完整的抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中之外,所述两个结合位点是相同的。所述链都表现出通过三个超变区 - 也称为互补性决定区或 CDR 连接的相对保守的构架区 (FR) 的相同的一般结构。来自每对的两条链的 CDR 通过构架区排列,使得能够与特定的表位结合。轻链和重链从 N 末端至 C 末端,都包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。按照 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991) 或 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987) ;Chothia 等, Nature 342 :878-883 (1989) 的定义,对每个结构域指定氨基酸编号。

[0126] 天然人免疫球蛋白基因座

[0127] 人免疫球蛋白天然由三个不同的基因座编码 :重链、 κ 轻链和 λ 轻链。这些天然基因座分别位于 14 号、2 号和 22 号染色体上。天然人重链基因座位于 14q32.3,在人 14 号染色体长臂的端粒附近,遍布在大约 1.3 兆碱基内,编码大约 45 种已表达的 V 基因区段、27 种 D 基因区段、6 种 J 基因区段和 9 种恒定 (C) 区基因区段。天然人 κ 轻链基因座位于 2 号染色体的 2p11.12,延伸超过大约 1.8 兆碱基,包含大约 34 种已表达的 V 基因区段、5 种 J 基因区段和一个 C 区基因区段。天然人 λ 基因座位于 22q11.2,延伸超过大约 0.9 兆碱基,编码大约 30 种 V 基因区段和 4 种功能性 J-C 对,每对包含一个 J 基因区段和一个 C 基因区段。这些天然基因座中的每一个也可以包含缺失、插入和单核苷酸多态性。

[0128] 通过杂交瘤融合生产单克隆抗体

[0129] 通过例如用抗原 (例如人蛋白质抗原,诸如 CD4、G-CSF、HSA、EGFR 或 CTLA-4、病原体编码的抗原、毒素或其它抗原) 免疫动物,可以实现单克隆抗体的产生。也可以使用包含所述抗原或所述抗原的免疫原性片段或者针对抗所述抗原抗体的抗独特型抗体的较长的多肽。参见 Harlow 和 Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP New York, NY, 1988) 以及 Mishell 和 Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, (W.H. Freeman and

Co. New York, NY 1980) (这两篇文献通过引用结合到本文中用于所有目的)。这样一种免疫原可以得自天然来源、通过肽合成或者通过重组表达而获得。任选地如下所述,将所述免疫原与载体蛋白连接或者与载体蛋白复合而给予。任选将所述免疫原与佐剂一起给予。可以如下所述使用几种类型的佐剂。优选给予完全弗氏佐剂,然后给予不完全佐剂,来免疫实验动物。通常用兔子和豚鼠来生产多克隆抗体。通常用啮齿动物(例如小鼠、大鼠和仓鼠)来生产单克隆抗体。这些小鼠可以是转基因的,可以包含人免疫球蛋白基因序列,如下所述。在免疫后,免疫动物将产生对所导入免疫原的血清应答。这种血清应答可以用各种各样的不同测定、通过测定所收集血清的效价来测量。常用测定的一个实例是 ELISA。血清应答的大小通常被称为效价。例如,效价为 1,000,表示通过测定血清的 1,000 倍稀释液可以检测到反应性抗体的存在。通常,免疫将引起比未经免疫动物中存在的血清应答大几个数量级的血清应答。仅一个或两个数量级的血清应答被认为是弱应答,通常表明存在少数表达抗原反应性抗体的 B 细胞。通过将淋巴细胞与无限增殖化细胞(例如骨髓瘤细胞)融合形成称为杂交瘤细胞的杂种细胞,获得单克隆抗体。新形成的杂交瘤细胞从亲代淋巴细胞获得抗体表达特性,而从亲代无限增殖化细胞获得生长特性。让新形成的杂交瘤细胞在含培养基的培养皿(例如 96 孔板)中生长。测试(通常在融合后 1 周至 2 周之间)培养上清液中所需重链和轻链同种型的抗原反应性抗体的存在情况。然后将这种原代培养物中的细胞稀释,再接种,以便分离分泌一种单克隆抗体的杂交瘤细胞的单个克隆。可以将这种次级培养物进一步亚克隆,获得第三培养物等等。可以用以通过这种亚克隆法获得杂交瘤克隆的抗原反应性原代培养物的比率,提供了对亚克隆效率的度量。如果所有的所述抗原阳性原代杂交瘤培养物都可以用来得到克隆细胞系,则亚克隆效率为 100%。如果编码所述已表达抗体的免疫球蛋白基因座不稳定,例如在细胞分裂期间易丢失-或者通过染色体、染色体片段或转染色体的丢失,或者通过插入序列的缺失重组、或者通过某些其它机制-则亚克隆效率将降低(即低于 100%)。有得到单克隆抗体、亚克隆效率高(例如高于 20%、优选高于 50%、更优选高于 80%,最优选高于 90%或 95%)的平台特别有用。根据与所述抗原的特异性结合来筛选抗体。任选根据与所述抗原的特定区的结合,进一步筛选抗体。对于蛋白质抗原,可以通过测定抗体与所述抗原肽的一组缺失突变体的结合、然后测定哪些缺失突变体与所述抗体结合,完成后一筛选。可以例如通过蛋白质印迹法或 ELISA 评估结合。显示出与所述抗体特异性结合的最小片段,限定了所述抗体的表位。然而,某些表位包含非连续的结构元件,它们可能由于位于所述确切表位之外的元件的缺失而丢失。另一方面,可以用试验抗体和参比抗体竞争与所述抗原结合的竞争测定,测定表位特异性。如果试验抗体和参比抗体竞争,它们则与同一表位结合,或者足够邻近其中一种抗体的这种结合的表位将干扰另一种抗体的结合。

[0130] 从 B 细胞杂交瘤克隆编码抗体的核酸

[0131] 可以从或者经免疫的或者未经试验的转基因动物中,克隆编码至少重链和轻链可变区的核酸。核酸可以作为基因组 DNA 或 cDNA 从这样的动物的淋巴细胞中克隆。在免疫球蛋白序列克隆之前,不需要这类细胞的无限增殖化。通常,分离 mRNA,用 oligo-dT 引物通过逆转录进行扩增。然后用引物扩增人免疫球蛋白保守区的 cDNA。采用对非 μ 序列特异性的 3' 引物,可以在所述文库中容易地富集非 μ 同种型(例如 IgG 或 IgA)。通常,轻链的扩增群体包含至少 100、1000、10,000、100,000 或 1,000,000 种不同的轻链。同样,重链的扩增群

体包含至少 100、1000、10,000、100,000 或 1,000,000 种不同的重链。例如,使用 IgG 引物,通常至少 90%、95%或 99%的扩增重链为 IgG 同种型。采用各种众所周知的方法,例如 PCR 或者用对人抗体的保守区特异性的 DNA 探针筛选 cDNA 文库,也可以从上述杂交瘤中克隆编码至少重链和轻链的可变区的核酸。通过对侧翼序列进行限制性消化,可以切下编码待亚克隆抗体链的核酸,或者所述核酸可以用针对邻接编码序列的位点的引物通过 PCR 来扩增。一般参见 PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (H. A. Erlich 编著, Freeman Press, NY, NY, 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis 等编著, Academic Press, San Diego, CA, 1990); Mattila 等, 1991, Nucleic Acids Res. 19:967; Eckert 等, 1991, PCR Methods and Applications 1:17; PCR (McPherson 等编著, IRL Press, Oxford)。这些参考文献和其中引用的参考文献通过引用结合到本文中用于所有目的。

[0132] 抗体的重组表达

[0133] 将编码与恒定区操作上连接的轻链和重链可变区的核酸插入到表达载体中。可以在相同或不同的表达载体中克隆轻链和重链。将编码抗体链的 DNA 区段与所述表达载体中的确保抗体链表达的控制序列操作上连接。这类控制序列包括信号序列、启动子、增强子和转录终止序列。表达载体通常可在宿主生物体中或者作为附加体或者作为宿主染色体的整合部分复制。

[0134] 大肠杆菌是一种对于本发明抗体表达特别有用的原核宿主。适合使用的其它微生物宿主包括杆菌如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和其它肠杆菌科如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌种。在这些原核宿主中,人们也可以制备表达载体,所述表达载体通常含有与宿主细胞匹配的表达控制序列(例如复制起点)和调节序列如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或得自噬菌体 λ 的启动子系统。

[0135] 其它微生物例如酵母,也可以用来表达。酵母属 (*Saccharomyces*) 是优选的宿主,并且有根据需要具有表达控制序列如启动子(包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子)和复制起点、终止序列等的合适载体。

[0136] 哺乳动物组织细胞培养物也可以用来表达和生产本发明的抗体(参见 Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, N. Y., 1987)。优选真核细胞,因为已经开发了许多能够分泌完整抗体的合适宿主细胞系。用于表达编码本发明免疫球蛋白的核酸的优选的合适宿主细胞包括:用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系 (293) (Graham 等, 1977, J. Gen. Virol. 36:59);幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞 -DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77:4216);小鼠支持细胞 (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251);猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL 1587);人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2);狗肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34);buffalo rat 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75);人肝细胞 (Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺癌 (MMT 060562, ATCC CCL51);和 TRI 细胞 (Mather 等, 1982, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-46);杆状病毒细胞。

[0137] 可以将含有目标多核苷酸序列(例如重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体转移到宿主细胞中。对于原核细胞通常使用氯化钙转染,而对于其它细胞宿主可以

使用磷酸钙处理或电穿孔（一般参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)（通过引用全文结合到本文中用于所有目的）。当重链和轻链在不同表达载体上克隆时, 用所述载体共转染, 从而达到完整免疫球蛋白的表达和装配。在导入重组 DNA 之后, 对表达免疫球蛋白产物的细胞系进行细胞选择。优选能够稳定表达的细胞系（即在所细胞系 50 次传代之后表达水平不降低）。

[0138] 一旦表达, 则可以依照本领域的标准方法, 包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等, 纯化本发明的完整抗体、其二聚体、单个轻链和重链或其它免疫球蛋白形式（一般参见 Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N. Y., 1982)。优选至少约 90-95% 同质性的基本纯的免疫球蛋白, 最优选 98-99% 或更高的同质性。

[0139] 嵌合抗体和人源化抗体

[0140] 嵌合抗体和人源化抗体具有与提供构建嵌合抗体或人源化抗体的原材料的小鼠或其它非人类抗体相同或相似的结合特异性和亲和性。嵌合抗体是通常通过遗传工程从属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建了其轻链和重链基因的抗体。例如, 可以将得自小鼠单克隆的基因的可变区 (V) 区段与人恒定区 (C) 区段例如 IgG₁ 和 IgG₄ 连接。优选人同种型 IgG₁。一种典型的嵌合抗体因此是由得自小鼠抗体的 V 区或抗原结合区和得自人抗体的 C 区或效应子区组成的杂种蛋白。

[0141] 人源化抗体具有基本上来自人抗体的可变区构架残基（称为接纳体抗体）和基本上得自小鼠抗体的互补性决定区（称为供体免疫球蛋白）。参见 Queen 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033 和 WO 90/07861, U. S. 5, 693, 762, U. S. 5, 693, 761, U. S. 5, 585, 089, U. S. 5, 530, 101 以及 Winter, U. S. 5, 225, 539（通过引用全文结合到本文中用于所有目的）。恒定区如果存在, 也基本上或全部来自人免疫球蛋白。人可变区通常选自人抗体, 其中构架序列表现出与 CDR 来源的鼠类可变区结构域高度的序列同一性。重链和轻链可变区构架残基可以来源于相同或不同的人抗体序列。所述人抗体序列可以是天然存在的人抗体序列, 或者可以是几种人抗体的共有序列。参见 Carter 等, W092/22653。根据对 CDR 构象和 / 或与抗原结合的可能影响, 选择来自人可变区构架残基的某些氨基酸以供取代。通过建模、对特定位置的氨基酸特性的检查或者凭经验观察特定氨基酸取代或诱变的影响, 对这类可能影响进行研究。

[0142] 例如, 当一个氨基酸在鼠可变区构架残基和所选人可变区构架残基之间不同时, 人构架氨基酸在可合理地预测有以下情形之一时, 通常应该被来自小鼠抗体的等同构架氨基酸所取代:

[0143] (1) 所述氨基酸非共价直接结合抗原,

[0144] (2) 所述氨基酸与 CDR 区相邻,

[0145] (3) 所述氨基酸在其它情况下与 CDR 区相互作用（即在 CDR 区的大约 6Å 内）, 或

[0146] (4) 所述氨基酸参与 VL-VH 连接。

[0147] 可供取代的其它候选物是对于人免疫球蛋白该位置上稀有的接纳体人构架氨基酸。这些氨基酸可以用来自小鼠供体抗体等同位置或者来自更通常的人免疫球蛋白等同位置的氨基酸取代。可供取代的其它候选物是对于人免疫球蛋白该位置上稀有的接纳体人构架氨基酸。人源化免疫球蛋白的可变区构架通常显示出与人可变区构架序列或这类序列的共有序列至少有 85% 的序列同一性。

[0148] 人抗体

[0149] 针对特定抗原的人抗体可通过以下所述的多种方法来提供。某些人抗体通过竞争性结合实验来选择,或者选择具有与特定小鼠抗体(例如实施例中所所述的小鼠单克隆抗体之一)相同的表位特异性的某些人抗体。也可以仅用抗原的片段作为免疫原,根据特定的表位特异性,筛选人抗体,和/或在蛋白质抗原的情况下,通过筛选针对所述抗原的一组缺失突变体的抗体,筛选人抗体。

[0150] Trioma 方法

[0151] 用于该方法的基本方法和示例性细胞融合成分(fusion partner)-SPAZ-4 已经由以下文献描述:Oestberg 等,1983, Hybridoma 2:361-367;Oestberg, 美国专利第 4,634,664 号;和 Engleman 等,美国专利 4,634,666(每篇文献通过引用全文结合到本文中用于所有目的)。用该方法获得的抗体生产细胞系称为 trioma,因为它们是从三种细胞-两种人细胞和一种小鼠细胞转变而来。开始,将小鼠骨髓瘤系与人 B 淋巴细胞融合,获得不产生抗体的异种杂交细胞,如 Oestberg 所述的 SPAZ-4 细胞系(参见上文)。然后将所述异种细胞与无限增殖化人 B 淋巴细胞融合,获得抗体生产 trioma 细胞系。已经发现 trioma 中产生比由人细胞制备的通常的杂交瘤更为稳定的抗体。

[0152] 虽然 trioma 是遗传稳定的,但它们不产生非常高水平的抗体。通过将抗体基因从所述 trioma 克隆到一种或多种表达载体中,将所述载体转化到标准哺乳动物、细菌或酵母细胞系中,可以提高表达水平。

[0153] 转基因非人类哺乳动物

[0154] 也可以用包含人免疫球蛋白基因座的转基因非人类哺乳动物,生产针对各种各样抗原的人抗体。通常,这些免疫球蛋白基因座可以编码基本为人序列的抗体,优选与人序列有 95%或更高的同一性,更优选 98-99%或更高的同一性,最优选 100%相同。免疫球蛋白基因座可以是重排的或是未经重排的,可以包含相对于天然人免疫球蛋白基因座的缺失或插入。所述基因座可以包括来自其它物种和来自非免疫球蛋白基因座的、基本上不产生次级组分(secondary repertoire)(非 IgM)抗体编码部分的遗传元件(例如非编码元件如增强子、启动子和转换序列,或者编码元件如 μ 恒定区基因区段)。优选的人免疫球蛋白基因座在所述转基因非人类哺乳动物体内的淋巴样细胞和/或淋巴样细胞前体中经历 DNA 序列改变,包括 V(D)J 连接、重链类别转换和体细胞突变,产生针对预定抗原的高亲和性人抗体。包含在这些转基因哺乳动物中的人免疫球蛋白基因座优选包括天然人重链和人轻链基因座的未经重排序列。通常,使这种转基因哺乳动物的内源免疫球蛋白基因座功能性失活(美国专利第 5,589,369 号;Takeda, S. 等,1993, EMBO J. 12:2329-2366; Jakobovits, A. 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:2551-2555; Kitamura, D. 和 Rajewsky, K., 1992, Nature 356:154-156; Gu, H. 等,1991, Cell 65:47-54; Chen, J. 等, EMBO J 12:821-830; Sun, W. 等,1994, J. Immunol 152:695-704; Chen, J. 等,1993, Intl. Immunology 5:647-656; Zou, X. 等,1995, Eur. J. Immunol 25:2154-2162; Chen, J. 等,1993 Intl. Immunology 5:647-656; Boudinot, P. 等,1995, Eur. J. Immunol. 25:2499-2505; Chen, J. 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:4528-4532; Roes, J. 和 Rajewsky, K., 1991, Intl. Immunology 3:1367-1371; Gu, H. 等,1993, Cell 73:1155-1164; Taki, S. 等,1993, Science 262:1268-71; Kitamura, D. 等,1991, Nature 350:423-6; Lutz, C. 等,1998,

Nature 393:797-801;Zou,Y. 等,1994,Current Biology 4:1099-1103;Chen,J. 等,1993,EMBO J. 12:4635-4645;Serwe,M. 和 Sablitzky,F.,1993,EMBO J. 12:2321-2327;Sanchez,P. 等,1994,Intl. Immunology 6:711-719;Zou,Y. 等,1993,EMBO J. 12:811-820)。内源免疫球蛋白基因的失活优选可以例如通过定向同源重组来达到。外源人免疫球蛋白基因座可以被结合到所述内源小鼠染色体上,或者可以是所导入的转染色体的(例如为其部分、插入其中或与其连接)。将转染色体作为非内源染色体或者具有一个中心粒和两个端粒的染色体片段导入细胞中。这些转染色体通常包含端粒和中心粒序列,并且可以包含相对于亲代完整染色体的缺失。转染色体也可以包含额外的插入序列。例如,通过将第一免疫球蛋白基因座的序列(例如来自 YAC 克隆、转染色体或完整染色体)插入到包含第二免疫球蛋白基因座的转染色体中,可以将两个人免疫球蛋白基因座结合在单个转染色体上。也可以重复这一过程,以将所有三种人免疫球蛋白基因座结合到一个转染色体上。包含两个或三个不同免疫球蛋白基因座的单个转染色体提供了这些基因座的遗传连锁,这提高了可用于生产人抗体的转基因后代的比率。转染色体的优选形式是在以下文献中详述的形式:Tomizuka,K. 等,2000,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727, Tomizuka,K. 等,1997,Nature Genetics 16:133-143,以及 W0 97/07671、W0 98/37757 和 W0 00/10383,每篇文献通过引用全文结合到本文中用于所有目的。转染色体也可以包括整合的选择标记(例如新霉素抗性基因)和在亲代完整染色体中不存在的其它序列。在转染色体和内源小鼠染色体之间的重组事件中,来自转染色体的序列被插入或加入到所述内源小鼠染色体中。可以如 W098/37757、EP 0972445 和 W0 00/10383(所述文献通过引用结合到本文中用于所有目的)中所述进行缺失、易位、取代等来修饰转染色体。例如,转染色体在被导入到小鼠胚胎干(ES)细胞的过程中可能自发片段化,通过端粒指导的截短而片段化和/或通过 Cre/loxP 定点重组或相似的方法而易位。特异性插入重组位点(例如 loxP 序列和其它序列;参见例如 Abuin,A. 和 Bradley,A.,1996,Mol. Cell. Biol. 16:1851-1856;Mitani,K. 等,1995,Somat. Cell. Mol. Genet. 21:221-231;Li,Z.W. 等,1996,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6158-6162;Smith,AJ. 等,1995,Nat. Genet. 9:376-385;Trinh,K R. 和 Morrison,S.L.,2000,J. Immunol. Methods 244:185-193;Sunaga,S. 等,1997,Mol. Reprod. Dev. 46:109-113;Dymecki,S.M.,1996,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6191-6196;Zou,YR. 等,1994,Curr. Biol. 4:1099-1103;Rudolph,U. 等,1993,Transgenic Res. 2:345-355;Rickert,R.C. 等,1997,Nucleic Acids Res. 25:1317-1318),可以促进这样的重组或易位事件。在引入 loxP 位点的情况下,编码 cre 重组酶的转基因的表达将促进两个 loxP 位点之间的重组。转染色体也可以是由于上述易位所致的由不同染色体片段组成的融合染色体。转染色体可以是自主型的。自主型转染色体与小鼠内源染色体不同、不邻接,也不插入到所述小鼠内源染色体中。这些自主型转染色体包含使得能够进行自主复制的端粒和中心粒序列。或者,可以将转染色体序列导入小鼠细胞核中之后,将其易位到小鼠染色体上。小鼠内源染色体包括 19 对常染色体以及 X 和 Y 染色体。

[0155] 导入外源人免疫球蛋白基因座可以采用各种各样的方法来实现,包括例如半日龄胚胎原核微注射、胚胎干细胞的转染、或者胚胎干细胞与酵母原生质球或包含转染色体的小核融合。用上述方法产生的转基因哺乳动物能够功能性地重排所导入的外源免疫球蛋白组分序列,并且表达由人免疫球蛋白基因编码的各种同种型的抗体

库,而不表达内源免疫球蛋白基因。具有这些特性的哺乳动物的产生和特性详述于例如 Lonberg 等, WO 93/12227(1993); 美国专利第 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 号, Nature 48:1547-1553(1994), Nature Biotechnology 14,826(1996), Kucherlapati, WO 91/10741(1991), WO94/02602(1993), WO 96/34096(1995), WO 96/33735(1996), WO98/24893(1997), 美国专利第 5,939,598、6,075,181、6,114,598 号, Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727, Tomizuka, K. 等, 1997, Nature Genetics 16:133-143, 和 Tomizuka, K., WO 97/07671, WO 98/37757, WO 00/10383 以及 JP 2000-42074(每篇文献通过引用全文结合到本文中用于所有目的)。诸如啮齿动物的转基因非人类哺乳动物特别合适。例如通过用常规的 Kohler-Milstein 技术,将得自这样的哺乳动物的 B 细胞与合适的无限增殖细胞系融合,可以制备单克隆抗体。运用 PCR 扩增 V 区(Schrader 等, 1997, 美国专利第 5,627,052 号),也可以直接从单个 B 细胞中得到单克隆抗体,从培养基中分离单克隆抗体。或者,经 FACs 分类的、或者经富集的 B 细胞制剂可以用作 RNA 或 DNA 源,以供经 PCR 扩增 V 区序列。噬菌体展示法(在下文描述)也可以用来从包含人免疫球蛋白基因座的免疫的转基因小鼠中获得人抗体序列。然后可以用通过这些方法获得的人抗体 V 区序列,产生保留原始亲代抗体结合特性的完整抗体。下面描述这种方法。

[0156] 噬菌体展示方法

[0157] 获得人抗体的另一种方法是按照 Huse 等, 1989, Science 246:1275-1281 概述的通用方案,筛选得自 B 细胞的 cDNA 文库。这种 B 细胞可以从用所需抗原、片段、含所述抗原或片段的较长多肽或者抗独特型抗体免疫的人中获得。任选地从未曾接触所述抗原的个体获得这样的 B 细胞。B 细胞也可以得自表达人免疫球蛋白序列的转基因非人类哺乳动物。可以用抗原或一组抗原免疫所述转基因非人类哺乳动物。所述动物也可以是未经免疫的。使用编码人抗体的 B 细胞 mRNA 序列,用逆转录酶产生 cDNA。然后将所述 cDNA 序列的 V 区编码区段克隆到指导所述抗体 V 区表达的 DNA 载体中。通常,在克隆之前通过 PCR 特异性地扩增所述 V 区序列。也通常将所述 V 区序列克隆到所述 DNA 载体内经构建而使得所述 V 区作为融合蛋白表达的位点中。这样的融合蛋白的实例包括 m13 大肠杆菌噬菌体基因 3 和基因 8 融合蛋白。然后用该组克隆 V 区序列产生抗体 V 区的表达文库。为了产生表达文库,用包含所述克隆 V 区序列的 DNA 载体转化真核或原核宿主细胞。除 V 区之外,所述载体还可以任选地编码整个或部分病毒基因座,并且可以包含病毒包装序列。在某些情况下,所述载体不包含完整的病毒基因组,然后将所述载体与辅助病毒或辅助病毒 DNA 序列一起使用。所述已表达抗体 V 区存在于转化细胞或者得自所述转化细胞的病毒颗粒内或其表面。然后,用包含所述细胞或病毒颗粒的这种表达文库鉴定编码与预定抗原反应的抗体或抗体片段的 V 区序列。为了鉴定这些 V 区序列,根据所述已表达 V 区与预定抗原的反应性,对所述表达文库进行筛选或选择。用鉴定或富集具有与预定抗原有反应性(例如结合缔合或催化活性)的 V 区的细胞或病毒颗粒的方法,筛选或选择包含所述克隆 V 区序列并且具有已表达 V 区的细胞或病毒颗粒。例如,可以检测与已表达 V 区结合的放射性或荧光标记的抗原,并用所述抗原鉴定或分选细胞或病毒颗粒。与固相基质或微珠结合的抗原也可以用来选择在表面具有反应性 V 区的细胞或病毒颗粒。如此从表达文库中鉴定的 V 区序列然后可以用来在转化宿主细胞中指导对预定抗原具有反应性的抗体或其片段的表达。Huse 所述的

方案与噬菌体展示技术结合变得更为有效。参见例如 Dower 等, W091/17271 和 McCafferty 等, W0 92/01047, 美国专利第 5, 871, 907、5, 858, 657、5, 837, 242、5, 733, 743 和 5, 565, 332 号(每篇文献通过引用全文结合到本文中用于所有目的)。在这些方法中, 产生其中成员(展示包装)在其外表面展示不同抗体的噬菌体文库。抗体通常以 Fv 或 Fab 片段展示。展示具有所需特异性的抗体的噬菌体可以通过用所述抗原或其片段进行亲和富集来选择。与表达人免疫球蛋白基因的免疫转基因非人类动物联合的噬菌体展示, 甚至当对所述抗原的免疫应答弱时, 也可以用来获得抗原特异性抗体。

[0158] 在噬菌体展示法的一个变体中, 可以产生具有选定鼠抗体结合特异性的人抗体。参见例如 Winter, W0 92/20791。在这种方法中, 所选鼠抗体的或者重链可变区或者轻链可变区被用作起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料, 则构建其成员展示相同轻链可变区(即鼠起始材料)和不同重链可变区的噬菌体文库。所述重链可变区得自经重排人重链可变区的文库。选择显示出与 CTLA-4 强特异性结合(例如至少 $10^8 M^{-1}$, 优选至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。得自该噬菌体的人重链可变区则用作构建另一噬菌体文库的起始材料。在该文库中, 每个噬菌体展示相同的重链可变区(即从第一展示文库中鉴定的区)和不同的轻链可变区。所述轻链可变区得自经重排人轻链可变区的文库。再次选择显示出对所选抗原强特异性结合的噬菌体。可以从例如在 CDR 区中掺入随机序列或合成序列的噬菌体展示文库中, 获得与人抗体相似的人工抗体。

[0159] 恒定区的选择

[0160] 可以采用各种熟知的方法, 将嵌合抗体、人源化抗体或人抗体的重链和轻链可变区与人恒定区的至少一部分连接(参见例如 Queen 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033 和 W0 90/07861 ;这些参考文献和其中引用的参考文献通过引用结合到本文中用于所有目的)。恒定区的选择部分取决于是否需要抗体依赖性补体和 / 或细胞介导毒性。例如, 同种型 IgG₁ 和 IgG₃ 通常比同种型 IgG₂ 或 IgG₄ 具有更高的补体结合活性。同种型的选择也可以影响脑中的抗体进入。轻链恒定区可以是 λ 或者是 κ 恒定区。抗体可以作为含两条轻链和两条重链的四聚体、作为分离的重链、轻链、作为 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 或者作为重链和轻链可变区通过一个间隔区连接的单链抗体来表达。

[0161] 对于某些应用, 非 IgG 抗体可能是有用。例如, 当需要多价抗体复合物时, 可以使用 IgM 和 IgA 抗体。

[0162] 应用部分抗体序列表达完整的抗体

[0163] 抗体主要通过位于 6 个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此, 在各个抗体之间, CDR 内的氨基酸序列比 CDR 之外的序列更多样化。因为 CDR 序列负责大多数的抗体-抗原相互作用, 所以有可能通过构建包括来自特定天然存在的抗体的 CDR 序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的构架序列上的表达载体, 表达模拟特定天然存在抗体特性的重组抗体(参见例如 Riechmann, L. 等, 1988, Nature 332 : 323-327 ; Jones, P. 等, 1986, Nature 321 : 522-525 ; 和 Queen, C. 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033)。这样的构架序列可以得自包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库。这些种系序列将不同于成熟抗体基因序列, 因为它们将不包括通过 B 细胞成熟期间 V(D)J 连接而形成的完全装配的可变区基因。种系基因序列也将与高亲和性次级组分抗体的序列因体细胞突变而在个别核苷酸上有所不同。然而, 体细胞突变在所述可变区中

并非均匀分布。例如,在构架区 1 的氨基末端部分和构架区 4 的羧基末端部分中体细胞突变的频率相对较低。此外,许多体细胞突变并不显著改变抗体的结合特性。因此,获得特定抗体的完整 DNA 序列以再构建具有与原始抗体相似结合特性的完整重组抗体并不是必需的(参见 1999 年 3 月 12 日申请的 PCT/US99/05535,该文献通过引用结合到本文中用于所有目的)。跨越所述 CDR 区的部分重链序列和轻链序列通常对于该目的是足够的。用所述部分序列来确定哪些种系可变区基因区段和连接基因区段对所述重组的抗体可变区基因有贡献。然后用所述种系序列补上所述可变区缺失的部分。在蛋白质成熟期间重链和轻链前导序列被切除,不影响最终抗体的特性。因此,表达构建体不必使用对应的种系前导序列。为了加上缺失的序列,可以通过连接或 PCR 扩增将克隆 cDNA 序列与合成寡核苷酸结合。或者,完整的可变区可以作为一组短的重叠寡核苷酸来合成,然后通过 PCR 扩增将其连接,构建完整的合成可变区克隆。该方法有一些优点,例如消除或包括特定限制位点或优化特定密码子。

[0164] 得自一个杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列可以用来设计一组重叠的合成寡核苷酸,以构建具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成 V 序列。所述合成的重链序列和 κ 轻链序列可以在三种方式上不同于天然序列:重复核苷酸碱基序列段被中断,以利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增;根据 Kozak 原则(Kozak,1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870),加入最适翻译起始位点;以及在翻译起始位点上游工程加入 HindIII 位点。

[0165] 对于重链和轻链可变区,优化的编码链序列和相应的非编码链序列被打断为 30-50 个核苷酸的区段,使得在相应的非编码寡核苷酸的大约中点处发生所述编码链序列核苷酸之间的断开。因此,对于每条链,可以将所述寡核苷酸装配为完全跨越所需序列的重叠双链组。将这些寡核苷酸混合为多个跨越 150-400 个核苷酸的区段的库。然后用所述库作为模板,产生 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。通常,一个可变区寡核苷酸组被分为两个库,分别扩增所述库,产生两种重叠 PCR 产物。然后,通过 PCR 扩增合并这些重叠产物,形成完整的可变区。也可能需要在 PCR 扩增中包括重链或轻链恒定区的重叠片段(包括 κ 轻链的 BbsI 位点或 γ 重链的 AgeI 位点),以产生可以被克隆到所述表达载体构建体中的片段。

[0166] 重建的重链和轻链可变区然后与克隆启动子序列、翻译起始序列、恒定区序列、3' 非翻译序列、聚腺苷酸化序列和转录终止序列结合,构成表达载体构建体。可以将所述重链和轻链表达构建体结合到一种载体中、共转染、连续转染或分别转染到宿主细胞中,然后融合形成表达两种链的宿主细胞。

[0167] 下面描述用于构建人 IgG κ 表达载体的质粒。构建所述质粒,使得 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列可以用来重建完整的重链和轻链小基因。这些质粒可以用来表达完整的人或嵌合 IgG₁ κ 或 IgG₄ κ 抗体。可以构建相似的质粒,用于表达其它重链同种型,或者用于表达包含 λ 轻链的抗体。

[0168] 以下所示的 κ 轻链质粒 pCK7-96 (SEQ ID NO:1) 包括 κ 恒定区和聚腺苷酸化位点,使得用在起始甲硫氨酸上游包括 HindIII 位点的 5' 引物扩增的 κ 序列可以用 HindIII 和 BbsI 消化,然后克隆到用 HindIII 和 BbsI 消化的 pCK7-96 中,重建具有聚腺苷酸化位点的完整轻链编码序列。该盒可以作为 HindIII/NotI 片段分离,并且与转录启动子序列连接,构建一个功能性小基因,以供转染到细胞中。

[0169] γ 1 重链质粒 pCG7-96 (SEQ ID NO :2) 包括人 γ 1 恒定区和聚腺苷酸化位点,使得用在起始甲硫氨酸上游包括 HindIII 位点的 5' 引物扩增的 γ 序列可以用 HindIII 和 AgeI 消化,然后克隆到用 HindIII 和 AgeI 消化的 pCG7-96 中,重构建具有聚腺苷酸化位点的完整 γ 1 重链编码序列。该盒可以作为 HindIII/SalI 片段分离,并且与转录启动子序列连接,构建一个功能性小基因,以供转染到细胞中。

[0170] γ 4 重链质粒 pG4HE (SEQ ID NO :3) 包括人 γ 4 恒定区和聚腺苷酸化位点,使得用在起始甲硫氨酸上游包括 HindIII 位点的 5' 引物扩增的 γ 序列可以用 HindIII 和 AgeI 消化,然后克隆到用 HindIII 和 AgeI 消化的 pG4HE 中,重构建具有聚腺苷酸化位点的完整 γ 4 重链编码序列。该盒可以作为 HindIII/EcoRI 片段分离,并且与转录启动子序列连接,构建一个功能性小基因,以供转染到细胞中。

[0171] 可以用多种不同启动子(包括但不限于 CMV 启动子、遍在蛋白启动子、SR α 启动子和 β -肌动蛋白启动子)来表达所述重构建的重链和轻链基因。例如,可以用 HindIII 和或者 NotI、XhoI 或者 EcoRI 切割载体 pCDNA3.1+(Invitrogen, Carlsbad, CA),用于与上述的或者 κ 、 γ 1 或 γ 4 盒连接,构成可以直接转染到哺乳动物细胞中的表达载体。

[0172] [150]pCK7-96 (SEQ ID NO :1)

[0173] TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATC

[0174] AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAAGAACA

[0175] TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC

[0176] CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA

[0177] CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG

[0178] TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCGCTT

[0179] TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG

[0180] TGTGCACGAACCCCCCGTTAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT

[0181] CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA

[0182] GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG

[0183] AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA

[0184] GCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAG

[0185] ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC

[0186] TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA

[0187] CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT

[0188] TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCCG

[0189] TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT

[0190] CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA

[0191] ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT

[0192] CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA

[0193] ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC

[0194] AGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT

[0195] TAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGG

[0196] TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT

[0197] GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
[0198] GGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
[0199] AACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
[0200] CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
[0201] AAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
[0202] TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
[0203] TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAA
[0204] AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA
[0205] TCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAG
[0206] CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGG
[0207] CGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTG
[0208] TACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGC
[0209] ATCAGGCGCCATTCGCCATTACAGGTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCCTC
[0210] TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGC
[0211] CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCGGCCGCGGTG
[0212] CAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAGCCTGTTATCCCAGCACAGTCCTGGAAGAG
[0213] GCACAGGGGAAATAAAAAGCGGACGGAGGCTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTC
[0214] AGACCTGTTCTGAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCATAAG
[0215] CATTGAGTTTACTGCAAGGTGAGAAAAGCATGCAAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAAGAGCTC
[0216] CAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACAT
[0217] CAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTT
[0218] TCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACACCCCAAGGGCAGAACTTT
[0219] GTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
[0220] CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
[0221] ATAACCTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
[0222] AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
[0223] CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
[0224] AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGC
[0225] CCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTTC
[0226] CACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCT
[0227] CCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAAATAAAGTGAATCTTTGCACCT
[0228] GTGGTTTCTCTCTTTCCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTT
[0229] TCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAAATCATCCT
[0230] TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACACGCCTCCCTCAAAACCCACAAGCCTTCT
[0231] GTCCTCACAGTCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCGTAATC
[0232] ATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAG
[0233] CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
[0234] TTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGG
[0235] CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGC

[0236] [151]pCG7-96 (SEQ ID NO :2)
[0237] GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGA
[0238] GGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGAC
[0239] ACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAAGCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCT
[0240] CTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCCATCGG
[0241] TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
[0242] GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
[0243] CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
[0244] CCGTGGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
[0245] AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGG
[0246] AAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGC
[0247] AAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTCAACCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGA
[0248] GAGGGTCTTCTGGCTTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAAGCCAG
[0249] GCCCTGCACACAAAGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGAC
[0250] CCTGCCCTGACCTAAGCCACCCCAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCT
[0251] TCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAATCTTGTGACA
[0252] AAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGG
[0253] CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGT
[0254] CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
[0255] CCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGGA
[0256] CGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATA
[0257] ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
[0258] ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
[0259] CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAG
[0260] GGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAAC
[0261] CTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
[0262] AGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
[0263] GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
[0264] GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
[0265] AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
[0266] AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGTCCCCGGGCTC
[0267] TCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCAT
[0268] GGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTCCACGGG
[0269] TCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACA
[0270] CTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGTGCC
[0271] TCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGG
[0272] CCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACAGCCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTG
[0273] TCCTGTTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAG
[0274] GTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGG

[0275] TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTAAACCTGCATTAATGAATCGGC
[0276] CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC
[0277] GCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
[0278] TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC
[0279] AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
[0280] TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
[0281] CGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATAC
[0282] CTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCT
[0283] CAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCCG
[0284] ACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
[0285] CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
[0286] GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
[0287] TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACC
[0288] GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
[0289] AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAG
[0290] GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGA
[0291] AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
[0292] CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG
[0293] TCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG
[0294] CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
[0295] GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAG
[0296] CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
[0297] GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCG
[0298] AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG
[0299] TCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
[0300] ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG
[0301] AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
[0302] CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA
[0303] AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTC
[0304] AGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
[0305] AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT
[0306] TGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA
[0307] TAAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAACCA
[0308] TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGT
[0309] TTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTC
[0310] GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTC
[0311] GGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGGACATA
[0312] TTGTCTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAG
[0313] GTGACACTATA

[0314] [152]pG4HE (SEQ ID NO :3)
[0315] GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAG
[0316] GGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACA
[0317] CTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCC
[0318] AGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCTTCCACCAAGGGCCCA
[0319] TCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG
[0320] CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
[0321] GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
[0322] GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
[0323] CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG
[0324] CTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGG
[0325] CAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGTCTCA
[0326] GGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTTAC
[0327] CCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGG
[0328] AGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGA
[0329] CACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGG
[0330] TCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGG
[0331] ACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCAC
[0332] CTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTGTTCCCCCAA
[0333] AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTG
[0334] AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC
[0335] CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCCG
[0336] TCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
[0337] CCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCAGGGGCC
[0338] ACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCT
[0339] GTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT
[0340] GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCG
[0341] TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
[0342] TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGG
[0343] GAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCC
[0344] TCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCCGTCCCCGGGCTCTCGG
[0345] GGTCGCGCGAGGATGCTTGGCACGTACCCCGTCTACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAA
[0346] ATAAAGCACCCACCACTGCCCTGGGCCCCCTGTGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAG
[0347] GCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGACATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGG
[0348] CCCAGGCTGTGCAGGTGTGCTGGGCCACCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGG
[0349] CAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGCTGCCCTGGGCTGGGGCAC
[0350] GGGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACAGCCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCTT
[0351] GTCCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCCCCCATGCCCACTCGGGGGGATCCCCGGGTACCGA
[0352] GCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCG

[0353] ATAAGCCAGGTAACTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTAT
[0354] TGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTCGCGCGAG
[0355] CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
[0356] AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC
[0357] GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
[0358] GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
[0359] TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
[0360] GGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC
[0361] TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
[0362] CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
[0363] TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
[0364] AACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGA
[0365] GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAA
[0366] GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT
[0367] CTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGG
[0368] ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
[0369] GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC
[0370] TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
[0371] TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTT
[0372] ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG
[0373] CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGT
[0374] TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTGTGGTATGGC
[0375] TTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA
[0376] AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA
[0377] CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC
[0378] TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
[0379] CTTGCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATC
[0380] ATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC
[0381] GATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG
[0382] GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
[0383] TGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT
[0384] GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTTC
[0385] CCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAAT
[0386] AGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACA
[0387] CATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
[0388] GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAG
[0389] CAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATA
[0390] CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA
[0391] 重组抗体的表达

[0392] 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体通常通过重组表达来产生。重组多核苷酸构建体通常包括与抗体链编码序列操作上连接的表达控制序列,包括天然相连的启动子区或者异源启动子区。优选所述表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦将所述载体掺入到合适的宿主中,则将宿主在适合于高水平表达所述核苷酸序列和收集并纯化交叉反应性抗体的条件下保持。

[0393] 这些表达载体在宿主生物体中通常可或者作为附加体或者作为宿主染色体 DNA 的整合部分复制。表达载体通常含有选择标记,例如氨苄青霉素抗性 or 潮霉素抗性,以允许检测出用所需 DNA 序列转化的那些细胞。

[0394] 大肠杆菌是一种对于本发明 DNA 序列克隆尤其有用的原核宿主。例如酵母的微生物也可用于表达。酵母属是优选的酵母宿主,并且有根据需要带有表达控制序列、复制起点、终止序列等的合适载体。常用的启动子包括 3- 磷酸甘油酸激酶启动子和其它糖酵解酶启动子。诱导型酵母启动子其中包括得自醇脱氢酶、异细胞色素 C 和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0395] 哺乳动物细胞是用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段的优选宿主。参见 Winnacker, FROM GENES TO CLONES, (VCH Publishers, NY, 1987)。本领域已经开发了能够分泌完整异源蛋白质的许多合适的宿主细胞系,包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系、HeLa 细胞、L 细胞和骨髓瘤细胞系。所述细胞优选是非人类的。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子、增强子 (Queen 等, 1986, Immunol. Rev. 89 :49) ; 和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止序列。优选的表达控制序列是来源于内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见 Co 等, 1992, J. Immunol. 148 :1149。

[0396] 另一方面,可以将抗体编码序列掺入到转基因中,以导入到转基因动物的基因组中,随后在所述转基因动物的乳中表达 (参见例如美国专利第 5,741,957、5,304,489 和 5,849,992 号)。合适的转基因包括与得自乳腺特异性基因 (例如酪蛋白基因或 β -乳球蛋白) 的启动子和增强子操作上连接的轻链和 / 或重链的编码序列。

[0397] 可以根据细胞宿主的类型,用众所周知的方法,将含有目标 DNA 区段的载体转移到宿主细胞中。例如,对于原核细胞,通常利用氯化钙转染法,而对于其它细胞宿主,可以使用磷酸钙处理、电穿孔、脂转染、基因枪法 (biolistics) 或基于病毒的转染。用于转化哺乳动物细胞的其它方法包括应用 polybrene、原生质体融合、脂质体、电穿孔和微注射 (一般参见 Sambrook 等, 参见上文)。对于转基因动物的产生,可以将转基因显微注射到受精卵中,或者可以掺入到胚胎干细胞的基因组中,然后将这种细胞的细胞核转移到去核卵母细胞中。

[0398] 一旦表达,可以依照本领域的标准方法纯化抗体,所述标准方法包括 HPLC 纯化,柱层析、凝胶电泳等 (一般参见 Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0399] 经修饰的抗体

[0400] 本发明也包括经修饰的抗体。术语“经修饰的抗体”包括已经通过例如缺失、加入或取代所述抗体的部分而被修饰的抗体,例如单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体。例如,可以通过缺失其恒定区并用可能造成增加所述抗体的半寿期如血清半寿期、稳定性或亲和

性的恒定区取代,来修饰抗体。

[0401] 本发明的抗体缀合物可以用来改变给定的生物反应或引起生物反应(例如募集效应细胞)。所述药物部分不应解释为限于经典的化学治疗药。例如,所述药物部分可以是一种具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可以包括例如酶活性毒素或其活性片段,例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,例如肿瘤坏死因子或干扰素- α ;或生物反应调节物,例如淋巴因子、白介素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它生长因子。

[0402] 用于将这样的治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见例如 Arnon 等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等(编著), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等,“Antibodies For Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 等(编著), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 等(编著), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 等(编著), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)。

[0403] 治疗方案

[0404] 本发明提供包含与药学上可接受的载体一起配制的一种或一种组合的单克隆抗体(完整的或其结合片段)的药用组合物。某些组合物包括一种组合的多种(例如两种或两种以上)本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分。在某些组合物中,所述组合物的每种抗体或其抗原结合部分是与抗原的一种不同的预先选定的表位结合的单克隆抗体或人序列抗体。

[0405] 在预防应用中,给予易感疾病或病症(即免疫疾病)或有此危险的患者足量的药用组合物或药物,以消除或降低此危险、减轻所述疾病(包括所述疾病的生物化学、组织学和/或行为症状)、其并发症和在发病期间存在的中间病理表型的严重程度或延迟其发作。在治疗应用中,给予疑有或者已经患有这种疾病的患者足量的组合物或药物,以治愈或者至少部分阻止所述疾病(生物化学、组织学和/或行为)包括其并发症和发病期间的中间病理学表型的症状。适合实现治疗性或预防性治疗的量被定义为治疗有效量或预防有效量。在预防方案和治疗方案中,药物通常都分数个剂量给予,直至达到足够的免疫应答。通常监视免疫应答,如果免疫应答开始消退,则给予重复的剂量。

[0406] 有效量

[0407] 本发明组合物用于治疗本文所述免疫相关病症和疾病的有效量视许多不同因素而变,所述因素包括给药方法、靶部位、患者的生理状况、患者是人类还是动物、给予的其它药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。所述患者通常为人类,但也可以治疗非人类哺乳动物,包括转基因哺乳动物。治疗剂量需要逐渐增加,以对安全性和效力进行优化。

[0408] 对于给予抗体,剂量范围为约 0.0001-100mg/kg 宿主体重,更通常为 0.01-5mg/kg 宿主体重。例如,剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重,或者在 1-10mg/kg 范围内。一种示例性的治疗方案需要每两周给予 1 次或者每月给予 1 次,或者每 3-6 个月给予 1 次。在某些方法中,同时给予具有不同结合特异性的两个或更多种单克隆抗体,在这种情况下,每种抗体的给药剂量在指定的范围内。通常给予多次抗体。单次给药之间的间隔可以是每周、每月或者是每年。根据通过测量患者体内血液抗体水平表明,间隔也可以是不规则的。在某些方法中,调节剂量,以达到 1-1000 μ g/ml 的血浆抗体浓度,在某些方法中达到 25-300 μ g/ml 的血浆抗体浓度。另一方面,抗体可以作为缓释制剂给予,在这种情况下需要的给药频率较低。剂量和频率视所述抗体在患者体内的半寿期而有所变化。一般而言,人抗体显示出最长的半寿期,然后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。给药剂量和给药频率可以根据所述治疗是预防性的还是治疗性的而有所变化。在预防应用中,在一段长时间内以频率相对较低的间隔给予相对低的剂量。某些患者此后将终身接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对短的间隔给予相对高的剂量,直至疾病发展减弱或终止,优选直至患者显示出病状的部分缓解或完全缓解。此后,可以给予该患者一种预防方案。

[0409] 对于编码免疫原的核酸而言,剂量范围为每位患者约 10ng-1 μ g、100ng-100mg、1 μ g-10mg 或 30-300 μ gDNA。用于感染性病毒载体的剂量在 10-100 或更多病毒体 / 剂范围内变化。

[0410] 给药途径

[0411] 用于诱发免疫应答的药物可以通过胃肠外、局部、静脉内、经口、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内途径给予,以用于预防性和 / 或治疗性治疗。免疫原性药物最常用的给药途径是皮下,虽然其它途径可能同样有效。下一个最常用的途径是肌内注射。这种类型的注射最为常见的是在臂部或腿部肌肉中进行。在某些方法中,直接将药物注射到已经积累了沉淀物 (deposit) 的特定组织中,例如颅内注射。对于抗体的给予,与静脉输注相比,优选肌内注射。在某些方法中,直接将特定的治疗性抗体注射到颅内。在某些方法中,抗体以缓释组合物或装置如 MedipadTM 装置给予。

[0412] 本发明的药物可以任选地与在治疗包括免疫相关疾病在内的各种疾病中至少部分有效的其它药物联合给予。就在脑中发生淀粉状蛋白沉积的早老性痴呆和唐氏综合征而论,也可以将本发明的药物与增加本发明药物穿过血脑屏障 (BBB) 的其它药物结合给予。

[0413] 制剂

[0414] 本发明的药物通常作为药用组合物给予,所述药用组合物包含活性治疗药即和各种各样的其它药学上可接受的组分。参见 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)。优选的形式取决于计划的给药方式 and 治疗应用。根据所需的制剂,所述组合物也可以包括药学上可接受的无毒载体或稀释剂,其定义为通常用来配制供动物或人类给药用的药用组合物的载体。选择稀释剂,以便不会影响到所述组合的生物活性。这类稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸缓冲盐溶液、Ringer 氏溶液、葡萄糖溶液和 Hank 氏溶液。另外,所述药用组合物或制剂也可以包括其它载体、辅料或无毒、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。

[0415] 药用组合物也可以包括大的被缓慢代谢的大分子,例如蛋白质、多糖如脱乙酰壳多糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物 (例如胶乳官能化 sepharoseTM、琼脂糖、纤维素等)、聚

合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体（例如油珠或脂质体）。另外，这些载体可以用作免疫刺激剂（即佐剂）。

[0416] 对于胃肠外给药，本发明的药物可以作为注射剂量的所述物质在生理上可接受的稀释剂与药用载体中的溶液或悬浮液来给予，所述药用载体可以是无菌液体，例如水、油、盐水、甘油或乙醇。另外，组合物可以存在辅料，例如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物质等。药用组合物的其它成分是来源于石油、动物、植物或合成的那些成分，例如花生油、豆油和矿物油。一般而言，甘醇类如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体，尤其对于注射液而言。抗体可以以长效注射剂 (depot injection) 或植入制剂的形式给予，所述长效注射剂或植入制剂可以以允许所述有效成分缓释的方式配制。一种示例性组合物包含配制在由 50mM L- 组氨酸、150mM NaCl 组成用 HCl 调至 pH 6.0 的水性缓冲液中的 5mg/ml 的单克隆抗体。

[0417] 通常，组合物配制为注射剂，或为液体溶液或为悬浮液；也可以制备适合于在注射前在液体溶媒中制成溶液或悬浮液的固体形式。所述制剂也可以如上所述被乳化，或者包封在脂质体或微粒如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中以便增强佐剂效应（参见 Langer, 1990, Science 249 :1527 和 Hanes, 1997, Advanced Drug Delivery Reviews 28 :97-119）。本发明的药物可以以长效注射剂或植入制剂的形式给予，所述注射剂或制剂以允许所述有效成分缓释或脉冲释放的方式配制。

[0418] 适用于其它给药模式的其它制剂包括经口、鼻内和肺部用制剂、栓剂和透皮应用。

[0419] 对于栓剂，粘合剂和载体包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯；可以由含有 0.5% -10%、优选 1% -2% 范围内的有效成分的混合物，形成这种栓剂。口服制剂包括赋形剂，例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物采用溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或散剂的形式，含有 10% -95% 有效成分，优选含 25% -70% 有效成分。

[0420] 局部用药可以导致经皮或皮内递药。通过将所述药物与霍乱毒素或其解毒型衍生物或亚单位或其它相似的细菌毒素共同给予，可以促进局部给药（参见 Glenn 等, 1998, Nature 391 :851）。使用作为混合物或作为通过化学交联或者作为融合蛋白表达获得的连接分子，可以达到共同给药。

[0421] 另一方面，用皮肤贴剂或 transferosomes (Paul 等, 1995, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 ;Cevc 等, 1998, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15)，可以达到经皮递药。

[0422] 所述药用组合物一般配制为无菌、基本等渗的，并且完全符合美国食品药品监督管理局的所有 Good Manufacturing Practice (药品生产管理规范) (GMP) 条例。

[0423] 毒性

[0424] 优选治疗有效量的本文所述蛋白将提供治疗效益，而不引起显著的毒性

[0425] 本文所述蛋白的毒性可以用标准药理学方法，在细胞培养物或实验动物中测定，例如通过测定 LD₅₀（使 50% 群体致死的剂量）或 LD₁₀₀（使 100% 群体致死的剂量）来测定。毒性作用和治疗效应之间的剂量比是治疗指数。从这些细胞培养物测定和动物研究获得的数据，可以用于制订人类用无毒的剂量范围。本文所述蛋白的剂量优选在包括低毒性或无毒的有效量的循环浓度范围内。所述剂量可以在该范围内根据所用剂型和所用的给药途径而有所变化。确切的制剂、给药途径和剂量可以由各个医师根据患者的病症来选择（参见例

如Fingl等,1975,载于:The Pharmacological Basis of Therapeutics,第1章,第1页)。

[0426] 试剂盒

[0427] 包含本发明的组合物(例如单克隆抗体、人序列抗体、人抗体、多特异性分子和双特异性分子)和使用说明的试剂盒也在本发明的范围内。所述试剂盒还可以包含至少一种另外的试剂、或者一种或多种另外的本发明人抗体(例如具有与所述抗原中不同于第一人抗体的表位结合的互补活性的人抗体)。试剂盒通常包括指示试剂盒内容物计划应用的标签。术语标签包括在试剂盒上供应、或者与试剂盒一起供应或者伴随试剂盒供应的任何书写或记录材料。

实施例

[0428] 实施例 1

[0429] C μ 被打中小鼠的产生

[0430] CMD打靶载体的构建。质粒pICE μ 含有一个跨越 μ 基因的鼠Ig重链基因座的EcoRI/XhoI片段,得自Balb/C基因组 λ 噬菌体文库(Marcu等,1980,Cell 22:187)。将这一基因组片段亚克隆到质粒pICEMI9H(Marsh等,1984,Gene 32:481-485)的XhoI/EcoRI位点。pICE μ 中包括的重链序列从恰好位于 μ 内含子增强子3'的EcoRI位点下游延伸至位于 μ 基因最后一个跨膜外显子下游约1kb的XhoI位点;然而, μ 转换重复区中的大部分已经由于在大肠杆菌中传代而缺失。

[0431] 如下构建所述打靶载体(参见图1)。从pICE μ 切下一个1.3kbHindIII/SmaI片段,将其亚克隆到HindIII/SmaI消化的pBluescript(Stratagene,La Jolla,CA)中。这一pICE μ 片段从位于C μ 1 5'大约1kb的HindIII位点延伸至C μ 1内的SmaI位点。所得的质粒用SmaI/SpeI消化,插入得自pICE μ 、从C μ 1 3'中的SmaI位点延伸至恰好位于最后一个C μ 外显子下游XbaI位点的约4kb SmaI/XbaI片段。将所得质粒pTAR1在SmaI位点线性化,并插入一个neo表达盒。该盒由小鼠磷酸甘油酸激酶(pgk)启动子(XbaI/TaqI片段;Adra等,1987,Gene 60:65-74)的转录控制下并且含有pgk聚腺苷酸化位点(PvuII/HindIII片段;Boer等,1990,Biochemical Genetics 28:299-308)的neo基因组成。该盒得自质粒pKJ1(由Tybulewicz等描述,1991,Cell 65:1153-1163),从所述质粒中切取作为EcoRI/HindIII片段的neo盒,将其亚克隆到EcoRI/HindIII消化的pGEM-7Zf(+)中,产生pGEM-7(KJ1)。通过EcoRI/SalI消化,从pGEM-7(KJ1)中切取neo盒,将其平端化,并以与基因组C μ 序列相反的方向亚克隆到质粒pTAR1中的SmaI位点。所得的质粒用NotI线性化,插入单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)盒,以便于富集带有同源重组的ES克隆,如Mansour等,1988,Nature 336:348-352所述。该盒由以小鼠pgk启动子和聚腺苷酸化位点作支架的tk基因的编码序列组成,如Tybulewicz等,1991,Cell 65:1153-1163所述。所得的CMD打靶载体与所述重链基因组有总共大约5.3kb的同源性,设计用以产生其中neo表达盒插入第一个C μ 外显子的唯一SmaI位点中的突变型 μ 基因。所述打靶载体电穿孔到ES细胞中之前,用在质粒序列内切割的PvuI线性化。

[0432] 被打中ES细胞的产生和分析。基本上按照已描述的方法(Robertson,E. J. (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach (E. J. Robertson 编著) Oxford, IRL Press, p. 71-112),让AB-1ES细胞(McMahon, A. P. 和 Bradley, A., 1990,

Cell 62:1073-1085) 在无有丝分裂活性的 SNL76/7 细胞饲养层(出处同前)上生长。采用 Hasty 等所述的方法(Hasty, P. R. 等, 1991, Nature 350:243-246), 将线性化的 CMD 打靶载体电穿孔到 AB-1 细胞中。将电穿孔细胞以 $1-2 \times 10^6$ 细胞/皿的密度接种到 100mm 培养皿中。24 小时后, 向培养基中加入 G418(200 微克/ml 有效成分) 和 FIAU(5×10^{-7} M), 让抗药性克隆在 8-9 天内产生。挑出克隆, 用胰酶处理, 将其分为两个部分, 进一步扩大培养。然后将得自每个克隆的一半细胞冷冻, 分析另一半细胞的载体和靶序列之间的同源重组。

[0433] 通过 DNA 印迹杂交法进行 DNA 分析。如 Laird 等所述(Laird, P. W. 等, 1991, Nucleic Acids Res. 19:4293), 从克隆中分离 DNA。分离的基因组 DNA 用 SpeI 消化, 用 915bp SacI 片段即探针 A 探测(图 1), 探针 A 与 μ 内含子增强子和 μ 转换区之间的序列杂交。探针 A 从野生型基因座检测到一个 9.9kb SpeI 片段, 从 μ 基因座检测到一个已经与 CMD 打靶载体(neo 表达盒含有一个 SpeI 位点)同源重组的 7.6kb 鉴别性条带。在通过 DNA 印迹分析筛选出的 1132 个 G418 和 FIAU 抗性克隆中, 3 个克隆显示出指示在 μ 基因座同源重组的所述 7.6kb SpeI 条带。这 3 个克隆进一步用酶 BglI、BstXI 和 EcoRI 消化, 以证实所述载体同源整合到 μ 基因中。当用探针 A 杂交时, 用 BglI、BstXI 或 EcoRI 消化的野生型 DNA 的 DNA 印迹分别产生 15.7、7.3 和 12.5kb 的片段, 而 7.7、6.6 和 14.3kb 的片段分别指示被打中 μ 等位基因的存在。所有 3 个通过 SpeI 消化所检测的阳性克隆都显示出预期的鉴别所述 neo 盒插入 C μ 1 外显子中的 BglI、BstXI 和 EcoRI 限制性片段。

[0434] 带有突变型 μ 基因的小鼠的产生。将指定编号为 264、272 和 408 的所述 3 个被打中 ES 克隆解冻复苏, 如 Bradley 所述(Bradley, A., 1987, 载于 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:a Practical Approach. (E. J. Robertson 编著) Oxford: IRL Press, p. 113-151), 注射到 C57BL/6J 胚泡中。将经注射的胚泡转移到假孕雌性小鼠的子宫中, 产生代表来源于输入 ES 细胞和宿主胚泡的细胞混合物的嵌合小鼠。根据刺豚鼠毛色中 C57BL/6J 黑色背景上来源于所述 ES 细胞系的量, 可以肉眼估计 ES 细胞对所述嵌合体的贡献程度。克隆 272 和 408 仅产生低百分比的嵌合体(即刺豚鼠着色的百分比低), 而克隆 264 产生高百分比的雄性嵌合体。让这些嵌合体与 C57BL/6J 雌性配种, 产生指示 ES 细胞基因组种系遗传的刺豚鼠后代。通过对 BglI 消化的尾部活检样品的 DNA 的 DNA 印迹分析(如上文关于 ES 细胞 DNA 分析所述的方法), 筛选所述被打中的 μ 基因。大约 50% 的所述刺豚鼠后代除显示 15.7kb 的野生型条带之外, 还显示出一个 7.7kb 的 BglI 杂交条带, 证明所述被打靶 μ 基因的种系遗传。

[0435] 转基因小鼠的 μ 基因的功能失活的分析。为了确定 neo 盒插入到 C μ 1 中是否使所述 Ig 重链基因失活, 让克隆 264 嵌合体与 JHD 突变纯合小鼠配种, JHD 突变由于 JH 基因区段的缺失而使重链表达失活(Chen 等, 1993, Immunol. 5:647-656)。产生了 4 个刺豚鼠后代。从 1 月龄这些动物中获得血清, 通过 ELISA 分析鼠 IgM 的存在。所述 4 个后代中的 2 个完全缺乏 IgM(表 1)。尾部活检样品 DNA 通过 BII 消化并使其与探针 A(图 1)杂交、以及通过 StuI 消化并与 475bp EcoRI/StuI 片段(出处同前)杂交进行 DNA 印迹分析, 分析所述 4 只动物的基因型, 证明不能表达血清 IgM 的动物是其中所述重链基因座中的一个等位基因带有所述 JHD 突变、而另一个等位基因带有所述 C μ 1 突变的动物。JHD 突变杂合的小鼠显示出血清 Ig 的野生型水平。这些数据证明, 所述 C μ 1 突变使 μ 基因的表达失活。

[0436] 表 1

[0437]

小鼠	血清 IgM(微克/ml)	IgH 链基因型
42	< 0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129×BL6F1	153	+/+
JHD	< 0.002	JHD/JHD

[0438] 表 1 显示了通过 ELISA 检测的携带 CMD 突变和 JHD 突变的小鼠 (CMD/JHD)、JHD 突变杂合小鼠 (+/JHD)、野生型小鼠 (129Sv×C57BL/6J)F1 小鼠 (+/+) 以及 B 细胞缺陷型 JHD 突变纯合小鼠 (JHD/JHD) 的血清 IgM 水平。

[0439] 实施例 2

[0440] 人 κ 轻链转基因 KCo5

[0441] 人 κ 轻链转基因小鼠系 KCo5-9272 的世代先前已被描述为 KCo5(Fishwild, D. 等, 1996, Nat. Biotechnol. 14, 845-851; 美国专利第 5,770,429 号中的实施例 38)。该系通过共同注射人工人 κ 轻链基因座和包含多个人 V_{κ} 区段的 YAC 克隆而产生。从含有包含人 V_{κ} 基因座一部分的 450kb 酵母人工染色体 (YAC) (ICRF YAC 文库命名 4x17E1) 的酵母菌株中分离出 YAC 克隆 DNA。对从所述 YAC DNA 扩增的 V 基因区段的 DNA 序列分析证明, 该克隆包含人远端 V_{κ} 区的相当大的部分, 包括大约 32 个不同 V_{κ} 区段。对该克隆不同分离株的分析 (Brensing-Kuppers, J. 等, 1997, Gene 191:173-181) 证实了该结果, 也证明该克隆代表人 κ 基因座 C 单倍型的一个实例, 其中所述远端 V 基因簇的 5' 部分类似近端 V 基因簇的同源区。因此, 5'0 家族 V 基因区段在序列上接近所述同源近端 0p 家族 V 区段。

[0442] 为了获得供微注射到胚胎原核用的纯化 YAC DNA, 将总基因组 DNA 在琼脂糖凝胶上进行大小分级分离。将含有 YAC 4x17E1 的酵母细胞在裂解之前包埋在琼脂糖中, 通过脉冲场凝胶电泳将 YAC DNA 与酵母染色体 DNA 分开, 分离 YAC DNA, 将其微注射到半日龄胚胎原核中。

[0443] 对基因组 DNA 的 DNA 印迹分析证明, 人 $V_{\kappa}A10$ 基因 (Cox, J. 等, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836; Schable, K. 和 Zachau, H., 1993, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:1001-1022) 掺入到 KCo5-9272 小鼠的基因组中。使用 $V_{\kappa}01$ 5' 区特异性的探针 (m217-1, Genbank X76071; AB129, ccacccataaacactgattc (SEQ ID NO:4); AB130, ttgatgcacacacacagggc (SEQ ID NO:5)) 和 $V_{\kappa}L24$ 和 $L25$ 之间的基因间区特异性探针 (m138-13, Genbank X72824; AB127, cctgccttacagtgtctgttag (SEQ ID NO:6); AB128, ggacagcaacaggacatggg (SEQ ID NO:7)) 进行 PCR 分析 (Brensing-Kuppers, J. 等, 1997,

Gene 191:173-181) 表明,得自 YAC 克隆 4x17E1 的 V κ 基因簇的 5' 区和 3' 区包括在 KCo5-9272 转基因整合体中。然后让系 KCo5-9272 小鼠与人重链转基因内源免疫球蛋白基因座突变型小鼠配种,获得内源重链和 κ 轻链基因座破坏纯合型、以及人重链转基因 HC2 或 HC07(美国专利第 5,770,429 号)和人 κ 轻链转基因 KCo5 半合型或纯合型小鼠。内源重链和 κ 轻链基因座破坏纯合型、和人重链转基因和人 κ 轻链转基因半合型或纯合型动物被命名为双转基因/双缺失小鼠。

[0444] 对直接得自 KCo5 双转基因/双缺失小鼠或者得自由这些动物产生的杂交瘤的 cDNA 克隆的 DNA 序列分析揭示出以下 V κ 基因表达 L6、A27、012、04/014、A10、L15、L18、L19 和 L24。

[0445] 实施例 3

[0446] 杂交育种

[0447] 通过杂交育种,使含有 14 号染色体片段 hCF(SC20) 的人重链基因座和人 κ 轻链转基因结合到一个品系中。hCF(SC20) 转基因小鼠品系是内源重链基因座(CM2D) 和内源 κ 轻链(CKD) 失活突变纯合型的。该品系也是 λ 1(low) 突变纯合型的(Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727)。CM2D 突变包含覆盖 C μ 2、C μ 3-C μ 4 的部分以及 M μ 1 和 M μ 2 的 3.7kb BamHI-XhoI 区段的缺失。CKD 突变包含覆盖 C κ 外显子的 2kb SacII-BglIII 区段的缺失。这两种突变先前已有报道(Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727)。让这些小鼠分别与 KCo5-9272 人 κ 转基因插入纯合型小鼠以及内源重链和 κ 链基因座的 CMD 和 JKD 破坏纯合型小鼠配种。在以上实施例 1 中描述了 CMD 突变。JKD 突变描述于美国专利第 5,770,429 号和 Chen 等, 1993, EMBO J. 12:821-830) 中。得自这些交配的 hCF(SC20) 转染色体阳性的后代(SC20/KCo5 小鼠, 或者杂种小鼠) 对于以下 6 种不同的遗传修饰是半合子型的: SC20、KCo5、CMD、CM2D、JKD 和 CKD。然而, 由于内源重链基因座的 CMD 突变和 CM2D 突变阻止小鼠 μ 基因的表达, 而内源 κ 基因座的 JKD 突变和 CKD 突变阻止小鼠 κ 的表达, 所以这些 SC20/KCo5 小鼠对于这两个基因座中的每个基因座的破坏是纯合型的。因此, 所述小鼠的含 κ 轻链的抗体的表达依赖于 SC20 和 KCo5 转基因。它们也可以形成杂种人/小鼠抗体, 因为内源小鼠 λ 轻链基因座仍有功能。所述小鼠也可以表达包含人重链 V 区和小鼠非 μ 重链同种型恒定区序列的嵌合人/小鼠抗体。这些嵌合抗体可以通过类别转换介导而将人 SC20IgH 基因座染色体易位到小鼠 IgH 基因座中来形成。这样的“转换(trans-switching)”事件先前发现存在于含小基因座重链转基因的小鼠中(Taylor, L. 等, 1994, Int. Immunol. 6:579-591)。40 只雄性 KCo5/CMD/JKD 小鼠和 98 只雌性 hCF(SC20)/CM2D/CKD 小鼠之间的杂交育种, 产生 305 只幼畜。对这些幼畜制备的血清样品的

[0448] ELISA 分析(Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:ELISA 分析(Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:722-727) 表明, 305 只幼畜中的 125 只(41%) 是人 Ig μ 链表达阳性的。检测人 Ig κ 链的进一步分析表明, 所有 h μ 阳性个体也都是 h κ 阳性的, 表明 KCo5 转基因保留(参见实施例 2)。使用用于检测 hCF(SC20) 的 D14S1419 和 D14S1420 引物对(Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 722-727) 对尾部 DNA 的 PCR 分析表明, 所有 h μ 阳性个体保留 hCF(SC20), 而所有 h μ 阴性个体都是 hCF(SC20) 阴性的。hCF(SC20) 从雌性 hCF(SC20)/CM2D/CKD 的遗传效率

(41%) 与先前报道的数据相一致 (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 : 722-727)。

[0449] 实施例 4

[0450] 人 Ig 在杂种小鼠血清中的表达

[0451] 通过 ELISA 检查从 6-12 周龄杂种小鼠制备的血清样品, 以测定人 Ig μ 、 γ 、 κ 和小鼠 λ 链的浓度 (图 2)。与在相似条件下保持的内源 C μ 缺失半合子型小鼠相比, 人 Ig μ 和 Ig γ 的平均水平高于小鼠 μ 链水平 (273mg/l), 分别是小鼠 γ 链水平 (590mg/l) 的 1/3。这些重链表达水平类似于双 Tc/ 双 KO 小鼠 (hCF(SC20)/hCF(2-W23)/CM2D/CKD Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727) 的水平。预期通过雄性和雌性杂种小鼠之间交配产生的 1/4 的 F2 后代是 m λ C1 (λ low) 突变纯合型的, 因为杂种小鼠的第一代是该突变杂合型的。通过 ELISA 测定 21 只先前报道中所述的 F2 杂种小鼠 (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727) 的人 Ig κ 轻链和小鼠 Ig λ 轻链的血清浓度。在所检查的 21 只小鼠中, 6 只小鼠表现出低 (< 0.1) 小鼠 λ / 人 κ 之比, 这是 λ low 突变纯合型小鼠的特征 (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727)。因此, 这 6 只杂种小鼠可能是 λ (low) 突变纯合型的, 这可用于有效产生分泌包含人 Ig 重链和 κ 轻链的抗体的杂交瘤。

[0452] 实施例 5

[0453] 抗人 CD4 人单克隆抗体的产生

[0454] 抗原的免疫。第 0 天皮下注射弗氏完全佐剂 (Sigma) 中的 100 μ g 可溶性人 CD4 (sCD4), 给杂种小鼠和双 Tc/KO 小鼠 (n = 5) 进行免疫, 然后在第 9、19 和 27 天用弗氏不完全佐剂 (Sigma) 的 100 μ g 可溶性人 CD4 免疫。第 37 天最后一次静脉注射含 40 μ g sCD4 的 PBS。

[0455] 小鼠体内的体液应答。第 0、16、26、34 和 40 天收集血清。根据抗 sCD4 的单克隆抗体 (MAb) 的产生, 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA), 测量抗原特异性人 Ig γ 和 Ig κ 。对于 ELISA 的详细方案描述于实施例 4 中。用含 1 μ /ml 抗原的碳酸氢盐缓冲液 (Sigma) 过夜包被抗原特异性板。用一种对抗原特异性的人单克隆 IgG 作为标准品, 定量测定抗原特异性 Ig γ 和 Ig κ 。结果示于图 3、4、5 和 6 中。在初次免疫后 34 天, 在杂种小鼠和双 Tc/ 双 KO 小鼠体内观察到人 γ 和 κ 应答。

[0456] 杂交瘤的产生。第 40 天, 将得自免疫小鼠的脾细胞与 Sp2/0-Ag14 细胞融合。将细胞悬浮液以 20,000 脾细胞 / 孔接种到 384 孔板中。根据抗 sCD4 单克隆抗体 (MAb) 的产生, 筛选所得的杂交瘤。结果示于以下表 1 中。

[0457] 表 1

[0458] CD4 单克隆抗体的产生

[0459]

	杂种	双 Tc/KO
有集落的孔数	1265	720

	杂种	双 Tc/KO
抗原特异性 h γ /h κ 阳性孔数	18	4
抗原特异性 h γ /m λ 阳性孔数	0	0
亚克隆亲代孔数	14	1
亚克隆效率 (%)	88	21

[0460] 通过两轮有限稀释,高效地亚克隆了得自杂种小鼠的亲代杂交瘤。得自杂种小鼠的所有杂交瘤都分泌人 γ /人 κ 抗 CD4MAb,无一个杂交瘤分泌人 γ /鼠 λ 抗 CD4MAb。这些数据表明,对于产生抗原特异性人单克隆抗体而言,杂种小鼠优于双 TC/KO 品系。通过多个 ELISA,进一步检查了由这些亚克隆杂交瘤分泌的 MAbs 的同种型。7 个孔是 h γ 1⁺,7 个孔是 h γ 4⁺。

[0461] 小规模培养物中的生长曲线和抗 CD4 人 IgG₁ 单克隆抗体的分泌水平。用其中一个产生抗 CD4 人 IgG₁ κ 的杂交瘤克隆 (KM2-3) 来测定小规模培养物中的生长曲线和人单克隆抗体的分泌水平。第 0 天,将 KM2-3 杂交瘤细胞以 1×10^5 细胞/ml 接种到 4 升旋转瓶 (Bellco) 中。使用 1 升补充 ITS-X (Gibco BRL) 和 1% 低 IgG 血清 (Hyclone) 的 ERDF 培养基进行培养。每天收集 1ml 培养基,测量细胞数以及如先前报道中所述 (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727) 通过 ELISA 测量 IgG₁ κ 浓度。结果示于图 7。估计的生产率为 24.6pg/细胞/天,这在类似于对于在这些条件下优良的鼠杂交瘤所预期的范围内。

[0462] 实施例 6

[0463] 抗人 G-CSF 人单克隆抗体的产生

[0464] 抗原的免疫。通过第 0、9、19、27 天皮下注射 TiterMaxGold 佐剂 (CytRx) 中的 100 μ g 可溶性人 G-CSF,免疫杂种小鼠和双 Tc/KO 小鼠 (n = 5)。第 37 天,给杂种小鼠和双 Tc/KO 小鼠最后一次静脉注射 PBS 中的 20 μ g G-CSF。

[0465] 每个小鼠品系体内的体液应答。第 0、16、26、34 和 40 天收集血清。通过 ELISA 定量测定抗原特异性人 Ig 的浓度。用含 1 μ g/ml 抗原的碳酸氢盐缓冲液 (Sigma) 过夜包被抗原特异性板。用一种对 G-CSF 特异性的人单克隆 IgG 作为标准品,定量测定抗原特异性 Ig γ 和 Ig κ 。结果示于图 8、9、10 和 11 中。杂种小鼠血清中的抗原特异性 h γ 和 h κ 浓度约 10 倍于双 Tc/KO 小鼠的所述浓度。

[0466] 杂交瘤的产生。第 40 天,将得自免疫小鼠的脾细胞与 Sp2/0-Ag14 细胞融合,根据抗 G-CSF 单克隆抗体 (MAb) 的产生,通过 ELISA 筛选所得的杂交瘤。结果示于以下表 2 中。

[0467] 表 2

[0468] G-CSF 单克隆抗体的产生

[0469]

	杂种	双 Tc-KO
有集落的孔数	3880	1580
抗原特异性 h γ /h κ 阳性孔数	13	3
抗原特异性 h γ /m λ 阳性孔数	13	0
亚克隆亲代孔数	11	2
亚克隆效率 (%)	83	64

[0470] 产生抗 G-CSF IgG 的杂交瘤中的一半分泌人 γ /人 κ 抗 G-CSFMAb,其余的杂交瘤分泌人 γ /鼠 λ 抗 G-CSF MAb。通过两轮有限稀释亚克隆产生 h γ /h κ 抗体的杂交瘤。进一步的 ELISA 实验证明,分别有 5 个、3 个和 3 个孔是 h γ 1⁺、h γ 2⁺ 和 h γ 4⁺。

[0471] 实施例 7

[0472] 抗人血清白蛋白人单克隆抗体的产生

[0473] 第 0 天腹膜内注射弗氏完全佐剂 (Sigma) 中的 50 μ g 人血清白蛋白,免疫杂种小鼠,然后在第 7、14 和 21 天用弗氏不完全佐剂 (Sigma) 的 50 μ g 人血清白蛋白免疫。

[0474] 杂交瘤的产生。第 24 天,将得自免疫小鼠的脾细胞与 Sp2/0-Ag14 细胞融合,根据针对抗原的单克隆抗体 (MAb) 的产生,通过 ELISA 筛选所得的杂交瘤。从产生抗白蛋白 h γ 的杂交瘤中随机选择 10 孔杂交瘤,进行亚克隆。所有的杂交瘤都分泌 γ /人 κ 抗白蛋白。该数据表明,对于产生抗原特异性全人单克隆抗体而言,杂种小鼠优于双 Tc/双 KO 小鼠,因为 2/3 的得自双 Tc/双 KO 小鼠的抗白蛋白 IgG 杂交瘤是 m λ ⁺ (Tomizuka, K. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 :722-727)。

[0475] 实施例 8

[0476] 抗人 CTLA-4 单克隆抗体的产生

[0477] 抗原。通过 PCR 扩增 cDNA 克隆以及桥接合成寡核苷酸,构建包含得自人 CTLA-4 和鼠 CD3 ζ 基因的序列的融合蛋白的 DNA 编码区段。所编码的融合蛋白含有以下序列 :i.) 编码氨基酸 1-190 (含有人 CTLA-4 的信号肽、胞外结构域和完整的人 CTLA-4 推定的跨膜序列) 的人 CTLA-4 ;和 ii.) 从氨基酸 52 至羧基末端的鼠 CD3 ζ 。将 PCR 扩增产物克隆到质粒载体中,测定所述 DNA 序列。然后将所克隆的插入片段亚克隆到载体 pBABE (它含有编码嘌呤霉素抗性的基因 (Morganstern, JP 和 Land, H, 1990 Nucl. Acids Res. 18 :3587-96) 中,产生 pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ 。将 pBABE-huCTLA4/CD3 ζ 转染到逆转录病毒包装系 ψ -2 中,选择出一个嘌呤霉素抗性细胞库。将这些细胞与鼠 T 细胞杂交瘤 BW5147 (ATCC#TIB-47) 共同培养。共同培养 2 天后,除去非贴壁 BW5147 细胞,根据对嘌呤霉素的抗性进行选择。通过有限稀释,亚克隆所述嘌呤霉素抗性细胞库,并且根据人 CTLA-4 的表面表达,通过 FACS 进行测试。选择出一个在细胞表面表达高水平人 CTLA-4 的克隆 (BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12)。包含人 CTLA-4 胞外结构域的可溶性重组抗原购自 R&D Systems (Cat. #325-CT-200)。

[0478] 免疫。给 3 只 SC20/KCo5 杂种小鼠 (ID#22227、22230 和 22231) 分别腹膜内 (i. p.) 注射 10^7 经洗涤表达人 CTLA-4 胞外结构域的 BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12 全细胞, 进行免疫。以大约 1 个月的间隔, 给小鼠 #22227 和 22230 重复这一免疫步骤 2 次或更多次。第 3 个月, 给小鼠 #22231 第三次腹膜内注射经洗涤的全细胞, 而给小鼠 #22227 和 22230 分别腹膜内注射和皮下 (s. c.) 注射 MPL+TDM 佐剂 (Sigma Cat. #M6536) 中 20 微克可溶性重组抗原。然后让小鼠休息 10 天, 在收获用于杂交瘤融合的脾细胞之前 2 天, 分别给小鼠 #22227 和 22230 尾静脉 (i. v.) 注射 20 微克可溶性重组抗原和腹膜内注射 MPL+TDM 佐剂中的 20 微克可溶性重组抗原。收获脾细胞前一天, 给这些小鼠再静脉注射 20 微克可溶性重组抗原。在收获脾细胞前 3 天, 腹膜内给予小鼠 #22231MPL+TDM 佐剂中的 10^7 经洗涤的 BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12 细胞, 然后在融合前 2 天, 腹膜给予无佐剂的 10^7 经洗涤的 BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12 细胞。

[0479] 融合。在 3 个独立实验中, 采用标准方法 (Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Sprmg Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennett 等, 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, New York; Oi 和 Herzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, Mishell 和 Shiigi 编著, pp. 357-372. Freeman, San Francisco; Halk, 1984, Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, Weissbach 和 Weissbach 编著, pp. 766-780, Academic Press, Orlando, FL), 将得自小鼠 #22227、22230 和 22231 的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (系 P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL1580, 或 SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581) 融合。细胞培养在 DMEM、10% FBS、OPI (Sigma 0-5003)、BME (Gibco 21985-023) 和 3% Origen Hybridoma Cloning Factor (Igen IG50-0615) 中。在最初的生长和选择期间, 向培养基中加入 HAT 或 HT 补充物。

[0480] 杂交瘤筛选。为了鉴定分泌抗原反应性人 IgG 抗体的杂交瘤, ELISA 板 (Nunc MaxiSorp) 用 $100 \mu\text{l}$ /孔含 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 人 CD152Mu-Ig 融合体 (Ancel#501-820) 的 PBS 于 4°C 包被过夜。洗涤板, 用含有 1% BSA 的 $100 \mu\text{l}$ /孔 PBS-Tween 封闭。加入 $50 \mu\text{l}$ 细胞培养上清液, 然后孵育 1-2 小时。洗涤板, 然后将其与 $100 \mu\text{l}$ /孔与碱性磷酸酶缀合的山羊抗人 γ 重链 (抗人 γ (fc) AP Jackson#109-056-098) 一起孵育 1 小时。每个步骤之间用 PBS-Tween 洗涤板 3 次。鉴定出 76 个分泌 γ 阳性的抗原反应性抗体的杂交瘤。然后进一步分析这些克隆, 以确定 γ 重链或轻链同种型以及污染性 IgM 分泌细胞的存在与否 (表 3)。

[0481] 表 3

[0482] 得自包含抗原反应性人 IgG 抗体的 1° 杂交瘤孔的重链同种型的分析

[0483]

小鼠 ID#	IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	Ig κ	Ig λ	所有 IgG
22227	0	4	1	0	3	7	0	8
22230	9	25	8	5	7	48	6	45

小鼠 ID#	IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	Ig κ	Ig λ	所有 IgG
22231	1	11	2	3	7	23	1	23
总计	10	40	11	8	17	75	7	76

[0484] 首先测试杂交瘤上清液中抗原反应性人 IgG 的存在情况。然后测试 76 个阳性上清液的抗原反应性人 IgM、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、Ig κ 和小鼠 Ig λ。捕获试剂：人 CD152 μ-Ig 融合体 (Ancel#501-820)。检测试剂：抗人 γ (fc)HRP (Jackson#109-036-098)；抗人 κ HRP (Bethyl#A80-115P)；抗人 γ1 HRP (Southern Biotech#9050-05)；抗人 γ2HRP (Southern Biotech#9070-05)；抗人 γ3HRP (SouthernBiotech#9210-05)；抗人 γ4 HRP (Southern Biotech#9200-05)；抗人 μ HRP (Southern Biotech#1060-05)。

[0485] 所述 76 个 IgG 抗原阳性孔中的 75 个也是人 κ 轻链抗原反应性抗体阳性，而其中 7 个孔是含小鼠 λ 的杂种抗体阳性。然而，所述 7 个 λ 阳性孔中的 6 个孔也含有 κ 轻链，这 3 个孔中的 3 个是污染性 IgM 抗原反应性抗体阳性。因为这些污染性 IgM 抗体可能有影响，包括 λ 轻链，所以在总共 76 个 IgG 克隆中有 3-7 个 IgG λ 克隆。因此，内源小鼠 λ 看来仅产生 4-9% 的所述 IgG 阳性抗原反应性杂交瘤。然后将所述 76 个阳性杂交瘤孔中的 22 个孔的细胞通过有限稀释再接种，以亚克隆分泌各个单克隆抗体的杂交瘤。从 22 个所述 1° 杂交瘤中的 19 个中，获得稳定的抗原反应性人 IgG 亚克隆（参见以下表 4）。

[0486] 表 4

[0487] 抗 CTLA-4 杂交瘤的亚克隆

[0488]

克隆	OD	所测试的克隆数	阳性数	阳性百分比
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%

克隆	OD	所测试的 克隆数	阳性数	阳性 百分比
10E1	1.17	24	3	13%
9F6	1.08	24	0	0%
689	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%

[0489] 因此,获得 86% 的亚克隆效率。亚克隆时,发现所述 1° 杂交瘤中的一个包含 2 个具有不同 IgG 同种型的不同克隆(参见以下表 5)。

[0490] 表 5

[0491] 人 IgG κ 抗 CTLA-4 亚克隆的同种型分析

[0492]

小鼠	克隆	亲代孔	IgG ₁ κ	IgG ₂ κ	IgG ₃ κ	IgG ₄ κ
22227	8G5	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22227	6B9	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22230	1B5	IgG ₃ κ	—	—	+	—
22230	2D8	IgG ₁ κ	+	—	—	—

小鼠	克隆	亲代孔	IgG ₁ κ	IgG ₂ κ	IgG ₃ κ	IgG ₄ κ
22230	6D11	IgG ₄ κ	—	—	—	+
22230	8H4	IgG ₄ κ	—	—	—	+
22230	9C4	IgG ₃ κ	—	—	+	—
22230	10H3	IgG ₃ κ	—	—	+	—
22231	1B6	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	1H5	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	2E4	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	4A9	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	4C1. 1	IgG ₄ κ	—	—	—	+
22231	9B10	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	4C7	IgG ₃ κ	—	—	+	—
22231	10D1. 1	IgG ₁ κ , IgG ₄ κ	+	—	—	—
22231	10D1. 4	IgG ₁ κ , IgG ₄ κ	—	—	—	+
22231	10E1	IgG ₄ κ	—	—	—	+
22231	8F2	IgG ₁ κ	+	—	—	—
22231	4E9	IgG ₁ κ	+	—	—	—

[0493] 因此,获得 20 个不同的亚克隆。所有 20 个克隆都使用人 κ 轻链,并且是全人克隆。

[0494] 从所述亚克隆的杂交瘤中的 5 个 (1H5、4A9、4C1、8H4 和 10E1) 分离单克隆抗体,并且测试其阻断 CTLA-4 与 B7. 2 结合的能力 (图 12 和 13)。

[0495] 简言之,用 0.7 μg/ml (100 μ / 孔) 的 B7. 2Ig 融合蛋白包被 ELISA 板 (参见 WO 01/14424,该文献通过引用全部结合到本文中用于所有目的)。洗涤板,并用 PBS-T+1% BSA 封闭 30 分钟。将抗体与等体积的 0.2 μg/ml 生物素标记的 CTLA-4Ig (Ance11#501-030) 混合,于室温预保温 1 小时,然后转移到 B7. 2 包被的 ELISA 板中,保温 1 小时。洗涤板,加入

100 μ l/孔链霉抗生物素蛋白碱性磷酸酶 (Kirkegaard and Perry Labs15-30-0), 保温 1 小时。用 pnpp 底物让板显色。对生物素标记的 CTLA-4 与 B7.2 结合的抑制, 以抗体浓度对 405nm 吸光度曲线作图。抗体 10D1 是一种 CTLA-4 特异性人 IgG₁, (参见 WO 01/14424)。抗体同种型是 1H5.1(γ_1)、4A9. (γ_1)、4C1.1(γ_4)、8H4.4(γ_4)、10E1.1(γ_4) 和 10D1(γ_1)。

[0496] 发现其中 2 种抗体 (1H5 和 4A9) 是封闭性抗体, 发现其中 3 种抗体 (4C1、8H4 和 10E1) 是非封闭性抗体 (图 12 和 13)。

[0497] 给予抗 CTLA-4 可以增强 T 细胞介导免疫应答 (Krummel, 1995, J. Exp. Med. 182 : 459-465 ;Krummel 等, 1996, Int' l Immunol. 8 :519-523)。因此可以用 CTLA-4 抗体作为佐剂, 来增强另一因子的免疫原性。当给予抗 CTLA-4 抗体与另一因子时, 这两种可以以任一顺序给予或者同时给予。所述方法可以用于增强的免疫应答对其有益的多种疫苗和治疗。例如, 传染病和癌症, 包括黑素瘤、结肠癌、前列腺癌和肾癌。

[0498] CTLA-4 抗体也可以用来负调节 T 细胞介导免疫应答。这一活性可以用抗 CTLA-4 抗体的多价制剂来获得。例如, 包被抗 CTLA-4 (用以增加抗体的价位) 的胶乳微球可以抑制 T 细胞增殖和激活。具有同一抗体结合位点的因子, 当作为 Fab 或可溶性 IgG 呈递时, 可以用作 CTLA-4 拮抗剂, 而当高度交联时, 可以用作 CTLA-4 激动剂。因此, 多价形式的抗 CTLA-4 抗体是可供免疫抑制用的有用的治疗药。

[0499] 除与胶乳微球或其它不溶性颗粒连接之外, 所述抗体可以相互交联或者进行遗传工程改造, 以形成多聚体。可以通过直接化学连接、或者通过间接连接如抗体-生物素-亲和素复合物, 进行交联。交联可以是共价的, 其中利用化学连接基团, 或者是非共价的, 其中利用蛋白质-蛋白质或其它蛋白质-配体相互作用。连接的遗传工程方法包括例如在 IgM 表达载体中重新表达高亲和性 IgG 抗体的可变区或者任何蛋白质部分 (例如聚赖氨酸等)。将高亲和性 IgG 抗体转变为 IgM 抗体, 可以构建具有极高亲和力的十价复合物。IgA₂ 表达载体也可以用来产生多价抗体复合物。IgA₂ 可以与 J 链和分泌成分一起形成聚合物。IgA₂ 可能具有附加的优点, 即它可以另外被嗜中性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞上表达的 IgA 受体 CD89 交联。或者, 因为从 C20/KCo5 杂种小鼠产生的杂交瘤中的大约 2% 是 IgA, 所以可以用这些动物直接产生人 IgA 同种型抗 CTLA-4 抗体。

[0500] 使用某些包含 CTLA-4 上至少两个非重叠表位的抗 CTLA-4 多克隆抗体的制剂, 也可以获得激动作用。在这种制剂中的一种含有两个结合位点的抗体, 可以与两个分子的 CTLA-4 结合, 形成一个小簇。然后, 具有不同结合位点的第二抗体可以使这些小簇连接 (聚集), 形成大簇, 从而形成 CTLA-4 复合物 (在细胞表面), 所述复合物可以将信号转导给所述 T 细胞从而抑制、减弱或防止带有 (表达) CTLA-4 的 T 细胞活化。因而, 某些多克隆抗体制剂显示出与上述多价制剂相似的激动作用。

[0501] 因此, 抗 CTLA-4 抗体的多价或多克隆制剂可用于激动 CTLA-4 受体, 从而抑制在其它情况下由带有 CTLA-4 受体的 T 细胞介导的免疫应答。可以用这种多价或多克隆抗体制剂治疗的疾病的某些实例包括自身免疫病、移植排斥和炎症。

[0502] 实施例 9

[0503] 抗人 EGFR 抗体的产生

[0504] 抗原。得自人癌 A431 细胞的纯化可溶性上皮生长因子受体 (EGFR) 得自 Sigma Chemical Co (E3641)。人癌 A431 细胞系得自美国典型培养物保藏中心 (American

Type Culture Collection) (ATCC CRL-1555)。RibiMPL+TDM 佐剂得自 Sigma Chemical Co (M-6536)。

[0505] 免疫。给两只 SC20/KCo5 杂种小鼠 (ID#22232 和 22239) 分别腹膜内 (i. p.) 注射 10^7 经洗涤的人癌 A431 全细胞, 进行免疫。1 个月后再在两只小鼠中重复这一免疫步骤。第 4 个月, 小鼠 22239 用 MPL+TDM 佐剂中的 $25 \mu\text{g}$ 可溶性 EGFR 腹膜内免疫; 休息 11 天, 然后静脉内注射 PBS 中的 $10 \mu\text{g}$ EGFR 和腹膜内注射 MPL+TDM 佐剂中的 $10 \mu\text{g}$ EGFR 进行免疫。2 天后, 小鼠 22239 再次静脉内接受 PBS 中的 $10 \mu\text{g}$ EGFR, 第二天, 从小鼠 22239 收获脾细胞用于融合。在前两次注射 A431 细胞之后, 让小鼠 22232 休息 3 个月, 然后腹膜内注射与 MPL+TDM 佐剂混合的 10^7 A431 细胞。4 天后, 从小鼠 22232 收获脾细胞用于融合。

[0506] 融合。在两个独立实验中, 将得自小鼠 #22232 和 22239 的脾细胞与或者 P3 X63 Ag8. 6. 53 (ATCC CRL 1580; 小鼠 #22239) 或者 SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581; 小鼠 #22232) 骨髓瘤细胞系融合。采用实施例 8 中概述的标准方法进行融合。

[0507] 杂交瘤筛选。EGFR 杂交瘤的筛选方法与实施例 8 中用于 CTLA-4 的方法相似。用 $100 \mu\text{l}$ /孔的 $1 \mu\text{g/ml}$ 可溶性 EGFR 抗原的 PBS 溶液包被 ELISA 板 (Nunc MaxiSorp) 过夜。洗涤板, 并用含 1% BSA 的 $100 \mu\text{l}$ /孔 PBS-Tween 封闭。加入 $50 \mu\text{l}$ 细胞培养上清液, 然后保温 1-2 小时。洗涤板, 然后与 $100 \mu\text{l}$ /孔的与碱性磷酸酶缀合的山羊抗人 γ 重链 (抗人 γ (fc) AP Jackson#109-056-098) 一起保温 1 小时。在每个步骤之间用 PBS-Tween 洗涤板 3 次。从小鼠 22232 和小鼠 22239 融合物中分别亚克隆了 5 个和 2 个分泌人 IgG κ 抗 EGFR 特异性抗体的杂交瘤。对所述 EGFR 特异性抗体重链和轻链的同种型分析包括 4 种 IgG₁ κ 、1 种 IgG₂ κ 和 1 种 IgG₄ κ 抗体。

[0508] 实施例 10

[0509] 纯化人 IgG κ 单克隆抗体的速率常数和平衡常数

[0510] 所述杂交瘤在含 1% 胎牛血清 (低 IgG) 的 eRDF 中培养。用 G 蛋白柱纯化人 MAb。用 BIAcore2000 仪器测定纯化 G-CSF MAb 和可溶性 CD4MAb 的速率平衡缔合常数。按照生产商的说明, 将人 G-CSF (120RU) 或 CD4 :Fc (1600RU) 通过氨基共价偶联固定化至 BIAcore2000 (BIAcore) 的传感芯片表面。让所述单克隆抗体流过所述抗原。芯片分别用甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH 1.5) 或 4M MgCl_2 再生, 以除去任何残留的抗人 G-CSF MAb 或抗 CD4MAb。用不同浓度的 MAb 重复这一循环。用 BIAevaluation 3.0 软件, 测定与抗原的结合和解离。将 $k_{\text{缔合}}$ 除以 $k_{\text{解离}}$, 得到 K_a 。如以下表 6 所示, 这些值与从鼠抗人 G-CSF MAb、克隆 3316. 111 (R&D) 或者鼠抗 CD4MAb、Leu3a (Pharmingen) 获得的值相当。

[0511] 表 6

[0512] 纯化人 IgG κ MAb 的速率常数和平衡常数

[0513]

MAb	亚类	小鼠	A 抗原	$k_{\text{缔合}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_{\text{解离}} (\text{s}^{-1})$	$K_a (\text{M}^{-1})$
#4	IgG ₁	双 Tc/KO	G-CSF	4.1×10^5	3.1×10^{-4}	1.3×10^9
#5	IgG ₁	双 Tc/KO	G-CSF	5.9×10^6	5.8×10^{-4}	1.0×10^{10}

MAb	亚类	小鼠	A 抗原	$k_{\text{结合}} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{\text{解离}} (s^{-1})$	$K_a (M^{-1})$
#11	IgG ₄	杂种	G-CSF	4.0×10^6	1.5×10^{-3}	2.8×10^9
#21	IgG ₁	杂种	G-CSF	1.1×10^6	2.0×10^{-3}	5.4×10^8
#27	IgG ₂	杂种	G-CSF	1.3×10^6	1.9×10^{-3}	6.5×10^8
#23	IgG ₁	杂种	CD4	7.6×10^5	5.7×10^{-5}	1.3×10^{10}
3316.111	小鼠	野生型	G-CSF	1.5×10^6	2.3×10^{-4}	6.3×10^9
Leu3a	小鼠	野生型	CD4	2.2×10^5	7.1×10^{-6}	3.1×10^{10}

[0514] 实施例 11

[0515] 杂种 (Fc) 小鼠的产生

[0516] 众所周知,免疫耐受避免了对自身抗原的反应性,通常阻止产生其氨基酸序列与鼠对应物氨基酸序列相似或相同的针对外源抗原的小鼠单克隆抗体。与人抗原及其鼠对应物之间共同表位结合的小鼠单克隆抗体可能是有用的,因为蛋白质抗原活性部位中的氨基酸序列往往是很好保守的。另外,由于体内给予这些抗体所带来的任何效应可以容易地用小鼠模型来研究。然而,获得针对这类共同表位的小鼠单克隆抗体也一直是困难的。如上所述,本发明的杂种小鼠可以用来获得针对各种人抗原的人单克隆抗体。然而,在某些情况下,可能难以获得有结合很好保守的人抗原的能力或者与鼠对应物交叉反应的人单克隆抗体。因此,在本发明的另一方面,提供其中 Fc γ 受体 IIB 已被失活的本发明的其它杂种小鼠。这些小鼠在本文中被称为杂种 (Fc) 小鼠,可供用于产生与很好保守的抗原结合或者与其鼠对应物交叉反应的单克隆抗体。生物化学研究和遗传学研究表明,免疫球蛋白 (Ig)G 的 IIB 型低亲和性受体 (Fc γ RIIB),抑制通过抗体或免疫复合物触发的细胞活化,并且可能是防止出现自身免疫方面的重要组分 (Takai, T. 等,1996, Nature 379 :346-349)。Fc γ RIIB (即抑制性 Fc 受体) 有缺陷的动物在所有抗体介导类别的过敏反应中有普遍性的增强抗体应答和加重的炎症 (Takai, T. 等,1996, Nature 379 :346-349)。例如,不是野生型小鼠,而用牛 IV 型胶原 (C-IV) 免疫的突变型小鼠表现出升高的对小鼠 C-IV 的自身抗体应答 (Nakamura, A. 等,2000, J. Exp. Med. 191 :899-905)。然而,尚无关于研究 Fc γ RIIB 突变型小鼠是否可以用来有效生产自身反应性单克隆抗体的报道。此外,没有证明有效产生在小鼠体内与人抗原和鼠对应物两个均结合的人单克隆抗体的报道。

[0517] 如下所述,将 Fc γ RIIB 突变培育到本发明的杂种小鼠中。用牛 C-IV 免疫所得杂种 (Fc) 小鼠,诱发针对牛 C-IV 和鼠 C-IV 两者的人抗体应答。也可以产生分泌与牛 C-IV 和鼠 C-IV 两者结合的人单克隆抗体的杂交瘤。因此,所述杂种 (Fc) 小鼠可供用于生产既可结合免疫外源抗原又可结合其鼠对应物的人单克隆抗体。所述杂种 (Fc) 小鼠也可以用来获得针对很好保守的抗原的人单克隆抗体。Fc γ RIIB 敲除纯合型 (Fc (-/-)) 小鼠 (Takai, T. 等,1996, Nature 379 :346-349) 由 Toshifumi Takai 博士 (Tohoku University, JAPAN)

提供。让 Fc(-/-) 雄性小鼠与雌性杂种小鼠交配(如实施例 3 中所述)。如实施例 3 中所述,通过 ELISA 和 PCR 检查每个 F1 个体中 KCo5 转基因和 hCF(SC20) 的保留情况。使用以下三种引物,通过 PCR 分析测定 Fc γ RIIB 敲除的基因型:

[0518] neo, 5' -CTCGTGCTTTACGGTATCGCC (SEQ ID NO :8) ;

[0519] 5' EC1, 5' -AAACTCGACCCCCCGTGGATC (SEQ ID NO :9) ;和

[0520] 3' EC1, 5' -TTGACTGTGGCCTTAAACGTGTAG (SEQ ID NO :10) .

[0521] 用 AmpliTaq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer), 对从尾部活检样品制备的基因组 DNA 样品进行 PCR。在含有上述三种引物(各 0.5pM) 的标准反应混合物中,对样品扩增 35 个循环:94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 30 秒 (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer)。野生型等位基因和纯合型等位基因给出的条带大小分别为 161bp 和 232bp。选择基因型为 KCo5/CMD 或 CM2D(-/+)/CKD 或 JKD(-/+)/Fc(-/+) 的 F1 雄性和基因型为 hCF(SC20)/KCo5/CMD 或 CM2D(-/+)/CKD 或 JKD(-/+)/Fc(-/+) 的 F1 雌性,并用于进一步的育种。最后,获得基因型为 hCF(SC20)/KCo5/CMD 或 CM2D(-/-)/CKD 或 JKD(-/-)/Fc(-/-) 的小鼠(杂种 (Fc))。证实所述杂种 (Fc) 小鼠体内人 Ig μ 和 κ 的血清表达水平与杂种小鼠中的水平(参见实施例 4) 相当。

[0522] 实施例 12

[0523] 抗小鼠 IV 型胶原人单克隆抗体的产生

[0524] 抗原的免疫。牛 C-IV (Cellmatrix IV) 得自 Nitta Gellatin, Inc。在用弗氏佐剂乳化之前,所述 C-IV 溶液 (3.0mg/ml, 在 1mM HCl 中, pH 3.0) 通过加入 1mM NaOH (终浓度) 进行中和。杂种小鼠和杂种 (Fc) 小鼠在尾部基部用在含结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 菌株 H₃₇Rv 的 CFA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 中乳化的 150 μ g C-IV 免疫。26 天和 48 天后,小鼠在同一部位用 150 μ g C-IV+IFA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 加强 (Nakamura, A. 等, 2000, J. Exp. Med. 191 :899-905)。

[0525] 小鼠体内的体液应答。第 58 天收集血清。按照已经描述并进行修改的方法 (Nakamura, A. 等, 2000, J. Exp. Med. 191 :899-905), 通过 ELISA 测量血清中抗原反应性人 Ig γ 。在各孔用 50 μ l/ 孔的 20 μ g/ml 牛 C-IV 的 PBS 溶液于 4°C 包被过夜的 96 孔小平板测定 (Nunc, MaxiSorp) 中检测到抗牛 C-IV 抗体。利用 BIOCOAT cellware 小鼠 C-IV 96 孔板测定 (Becton Dickinson Labware), 检测抗小鼠 C-IV 抗体。以 50 μ l/ 孔加入经稀释的血清 (1 :20-1280), 让其于 4°C 反应过夜。洗涤各孔, 与同辣根过氧化物酶偶联的山羊抗人 IgG (Fc) (Sigma, A0170) 一起于 4°C 保温 2 小时, 洗涤, 然后用 50 μ l TMB 底物 (Sumitomo Bakelite, ML-1120T) 于室温显色 30 分钟。用小平板读出仪 (Arvo, Wallac Berthold Japan) 读出 450nm 的 OD。在杂种 (Fc) 而非在杂种小鼠的血清中, 观察到抗小鼠 C-IV 的特异性人 γ 自身抗体应答。在杂种 (Fc) 小鼠血清中观察到增强的抗牛 C-IV 应答 (图 14)。

[0526] 融合和杂交瘤筛选。66 天后, 给小鼠额外腹膜内注射 (KM#1 :杂种, FC#1 :杂种 (Fc)) 或静脉注射 (KM#2 :杂种, FC#2 :杂种 (Fc)) 150 μ g 抗原, 69 天后收获脾细胞。采用标准方法, 使得自小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (Sp2/0-Ag14) 融合。将细胞悬浮液以 200,000 脾细胞 / 孔接种到 96 孔板中。细胞培养在 DMEM、10% FBS、胰岛素、IL-6 中。在初始生长和选择期间, 向培养基中加入 HAT 或 HT 补充物。通过 ELISA 筛选杂交瘤。为了鉴定分泌小鼠 C-IV 的杂交瘤, 用 50 μ l/ 孔的 40 μ g/ml 小鼠 C-IV (Sigma, C0534) 的 PBS 溶液,

于 4℃ 包被 ELISA 板 (Nunc MaxiSorp) 过夜。加入 50 μl 细胞培养上清液。从杂种 (Fc) 小鼠获得两个分泌 hγ 阳性小鼠 C-IV 反应性抗体的杂交瘤, 通过有限稀释法, 成功地亚克隆了所述两个杂交瘤 (参见以下表 7)。

[0527] 表 7

[0528] 抗 IV 型胶原单克隆抗体的产生

[0529]

小鼠 ID #	阳性孔		
	抗牛 hγ	抗小鼠 hγ	
KM#1	8	0	ip
KM#1	52	0	iv
FC#1	16	0	ip
FC#2	85	2	iv

[0530] 该数据表明, 所述杂种 (Fc) 小鼠可用于生产针对很好保守的抗原或表位的人单克隆抗体。

[0531] ***

[0532] 本发明的范围并不限于所列举的用来说明本发明各个方面的实施方案的范围, 功能上等同的任何克隆、DNA 或氨基酸序列都在本发明范围内。实际上, 根据上述描述和附图, 除本文所述的之外的本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。这类修改将落入所附的权利要求书的范围内。也不用说, 所给出的核苷酸的所有碱基对的大小是大致的, 用于说明。

[0533] 以上引用的所有出版物和专利文件通过引用全部结合到本文中用于所有目的, 其程度如同每个出版物或专利文件单独指明结合到本文中一样。

[0534] 序列表

[0535] <110>Tomizuka, Kazuma

[0536] Ishida, Isao

[0537] Lonberg, Nils

[0538] Halk, Ed

[0539] <120> 用于生产人类抗体的转基因转染色体啮齿动物

[0540] <130>014643-012110US

[0541] <140> 待定

[0542] <141> 待定

[0543] <150>US 60/250, 340

[0544] <151>2000-11-30

[0545] <160>10

[0546] <170>PatentIn Ver. 2.1

[0547] <210>1

[0548] <211>3881
[0549] <212>DNA
[0550] <213> 人工序列
[0551] <220>
[0552] <223> 人工序列的描述 : κ 轻链质粒
[0553] <220>
[0554] <223>pCK7-96
[0555] <400>1
[0556] tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta 60
[0557] tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
[0558] aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
[0559] tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
[0560] tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 300
[0561] cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
[0562] agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc 420
[0563] tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt 480
[0564] aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact 540
[0565] ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 600
[0566] cctaactacg gctacactag aaggacagta tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
[0567] accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
[0568] ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
[0569] ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
[0570] gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
[0571] aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
[0572] gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc 1020
[0573] gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg 1080
[0574] cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
[0575] gagegcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
[0576] gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1260
[0577] ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcceaacga 1320
[0578] tcaaggcgag ttacatgate ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct 1380
[0579] ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440
[0580] cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
[0581] accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttggcc ggcgtcaata 1560
[0582] cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
[0583] tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 1680
[0584] cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
[0585] acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 1800
[0586] atactcttcc tttttcaata ttattgaage atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860

[0587] tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
 [0588] aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980
 [0589] cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcgggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
 [0590] atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
 [0591] cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
 [0592] gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
 [0593] agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
 [0594] tcgggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
 [0595] ttaagttagg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc 2400
 [0596] aagctagcgg ccgcggtcca accaccaatc tcaaagcttg gtaccggga gcctgttatc 2460
 [0597] ccagcacagt cctggaagag gcacagggga aataaaagcg gacggaggct ttccttgact 2520
 [0598] cagccgctgc ctggtcttct tcagacctgt tctgaattct aaactctgag ggggtcggat 2580
 [0599] gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa 2640
 [0600] gccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag 2700
 [0601] ggggaagcta ggaagaaact caaaacatca agattttaaa tacgcttctt ggtctccttg 2760
 [0602] ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta 2820
 [0603] tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc 2880
 [0604] tttcctcagg aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct gatgagcagt 2940
 [0605] tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca 3000
 [0606] aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 3060
 [0607] agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 3120
 [0608] actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg agctcgcccg 3180
 [0609] tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agaggagaaa gtgccccac ctgctcctca 3240
 [0610] gtccagcct gacccctcc cctcctttgg cctctgacce tttttccaca ggggacctac 3300
 [0611] ccctattgag gtcctccagc tcatttttca cctcaccccc ctctctctcc ttggctttta 3360
 [0612] ttatgctaata gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat ctttgcacct gtggtttctc 3420
 [0613] tctttctca atttaataat tattatctgt tgtttacca ctactcaatt tctcttataa 3480
 [0614] gggactaaat atgtagtcat cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tccttcattc 3540
 [0615] tattttacce tatcctctc tgcaagacag tctcctca aaccacaag cttctgtcc 3600
 [0616] tcacagtcct ctgggccatg gatctcaca tcccaatccg cggcgcgaat tcgtaatcat 3660
 [0617] ggtcatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacag 3720
 [0618] ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg 3780
 [0619] cgttgcgctc actgcccgt ttcagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 3840
 [0620] tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 3881
 [0621] <210>2
 [0622] <211>4723
 [0623] <212>DNA
 [0624] <213> 人工序列
 [0625] <220>

[0626] <223> 人工序列的描述：γ 1 重链质粒

[0627] <220>

[0628] <223>pCG7-96

[0629] <400>2

[0630] gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccaggcct gaccttggct ttggggcagg 60

[0631] gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccagggtgca cacccaatgc ccatgagccc 120

[0632] agacactgga cgctgaacct cgcgacagct taagaacca ggggcctctg cgccctgggc 180

[0633] ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg 240

[0634] cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 300

[0635] gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 360

[0636] cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tctcaggac tctactccct 420

[0637] cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 480

[0638] gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagaaagtt ggtgagaggc cagcacaggg 540

[0639] agggagggtg tctgctggaa gccaggctca gcgtcctgc ctggacgcat cccggctatg 600

[0640] cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc cegtctgcct cttcaccggg aggcctctgc 660

[0641] ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggctttt tccccaggct ctgggcaggc 720

[0642] acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg cacacaaagg ggcagggtgct gggctcagac 780

[0643] ctgccaaagag ccatatccgg gaggaccctg cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa 840

[0644] actctccact ccctcagctc ggacaccttc tctcctcca gattccagta actcccaatc 900

[0645] ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccaggta 960

[0646] agccagccca ggcctcgccc tccagctcaa ggcgggacag gtgccctaga gtagcctgca 1020

[0647] tccagggaca ggcgccagcc ggggtgctgac acgtccacct ccatctcttc ctcagcacct 1080

[0648] gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 1140

[0649] atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 1200

[0650] gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1260

[0651] gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1320

[0652] tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1380

[0653] gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg acccgtgggg tgcgagggcc acatggacag 1440

[0654] aggccggctc ggcccacct ctgccctgag agtgaccgct gtaccaacct ctgtccctac 1500

[0655] agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 1560

[0656] gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga 1620

[0657] gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 1680

[0658] cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 1740

[0659] gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1800

[0660] cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg acggccggca agccccgct ccccgggctc 1860

[0661] tcgcggtcgc acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttcccg ggcgcccagc 1920

[0662] atggaaataa agcaccagc gctgccctgg gcccctgcga gactgtgatg gttctttcca 1980

[0663] cgggtcaggc cgagtctgag gcctgagtgg catgaggggag gcagagcggg tcccactgtc 2040

[0664] cccacactgg cccaggctgt gcagggtgtc ctgggcccc taggggtgggg ctcagccagg 2100

[0665] ggctgccctc ggcagggtgg gggatttgcc agcgtggccc tccctccagc agcacctgcc 2160
 [0666] ctgggctggg ccacgggaag ccctaggagc ccctggggac agacacacag cccctgcctc 2220
 [0667] tgtaggagac tgtcctgttc tgtgagcgcc cctgtcctcc cgacctccat gccactcgg 2280
 [0668] gggcatgcct gcaggctgac tctagaggat ccccggttac cgagctcgaa ttcctcgtatg 2340
 [0669] atatcagatc tgccggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgataag ccaggttaac 2400
 [0670] ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 2460
 [0671] gcttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 2520
 [0672] cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 2580
 [0673] tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 2640
 [0674] cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 2700
 [0675] aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 2760
 [0676] cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 2820
 [0677] gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggatc ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 2880
 [0678] ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtactat 2940
 [0679] cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 3000
 [0680] aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 3060
 [0681] tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 3120
 [0682] ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 3180
 [0683] tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 3240
 [0684] ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 3300
 [0685] agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaatgaag ttttaaatca 3360
 [0686] atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 3420
 [0687] cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 3480
 [0688] ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 3540
 [0689] ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 3600
 [0690] agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 3660
 [0691] agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 3720
 [0692] gtggtgtcac gctcgtcgtt tggataggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 3780
 [0693] cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagecggtta gtccttcgg tcctccgatc 3840
 [0694] gttgtcagaa gtaagttagc cgcagtgtta tctatcatgg ttatggcagc actgcataat 3900
 [0695] tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 3960
 [0696] tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 4020
 [0697] aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 4080
 [0698] cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 4140
 [0699] cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcggtt ctgggtgagc aaaaacagga 4200
 [0700] aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcactc 4260
 [0701] ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 4320
 [0702] ttigaatgta tttagaaaaa taacaaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 4380
 [0703] ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 4440

[0704] acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg acacatgcag 4500
 [0705] ctccccgaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agccccgtcag 4560
 [0706] ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag 4620
 [0707] attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgttag aacgcggcta caattaatac 4680
 [0708] ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact ata 4723
 [0709] <210>3
 [0710] <211>4694
 [0711] <212>DNA
 [0712] <213> 人工序列
 [0713] <220>
 [0714] <223> 人工序列的描述 : γ 4 重链质粒
 [0715] <220>
 [0716] <223>pG4HE
 [0717] <400>3
 [0718] gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccgggcct gactttggct gggggcaggg 60
 [0719] agggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccaggtgcac acccaatgcc catgagccca 120
 [0720] gacactggac cctgcatgga ccatcgcgga tagacaagaa ccgaggggcc tctgcgccct 180
 [0721] gggcccagct ctgtcccaca ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca 240
 [0722] agggcccata cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagccg 300
 [0723] ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg tggaaactcag 360
 [0724] gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca ggactctact 420
 [0725] ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca 480
 [0726] acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgggtgag aggccagcac 540
 [0727] agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctacgccctc ctgcctggac gcaccccgcc 600
 [0728] tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgccccatct gtctcctcac ccggaggcct 660
 [0729] ctgaccacce cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc aggtccggg 720
 [0730] cagccacagg ctggatgccc ctaccccagg ccctgcgcac acaggggcag gtgctgcgct 780
 [0731] cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaaacc caccctaaag 840
 [0732] gccaaactct cactccctc agctcagaca cttctctcc tcccagatct gagtaactcc 900
 [0733] caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgcc caggtaagcc 960
 [0734] aaccagggcc tcgcccctca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag cctgcatcca 1020
 [0735] gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcac ccacctccat ctcttctca gcacctgagt 1080
 [0736] tcttgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct 1140
 [0737] cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc 1200
 [0738] agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 1260
 [0739] agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgctctgcac caggactggc 1320
 [0740] tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga 1380
 [0741] aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acgggggtgcg agggccacat ggacagaggt 1440
 [0742] cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt ccctacaggg 1500

[0743] cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1560
[0744] caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1620
[0745] gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1680
[0746] ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1740
[0747] gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1800
[0748] tccctgtctc tgggtaaagt agtgccaggc cggcaagcc cccgtcccc gggctctcgg 1860
[0749] ggctgcgcga ggatgcttgg cacgtacccc gtctacatac ttcccaggca cccagcatgg 1920
[0750] aaataaagca cccaccactg ccctgggccc ctgtgagact gtgatggttc tttccacggg 1980
[0751] tcaggccgag tctgaggcct gagtgcacatg agggaggcag agcgggtccc actgtcccca 2040
[0752] cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccacctagg gtggggctca gccaggggct 2100
[0753] gccctcggca ggggtgggga ttgcccagcg tggccctccc tccagcagca gctgccctgg 2160
[0754] gctgggccac gggaagccct aggagccctt ggggacagac acacagcccc tgcctctgta 2220
[0755] ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgaccc cccatgcca ctcgggggga 2280
[0756] tccccgggta ccgagctcga attcatcga gatatacagat ctgccggtct ccctatagt 2340
[0757] agtcgtatta atttcgataa gccagggtta cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 2400
[0758] gagaggcgggt ttgcgtattg ggcgtcttcc cgcttccctc ctcactgact cgctgcgctc 2460
[0759] ggctcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac 2520
[0760] agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 2580
[0761] ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgTTTTT ccataggctc cgccccctg acgagcatca 2640
[0762] caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 2700
[0763] gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 2760
[0764] cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 2820
[0765] tctcagttcg gtgtaggctc ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 2880
[0766] gcccagccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccagg taagacacga 2940
[0767] cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagggt atgtaggcgg 3000
[0768] tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060
[0769] tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 3120
[0770] caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180
[0771] aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggcttgacg ctcagtggaa 3240
[0772] cgaaaactca cgttaaggga ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300
[0773] ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 3360
[0774] tgacagttac caatgcttaa tcagttaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 3420
[0775] atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480
[0776] tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc 3540
[0777] aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3600
[0778] catccagtct attaatgtt gcccgggaagc tagagtaagt agttcggcag ttaatatgtt 3660
[0779] gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtc cgctcgtcgt ttggtatggc 3720
[0780] ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 3780
[0781] aaaagcgggt agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt 3840

[0782]	atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg	3900
[0783]	cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc	3960
[0784]	gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa	4020
[0785]	agtgtcatc atttgaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt	4080
[0786]	gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt	4140
[0787]	caccagcggt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag	4200
[0788]	ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctctctttt caatattatt gaagcattta	4260
[0789]	tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	4320
[0790]	aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat	4380
[0791]	catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg	4440
[0792]	tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta	4500
[0793]	agcgatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg	4560
[0794]	gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatggacat	4620
[0795]	attgtcgta gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt	4680
[0796]	taggtgacac tata	4694
[0797]	<210>4	
[0798]	<211>21	
[0799]	<212>DNA	
[0800]	<213> 人工序列	
[0801]	<220>	
[0802]	<223> 人工序列的描述 :V κ 01 5' 区的探针	
[0803]	<400>4	
[0804]	ccacccata aacactgatt c	21
[0805]	<210>5	
[0806]	<211>21	
[0807]	<212>DNA	
[0808]	<213> 人工序列	
[0809]	<220>	
[0810]	<223> 人工序列的描述 :V κ 01 5' 区的探针	
[0811]	<400>5	
[0812]	ttgatgcate ctaccagg c	21
[0813]	<210>6	
[0814]	<211>20	
[0815]	<212>DNA	
[0816]	<213> 人工序列	
[0817]	<220>	
[0818]	<223> 人工序列的描述 :V κ L24 和 L25 基因间区的探针	
[0819]	<400>6	
[0820]	cctgccttac agtgctgtag	20

[0821]	<210>7	
[0822]	<211>20	
[0823]	<212>DNA	
[0824]	<213> 人工序列	
[0825]	<220>	
[0826]	<223> 人工序列的描述 :V κ L24 和 L25 基因间区的探针	
[0827]	<400>7	
[0828]	ggacagcaac aggacatggg	20
[0829]	<210>8	
[0830]	<211>21	
[0831]	<212>DNA	
[0832]	<213> 人工序列	
[0833]	<220>	
[0834]	<223> 人工序列的描述 :PCR 引物 neo	
[0835]	<400>8	
[0836]	ctcgtgcttt acggtatcgc c	21
[0837]	<210>9	
[0838]	<211>21	
[0839]	<212>DNA	
[0840]	<213> 人工序列	
[0841]	<220>	
[0842]	<223> 人工序列的描述 :PCR 引物 5' EC1	
[0843]	<400>9	
[0844]	aaactcgacc ccccgtggat c	21
[0845]	<210>10	
[0846]	<211>24	
[0847]	<212>DNA	
[0848]	<213> 人工序列	
[0849]	<220>	
[0850]	<223> 人工序列的描述 :PCR 引物 3' EC1	
[0851]	<400>10	
[0852]	ttgactgtgg ccttaaacgt gtag	24



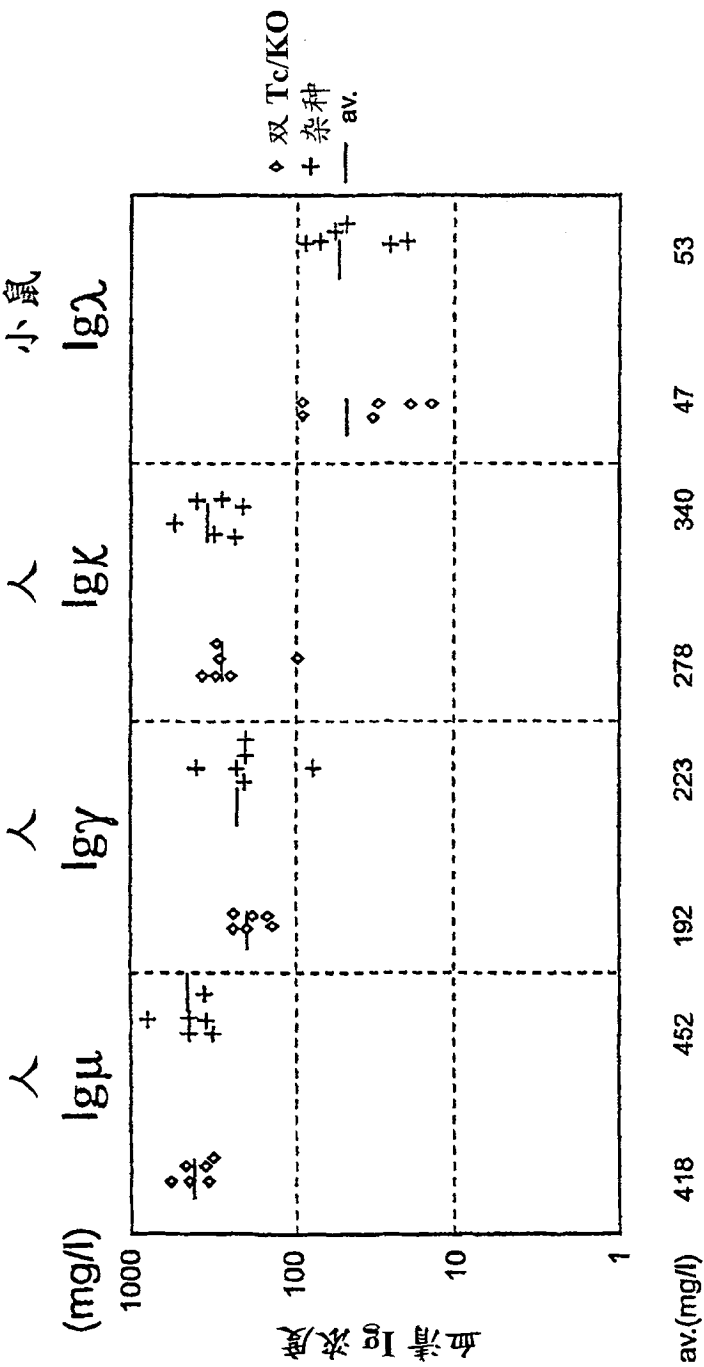


图 2

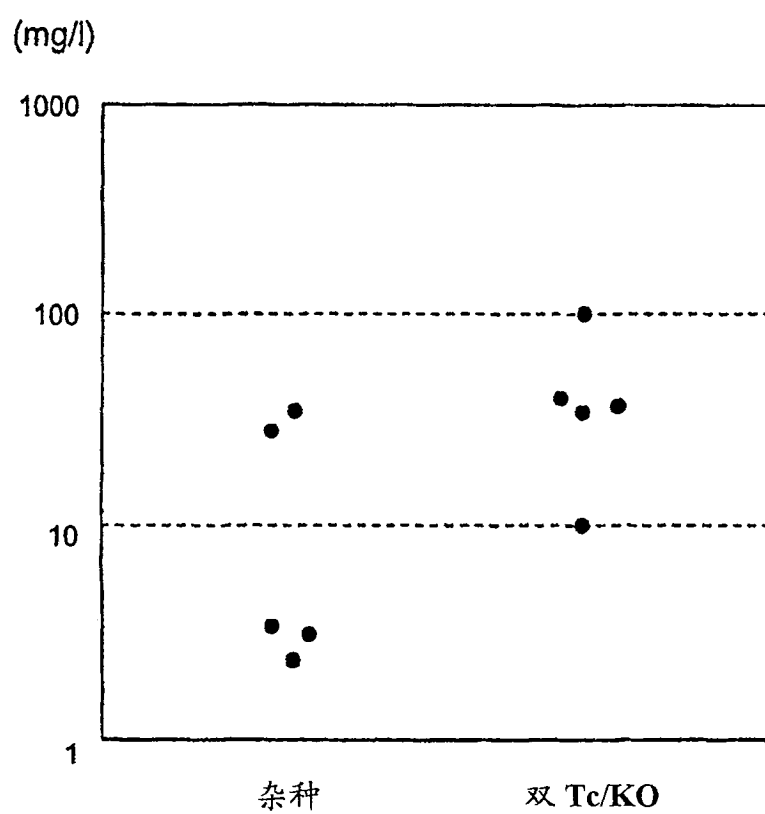


图 3

抗 CD4 人 Igκ 的血清浓度

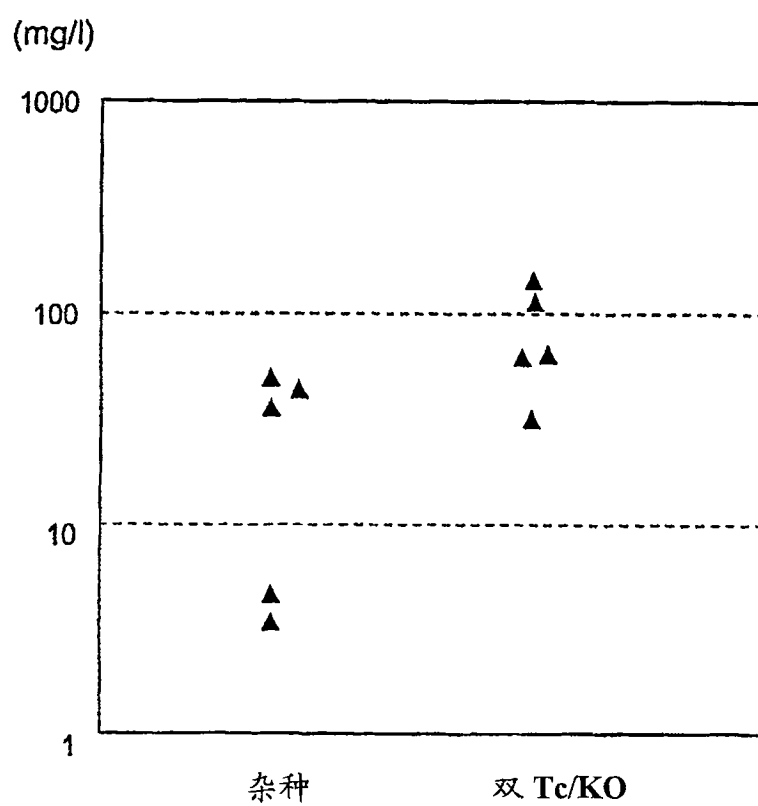


图 4

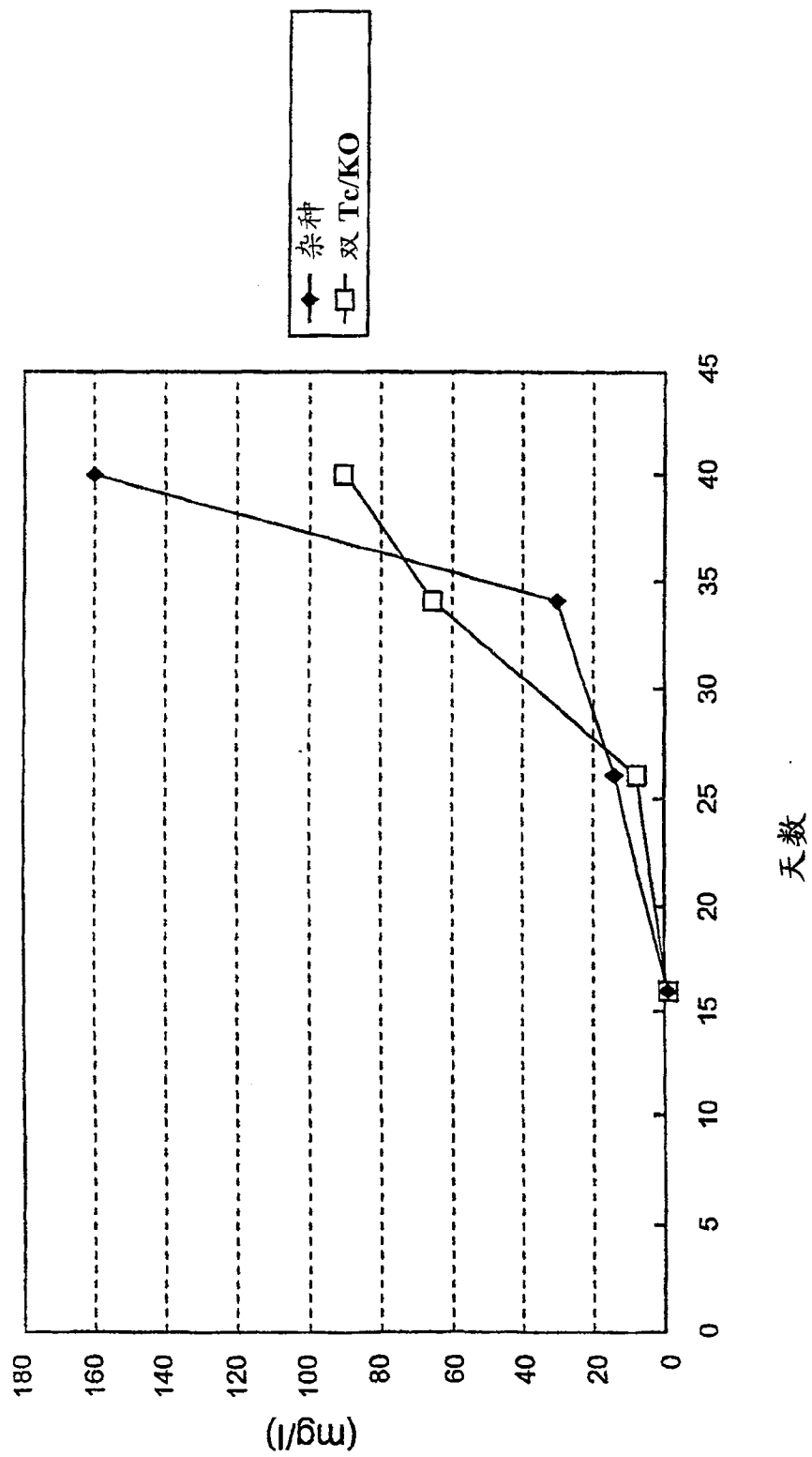


图 5

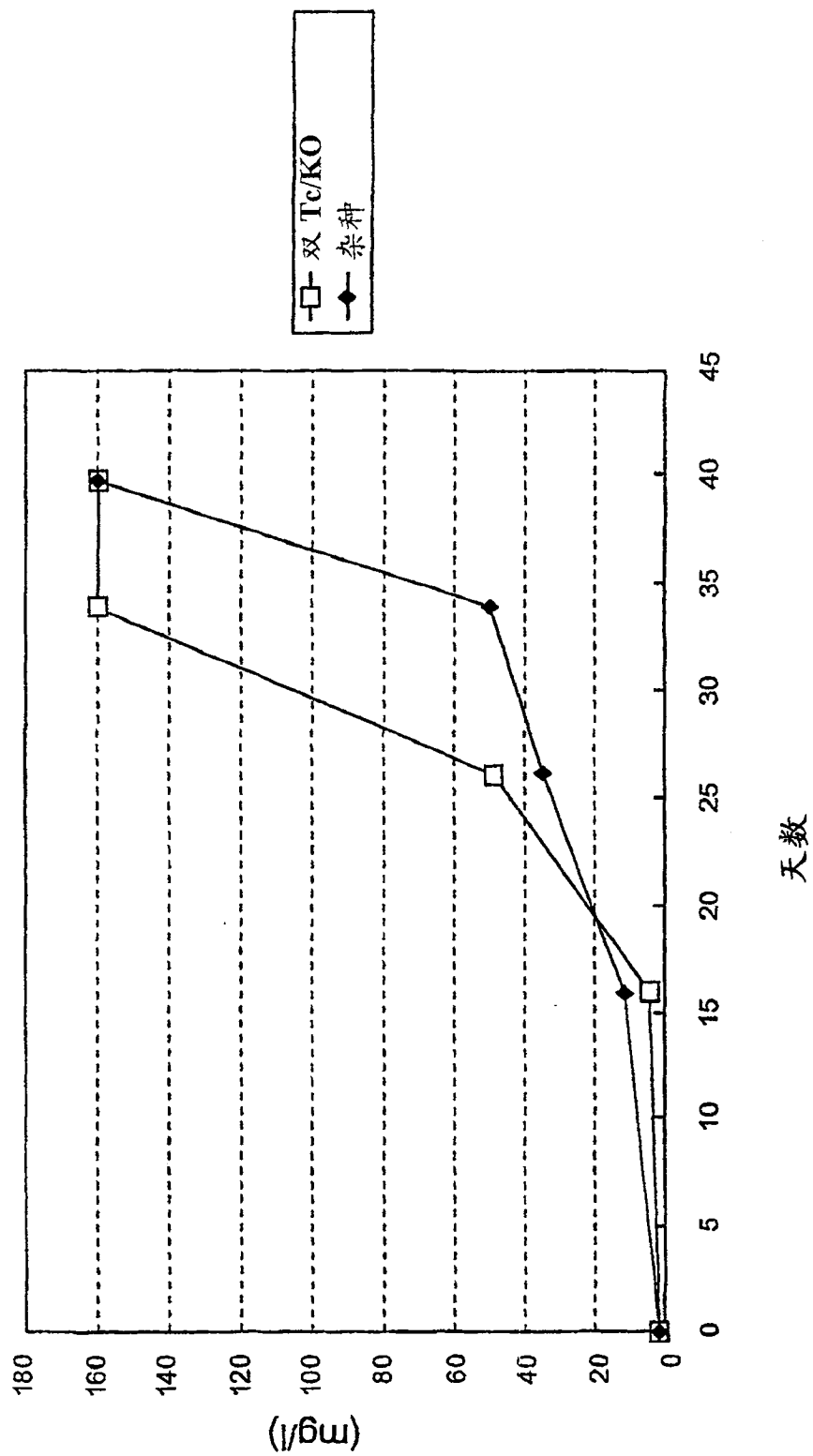


图 6

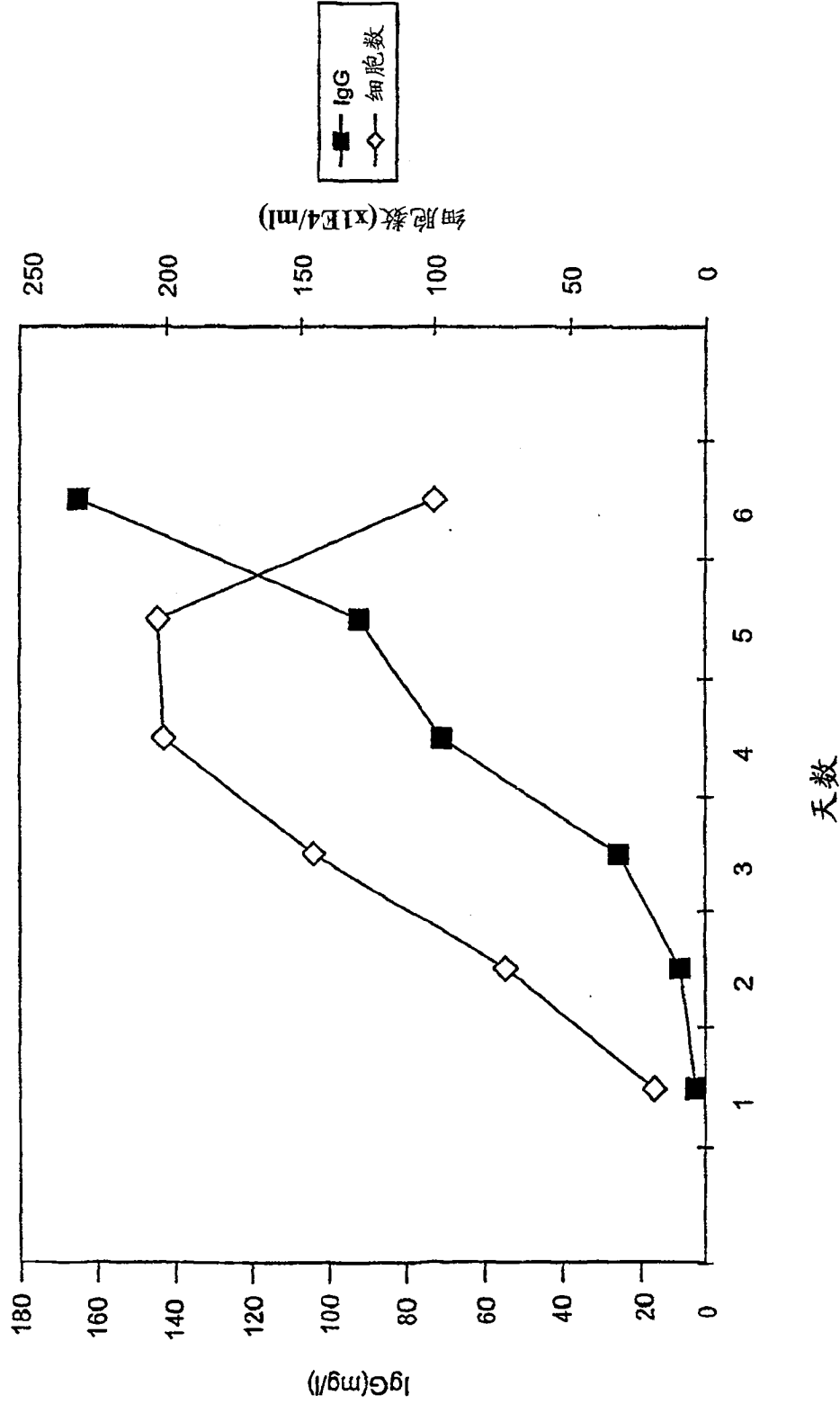


图 7

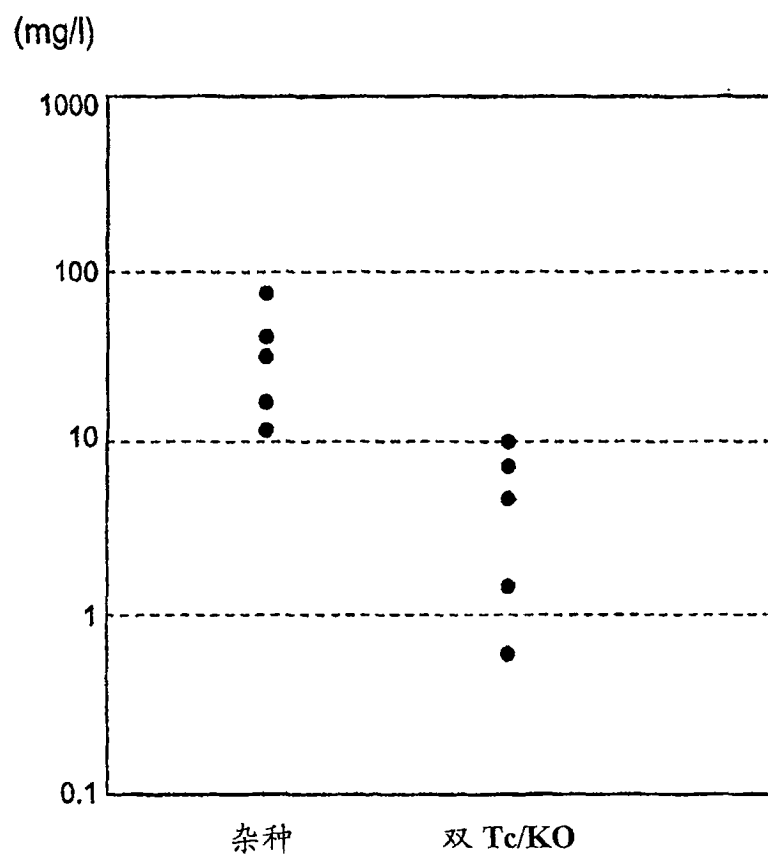


图 8

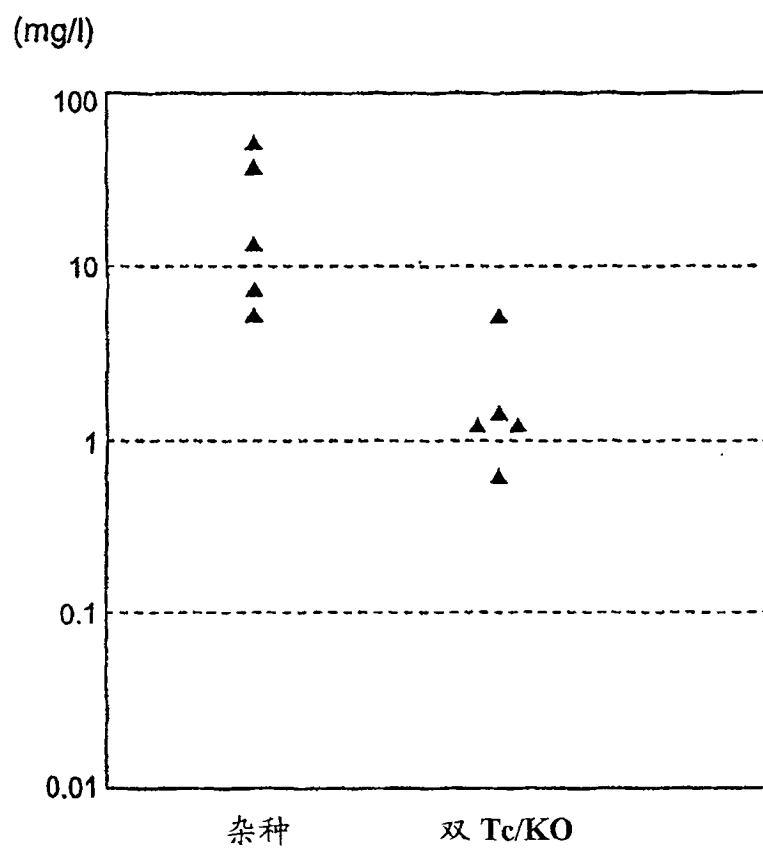


图 9

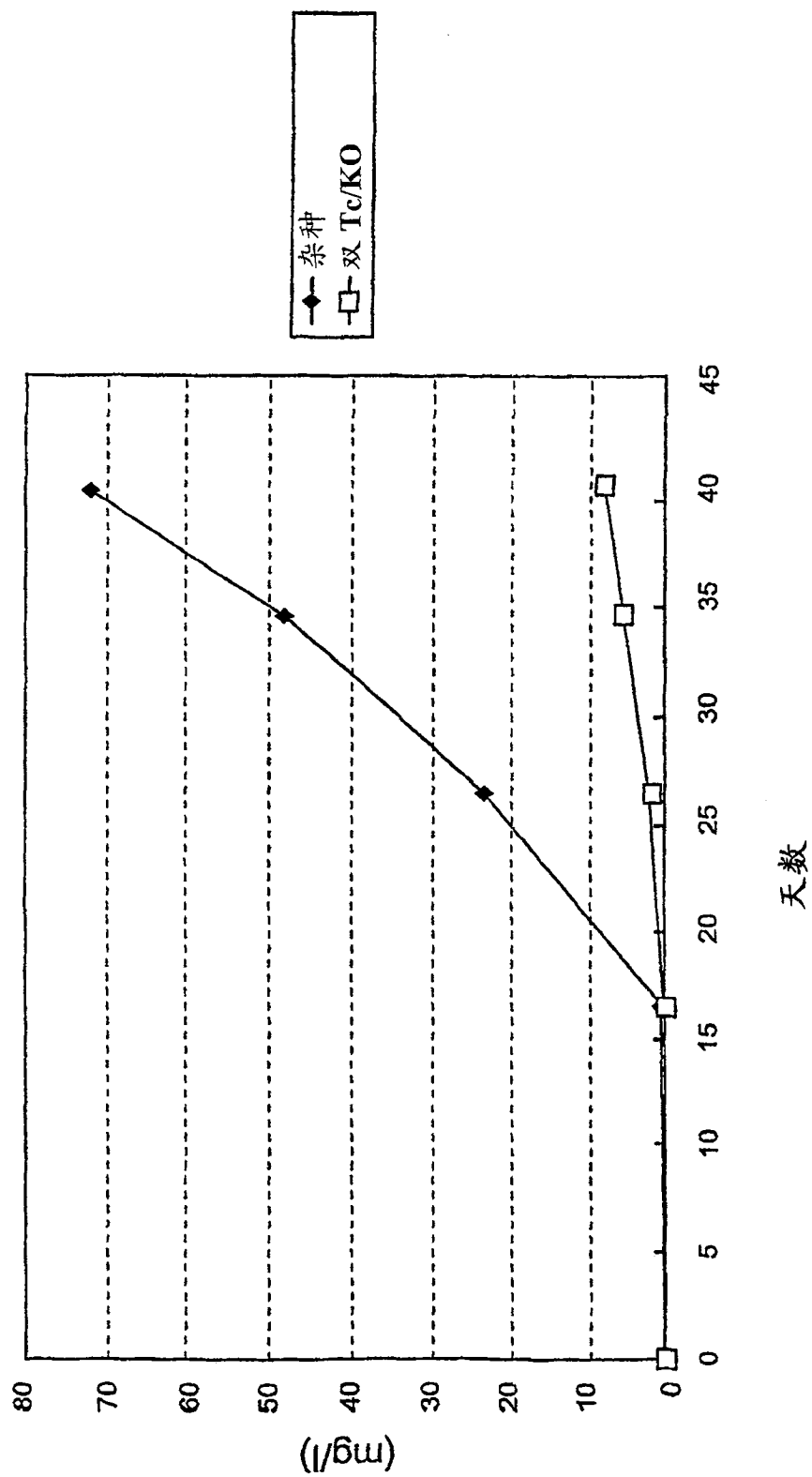


图 10

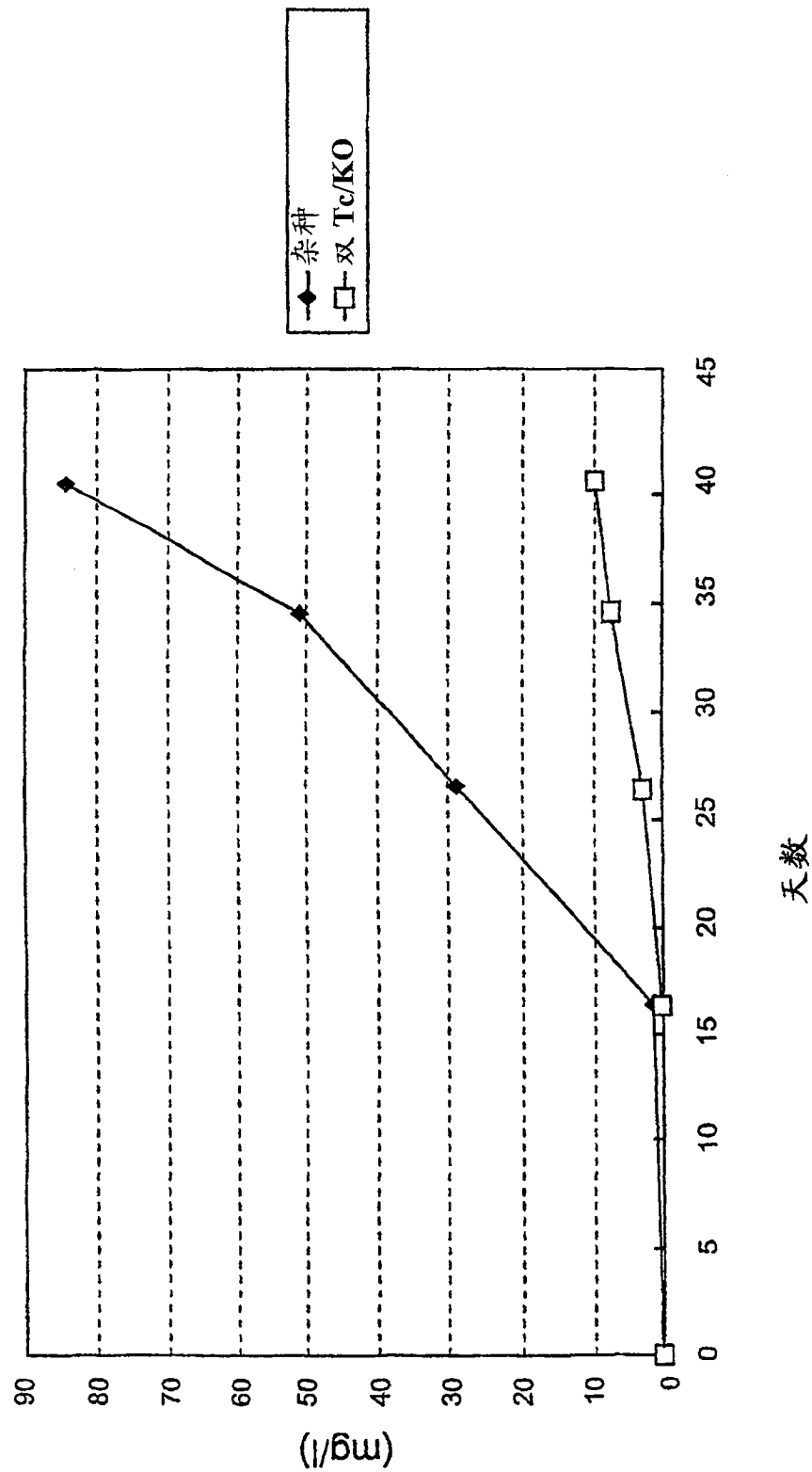


图 11

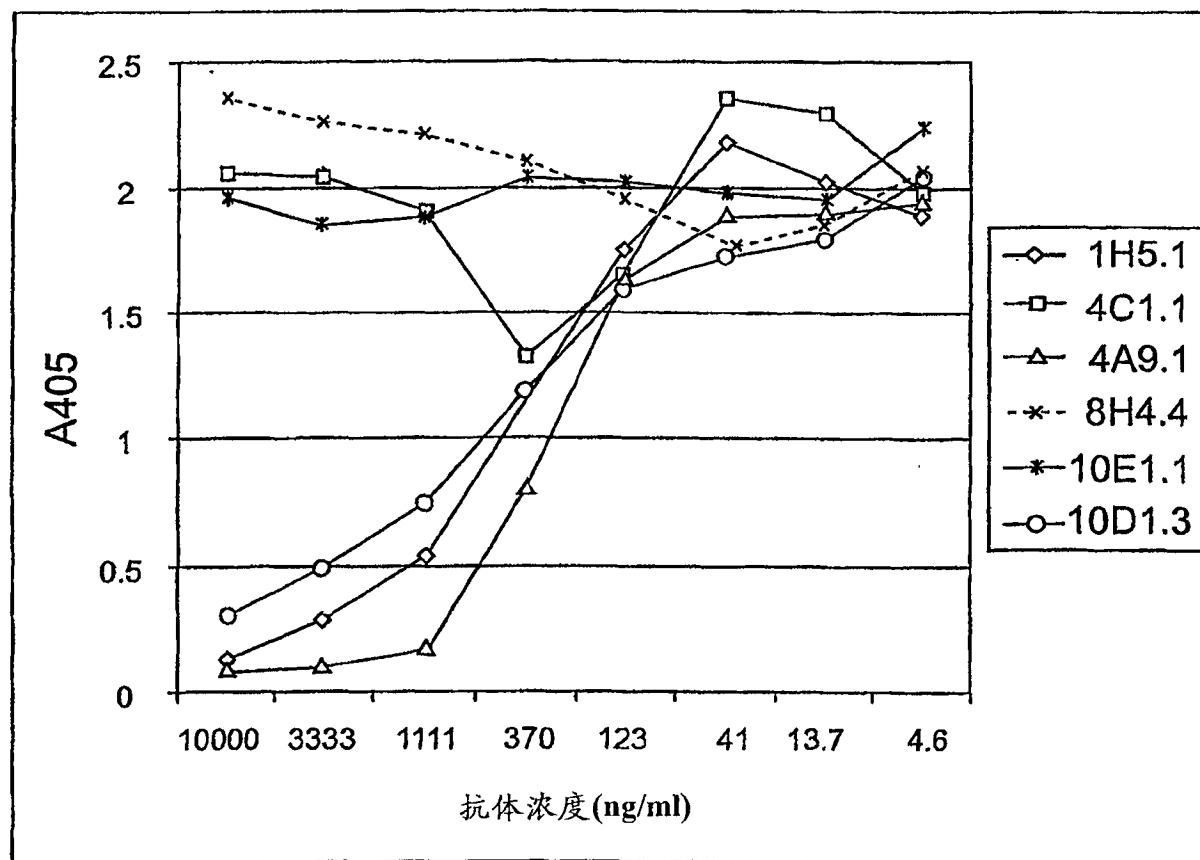


图 12

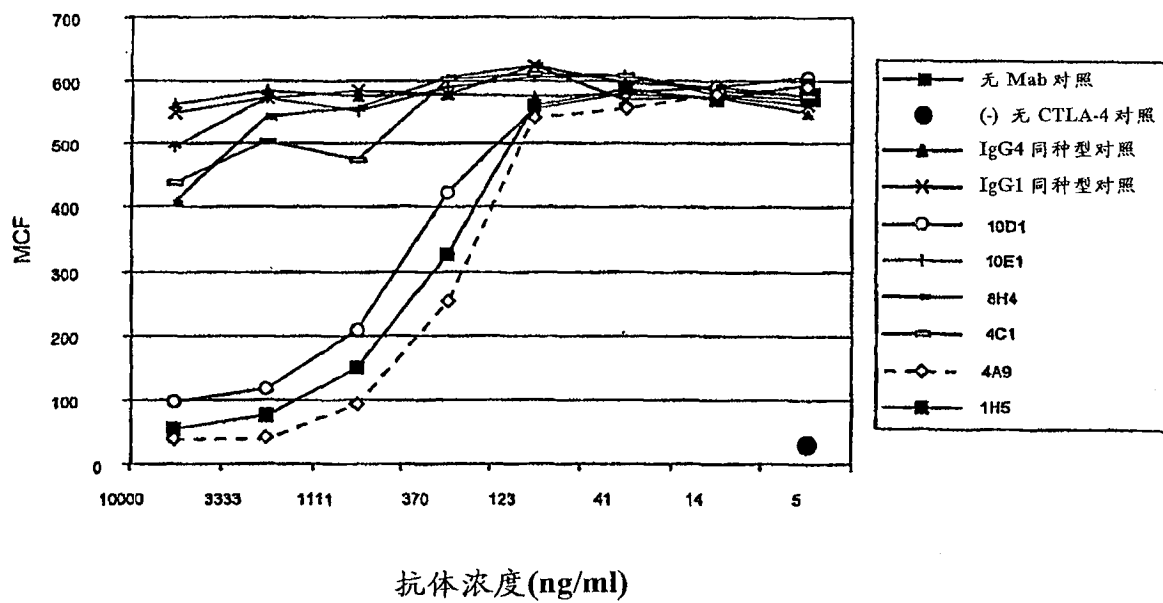


图 13

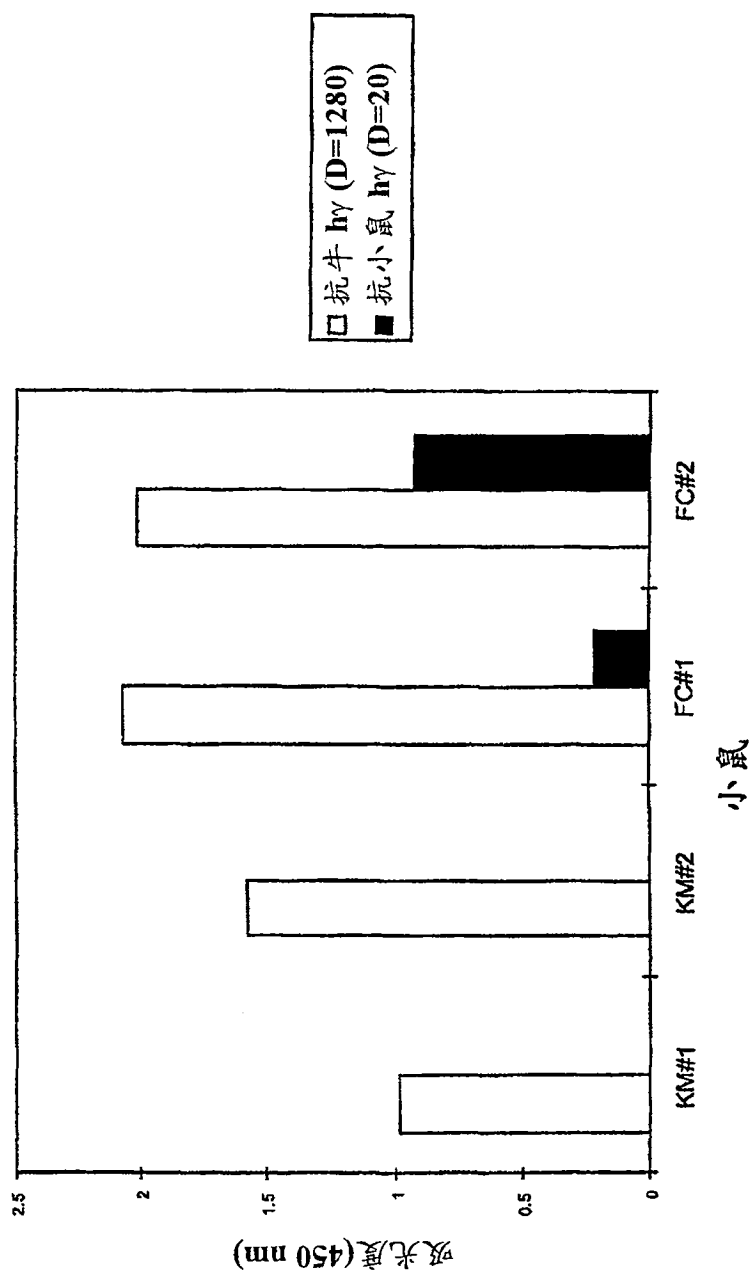


图 14