

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-332152

(P2007-332152A)

(43) 公開日 平成19年12月27日(2007. 12. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006. 01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 V	4 C O 8 5
A O 1 K 67/027 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 X	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 312 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-198202 (P2007-198202)	(71) 出願人	598064886
(22) 出願日	平成19年7月30日 (2007. 7. 30)		ジェンファーム インターナショナル, インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願平9-515285の分割		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 1
原出願日	平成8年10月10日 (1996. 10. 10)		3 1 - 1 8 0 7, サン ノゼ, クメ ドラ
(31) 優先権主張番号	08/544, 404		イブ 2 3 5 0
(32) 優先日	平成7年10月10日 (1995. 10. 10)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(72) 発明者	ニルス ロンバード
			アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4
			6 0 1, レッドウッド シティ エッジ
			クリフ ウェイ 9 3 0
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物

(57) 【要約】

【課題】異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物を用いて免疫グロブリンを得ること。

【解決手段】下記工程を含むヒト配列免疫グロブリンポリペプチドを作る方法、(A) トランスジェニックマウスを得ること (B) 該トランスジェニックマウスを所定の抗原により免疫化すること、(C) 再配列されたトランスジェンの可変領域の少なくとも一部をエンコードする核酸を単離しかつ配列決定し、そして該再配列されたトランスジェンの配列決定された部分によりエンコードされる免疫グロブリンポリペプチドのアミノ酸配列を決定すること、(D) 第2の免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする人工的遺伝子を作ること、(E) 該人工的遺伝子を転写プロモーター配列に結合すること、そして(F) 該人工的遺伝子を細胞内へ導入すること、これによりヒト配列免疫グロブリンポリペプチドが作られる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載されるような免疫グロブリン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【数 6】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許出願 No.08/544,404 (1995 年 10 月 10 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/352,322 (1994 年 12 月 7 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/209,741 (1994 年 3 月 9 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/165,699 (1993 年 12 月 10 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/161,739 (1993 年 12 月 3 日出願) の部分継続出願であり、これは、

No.08/155,301 (1993 年 11 月 18 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/096,762 (1993 年 7 月 22 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.08/053,131 (1993 年 4 月 26 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.07/990,860 (1992 年 12 月 16 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.07/904,068 (1992 年 6 月 23 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.07/853,408 (1992 年 3 月 18 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.07/810,279 (1991 年 12 月 17 日出願) の部分継続出願であり、これは、No.07/575,962 (1990 年 8 月 31 日出願) (現在は放棄された) の部分継続出願であり、これは、No.07/574,748 (1990 年 8 月 29 日出願) (現在は放棄された) の部分継続出願である。本出願は、PCT 出願 No.PCT/US91/06185 (1992 年 2 月 5 日に出願した米国特許出願 No.07/834,539 に対応する) および PCT 出願 No.PCT/US92/10983 に対して、米国法、セクション 119 の、タイトル 35 の下に、外国の優先権を主張している。

産業上の利用分野

本発明は、異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物、そのようなトランスジェニック動物を産生するのに使うトランスジーン(transgene)、V-D-J 組換えにおいて異種 D 遺伝子を機能的に再配列させることのできるトランスジーン、異種抗体を産生することのできる不死化 B 細胞、多数のイ

【数 7 - 1】

ソタイプの異種抗体を産生せしめる方法およびそのためのトランスジーン、内因性免疫グロブリン遺伝子座の発現を不活性化または抑制する方法およびそのためのトランスジーン、生殖細胞系列の再配列された可変領域配列に比較すると可変領域配列が体細胞変異を含んで成る異種抗体を産生せしめる方法およびそのためのトランスジーン、ヒト一次配列を有する抗体を産生し且つヒト抗原に結合するトランスジェニック非ヒト動物、その様なトランスジュニック動物のB細胞から作られたハイブリドーマ、並びに該ハイブリドーマにより発現され6モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

【数 7 - 2】

従来の技術

ヒトにおけるモノクローナル抗体の生体内治療および診断用途の開発に直面する主な障害の1つは、非ヒト免疫グロブリンの本質的免疫原性である。例えば、免疫寛容性のヒト患者に治療量の齧歯類モノクローナル抗体を役与すると、患者は齧歯類免疫グロブリン配列に対して抗体を産生し、それらのヒト抗マウス抗体（HAMA）は治療抗体を中和し、急性毒性を引き起こし得る。よって、有望な治療および／または診断上の標的である特異的ヒト抗体と反応性であるヒト免疫グロブリンを作製することが望ましい。

10

モノクローナル抗体を作製するための現在の技術は、動物（通常はラットまたはマウス）を抗原に予備暴露するか、または抗原で感作せしめ、該動物からB細胞を取得し、そしてハイブリドーマクローンのライブラリーを作製することを伴う。ハイブリドーマ集団を抗原結合特異性（イディオタイプ）についてスクリーニングし、更に免疫グロブリンクラス（イソタイプ）についてもスクリーニングすることにより、所望の抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択することが可能である。

20

しかしながら、モノクローナル抗体を作製する現行法を、ヒト抗原に対して結合特異性を有するヒト抗体を産生せしめる目的に適用すると、ヒトは典型的には自己抗原に対しては免疫応答を生じないであろうから、ヒト免疫グロブリンを産生するBリンパ球を得ることは深刻な妨げになる。

30

よって、ヒト抗原と特異的に反応するヒトモノクローナル抗体を作製する現行

【数 8】

(9)

法は明らかに不十分である。ハイブリドーマを作製するためのB細胞源として非ヒト種を使用する場合にも、真の自己抗原に対するモノクローナル抗体を作製することに同じ制限が当てはまる。

機能的異種免疫グロブリントランスジーンを含有するトランスジェニック動物の作製は、自己抗原と反応する抗体を産生させることができる方法である。しか

10

しながら、療法上有用な抗体の発現、またはそのような抗体を産生するハイブリドーマクローンを得るためには、トランスジェニック動物がBリンパ球発生過程を経て成熟することのできるトランスジェニックB細胞を産生しなければならない。そのような成熟はトランスジェニックB細胞上の表面IgMの存在を必要とするが、療法利用にはIgM以外のイソタイプが所望される。よって、機能的V-D-J再配列を受けて組換え多様性と接合多様性を生じることのできるトランスジーンおよびそのようなトランスジーンを有する動物が要求される。更に、そのようなトランスジーンとトランスジェニック動物は、好ましくは、B細胞成熟に必要とされる第一のイソタイプから優れた療法的効用を有する次なるイソタイプへのイソタイプ転換を促進するシス作用性配列を含有する。

20

多数の実験は、I g遺伝子再配列に必要な特異的DNA配列を決定するためのトランスフェクトされた細胞系の使用を報告している [Lewis およびGellert(1989), Cell, 59, 585-588]。そのような報告は推定上の配列を同定し、そして再配列に使う組換え酵素へのそれらの配列の近づきやすさ(accessibility)が転写により変更されると結論づけている [Yancopoulos およびAlt(1985), Cell, 40, 271-281]。V(D)J結合のための配列は、報告によれば、高度に保存されたほぼ回文式のヘプタマーと、12または23 bp のいずれかのスパーサーにより隔てられたあまり保存されていない高ATナノマーである [Tonegawa(1983), Nature, 302, 575-581, Hesseら(1989), Genes in Dev., 3, 1053-1061]。効率的組換えは、伝えられるところによれば、異なる長さのスパーサー領域を有する組換えシグナル配列を含む部位の間でのみ起こる。

30

40

I g遺伝子再配列は、組織培養細胞において研究されているが、トランスジェニックマウスでは詳しく研究されていない。マウス中に導入された再配列試験構

【数 9】

(10)

成物を記載している少数の報告が発表されているに過ぎない [Buchini ら、Nature, 326: 409-411 (1987) (再配列されていないニワトリ λ トランスジーン) ; Goodhart ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4229-4233(1987) (再配列されていないウサギ κ 遺伝子) ; および Bruggemann ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U

10

SA 86:6709-6713 (1989) (ハイブリッドマウス-ヒト重鎖)]。しかしながら、そのような実験の結果は変動的であり、場合によって、トランスジーンの不完全なまたは最小の再配列を生じることがある。

更に、分子の F c 部分により抗体分子の多様な生物学的機能、例えば F c ϵ を介したマスト細胞または好塩基球との相互作用、および F c μ または F c γ による補体の結合、が発揮され、イソタイプの変化により特定の特異性を有する機能的に多様な抗体を生成せしめることが更に望ましい。

20

異種抗体の 1 または複数の鎖をコードするトランスジーンを含むトランスジェニック動物は作製されているけれども、好結果のイソタイプスイッチを受ける異種トランスジーンについての報告は全くない。イソタイプをスイッチすることのできないトランスジェニック動物は単一のイソタイプの異種抗体を産生するものに限定され、より詳しくは、B 細胞成熟に不可欠であるイソタイプ、例えば IgM とおそらく IgD を産生するものに限定され、それらの抗体は療法的効用が限定され得る。

30

上記に基づくと、第二の種において産生される第一の種の遺伝子配列によってコードされる異種抗体を効率的に産生せしめる方法に対する要求が存在することは明らかである。より詳しくは、組換え多様性に貢献する D セグメントの全部または一部を含む機能的 V-D-J 遺伝子再配列を受けることができる異種免疫グロブリン トランスジーンおよびトランスジェニック動物に対する要求が当業界に存在する。更に、(1) 機能的な B 細胞発達が起こり、そして (2) 療法上有用な異種抗体が産生されるように V-D-J 組換えとイソタイプスイッチングを支えることができるトランスジーンおよびトランスジェニック動物に対する要求が当業界に存在する。抗体が設計される特定の種において療法または診断用のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを製造することができる B 細胞源に対

40

【数 1 0 - 1】

(11)

する要求も存在する。機能的 V-D-J 組換えおよび／またはイソタイプスイッチングを受けることができる異種免疫グロブリントランスジーンはそれらの要求を満たすことができる。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

【数 1 0 - 2】

上記目的に従って、異種抗体、例えばヒト抗体、を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物が提供される。

更に、異種抗体を発現することができるそのようなトランスジェニック動物からの B 細胞であって、特定抗原に特異的なモノクローナル抗体の源を提供するために不死化されている前記 B 細胞を提供することが本発明の目的である。

20

この上記目的に従って、そのような異種モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を提供することが本発明の更なる目的である。

更にまた、上述の非ヒトトランスジェニック動物の製造に有用な再配列されていないおよび再配列された異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンを提供することが本発明の目的である。

更にまた、トランスジェニック動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊する方法を提供することが本発明の目的である。

30

更にまた、上述のトランスジェニック非ヒト動物において異種抗体産生を誘導する方法を提供することが本発明の目的である。

本発明の更なる目的は、本発明の 1 または複数のトランスジーンを作製するために使われる免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントレパートリーを作製する方法を提供することである。

40

上記の参考文献は、単に本出願の出願日より前のそれらの開示のために提供される。本発明者らが先行発明によってそのような開示より以前は権利がないと認めることと解釈してはならない。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

本発明によって、以下が提供される：

1. 予め決められたヒト抗原への結合について少なくとも $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) を有する免疫グロブリンを含む組成物であって、ここで、該免疫グロブリンは、

50

以下：

ヒト配列軽鎖であって、(1) ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、ならびに(2) C_L 遺伝子セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域から構成される、ヒト配列軽鎖：ならびに

ヒト配列重鎖であって、(1) ヒト V_H 遺伝子セグメントと、必要に応じて、D領域およびヒト J_H セグメントとによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、ならびに(2) ヒト C_H 遺伝子セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する定常領域から構成される、ヒト配列重鎖、
からなる、組成物。 10

2. 項目1に記載の組成物であって、ここで前記ヒト配列重鎖および前記ヒト配列軽鎖は、ヒト重鎖トランスジーンおよびヒト軽鎖トランスジーンによってそれぞれ別々にコードされ、該ヒト重鎖トランスジーンおよび該ヒト軽鎖トランスジーンは、マウス細胞のゲノムに組込まれている、組成物。

3. 項目1に記載の組成物であって、該組成物は、単一のイディオタイプのモノクローナル抗体を含む、組成物。

4. 項目1に記載の組成物であって、前記予め決められたヒト抗原は、ヒトの体細胞の少なくとも1つの細胞型において表面蛋白質または膜通過蛋白質として天然に存在するヒト蛋白質である、組成物。 20

5. 前記ヒト配列軽鎖が κ 定常領域を有する、項目1に記載の組成物。

6. 前記ヒト配列重鎖が γ 定常領域を有する、項目1に記載の組成物。

7. 項目1に記載の組成物であって、前記免疫グロブリンが、 κ 定常領域を有するヒト配列軽鎖と、 γ 定常領域を有するヒト配列重鎖とを含む、組成物。

8. 項目4に記載の組成物であって、前記予め決められたヒト抗原が、ヒトCD4蛋白質またはその抗原性フラグメントである、組成物。

9. 項目7に記載の組成物であって、前記予め決められたヒト抗原が、ヒトCD4蛋白質またはその抗原性フラグメントである、組成物。

10. 予め決められたヒト抗原への結合について少なくとも $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) を有する免疫グロブリンであって、ここで、該免疫グロブリンは、以下： 30

ヒト配列軽鎖であって、(1) ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、ならびに(2) ヒト C_L 遺伝子セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域から構成される、ヒト配列軽鎖：ならびに

ヒト配列重鎖であって、(1) ヒト V_H 遺伝子セグメントと、必要に応じて、D領域およびヒト J_H セグメントとによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、ならびに(2) ヒト C_H 遺伝子セグメントによりコードされるポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を有する定常領域から構成される、ヒト配列重鎖、
からなる、免疫グロブリン。 40

11. 項目10に記載の免疫グロブリンであって、前記予め決められたヒト抗原は、ヒトの体細胞の少なくとも1つの細胞型において表面蛋白質または膜通過蛋白質として天然に存在するヒト蛋白質である、免疫グロブリン。

12. 項目11に記載の免疫グロブリンであって、前記ヒト蛋白質が、ヒトCD4蛋白質またはその抗原性フラグメントである、免疫グロブリン。

13. 項目10に記載の免疫グロブリンであって、前記ヒト配列軽鎖が κ 鎖であり、そして前記ヒト配列重鎖が γ 鎖である、免疫グロブリン。

14. ヒト重鎖トランスジーンとヒト軽鎖トランスジーンとを有するトランスジェニック 50

マウスから得られるB細胞から構成されるハイブリドーマであって、該B細胞は、ハイブリドーマを作製するために適切な不死細胞に融合されており、ここで該ハイブリドーマは、検出可能な量の項目10に記載の免疫グロブリンを培養上清中に産生する、ハイブリドーマ。

15. 前記免疫グロブリンが、ヒト配列κ鎖およびヒト配列γ鎖からなる、項目14に記載のハイブリドーマ。

16. 前記免疫グロブリンが、少なくとも $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性でヒトCD4に結合する、項目14に記載のハイブリドーマ。

17. 前記免疫グロブリンが、少なくとも $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性でヒトCD4に結合する、項目15に記載のハイブリドーマ。

18. トランスジェニックマウスであって、該トランスジェニックマウスは、以下：

機能的に破壊された内因性重鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、機能的に破壊された内因性軽鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、異種免疫グロブリン軽鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピー、および異種免疫グロブリン重鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピー

を含み、ここで該動物はヒト抗原での免疫化後に抗体応答を行い、ここで該抗体応答は、項目10に記載の免疫グロブリンを含む、トランスジェニックマウス。

19. 項目18に記載のトランスジェニックマウスであって、ここで前記項目10に記載の免疫グロブリンは、ヒト配列κ鎖およびヒト配列γ鎖を含む、トランスジェニックマウス。

20. 項目18に記載のトランスジェニックマウスであって、ここで前記免疫グロブリンは、ヒトの少なくとも1つの体細胞型において存在するヒト表面蛋白質またはヒト膜通過蛋白質に結合し、ここで該免疫グロブリンは、 $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ と $1.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ との間の親和性定数(K_a)で該ヒト表面蛋白質または該ヒト膜通過蛋白質に結合する、トランスジェニックマウス。

21. 前記ヒト表面蛋白質または前記ヒト膜通過蛋白質がヒトCD4である、項目20に記載のトランスジェニックマウス。

22. 項目14に記載のハイブリドーマであって、前記トランスジェニックマウスが、項目18に記載のトランスジェニックマウスである、ハイブリドーマ。

23. 項目18に記載のトランスジェニックマウスを作製する方法であって、該方法は、トランスジーン内でのアイソタイプスイッチを受け得るヒト重鎖トランスジーンの生殖細胞系コピーを含むトランスジェニックマウスを、反対の性別の適切なトランスジェニックマウスと交配する工程を包含し、その結果、子孫が項目18に記載のトランスジェニックマウスを含む、方法。

24. 項目23に記載の方法であって、前記反対の性別の適切なトランスジェニックマウスが、ヒト軽鎖トランスジーンの生殖細胞系コピーと、機能的に破壊されたマウス重鎖対立遺伝子および機能的に破壊された軽鎖対立遺伝子の生殖細胞系コピーを含むノックアウトバックグラウンドを含む、方法。

25. 項目18に記載のトランスジェニックマウスであって、該マウスのB細胞は、機能的なマウス配列重鎖または機能的なマウス配列軽鎖の発現の非存在下において、B細胞成熟、ヒト配列免疫グロブリンの発現、クラススイッチ、および体細胞変異を起こす、トランスジェニックマウス。

26. ヒト可変領域遺伝子セグメントの拡張されたレパートリーを有するトランスジェニックマウスを作製する方法であって、該方法は、ヒト免疫グロブリントランスジーンと、該ヒト免疫グロブリントランスジーンには存在しないヒトV遺伝子セグメントを含有するヒトV遺伝子ポリヌクレオチドとを、マウスのゲノム中に共導入する工程を包含する、方法。

27. 前記V遺伝子ポリヌクレオチドが、ヒトκ免疫グロブリン遺伝子座の一部を含む酵母人工染色体である、項目26に記載の方法。

28. 項目26に記載の方法によって作製されるトランスジェニックマウスであって、該

10

20

30

40

50

マウスは、前記V領域ポリヌクレオチドに存在するV領域遺伝子セグメントによってコードされる可変領域配列を含む免疫グロブリン鎖を発現する、トランスジェニックマウス。

29. 少なくとも5つの異なるV_K遺伝子を含む、トランスジェニックマウス。

30. ヒト配列免疫グロブリンを発現する形質を遺伝させる方法であって、該方法は、項目28に記載のトランスジェニックマウスを交配する工程を包含する、方法。

31. 項目29に記載のトランスジェニックマウスによって産生される、項目10に記載の免疫グロブリン。

32. ヒト配列免疫グロブリンポリペプチドを作製する方法であって、該方法は、以下の工程：

(A) トランスジェニックマウスを得る工程であって、ここで該トランスジェニックマウスは、機能的に破壊された内因性重鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、機能的に破壊された内因性軽鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、ヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピー、およびヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピーを含む、工程； 10

(B) 該トランスジェニックマウスを予め決められた抗原により免疫化する工程であって、ここで免疫応答が誘発され、そしてそれにより該マウスのトランスジーンがV-D-J再配列を受け、それにより再配列されたトランスジーンが作製される、工程；

(C) 再配列された該トランスジーンの変領域の少なくとも一部をコードする核酸を単離しかつ配列決定し、そして該再配列されたトランスジーンの配列決定された部分によりコードされる免疫グロブリンポリペプチドのアミノ酸配列を決定する工程； 20

(D) 第2の免疫グロブリンポリペプチドをコードする人工的遺伝子を作製する工程であって、ここで該第2の免疫グロブリンポリペプチドは、再配列された該トランスジーンの配列決定された部分によりコードされる免疫グロブリンポリペプチドのアミノ酸配列に実質的に類似したアミノ酸配列を含む、工程；

(E) 該人工的遺伝子を転写プロモーター配列に結合する工程；ならびに

(F) 該人工的遺伝子を細胞内へ導入する工程、
を包含し、これによりヒト配列免疫グロブリンポリペプチドが作製される、
方法。

33. 前記第2の免疫グロブリンポリペプチドが、再配列された前記トランスジーンの配列決定された部分によりコードされる免疫グロブリンポリペプチドのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む、項目32に記載の方法。 30

34. 工程(C)の前記核酸が、ヒト配列免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマから単離される、項目32に記載の方法。

35. 再配列された前記トランスジーンがヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンである、項目32に記載の方法。

36. 前記人工的遺伝子がガンマイソタイプ定常領域をコードする、項目35に記載の方法。

37. 工程(F)の前記細胞中に第2の人工的遺伝子を導入する工程を更に含み、ここで該第2の人工的遺伝子は、再配列された前記トランスジーンがヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジーンであることを除いては項目4に記載の工程(A)～(E)に従って作製され、かつここで該細胞は免疫グロブリンを産生する、項目35に記載の方法。 40

38. ヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーン及びヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジーンが、トランスジェニックマウス由来の単一のB細胞を1つの不死細胞へ融合させることにより作製されたハイブリドーマ内で発現される、項目37に記載の方法。

39. 前記細胞が、少なくとも約 10^8 M^{-1} の親和性定数(K_a)で予め決められた抗原に結合する免疫グロブリンを産生する、項目37に記載の方法。

40. 項目32に記載の方法により作製された、免疫グロブリン。

41. 免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも一部をコードする少なくとも1つの人工的遺伝子を含む細胞であって、該細胞は予め決められたヒト抗原を結合する免疫グロブリンの検出可能量を産生し、該免疫グロブリンポリペプチドは、トランスジェニックマウス 50

から得られたハイブリドーマにより分泌される免疫グロブリンポリペプチドと実質的に同じ配列を有し、該マウスは、機能的に破壊された内因性重鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、機能的に破壊された内因性軽鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、ヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピー、及びヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンの少なくとも一つのコピーを含む、細胞。

42. 項目41に記載の真核細胞。

43. 前記免疫グロブリンが、ヒトCD4またはその抗原性フラグメントに結合する、項目42に記載の細胞。

44. ヒトCD4に特異的に結合する免疫グロブリンであって、該免疫グロブリンが、配列I. D. No. 1、配列I. D. No. 2、配列I. D. No. 3、配列I. D. No. 4、配列I. D. No. 5、配列I. D. No. 6、配列I. 10

D. No. 7、配列I. D. No. 8、配列I. D. No. 9、または配列I.

D. No. 10によりコードされるアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を含むヒト配列軽鎖可変領域を含む、免疫グロブリン。

45. 前記免疫グロブリンが配列I. D. No. 61又は配列I. D. No. 62の配列を含む、項目44に記載の免疫グロブリン。

46. 予め選択された抗原に特異的に結合するヒト配列免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマを選択する方法であって、該方法は以下の工程：

(a) トランスジェニックマウスからB細胞を得る工程であって、ここで該トランスジェニックマウスは、機能的に破壊された内因性重鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、機能的に破壊された内因性軽鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、ヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジーンの少なくとも1つのコピー、ならびに μ セグメントおよび非 μ セグメントをコードする配列を含むヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンの少なくとも一つのコピーを含み、かつここで該マウスは予め決定された抗原により免疫化されている、工程； 20

(b) 該B細胞を不死細胞に融合させる工程であって、ここでハイブリドーマが産生される、工程；

(c) 非 μ 、非 δ イソタイプ免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマの第1群を同定する工程；

(d) ハイブリドーマの第2群を同定する工程であって、ここで該第2群は、ハイブリドーマの第1群のサブセットであり、該第2群のハイブリドーマは予め決定された抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを分泌する、工程； 30

(e) ハイブリドーマの第2群から、予め選択された抗原に特異的に結合するヒト配列免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマを選択する工程を包含する、方法。

47. ハイブリドーマの前記第1群がIgG免疫グロブリンを分泌する、項目46に記載の方法。

48. 工程(e)の前記ヒト配列免疫グロブリンが、少なくとも約 10^9 M^{-1} の親和性定数(K_a)で予め決定された抗原に結合する、項目46に記載の方法。

49. ヒト由来のCD4に特異的に結合し、かつ少なくとも1つの非ヒト霊長類由来のCD4に特異的に結合する、ヒト抗CD4免疫グロブリン。 40

50. 前記非ヒト霊長類がアカゲザル、カニクイザル、又はチンパンジーである項目49に記載の免疫グロブリン。

51. 前記ヒト抗CD4免疫グロブリンが、アカゲザル及びカニクイザルの両方に由来するCD4に特異的に結合する項目50に記載の免疫グロブリン。

52. 前記ヒト抗CD4免疫グロブリンが、アカゲザル、カニクイザル及びチンパンジー由来のCD4に特異的に結合する項目50に記載の免疫グロブリン。

53. VH4-34セグメント、DXP'1セグメント、JH4セグメント、及び配列DITMVRGPH(配列I. D. No. 63)を含む重鎖CDR3領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

54. VH5-51セグメント、DHQ52セグメント、JH2セグメント、及び配列P 50

A N W N W Y F V L (配列 I. D. No. 64) を含む重鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

55. V H 4-34 セグメント、J H 5 セグメント、及び配列 V I N W F D P (配列 I. D. No. 65) を含む重鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

56. V H 5-51 セグメント、D H Q 52 セグメント、J H 4 セグメント、及び配列 D Q L G L F D Y (配列 I. D. No. 66) を含む重鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

57. V k A 27/A 11 セグメント、J k 4 セグメント、及び配列 Q Q Y G S S P L T (配列 I. D. No. 67) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

58. V k L 18 セグメント、J k 4 セグメント、及び配列 Q Q F I S Y P Q L T (配列 I. D. No. 68) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。 10

59. V k L 19 セグメント、J k 2 セグメント、及び配列 Q Q A N S F P Y T (配列 I. D. No. 69) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン。

60. V k L 15 セグメント、J k 2 セグメント、及び配列 Q Q Y D S Y P Y T (配列 I. D. No. 70) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含む、ヒト配列免疫グロブリン。

61. 免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマであって、該免疫グロブリンが、V H 4-34 セグメント、D X P ' 1 セグメント、J H 4 セグメント、及び配列 D I T M V R G P H (配列 I. D. No. 63) を含む重鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V H 5-51 セグメント、D H Q 52 セグメント、J H 2 セグメント、及び配列 P A N W N W Y F V L (配列 I. D. No. 64) を含む重鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V H 4-34 セグメント、J H 5 セグメント、及び配列 V I N W F D P (配列 I. D. No. 65) を含む重鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V H 5-51 セグメント、D H Q 52 セグメント、J H 4 セグメント、及び配列 D Q L G L F D Y (配列 I. D. No. 66) を含む重鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V k A 27/A 11 セグメント、J k 4 セグメント、及び配列 Q Q Y G S S P L T (配列 I. D. No. 67) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V k L 18 セグメント、J k 4 セグメント、及び配列 Q Q F I S Y P Q L T (配列 I. D. No. 68) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン；V k L 19 セグメント、J k 2 セグメント、及び配列 Q Q A N S F P Y T (配列 I. D. No. 69) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン：ならびに V k L 15 セグメント、J k 2 セグメント、及び配列 Q Q Y D S Y P Y T (配列 I. D. No. 70) を含む軽鎖 C D R 3 領域を含むヒト配列免疫グロブリン 30

から成る群から選択される、ハイブリドーマ。

【数 10-3】

発明の要約

異種抗体、例えばヒト抗体を産生することのできるトランスジェニック非ヒト動物が提供される。そのような異種抗体は、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgA_{3c}, IgD または IgE を含む様々なイソタイプのものであることが

【数 1 1】

(12)

できる。そのようなトランスジェニック非ヒト動物が免疫応答を行うには、B細胞の発達と抗原刺激成熟を果たすためにトランスジェニックB細胞および前B細胞が表面結合型免疫グロブリン、特にIgM（ことによるとIgD）イソタイプのものを産生することが必要である。そのようなIgM（またはIgD）表面結合型免疫グロブリンの発現はB細胞発達の抗原刺激成熟期の間にのみ要求され、一時期には一回スイッチしたイソタイプだけが産生されるが、成熟B細胞は他のイソタイプを産生し得る。

10

典型的には、B細胞系統の細胞は一時期に単一のイソタイプだけを産生するだろうが、 μ_s （分泌型 μ ）および μ_m （膜結合型 μ ）型、並びに μ および δ 免疫グロブリン鎖で天然に起こるような、シスまたはトランス二者択一RNAスプライシングは、単一細胞による複数のイソタイプの同時代発現をもたらし得る。従って、複数のイソタイプの異種抗体、特に療法上有用なIgG、IgAおよびIgMイソタイプの異種抗体を産生せしめるためには、イソタイプスイッチングが起こることが必要である。そのようなイソタイプスイッチングは古典的クラススイッチであってもよく、または1もしくは複数の非古典的イソタイプスイッチ機構から生じてよい。

20

本発明は、異種免疫グロブリントランスジーンおよびそのようなトランスジーンを有するトランスジェニック動物を提供し、ここで該トランスジェニック動物はイソタイプスイッチを受けることにより複数のイソタイプの異種抗体を産生することができる。古典的イソタイプスイッチは、トランスジーン中の少なくとも1つのスイッチ配列領域を巻き込む組換え現象によって起こる。非古典的イソタイプスイッチは、例えば、ヒト $\sigma\mu$ 配列とヒト $\Sigma\mu$ 配列の間の相同組換え（ δ -関連欠失）により起こり得る。別の非古典的スイッチ機構、例えば特にトランスジーン間および／または染色体間組換えは、イソタイプスイッチを果たすことができる。

30

40

そのようなトランスジーンおよびトランスジェニック動物は、抗原刺激型B細胞成熟に必要である第一の免疫グロブリンイソタイプを産生し、そして療法的および／または診断的効用を有する1または複数の第二の異種イソタイプをコード

【数 1 2】

(13)

し産生するようにスイッチすることができる。よって本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、一態様では、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列によりコードされ且つ高親和力で特異的ヒト抗原に結合するIgG、IgAおよび／またはIgE抗体を産生することができる。

本発明は、様々なイソタイプの異種抗体を発現することのできるトランスジェニック動物からのB細胞にも関し、そのようなB細胞は、特定抗原に対して特異的なモノクローナル抗体の源を提供するために不死化される。そのようなB細胞から誘導されたハイブリドーマ細胞は、そのような異種モノクローナル抗体の1つの源として働くことができる。

本発明は、上述の非ヒトトランスジェニック動物中でまたはそのようなトランスジェニック動物から外植されたB細胞系統のリンパ球中で生体内イソタイプスイッチを受けることができる、再配列されていないおよび再配列された異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンを提供する。そのようなイソタイプスイッチは自然に起こるか、またはトランスジェニック動物もしくは外植されたB細胞系統リンパ球をイソタイプスイッチ促進剤、例えばT細胞由来のリンホカイン（例えばIL-4およびIFN γ ）で処理することによって誘導することができる。

更に、本発明は、上述のトランスジェニック非ヒト動物中での異種抗体産生を誘導する方法を包含し、ここでそのような抗体は様々なイソタイプのものであることができる。それらの方法は、異種抗体、特にスイッチされたイソタイプ（IgG、IgAおよびIgM）の異種抗体の産生のためにトランスジェニック非ヒト動物において抗原刺激型免疫応答を生じさせることを含む。

本発明は、トランスジェニック動物中で産生される異種免疫グロブリンおよび前記動物のB細胞から誘導されるモノクローナル抗体クローンが多様なイソタイプ

プのものであり得るように、トランスジーンがイソタイプスイッチを果たす配列を含む方法を提供する。

本発明は更に、特定のイソタイプ間のスイッチが、生殖細胞免疫グロブリン遺伝子座中で典型的に起こるよりもずっと高頻度もしくは低頻度でおこるかまたは

10

20

30

40

【数 1 3】

(14)

異なる時間順序で起こるように、トランスジーンのアライメントスイッチを促進する方法を提供する。スイッチ領域は、様々なC_H遺伝子から移植しそしてトランスジーン構成物中の別のC_H遺伝子に連結せしめることができる。そのような移植スイッチ配列は典型的には結合されたC_H遺伝子とは独立的に機能し、そのため、トランスジーン構成物中でのスイッチは結合されたスイッチ領域の元の機能であろう。あるいはまた、スイッチ配列と共に、 δ -結合欠失配列が様々なC_H遺伝子に連結され、2つの δ -結合欠失配列の間の配列の欠失により非古典的スイッチを果たすことができる。よって、特定のC_H遺伝子が異なるスイッチ配列に連結され、それによって天然に結合されたスイッチ領域を使用した時に起こるよりも頻繁にスイッチされるトランスジーンを作製することができる。

10

本発明はまた、免疫グロブリントランスジーンを含有するトランスジェニック動物においてトランスジーン配列のアライメントスイッチが起こったかどうかを決定する方法を提供する。

20

本発明は、その内の幾つかは生殖細胞の免疫グロブリン遺伝子座配列（欠失を含んでもよい）のサブセットを含有する免疫グロブリントランスジーン構成物、および免疫グロブリントランスジーン構成物の作製方法を提供する。本発明は、免疫グロブリントランスジーンの容易なクローニングと作製のための特別な方法であって、2つのユニークNotI部位により隣接されたユニーク XhoIおよびSalI制限部位を使用するベクターを必要とする方法を包含する。

30

本発明のトランスジーンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る重鎖トランスジーンを包含する。免疫グロブリン軽鎖トランスジーンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメント

40

および1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、それらが誘導されるトランスジェニック非ヒト動物にとって異種であるか、またはトランスジェニック非ヒト動物から成らない種からの免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに相当する。

【数 1 4】

(15)

本発明の一観点によれば、個々の遺伝子セグメントが再配列されておらず、即ち機能的な免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするようには再配列されていないようなトランスジーンが作製される。そのような再配列されていないトランスジーンは、トランスジェニック非ヒト動物が抗原に暴露されると、前記動物中での該遺伝子セグメントの組換え（機能的再配列）並びに生成した再配列された免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖の発現を可能にする。

10

本発明の一観点によれば、異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジーンは、再配列された異種DNAの比較的大きい断片を含んで成る。そのような断片は、典型的には異種免疫グロブリン遺伝子座からのC、J（および重鎖の場合にはD）セグメントの実質的部分を含む。加えて、そのような断片は可変遺伝子セグメントの実質的部分も含んで成る。

20

一態様では、そのようなトランスジーン構成物は、調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、組換えシグナル、異種DNAから誘導された対応配列等を含んで成る。あるいは、そのような調節配列を、本発明に使われる非ヒト動物と同一のまたは関連の種からのトランスジーン中に組み込むことができる。例えば、トランスジェニックマウスに使うために、齧歯類免疫グロブリンエンハンサー配列を有するトランスジーン中にヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを組み合わせることができる。

30

本発明の方法では、生殖細胞再配列されていない軽鎖および重鎖免疫グロブリントランスジーン—即ちD細胞分化中にVDJ結合を受けるもの—を抗原と接触

せしめ、二次レパトリーB細胞における異種抗体の産生を誘導する。

本発明に使われる非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するベクターおよび方法も本発明に包含される。そのようなベクターおよび方法は、トランスジーン、好ましくはポジティブ・ネガティブ(positive-negative)選別ベクターを使用し、該ベクターは、それが本発明において使用する非ヒト動物にとって内因性である重鎖および／または軽鎖免疫グロブリンをコードする遺伝子セグメントのクラスの機能的破壊を標的するように構成される。そのような内因性遺伝子セグメントとしては、多様性領域、連結領域および定常領域遺伝子セグメ

40

【数 1 5】

(16)

ントが挙げられる。

本発明のこの観点によれば、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターを少なくとも1つの非ヒト動物の胎児性幹細胞と接触させた後、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターが相同組換えによって非ヒト動物のゲノム中に組み込まれている細胞を選択する。移植後、得られたトランスジェニック非ヒト動物は、該ベクターの相同組み込みの結果として、免疫グロブリン媒介の免疫応答を開始することが実質的に不可能である。そのような免疫不全非ヒト動物は、その後、免疫不全症の研究に使うことができ、または異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンの受容体として使うことができる。

10

本発明はまた、内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊することなく、1または複数の種の免疫グロブリン鎖の発現を抑制するのに有用なベクター、方法および組成物を提供する。そのような方法は、トランスジェンによってコードされる1または複数の免疫グロブリン鎖の発現を許容しながら、トランスジェンによってコードされる1または複数の免疫グロブリン鎖の発現を抑制するのに有用である。内因性免疫グロブリン鎖遺伝子座の遺伝的破壊とは異なり、免疫グロブリン鎖発現の抑制は、破壊された内因性 I g 遺伝子座についてホモ接合性であるトランスジェニック動物の確立に必要である時間のかかる飼育を必要としない。

20

内因性 I g 遺伝子破壊法に比較した時の抑制法の追加の利点は、ある態様では

30

、個体動物内で鎖抑制が可逆的であることである。例えば、I g 鎖抑制は、(1) 内因性 I g 鎖遺伝子配列に特異的にハイブリダイズするアンチセンス RNA をコードし発現するトランスジェン、(2) 内因性 I g 鎖遺伝子配列に特異的にハイブリダイズするアンチセンスズリゴヌクレオチド、および(3) 内因性 I g 鎖ポリペプチドに特異的に結合する免疫グロブリン、を使って達成することができる。

40

本発明は、機能的に分断された内因性重鎖対立遺伝子の同型接合対、機能的に分断された内因性軽鎖対立遺伝子の同型接合対、非相同免疫グロブリン重鎖トランスジェンの少なくとも1つのコピー、及び非相同免疫グロブリン重鎖トランスジェンの少なくとも1つのコピーを含み、ヒト抗原（例えばC04）といった抗原

【数 1 6】

(17)

での免疫化に続いて抗体応答を行なう、ヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。本発明は同様に、前記機能的に分断された内因性重鎖対立遺伝子が J_H 領域相同組換えノックアウトであり、前記機能的に分断された内因性軽鎖対立遺伝子が J_K 領域相同組換えノックアウトであり、前記非相同免疫グロブリン重鎖トランスジーンが HC1 又は HC2 ヒトミニ遺伝子トランスジーンであり、前記非相同軽鎖トランスジーンが KC2 又は KC1e ヒト κ トランスジーンであり、前記抗原がヒト抗原であるような、ヒト以外のトランスジェニック動物をも提供する。

10

本発明は同様に、内因性ヒト免疫グロブリン遺伝子座を抑制、切除及び／又は機能的に分断するためのさまざまな実施態様をも提供している。

本発明は同様に、ヒト配列重鎖可変領域及びマウス配列重鎖恒常領域を含むキメラ重鎖及びヒト配列重鎖の両方を発現するトランスジェニックマウスをも提供する。このようなキメラ重鎖は一般に、機能的に再配置されたヒトトランスジーンと内因性マウス重鎖恒常領域 ($\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$) の間でのトランススイッチにより産生される。標準的にはトランスジーンコードされたヒト配列軽鎖又は内因性マウス軽鎖と引合わされたこのようなキメラ重鎖を含む抗体は、予め定められた抗原での免疫化に応答して形成される。これらの実施態様のトランスジェニックマウスは、第1の時点でヒト配列重鎖を産生（発現）し、第2（

20

30

次に続く）時点でヒト可変領域及びマウス恒常領域（例えば、 $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$ ）から成るキメラ重鎖を産生（発現）するべくトランススイッチする B 細胞を含むことができる；このようなヒト配列及びキメラ重鎖は軽鎖をもつ機能的抗体内に組込まれる；このような抗体は、かかるトランスジェニックマウスの血清中に存在する。

かくして換言すると、これらの実施態様のトランスジェニックマウスは、ヒト配列重鎖を発現しその後、ヒト可変領域及び交互の恒常領域（例えばマウス $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$ ；ヒト γ , α , ϵ ）から成るキメラ又はアイソタイプスイッチを受けた重鎖を発現するべくスイッチ（トランススイッチ又はシススイッチによる）する B 細胞を含むことができ；かかるヒト配列及びキメラ又はアイソタイプスイッチされた重鎖は軽鎖を伴う機能的抗体（ヒト又はマウス）の中に組

40

【数 1 7】

(18)

込まれ；かかる抗体はかかるトランスジェニックマウスの血清内に存在する。

本発明はまた、大きなトランスジーンを生じる方法を提供し、該方法は、次のことを含む：哺乳動物の細胞に、少なくとも3つのポリヌクレオチド種を導入することであって；第1のポリヌクレオチド種は、第2のポリヌクレオチド種と共有された配列一致（sequence identity）の組換え遺伝子領域（recombinogenic region）を有し、第2のポリヌクレオチド種は、第1のポリヌクレオチド種と共有された配列一致の組換え遺伝子領域および第3のポリヌクレオチド種と共有された配列一致の組換え遺伝子領域を有し、かつ第3のポリヌクレオチド種は、第2のポリヌクレオチド種と共有された配列一致の組換え遺伝子領域を有する。組換え遺伝子領域は、哺乳動物細胞（例えばE S細胞）における、好ましくはまた非哺乳動物の真核細胞（例えばサッカロマイセスおよび他の酵母または菌の細胞）における、イン ビボでの相同組換えを生じるのに十分な実質的な配列一致の領域である。典型的には、組換え遺伝子領域は少なくとも 50～100,000 ヌクレオチド長、好ましくは 500 ヌクレオチド～10,000 ヌクレオチド長で、たいいてい 80～100%同一、しばしば 95～100%同一の、たいいてい同質遺伝子である。

10

20

本明細書中に引用された参考文献は本出願の出願日より前にそれらの開示があったことを示すためだけに提供される。先行発明によって本発明者らがそのような開示よりも先であるという権利を与えられることを認めるものと解釈してはならない。

30

（化2）及び（化3）はベクターpGPeの配列を示す。

（化4）及び（化5）は遺伝子V_H 49.8の配列を示す。

表1は本発明のトランスジェニックマウスの血清中のヒトIgMおよびIgGの検出を示す。

40

（化6）及び（化7）はVDJ接合の配列を示す。

表2は、成人の末梢血リンパ球（PBL）において見つかるJセグメントに対する、pHCl1トランスジーンによってコードされる転写物中に組み込まれたJセグメントの分布を示す。

表3は、成人の末梢血リンパ球（PBL）において見つかるDセグメントに対

【数 18】

(19)

する、pHC1トランスジーンによってコードされる転写物中に組み込まれたDセグメントの分布を示す。

(化8) 及び (化9) は、pHC1トランスジェニックマウス中またはヒト P B L 中のフレーム内 V D J 接合を有する転写物からのCDR3ペプチドの長さを示す。

表 4 は、pHC1トランスジェニックマウスから分析された30クローンの V D J 領域の推定アミノ酸配列を示す。

10

表 5 は、指摘の実験において使用したライン112 のトランスジェニックマウスを示す； (+) は各トランスジーンが存在を示し、 (++) は該動物が J_H D 突出トランスジーンについてホモ接合性であることを示す。

表 6 は、複数の0011マウスの遺伝子型を示す。

表 7 は、トランスジェニックマウスにおけるHC2重鎖トランスジーン内の体細胞突然変異の発生を示す。

20

表 8 は、トランスジーン V および J セグメント使用を示す。

表 11 は、トランスジェニックマウスからのハイブリドーマにおけるヒト可変領域使用を示す。

表 14 は、YAC 4x17E1 でのヒト Vk セグメントの同定を示す。

表 15、マウス系統 KCo5-9272 において発現したヒト Vk 遺伝子の同定。

30

表 16、ヒト IgGk 抗-nCD4 モノクローナル抗体についての分泌レベル。

表 17、ヒト CD4 に結合するモノクローナル抗体についての速度および親和性 (affinity) 定数。

表 18、ヒト抗ヒト CD4 モノクローナル抗体の親和性 (affinity) および速度定数。

表 19、ヒト抗ヒト CD4 モノクローナル抗体の結合力 (avidity) および速度定数。

40

表 20、抗 CD4 モノクローナル抗体について報告された結合力 (avidity) および速度定数。

表 21、フローサイトメトリーにより測定された、ヒト抗ヒト CD4 モノクローナル抗体の親和性 (avidity) 定数。

【数 19】

(20)

表 22、機能的転写のための部分ヌクレオチド配列。

表 23、ハイブリドーマ転写における生殖細胞系 V(D) J セグメント使用。

表 24、ミニジーン構成において使用されるプライマー、ベクターおよび産物

。

表 25、末梢のチンパンジーのリンパ球でのヒト mAbs の効果。

10

詳細な説明

上述したように、有望な治療および／または診断上の標的である特異的ヒト抗原と反応するヒト免疫グロブリンを製造することが望ましい。しかしながら、ヒト抗原と特異的に結合するヒト免疫グロブリンは問題がある。

第一に、B細胞源として働く免疫処置動物が、与えられた抗原に対して免疫応答を生じなければならない。動物が免疫応答を生じるには、与えられた抗原が外

20

来でなければならない、且つ動物が該抗原に寛容性でなければならない。よって、例えばヒトタンパク質に結合するイディオタイプを有するヒトモノクローナル抗体を製造しようと所望するならば、自己寛容性がヒトタンパク質に対する実質的な免疫応答を生じるのを妨げるだろう。何故なら、免疫原性となり得る該抗原の唯一のエピトープが、ヒト集団の中のタンパク質の多形性に由来するもの（同種異系間エピトープ）であろうからである。

30

第二に、ハイブリドーマを形成させるためのB細胞の源として働く動物（一例ではヒト）が真正自己抗原に対して免疫応答を生じるならば、該動物において深刻な自己免疫病が発生し得る。ハイブリドーマ用のB細胞源としてヒトを使う場合には、そのような自己免疫化は現代の道徳的規範により非論理的であると見なされる。

かくして予め定められたヒト抗原に対する抗体応答を誘発できるヒト抗体分泌B細胞が必要とされることから、予め定められたヒト抗原と特異的反応性をもつヒト免疫グロブリン鎖を分泌するハイブリドーマを開発することには問題が多い。

40

ヒト抗原と特異的に反応するヒト抗体を得るのに利用することができる1つの方法論は、本発明のヒト免疫グロブリントランスジーン構成物を含有するラン

【数 2 0】

(21)

スジェニックマウスの製造である。簡単に言えば、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の全部もしくは部分を含有するトランスジーン、またはヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の必須機能要素を含んで成る合成「小遺伝子座」（下記、並びに同時継続米国特許出願第 08/352,322 号(1994 年 12 月 7 日出願)、第 07/90,860 号(1992 年 12 月 16 日出願)、第 07/810,279号(1991年 12 月 17 日出願)、第 07/904,068 号(1992 年 6 月 23 日出願)；第 07/853,408 号(1992 年 3 月 18 日出願)、第 07/574,748 号(1990年 8 月 29 日出願)、第 07/575,962 号 (1990 年 8 月 31 日出願) および PCT/US91/06185 号 (1991 年 8 月 28 日出願) に記載されている) を含有するトランスジーンを使ってトランスジェニック非ヒト動

10

物を作製する。

20

そのようなトランスジェニック非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる免疫グロブリン鎖を産生する能力を有し、その上、ヒト抗原に対して免疫応答を生じることができるだろう。よって、そのようなトランスジェニック非ヒト動物は特定のヒト抗原と反応する免疫血清の源として働くことができ、そのようなトランスジェニック動物からの B 細胞をミエローマ細胞と融合せしめることにより、ヒト抗原と特異的に反応するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを製造することができる。

30

様々な形の免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックマウスの製造は以前に報告されている。トランスジェニックマウスの製造には、再配列されたマウス免疫グロブリン重鎖または軽鎖遺伝子が使われている。加えて、 μ または $\gamma 1$ 定常領域を含む機能的に再配列されたヒト Ig 遺伝子がトランスジェニックマウス中で発現されている。しかしながら、トランスジーンが再配列されていない（再配列されない V-D-J または V-J）免疫グロブリン遺伝子を含んで成る実験は変動的であり、場合によって、トランスジーンの不完全なまたは最少の再配列を生じることがあった。しかし、トランスジーン中の C_H 遺伝子間での好結果のイソタイプスイッチを受ける再配列されたまたは再配列されていない免疫グロブリントランスジーンの場合は 1 つも報告されていない。

40

【数 2 1】

(22)

本発明は同様に、基本的にヒト恒常領域配列に対するポリペプチド結合におけるヒトV D J 配列から成るヒト免疫グロブリン鎖を含むモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ候補を同定するための方法をも提供する。かかるハイブリドーマ候補は、(1) 基本的にヒトV D J 領域とヒト恒常領域から成る免疫グロブリン鎖を発現するハイブリドーマクローン、及び(2) 基本的にヒトV D J 領域及びマウス恒常領域から成るヘテロハイブリッド免疫グロブリン鎖を発現するトランススイッチされたハイブリドーマを含むハイブリドーマクロンのプールから同定される。個々の又はプールされたハイブリドーマクローンの上清は、予め定められた抗原結合特異性をもつ抗体を選択するための結合条件下で、標準的

10

には固定基質(例えばマイクロタイターウェル)上に吸着により不動化される抗原である予め定められた抗原と接触させられる。

20

ヒト恒常領域に特異的に結合する抗原も同様に、抗体が少なくとも1つのヒト恒常領域エピトープに選択的に結合するもののマウス恒常領域エピトープには結合しないような結合条件下で、ハイブリドーマ上清及び予め定められた抗原と接触させられ、かくして予め定められた抗原及び特異的にヒト恒常領域と結合する抗体に結合されたハイブリドーマ上清(トランスジェニックモノクローナル抗体)で基本的に構成されている複合体を形成する(そして、これは検出可能な標識又はリポーターで標識付け可能である)。このような複合体の形成の検出は、ヒト免疫グロブリン鎖を発現するハイブリドーマクローン又はプールを表わす)。

30

本発明の好ましい実施態様において、スクリーニングにおいて使用される抗ヒト定常領域免疫グロブリンは、非- μ 、非- δ イソタイプ、好ましくは α または ϵ 、より好ましくは γ イソタイプ定常領域を特異的に認識する。 γ イソタイプのモノクローナル抗体が好ましい。というのは、(i)IgG免疫グロブリンの特性が、いくつかの治療的な適用について、IgM免疫グロブリンに対して好ましい(例えばIgMペンタマーに比べてIgGダイマーのより小さい大きさの故に)こと、および(ii)体細胞突然変異のプロセスが、 μ 定常領域から非 μ (例えば γ)定常領域へのクラススイッチに相関されることのためである。クラススイッチを受けた免疫グロブリンの集団から選ばれた免疫グロブリン(例えばIgG)は、クラス

40

【数 2 2】

(23)

ウィッチを受けていない集団から選ばれた免疫グロブリン（例えばIgM）より高い親和性で抗体を結合する傾向にある。例えばロンベルグ(Lonberg)およびハスザー(Huszer)、

Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995年)を見よ。

1つの実施態様において、候補者のハイブリドーマがまず、 γ イソタイプ定常領域についてスクリーニングされ、次に、IgG発現ハイブリドーマのプールが、予め決められた抗原への特異的結合についてスクリーニングされる。

10

かくして、この方法によれば、本発明のトランスジェニックマウスは、予め決められた抗原で免疫されて、免疫応答を引起す。B細胞がマウスから集められ、不死細胞に融合されてハイブリドーマを生じる。ハイブリドーマはまずスクリーニングされて、非 μ 、非 δ イソタイプのIg（例えばIgG）を分泌する個々のハイブリドーマを同定する。このハイブリドーマの組は次に、関心のある、予め決められた抗原への特異的結合についてスクリーニングされる。スクリーニングは、例えば、ハーロー(Harlow)およびレイン(Lane)、Antibodies:ア ラボラトリー マニュアル、コールドスプリングハーバー(A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor)、ニューヨーク（1988年）に記載されたような標準的技術を用いて行われる。この方法を用いると、高親和性（例えば約 10^7 M^{-1} より大きい K_a ）の免疫グロブリンを実用的に効率的に同定することが可能である。

20

30

定義

本明細書中で使用する時、用語「抗体」は、少なくとも2本の同一の軽ポリペプチド鎖と2本の同一の重ポリペプチド鎖を含んで成る糖タンパク質を言う。重および軽ポリペプチド鎖は各々、抗原と相互作用する結合ドメインを含む可変領域（通常はポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含有する。重および軽ポリペプチド鎖は各々、ポリペプチド鎖の定常領域（通常はカルボキシル末端部分）も含んで成り、その配列の一部は、免疫系の種々の細胞、或る種の食細胞および典型的補体系の第一成分（C1q）を含む宿主組織への免疫グロブリンの結合を媒介する。

40

本明細書中で使用する時、「異種抗体」は、そのような抗体を産生するトラン

【数 2 3】

(24)

スジェニック非ヒト生物に関連して定義される。それは、トランスジェニック非ヒト動物から成らない生物において見つかるものに対応するアミノ酸配列を有するかまたはDNA配列をコードする抗体である。

本明細書中で使用する時、「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物体起源の軽鎖と重鎖を有する抗体を言う。例えば、マウス軽鎖と会合されたヒト重鎖を有する抗体はヘテロハイブリッド抗体である。

10

本明細書中で使用する時、「イソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス（例えばIgMまたはIgG₁）を言う。

本明細書中で使用する時、「イソタイプスイッチ」は、抗体のクラスまたはイソタイプが或るIgクラスから別のIgクラスのうちの1つへ変化する現象を言う。

20

本明細書中で使用する時、「非スイッチイソタイプ」は、イソタイプスイッチが起こらなかった時に産生される重鎖のクラスを言う。非スイッチイソタイプをコードするC_H遺伝子は、典型的には機能的に再配列されたVDJ遺伝子のすぐ下流の最初のC_H遺伝子である。

本明細書中で使用する時、用語「スイッチ配列」は、スイッチ組換えを招くこれらのDNA配列を言う。「スイッチ供与体」配列、典型的にはμスイッチ領域は、スイッチ組換え中に欠失されるであろう定常領域の5'（即ち上流）にあるだろう。「スイッチ受容体」領域は、欠失されるであろう定常領域と代替定常領域（例えばγ, ε等）との間であろう。組換えが常に起こる特異部位は1つもないので、典型的には最終遺伝子配列は構成物から予想不可能であろう。

30

本明細書中で使用する時、「グリコシル化パターン」は、タンパク質、より詳しくは免疫グロブリンタンパク質に共有結合している炭化水素単位のパターンとして定義される。当業者が異種抗体のグリコシル化パターンをトランスジーンのC_H遺伝子が由来する種よりも非ヒトトランスジェニック動物の種の中のグリコシル化パターンに一層類似していると認識するような時には、異種抗体のグリコシル化パターンは、非ヒトトランスジェニック動物の種によって産生される抗体

40

【数 2 4】

(25)

上に天然に存在するグリコシル化パターンと実質上類似していると特徴付けることができる。

本明細書中で使用する時、「特異的結合」は、抗体が（１）予め決定された抗原に少なくとも $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ の親和力で結合し、そして（２）予め決定された抗原以外の非特異的抗原（例えば BSA、カゼイン）への結合親和力よりも少なくとも 2 倍大きい親和力で、予め決定された抗原に優先的に結合する性質を言う。

10

本明細書中で使用する時「天然に存在する」という用語は、対象物に用いた時に対象物が天然に見つけることができることを言う。例えば、天然源から単離することができ且つ人間によって実験室で故意に変更されていない、生物体（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、「天然に存在する」ものである。

20

本明細書中で使用する時「再配列された」という用語は、Vセグメントがそれぞれ本質的に完全な V_H または V_L ドメインをコードする構造において D-J または Jセグメントのすぐ近くに位置する重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座

の配置を言う。再配列された免疫グロブリン遺伝子座は生殖細胞 DNA との比較によって同定することができ；再配列された遺伝子座は少なくとも 1 つのヘプタマー／ナノマー相同性要素を有するだろう。

30

Vセグメントに関して本明細書中で使用する時、「再配列されていない」または「生殖細胞配置」なる用語は、DまたはJセグメントのすぐ近くになるようにVセグメントが組換えられない配置を言う。

核酸については、「実質的相同性」ともいうのは、最適な形で整列され比較された場合、2つの核酸又はその指定配列が、少なくとも約80%のヌクレオチド、通常は少なくとも約90%～95%、より好ましくは少なくとも約98～99.5%のヌクレオチドにおいて適当なヌクレオチド挿入又は欠失を伴って同一であることを表わす。代替的には、選択的ハイブリダイゼーション条件下でストランドの補体に対しセグメントがハイブリッド形成するとき実質的な相同性が存在する。核酸は、全細胞中に、細胞リゼイト中に、又は部分的に精製された形又は実質的に純粋な形で存在しうる。核酸は、アルカリ／SDS処理、 $CsCl$ バンディング、カ

40

【数 2 5】

(26)

ラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動及び当該技術分野において周知のその他の技術を含む標準的技術により、例えばその他の細胞核酸又はタンパク質といったその他の細胞成分はその他の汚染物質から精製された時点で、「分離され」又は「実質的に純粋な状態にされ」ている。F. Ausubel, et. al., ed. 「分子生物学における現在のプロトコル」、Greene, Publishing and Wiley-Interscience、ニューヨーク（1987）参照。

10

本発明の核酸組成物は、往々にして、cDNAゲノミック又は混合物のいずれかからの未変性配列（修正された制限部位などを除く）にあるものの、標準的技術に従って遺伝子配列を提供するべくそこからの突然変異を受けることができる。コーディング配列については、これらの突然変異は望まれるとおりにアミノ酸配列に影響を及ぼしうる。特に、未変性にD. J. 結合スイッチと実質的に相同な又はこれらから誘導されたDNA配列及び本書に記されているその他のこのような配列が考慮される（ここで「誘導された」というのは、1つの配列がもう1

20

つの配列と同一であるか又はそれから修正されたものであることを表わす）。

核酸は、他の核酸と機能的関係におかれたとき、それは「使用可能に連結される。」例えば、プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与えるとき、「作用可能に連結される。転写抑制配列に関し、作用可能に連結されるとは、連結されたDNA配列が隣接することを意味し、2つの蛋白質コード領域を連結するのに必要な場合、隣接しており、そしてリーディングフレーム内にある。スイッチ配列については、作用可能に連結されるとは、配列がスイッチ組換えを行うことができることを意味する。

30

異種抗体を産生することのできるトランスジェニック非ヒト動物

異種抗体レパトリーによる外来抗原刺激に応答するトランスジェニック非ヒト動物のデザインは、トランスジェニック動物の内部に含まれた異種免疫グロブリントランスジーンがB細胞発達経路を通して正しく機能することを必要とする。好ましい態様では、異種重鎖トランスジーンの正しい機能がイソタイプスイッチを含む。従って、イソタイプスイッチを生じ且つ下記のうちの1つまたは複数をもたらすように本発明のトランスジーンが作製される：（1）高レベルで且つ

40

【数 2 6】

(27)

細胞型特異的な発現、(2) 機能的な遺伝子再配列、(3) 対立遺伝子排除の活性化およびそれに対する応答、(4) 十分な一次レパートリーの発現、(5) シグナル形質導入、(6) 体細胞高度突然変異 (hyper-mutation、および (7) 免疫応答の間のトランスジーン抗体遺伝子座の優性化。

下記開示から明らかのように、上記の基準の全てを満たす必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されるそれらの態様では、トランスジーンは対立遺伝子排除を活性化する必要がない。更に、トランスジーンが機能的に再配列された重鎖および／または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含んで成る態様では、2番目の基準である機能的な遺伝子再配列は、少なくとも既に再配列されているトランスジーンには不要である。分子免疫学に関する背景については、Fundamental Immunology, 第2版(1989), Pau

10

20

l William E.編, Raven Press, N.Y. を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

本発明の一観点では、トランジェニック動物の生殖細胞 (ジャームライン) 中に再配列された、再配列されていない、または再配列されたものと再配列されていないものとの組み合わせの、異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンを含有する、トランスジェニック非ヒト動物が提供される。重鎖トランスジーンの各々は少なくとも1つのC_H 遺伝子を含んで成る。加えて、重鎖トランスジーンは、トランスジェニック動物のB細胞中で多数のC_H 遺伝子をコードする異種トランスジーンのイソタイプスイッチを支持することができる機能的イソタイプスイッチ配列を含んでもよい。そのようなスイッチ配列は、トランスジーンC_H 遺伝子の源として働く種からの生殖細胞免疫グロブリン遺伝子座に天然に存在するものであることができ、またはトランスジーン構成物を受け入れることになっている種 (トランスジェニック動物) に存在するものから誘導することもできる。

30

40

例えば、トランスジェニックマウスを製造するのに使われるヒトトランスジーン構成物は、それがマウス重鎖遺伝子座中に天然に存在するものに類似したスイッチ配列を含むならば、より高頻度のイソタイプスイッチ現象をもたらすことが

【数 27】

(28)

できる。というのは、恐らくマウススイッチ配列はマウススイッチレコンビナーゼ酵素系が機能するように最適化されるが、一方ヒトスイッチ配列は最適化されないだろうからである。スイッチ配列は、常用のクローニング法により単離しクローニングすることができ、または免疫グロブリンスイッチ領域配列に関する発表された配列情報に基づいてデザインした重複合成オリゴヌクレオチドから初めから合成することができる (Mills ら、Nucl. Acids Res. 18:7305-7316 (1991) ; Siderrasら、Intl. Immunol. 1:631-642(1989)、これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。

10

上記トランスジェニック動物の各々について、機能的に再配列された異種重鎖

および軽鎖免疫グロブリントランスジーンは、トランスジェニック動物の有意な率（少なくとも10パーセント）のB細胞中に検出される。

20

本発明のトランスジーンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る重鎖トランスジーンを包含する。免疫グロブリン軽鎖トランスジーンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、それらが誘導されるトランスジェニック非ヒト動物にとって異種であるか、またはトランスジェニック非ヒト動物から成らない種からの免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに相当する。

30

本発明の一観点によれば、個々の遺伝子セグメントが再配列されておらず、即ち機能的な免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするようには再配列されていないようなトランスジーンが作製される。そのような再配列されていないトランスジーンは、抗原に暴露されると、トランスジェニック非ヒト動物内でV、DおよびJ遺伝子セグメントの組換え（機能的再配列）を支持し、そして好ましくは結果として得られる再配列された免疫グロブリン重鎖中へのD領域遺伝子セグメントの全部または部分の組み込みを支持する。

40

本発明の別の観点によれば、該トランスジーンは、再配列された「小遺伝子座

【数 2 8】

(29)

」を含んで成る。そのようなトランスジーンは、典型的にはC、DおよびJセグメントの実質的部分並びにVセグメントのサブセットを含んで成る。そのようなトランスジーン構成物では、様々な調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、RNAプロセシング用のスプライス供与体およびスプライス受容体、組換えシグナル等は、異種DNAから誘導された対応配列を含んで成る。

10

あるいは、そのような調節配列を本発明に使われる非ヒト動物と同一のまたは

関連の種からのトランスジーン中に組み込むことができる。例えば、トランスジェニックマウスに使うために、トランスジーン中にヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを齧歯類免疫グロブリンエンハンサー配列と組み合わせることができる。あるいは、トランスジーン中に合成調節配列を組み込むこともでき、この場合、そのような合成調節配列は哺乳類のゲノム中に天然に存在することが知られている機能的DNA配列とは相同でない。合成調節配列は共通規則に従ってデザインされ、例えば、スプライス受容体部位またはプロモーター／エンハンサーモチーフの許容配列を特定するものである。

20

例えば、ミニ遺伝子座は、天然に発生する生殖細胞系Ig遺伝子座と異なり、可欠DNA部分（例えば介在配列；イントロン又はその一部分）の少なくとも1つの内部（すなわちこの部分の末端にはない）の欠失を有するゲノミック免疫グロブリン遺伝子座の一部分を含む。

30

本発明はまた、重鎖および軽鎖トランスジーンを有する生殖細胞を含有するトランスジェニック動物にも関し、ここで前記トランスジーン的一方は再配列された遺伝子セグメントを含み、他方は再配列されていない遺伝子セグメントを含む。好ましい態様では、再配列されたトランスジーンが軽鎖免疫グロブリントランスジーンであり、再配列されていないトランスジーンが重鎖免疫グロブリントランスジーンである。

40

抗体の構造および産生

全ての免疫グロブリンの基本構造は、2つの軽鎖ポリペプチドと2つの重鎖ポリペプチドとから成る単位に基づく。各軽鎖は、可変軽鎖領域および定常軽鎖領

【数 2 9】

(30)

域として知られる 2 つの領域を含んで成る。同様に、免疫グロブリン重鎖は、可変重鎖領域および定常重鎖領域と呼ばれる 2 つの領域を含んで成る。

重鎖または軽鎖の定常領域は、重鎖または軽鎖定常領域遺伝子 (C_H) セグメントと呼ばれるゲノム配列によりコードされる。特定の重鎖遺伝子セグメントの使用が免疫グロブリンのクラスを限定する。例えば、ヒトでは、 μ 定常領域遺伝

10

子セグメントが抗体の IgM クラスを限定し、一方で γ , γ_2 , γ_3 または γ_4 定常領域遺伝子セグメントが抗体の IgG クラス並びに IgG のサブクラス IgG₁ ~ IgG₄ を限定する。同様に、 α_1 または α_2 定常領域遺伝子セグメントの使用が抗体の IgA クラス並びに IgA₁ および IgA₂ サブクラスを限定する。 δ および ε 定常領域遺伝子セグメントがそれぞれ IgD および IgE 抗体クラスを限定する。

20

重鎖および軽鎖免疫グロブリンの可変領域は、一緒になって抗体の抗原結合領域を含む。広範囲の抗原を結合できるようにするために抗体のこの領域に多様性が必要なため、初期または一次レパートリー可変領域をコードする DNA は、特定の可変領域遺伝子セグメントのファミリーに由来する多数の異なる DNA セグメントを含んで成る。軽鎖可変領域の場合、そのようなファミリーは可変 (V) 遺伝子セグメントと連結 (J) 遺伝子セグメントを含んで成る。よって、軽鎖の初期可変領域は 1 つの V 遺伝子セグメントと 1 つの J 遺伝子セグメントによってコードされ、各セグメントはその生物のゲノム DNA 中に含まれる V および J 遺伝子セグメントのファミリーから選ばれる。重鎖可変領域の場合、重鎖の初期または一次レパートリー可変領域をコードする DNA は、1 つの重鎖 V 遺伝子セグメント、1 つの重鎖多様性 (D) 遺伝子セグメントおよび 1 つの J 遺伝子セグメントを含んで成り、各セグメントはゲノム DNA 中の適当な免疫グロブリン遺伝子セグメントの V, D および J ファミリーから選ばれる。

30

40

抗体結合部位の形成に貢献する配列の多様性を増加させるために、重鎖トランスジーンが再配列された V-D-J 遺伝子配列中に D 領域の全部または部分を組み込むことができる機能的 V-D-J 再配列を支持するシス作用性配列を含むことが好ましい。典型的には、発現されたトランスジーンによってコードされる重鎖 (または mRNA) の少なくとも約 1 % が V 領域中に認識可能な D 領域配列を含有

【数 3 0】

(31)

する。好ましくは、トランスジーンによってコードされるV領域の少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約30%、最も好ましくは50%が認識可能なD領域配列を含有する。

認識可能なD領域配列は一般に、重鎖トランスジーンのD領域遺伝子セグメント中に存在する配列に相当する少なくとも約8個の連続するヌクレオチドおよび／またはそのようなD領域ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。例えば、トランスジーンがD領域遺伝子DHQ52を含むならば、V遺伝子セグメント配列とJ遺伝子セグメント配列の間のV領域中に配列5'-TAACTGGG-3'を含有するトランスジーンによってコードされるmRNAは、D領域配列、特にDHQ52配列を含むものとして認識可能である。同様に、例えば、トランスジーンがD領域遺伝子DHQ52を含むならば、V遺伝子セグメントアミノ酸配列とJ遺伝子セグメントアミノ酸配列の間のV領域中に置かれたアミノ酸配列-DAF-を含有するトランスジーンによってコードされる重鎖ポリペプチドは、D領域配列、特にDHQ52配列を含むものとして認識可能である。

しかしながら、D領域セグメントをさまざまな程度までのさまざまな読み取り枠内でのVDJジョイニング内に取り込むことができることから、特定のDセグメントの取込みを見極めるには、トランスジーン内に存在するD領域セグメントに対する重鎖可変領域のD領域部域の比較が必要である。その上、組換え中の潜在的エキソヌクレアーゼ消化は、V-D-J組換え中の不精確なV-D及びD-J連結を漂く可能性がある。

しかしながら、体細胞突然変異またはN領域付加のために、幾つかのD領域は、認識可能であるが連続するD領域配列と全く同一には一致しないことがある。例えば、ヌクレオチド配列 5'-CTAAXTGGGG-3'（ここでXはA、TまたはGであり、該配列は重鎖V領域中にあり、V領域遺伝子配列とJ領域遺伝子配列によって隣接されている）は、DH52配列 5'-CTAACTGGG-3'に相当すると認識され得る。同様に、例えば、V領域中にありそしてアミノ末端側でトランスジーンV遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列により隣接されそしてカルボキシル末端側でトランスジーンJ遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列により

10

20

30

40

【数 3 1】

(32)

隣接されているポリペプチド配列 -DAFDI-, -DYFDY- または -GAFDI-は、D領域配列として認識され得る。

従って、体細胞突然変異やN領域付加はトランスジーンD領域に由来する配列中に変異をもたらし得るので、認識可能なD領域配列の存在を決定するための指標として次の定義が与えられる。アミノ酸配列またはヌクレオチド配列は次のような場合にD領域として認識可能である：（１）該配列がV領域中に存在し、一方の側がV遺伝子配列（ヌクレオチド配列または推定アミノ酸配列）により隣接されており、そして他方の側がJ遺伝子配列（ヌクレオチド配列または推定アミノ酸配列）により隣接されており、且つ（２）該配列が既知のD遺伝子配列（ヌクレオチド配列または推定アミノ酸配列）と実質的に同じであるかまたは実質的に相同である場合。

10

20

ここで使用する用語「実質的な同一」は、ポリペプチド配列が参照配列に比較して少なくとも50%の配列一致、しばしば少なくとも約80%の配列一致および、時には約90%より多い配列一致を有し、核酸配列が参照配列に比較して少なくとも70%の配列一致を有する、

ポリペプチド配列またはヌクレオチド配列の特徴を

表す。配列一致の%は、参照配列の合計35%未満である小さな欠失または付加を除いて計算される。参照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば完全なD遺伝子であってもよい；しかしながら、参照配列はポリヌクレオチドの場合長さが少なくとも8ヌクレオチドであり、ポリペプチドの場合長さが少なくとも3アミノ酸残基である。典型的には、参照配列は少なくとも8～12ヌクレオチドまたは少なくとも3～4アミノ酸であり、好ましくは12～15ヌクレオチドもしくはそれ以上または少なくとも5アミノ酸である。

30

40

ここで使用する用語「実質的な相同」は、ポリペプチド配列が参照配列に対して少なくとも80%の相同性を有する、ポリペプチド配列の性質を表す。配列相同性の%は、同一アミノ酸または位置保存性アミノ酸置換を相同であるとして数えることにより算出される。位置保存性アミノ酸置換は、単一ヌクレオチド置換から生じ得るものである。単一ヌクレオチド置換により最初のアミノ酸のコドンと

【数 3 2】

(33)

二番目のアミノ酸のコドンが異なり得る場合、最初のアミノ酸が二番目のアミノ

酸と置き換えられる。例えば、配列-Lys-Glu-Arg-Val-は配列-Asn-Asp-Ser-Val-と実質的に相同である。何故なら、コドン配列-AAA-GAA-AGA-GUU-は、わずか3つの置換変異（2つの元のコドンのうちの3つに単一ヌクレオチド置換）を導入することによって-AAC-GAC-AGC-GUU-に変異せしめることができるからである。

10

参照配列はより大きな配列のサブセット、例えば完全なD遺伝子であってもよい；しかしながら、参照配列は長さが少なくとも4アミノ酸残基である。典型的には参照配列は少なくとも5アミノ酸であり、好ましくは6アミノ酸またはそれ以上である。

一次レパートリー

20

重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子をコードするDNAを作製する方法は、主としてB細胞を発達させることに存する。種々の免疫グロブリン遺伝子セグメントの結合前、V、D、Jおよび定常（C）遺伝子セグメントは、大部分、一次レパートリーB細胞の前駆体中にV、D、JおよびC遺伝子セグメントのクラスターとして見つかる。通常、重鎖または軽鎖の遺伝子セグメントの全てが単一の染色体上に比較的近くに密接して置かれている。様々な免疫グロブリン遺伝子セグメントの組換え前のそのようなゲノムDNAは、本明細書中「再配列されていない」ゲノムDNAと呼称される。B細胞分化の間に、V、D、J（または軽鎖遺伝子の場合はVとJのみ）の適当なファミリーメンバーのいずれか1つの遺伝子セグメントが組み換えられて機能的に再配列された重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を形成する。

30

そのような機能的再配列は、機能的な可変領域をコードするDNAを形成する可変領域セグメントの再配列である。この遺伝子セグメント再配列過程は連続的であると思われる。最初に、重鎖D-J接合が作られ、次いで重鎖V-D-J接合と軽鎖V-J接合が作られる。軽鎖および／または重鎖中の機能的可変領域のこの初期形態をコードするDNAへは、「機能的に再配列されたDNA」または「再配列されたDNA」と呼ばれる。重鎖の場合、そのようなDNAは「再配列された重鎖DNA」と呼ばれ、そして軽鎖の場合、そのようなDNAは「再配列さ

40

【数 3 3】

(34)

れた軽鎖DNA」と呼ばれる。本発明のトランスジーンの機能的再配列を記述する

ためにも同様な用語が使われる。

機能的な重鎖および軽鎖可変領域を形成するための可変領域遺伝子セグメントの組換えは、組換え応答能のあるV、DおよびJセグメントに隣接する組換えシグナル配列(RSS)により媒介される。組換えを指令するのに必要且つ十分なRSSは、二分子対称ヘプタマー、高ATノナマー、および12塩基対または23塩基対のいずれかの中断スペーサー領域を含んで成る。それらのシグナルは、D-J (またはV-J) 組換えを行いそして機能的に相互交換可能である異なる遺伝子座および種の間で保存されている。Oettingerら(1990), Science, 248, 1517-1523およびその中に引用された参考文献を参照のこと。

配列CACAGTGまたはその類似体を含んで成るヘプタマーの後に非保存性配列のスペーサー、次いで配列ACAAAAACCまたはその類似体を有するノナマーが存在する。それらの配列は、各VおよびD遺伝子セグメントのJ側、即ち下流側上に見つかる。生殖細胞型および遺伝子セグメントの直前に、再び2つの組換えシグナル配列があり、最初にノナマーそして非保存性配列により隔てられて次にヘプタマーがある。V_L、V_HまたはDセグメントの後ろのヘプタマーおよびノナマー配列は、それらが組み換わるJ_L、DまたはJ_Hセグメントの前方のものと相補的である。ヘプタマーとノナマー配列との間のスペーサーは12塩基対の長さかまたは22~24塩基対の長さかのいずれかである。

V、DおよびJセグメントの再配列に加えて、軽鎖のVセグメントとJセグメントとの間および重鎖のDセグメントとJセグメントとの間の可変的組換えによって、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一次レパートリーにおいて更なる多様性が生まれる。そのような様々な組換えは、そのようなセグメントが結合する正確な場所の変位(ずれ)によって生成される。軽鎖におけるそのようなずれは、典型的にはV遺伝子セグメントの最後のコドンの内部およびJセグメントの最初のコドンの内部に起こる。同様な結合のずれは、重鎖染色体上ではDセグメントとJ_Hセグメントとの間に起こり、10ヌクレオチドほどの多数に及ぶことがある。

10

20

30

40

【数 3 4】

(35)

更に、DセグメントとJ_Hセグメントとの間およびV_HセグメントとDセグメントとの間に、ゲノムDNAによりコードされない幾つかのヌクレオチドが挿入されることがある。それらのヌクレオチドの付加はN領域多様性として知られている。

V J および／またはV D J 再配列の後、再配列された可変領域遺伝子セグメントおよび再配列された可変領域の下流に置かれた1または複数の定常領域遺伝子セグメントの転写は、一次RNA転写物を生成し、これが適当なRNAスプライシングを受けると、全長の重鎖または軽鎖免疫グロブリンをコードするmRNAを生じる。そのような重鎖および軽鎖は、B細胞の経膜領域中への免疫グロブリンの挿入および／またはB細胞からの分泌を行うリーダー配列を含む。このシグナル配列をコードするDNAは、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変領域を形成するのに使うVセグメントの第一エクソンの内部に含まれる。コードされる免疫グロブリン重鎖および軽鎖ポリペプチド（これは互いとの適切な会合によって抗体分子を形成する）を生成するmRNAの翻訳を調節するためにmRNA中に適当な調節配列も存在する。

可変領域遺伝子セグメント中のそのような再配列およびそのような連結中に起こり得る可変的組換えの最終結果は、一次抗体レパートリーの生成である。一般に、この段階まで分化された各B細胞は、単一の一次レパートリー抗体を産生する。この分化過程の間に、機能的に再配列されたIg遺伝子内に含まれるもの以外の遺伝子セグメントの機能的再配列を抑制する細胞現象が起こる。二倍体B細胞がそのような単一特異性を維持する過程は、対立遺伝子排除と呼ばれる。

二次レパートリー

一次レパートリーを含んで成る配列の組の中からの免疫グロブリンを発現するB細胞クローンは、外来抗原に応答させるのにすぐに利用できる。単純なV J およびV D J 結合により生じる限定された多様性のため、いわゆる一次応答によって産生される抗体は比較的低い親和性のものである。2つの異なる型のB細胞が

この初期応答を作成する：一次抗体形成細胞の前駆体および二次レパートリーB細胞の前駆体 [Lintonら、Cell, 59:1049-1059 (1989)]。最初の型のB細胞は或

【数 3 5】

(36)

る種の抗原に応答してIgM 分泌性形質細胞に成熟する。他方のB細胞は、T細胞依存性成熟過程に入ることにより、抗原への初期暴露に応答する。

抗原により感作されたB細胞クローンのT細胞依存性成熟の間に、細胞表面上の抗体分子の構造が2つの経路で変化する。第一は、定常領域が非IgMサブタイプにスイッチし、そして可変領域の配列が多数の単一アミノ酸置換により変更されて一層高い親和性の抗体分子を生成することができる。

10

前に指摘したように、Ig重鎖または軽鎖の各可変領域は、抗原結合領域を含む。二次応答の間の体細胞突然変異は、アミノ酸および核酸配列決定により、3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3；これは超可変領域1、2または3とも呼ばれる）を含むV領域の至るところで起こることが決定されている〔Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991) U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC；これは参考として本明細書中に組み込まれる〕。CDR1とCDR2は可変遺伝子セグメント内部に位置し、一方CDR3は大部分がV遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントの間またはV、DおよびJ遺伝子セグメントの間の組換えの結果である。

20

CDR1、2 または3 を構成しない可変領域の部分は、一般に、FR1、FR2、FR3 およびFR4 と名付けられたフレームワーク領域と呼ばれる。図1を参照のこと。高度突然変異の間に、再配列されたDNAが変異されて異なるIg分子を有する新しいクローンを生じる。外来抗原に対して一層高い親和性を有するそれらのクローンがヘルパーT細胞によって選択的に増大されて、発現抗体の親和力成熟を引き起こす。クローン選択は、典型的にはCDR1、CDR2および／またはCDR3領域中に新規変異を含むクローンの発現をもたらす。しかしながら、抗原結合領域の特異性および親和性に影響を及ぼすようなそれらの領域の外側の変異も起こる。

30

異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物

40

本発明の1観点では、トランスジェニック非ヒト動物は、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリントランスジーン（後述）を非ヒト動物の接合子または初期胚中に導入することにより製造される。本発明に有用である非ヒト動物は、一般に、免疫グロブリン遺伝子セグメントを再配列して一次抗体応答を生ぜしめるこ

【数 3 6】

(37)

とができる任意の哺乳類を包含する。そのような非ヒトトランスジェニック動物としては、例えば、トランスジェニックブタ、トランスジェニックラット、トランスジェニックウサギ、トランスジェニックウシ、および当業界で既知である他のトランスジェニック動物種、特に哺乳動物種が挙げられる。特に好ましい非ヒト動物はマウスまたは齧歯類の他のメンバーである。

10

しかしながら、本発明はマウスの使用に限定されない。むしろ、一次および二次抗体応答を開始することができる任意の非ヒト哺乳動物を使うことができる。そのような動物としては、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー、ウシ、ヒツジおよびブタの種、齧歯科の他のメンバー、例えばラット、並びにウサギおよびモルモットが挙げられる。特に好ましい動物はマウス、ラット、ウサギおよびモルモットであり、最も好ましくはマウスである。

20

本発明の一態様では、ヒトゲノム由来の様々な遺伝子セグメントが再配列されていない形で重鎖および軽鎖トランスジーンに使われる。この態様では、そのようなトランスジーンがマウスに導入される。軽鎖および／または重鎖トランスジーンの再配列されていない遺伝子セグメントは、マウスゲノム中の円因性免疫グロブリン遺伝子セグメントと識別可能である、ヒト種に固有のDNA配列を有する。それらは生殖細胞やB細胞から成らない体細胞では再配列されていない形態でそしてB細胞では再配列された形態で容易に検出することができる。

30

本発明の別の態様では、トランスジーンは、再配列された重鎖および／または軽鎖免疫グロブリントランスジーンを含んで成る。そのようなトランスジーンの機能的に再配列されたVDJまたはVJセグメントに相当する特定セグメントは、マウス中の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントから明らかに識別可能であ

る免疫グロブリンDNA配列を含む。

40

そういったDNA配列の相違は、マウスB細胞によりコードされるアミノ酸配列に比較するとそのようなヒト免疫グロブリントランスジーンによりコードされるアミノ酸配列にも反映される。よって、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされる免疫グロブリンエピトープに特異的な抗体を使って、本発明のトランスジェニック非ヒト動物において、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を

【数 3 7】

(38)

検出することができる。

ヒトまたは他の種由来の再配列されていないトランスジーンを含有するトランスジェニックB細胞は、適当な遺伝子セグメントを機能的に組換えると、機能的に再配列された軽鎖および重鎖可変領域を形成する。そのような再配列されたトランスジーンによりコードされる抗体は、本発明を実施するのに用いる非ヒト動物中で通常遭遇するものとは異種であるDNAおよび／またはアミノ酸配列を有することは容易に明らかであろう。

10

再配列されていないトランスジーン

本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン重鎖トランスジーン」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。前記重鎖トランスジーン各遺伝子セグメントは、前記トランスジーンが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。

20

同様に、本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン軽鎖トランスジーン」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。ここで、前記軽鎖トランスジーン各遺伝子セグメントは、

30

前記軽鎖トランスジーンが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。

本発明のこの観点でのそのような重鎖および軽鎖トランスジーンは、再配列されていない形態で上述の遺伝子セグメントを含有する。即ち、重鎖トランスジーン中のV、DおよびJセグメントの間および軽鎖トランスジーン中のVとJセグメントの間には、適当な組換えシグナル配列(RSS)が置かれる。加えて、そのようなトランスジーンは、定常領域遺伝子セグメントをVJまたはVDJ再配列された可変領域と結合するための適当なRNAスプライシングシグナルも含む

40

【数 3 8】

(39)

。

複数のC領域遺伝子セグメント、例えばヒトゲノムからのC μ およびC γ 1を含む重鎖トランスジーン内でのイソタイプスイッチを促進するために、各定常領域遺伝子セグメントの上流で且つ可変領域遺伝子セグメントの下流に、免疫グロブリンクラススイッチ、例えばIgMからIgGへのクラススイッチを考慮した前記定常領域間の組換えを可能にするため、下記に説明するような「スイッチ」領域が組み込まれる。そのような重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジーンは、可変領域遺伝子セグメントの上流に置かれたプロモーター領域を含む転写調節配列（典型的にはTATAモチーフを含む）も含有する。

10

プロモーター領域は、下流配列に作用可能に連結されると該下流配列の転写を指令することができるDNA配列として大体定義することができる。プロモーターは、効率的転写を指令するために連結された追加のシス作用性配列の存在を必要とすることがある。更に好ましくは、繁殖不能性転写物の転写に関する他の配列が含まれる。繁殖不能性転写物の発現に関する配列の例は、Rothman ら、Intl. Immunol. 2: 621-627 (1990) ; Reidら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 840-844 (1989) ; Stavnezer ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7704-7708 (1988) および Millsら、

20

30

Nucl. Acids Res. 18:7305-7316 (1991)（この各々は参考として本明細書中に組み込まれる）を包含する、発表文献中に見つけることができる。

それらの配列は、典型的にはスイッチ領域のすぐ上流の少なくとも約50 bp、好ましくはスイッチ領域の上流の少なくとも約200 bp、より好ましくはスイッチ領域の少なくとも約200~1000 bp またはそれ以上を含む。適当な配列はヒトS γ 1, S γ 2, S γ 3, S γ 4, S α 1, S α 2 およびS ϵ スイッチ領域のすぐ上流に存在するが、ヒトS γ 1 およびS γ 3 スwitch領域のすぐ上流の配列が好ましい。それに代えて、又はそれと組合わせて、ネズミIgスイッチ配列を用いることができる。トランスジェニック非ヒト動物と同じ種のIgスイッチ配列を用いるのが、しばしば有利である。特に、インターフェロン（IFN）誘導性転写調節要素、例えばIFN誘導性エンハンサーがトランスジーンスイッチ配列のすぐ上流

40

【数 3 9】

(40)

に含まれるのが好ましい。

プロモーターに加えて、主にB系列細胞中で機能する他の調節配列が使われる。例えば、軽鎖トランスジーン上の好ましくはJセグメントと定常領域遺伝子セグメントとの間に置かれた軽鎖エンハンサー配列は、トランスジーンが発現を増強し、それによって対立遺伝子排除を促進するために使われる。重鎖トランスジーンの場合、調節エンハンサーも使われる。そのような調節配列は、トランスジーンの転写および翻訳を最大にし、その結果対立遺伝子排除を誘導しそして比較的高いレベルのトランスジーン発現を提供するために用いられる。

10

上述のプロモーターおよびエンハンサー調節配列は包括的に記載されているけれども、そのような調節配列は非ヒト動物に対して異種であることができ、異種トランスジーン免疫グロブリン遺伝子セグメントが得られるゲノムDNAから誘導することができる。あるいは、そのような調節遺伝子セグメントは、重鎖および軽鎖トランスジーンを含む、非ヒト動物または密接に関連した種のゲノム中の対応する調節配列から誘導される。

20

好ましい態様では、遺伝子セグメントはヒトから誘導される。そのような重鎖および軽鎖トランスジーンを含有するトランスジェニック非ヒト動物は、そのような動物に投与される特異抗原に対してIg介在型免疫応答を開始することができる。そのような動物中では異種ヒト抗体を産生することのできるB細胞が産生される。不死化後、および適当なモノクローナル抗体(Mab)、例えばハイブリドーマの選択後、治療用ヒトモノクローナル抗体の源が提供される。そういったヒトMabは、ヒトに療法的に投与した時に実質的に減少された免疫原性を有する。

30

好ましい態様はヒト遺伝子セグメントを含む重鎖および軽鎖トランスジーンで作製を開示するけれども、本発明はそれに限定されない。この点に関しては、本明細書中に記載される教示は、ヒト以外の種からの免疫グロブリン遺伝子セグメントの使用に合わせて容易に改変できると理解すべきである。例えば、本発明の抗体によるヒトの療法的処置に加えて、適切な遺伝子セグメントによりコードされた療法的抗体を用いて獣医科学において使用するためのモノクローナル抗体を生成せしめることができる。

40

【数 4 0】

(41)

再配列されたトランスジーン

別の態様では、トランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニック動物の生殖細胞中に機能的に少なくとも1つの再配列された異種重鎖免疫グロブリントランスジーンを含有する。そのような動物は上述のような再配列された重鎖トランスジーンを発現する一次レパトリーB細胞を含有する。そのようなB細胞は、好ましくは、抗原と接触すると体細胞突然変異を受け、該抗原に対して高い親和性を特異性を有する異種抗体を形成することができる。前記再配列されたトランスジーンは、少なくとも2つのC_H遺伝子とイソタイプスイッチに必要な関連配列を含むだろう。

10

本発明はまた、重鎖および軽鎖トランスジーンを有する生殖細胞を含み、前記トランスジーンのうち的一方が再配列された遺伝子セグメントを含み、他方が再配列されていない遺伝子セグメントを含む、トランスジェニック動物にも関する

20

。そのような動物では、重鎖トランスジーンが少なくとも2つのC_H遺伝子とイソタイプスイッチに必要な関連配列を有するだろう。

本発明は更に、本発明のトランスジーンにおいて使うことができる合成可変領域遺伝子セグメントレパトリーを作製する方法にも関する。該方法は、免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を作製することを含んで成る。ここで前記VセグメントDNAの各々は免疫グロブリンVセグメントをコードし、そして各末端に制限エンドヌクレアーゼの開裂認識部位を含む。免疫グロブリンVセグメントDNAの前記集団は、その後、鎖状に連結されて合成免疫グロブリンVセグメントレパトリーを形成する。そのような合成可変領域重鎖トランスジーンは、少なくとも2つのC_H遺伝子とイソタイプスイッチに必要な関連配列を有するだろう。

30

40

イソタイプスイッチ

Bリンパ球の発達過程において、該細胞は、生産的に再配列されたV_HおよびV_L領域によって決定される結合特異性を有するIgMを最初に産生する。続いて、各B細胞とその子孫の細胞が同じLおよびH鎖V領域を有する抗体を合成するが、それらはH鎖のイソタイプをスイッチすることができる。

【数 4 1】

(42)

μ または δ 定常領域の使用は、大部分は、IgM および IgD を単一細胞中で同時発現できるようにする、交互スプライシングによって決定される。その他の重鎖イソタイプ (γ , α および ε) は、遺伝子再配列現象が C μ および C δ エクソンを欠失させた後で本質的にのみ発現される。この遺伝子再配列過程はイソタイプスイッチと呼ばれ、典型的には各重鎖遺伝子 (δ を除く) のすぐ上流に置かれたいわゆるスイッチセグメントの間での組換えによって起こる。

10

個々のスイッチセグメントは長さが 2~10 kb であり、主として短い反復配列から成る。組換えの正確な位置は個々のクラススイッチ現象ごとに異なる。cDNA 由来の C_H プローブを用いるサザンブロット法または溶液ハイブリダイゼーショ

ン速度論を使った実験は、スイッチが細胞からの C_H 配列の消失に関係し得ることを確証した。

20

μ 遺伝子のスイッチ (S) 領域、S μ は、コード配列の約 1~2 kb 5' 側に位置し、そして (GAGCT)_n (GGGGT) の形の配列の多数の縦列反復から成る。ここで n は通常 2~5 であるが、17 ほどの大きさに及ぶことができる。[T. Nikaido ら、Nature, 292: 845-848(1981)を参照のこと。] 他の C_H 遺伝子の 5' にも、数千塩基対に及ぶ同様な内部反復性スイッチ配列が見つかった。S α 領域は配列決定されており、縦列に反復した 80 bp の相同性単位から成ることが判明した。一方、S_{2a}, S_{2b} および S₃ は全て、互いに非常に類似している反復した 49 bp の相同性単位を含む [P. Szurek ら、J. Immunol., 135: 620-626 (1985) および T. Nikaido ら、J. Biol. Chem., 257: 7322-7329 (1982) を参照のこと；これらは参考として本明細書中に組み込まれる]。全ての配列決定された S 領域は、S μ 遺伝子の基本的反復配列であるペンタマー GAGCT および GGGGT の多数の存在を含む [T. Nikaido ら、J. Biol. Chem., 257: 7322-7329 (1982)；これは参考として本明細書中に組み込まれる]；他の S 領域では、それらのペンタマーは S μ のようには正確に縦列に反復されていないが代わりに大きな反復単位中に埋もれている。S γ_1 領域は追加の高次構造を有し、即ち、2つの直接反復配列が 49 bp の縦列反復の 2つのクラスターの各々に隣接する [M.R. Mowatt ら、J. Immunol., 136: 2674-2683 (1986) を参照のこと；これは引用して本明細書中

30

40

【数 4 2】

(43)

に組み込まれる〕。

ヒトH鎖遺伝子のスイッチ領域はそれらのマウス同族体に非常に類似していることがわかっている。実際、C_H遺伝子の5'側のヒトクローンとマウスクローンの間の類似性はS領域に限られることがわかっており、これは、それらの領域の生物学的重要性を確証する事実である。

10

μ 遺伝子と α 遺伝子の間のスイッチ組換えは複合 S μ - S α 配列をもたらす。典型的には、組換えが常に起こるような特異部位は S μ 領域中にも他の S 領域中にも存在しない。

一般に、V-J 組換えの酵素的機構とは異なり、スイッチ機構は、明らかに生殖細胞 S 前駆体の反復相同領域の種々の整列を適応させることができ、次いで該配列を異なる位置で一直線上に連結することができる。〔T.H. Rabbitts ら、Nucleic Acids Res. 9: 4509-4524 (1981) および J. Ravetch ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6734-6738 (1980) を参照のこと；これらは参考として本明細書中に組み込まれる。〕

20

特定のイソタイプへのスイッチを選択的に活性化する機構の詳細は未知である。リンホカインやサイトカインのような外因性影響物質はイソタイプ特異的レコンビナーゼを増加調節するかもしれないが、この酵素機構はあらゆるイソタイプへのスイッチを触媒し、そして特異性がこの酵素機構の標的を特定のスイッチ領域に向けることにある可能性もある。

30

T 細胞由来のリンホカイン IL-4 および IFN γ は、幾つかのイソタイプの発現を特異的に促進することが証明されている。IL-4 は IgM, IgG 2a, IgG 2b および IgG 3 発現を減少させ、IgE および IgG 1 発現を増加させる；IFN γ は IgG 2a 発現を選択的に刺激し拮抗する一方、IgE と IgG 1 発現の増加を誘導する〔Coffman ら、J. Immunol. 136: 949-954 (1986) および Snapper ら、Science 236: 944-947 (1987)；これらは参考として本明細書中に組み込まれる〕。

40

スイッチに関する T 細胞作用に関係する実験のほとんどは、特定のスイッチ組換えを有する細胞において観察される増加が事前スイッチされた細胞または事前傾倒された細胞の選択を反映し得る可能性を無視することができなかった。しか

【数 4 3】

(44)

し、最もありそうな説明はリンホカインが実際にスイッチ組換えを促進するというものである。

クラススイッチの誘導は、スイッチセグメントの上流で始まる繁殖不能転写物 (stelite transcript) に関係があるらしい [Lutzkerら、Mol. Cell Biol. 8:1849 (1988) ; Stavnezer ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7704 (1988) : E

10

sserおよびRadbruch, EMBO J. 8: 483 (1989) ; Bertonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2829 (1989) ; Rothmanら、Int. Immunol. 2:621 (1990) ; これらの各々は参考として本明細書中に組み込まれる]。例えば、観察される IL-4 による γ 1 繁殖不能転写物の誘導および IFN γ による阻害は、IL-4 が B 細胞中での γ 1 へのクラススイッチを促進し、IFN γ が γ 1 発現を阻害するという観察結果と一致する。従って、繁殖不能転写物の転写に影響を及ぼす調節配列の包含は、イソタイプスイッチの速度にも影響を及ぼし得る。例えば、特定の繁殖不能転写物の転写を増加せしめることが、典型的には近隣のスイッチ配列を伴うイソタイプスイッチ組換えの頻度を増加させると期待できる。

20

それらの理由により、トランスジーンがイソタイプに使用する予定の各スイッチ領域の約 1~2 kb 上流以内に転写調節配列を含むことが望ましい。それらの転写調節配列は、好ましくはプロモーターとエンハンサー要素を含み、より好ましくはスイッチ領域と生来関連している (即ち生殖細胞配置で存在する) 5' 隣接 (即ち上流) 領域を含む。この 5' 隣接領域は、典型的には長さが少なくとも 50 ヌクレオチド、好ましくは長さが少なくとも約 200 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 500~1000 ヌクレオチドである。

30

1 つのスイッチ領域からの 5' 隣接配列をトランスジーン構成物用の別のスイッチ領域に作用可能に連結させることができる (例えば、ヒト S γ 1 スwitch からの 5' 隣接配列を S α 1 スwitch のすぐ上流に融合させることができ ; ネズミ S γ 1 フランキング領域をヒト γ 1 スwitch 配列の隣りに移植することができ ; あるいはネズミ S γ 1 スwitch をヒト γ 1 コード領域に移植することができる) けれども、或る態様では、トランスジーン構成物中に含まれる各スイッチ領域が、天然に存在する生殖細胞配置においてすぐ上流に存在する 5' 隣接配列を有す

40

【数 4 4】

(45)

ることが好ましい。

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、当業者にとっては周知のさまざまな技術によって得る

ことができる。簡単に言うと、望ましい抗原で免疫化された動物からの脾細胞を、一般には骨髓腫細胞との融合によって不死化させる。(Kchle及びMilstein, Eur. J. Immunol., 6 ; 511-519 (1976) を参照のこと)。不死化の代替的方法としては、エプスタインバーウイルス、オンコ遺伝子又はレトロウイルスでの形質転換、又はその他の当該技術分野において周知の方法が含まれる。

10

単一的不死化された細胞から発生したコロニーは、抗原に対する望ましい特異性及び親和力を有する抗体の産生についてスクリーニングされ、かかる細胞により産生されるモノクローナル抗体の収量は、脊椎動物宿主の腹腔内への注入を含むさまざまな技術によって増強できる。免疫グロブリンを産生するための動物の免疫化、モノクローナル抗体の産生；プローブとしての使用を目的とした免疫グロブリンの標識付け、イムノアフィニティ精製及び免疫学的検定法を含め、これらの技術分野で有効なさまざまな技法が、例えば、Harlow及びLane、抗体：その研究室マニュアル、Cold Spring Habor, New York (1988) の中で論述されている。

20

30

トランスジェニック一次レパートリー

A. ヒト免疫グロブリン遺伝子座

トランスジーン機能のための重要な必要条件は、広範囲の抗原に対して二次免疫応答を開始させるのに十分な程度に多様である一次抗体レパートリーの作製である。再配列された重鎖遺伝子は、シグナルペプチドエクソン、可変領域エクソン、および各々が数個のエクソンによりコードされる多ドメイン定常領域の縦列整列領域から成る。定常領域遺伝子の各々は異なる免疫グロブリンクラスの定常部分をコードする。B細胞発達の間に、定常領域に近いV領域が欠失されて新規重鎖クラスの発現をもたらす。各重鎖クラスについては、RNAスプライシングの別パターンが経膜型と分泌型の両方の免疫グロブリンをもたらす。

40

ヒト重鎖遺伝子座は、2 Mbにわたる約200 個のV遺伝子セグメント（今回のデ

【数 4 5】

(46)

ーターは約50—100 V 遺伝子セグメントの存在を支持している。) 、約40 kb にわたる約30個のD 遺伝子セグメント、3 kbの範囲内に密集した6個のJ セグメント、および約300 kbにわたる9個の定常領域遺伝子セグメントから成ると予想される。全遺伝子座は、染色体14の長い方の腕の遠位部分約2.5 Mbに及ぶ (図4) 。

10

B. 遺伝子断片トランスジーン

1. 重鎖トランスジーン

好ましい態様では、免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンは、ヒト由来の再配列されていないゲノムDNAを含んで成る。重鎖の場合、好ましいトランスジーンは670 ~830 kbの長さを有するNotI断片を含んで成る。この断片の長さは、3' 制限部位が実際にマッピングされていないため、不明瞭である。しかしながら、 $\alpha 1$ と $\psi \alpha$ 遺伝子セグメントとの間にあることが知られている。この断片は、6つの既知V_H ファミリーの全部のメンバー、DおよびJ 遺伝子セグメント、並びに μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$ および $\alpha 1$ 定常領域を含む。Bermanら、EMBOJ. 7:727-738(1988)。このトランスジーンを含有するトランスジェニックマウス系は、B細胞の発達に必要なとされる重鎖クラス (IgM) を正しく発現し、そしてほとんどの抗原に対して二次応答を開始せしめるのに十分な程多数のレパートリーと共に、少なくとも1つのスイッチされた重鎖クラス (IgG₁) を発現する。

20

30

2. 軽鎖トランスジーン

ヒト軽鎖遺伝子座からの必要な遺伝子セグメントおよび調節配列を全て含有するゲノム断片を同様に作製することができる。そのような構成物は本実施例中に記載のようにして作製される。

C. 生体内組換えにより細胞内的に作製されるトランスジーン

40

単一DNA断片上の重鎖遺伝子座の全部または一部分を単離する必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座からの670-830 kb Not I 断片は、トランスジーン形成(transgenesis)の間に非ヒト動物の生体内で形成させることができる。

【数 4 6】

(47)

きる。そのような生体内トランスジーン作製は、2以上の重複するDNA断片を非ヒト動物の胎児性核に導入することにより行われる。DNA断片の重複部分は、実質的に相同であるDNA配列を有する。胎児性核内に含まれるレコンビナーゼに暴露されると、重複しているDNA断片が適切な方向において相同的に組み換わって670-830 kbの NotI重鎖断片を形成する。

10

生体内トランスジーン作製は、そのサイズのために現存の技術による作製または操作が困難であるかまたは不可能である多数の免疫グロブリントランスジーンを形成せしめるのに使うことができると理解すべきである。例えば、生体内トランスジーン作製は、YACベクター [MurrayおよびSzostak, *Nature* 305:189-192 (1983)] により操作することができるDNA断片よりも大きい免疫グロブリントランスジーンを作製するのに有用である。そのような生体内トランスジーン作製は、トランスジェニック非ヒト動物から成らない種の実質的に完全な免疫グロブリン遺伝子座を非ヒト動物中に導入する場合にも使うことができる。

20

ゲノム免疫グロブリントランスジーンを形成させることに加えて、実施例に記載の如く「小遺伝子座」トランスジーンを形成させるのにも生体内相同組換えを使うことができる。

生体内トランスジーン作製・を利用する好ましい態様では、各々の重複するDNA断片は、好ましくは第一のDNA断片の末端部分と第二のDNA断片の末端部分の間で重複する実質的に相同なDNA配列を有する。DNA断片のそのような重複部分は、好ましくは約500 bp-約2000 bp、最も好ましくは1.0 kb~2.0 kbを含む。生体内でトランスジーンを形成させるための重複DNA断片の相同組換えは、1992年3月19日に公開された「哺乳類細胞における相同性組換え (Homologous Recombination in Mammalian Cells)と称するPCT 公開WO 92/03917 に更に詳しく記載されている。

30

40

D. 小遺伝子座トランスジーン

本明細1書中で使用する時、「免疫グロブリン小遺伝子座」なる用語は、通常は

約150 kb未満、典型的には約25~100 kbのDNA配列であって、前記DNA配列

【数 4 7】

(48)

が少なくとも1つの実質的不連続性（例えば、相同ゲノムDNA配列に関して、通常は少なくとも約2～5 kb、好ましくは10～25 kbまたはそれ以上の欠失）を有するような、次のものを各々少なくとも1つ含むDNA配列を言う：機能的可変（V）遺伝子セグメント、機能的連結（J）領域セグメント、少なくとも1つの機能的定常（C）領域遺伝子セグメント、および重鎖小遺伝子座の場合には、機能的多様性（D）領域セグメント。軽鎖小遺伝子座トランスジーンは、長さが少なくとも25 kb、典型的には50～80 kb であるだろう。重鎖トランスジーンは、スイッチ領域に作用可能に連結された2つの定常領域を有する、典型的には約70～80 kb、好ましくは少なくとも約60 kb の長さであろう。更に、小遺伝子座の個々の要素は好ましくは生殖細胞（ジャームライン）配置にあり、そして小遺伝子座の該要素により完全にコードされる多様な抗原特異性を有する機能的抗体分子を発現するように、トランスジェニック動物の前駆体B細胞において遺伝子再配列を受けることができる。更に、少なくとも2つのC_H 遺伝子と必要なスイッチ配列とを含んで成る重鎖小遺伝子座は、典型的には、異なる免疫グロブリンクラスの機能的抗体分子が生成されるように、イソタイプスイッチを受けることができる。そのようなイソタイプスイッチは、トランスジェニック非ヒト動物内に存在するB細胞中で生体内で起こるか、またはトランスジェニック非ヒト動物から外植されたB細胞系列の培養細胞中で起こり得る。

10

20

30

他の好ましい態様では、免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンはV_H , DおよびJ_H 遺伝子セグメントを各々1つまたは複数並びにC_H 遺伝子を2つ以上含んで成る。適当なタイプの遺伝子セグメントの少なくとも1つが小遺伝子座トランスジーンに組み込まれる。重鎖トランスジーンはC_H セグメントに関しては、トランスジーンが少なくとも1つのμ 遺伝子セグメントと、少なくとも1つの他の定常領域遺伝子セグメント、より好ましくはγ 遺伝子セグメント、最も好ましくはγ 3またはγ 1 遺伝子セグメントとを含むことが好ましい。この優先性は、コードされる免疫グロブリンのIgM形とIgG形の間のクラススイッチおよび分泌形の高親和性非IgM免疫グロブリンの産生を考慮したものである。他の定

40

常領域遺伝子セグメント、例えばIgD, IgAおよびIgE の産生をコードするもの

【数 4 8】

(49)

も使うことができる。

当業者は、重鎖 C_H 遺伝子の発生の順序が該 C_H 遺伝子の供与体として働く種の生殖細胞において見つかる天然に存在する空間的順序とは異なるであろうトランスジーンも作製するだろう。

更に、当業者は、1つの種の複数の個体から C_H 遺伝子を選択することができ (例えば、同種異系 C_H 遺伝子)、そしてイソタイプスイッチを受けることができる過剰の C_H 遺伝子として前記遺伝子をトランスジーン中に組み込むことができる。次いで、結果として生じたトランスジーン非ヒト動物は、或る態様では、トランスジーン C_H 遺伝子を得た前記種に象徴されるアロタイプの全てを包含する様々なクラスの抗体を生産することができる。

10

更にまた、当業者は、異なる種から C_H 遺伝子を選択してトランスジーン中に組み込むことができる。各 C_H 遺伝子と共に機能的スイッチ配列が含まれるが、使用するスイッチ配列は必ずしも C_H 遺伝子の隣に天然に存在するものである必要はない。種間の C_H 遺伝子組み合わせは、様々な種からの C_H 遺伝子に相当する多様なクラスの抗体を生産することのできるトランスジェニック非ヒト動物をもたらすだろう。腫瘍 C_H トランスジーンを含有するトランスジェニック非ヒト動物は、獣医学用のモノクローナルを産生するハイブリドーマを作製するための B細胞の源として働くことができる。

20

ヒトの重鎖 j 領域セグメントは、3 kb の DNA 長さにおいて密集した 6 個の機能的 J セグメントと 3 個の偽遺伝子を含んで成る。それが比較的小さいサイズであることとそれらのセグメントが μ 遺伝子および δ 遺伝子の 5' 部分と一緒に単一の 23 kb Sfil/Soel断片として単離できること [Sadoら、Biochem Biophys. Res. Commun. 154:246-271 (1988)；これは参考として本明細書甲に組み込まれる j を仮定すれば、小遺伝子座構成物において全部の J 領域遺伝子セグメントを使うことが好ましい。更に、この断片は μ 遺伝子と δ 遺伝子の間の領域に広がるた

30

40

め、 μ 発現に必要とされるシス結合した 3' 調節要素の全てを含むことが適当である。

更に、この断片は完全な J 領域を含むため、重鎖エンハンサーと μ スイッチ領

【数 4 9】

(50)

域を含む [Mills ら、Nature 306:809(1983) ; Yancopoulos および Alt, AnnRev Immunol. 4:339-368(1986) ; これらは参考として本明細書中に組み込まれる] 。それは、V D J 結合を開始させて一次レパートリー B 細胞を形成させる転写開始部位も含む [Yancopoulos および Alt, Cell 40:271-281 (1985) ; これは参考として本明細書中に組み込まれる] 。あるいは、23 kb SfiI/SpeI 断片の代わりに、D 領域の一部を含む 36 kb BssHII/SpeI 断片を使うことができる。そのような断片の使用は、効率的 D - j 結合を促進させる 5' 隣接配列の量を増加させる。

10

ヒト D 領域は、縦列に結合した 4 または 5 個の相同な 9 kb の亜領域から成る [Siebenlist ら、Nature 294:631-635(1981)] 。各亜領域は 10 個までの個々の D セグメントを含む。それらのセグメントの一部はマッピングされており、それを図 4 に示す。2 つの異なる方策を使って小遺伝子座 D 領域を作製する。第一の方策は、1 つまたは 2 つの反復 D 亜領域を含む短い DNA の連続鎖の中に置かれたそれらの D セグメントのみを使うものである。候補となるのは、12 個の個々の D セグメントを含む単一の 15 kb 断片である。

20

DNA のこの断片は 2 つの連続する EcoRI 断片から成り、そして完全に配列決定されている [Ichihara ら、EMBO J. 7:4141-4150(1988)] 。12 の D セグメントが一次レパートリーに十分であろう。しかしながら、D 領域の分散性質があるとすれば、別の方策は、幾つかの不連続 D 断片含有断片を一緒に連結して、より多数のセグメントを有する一層小型の DNA 断片を作製することである。例えば、特徴的な隣接ノナーまたはヘプタマー配列 (前傾) の存在により、および文献への参照により、追加の D セグメント遺伝子を同定することができる。

30

重鎖小遺伝子座トランスジェーンを作製するのには、少なくとも 1 つ、好ましくは複数の V 遺伝子セグメントが使われる。隣接配列を伴うまたは伴わない、再配列されたまたは再配列されていない V セグメントは、「異種性抗体を生産することができるトランスジェニック非ヒト動物」 (Transgenic Non-Human Animal Capable of Producing Heterologous Antibodies) と称する。1992 年 3 月 19 日に公開された PCT 公開 W0 1092/03918 に記載の通りに単離することができる。

40

【数 5 0】

(51)

隣接配列を伴うまたは伴わない、再配列されたまたは再配列されていないVセグメント、Dセグメント、JセグメントおよびC遺伝子は、1992年3月19日に公開されたPCT 公開W0 1092/03918 に記載の通りに単することができる。

小遺伝子座軽鎖トランスジーンは、ヒト λ または κ 免疫グロブリン遺伝子座から同様にして作製することができる。すなわち、例えば、複数のDNA断片、少なくとも2つ、3つまたは4つのDNA断片から、V、D、Jおよび定常領域配列（各配列はヒト遺伝子配列に実質的に相同である）をコードする、例えば約75 kbの、免疫グロブリン重鎖小遺伝子座トランスジーン構成物を形成せしめることができる。好ましくは、前記配列は転写調節配列に作用可能に連結され、そして再配列を受けることができる。2以上の適当に置かれた定常領域配列（例えば μ および γ ）およびスイッチ領域では、スイッチ組換えも起こる。典型的な軽鎖トランスジーン構成物は、1990年8月29日出願の同時係属出願 USS 07/574,748に記載の通りに、ヒトDNAに実質的に相同であり且つ再配列を受けることのできる複数のDNA断片から同様に形成せしめることができる。

E. イソタイプスイッチを受けることができるトランスジーン構成物

理想的には、クラススイッチを受けることになっているトランスジーン構成物は、繁殖不能転写物を調節するのに必要なシス作用性配列の全てを含むべきである。天然に存在するスイッチ領域並びに上流のプロモーターおよび調節配列（例えばIFN誘導性要素）は、イソタイプスイッチを受けることのできるトランスジーン構成物中に含まれる好ましいシス作用性配列である。スイッチ領域、好ましくはヒト $\gamma 1$ スイッチ領域のすぐ上流の少なくとも約50塩基対、好ましくは少

なくとも約200塩基対、より好ましくは少なくとも500～1000塩基対またはそれ以上の配列が、スイッチ配列、好ましくはヒト $\gamma 1$ スイッチ配列に作用可能に連結されるだろう。更に、スイッチ領域は、特定のスイッチ領域の隣に天然には存在しない C_H 遺伝子上流に（且つ近隣に）連結せしめることができる。例えば、限定のつもりでないが、ヒト $\gamma 1$ スイッチ領域をヒト $\alpha 2 C_H$ 遺伝子上流に連結してもよく、またはマウス $\gamma 1$ スイッチ領域をヒト C_H 遺伝子に連結してもよい。

【数 5 1】

(52)

トランスジェニックマウスにおいて非古典的イソタイプスイッチ（例えば δ - 関連欠失）を得るための別法は、ヒト μ 遺伝子に隣接する400 bpの直接反復配列（ $\sigma\mu$ および $\varepsilon\mu$ ）〔Yasui ら、Eur. J. Immunol. 19:1399(1989)〕の包含を伴う。それらの二配列の間の相同組換えはIgD型のみのB細胞において μ 遺伝子を欠失せしめる。重鎖トランスジーンは、次の式によって表すことができる：

10

$$(V_H)_x - (D)_y - (J_H)_z - (S_0)_m - (C_1)_n - [(T) - (S_A)_p - (C_2)]_q$$

上式中、

V_H は重鎖可変領域遺伝子でセグメントであり、

D は重鎖D（多様性）領域遺伝子セグメントであり、

J_H は重鎖J（連結）領域遺伝子セグメントであり、

S_0 はイソタイプスイッチが起こるような S_d 受容体領域セグメントとの組換え現象に参加することのできる供与体領域セグメントであり、

20

C_1 はB細胞発達ににおいて使われるイソタイプ（例えば μ または δ ）をコードする重鎖定常領域遺伝子セグメントであり、

T は少なくともプロモーターを含有するシス作用性転写調節領域セグメントであり、

S_d はイソタイプスイッチが起こるような選択された S_0 供与体領域セグメントとの組換え現象に参加することのできる受容体領域セグメントであり、

30

C_2 は μ 以外のイソタイプ（例えば $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \alpha_1, \alpha_2, \varepsilon$

）をコードする封鎖定常領域遺伝子セグメントであり、 x, y, z, m, n, p および q は整数であり、 x は1～100、 n は0～10、 y は1～50、 p は1～10、 z は1～50、 q は0～50、 m は0～10である。典型的には、トランスジーンがイソタイプスイッチを受けることができる時、 q は少なくとも1であり、 m は少なくとも1であり、 n は少なくとも1であり、そして m は n と等しいかまたはそれより大きくなければならない。

40

$V_H, D, J_H, S_0, C_1, T, S_A$ および C_2 セグメントは様々な種、好ましくは哺乳動物種、より好ましくはヒトおよびマウス生殖細胞DNAから選択することができる。

【数 5 2】

(53)

V_H セグメントは、ヒト生殖細胞中に天然に存在する V_H セグメント、例えば VH_{251} から選択することができる。典型的には、約2個の V_H セグメント、好ましくは約4個、より好ましくは少なくとも約10個の V_H セグメントが含まれる。

典型的には少なくとも1個のDセグメントが含まれるが、好ましくは少なくとも10個のDセグメントが含まれ、態様によっては、10個以上のDセグメントが含まれる。幾つかの好ましい態様はヒトDセグメントを含む。

10

典型的には少なくとも1個の J_H セグメントがトランスジーンに含まれるが、約6個の J_H セグメントを含むことが好ましく、幾つかの好ましい態様は約6個以上の J_H セグメントを含み、非ヒト J_H セグメントを1つも含まない。

S_0 セグメントは該トランスジーンの S_A セグメントとの組換え現象に参加することかできる供与体領域である。古典的なイソタイプスイッチでは、 S_0 および S_A 領域は S_μ , S_{γ_1} , S_{γ_2} , S_{γ_3} , S_{γ_4} , S_α , S_{α_2} および S_E といったスイッチ領域である。好ましくは、スイッチ領域はマウスまたはヒトであり、より好ましくは S_0 がヒトまたはマウス S_μ であり、 S_A がヒトまたはマウス S_{γ_1} である。非古典的イソタイプスイッチ (δ 関連欠失) で、 S_0 および S_A 領域は、好ましくはヒト μ 遺伝子に隣接する400塩基対の直接複製配列である。

20

30

C_1 セグメントは、典型的には μ または δ 遺伝子であり、好ましくは μ 遺伝子であり、より好ましくはヒトまたはマウス μ 遺伝子である。

Tセグメントは、典型的には天然に存在する (即ち生殖細胞) スイッチ領域に隣接する5'隣接配列を含む。Tセグメントは典型的には長さが少なくとも約50ヌクレオチド、好ましくは長さが少なくとも約200ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも500~1000ヌクレオチドである。好ましくはTセグメントは、生殖細胞配置においてヒトまたはマウススイッチ領域のすぐ上流に存在する5'隣接配列である。前記Tセグメントが動物の生殖細胞に天然に存在しないシス作用性転写調節配列 (例えばウイルスのエンハンサーおよびプロモーター、例えばSV40、アデノウイルス、および真核細胞に感染する他のウイルス中に見つかる

40

【数 5 3】

(54)

もの)を含んでもよいことは当業者にとって明白である。

C₂ セグメントは、典型的には γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 または ε C₁₁ 遺伝子であり、好ましくはそれらのイソタイプのヒト C₁₁ 遺伝子であり、より好ましくはヒト γ_1 または γ_3 遺伝子である。様々な種からの下流 (スイッチされる) イソタイプ遺伝子としてマウス γ_{24} および γ_{2b} を使ってもよい。重鎖トランスジーンが免疫グロブリン重鎖小遺伝子座を含む場合、該トランスジーン的全長は典型的には150 キロ塩基対未満であろう。

10

一般に、該トランスジーンは、生来の重鎖 I g 遺伝子座以外のものであるだろう。例えば、不必要な領域の欠失または他の種からの対応領域との置換が存在するだろう。

F. I gトランスジーン中の機能的イソタイプスイッチを決定する方法

20

トランスジェニック非ヒト動物におけるイソタイプスイッチの発生は、当業界で公知である任意の方法によって同定することができる。好ましい態様としては次のものが挙げられ、それらは単独でまたは組み合わせて使用される。

1. δ 以外の少なくとも1つのトランスジーン下流 C_H 遺伝子に相同である配

列とトランスジーン V_H - D_H - J_H 再配列された遺伝子に相同である隣接配列とを含有する mRNA 転写物の検出；そのような検出はノーザンハイブリダイゼーション、S₁ ヌクレアーゼ保護アッセイ、PCR 増幅、cDNA クローニングまたはその他の方法によることができる。

30

2. トランスジェニック動物の血清中の、または該トランスジェニック動物の B 細胞から作製したハイブリドーマ細胞の培養上清中の、下流 C_H 遺伝子によりコードされる免疫グロブリンタンパク質の検出。ここで免疫化学的方法により、そのようなタンパク質が機能的可変領域を含んで成ることを証明することもできる。

40

3. トランスジェニック動物の B 細胞からの DNA 中の、またはハイブリドーマ細胞からのゲノム DNA 中の、該トランスジーン中のイソタイプスイッチの発生と一致する DNA 再配列の検出。そのような検出はサザンブロットハイブリダイゼーション、PCR 増幅、ゲノムクローニングまたは他の方法によって達成す

【数 5 4】

(55)

ることができる。

4. イソタイプスイッチの他の徴候、例えば繁殖不能転写物の産生、スイッチに関与する特徴的な酵素の産生（例えば「スイッチレコンビナーゼ」）、あるいは現行技術によって検出、測定または観察され得る他の徴候の同定。

各々のトランスジェニック系列はトランスジーンの異なる組み込み部位とトランスジーン挿入断片の潜在的に異なる縦列整列を表し、そしてトランスジーンと隣接DNA配列の各々の異なる配置は遺伝子発現に影響を与え得るため、高レベルのヒト免疫グロブリン、特にIgGイノタイプのもので発現し、且つ最少コピー数の該トランスジーンを含有するマウスの系統を同定しそれを使用することが好ましい。単一コピーのトランスジェニック動物は、起こり得る不完全な対立遺伝子発現の問題を最少にする。

トランスジーンは典型的には宿主染色体DNA中、最も普通には生殖細胞DNA

A中に組み込まれ、そしてその後の生殖細胞系列トランスジェニック飼育用動物の飼育によって繁殖される。しかしながら、実施者は、適宜および所望により、当業界において既知であるかまたは後に開発される他のベクターおよびトランスジェニック法に置換することができる。

内因性非ヒト重鎖恒常領域遺伝子に対するトランススイッチが起こって、キメラ重鎖及びかかるキメラヒト／マウス重鎖を含む抗体を産生する可能性がある。かかるキメラ抗体は、本書で記述するいくつかの用途には望まれるかもしれないが、望ましくない場合もある。

G. 内因性免疫グロブリン遺伝子鎖の機能的破壊

好結果に再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンが発現は、トランスジェニック非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子の再配列を抑制することにより優性作用を有すると予想される。しかしながら、内因性抗体を欠く非ヒト動物を生成せしめる別の方注は、内因性免疫グロブリン遺伝子座を突然変異せしめることによるものである。胎児性幹細胞技術および相同組換えを使って、内因性免疫グロブリンレパートリーを容易に排除することができる。下記はマウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊を説明する。しかしながら、開示

【数 5 5】

(56)

されるベクターおよび方法は、他の非ヒト動物における使用に合わせて容易に改変することができる。

簡単に言えば、この技術は、生殖細胞組織に分化することができる多分化能性細胞系における、相同組換えによる遺伝子の不活性化を包含する。マウス免疫グロブリンの変更コピーを含むDNA構成物を胎児性幹細胞の核に導入する。その細胞の一部において、導入されたDNAマウス遺伝子の内因性コピーと組み換わり、それを変更コピーで置き換える。新たに操作された遺伝的損傷を含む細胞を宿主マウス胚に注入し、それを受容体の雌に再移植する。それらの胚の一部が変異細胞系に完全に由来する生殖細胞を有するキメラマウスに発達する。従って、キメラマウスを交配することにより、導入された遺伝的損傷を含むマウスの新規

10

系列を獲得することが可能である [Capecchi (1989) *Science*, 244, 1288-1292 により概説されている]。

20

マウス λ 遺伝子座は免疫グロブリンのわずか5%に寄与するため、重鎖および／または κ 軽鎖遺伝子座の不活性化で十分である。それらの遺伝子座の各々を破壊するには3つの方法があり、J領域の欠失、J-Cイントロエンハンサーの欠失、および終結コドンの導入による定常領域コード配列の破壊である。DNA構成物デザインの見地から、最後の方法の選択が最も簡単である。 μ 遺伝子の排除はB細胞の成熟を破壊し、それによっていずれかの機能的重鎖セグメントにクラススイッチすることを防ぐ。それらの遺伝子座を破壊（ノックアウト）する方策を下記に概説する。

30

マウス μ -および κ 遺伝子を破壊するためには、Jaenischおよび共同研究者 [Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-433] によりマウス $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子の好結果の破壊に使われたデザインを基にした標的ベクターを用いる。プラスミドpMClneo からネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を標的遺伝子のコード領域中に挿入する。pMClneo 挿入断片は neo発現を指令するのにハイブリッドワイルスプロモーター／エンハンサー配列を使う。このプロモーターは胎児性幹細胞中で活性である。従って、破壊（ノックアウト）構成物の組込みのための選択マーカーとしてneo を使うことができる。ランダム挿入現象に対する陰性選択マー

40

【数 5 6】

(57)

カーしてHSV チミジンキナーゼ(tk)遺伝子を該構成物の末端に付加する (Zijlstraら、前掲)。

重鎖遺伝子座を破壊するための好ましい方策はJ領域の削除である。この領域はマウスではかなり小さく、わずか1.3 kbに及ぶ。遺伝子標的ベクターを作製するために、分泌されるA定常領域エクソンの全部含む15 kbのKpn I断片をマウスゲノムライブラリーから単離する。1.3 kbのJ領域をpMCleoからの1.1 kb挿入断片により置き換える。次いで該Kpn I断片の5'末端にHSV tk遺伝子を付加する。相同組換えによるこの構成物の正しい組込みは、neo遺伝子によるマウ

10

スJ_H領域の置換をもたらすだろう。neo遺伝子を基にしたプライマーとD領域中のKpn I部位の5'のマウス配列に相同のプライマーとを使って、PCRにより組換え体をスクリーニングする。

20

あるいは、 μ 遺伝子のコード領域を破壊することにより重鎖遺伝子座を破壊(ノックアウト)する。このアプローチは、上記のアプローチで使ったものと同じ15 kbのKpn I断片を必要とする。pMC1neoからの1.1 kb挿入断片をエクソンII中のユニークBamHI部位のところに挿入し、そしてHSK tk遺伝子を3' Kpn I末端に付加する。neo挿入断片の片側における二重交差(これはtk遺伝子を削除する)を選択する。それらは、選択されたクローンのプールからPCR増幅により検出される。PCRプライマーの一方はneo配列に由来し、そして他方は標的ベクターの外側のマウス配列に由来する。マウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊は実施例に記載される。

30

G. 内因性免疫グロブリン遺伝子座の発現の抑制

内因性Ig遺伝子座の機能的破壊に加えて、内因性Ig遺伝子座の発現を防ぐ別の方法は抑制である。内因性Ig遺伝子の抑制は、1または複数の組み込まれたトランスジーンから産生されるアンチセンスRNAにより、アンチセンスオリゴヌクレオチドにより、および/または1または複数の内因性Ig鎖に特異的な抗血清の投与により達成することができる。

40

アンチセンスポリヌクレオチド

【数 5 7】

(58)

特定の遺伝子の発現を部分的または全体的に破壊するためにアンチセンスRNAトランスジーンを使うことができる〔Pepin ら(1991)Nature 355: 725 ; Helene, C. およびToulme, J. (1990) Biochimica Biophys. Acta 1049: 99 ; Stout, J. およびCaskey, T.(1990)Somat. Cell Mol. Genet. 16: 369 ; Munirら(1990) Somat. Cell Mol. Genet. 16: 383 ; これらの各々は参考として本明細書中に組み込まれる〕。

10

「アンチセンスポリヌクレオチド」は、(1) 参照配列、例えば内因性IgのC_H またはC_L 領域配列の全部または一部に相補的であり、且つ(2) 相補的な標的配列、例えば染色体遺伝子座またはIg mRNA に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。そのような相補的アンチセンスポリヌクレオチドは、関連する標的配列への特異的ハイブリダイゼーションが該ポリヌクレオチドの機能的性質として保持される限り、ヌクレオチド置換、付加、欠失または転位を含んでもよい。

20

相補的アンチセンスポリヌクレオチドとしては、個々のmRNA種に特異的にハイブリダイズしそして該mRNA種の転写および／またはRNAプロセッシングおよび／またはコードされるポリペプチドの翻訳を防ぐことができる、可溶性アンチセンスRNAまたはDNAオリゴヌクレオチドが挙げられる〔Ching ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10006-10010 (1989) ; Broderら、Ann. Int. Med. 113:604-613 (1990) ; Loreau ら、FEBS Letters 274: 53-56 (1990) ; Holcenbergら、W0091/11535 ; U.S.S.N 07/530,165 (「新規ヒトCRIPRO遺伝子」) ; W0091/09865 ; W091/04753 ; W090/ 13641 およびEP 386563 ; これらの各々は参考として本明細書中に組み込まれる〕。

30

アンチセンス配列は、長さが少なくとも約15の連続ヌクレオチド、より好ましくは長さが約30以上の連続ヌクレオチドの少なくとも1つの免疫グロブリン遺伝子配列に相補的であるポリヌクレオチド配列である。しかしながら、或る態様では、アンチセンスポリヌクレオチドの特性として特異的ハイブリダイゼーションが保持される限り、アンチセンス配列は、相補的免疫グロブリン遺伝子配列に比較して置換、付加または欠失を有することができる。一般的に、アンチセンス配

40

【数 5 8】

(59)

列は、免疫グロブリン鎖をコードするか、またはDNA再配列後に免疫グロブリン鎖をコードする潜在能力を有する内因性免疫グロブリン遺伝子配列に相補的である。ある場合には、免疫グロブリン遺伝子列に一致するセンス配列が特に転写を妨害することによって発現を抑制する働きをすることがある。

従ってアンチセンスポリヌクレオチドは、コードされるポリペプチドの産生を

10

阻害する。この点に関して、1または複数の内因性Ig遺伝子座の転写および／または翻訳を阻害するアンチセンスポリヌクレオチドは、内因性Ig遺伝子座によりコードされる免疫グロブリン鎖を産生する非ヒト動物の能力および／または特異性を変更することができる。

アンチセンスポリヌクレオチドは、トランスフェクタント細胞またはトランスジェニック細胞中、例えば個体の造血幹細胞集団の全部または一部を再構成するのに使われるトランスジェニック多分化能性造血幹細胞中、あるいはトランスジェニック非ヒト動物中で異種発現カセットから生産され得る。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチドは、試験管内では培地中または生体内では循環系もしくは間質液中のいずれかの外部環境に投与される可溶性オリゴヌクレオチドを含んで成ることができる。外部環境中に存在する可溶性アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞質に接近しそして特定のmRNA種の翻訳を阻害することが証明されている。

20

ある態様では、アンチセンスポリヌクレオチドがメチルホスホネート成分を含んで成るか、あるいはホスホロチオネートまたはO-メチルリボヌクレオチドを使用してもよく、そしてキメラオリゴヌクレオチドを使用してもよい [Oag leら (1990) Nucleic Acids Res. 18: 4751]。ある用途には、アンチセンスオリゴヌクレオチドはポリアミド核酸を含んでもよい [Nielsen ら (1991) Science 254: 1497]。アンチセンスポリヌクレオチドに関する一般法については、Antisense RNA and DNA (1988), D.A. Helton編, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと。

30

40

1または複数の配列に相補的なアンチセンスポリヌクレオチドを使って、転写、RNAプロセッシング、および／または同起源のmRNA種の翻訳を阻害し、それに

【数 5 9】

(60)

よってコードされる各ポリペプチドの量を減少させる。そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、生体内で1または複数の内因性 I g 遺伝子座の形成を阻害することにより治療機能を提供することができる。

可溶性アンチセンスポリヌクレオチドとしてまたはアンチセンストランスジーンから転写されたアンチセンスRNAとしてのいずれにせよ、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、生体内の生理的状态において内因性 I g 配列に優先的にハイブリダイズするように選択される。最も典型的には、選択されたアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明の重鎖または軽鎖トランスジーンによりコードされる異種 I g 配列にそれほど多くはハイブリダイズしないだろう（即ち、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約25~35%以上トランスジーン I g f 発現を阻害しないであろう）。

抗血清抑制

内因性 I g 鎖発現の部分的または完全な抑制は、マウスに1または複数の内因性 I g 鎖に対する抗血清を注入することにより達成することができる〔(Weiss ら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:211;これは参考として本明細書中に組み込まれる)〕。抗血清は、1または複数の内因性 I g 鎖とは特異的に反応するが本発明の I g トランスジーンによりコードされる異種 I g 鎖とは最少の反応性を有するかまたは全く反応性を持たないように選択される。よって、Weiss ら（前掲）のものにより代表されるようなスケジュールに従った選択抗血清の投与は、内因性 I g 鎖発現を抑制するが本発明のトランスジーンによりコードされる1または複数の異種 I g 鎖の発現を許容する。

抗体適切な抗体供給源としては、以下のものが含まれる：

- (1) 特異的にマウス μ , γ , κ 又は入鎖に結合するものの本発明のヒト I g トランスジーンによりコードされるヒト免疫グロブリン鎖と反応しない、モノクローナル抗体といったようなモノクローナル抗体、
- (2) 混合物が、内因性 I g 鎖の単一種上の多重エピトープと、多重内因性 I g 鎖（例えばマウス μ 及びマウス γ ）と、又は多重エピトープ及び多重の鎖又は内因性免疫グロブリンと結合するような、かかるモノクローナル抗体の混合物；

【数 6 0】

(61)

(3) ポリクローナル抗血清又はその混合物。標準的には、かかる抗血清（単鎖）は、内因性 I g 鎖の単一種（例えばマウス μ , マウス γ , マウス κ , マウス λ ）又は内因性 I g 鎖の多重種）に結合するため単一特異性のものであり、最も好ましくは、かかる抗血清は、本発明のトランスジーンによりコードされたヒト免疫グロブリン鎖に対して無視できる結合力しか有していない；及び／又は

10

(4) 内因性 I g 鎖の単一又は多重種に対し結合し、最も好ましくは本発明のトランスジーンによりコードされるヒト免疫グロブリン鎖に対して無視できるほどの結合力しかもたないポリクローナル抗血清とモノクローナル抗体の混合物。一般にポリクローナル抗体が好まれ、かかる実質的に単一特異性のポリクローナル抗体は、有利には、ヒト以外の動物種（例えばマウス）から誘導される抗体での予備吸着及び／又は例えば不動化されたヒト I g を含む親和性樹脂上での抗血清又はその精製分画のアフィニティクロマトグラフィ（ここで結合された分画は抗血清中の望ましい抗ヒト I g について富化されており、この結合分画は標準的には低 pH 又はカオトロピック塩溶液という条件で溶離される）によりヒト免疫グロブリンに対して生成された抗血清から産生できる。

20

内因性の（例えばマウスの）免疫グロブリン鎖を発現するリンパ球の抗体により誘導された細胞の枯渇を増強させるため、細胞分裂及び／又は補体固定を利用することができる。例えば、一実施態様においては、マウス I g を発現する外植された造血細胞及び／又はヒト I g トランスジーンを宿すトランスジェニックマウスから得た B 系列のリンパ球の半比枯渇のために抗体が利用される。かくして、造血細胞及び／又は B 系列リンパ球が、ヒト I g トランスジーンを宿す（好ましくはヒト重鎖トランスジーン及びヒト軽鎖トランスジーンの両方を宿す）ヒト以外のトランスジェニック動物から外植され、外植された細胞は、（1）内因性免疫グロブリン（例えばマウス μ 及び／又は κ ）に結合し、（2）トランスジーンによりコードされるヒト免疫グロブリン鎖に対する実質的な結合力に欠ける抗体（単数又は複数）と共にインキュベートされる。

30

40

このような抗体は、明確化を期して「抑制抗体」と呼ばれる。外植された細胞集団は、抑制抗体（単複）に結合する細胞を選択的に枯渇させられる、このよう

【数 6 1】

(62)

な枯渴は、(1) 未結合細胞から抑制抗体結合細胞を除去するための物理的分離 (例えば、抑制抗体に結合している細胞を不動化し除去するため固体支持体又は磁気ビードに抑制抗体を結合させることができる)、(2) 抑制抗体により結合された細胞の抗体依存型細胞死滅 (例えば、ADCC、補体固定、又は抑制抗体に関連された毒素による)、及び (3) 抑制抗体により誘発されたクローンアネルギー、などのさまざまな方法により達成できる。

10

往々にして、内因性 I g 鎖産生の抗体抑制のために用いられる抗体は、補体を固定することができる。ウサギ又はモルモットといったように半ビボ/インビトロ枯渴のための便利な補体源と充分反応するようにかかる抗体を選択できることが往々にして好ましい。インビボ枯渴については、一般に抑制抗体がヒト以外のトランスジェニック動物種においてエフェクター機能を有することが好ましい。かくして、トランスジェニックマウスでの使用のためには、一般に、マウスエフェクター機能 (例えば、ADCC 及び補体固定) を含む抑制抗体が好ましい。

20

1 変形実施態様においては、内因性免疫グロブリンを発現するリンパ球の半ビボ/インビトロ枯渴のために、予め定められた内因性免疫グロブリン鎖に特異的に結合する抑制抗体が用いられる。ヒト免疫グロブリントランスジーンを宿すヒト以外のトランスジェニック動物からの細胞外植体 (例えばリンパ球試料) は抑制抗体と接触させられ、抑制抗体に特異的に結合する細胞は枯渴させられ (例えば、不動化、補体固定などにより)、かくして内因性 (非ヒト) 免疫グロブリンを発現する細胞 (例えばマウス I g を発現するリンパ球) 内で枯渴された細胞副次集団を生成する。

30

結果として得られた枯渴したリンパ球集団 (T 細胞、ヒト I g 一陽性 B 細胞など) は、内因性抗体を産生する能力が実質的に無い同じ種の免疫適合性ある (すなわち NHC 適合性ある) ヒト以外の動物 (例えば SCID マウス、RAG-1 又は RAG-2 ノックアウトマウス) の体内へとトランスファさせることができる。再構成された動物 (マウス) を次に抗原で免疫化させ (又は外植体を提供したドナー動物を

40

免疫化するのに使用した抗原を用いて再免疫化させる)、高親和性 (親和性成熟した) 抗体及びかかる抗体を産生する B 細胞を得ることができる。かかる B 細胞

【数 6 2】

(63)

は、従来の細胞融合によりハイブリドマを生成するのに使用でき、スクリーニングできる。抗体抑制はその他の内因性 I g の失活／抑制方法（例えば J_H ノックアウト、C_H ノックアウト、D ー領域切除、アンチセンス抑制、補償されたフレームシフト失活）と組合わせて使用することもできる。

完全な内因性 I g 遺伝子座失活

10

或る種の実施態様では、ヒト可変領域及び非ヒト（例えばマウス）恒常領域を含むハイブリッド免疫グロブリン鎖が形成され得ないような形で（例えばトランスジーン及び内因性 I g 配列の間のトランス切換えにより）、内因性 I g 遺伝子座の完全な失活を行なうことが望ましい。J_H 領域においてのみ機能的に分断されている（原文with→which の誤り）内因性重鎖対立遺伝子を支持するノックアウトマウスは、標準的にはトランスジーンによりコードされた再配置されたヒト可変領域（V D J）が内因性マウス恒常領域に連鎖された融合タンパク質として発現されるトランススイッチを頻繁に示すが、その他のトランススイッチされた連結も可能である。

20

この潜在的問題を克服するためには、一般に、制眼的な意味なく以下のものを含むさまざまな方法のうちのいずれかにより内因性重鎖遺伝子座を完全に失活することが望ましい：（1）少なくとも1つ、好ましくは全ての内因性重鎖恒常領域遺伝子を、相同組換えによって機能的に分断及び／又は欠失させること、（2）少なくとも1つ好ましくは全ての内因性重鎖恒常領域遺伝子を突然変異させて、終止コドン（又はフレームシフト）をコードし、切形又はフレームシフトされた産物（トランスススイッチされた場合）を産生すること、及び当業者にとっては明白なその他の方注及び戦略。重鎖恒常領域遺伝子及び／又はD ー領域遺伝子の実質的部分又は全ての欠失は、特に「ヒット・エンド・ラン」タイプなどの相同組換えターゲティングベクターによる逐次欠失を含むさまざまな方法によって達成できる。同様にして、内因性軽鎖恒常領域遺伝子を切除するための少なくとも

30

40

1つの内因性軽鎖遺伝子（例えばκ）の機能的分断及び／又は欠失が往々にして好ましい。

【数 6 3】

(64)

頻繁に、非相同トランスジーンがJセグメント（単複）内のフレームシフト及びトランスジーン恒常領域遺伝子のうちの単数又は複数のもの（好ましくは全て）の初期領域（すなわちアミノ末端コーディング部分）内の補償フレームシフト（例えば原読取り枠を再生させるため）を含んでいるようなフレームシフトされたトランスジーンを利用することが好ましい。内因性IgH遺伝子座恒常遺伝子（補償フレームシフトを含まないもの）に対するトランススイッチは、切形又はミスセンス産物を結果としてもたらすことになり、その結果、トランススイッチされたB細胞は欠失されるか又は選択されなくなり、かくしてトランススイッチされた表現型は抑制されることになる。

10

内因性Ig遺伝子産物発現（例えば、マウス重鎖及び軽鎖配列）及び／又はトランススイッチされた抗体（例えばヒト可変／マウス恒常キメラ抗体）の実質的に完全な機能的失活を実施するためにはアンチセンス抑制及び抗体抑制も同様に使用することができる。

20

内因性（例えばマウスの）Ig鎖発現の基本的に完全な抑制を行なうためには、失活及び抑制戦略のさまざまな組合せを使用することが可能である。

（トランススイッチ）

いくつかの変形態様においては、トランススイッチされた免疫グロブリンを産生することが望ましい場合がある。例えば、このようなトランススイッチされた重鎖は、キメラのものでありうる（すなわち非マウス（ヒト）可変領域及びマウス恒常領域）。このようなトランススイッチされたキメラ免疫グロブリンを含む抗体は、非ヒト（例えばマウス）恒常領域を有することか望まれるさまざまな利用分野（例えば、ヒト恒常領域を結合しない二次抗体の結合のためといったようなマウス免疫学的決定因子の存在について宿主内のエフェクター機能の保持のため）のために使用することができる。1例を挙げると、或る種の抗体に関して、

30

40

マウス可変領域能力範囲（レパートリー）に比べて、ヒト可変領域能力範囲が有利である可能性がある。

おそらくは、ヒトV_H、D、J_H、V_L及びJ_L遺伝子は、進化の間に、或る種の進化上重要な抗原を結合する免疫グロブリンをコードするその能力のために

【数 6 4】

(65)

選択されてきたのであろう：マウスの能力範囲のための進化上選択的な圧力を提供した抗原は、ヒトの能力範囲を形作るのに進化的圧力を提供した抗原と全く異なるものである可能性がある。マウス恒常領域（例えばトランススイッチされたマウスの）アイソタイプと組合わされたときヒト可変領域能力範囲を有利なものにするその他の能力範囲の利点も存在しうる。マウス恒常領域の存在は、ヒト恒常領域に比べ利点を提供する可能性がある。

10

例えば、トランススイッチによりヒト可変領域に連鎖されたマウス γ 恒常領域は、予め定められた抗原（例えばヒト IL-2 レセプター）と反応性あるキメラ抗体（好ましくはモノクローナル）を、マウス内の T リンパ球が機能的ヒト IL-2 レセプターを発現する移植細胞対宿主病のマウスモデルといったマウス疾病モデルの中でテストできるように、マウスエフェクター機能（例えば AOC、マウス補体固定）を有する抗体を提供しうる。これに続いて、ヒト可変領域コーディング配列を（例えば供給源（ハイブリドマクローン）からの cDNA クローニング又は PCR 増復により）分離させ、望ましいヒト恒常領域をコードする配列にスプライシングして、免疫原性が好ましくは最小限にされているヒトの治療用途により適したものであるヒト配列抗体をコードすることが可能である。

20

結果として得られる完全にヒトのコーディング配列（単複）を有するポリヌクレオチド（単複）を宿主内で発現させ（例えば哺乳動物細胞中の発現ベクターから）、医薬品のため精製することが可能である。いくつかの利用分野では、マウス恒常領域をヒト恒常領域と置換することなく直接キメラ抗体を使用することができる。トランススイッチされたキメラ抗体のその他の変形態様及び用途は、当事者にとって明白であらう。

30

本発明は、一般にヒト重鎖トランスジーンと内因性マウス重鎖恒常領域遺伝子の間のトランススイッチの結果として得られるキメラ抗体を発現する B リンパ球を含む、ヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。このようなキメラ抗体は、一般にマウスのスイッチされた（すなわち非 μ 、非 δ ）アイソタイプであるマウス恒常領域とヒト配列可変領域を含む。予め定められた抗原に対するキメラ抗体を作ることのできるヒト以外のトランスジェニック動物は、通常、ヒト可変

40

【数 6 5】

(66)

及びヒト恒常領域遺伝子をコードするヒト重鎖及びヒト軽鎖トランスジーンの間方が組込まれた場合、完全にヒトの配列の抗体を作る能力もある。

最も標準的には、機能的に分断された重鎖遺伝子座及び／又は軽鎖遺伝子座について同型接合であるが、トランススイッチできる単数又は複数の内因性重鎖恒常領域遺伝子（例えば γ , α , ϵ ）を保持し、頻繁にシス連鎖したエンハンサーを保持する。このようなマウスは、通常アシュバントと組合わせた形で予め定められた抗原を用いて免疫化され、マウス恒常領域配列に連鎖されたヒト配列可変領域から成る重鎖を含む検出可能な量のキメラ抗体を含む免疫応答が生み出される。標準的には、かかる免疫化された動物の血清は少なくとも約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 往々にして約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、頻繁には $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、そして最高 $50 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度でこのようなキメラ抗体を含みうる。

キメラヒト可変／マウス恒常領域重鎖を含む抗体を含む抗血清は標準的に、ヒト可変／ヒト恒常領域（完全ヒト配列）重鎖を含む抗体をも含んでいる。トランススイッチされたキメラ抗体は通常、（１）ヒト可変領域とマウス恒常領域（標準的にはマウスガンマ）から成るキメラ重鎖及び（２）ヒトのトランスジーンコーディングを受けた軽鎖（標準的にはけカッパ）又はマウス軽鎖（標準的にはカッパノックアウトバックグラウンド内のラムダ）を含んでいる。

かかるトランススイッチされたキメラ抗体は、一般に、約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 以上、好ましくは $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上

の親和力で予め定められた抗原（例えば免疫原）に結合する。頻繁には、予め定められた抗原は、ヒトタンパク質、例えばヒト細胞表面抗原（例えば CD 4, CD 8, IL-2 レセプター、EGF レセプター、POGF レセプター）、その他のヒト生物学的巨大分子（例えば トロンボモジュリン、プロテイン C、炭水化物抗原、シアリルルールイス抗原、L-セレクチン）又は非ヒト疾病関連巨大分子（例えば細菌性 LPS、ビリオン・カプシドタンパク質又は外被糖タンパク質）などである。

本発明は、次のものを含むゲノムを含むヒト以外のトランスジェニック動物を提供する：すなわち、（１）（例えば、機能的スイッチ組換え配列、標準的には

【数 6 6】

(67)

機能的エンハンサーに対するシス連鎖における) トランススイッチすることのできる少なくとも1つのマウス恒常領域遺伝子を含む同型接合で機能的に分断された内因性重鎖遺伝子、(2) 機能的ヒト重鎖可変領域をコードし発現するよう再配置することができかつトランススイッチすることのできる(例えばシス連鎖されたR S Sを有する) ヒト重鎖トランスジーン; さらに任意には(3) 機能的ヒト軽鎖可変領域をコードするべく再配置しかつヒト配列軽鎖を発現することのできるヒト軽鎖(例えばカッパ) トランスジーン; さらに任意には、(4) 同型接合で機能的に分断された内因性軽鎖遺伝子座(κ 、好ましくは κ 及び λ); そしてさらに任意に(5) ヒトトランスジーンによりコードされたヒト配列可変領域及び内因性マウス重鎖恒常領域遺伝子(例えば $\gamma 1$, $\gamma 2 a$, $\gamma 2 b$, $\gamma 3$)によりコードされたマウス恒常領域配列から成るキメラ重鎖を含む抗体を含む血清。

10

20

かかるトランスジェニックマウスはさらに、約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 以上、好ましくは約 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 以上の親和力で、予め定められたヒト抗原(例えば、CD 4, CD 8, CBA)に結合するキメラ抗体を含む血清を含みうる。頻繁には、こうして産生されたモノクローナル抗体が少なくとも $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和力をもつハイブリドーマを作ることかできる。往々にして非ヒト抗体に結合することができる、マウス恒常領域とヒト可変領域から成る重鎖を含むキメラ抗体が同様に血清中に、又はハイブリドーマから分泌さ

30

れた抗体として、存在しうる。

いくつかの変形態様においては、無傷の重鎖恒常領域遺伝子を保持する失活した内因性マウス重鎖遺伝子座を有し、トランススイッチできるヒト重鎖トランスジーンを有し、任意には単数又は複数の失活した内因性マウス軽鎖遺伝子座を伴い、ヒト軽鎖トランスジーンをも有するトランスジェニックマウスを生成することが望ましい。かかるマウスは有利にも、トランススイッチにより、完全にヒトの重鎖を含む抗体及びキメラ(ヒト可変/マウス恒常)重鎖を含む抗体を交互に発現することのできるB細胞を産生することができる。このマウスの血清には、完全にヒトの重鎖を含む抗体及び、好ましくは完全にヒトの軽鎖と組合わせた状

40

【数 67】

(68)

態でキメラ（ヒト可変／マウス恒常）重鎖を含む抗体を含む抗体が含まれる。ハイブリドーマは、このマウスのB細胞から生成されうる。

一般にこのようなキメラ抗体はトランススイッチにより生成でき、ここで、インピボで産生能あるV-D-J再配置によりコードされるヒト可変領域及びヒト恒常領域、標準的にはヒト μ をコードするヒトトランスジーンは、非トランスジーン免疫グロブリン恒常遺伝子スイッチ配列（RSS）でのスイッチ組換えを受け、かくして、標準的に内因性マウス免疫グロブリン重鎖恒常領域又は第2のトランスジーン上でコードされた非相同（例えばヒト）重鎖恒常領域である、前記トランスジーンによりコードされていないヒト重鎖恒常領域とトランスジーンコーディングを受けたヒト可変領域を作動的に連結させる。シススイッチというのは、トランスジーン内のRSS要素の組換えによるアイソタイプスイッチのことであるが、トランススイッチには、往々にしてトランスジーンを宿す染色体とは異なる染色体上で、トランスジーンRSSとこのトランスジーンの外側のRSS要素その間での組換えが関与する。

トランススイッチは、一般に、発現されたトランスジーン重鎖恒常領域遺伝子と、（非 μ アイソタイプ、標準的には γ の）内因性マウス恒常領域遺伝子のRSS又は往々にして別々の染色体上に組込まれている第2のトランスジーン上に含

まれたヒト恒常領域遺伝子のRSSのいずれか一方の間で起こる。

トランススイッチが第1の、発現されたトランスジーン重鎖恒常領域遺伝子（例えば μ ）のRSSと、第2のトランスジーン上に含まれたヒト重鎖恒常領域遺伝子のRSSの間で起こる場合、実質的に完全にヒトの配列をもつ非キメラ抗体が産生される。制眼的な意味のない例として、ヒト重鎖恒常領域（例えば、 $\gamma 1$ ）及び作動的に連鎖されたRSS（例えば $\gamma 1$ RSS）をコードするポリヌクレオチドを、トランスジーンコーディングと受けたヒト μ 鎖を含む抗体を発現するトランスジェニックマウスのB細胞（又はB細胞集団）から生成されたハイブリドーマ細胞の集団内に導入（例えばトランスフェクション）することができる。

結果として得られたハイブリドーマ細胞を、導入されたポリヌクレオチドの存在について、及び／又は、ヒト μ 鎖の可変領域（イディオタイプ／抗原反応性）

10

20

30

40

【数 6 8】

(69)

を有しかつ導入されたポリヌクレオチド配列（例えば、ヒト $\gamma 1$ ）によりコードされる恒常領域をもつ重鎖を含むトランススイッチされた抗体の発現について、選択することができる。トランスジーンにコードされたヒト μ 鎖の R S S と下流のアイソタイプ（例えば $\gamma 1$ ）をコードする導入されたポリヌクレオチドの R S S の間のトランススイッチ組換えは、かくしてトランススイッチされた抗体を生成することかできる。

10

本発明はと同様に、（１）トランススイッチすることのできる少なくとも１つのマウス恒常領域遺伝子（例えば $\gamma 2 a$, $\gamma 2 b$, $\gamma 1$, $\gamma 3$ ）を含む、同型接合で機能的に分離された内因性重鎖遺伝子座、（２）機能的ヒト重鎖可変領域をコードするべく再配置しヒト配列重鎖を発現することができ、かつアイソタイプスイッチ（及び／又はトランススイッチ）を受けることのできるヒト重鎖トランスジーン；さらに任意には（３）機能的ヒト軽（例えばカッパ）鎖可変領域をコードするべく再配置しヒト配列軽鎖を発現することができ、かつアイソタイプスイッチ（及び／又はトランススイッチ）を受けることのできるヒト軽鎖（例えばカッパ）トランスジーン、そしてさらに任意には（４）同型接合で機能的に分断された内因性軽鎖遺伝子座（標準的には κ 、好ましくは κ と λ の両方）、そしてさらに任意には（５）ヒトトランスジーンによりコードされたヒト配列可変領域及

20

び内因性マウス重鎖恒常領域遺伝子（例えば、 $\gamma 1$, $\gamma 2 a$, $\gamma 2 b$, $\gamma 3$ ）によりコードされるマウス恒常領域配列から成るキメラ重鎖を含む抗体を含む血清、を含むゲノムを含むトランスジェニックマウスを予め定められた抗原で免疫化する段階を含む、このようなトランススイッチされたキメラ抗体を産生するための方法も提供している。

30

親和性標識：スイッチされたアイソタイプについての異状

有利なことに、体細胞突然変異のプロセスは、トランススイッチ（及びシススイッチ）と結びつけられる。体細胞突然変異は、B細胞のクローン後代によりコードされる抗体親和力の範囲を拡張する。例えば、スイッチ（トランス—又はシス—）を受けたハイブリドーマ細胞により産生された抗体は、スイッチを受けなかったハイブリドーマ細胞内に存在するよりも広い抗原結合親和力範囲を示す。従って、第１のヒト重鎖恒常領域（例えば μ ）に対するポリペプチド結合におい

40

【数 6 9】

(70)

て第1のヒト重鎖可変領域を含む重鎖を含む第1の抗体を発現するハイブリドーマ細胞集団（標準的にはクローンの）を、第2の重鎖恒常領域（例えばヒト γ 、 α 又は ε 恒常領域）に対するポリペプチド結合において前記第1のヒト重鎖可変領域を含む重鎖を含む抗体を発現するハイブリドーマ細胞クローン変異株についてスクリーニングすることができる。

10

かかるクローン変異株は、インビトロでシススイッチを生成する天然クローン変異によって、又はT細胞誘導されたリンホカイン（例えばIL-4及びIFN- γ ）といったアイソタイプスイッチを促進する作用物質の投与を通してといったようなクラススイッチ（トランスー又はシスー）の誘発によって、又はトランススイッチのための基質として役立つべき非相同（例えばヒト）重鎖恒常領域遺伝子及び機能的RSSを含むポリヌクレオチドの導入によって、又は上述のものの組合せなどによって、產生させることができる。往々にして、作動的に連鎖されたRSSを伴うヒト下流アイソタイプ恒常領域（例えば $\gamma 1$ 、 $\gamma 3$ など）を含むポリヌクレオチドが同様に、ハイブリドーマ細胞内に導入され、トランス・スイッチメカニズムを介してアイソタイプスイッチを促進する。

20

クラススイッチ及び親和性成熟は、本発明のトランスジェニック動物から誘導されたB細胞の同じ集団内で発生する。従って、クラススイッチされたB細胞（又はそれから誘導されたハイブリドーマ）の同定を、高親和力のモノクローナル抗体を得るための1つのスクリーニング段階として使用することができる。シススイッチ（トランスジーン内スイッチ）、トランススイッチ又はその両方といったクラススイッチ事象を容易にするため、さまざまなアプローチを利用することができる。例えば、付随するRSS要素及びスイッチ調節要素（例えば不稔写しプロモーター）を伴う μ 及び γ の両方の恒常領域遺伝子を含む単一の連続ヒトゲノミックフラグメントを、トランスジーンとして使用することができる。

30

40

しかしながら、望まれる単一の隣接するヒトゲノミックフラグメントの一部分は、例えばクローニング宿主などの中で複製されるときに不安定さの問題などにより、効果的にクローニングすることが困難でありうる：特に δ と $\gamma 3$ の間の領域は、特に μ 遺伝子、 $\gamma 3$ 遺伝子、V遺伝子、D遺伝子セグメント及びJ遺伝子

【数 7 0】

(71)

セグメントを含む隣接するフラグメントのように効率良くクローニングしにくいことが判明する可能性がある。

同様に例として、ヒト μ 遺伝子、ヒト γ 3 遺伝子、ヒト V 遺伝子（単復）、ヒト D 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントから成り、介入する（イントロンの）又はその他の形で可欠な配列（例えば単数又は複数の V、D、及び／又は J セグメント及び／又は単数又は複数の非 μ 恒常領域遺伝子）の単数又は複数の欠失を伴う、不連続のヒトトランスジーン（ミニ遺伝子）、がある。このようなミニ遺伝子は、効率良い免疫グロブリンの発現及びスイッチのための必須要素の全てにまたがるゲノミック DNA の単一の隣接セグメントを分離することに比べて、いくつかの利点を有する。

例えば、このようなミニ遺伝子は、クローニングし難い配列（例えば、不安定配列、毒物配列など）を内含しうる DNA の大きい断片を分離する必要性を無く

する。さらに、シスー又はトランスースイッチのためのアイソタイプスイッチのために必要な要素（例えば、ヒト γ 不稔写しプロモータ）を含むミニ遺伝子座は、有利にもインビボで体細胞突然変異及びクラススイッチを受けることができる。多くの真核性 DNA 配列がクローニングし難いものであることが立証されているため、可欠配列を削除することが有利であることが判明する。

一変形態様においては、高い結合親和力（例えば $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 以上、好ましくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上）をもつ抗体を産生するハイブリドーマクローンは、産生力ある（枠内）V-D-J 再配置を受けることができる内因性マウス重鎖遺伝子座が実質的に欠如しアイソタイプスイッチを行なうことのできる（以上参照）ヒト重鎖トランスジーンを宿すトランスジェニックマウスの B 細胞から誘導されたハイブリドーマ細胞のプールから、ヒト（又はマウス）非 μ 重鎖恒常領域に対するポリペプチド結合においてヒト配列重鎖可変領域を含む重鎖を含む抗体を発現するハイブリドーマを選択することによって得られる。これらの抗体は、インビボ又は細胞培養中でのシスースイッチ及び／又はトランスースイッチの結果として産生される「スイッチされた重鎖」を含むことから、「スイッチされた抗体」と呼ばれる。

【数 7 1】

(72)

スイッチされた抗体を産生するハイブリドーマは、一般に、体細胞突然変異プロセスを受けており、このハイブリドーマのプールは一般により広い抗原結合親和力範囲を有することになり、この中から高親和力の抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択することができる。標準的には、予め決定された抗原について実質的な結合親和力 ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 以上) をもつヒト配列抗体を分泌し、このヒト配列抗体がヒト免疫グロブリン可変領域 (単複) を含んでいるようなハイブリドーマを、2段階プロセスを含む方法により選択することか
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

もう1つの段階は、(例えばハイブリドーマクローン上清のELISA、標識づけされた抗原を用いたFACS分析などにより) 実質的な結合親和力で予め定められた抗原に結合するハイブリドーマ細胞を同定することにある。標準的には、スイッチされた抗体を分泌するハイブリドーマの選択は、予め定められた抗原を結合するハイブリドーマ細胞を同定する前に行なわれる。予め定められた抗原に対する実質的な結合親和力をもつスイッチされた抗体を発現するハイブリドーマ細胞が分離され、標準的には個々の選択されたクローンとして当該技術分野において既知の適切な成長条件下で培養される。任意には、この方法には、モノクローナル抗体の発現に適した条件下で前記選択されたクローンを培養する段階が含まれる。このモノクローナル抗体を収集し、これを治療、予防及び／又は診断の目的で投与することができる。

往々にして、選択されたハイブリドーマクローンは、予め定められた抗原に結合する (又はこれに対する結合力を付与する) 免疫グロブリン (例えば可変領域) をコードする免疫グロブリン配列を分離するのためのDNA又はRNA原として役立つ。これに続いて、ヒト可変領域コーディング配列を分離し (例えばPCR増幅又は供給源 (ハイブリドーマクローン) からのcDNAクローニングによ

【数 7 2】

(73)

る)、好ましくは免疫原性が最小限にされるヒトの治療用途により適したヒト配列抗体をコードするべく望ましいヒト恒常領域をコードする配列に対しスプライシングする。結果として得られた完全にヒトのコーディング配列(単複)をもつポリヌクレオチド(単複)を宿主細胞(例えば哺乳細胞内の発現ベクターから)の中で発現させ、医薬品のために精製することが可能である。

10

キセノ(異種)エンハンサー

ヒト免疫グロブリン(例えば重鎖)をコードすることのできる非相同トランスジーンは、有利にも、マウスゲノムから誘導されていない、及び/又は非相同トランスジーンのエキソンとシスで自然に結びつけられていないシス連鎖された

エンハンサーを含んでいる。例えば、ヒト κ トランスジーン(例えば κ ミニ遺伝子座)は有利にも、ヒト V_{κ} 遺伝子、ヒト J_{κ} 遺伝子、ヒト C_{κ} 遺伝子及びキセノエンハンサーを含んでいる可能性があり、標準的には、このキセノエンハンサーは、標準的に J_{κ} 遺伝子と C_{κ} 遺伝子の間にあるか又は C_{κ} 遺伝子の下流に位置づけされた、ヒト重鎖イントロンエンハンサー及び/又はマウス重鎖イントロンエンハンサーを含む。例えば、マウス重鎖 $J-\mu$ イントロンエンハンサー(Banerji et al. (1983) Cell 33: 729)は、プラスミドpkVe2 の 0,9kbのkba 1フラグメント上で分離されうる(下記参照)。

20

ヒト重鎖 $J-\mu$ イントロンエンハンサー(Hayday et al. (1984) Nature 307 334)は、1.4kbのMlu I/Hind IIIフラグメントとして分離されうる(下記参照)。基本的にマウス $J-\mu$ イントロンエンハンサーに対しシスで連鎖されたヒト $J-\mu$ イントロンエンハンサーで構成されている組合せられたキセノエンハンサーといった、トランスジーンに対する転写的に活性なキセノエンハンサーの付加は、特にこのトランスジーンかヒト κ といった軽鎖をコードする場合、トランスジーンの高い発現レベルを付与することかできる。同様に、ラット3'エンハンサーを、ヒト重鎖とコードできるミニ遺伝子座構成体内に有利にも含み入れることかできる。

30

40

核酸

「実質的相同性」なる用語は、2つの核酸またはデザインしたその配列を最適

【数 7 3】

(74)

に整列しそして比較した時に、少なくとも約80%のヌクレオチド、通常は少なくとも約90%～95%、より好ましくは少なくとも約98%～99.5%のヌクレオチドが同一であることを指摘する。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下でその鎖の相補体にハイブリダイズする時、実質的相同性が存在する。核酸は完全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で、存在することかできる。

10

核酸は、標準技術により、例えばアルカリ／SOS 処理、CsClバンド沈降、カラ

ムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当業界で公知の他の方法により、他の細胞成分または他の汚染物、例えば他の細胞性核酸もしくはタンパク質から分離精製された時、「単離され」または「実質的に純粋にされ」る。F. Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)を参照のこと。

20

本発明の核酸組成物は、遺伝子配列を提供するための標準技術に従って、しばしばcDNA、ゲノムDNAまたは混合物のいずれかからの生来の配列（修飾された制限部位等を除く）を変異せしめることができる。コード配列については、それらの変異は、所望であればアミノ酸配列に影響してもよい。特に生来のV, D, J, 定常, スイッチおよび他の本明細書中に記載のそのような配列に実質的に相同であるかまたはそれから誘導されるDNA配列が考えられる（ここで、「誘導される」とは、ある配列が別の配列と同一であるかまたは変更されていることを指摘する）。

30

核酸はそれが別の核酸配列と機能的関係に置かれる時、「作用可能に連結される」という。例えば、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に作用するならば、それらはコード配列に作用可能に連結されている。転写調節配列については、作用可能に連結されるとは、連結されるDNA配列が連続であって、そして2種のタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、連続であって且つ読み枠内であることを意味する。スイッチ配列については、作用可能に連結されるとは、該配列がスイッチ組換えを行うことができることを意味する。

40

【数 7 4】

(75)

特定の好ましい態様

本発明の好ましい態様は、実施例 5, 6, 8 または 14 に記載の軽鎖トランスジェニックの単一のコピーを含有する動物と交配させた実施例 12 に記載のトランスジェニック（例えば pHCl または pHCl2）の少なくとも 1 回のコピー、典型的には 2 ～ 10 回のコピー、時には 25 ～ 50 回以上のコピーを含有する動物、並びに実施例 10 に記載の J

10

H 欠失動物から繁殖させた子孫である。動物はそれらの 3 つの特性について同型接合に交配される。

そのような動物は次の遺伝子型を有する：再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座（実施例 12 に記載）の単一コピー（染色体の一倍体 1 組あたり）、再配列されたヒト κ 軽鎖構成物（実施例 14 に記載）の単一コピー（染色体の一倍体 1 組あたり）、および機能的 J_H セグメントの全部を除去する各内因性マウス重鎖遺伝子座のところの欠失（実施例 10 に記載）。そのような動物は、j_H セグメントの欠失について同型接合であるマウスと交配させる（実施例 10）と、J_H 欠失について同型接合でありそしてヒト重鎖および軽鎖構成物については半接合である子孫を生産する。生じた動物に抗原を注入し、それらの抗原に対するヒトモノクローナル抗体の産生に使う。

20

30

そのような動物から単離された B 細胞は、それらが各遺伝子の単一コピーのみを含むため、ヒト重鎖および軽鎖に関して単一特異性である。更に、それらはヒトまたはマウス重鎖に関して単一特異性であろう。というのは、実施例 9 および 12 に記載のようにして導入された j_H 領域に広がる欠失によって、両方の内因性マウス重鎖遺伝子コピーが非機能的であるためである。更に、B 細胞の実質的部分はヒトまたはマウス軽鎖に関して単一特異性であろう。何故なら、再配列されたヒト κ 軽鎖遺伝子の単一コピーの発現が、B 細胞の実質的部分における内因性マウス κ および λ 鎖遺伝子の再配列を対立的におよび同位的に排除するだろうからである。

40

好ましい態様のトランスジェニックマウスは、理想的には生来のマウスのものと実質的に同じである、有意なレパートリーを有する免疫グロブリン産生を示す

【数 7 5】

(76)

だろう。例えば、内因性Ig遺伝子が不活性化されている態様では、総免疫グロブリンレベルは約0.1~10mg/ml血清、好ましくは0.5~5mg/ml、理想的には少なくとも約1.0 mg/mlの範囲であろう。IgM からIgG にスイッチすることができるトランスジーンをトランスジェニックマウスに導入した時、血清尾IgG対IgMの

10

成熟マウス比は好ましくは約10：1である。もちろん、IgG対IgM比は、未成熟マウスではずっと低いだろう。一般に、脾臓およびリンパ節B細胞の約10%より多く、好ましくは40~80%が、もっぱらヒトIgGタンパク質のみを発現する。

レパートリーは理想的には非トランスジェニックマウス中にしめされるものとほぼ等しく、通常は少なくとも約10%ほど高く、好ましくは25~50%またはそれ以上高いだろう。マウスゲノム中に導入される異なるV、JおよびD領域の数に主として依存して、通常少なくとも約1000種の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）、好ましくは $10^4 \sim 10^6$ またはそれ以上の免疫グロブリンが産生されるだろう。それらの免疫グロブリンは、典型的には、高抗原性タンパク質の約半分またはそれ以上を認識するだろう。

20

抗原性タンパク質としては、ハトチトクロームC、ニワトリリゾチーム、アメリカヤマゴボウのマイトジェン(PWM)、ウシ血清アルブミン、アオガイヘモシアニン、インフルエンザ赤血球凝集素、スタフィロコッカスプロテインA、マッコウクジラミオグロビン、インフルエンザノイラミニダーゼおよびリプレッサータンパク質が挙げられるがそれに限定されない。上記免疫グロブリンの幾つかは、予め選択された抗原に対して、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1} \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ またはそれ以上の親和性を示すだろう。

30

いくつかの実施態様においては、予め定められた抗原タイプに対する抗対応答において表わされるV遺伝子の選択を制限する目的で、予め定められた能力範囲をもつマウスを生成することが好まれる可能性がある。予め定められた能力範囲をもつ重鎖トランスジーンは例えば、人間ににおける予め定められた抗原タイプに対する抗体応答で好んで用いられるヒトV_H 遺伝子を含みうる。代替的には、さまざまな範囲により（例えば、予め定められた抗原に対する高い親和力のV領域をコードする確率が低い；対細胞突然変異及び親和力激化を受ける傾向が弱い；

40

【数 7 6】

(77)

又は一定の人間に対する免疫原性をもつ)、規定された能力範囲からいくつかの V_H 遺伝を除外することができる。

様々な重鎖または軽鎖遺伝子セグメントを含むトランスジーンの再配列の前に、それらの遺伝子セグメントは、例えばハイブリダイゼーションまたはDNA配列決定により、トランスジェニック動物以外の生物種に由来するものであると容易に同定することができる。

10

本発明のトランスジェニックマウスは、ヒトの抗体が望ましいところの、予め決められた抗原、例えば膜通過蛋白質、細胞表面巨大分子または他の適当な抗原 (例えば TNF、LPS 等) で免疫され得る。マウスは、トランスジーン内スイッチ組換え (シススイッチ) を経てクラススイッチを受け、予め決められた抗原と反応する免疫グロブリンを発現するB細胞を生成する。免疫グロブリンは、ヒト配列抗体であり得、ここで、重鎖および軽鎖ポリペプチドがヒトトランスジーン配列によってエンコードされ、これは体細胞突然変異によって誘導される配列およびV領域組換えジョイント、ならびに生殖細胞系エンコード配列を含み；これらのヒト配列免疫グロブリンは、ヒト V_L または V_H 遺伝子セグメントおよびヒト J_L または J_H セグメントによってエンコードされたポリペプチド配列に実質的に同一であるとされ得る。たとえ他の非生殖細胞系配列が、体細胞突然変異および分化 V-JおよびV-D-J組換えジョイントの結果として存在し得るとしても。そのようなヒト配列抗体に関して、各鎖の可変領域は、ヒト生殖細胞系V、Jおよび重鎖の場合にはD遺伝子セグメントによって、典型的には少なくとも80%エンコードされており；しばしば少なくとも85%の可変領域が、トランスジーンに存在するヒト生殖細胞系配列によってエンコードされており；時には90または95%またはそれ以上の可変領域配列がトランスジーンに存在するヒト生殖細胞系配列によってエンコードされている。しかしながら、非生殖細胞系配列は体細胞突然変異および VJおよび VDJ結合によって導入されるので、ヒト配列抗体はしばしば、マウスの生殖細胞系におけるヒトトランスジーンに見出されるように、ヒトV、D、またはJ遺伝子セグメントによってエンコードされるいくつかの可変領域配列 (および、あまりしばしばではないが、定常領域配列) を有するであ

20

30

40

【数 7 7】

(78)

う。典型的には、その

ような非生殖細胞系配列（または個々のヌクレオチド配置）は、CRD の中もしくは近くに、または体細胞突然変異が集中する(cluster)ことが知られている領域に、集中するであろう。

10

予め決められた抗原に結合するヒト配列抗体は、ヒト配列 γ 鎖（例えば $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2B$ または $\gamma 3$ ）およびヒト配列軽鎖（例えば κ ）を含むヒト抗体が生成されるようなイソタイプスイッチから、結果として生じ得る。そのようなイソタイプスイッチされたヒト配列抗体はしばしば、典型的には可変領域に、特に二次的な（引き続く）抗原チャレンジに続く、抗原によるB細胞の親和性突然変異および選択の結果として、しばしば CDR の約10残基内で、1 またはそれ以上の体細胞突然変異を含む。これらの高親和性ヒト配列抗体は、少なくとも $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、典型的には少なくとも $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、しばしば $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ より上、時には $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ またはそれ以上の結合親和性を有することができる。そのような高い親和性ヒト配列抗体は、ヒト抗原、例えばヒト CD4等のヒト巨大分子（例えばヒト膜通過または細胞表面蛋白質または他の細胞表面抗原）に対して高い結合親和性を有して、作られ得る。

20

そのようなマウスからのB細胞は、ヒト蛋白質たとえば CD4 等を含む種々の抗原に対してモノクローナル高親和性（ $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ より上）のヒト配列抗体を発現するハイブリドーマを生じるのに使用され得る。これらのハイブリドーマは、予め決められたヒト抗原への結合について、少なくとも $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) を有する免疫グロブリンを含む組成物を生じるために使用され得る。ここで、前記免疫グロブリンは、つぎのものから成る：

30

ヒト配列軽鎖であって、(1)ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖可変領域および(2)ヒト C_L 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖定常領域を含むヒト配列軽鎖；および

40

ヒト配列重鎖であって、(1)ヒト V_H 遺伝子セグメント、任意的に

【数 7 8】

(79)

はD領域、およびヒト J_H セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む重鎖可変領域および(2)ヒト C_H 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む定常領域を含むヒト配列重鎖。

しばしば、ヒト配列重鎖およびヒト配列軽鎖は、ヒト重鎖トランスジーンおよびヒト軽鎖トランスジーンによって、それぞれ別々にエンコードされ、マウス細胞のゲノムに組込まれる。しかしながら、両方の鎖が単一のトランスジーン上にエンコードされ得るか、または一方もしくは両方の鎖が多重トランスジーン上にエンコードされ得る。多重トランスジーンは、例えば、マウス生殖細胞におけるヒト重鎖トランスジーンと同じ遺伝子座で、組込まれていないV_H 配置を含む YA C から V 遺伝子セグメントを誘導したヒト重鎖トランスジーン (例えばHC2) である。

10

20

1つの実施態様において、組成物は、K定常領域を有するヒト配列軽鎖およびγ定常領域を有するヒト配列重鎖を含む免疫グロブリンを含む。

マウス (およびそれから誘導されたハイブリドーマ) は、予め決められたヒト抗原への結合について少なくとも $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) を有する免疫グロブリンのための供給源である。ここで、該免疫グロブリンは、次のものから成る：

30

ヒト配列軽鎖であって、(1)ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖可変領域および(2)ヒト C_L 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖定常領域を含むヒト配列軽鎖；および

ヒト配列重鎖であって、(1)ヒト V_H 遺伝子セグメント、任意的にはD領域、およびヒト J_H セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む重鎖可変領域および(2)ヒト C_H 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む定常領域を含むヒト配列重鎖。

40

本発明は、次のものを含むトランスジーンマウスを提供する：機能的

【数 7 9】

(80)

に分断された内因性の重鎖対立遺伝子のホモ接合の組、機能的に分断された内因性の軽鎖対立遺伝子のホモ接合の組、ヘテロガス免疫グロブリン軽鎖トランスジェーンの少なくとも1のコピー、およびヘテロガス免疫グロブリン重鎖トランスジェーンの少なくとも1のコピー。ここで、該動物は、ヒト抗原との免疫に続いて抗体応答をし、抗体応答は、予め決められたヒト抗原への結合について少なくとも $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) を有する免疫グロブリンを含み、該免疫グロブリンは、次のものから成る：

10

ヒト配列軽鎖であって、(1)ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖可変領域および(2)ヒト C_L 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む軽鎖定常領域を含むヒト配列軽鎖；および

20

ヒト配列重鎖であって、(1)ヒト V_H 遺伝子セグメント、任意的にはD領域、およびヒト J_H セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む重鎖可変領域および(2)ヒト C_H 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列と実質的に同一のポリペプチド配列を含む定常領域を含むヒト配列重鎖。

30

そのようなトランスジェニックマウスは、ヒトの少なくとも1の体細胞系上に存在するヒトの表面もしくは膜通過蛋白質に結合するところのヒト配列免疫グロブリンを生成することができ、ここで、免疫グロブリンは、 $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \sim 1.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性定数 (K_a) で、該ヒトの表面もしくは膜通過蛋白質に結合する。そのようなヒトの表面もしくは膜通過蛋白質の1例はCD4であるが、他のものが所望の免疫原として使用され得る。

予め決められた抗原に対する高親和性のヒト配列抗体の発生は、組込まれたヒト免疫グロブリントランスジェーンを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスにおいてヒト可変領域遺伝子セグメントのレパートリーを広げるための方法によって促進され、該方法は、該組込まれたヒ

40

ト免疫グロブリントランスジェーンに存在しないV領域遺伝子セグメントを含むv

【数 8 0】

(81)

遺伝子トランスジーンをゲノムに導入することを含む。しばしば、このV領域トランスジーンは、ヒトゲノムに自然に生じ得るような、または組換え法によって別々にスプライスされ得るような、ヒトのV_HまたはV_L (V_K) 遺伝子セグメント配置の部分を含む、酵母の人工的な染色体であり、これは、適切でない (out-of-order) または省略されたV遺伝子セグメントを包含し得る。しばしば、少なくとも5またはそれ以上の機能的v遺伝子セグメントがYACに含まれる。この変形において、Vレパートリー拡張法 (V-repertoire expansion method) によって生成されたトランスジェニックマウスを作ることが可能であり、ここで、マウスは、V領域トランスジーンに存在するV領域遺伝子セグメントによってエンコードされた可変領域配列およびヒトIgトランスジーンにエンコードされたC領域を含む免疫グロブリン鎖を発現する。vレパートリー拡張法によって、少なくとも5の明瞭なV遺伝子を有するトランスジェニックマウスが生成されることができ、また、少なくとも約24のv遺伝子またはそれ以上を有するマウスが生成され得る。もちろん、いくつかのV遺伝子セグメントは非機能的であることができ (例えば偽遺伝子等)、これらのセグメントは保持されることができ、または所望なら当業者に入手可能な組換え法により削除されることができる。

マウス生殖細胞系が、JおよびC遺伝子セグメントを含むヒトIgトランスジーンにおいて実質的に存在しない、拡張されたVセグメントレパートリーを有する機能的YACを含むように処理されたなら、形質は増殖され、他の遺伝子バックグラウンドへと繁殖され得る。他の遺伝子バックグラウンドは、拡張されたVセグメントレパートリーを有する機能的YACが、異なるヒトIgトランスジーンを有するマウス生殖細胞系へと繁殖されるところのバックグラウンドを包含する。拡張されたVセグメントレパートリーを有する多重の機能的YACは、生殖細胞系へと繁殖されて、ヒトIgトランスジーン (または多重ヒトIgトランスジーン) と共に働き得る。ここで、YACトランスジーンと称するけれども、ゲノムに

組込まれたときそのようなトランスジーンは、酵母の配列を実質的に欠き得る。それは、例えば酵母での自律性の複製に必要とされる配列であり、そのような配列は、もはや必要ではない、酵母での複製後に (すなわち、マウスES細胞または

【数 8 1】

(82)

マウスプロザイゴート(prozygote)に導入されるに先立って)、遺伝子工学(例えば制限消化およびパルス場ゲル電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis)または他の適当な方法)によって任意的に除去され得る。

本発明はまた、ヒト配列免疫グロブリン発現の形質を増殖させる方法を提供し、この方法は、ヒトIgトランスジーンを有し、かつ拡張されたVセグメントレパートリーを有する機能的YACを任意的にまた有するトランスジェニックマウスを繁殖させることを含む。V_HおよびV_L遺伝子セグメントの両方が、YACの上に存在し得る。トランスジェニックマウスは、実行する人が所望する任意のバックグラウンドへと繁殖され得、このバックグラウンドは、ヒトIgトランスジーンおよび/または他のヒトリンパ球蛋白質をエンコードするトランスジーンを含む、他のヒトトランスジーンを収容するバックグラウンドを包含する。

10

20

本発明はまた、拡張されたV領域レパートリーYACトランスジーンを有するトランスジェニックマウスにより生成された高親和性ヒト配列免疫グロブリンを提供する。

上記に本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様を記載したけれども、他の態様は本明細書の開示により、そしてより特定的には実施例に記載のトランスジーンにより定義される。トランスジェニック動物の4つのカテゴリーが定義され得る

30

I. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジーンと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジーンとを含有するトランスジェニック動物。

II. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジーンと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジーンとを含有するトランスジェニック動物。

III. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジーンと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジーンとを含有するトランスジェニック動物。

40

IV. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジーンと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジーンとを含有するトランスジェニック動物。

トランスジェニック動物の上記カテゴリーの好ましい優先順序は、内因性軽鎖遺伝子(または少なくともκ遺伝子)が相同組換え(または他の方法)により破

【数 8 2】

(83)

壊されている場合にはII>II>III>IVであり、そして内因性軽鎖遺伝子が破壊されておらず且つ対立遺伝子排除により優性になるに違いない場合には I>II>III>IVである。

先に議論したように、本発明は、ヒトの疾病の処置において有用なヒト配列モノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体の治療上の使用は、例えばラリックおよびボーク、Journal of Biological Response Modifiers, 5 : 379-393 において議論されている。ヒトモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、癌、感染症、移植組織の拒絶、血液障害例えば凝固障害、および他の疾病の処置を包含する。

10

本発明の抗体は、蛋白質の送り出しについて医療分野で公知の任意の方法により、患者に投与され得る。抗体は、非経口投与（すなわち皮下、筋肉内、または静脈内投与）に特に適している。本発明の薬剤組成物は、代替的薬剤送り出しアプローチを用いた投与にまた適している（例えばランガー、サイエンス、249 : 1527-1533(1990)）。

20

非経口投与のための薬剤組成物は通常、受け入れ可能な担体、好ましくは水性担体中に溶解されたモノクローナル抗体の溶液を含む。種々の水性担体が使用でき、例えば水、緩衝された水、0.4%塩水、0.3%グリシンなどである。これらの溶液は、無菌であり、一般に微粒子物質を含まない。これらの組成物は、慣用の公知の滅菌技術によって滅菌され得る。組成物は、適当な生理的条件に必要とされるような、薬剤的に受け入れ可能な補助的物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、緊張調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含むことができる。これらの処方における抗体の濃度は、広く変わり得る。すなわち、約 0.5 重量%より下から、通常0.1 重量%以上、1.5 または 2.0 重量%までであり、選択された投与の

30

40

特定の様式にしたがって、第1に流体体積、粘度などに基づいて選択されるであろう。非経口投与可能な組成物を実際に調製する方法は、当業者に公知であるかまたは明らかであり、より詳細には、例えばレミントンの薬学科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)、第17版、マックパブリッシングカンパニー、

【数 8 3】

(84)

イーストン、ペンシルバニア(1985)に記載されている。

本発明の抗体またはその混合物を含む組成物は、予防的および／または治療的処置のために投与されることができる。治療的施与において、組成物は、治療するのに十分な量、または感染およびその合併症を少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で患者に投与される。これを成し遂げるのに適切な量は、「治療的に有効な投与量」として定義される。この使用のために有効な量は一般に、約0.05 mg/kg体重～約5 mg/kg体重、好ましくは約0.2 mg/kg体重～約1.5mg/kg体重の範囲である。

10

いくつかの例においては、本発明の免疫グロブリン分子を変性してその生物学的活性を変化させることが望ましいであろう。例えば、免疫グロブリンは、直接または間接に、他の化学療法薬と一緒にすることができる。種々の化学療法薬が標的にするために一緒にされ得る。例えば、一緒にされ得る抗炎症剤は、免疫調節薬、血小板活性化因子（PAF）拮抗剤、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤およびロイコトリエン拮抗剤を包含する。いくつかの好ましい部分は、シクロスポリンA、インドメタシン、ナプロキセン、FK-506、マイコフェノール酸等を含む。同様に、抗酸化剤例えばスーパーオキシドジスムターゼが、リパーヒュージョン障害（reperfusion injury）の処置において有用である。同様に、抗がん剤たとえばダウノマイシン、ドキソルビシン、ビンブラスチン、ブレオマイシン等が標的にされ得る。

20

30

本発明のモノクローナル抗体はまた、患者の部位に対して両親媒性のもの（例えばリポソーム）を標的にするのに使用され得る。これらの調製において、受け渡しされるべき薬剤が、ヒトモノクローナル抗体が埋

め込まれるところのリポソームの部分として組込まれる。

40

本発明のヒト配列モノクローナル抗体は、それらが向けられた、予め決められた抗原に特異的に結合するので、有用である。予め決められた抗原がヒト抗原（すなわち、ヒト蛋白質またはそのフラグメント）であるとき、本発明のヒト免疫グロブリンがまた非ヒト動物、特に薬剤試験（例えば生物学的活性、薬物動態学および安全の臨床前試験）のためによく使用される動物で見出されたコグネイト

【数 8 4】

(85)

抗原に結合するなら、それは時には有利である。これらの動物は、マウス、ウサギ、ラット、イヌ、ブタ、および特に非ヒト霊長類例えばチンパンジー、無尾猿(ape)および猿(monkey) (例えばレサスモンキー(Rhesus monkey)およびシノモルガスモンキー(cynomolgus monkey))を含む。実験動物において抗原を認識する能力は、免疫グロブリンの生物分布での特異的結合の効果を測定するのに特に有用である。コグネイト抗原は、(i) ヒト抗原と実質的に同様の構造 (例えばアミノ酸配列) を有する (すなわち、動物のコグネイト蛋白質のアミノ酸配列は、典型的にはヒト蛋白質に少なくとも約50%同一、通常少なくとも約70%同一、およびしばしば少なくとも約80%またはそれ以上同一である) ; (ii) ヒト抗原と実質的に同じ機能を有する ; および(iii)ヒト抗原と同じ細胞区画にしばしば見出されるところの抗原である。ヒトおよび動物のコグネイト抗原は、典型的には (いつもではないが) 同じ名前を有する。コグネイト抗原の例は、ヒトチューブリンおよびマウスチューブリン、ヒト CD4 およびレサス(Rhesus)CD4およびヒト IgG およびラット IgG を含む。

10

20

別の観点では、本発明は、人工遺伝子によってエンコードされた少なくとも1のポリペプチドを有する抗原結合ヒトmABを提供する。人工遺伝子は、細胞誘導された鋳型核酸ストランド (例えば細菌性の細胞または免疫もしくはハイブリドーマ細胞から得られた核酸鋳型) および人工遺伝子の (複製を経た) 子孫を必要としない化学的または酵素的な方法によってイン ビボで合成された、ポリペプチドをエンコードする核酸セグメント、すなわち完全に合成された核酸を含む。

30

短い核酸をプライマー、リンカー等として使用することは遺伝子工学においてルーチンであるが、化学的および／または酵素的な手段によって、30、50またはそれ以上の塩基を長さにする、完全に合成の蛋白質をエンコードする核酸を生成することがまた可能である。本発明の人工遺伝子は、合成核酸領域と細胞誘導核酸領域との両方を含み得る。人工遺伝子の合成核酸領域は一般に、少なくとも約50塩基、しばしば少なくとも約100塩基、典型的には少なくとも約200塩基、よりたびたびには少なくとも約250塩基、通常300塩基または400塩基より多い塩基の長さがある。典型的には、合成核酸領域は、可変遺伝子セグメントまたはその部

40

【数 8 5】

(86)

分例えば CDR領域をエンコードし、定常領域は、細胞誘導された核酸によってエンコードされる。免疫グロブリンポリペプチド（すなわち、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖）は、ポリペプチドをエンコードする人工遺伝子を用いて簡便に発現され得る。通常、人工遺伝子は、転写プロモーター配列、例えば免疫グロブリン遺伝子からまたはウィルス（例えばSV40、CMV、HIV、RSV）またはハイブリッドプロモーターから誘導されたプロモーター配列に動作可能に結合される。人工遺伝子は、他の配列例えばポリアデニル化配列およびイントロンにもまた結合され得る。免疫グロブリンポリペプチドを発現するための1つの方法は、免疫グロブリンポリペプチドの1つの領域（例えば可変領域またはその部分）をエンコードする合成核酸を、残留するセグメントまたは免疫グロブリン鎖の部分（例えば μ 、 γ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 δ 、 ε 、 α_1 、 α_2 定常領域）、および任意的にプロモーター（例えば CMV（サイトメガロウィルス）プロモーター）、ポリアデニル化もしくは他の配列をエンコードするベクターへ挿入することを含む。そのようなベクターは、細胞に導入されると、ベクター配列の細胞性転写および翻訳が免疫グロブリンポリペプチドをもたらすように構成される。

10

20

機能的ヒト配列免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子およびポリペプチドは、人工遺伝子を用いて構成され、予め決められた抗原に特異的に結合するような所望の特異性を有する免疫グロブリンを生成するため

30

に使用され得る。これは、予め決められた抗原で免疫されたトランスジェニック動物からの細胞またはその動物から誘導されたハイブリドーマによって発現されたポリペプチドと実質的に同様の免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする人工遺伝子を構成することによって達成される。かくして、本発明は、免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする人工遺伝子および、人工遺伝子を用いてヒト配列免疫グロブリンを生成する方法を提供する。

40

この方法に従って、トランスジェニック動物（例えば、機能的に分断された内因性の重鎖対立遺伝子のホモ接合の組、機能的に分断された内因性の軽鎖対立遺伝子のホモ接合の組、ヒト免疫グロブリン軽鎖トランスジェンの少なくとも1つのコピー、およびヒト免疫グロブリン重鎖トランスジェンの少なくとも1つの

【数 8 6】

(87)

コピーを有するトランスジェニックマウス) が、予め決められた抗原、例えばヒト蛋白質で免疫される。核酸、好ましくは mRNA は次に、集められまたは、免疫グロブリン遺伝子転位が起こるところの細胞または細胞集団から分離され、免疫グロブリンの重鎖および／または軽鎖（特に V セグメント）をエンコードする核酸又はその部分の配列が決定される。この配列情報は、人工遺伝子の配列のための基礎として使用される。

10

配列の決定は一般に、興味ある遺伝子または cDNA の少なくとも部分、例えば転位されたヒトトランスジーンまたは免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする対応する cDNA の部分の分離を必要とする。通常、これは、ヒト免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする DNA、または好ましくは mRNA (すなわち cDNA) のクローニングを必要とする。クローニングは、標準の技術（例えばサンプルックら、(1989年)、モレキュラークローニング: ア ラボラトリーガイド、第1-3巻、コールド スプリングハーバープレスを見よ）を用いて行う。例えば、cDNA ライブラリーは、ポリA⁺ mRNA、好ましくは膜結合mRNA、および免疫グロブリンポリペプチド遺伝子配列に特異的なプローブを用いてスクリーニングされたライブラリーの逆転写によって構成される。しかしながら、好ま

20

しい実施態様において、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) が、興味のある免疫グロブリン遺伝子セグメント（例えば軽鎖可変セグメント）をエンコードする cDNA（または全長さの cDNA の部分）の増幅に使用される。ヒト免疫グロブリンポリペプチド遺伝子の配列は当業者に容易に入手可能なので、ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントを特異的にハイブリッド化するまたは増幅するプローブまたはPCRプライマーは容易に設計され得る。テイラーら、Nuc. Acids. Res., 20: 6287 (1992年) を見よ。さらに、トランスジェニックマウスのヒトトランスジーンの配列はしばしば、実施する人には公知であり、プライマー配列は、トランスジーンの適当な領域にハイブリッド化するように選択され得る。増幅された配列は、任意の適当なベクターたとえば発現ベクター、ミニジーンベクター、またはファージ表示ベクターへと、容易にクローン化され得る。興味のある免疫グロブリンポリペプチドのある部分の配列を決定することが可能である限りは、使

30

40

【数 8 7】

(88)

用される特定のクローン化の方法は重要ではないことが正しく認識される。ここで使用されるように、クローン化され、増幅され、標識を付けられた、またはさもなければ、興味のある核酸の配列が決定され得るようにバックグラウンド核酸から区別された核酸は、分離されたと考えられる。

クローニングおよび配列に使用されるRNAの1つの供給源は、トランスジェニックマウスからB細胞を得、かつB細胞を不死細胞に融合することによって製造されるハイブリドーマである。ハイブリドーマを使用する利点は、それらが容易にスクリーニングされ、興味のあるヒトモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマが選択されることである。あるいは、RNAが、免疫した動物のB細胞（または脾臓全部）から分離され得る。ハイブリドーマ以外の供給源が使用されるとき、特異的結合特性を有する免疫グロブリンまたは免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする配列についてスクリーニングするのが好ましい。そのようなスクリーニングの方法の1つは、ファージ表示技術の使用である。ファージ表示は、例えばダウアーら、国際特許出願W0 91/17271、マックカ

10

20

ファーティら、国際特許出願W0 92/01047、およびカトンおよびコプロウスキー、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6450-6454（1990年）に記載されている。ファージ表示技術を用いた1つの実施態様において、免疫されたトランスジェニックマウスからのcDNA（例えば全脾臓cDNA）が分離され、ポリメラーゼ鎖反応が、免疫グロブリンポリペプチドの部分、例えばCDR領域をエンコードするcDNA配列を増幅するのに使用され、かつ、増幅された配列は、ファージベクターに挿入される。興味のあるペプチド、例えば所望の結合特性を有する可変領域ペプチドをエンコードするcDNAは、パニング(panning)のような標準の技術によって同定される。

30

40

次に、増幅されたまたはクローン化された核酸の配列が決定される。典型的には、免疫グロブリンポリペプチドの可変領域全部をエンコードする配列が決定されるが、しかし、時には可変領域の部分、例えばCDRをエンコードする部分のみを配列することが適当であろう。典型的には、配列された部分は、少なくとも30塩基の長さであり、よりしばしば、可変領域の長さの少なくとも約3分の1また

【数 8 8】

(89)

は少なくとも約2分の1の長さについて基づいたコーディング (based coding) が配列されるであろう。

配列は、cDNAライブラリーから分離されたクローン上で、またはPCRが使用されるときは、増幅された配列のサブクローニングの後で、または増幅されたセグメントの直接PCR配列によって、行われることができる。配列は標準技術（例えばサンプブルックら、(1989年)、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーガイド、第1－3巻、コールド スプリング ハーバー プレスおよびサンガー、Fら、(1977年)、proc. Natl.Acad. Sci. USA 74:5463-5467を見よ）を用いて行われる。クローン化された核酸の配列を、ヒト免疫グロブリン遺伝子およびcDNAの公開された配列と比べることにより、配列された領域に依存して、(i)ハイブリドーマ免疫グロブリンポリペプチド（重鎖のイソタイプを含む）の生殖細胞系セグメント使用(usage)および(ii)重鎖および軽鎖可変領域

10

20

の配列（N-領域添加および体細胞突然変異のプロセスから生じた配列を含む）を、当業者は容易に決定することができる。免疫グロブリン遺伝子配列情報の1つの供給源は、ナショナルセンターフォーバイオテクノロジーインフォメーション、ナショナルライブラリーオブメディシン、ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス、ベセスダ、エムディーである。

30

代替的な実施態様においては、興味のある免疫グロブリンのアミノ酸配列は、直接蛋白質配列によって決定することができる。

免疫グロブリン発現遺伝子（すなわち、転位トランスジーン）の少なくとも一部分に一致するかまたは実質的に同様の配列を有する人工遺伝子を構成することができる。同様に、人工遺伝子は、転位トランスジーンの配列された部分によりエンコードされたポリペプチドに一致するかまたは実質的に同様であるところのポリペプチドをエンコードすることができる。遺伝子コードの縮重は同じポリペプチドが多重核酸配列によってエンコードされるのを許す。時には核酸配列を変えて、例えば制限部位を誘導する、コドンの使用(usage)を変えて特定の発現系を反映する、またはグリコシル化部位を除去することが望ましい。さらに、ハイブリドーマ配列における変化は、免疫グロブリンの特性（例えば結合特性）を変

40

【数 8 9】

(90)

えるために導入され得る。例えば、重鎖および軽鎖可変領域のCDR 領域において特に、予め決められた抗原にたいしての免疫グロブリンの親和性を増加するために、変化が導入される。

合成核酸を構成するための方法はよく知られている。完全に化学的合成が可能であるが、一般に混合した化学的-酵素的合成が行われ、この方法では、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドがライゲーション反応および／またはポリメラーゼ鎖反応に使用されて、より長いポリヌクレオチドを作り上げる。もっとも好ましい実施態様において、ポリメラーゼ鎖反応は、増幅の結果が人工遺伝子のために望ましい配列を有するDNA であるように選ばれたオーバーラッププライマーを用いて行われる。本発明のオリゴヌクレオチドは、固相または溶液中で合成され得る。一

10

20

般に、固相合成が好ましい。ホスファイトトリエステル、ホスホトリエステルおよびH-ホスホネート化学によるオリゴヌクレオチドの固相合成についての工程の詳細な記載は、広く入手可能である。例えば、イタクラ、米国特許第4,401,796号明細書；カルサーズら、米国特許第4,458,066号明細書および第4,500,707号明細書；ビユーケイジら、Tetrahedron Lett., 22:1859-1862；マッチューチら、J. Amer.Chem. Soc., 103:3185-3191 (1981年)；カルサーズら、Genetic Engineering, 4:1-17 (1982年)；ジョーンズ、第2章、アトキンソンら、第3章、およびスプロートら、第4章、ガイト編、オリゴヌクレオチド合成：アプラクティカル アプローチ、IRLプレス、ワシントンD. C.(1984年)；フレーラーら、Tetrahedron Lett., 27:469-472 (1986年)；フレーラーら、Nucleic Acids Res., 14:5399-5407 (1986年)；シンハラ、Tetrahedron Lett.,24:5843-5846 (1983年)；シンハラ、Nucleic Acids Res., 12:4539-4557 (1984年)を見よ。

30

40

人工遺伝子は細胞に導入され、発現されて、免疫グロブリンポリペプチドを生成することができる。発現のための細胞タイプの選択は、多くの要因（例えば所望される蛋白質グリコシル化のレベル）に依存するが、ヒト免疫グロブリンを分泌することができる細胞が好ましい。特に好ましい細胞は、CHO細胞およびミエ

【数 9 0】

(91)

ローマ誘導細胞例えばSP20およびNS0細胞系を含む。標準の細胞培養はよく知られており、また、ニューマンら、Biotechnology, 10:1455-1460 (1992年) ; ベビントンら、Biotechnology, 10:169-175 (1992年) ; コケットら、Biotechnology, 8:662-667(1990年);カーターら、Biotechnology,10:163-167 (1992年) に記載されている。核酸例えば人工遺伝子の導入方法はよく知られており、トランスフェクション (例えばエレクトロポレーションによってまたはリポソームが媒介する) および形質転換を含む。導入された遺伝子の発現のためのシステムは、一般に、サムブルックらの上記の文献に記載されている。

10

免疫グロブリン (例えば IgG分子) がイン ビボで生成されるように、同じ細胞中で2つの免疫グロブリンポリペプチド (すなわち、重鎖および軽鎖) を発現することがしばしば望ましい。したがって、2つの人工遺伝子 (すなわち、1つは重鎖をエンコードし、1つは軽鎖をエンコードする) を細胞に導入するのが時には望ましい。(この2つの人工遺伝子は単一のベクター上に導入され得る。)あるいは、1つの免疫グロブリンポリペプチドをエンコードする1つの人工遺伝子が、遺伝子的に操作されて他の免疫グロブリンポリペプチドを発現する細胞に導入され得る。

20

人工遺伝子がトランスフェクトされた細胞が増殖すると、人工遺伝子の合成核酸部分全部が、複製および転写のための鋳型としてふるまうことが明らかである。それにもかかわらず、子孫の遺伝子は、合成核酸由来であったであろう (すなわち、細胞誘導鋳型核酸ストランドを必要としない、化学的または酵素的方法によってインビトロで合成された、ポリペプチドをエンコードする核酸分子)。そして、ここで使用されているように、これはまた、人工遺伝子と考えられる。かくして、ハイブリドーマの、発現されたトランスジーンに対する人工遺伝子の合成部分の関係は、情報的結合 (すなわち、配列情報) はあるが、直接物理的結合はないところのものである。

30

40

本発明はまた、治療的および診断的な適用において、特にヒトの疾病の処置において有用な、抗 CD4 モノクローナル抗体を提供する。CD4は、胸腺細胞およびT細胞にまず発現される細胞表面蛋白質であり、これは、T細胞機能および抗原

【数 9 1】

(92)

の MHC クラスII認識に含まれる。CD4 に向けられた抗体は、CD4 細胞の活性を減らすようにふるまい、かくして、望まない自己免疫反応、炎症性の応答および移植した器官の拒絶を減らす。

実際に、抗 CD4 mAb の投与は、動物モデルにおいて、自己免疫疾患を防ぐ（ウォーフジーら、J. Exp. Med., 161:378-391 (1985年)) または逆転させる（ウォーフジーら、J. Immunol., 138:3247-3253(1987年)、ワルダーら、サイエンス、227:415-417 (1985年)) ことが示された。ネズミまたはキメラの抗 CD4 mAb の、リュウマチ様の関

10

節炎患者への投与は、臨床的恩恵を示した（ノックスら、Blood, 77:20-30 (1991年)；ゴールドベリーら、J. Autoimmunity, 4:617-630；ヘルツォグら、ランセット、ii:1461-1462；ホーネフら、Arthritis Rheum.,34:129-140；ライターら、Arthritis Rheum.,34:525-536；ウエンディングら、J. Rheum., 38:325-327；ファンデル ルツベラ、ArthritisRheum.,38:1097-1106；ファンデル ルツベラ、Arthritis Rheum., 36:1375-1379；モアランドら、Arthritis Rheum., 36:307-318およびチョイら、Arthritis andRheumatism, 39(1):52-56 (1996年))。さらに、上記したように、キメラ抗 CD4 mAbは、菌状息肉症の患者においていくらかの臨床的効力を示した（ノックスら、(1991年) Blood, 77:20)。抗 CD4 抗体はまた、ニューマンら、バイオテクノロジー、10:1455-1460 (1992年) において議論されている。

20

30

実施例

方法および材料

トランスジェニックマウスは、Ilogan ら、“Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual”，Cold Spring Harbor Laboratory（これは参考として本明細書中に組み込まれる）に従って誘導される。

40

胎児性幹細胞は、発表された方法に従って操作される [Terato- carcinomas and embryonic stem cells : a practical approach, E.J. Robertson編, IRL, Press, Washington, D.C., 1987；Zijlstraら、Nature 342: 435-438 (1989)およびSchwartzberg, P.ら、Science 246:799-803 (1939)；この各々は参考とし

【数 9 2】

(93)

て本明細書中に組み込まれる]。

DNAクローニング方法は、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (これは参考として本明細書中に組み込まれる) に従って実施される。

10

オリゴヌクレオチドは、製造業者により与えられた規格書に従ってApplied Biosystemsのオリゴヌクレオチド合成装置上で合成される。

ハイブリドーマ細胞および抗体は、“Antibodies: A Laboratory Manual”, Haralow およびDavid Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory 1988) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) に従って操作される。

20

実施例 1

ゲノム重鎖ヒトIgトランスジーン

この実施例は、マウスの接合子中にマイクロインジェクトされるヒトゲノム重鎖免疫グロブリントランスジーンのコローニングとマイクロインジェクションを記載する。

Marzluff, W.Fら、“Transcription and Translation: A Practical Approach”, B.D. Hammes およびS.J. Higgins編, 89-129頁, IRL Press, Oxford(1985)により記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核 (またはPBSで洗浄したヒト精母細胞) を低融点アガロース母材中に埋め込み、EDTAとプロテイナーゼKで溶解せしめて高分子量DNAを暴露させ、このDNAを次いでM. FinneyによりCurrent Protocols in Molecular Biology(F. Ausubelら編, John Wiley & Sons, 増補4版, 1998, 第2.5.1 章) 中に記載された通りにアガロース中で制限酵素Not Iで消化する。

30

次いでNot I消化されたDNAを、Anand, R. ら、Nucl. Acids Res., 17:3425-3433 (1989) により記載されたようにパルスフィールドゲル電気泳動により分画する。Not I断片に富む画分をサザンブロットハイブリダイゼーションによりアッセイし、この断片によりコードされる1または複数の配列を検出する。そのような配列は、重鎖Dセグメント、Jセグメント、 μ および γ 1定常領域と一緒に

40

【数 9 3】

(94)

に8種のV_H ファミリーの全部の代表物を含む〔この断片は、Bermanら (1988) 前掲によりHeLa細胞から870 kb断片として同定されているが、本発明者らはヒト胎盤および精子DNAからは830 kb断片としてであることを発見した〕。

このNot I断片を含む画分 (図4参照) をプールし、そして酵母細胞中のベクターpYACNNの Not I部位にクローニングする。プラスミドpYACNNは、pYAC-4 Neo [Cook, H.ら、Nucl. Acids Res. 16:11817 (1988)] をEcoRIで消化しそしてオリゴヌクレオチド5′ -AAT TGC GGC CGC- 3′ の存在下で連結せしめることにより調製する。

10

Brownsteinら(1989), Science, 244, 1348-1351およびGreen. E. ら、Proc Natl. Acad. Sci. USA 87:1213-1217 (1990) (これらは参考として本明細書中に組み込まれる) により記載されたようにして、重鎖 Not I 断片を含む YACクローンを単離する。M. Finncy. (前掲) により記載されたパルスフィールドゲル電気泳動により、高分子量酵母DNAからクローン化 Not I 挿入断片を単離する。1Mmのスベルミンの添加によりこのDNAを凝縮させ、上述の単細胞胚の核に直接マイクロインジュクトする。

20

実施例2

30

生体内相同組換えにより形成されるゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジーン

ヒトκ軽鎖の地図はLorenz. Wら、Nucl. Acids Res. 15:9667-9677 (1987) に記載されており、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

全てのCκ、3′ エンハンサー、全てのJセグメントおよび少なくとも5つの異なるVセグメントを含む450 kbの XhoI-Not I断片を実施例1に記載の如く単離し、そして単一の細胞胚の核の中にマイクロインジュクトする。

40

実施例3

生体内相同組換えにより形成されるゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジーン

前記成分の全部と少なくとも20個多いVセグメントとを含む750 kb Mlu I-Not I断片を実施例1に記載の如く単離し、そしてBssHIIで消化して約400 kbの断片を生産せしめる。

【数 9 4】

(95)

450 kb Xho I—Not I断片と約400 kb MluI—BssHII断片は、Bss H II制限部位とXho I制限部位とにより限定される配列重複を有する。マウス接合子のマイクロインジェクションによるそれらの2断片の相同組換えは、450 kb Xho I/Not I断片（実施例2）中に見つかるものよりも少なくとも15～20個追加のVセグメントを含むトランスジーンをもたらす。

10

実施例 4

重鎖小遺伝子座の作製

A. pGP1およびpGP2の作製

pBR322をEcoRI とSFtyIで消化し、下記のオリゴヌクレオチドと連結せしめることにより、図8に記載の制限部位を有する147塩基対の挿入断片を含むpGP1を作製する。それらのオリゴの概括的重複は図9にも示される。

20

オリゴヌクレオチドは下記のものである：

オリゴー1 5′ —CTT GAG CCC GCC TAA TAG GCG GGC TTT TTT TTG CAT ACT
GCG GCC—3′

オリゴー2 5′ —GCA ATG GCC TGG ATC CAT GGC GCG CTA GCA TCG ATA TCT
AGA GCT CGA GCA—3′

オリゴー3 5′ —TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG CTT ACG CGT ACT
AGT GCG GCC GCT—3′

30

オリゴー4 5′ —AAT TAG CGG CCG CAC TAG TAC GCG TAA GCT TGG TAC CCG
GGA ATT—3′

オリゴー5 5′ —CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA TCG ATG CTA GCG
CGC CAT GGA TCC—3′

オリゴー6 5′ —AGG CCA TTG CGC CCG CAG TAT GCA AAA AAA AGC CCG CTC
ATT AGG CGG GCT—3′

40

このプラスミドは、マイクロインジェクション用のベクター配列から単離することができる大挿入断片を構築するための、稀少な切断性Not I部位により隣接された大きなポリリンカーを含む。このプラスミドは、pUC 系プラスミドに比べて比較的低コピー数であるpBR322に由来する（pGP1は複製開始点の近くにpBR322

【数 9 5】

(96)

コピー数調節領域を保持している)。低コピー数は挿入配列の潜在的毒性を減少させる。加えて、pGP1は、アンピシリン耐性遺伝子と前記ポリリンカーとの間に挿入された、trp由来の強力な転写ターミネーター配列〔Christie, G. E. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180 (1981)〕も含む。これは、アンピシリンプロモーターから起こる読み通し転写を防ぐことにより、或る種の挿入断片に係する毒性を減少させる。

10

プラスミドpPG2は、ポリリンカー中に追加の制限部位 (Sfi I) を導入するようにpGP1から誘導される。pGP1をMluIと SpeIで消化し、該プラスミドのポリリンカー部分の中の認識配列を切除する。

このように消化されたpGP1に次のアダプターオリゴヌクレオチドを連結せしめてpPG2を作製する。

20

5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3'

5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3'

pPG2は MluI部位と Spe I部位の間に置かれた追加のSfiI部位を含むこと以外はpGP1と同じである。これは挿入断片をSfiIで並びにNot Iで完全に切除することを可能にする。

30

B. pRE3 (ラットエンハンサー 3') の作製

ラット定常領域の下流に置かれたエンハンサー配列を重鎖構成物中に導入する。

Petterssonら、Nature 344:165-168 (1990) により記載された重鎖領域 3' エンハンザーを単離し、クローニングする。次のオリゴヌクレオチド

5' CAG GAT CCA CAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

40

を使って、ラットIGH 3' エンハンサー配列をPCR増幅せしめる。

こうして形成された 3' エンハンサーをコードする二本鎖DNAをBamHIとSphIで切断し、BamHI/SphIで切断されたpPG2中にクローニングしてpRE3 (ラットエンハンサー 3') を得る。

C. ヒトJ- μ 領域のクローニング

【数 9 6】

(97)

この領域の実質的部分を、 λ ファージ挿入断片から単離された2以上の断片を組み合わせてることによりクローニングする。図9を参照のこと。

オリゴヌクレオチド GCA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATGTCT GGG GCCA AG を使って、全部のヒト μ セグメントを含む6.3 kb BamHI/HindIII 断片 [Matsuda ら、BMBO J. 7:1047-1051 (1988) : Ravetech ら、Cell 27:583-591 (1981)、これらは参考として本明細書中に組み込まれる] をヒトゲノムDNAライブラリーから単離する。

10

オリゴヌクレオチド CAC CAA GTT GAC CAG CCT GGT CAC AGA CCTGAC CAC CTA

TGAを使って、エンハンザー、スイッチおよび定常領域コードエクソンを含む隣接の10 kb HindIII/BamHI 断片 [Yasui ら、Eur. J. Immunol. 19:1399-1403 (1989)] を同様にして単離する。

20

プローブとしてクローンpMUM挿入断片 (pMUMは、 μ 膜エクソン1オリゴヌクレオチド:CCT GTG GAC CAC CGC CTC CAC CTT CAT CGT CCT CTT CCT CCTを使ってヒトゲノムDNAライブラリーから単離された4 kb EcoRI/HindIII断片である) を使って隣接の3' 1.5 kb BamHI 断片を同様に単離し、そしてpUC19中にクローニングする。

pGP1をBamHIとBgl IIで消化した後、子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する。

30

図9からの断片 (a) および (b) を前記消化pGP1中にクローニングする。次いで5' BamHI部位が BamHI/Bgl II融合により破壊されるように置かれたクローンを単離する。それをpMU と命名する (図10参照)。pMU をBamHI で消化し、図9からの断片 (c) を挿入する。HindIII 消化により方向性を確認する。生じたプラスミドpHIG1 (図10) は、およびC μ セグメントをコードする18 kb 挿入断片を含有する。

40

D. C μ 領域のクローニング

pGP1をBamHI とHindIIIで消化し、次いで子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する (図14)。このように処理された図14の断片 (b) および図14の (c) を、BamHI/HindIIIで切断したpGP1中にクローニングする。HindIII消化により

【数 97】

(98)

断片 (c) の正しい方向を確認し、C μ 領域をコードする12 kb 挿入断片を含む pCONIを得る。

PHIGIは、Not I部位により隣接されたポリリンカー—中にSfiI 3' 部位と S peI 5' 部位を有する18 kb挿入断片内にJセグメント、スイッチおよび μ 配列を含む故に、再配列されたVDJセグメントに使われるだろう。pCONIはJ領域を欠き12 kb 挿入断片のみを含むこと以外はpHIGIと同じである。再配列されたVDJセグメントを含む断片の作製におけるpCONIの使用については後で記載す

10

る。

E. $\gamma - 1$ 定常領域のクローニング (oREG2)

ヒト $\gamma - 1$ 領域のクローニングは図16に描写される。

20

Yamamuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156 (1986) は、組込み時に部分的に削除されたトランスジーン構成物からの膜結合ヒト $\gamma - 1$ の発現を報告している。彼らの結果は、3' BamHI 部位が、5kb未満のV-Cイントロンを有する経膜再配列されそしてスイッチされた γ 遺伝子コピーを含む配列の輪郭となることを指摘している。従って、再配列されていないスイッチされていない遺伝子では、最初の $\gamma - 1$ 定常エクソンの5' 末端から5 kb未満のところで始まる配列中にスイッチ領域全体が含まれる。

30

従ってそれは5' 5.3 kb Hind III 断片中に含まれる [Ellison, J.W. ら、Nucleic Acids Res. 10:4071-4079 (1982) ;これは参考として本明細書中に組み込まれる]。Takahashiら、Cell 29:671-679 (1982) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) もまた、この断片がスイッチ配列を含むことを報告しており、この断片と7.7 kb Hind III-BamHI断片とを合わせると我々がトランスジーン構成物に必要とする配列の全部を含むに違いない。イントロン配列は、特定遺伝子のイントロン中に存在する少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

40

$\gamma - 1$ の第三エクソン (C_H 3) に特異的である次のオリゴヌクレオチドを使って、 $\gamma - 1$ 領域を含むファージクローンを同定し単離する。

5' TGA GCC ACG AAG ACC CTG AGG TCA AGT TCA ACT GGT ACG TGG 3'

【数 9 8】

(99)

7.7kb Hind III -Bgl II断片（図11中の断片（a））をHindIII/Bgl IIで切断されたpRE3中にクローニングしてpREG1を作製する。上流の5.3 kb Hind III断片（図11中の断片（b））をHindIII 消化されたpREG1中にクローニングしてpREG2を作製する。BamHI/Spe I消化により正しい方向を確かめる。

F. C γ とC μ の結合

10

上述したプラスミドpHIG1はヒト J セグメントとC μ 定常領域エクソンを含む。C μ 定常領域遺伝子セグメントを含むトランスジーンを提供するために、pHIG1をSfi Iで消化した（図10）。プラスミドpREG2 もSfi Iで消化し、ヒトC γ エクソンとラット 3' エンハンサー配列を含む13.5 kb挿入断片を得た。それらの配列を連結し、31.5 kb挿入断片上にヒトJ セグメント、ヒトC μ 定常領域、ヒトC γ 1 定常領域およびラット 3' エンハンサー配列を含むプラスミドpHIG3' を作製した（図12）。

20

pCON1 をSfi Iで消化し、そしてpREG2 をSfi Iで消化して得られたヒトC γ 領域とラット 3' エンハンサーとを含むSfi I 断片と連結せしめることにより、ヒトC μ およびヒトC γ 1 をコードするがJ セグメントを含まない第二のプラスミドを作製する。得られたプラスミドpCON（図12）は、ヒトC μ 、ヒト γ 1 およびラット 3' エンハンサー配列を有する20 kbの Not I/Spe I挿入断片を含有する。

30

G. Dセグメントのクローニング

ヒトDセグメントをクローニングするための方策は図13に描写される。Dセグメントを含むヒトゲノムライブラリーからのファージクローンを、多様性領域配列〔Y. Ichihara ら、EMBO J. 7:4141-4150 (1988)〕に特異的なプローブを使って同定しそして単離する。次のオリゴヌクレオチドを使用する。

40

OXP1: 5' -TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT AAC CAC AGT GTC
-3'

DXP4: 5' -GCC TGA AAT GGA GCC TCA GGG CAC AGT GGG CAC GGA CAC TGT
-3'

DN4: 5' -GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC GCA CCT GAC ACC

【数 9 9】

(100)

— 3′

オリゴ DXP1 を使って同定されたファージクローンから、DLR1, DXP1, DXP' 1 およびUA1を含む5.2 kb XhoI断片（図13中の断片（b））を単離する。

オリゴ DXP4 を使って同定されたファージクローンから、DXR4,0A4およびOK4を含む3.2 kb Xba I断片（図13中の断片（c））を単離する。

10

図13中の断片（b）, （c）および（d）を結合し、pGP1のXba I/Xho I部位中にクローニングして、10.6 kb挿入断片を含むpHIG2 を形成せしめる。

このクローニングは連続的に行われる。まず、図13の5.2 kb断片（b）と図13の2.2 kb断片（d）を子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてXho IとXba Iで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたクローンを該5.2 kbおよび2.2 kb挿入断片を用いてスクリーニングする。5.2 kbおよび2.2 kb挿入断片での試験に陽性であるそれらのクローンの半分が、BamHI 消化により確かめると正しい方向で5.2 kb挿入断片を有する。次いで図13の3.2 kb Xba I断片を、断片（b）と（d）を含むこの中間プラスミド中にクローニングし、pHIG2 を形成せしめる。このプラスミドは、ユニーク 5′ Sfi I部位とユニーク 3′ Spe I部位を有するポリリンカー中にクローニングされた多様性セグメントを含む。完全なポリリンカーはNot I部位により隣接される。

20

30

H. 重鎖小遺伝子座の作製

下記は、1または複数のVセグメントを含むヒト重鎖小遺伝子座の作製を説明する。

Newkirkら、J. Clin. Invest., 81:1511-1518 (1988)（これは参考として本明細書中に組み込まれる）のハイブリドーマ中に含まれるVセグメントとして同定されたものに相当する再配列されていないVセグメントを、次のオリゴヌクレオチド

40

5′ —GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG GAT TTT ATT CAC CCC TGT GTC— 3′

を使って単離する。

再配列されていないVセグメントの制限地図を調べて、消化すると3′ および5′ 隣接配列と一緒に再配列されていないVセグメントを含む約2 kbの長さを有

【数 1 0 0】

(101)

するDNA断片を提供するユニーク制限部位を同定する。5' 開始配列はプロモーターおよび他の調整配列を含み、一方3' 隣接配列はV-DJ結合に必要な組換え配列を提供するだろう。この約3.0 kb Vセグメント挿入断片をpGB2のポリリンカー中にクローニングし、pVHIを形成せしめる。

10

pVHIをSfiIで消化し、得られた断片をpHIG2のSfiI部位にクローニングしてpHIG5' を作製する。pHIG2はDセグメントのみを含むので、生成したpHIG5' プラスミドはDセグメントと一緒に単一のVセグメントを含む。pHIG5'に含まれる挿入断片のサイズは、10.6 kb ÷ Vセグメント挿入断片のサイズである。

Not IとSpeIでの消化によりpHIG5'から挿入断片を切り出す。J、C μ およびC γ 1セグメントを含むpHIG3' をSpe IとNot Iで消化し、そして上記配列とラット3' エンハンサーとを含む3kb断片を単離する。それらの2断片を一緒にして、Not Iで消化されたpGP1中に連結せしめ、Vセグメント、9つのDセグメント、6つの機能的なJセグメント、C μ 、C γ およびラット3' エンハンザーを含むPHIGを作製する。この挿入断片のサイズは約43 kb ÷ Vセグメント挿入断片のサイズである。

20

I. 相同組換えによる重鎖小遺伝子座の作製

前の章で指摘したように、pHIG挿入断片は単一のVセグメントを使用すると約43~45 kbである。この挿入断片サイズは、プラスミドベクター中に容易にクローニングすることかできる限界かまたはそれに近い。より多数のVセグメントの使用に備えるために、接合子またはES細胞内での相同組換えによってラット3' エンハンサー配列、ヒトC μ 、ヒトC γ 1、ヒトJセグメント、ヒトDセグメントおよび多数のヒトVセグメントを含むトランスジーンを形成する、重複DNA断片の生体内相同組換えを下記に記載する。

30

ヒトJセグメントを含む6.3 kb BamHI/HindIII断片（図9中の断片（a）を参照のこと）を、次のアダプター：

40

5' GAT CCA AGC AGT 3'

5' CTA GAC TGC TTG 3'

5' CGC GTC GAA CTA 3'

【数 1 0 1】

(102)

5' AGC TTA GTT CGA 3'

を使って、Mlu I/Spe Iで消化されたpHIG5' 中にクローニングする。

生成したプラスミドをpHIG5' 0 (重複)と命名する。このプラスミド中に含まれる挿入断片はヒトV, DおよびJセグメントを含む。pVH1からの単一Vセグメントが使われる時、この挿入断片のサイズは約17 kb÷2 kbである。この挿入断片を単離し、そしてヒトJ, C μ , γ 1 およびラット3' エンハンサー配列を含むpHIG3' からの挿入断片と組み合わせる。両挿入断片は、2つのDNA断片の間の約6.3 kbの重複部分に備えるヒトJ配列を含む。これらをマウス接合子中に同時注入すると、生体内相同組換えが起こり、pHIG中に含まれる挿入断片と同等のトランスジーンを生成する。

このアプローチは生体内で形成されるトランスジーン中への多数のVセグメントの付加に備える。例えば、単一のVセグメントをpHIG5' 中に組み込む代わりに、(1) 単離されたゲノムDNA、(2) ゲノムDNAから誘導された連結DNA、または(3) 合成VセグメントレパートリーをコードするDNA、上に含まれる多数のVセグメントをpHIG2のSfiI部位にクローニングしてpHIG5' V_nを作製する。次いで図9のJでグメント断片(a)をpHIG5' V_n中にクローニングし、そして挿入断片を単離する。この挿入断片は、pHIG3' から単離した挿入断片上に含まれるJセグメントと重複するJセグメントと多数のVセグメントを含むようになる。これをマウス接合子の核中に同時注入すると、相同組換えが起こり、多数のVセグメントおよび多数のJセグメント、多数のDセグメント、C μ 領域、C γ 1領域(全てヒト由来)並びにラット3' エンハンサー配列をコードするトランスジーンを生成する。

実施例 5

軽鎖小遺伝子座の作製

A. pE μ 1の作製

pE μ 1の作製は図16に描写される。オリゴ

5' GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC TAT TCA CAA CTG ACT 3'

【数 1 0 2】

(103)

を使ってファージクローンから678 bpのXba I—EcoRI 断片 [J. Banerji ら、Ce li 33:729-740 (1983)] においてマウス重鎖エンハンサーを単離する。

このE μ 断片を、EcoRI 部位の平滑末端フィルインにより、EcoRV/Xba I消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミドをpE μ 1と命名する。

B. κ 軽鎖小遺伝子座の作製

10

κ 構成物は、少なくとも1つのヒトV κ セグメント、5つのヒトJ κ セグメント全部、ヒトJ—C κ エンハンサー、ヒト κ 定常領域エクソン、および理想的にはヒト3' κ エンハンサーを含む [K. Meyerら、EMBO J. 8:1959-1964(1989)]。マウスの κ エンハンサーはC κ から9 kb下流である。しかしながら、ヒトではまだ同定されていない。加えて、該構成物はマウス重J—C μ エンハンサーのIコピーも含む。

20

この小遺伝子座は次の4つの成分断片から作製される

(a) マウス遺伝子座との類推によりヒトC κ エクソンと3' ヒトエンハンサーとを含む16 kb Sma I断片：

(b) 5つのJ セグメント全部を含む5' 隣接5 kb Sma I 断片：

(c) $\rho \epsilon \mu$ 1 から単離されたマウス重鎖イントロンエンハンサー（この配列は、B細胞発達のできるだけ初期に軽鎖構成物の発現を誘導するために含まれる。重鎖遺伝子は軽鎖遺伝子よりも初期に転写されるため、この重鎖エンハンサーはおそらくイントロン κ エンハンサーよりも早い段階で活性であろう。）；および

30

(d) 1または複数のVセグメントを含む断片。

この構成物の調整は次の通りである。ヒト胎盤DNAをSmaIで消化し、電気泳動によりアガロース上で分画する。同様に、ヒト胎盤DNAを BamHIで消化し、電気泳動により分画する。SmaIで消化したゲルから16 kb画分を単離し、同様にBamHIで消化したDNAを含むゲルから11 kb領域を単離する。

40

16 kb Sma I画分を、Xho Iで消化されXho I制限消化生成物をフィルインするためにクレノウ断片DNAポリメラーゼで処理されているラムダFIX II (Stra

tagene, La Jolla, California) 中にクローニングする。16 kb Sma I画分の連

【数 1 0 3】

(104)

結はSma I部位を破壊するがXho I部位はそのまま残す。

11 kb BamHI 画分を、クローニング前にBamHIで消化したラムダFIX II (Stratagene, La Jolla, California) 中にクローニングする。

各ライブラリーからのクローンを、C κ 特異的オリゴ

5' GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TCC CGC CAT CTG 3'

10

を用いて探査する。

C κ かSma Iに隣接するように、16 kb Xho I 挿入断片をXho Iで切断されたpE μ 1中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKap1と命名する。

上記C κ 特異的オリゴヌクレオチドを用いて λ EML3/BamIIIライブラリーを探査し、11 kbクローンを同定する。5 kb Sma I断片 (図25の断片 (b)) をサブクローニングし、次いでSma Iで消化されたpKap1中に挿入する。正しい方向のJセグメント、C κ およびE μ エンハンサーを含むそれらのプラスミドをpKap2と命名する。

20

その後、1または複数のV κ セグメントをpKap2のMluI中にサブクローニングし、ヒトV κ セグメント、ヒトJ κ セグメント、ヒトC κ セグメントおよびヒトE μ エンハンサーをコードするプラスミドpKapHを生ぜしめる。pKapHをNotI消化することによりこの挿入断片を切り出し、そしてアガロースゲル電気泳動により精製する。こうして精製された挿入断片を上述の如くマウス接合子の前核中にマイクロインジェクトする。

30

C. 生体内相同組換えによる κ 軽鎖小遺伝子座の作製

11 kb BamHI断片を、その3'末端がSfi I部位の方に向くように、BamHIで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミドをpKAPintと命名する。pKAPint中のBamHI部位とSpe I部位との間のポリリンカー中に1または複数のV κ セグメントを挿入してpKapHVを作製する。pKapHVの挿入断片をNot Iでの消化により切り出し、そして精製する。pKap2からの挿入断片をNot Iでの消化

40

により切り出し、精製する。それらの2断片の各々は、pKapHVからの断片が、pKap2から得られる挿入断片中に含まれる5 kb Sma I断片と実質的に相同であるJ κ セグメントを含む5 kbのDNA配列を含むという点で、相同性領域を含有す

【数 1 0 4】

(105)

る。それ故に、それらの挿入断片は、マウス接合子中にマイクロインジェクトされると相同組換えして、 V_K , J_K , および C_K をコードするトランスジーンを形成することができる。

実施例 6

免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子の再配列され発現されるコピーに相当するゲノムクローンの単離

10

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のクローニングを記載する。そのような細胞は、与えられた免疫グロブリン遺伝子の多数の対立遺伝子を含み得る。例えば、ハイブリドーマは 4 コピーの κ 軽鎖遺伝子を含み、その 2 コピーは融合相手の細胞系からのものであり、2 コピーは着目の免疫グロブリンを発現するもとの B 細胞からのものである。それらの 4 コピーのうち、数個が再配列することかできるという事実にもかかわらず、ただ 1 つだけが着目の免疫グロブリンをコードする。この実施例に記載の手順は、 κ 軽鎖の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

20

A. 二本鎖 cDNA

ヒトハイブリドーマもしくはリンパ腫からの細胞、または細胞表面形態もしくは分泌形態またはその両形態の κ 軽鎖含有 IgM を合成する他の細胞系を、ポリ A RNA の単離に使用する。次いで該 RNA を、逆転写酵素を使ったオリゴ dT 開始 cDNA の合成に使用する。次で一本鎖 cDNA を単離し、ポリヌクレオチドターミナルトランスフェラーゼ酵素を使って 3' 末端に G 残基を付加する。次いで G 末端が付けられた一本鎖 cDNA を精製し、そしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド

30

5' -GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG CCC CCC CCC CCC- 3'

を使った第二鎖合成 (DNA ポリメラーゼ酵素により触媒される) のための鋳型として用いる。

40

二本鎖 cDNA を単離し、発現される免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖をコードする mRNA の 5' 末端のヌクレオチド配列を決定するために使用する。次いで、それらの発現される遺伝子のゲノムクローンを単離する。発現される軽鎖遺伝子のクローニング方法は、下記の B 部に要約される。

【数 1 0 5】

(106)

B. 軽鎖

A 部に記載された二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマ

5' —GAT CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT GGC GGG AAG ATG AA
G ACA GAT GGT GCA— 3'

を使った第3巡目のDNA合成のための鋳型として使用する。

10

このプライマーは、κ軽鎖情報の定常部分に特異的な配列（TCA TCA GAT GGCG
GG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA）並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増
幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列（GTA CGC CAT ATC
AGC TGG ATG AAG）を含む。この配列を、次の2つのオリゴヌクレオチドプライ
マー

5' —GAG CTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG— 3'

20

5' —GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG— 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そしてプライマーとして
次のオリゴヌクレオチド

5' —GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG— 3'

を使うジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写
された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成
42ヌクレオチドセグメントを、以後οーカッパと称することにする。

30

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよびSmaIを含む幾つか異なるの制限エ
ンドヌクレアーゼと対に組み合わせて消化したDNAのサザンプロットを、³²P
標識したユニークオリゴヌクレオチドοーカッパを用いて探査する。ユニーク制
限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

40

次いでIg発現細胞系からのDNAをSma Iおよび第二の酵素（Vセグメントの
内側にSma I部位がある場合にはBamHI またはKpnI）で切断する。いずれかの生
成した非平滑末端をT4 DNAポリメラーゼ酵素で処理し、平滑末端化DNA分子を
与える。次いで制限部位をコードするリンカー（断片中にどの部位が存在しない

【数 1 0 6】

(107)

かに応じてBamHI, EcoRI (または Xho I) を付加し、そして対応するリンカー酵素で切断してBamHI, EcoRIまたはXho I末端を有するDNA断片を与える。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現されるVセグメントを包含するDNA断片を含む画分をラムダEMBL3またはラムダFIX (Stratagene, La Jolla, California)中にクローニングする。ユニークプローブ α -カッパを使って、Vセグメント含有クローンを単離する。陽性クローンからDNAを単離し、そしてpKap1のポリリンカー中にサブクローニングする。生じたクローンをpRKLと命名する。

10

実施例 7

免疫グロブリン重鎖 μ 遺伝子の再配列され発現されるコピーに相当するゲノムローターの単離

20

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの免疫グロブリン重鎖 μ 遺伝子のクローニングを記載する。この実施例に記載の手順は、 μ 重鎖遺伝子の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

上述した如く、二本鎖cDNAを調製し単離する。この二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマー

5' —GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA CAC GAG GGG CAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC— 3'

30

を使った3巡目のDNA合成のための鋳型として使用する。

このプライマーは、 μ 重鎖情報の定常部分に特異的な配列 (ACA GGA GAC GAGG GG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC) 並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列 (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) を含む。この配列を、次の2つのオリゴヌクレオチドプライマー：

40

5' —GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG— 3'

5' —GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG— 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そしてプライマーとして

【数 1 0 7】

(108)

次のオリゴヌクレオチド

5' —GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG— 3'

を使ったジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成
42ヌクレオチドセグメントを、以後 ϕ -ミューと称することにする。

10

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよびMluI (MluIは、Jセグメントと μ CHI との間を開裂する稀少切断性酵素である) を含む幾つかの異なる制限エンドヌクレアーゼと対に組み合わせて消化したDNAのサザンプロットを、³²P標識したユニークオリゴヌクレオチド ϕ -ミューを用いて探査する。ユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

20

次いでIg発現細胞系からのDNAをMluIと第二の酵素で切断する。次でMluIまたはSpeIアダプターリンカーを末端に連結せしめ、切断して上流部位をMluIまたはSpeI変換する。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現されるVセグメントを包含するDNA断片を含む画分をプラスミドpGP1中に直接クローニングする。ユニークプローブ ϕ -ミューを使って

Vセグメント含有クローンを単離し、その挿入断片をMluIでまたはMluI/SpeIで切断されたプラスミドpCON2中にサブクローニングする。生じたクローンをpRMGHと命名する。

30

実施例 8

ヒト κ 小遺伝子座トランスジーンの作製

軽鎖小遺伝子座

κ 軽鎖特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いてヒトゲノムDNAファージライブラリーをスクリーニングし、J κ -C領域に及ぶクローンを単離した。J κ 1を含む5.7 kb ClaI/XhoI断片をJ κ 2-5とC κ を含む13 kb XhoI断片と一緒にpGP1b中にクローニングし、そしてプラスミドpKcorを作製するのに使った。このプラスミドは、4.5 kbの5' 隣接配列と9 kbの3' 隣接配列と共に、J κ 1-5、 κ インロトンエンハンサーおよびC κ を含有する。それはVセグメント

40

【数 1 0 8】

(109)

のクローニング用のユニークな 5' Xho I 部位と追加のシス作用性調節配列の挿入用のユニークな 3' Sal I 部位も有する。

V_κ 遺伝子

V_κ 軽鎖特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いてヒトゲノム DNA ファージライブラリーをスクリーニングし、ヒト V_κ セグメントを含むクローンを単離した。DNA 配列分析により機能的 V セグメントを同定した。それらのクローンは、TATA ボックス、リーダーと可変性ペプチド（2 つのシステイン残基を含む）をコードする転写解読枠、スプライス配列、および組換えヘプタマー-12 b スペース-ノナマー配列を含有する。該クローンのうちの 3 つをマッピングし、配列決定した。該クローンのうちの 2 つ、65.5 と 65.8 が機能的であり、それらが TATA ボックス、リーダーと可変性ペプチド（2 つのシステイン残基を含む）をコードする転写解読枠、スプライス配列、および組換えヘプタマー-12 b スペース-ノナマー配列を含有すると思われる。3 つめのクローン 65.4 は、非規準的組換えヘプタマーを含むことから V_κ I 偽遺伝子をコードすると思われる。

10

20

V_κ III ファミリー遺伝子をコードする機能的クローンのうちの 1 つ V_κ 65-8

を使って軽鎖小遺伝子座構成物を作製した。

30

pκC1

V_κ 65-8 を含む 7.5 kb Xho I / Sal I 断片を pKcor の 5' Xho I 部位に挿入することにより、κ 軽鎖小遺伝子座 pκC1（図 38）を作製した。注入前に Not I での消化により該トランスジーン挿入断片を単離した。

精製した挿入断片を、受精した (C57BL/6 × CBA) F₂ マウス胚の前核中にマイクロインジェクトし、次いで Hogan ら (Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986. Cold Spring Harbor Laboratory, New York) に記載の通りに、生存している胚を偽妊娠に移した。注入された胚から発育したマウスを、尾部 DNA のサザンプロット分析によりトランスジーン配列の存在について分析した。既知量のクローン化 DNA を含有する対照標準に比較したバンド強度により、トランスジーンコピー数を評価した。それらの動物から血清を単離し、そして Harlow および Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, 1988. Cold Spring Harbor Laborator

40

【数 1 0 9】

(110)

y, New York) により記載された通りに、トランスジーンによりコードされるヒトIg κ タンパク質の存在についてELISAにより分析した。

マイクロタイタープレートウエルをヒトIg κ (クローン 6E1, #0173, AMAC Inc., Westbrook, ME) ヒトIgM (クローン AF6, #0285, AMAC Inc., Westbrook, ME) およびヒトIgG1 (クローン JL512, #0280, AMAC Inc., Westbrook, ME) に特異的なマウスモノクローナル抗体でコーティングした。血清試料を該ウエル中に系列希釈し、そしてマウス免疫グロブリンとの交差反応性を最少にするために予備吸着されているアフィニティー精製済アルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ヒトIg (多価) を使って特定の免疫グロブリンの存在を検出した。

図41は、8匹のマウス (I.D. #676, 674, 673, 670, 666, 665, 664 および496) からの血清のELISAアッセイの結果を示す。それらのマウスの最初の7匹はpKC1トランスジーン挿入断片が注入された胚から発育し、そして8番目のマウスはpHC1トランスジーン (前記) のマイクロインジェクションにより生まれたマウス

スに由来する。pKC1注入胚からの7匹のマウスのうちの2匹 (I.D. #666と664) は、DNAサザンプロット分析により分析するとトランスジーン挿入断片を含んでおらず、5匹 (I.D. #676, 674, 673, 670および665) は該トランスジーンを含んでいた。

pKC1トランスジーン陽性動物の一匹を除く全てが検出可能なレベルのヒトIg κ タンパク質を発現し、残りの一匹の非発現性動物はDNAサザンプロット分析に基づく遺伝的モザイクであるらしい。pHC1陽性トランスジェニックマウスはヒトIgMとIgG1を発現するがIg κ を発現せず、これは該アッセイに使用する試薬の特異性を証明する。

pKC2

V κ 65.5を含む8 kb XhoI/SalI 断片をpKC1の5' XhoI部位に挿入することにより、 κ 軽鎖小遺伝子座pKC2を作製した。2つのV κ セグメントを含む生成トランスジーン挿入断片をマイクロインジェクション前にNotIでの消化により単離した。

【数 1 1 0】

(111)

pKVe2

この構成物は、J κ の5'に1.2 kbの追加配列を含みそしてV κ 65.8の3'の4.5 kbの配列を欠いていること以外は、pKC1と同じである。該構成物は更に、マウス重鎖J-mイントロンエノハンサー [Banrji ら、Cell 33:729-740 (1982)] を含む0.91 kb Xba I断片と、下流に挿入されたヒト重鎖J-mイントロンエノハンサー [Haydayら、Nature 307:334-340(1984)] を含む 1.4 kb MluI-HindIII断片を含有する。この構成物を、対立遺伝子排除とイソタイプ排除を果たす軽鎖小遺伝子座の初期再配列を開始する可能性について試験する。異なるエンハンサー、即ちマウスまたはラットの3' κ または重鎖エンハンサー [Meyer およびNeuberger, EMBO J. 8:1959-1964 (1989), Pettersonら、Nature 344:165-169 (1990) :これらは参考として本明細書中に組み込まれる] を有する類似構成物を作製することができる。

10

20

再配列された軽鎖トランスジーン

ヒトB細胞DNAからPCRにより増幅され機能的に再配列された軽鎖遺伝子を再構成するために κ 軽鎖発現カセットをデザインした。方策を図39に示す。PCR増幅させた軽鎖遺伝子を、 κ 軽鎖遺伝子65.5から単離した3.7 kbの5' 隣接配列を含むベクターpK5nx中にクローニングする。次いで、J κ 2-4、J κ イントロンエンハンサー、C κ および9 kbの下流配列を含むベクターpK31sのユニークXhoI部位中に、5' 転写調節配列に融合させたVJセグメントをクローニングする。生じたプラスミドは、再構成された機能的に再配列された κ 軽鎖トランスジーンを含有し、このトランスジーンは胚へのマイクロインジェクションのためにNot Iで切り出すことができる。該プラスミドは追加のシス作用性調節配列の挿入のために3' 末端にユニークSal I部位も含有する。

30

40

ヒト脾臓ゲノムDNA由来の再配列された κ 軽鎖遺伝子を増幅せしめるのに2つの合成オリゴヌクレオチド (o-130, o-131) を使った。オリゴヌクレオチド o-130 (gga ccc aga(g,c)ggg aac cat gga a(g,a)(g,a,T,c)) は、V κ III ファミリー軽鎖遺伝子の5' 領域に相補的でありそしてリーダー配列の最初のATCと重複している。オリゴヌクレオチド o-131 (gtg caa tca att ctc gag ttt ga

【数 1 1 1】

(112)

c tac aga c) は、J κ 1 の約150 bp 3' よりの配列に相補的であり、Xho I 部位を含む。それらの2つのオリゴヌクレオチドは、J κ 1 セグメントに連結された再配列された V κ III 遺伝子に相当するヒト脾臓 DNA からの 0.7 kb の DNA 断片を増幅する。

PCR 増幅された DNA を Nco I と Xho I で消化し、個々の PCR 生成物をプラスミド pNN03 中にクローニングした。5つのクローンの DNA 配列を決定すると、機能的 V J 連結（転写解読枠）を有する2つのクローンが同定された。追加の機能的に再配列された軽鎖クローンも収集される。機能的に再配列されたクローンは上記軽鎖発現カセット（図39）中に個別にクローニングすることができる。再配列された軽鎖構成物を用いて生産されたトランスジェニックマウスを重鎖小遺伝子座トランスジェニックマウスと交配せしめることにより、一次レパートリーの多様性の全てが重鎖により与えられる完全にヒトの抗体のスペクトルを発現するマウス株を生産することができる。

10

20

軽鎖多様性の1つの起源は体細胞突然変異からであることができる。全ての軽鎖が様々な異なる重鎖と結合する能力に関して同等であるわけではないので、各々が異なる軽鎖構成物を含有する異なるマウス株を生成せしめ試験することができる。この方策の利点は、再配列されていない軽鎖小遺伝子座の使用とは反対に、容易に重鎖と対を作りすぐに重鎖 V D J 連結が起こるような軽鎖を有することから生まれる軽鎖対立遺伝子およびイソタイプ排除の増加である。この組み合わせは、完全にヒトの抗体を発現する B 細胞の頻度の増加をもたらし、かくしてヒト Ig 発現性ハイブリドーマの単離を容易にすることができる。

30

プラスミド pIGM1, pHCl, pIGH1, pKC1 および pKC2 の Not I 挿入断片をアガロースゲル電気泳動によりベクター配列から単離した。精製されたそれらの挿入断片を、受精した (C57BL/6 $\times$ CBA) F2 マウスの前核中にマイクロインジェクトし、そして Hogan らにより記載された通りに [Hogan ら、Methods of Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1986)]、生存している胚を偽妊娠雌中に移した。

40

実施例 9

【数 1 1 2】

(113)

相同組換えによるマウス κ 軽鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胎児性幹(ES)細胞中での相同組換えによるマウス内因性 κ 遺伝子座の不活性化に次いで、不活性化された κ 対立遺伝子を有する標的ES細胞を初期マウス胚(胚盤胞)中に注入することによるマウス生殖細胞系中への変異遺伝子の導入を記載する。

10

方策は、J κ 遺伝子とC κ セグメントに及ぶ遺伝子座の4.5 kbセグメントが削除されそして選択マーカーneoにより置き換えられているマウス κ 遺伝子座に相同なDNA配列を含むベクターを用いた相同組換えによりJ κ 遺伝子とC κ 遺伝子を欠失せしめることである。

 κ 標的ベクターの作製

20

プラスミドpGEM7(KJ1) (M.A. Rudnicki, Whitehead Institute) は、クローニングベクター7Zf(÷)中のマウスホスホグリセレートキナーゼ(pgk)プロモーター [Xba I/TaqI断片; Adra, C.N.ら、Gene 60:65-74 (1987)] の転写調節下に、トランスフェクトされたES細胞の薬剤選択に使うネオマイシン耐性遺伝子(neo)を含む。このプラスミドは、マウスpgk 遺伝子の3' 領域に由来する、neo 遺伝子にとって異種のポリアデニル化部位 [Pvu II/HindIII 断片.Boer, PH.ら、Biochemical Genetics 28:299-308 (1990)] も含む。このプラスミドを κ 福的ベクターの作製のための出発点として使った。第一段階はneo発現カセットの3' の κ 遺伝子座に相同な配列を挿入することであった。

30

C κ 遺伝子座に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ

5' -GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG -3'

とJ κ 遺伝子でグメントに特異的なオリゴヌクレオチドプローブ

5' -CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT AAG -3'

40

を使って、肝臓DNAから誘導されたゲノムファージライブラリーから、マウス κ 鎖配列(図25a)を単離した。

陽性ファークローンから2断片において、即ち1.2 kb BgIII/Sac I断片と6.3 kb SacI断片として、マウスC κ セグメントの3' に及ぶ8 kb BgIII/SacI断片を単離し、それをBgIII/Sac Iで消化されたpGEM(KJ1)中にサブクローニング

【数 1 1 3】

(114)

し、プラスミド pNEO-K3' を作製した (図25b)。

J κ 領域の 5' に及ぶ1.2 kb EcoRI/Sph I断片も陽性ファージクローンから単離した。この断片のSphI部位にSphI/Xba I/Bgl II/EcoRI アダプターを連結せしめ、生じたEcoRI 断片をneo遺伝子および下流の 3' κ 配列と同じ 5' - 3' 方向で、EcoRIで消化された pNEO-K3' に連結せしめ、pNEO-K5' 3' (図25 c) を作製した。

10

次いで、Mansourら、Nature 336:348-352 (1988) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により記載されたようにして、相同組換え体を有するES

クローンの富化に備えるために、該構成物中に単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含めた。プラスミドpGEM7(TK)からHSV TKカセットを得た。このカセットは、pGEM(KJ1)について上述したのと同様に、マウスpgkプロモーターとポリアデニル化配列とにより隣接されたHSV TK遺伝子の構造配列を含む。pGEM7(TK)のEcoRI部位をBamHI部位に変更し、そしてTKカセットをBamHI/HindIII 断片として切り出し、pGP1b中にサブクローニングしてpGP1b-TKを作製した。このプラスミドをXho I部位のところで線状化し、J κ の 5' からのゲノム配列とC κ の 3' からのゲノム配列とにより隣接されたneo遺伝子を含む、pNEO-K5' 3' 由来の XhoI断片をpGP1b-TK中に挿入し、標的ベクターJ/C K1 (図25 d) を作製した。J/C K1を用いた相同組換え後のゲノム κ 遺伝子座の推定構造を図25eに示す。

20

30

κ 対立遺伝子の標的不活性化によるES細胞の作製および分析

使用したES細胞は、本質的には記載された通りに [Robertson, E. J., Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J.Robertson 編 (Oxford: IRL Press) 71-112頁(1987)]、分裂上不活性なSNL76/7 支持細胞層 [McMahonおよびBradley, A Cell 62:1073-1085 (1990)] 上で増殖させたAB-1系であった。他の適当なES系としては、E14系 [Hooperら、Nature 326:292-295 (1987)]、D3系 [Doe t schmanら、J.Embryol. Exp. Morph. 87:28-45(1985)]、およびCCE 系 [Robertson ら、Neture 323:445:448(1986)] が挙げられるが、それらに限定されない。特異的な標的変異を有するES細胞からマウス系

40

【数 1 1 4】

(115)

統をうまく作製できるのは、ES細胞の多分化能性（即ち、宿主胚盤胞中に注入されれば、胚形成に参加することができ且つ生じた動物の生殖細胞に貢献することができるそれらの能力）に依存している。

任意の与えられたES細胞系の多分化能性は、培養時間およびそれに取り払った注意によって異なり得る。多分化能性についての唯一の決定的アッセイは、使用する
10
ことになっているES細胞の特定集団がESゲノムの生殖細胞伝達を行うことができるキメラ体を生成することができるかどうかを決定することである。この理由により、遺伝子標的の前に、AB-1細胞の親集団の一部をC5701/6J胚盤胞中に注

入し、該細胞がキメラマウスを生成できるかどうか、およびそれらのキメラ体の大部分がESゲノムを子孫に伝達できるかどうかを確かめる。
20

κ 鎖不活性化ベクターJ/C K1を NotIで消化し、そして記載された方法 [Hasty, P.R. ら、Nature 350:243-246(1991)] によりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100 mm皿上に $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/皿の密度で塗抹した。24時間後、G418 ($200 \mu\text{g/ml}$ の活性成分) およびFIAU ($0.5 \mu\text{M}$) を培地に添加し、10~11日に渡り薬剤耐性クローンを発達させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。
30

サザンブロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く [Laird, P.W.ら、Nucl. Acids Res. 19:4293 (1991)] クローンからDNAを単離し、Xba I で消化し、そして標的的プローブとして図25 eに指摘の800 bp EcoRI/Xba I 断片を用いて探査した。このプローブは野生型遺伝子座中の3.7kb Xba I 断片、および標的ベクターと相同組換えされた遺伝子座中の標徴的な1.8 kbバンドを検出した（図25 a および e を参照のこと）。サザンブロット分析によりスクリーニングした 901個のG 4 18およびFIAU体制クローンのうち、7つのクローンが κ 遺伝子のうちの1つへの相同組換えを示す1.8 kb Xba I バンドを表した。それらの4つのクローンを更に BglIII, Sac I およびPst I 酵素で消化し、 κ 遺伝子のうちの1つに該ベクターが相同的に組み込まれたことを確認した。標
40

【数 1 1 5】

(116)

徴的800 bp EcoRI/Xba I 断片（プローブ A）を用いて探査すると、野生型 DNA の BglII, Sac I および Pst I 消化物がそれぞれ 4.1, 5.4, および 7 kb の断片を生成し、一方標的された κ 対立遺伝子の存在はそれぞれ 2.4, 7.5 および 5.7 kb の断片により指摘された（図 25 a および e を参照のこと）。Xba I 消化物により検出された 7 つの陽性クローンの全てが、 κ 軽鎖のところでの相同組換えに特徴的である期待の BglII, Sac I および Pst I 制限断片を示した。

10

不活性化された κ 鎖を有するマウスの作製

前の章で記載した標的された ES クローンのうちの 5 つを、記載の如く [Bradley, A. , Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson 編 (Oxford: IRL Press), 113-151 頁 (1987)] C57BL/6J 胚盤胞中に注入し、そして偽妊娠雌の子宮に移し、注入 ES 細胞から誘導された細胞と宿主の胚盤胞との混合物に由来するキメラマウスを作製する。黒い C57BL/6J 背景上において、ES 細胞系由来のアグーチ皮膜着色の量により、キメラ体への ES 細胞の貢献の程度を外観的に同定する。標的クローンの胚盤胞注入から得られた子孫のほぼ半分がキメラであり（即ち、アグーチ並びに黒い着色を示した）、それらの大部分が皮膜着色への過剰の ES 細胞の貢献（70% 以上）を示した。A81 ES 細胞は XY 細胞系であり、それらの高率キメラ体の大部分が、コロニー形成された雄 ES 細胞による雌胚の性転換のために雄であった。

20

30

雄のキメラを C57BL/6J と交配させ、ES ゲノムの生殖細胞伝達の指標である優性のアグーチ皮膜色の存在について子孫を観察する。それらのクローンのうちの 2 つからのキメラ体が一貫してアグーチ子孫を生産した。 κ 遺伝子座の唯一のコピーが注入 ES クローンに標的されたので、各アグーチ子孫は変異遺伝子座を受け継ぐ見込みを 50% 有した。尾部生検試料からの BglII 消化 DNA のサザンブロット分析により、標的 ES クローンの同定に用いたプローブ（プローブ A、図 25 e）を使って、標的遺伝子のスクリーニングを行った。予想通り、アグーチ子孫の約 50% が 4.1 kb の野生型バンドに加えて 2.4 kb のハイブリダイズする BglII バンドを示した。この結果は、標的された κ 遺伝子座の生殖細胞伝達を証明する。

40

該変異に対して同型接合性のマウスを生成せしめるために、異型接合体同士を

【数 1 1 6】

(117)

交配し、そして上述のようにして子孫の κ 遺伝子型を決定した。予想通り、異型接合体交配から 3 つの遺伝子型が誘導された：2 コピーの正常 κ 遺伝子座を有する野生型マウス、1 コピーの標的 κ 遺伝子と 1 つの NT κ 遺伝子を有する異型接合体、および κ 変異に対して同型接合体であるマウス。それらの後者のマウスからの κ 配列の欠失は、J κ に特異的なプローブ（プローブ C、図 25 a）を使った

10

サザンブロットハイブリダイゼーションにより確認した。該 J κ プローブのハイブリダイゼーションは異型接合性子孫と野生型子孫からの DNA 試料に観察されたが、一方で同型接合体には全くハイブリダイゼーションシグナルが検出されなかった。これは、標的変異の結果としての欠失により κ 遺伝子座の両方のコピーが不活性化されている新規マウス株の発生を証明する。

20

実施例 10

相同組換えによるマウス重鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胎児性幹 (ES) 細胞中での相同組換えによる内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子の活性化を記載する。方策は、J_H 領域が削除されそして選択マーカー遺伝子 neo により置き換えられている重鎖配列を含むベクターとの相同組換えにより内因性重鎖 J セグメントを欠失せしめることである。

30

重鎖標的ベクターの作製

J_H 4 特異的オリゴヌクレオチドプローブ

5' -ACT ATG CTA TGG ACT GGG GTC AAG GAA CCT CAG TCA CCG -3'

を使って、O3 ES 細胞系 [Gossler ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:906 5-9069 (1986)] から誘導されたゲノムファージライブラリーから、J_H 領域を含むマウス重鎖配列 (図 26 a) を単離した。

J_H 領域に及ぶ 3.5 kb のゲノム Sac I / Stu I 断片を陽性ファージクローンから単離し、それを Sac I / Sma I で消化された pUC18 中にサブクローニングした。生じたプラスミドを puc18 J_H と命名した。トランスフェクトされた ES 細胞の薬剤選別に用いるネオマイシン耐性遺伝子 (neo) は、プラスミド pGEM7 (KJI) の修復変形から誘導された。文献中の報告 [Yenofski ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 3435-3439 (1990)] は、pGEM7 (KJI) 中に使用される neo 遺伝子の源とし

40

【数 1 1 7】

(118)

て働いた pMC1neo [ThomasおよびCappechi, Cell 51: 503-512(1987)] を含む
幾つかの常用の発現ベクターの neoコード配列の点変異を証明している。

この変異は neo遺伝子産物の活性を減少させるが、該変異を含む制限断片を野
生型 neoクローンからの対応配列と置き換えることにより修復された。pGEM7 (K

10

J1) 中のHindIII部位を合成アダプターの付加によってSal I 部位に変更し、そし
てXba I/Sal Iでの消化によりneo 発現カセットを切り出した。次いで neo断
片の両端をDNA pol Iのクレノウ形での処理により平滑末端化し、pUC13 J_Hの
Nae I部位中にサブクローニングし、プラスミドpUC18 J_H-neo (図26 b) を作
製した。

標的ベクターの更なる作製は、プラスミドpGP1bの誘導体において行った。pGP
1bを制限酵素 Not Iで消化し、アダプターとして次のオリゴヌクレオチド 5'
—GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AAT TCC AGC AAA GC
T TTG GC— 3'
と連結せしめた。

20

生じたプラスミド (pGETと命名) を使ってマウス免疫グロブリン重鎖標的構成
物を構築した。

Mansour ら、Nature 336: 348-352(1988)により記載されたようにして、相同
組換え体を有するESクローンの富化に備えるために、該構成物中に単純ヘルペス
ウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含めた。プラスミドpGEM(TK)からE
coRIとHindIIIでの消化によりHSV TK遺伝子を得た。このTK DNA断片をpGMTのEco
RI 部位とHindIII部位との間にサブクローニングし、プラスミドpGMT-TK (図26
c) を作製した。

30

標的配列に対する広範な相同性領域を提供するために、陽性ゲノムファージク
ローンから Xho IでのDNAの限定消化および Xba Iでの部分消化により、J_H
領域の5' に位置する5.9 kbのゲノムXba I/Xho I断片を誘導した。図26 aに示
されるように、このXba I部位はゲノムDNA中には存在せず、むしろ陽性ファ
ージクローン中のクローン化ゲノム重鎖挿入断片にすぐに隣接するファージ配列
から誘導される。この断片をXba I/Xho Iで消化されたpGMT-TK中にサブクロー

40

【数 1 1 8】

(119)

ニングし、プラスミド pGMT-TK-J_H 5' (図27 d) を作製した。

作製の最終段階は、neo遺伝子および隣接するゲノム配列を含むpUC18 J_H-neoからの2.8 kb EcoRI断片の切除を含んだ。この断片をクレノポリメラーゼにより平滑末端にし、同様に平滑末端化されたpGMT-TK-J_H 5' のXho I 部位中にサブクローニングした。生じた構成物 J_H K01 (図27 e) は、J_H 遺伝子座を隣接する6.9 kbのゲノム配列を含み、neo 遺伝子が中に挿入されている J_H 領域に及ぶ2.3 kbの欠失を有する。図27fは、標的用構成物との相同組換え後の内因性重鎖遺伝子の構造を示す。

10

実施例11

標的されたES細胞の生産および分析

20

本質的には記載された通りに [Robertson, E.J.(1987) Terato-carcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach, E.J.Robertson編 (Oxford: IRL Press), 71-112頁]、分裂上不活性なSNL76/7 支持細胞層 [McMahon および Bradley, Cell 62: 1073-1085(1990)] 上でAB-1 ES細胞を増殖させた。前の実施例に記載した通り、標的指向性構成物 J_H K01 によるES細胞のエレクトロポレーションの前に、ESゲノムの生殖細胞伝達能力を有することが証明されたAB-1由来のキメラの作製により、ES細胞の多分化能力を決定した。

30

重鎖不活性化ベクター J_H K01 をNot Iで消化し、そして記載された方法 [Hasty ら、Nature 350: 243-246 (1991)] にこよりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100 mm皿上に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/皿の密度で塗抹した。24時間後、G418 (200 mg/mlの活性成分) およびFIAU (0.5mM) を培地に添加し、8～10日間に渡り薬剤耐性クローンを発達させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

40

サザンプロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く [Laird ら、Nucl. Acids Res. 19:4293 (1991)] クローンからDNAを単離

【数 1 1 9】

(120)

し、Stu Iで消化し、そしてプローブ Aとして図27 fに示される500 bp EcoRI/Stu I断片を用いて探査した。このプローブは野生型遺伝子座中の 4.7 kb StuI断片を検出し、一方で3 kbバンドは標的指向ベクターと内因性配列の相同組換えに標徴的である（図26 aおよび27 fを参照のこと）。サザンブロットハイブリダイゼーションによりスクリーニングした525 個のG418およびFITU二重耐性クローンのうち、12個が標的指向ベクターとの組換えに標徴的な3 kb断片を含むことがわかった。それらのクローンがJ_H 遺伝子座のところに期待の標的現象（図27 fに示されるような）示すことは、HindIII、Spe IおよびHpa Iでの更なる消化により確認された。

10

HindIII、Spe IおよびHpa Iで消化されたDNAのサザンブロットへのプローブ A、（図27 f 参照）のハイブリダイゼーションは、野生型遺伝子座についてはそれぞれ2.3 kb、>10 kbおよび>10 kbのバンドをもたらし、一方標的された鎖遺伝子座についてはそれぞれ5.3 kb、3.8 kbおよび1.9 kbのバンドが予想される（図27 f 参照）。Stu I消化物により検出された12個の陽性クローンの全てが、標的 J_H 遺伝子に標徴的な推定HindIII、Spe IおよびHpa Iバンドを示した。加えて、neo-持異的プローブ（プローブ B、図27 f）を使った12個のクローン全ての Stu I消化物のサザンブロット分析は3 kbの推定断片のみを生じ、それらのクローンは各々標的指向ベクターの単一コピーを含有することを証明した。

20

30

J_H 欠失を有するマウスの作製

前の章で記載した標的されたESクローンのうちの3つを解凍し、記載の如く-
[Bradley, A. (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (Oxford: IRL Press). 113-151 頁(1987)] C57B1/6J胚盤胞子中に注入し、そして偽妊娠雌の子宮に移した。黒色C5781/6J背景上において、ES細胞系由来のアグーチ皮膜着色の量から、キメラ体へのES細胞の貢献の程度を外観的に同定する。2つの標的クローンの胚盤胞注入から得られた子孫のほぼ半分がキメラであり（即ち、アグーチ並びに黒い着色を示した）、3つ目の標的クローンはキメラ動物を生じなかった。それらのキメラ体の大部分が皮膜着色へのES細胞のかかなりの貢献度（70%以上）を示した。AB1 ES細胞はXY細胞系で

40

【数 1 2 0】

(121)

あり、キメラ体の大部分は、コロニー形成された雌胚が雄ES細胞により性転換されたために雄であった。雄キメラをC57BL/6J雌と交配させ、ESゲノムの生殖細胞伝達の標徴である優性のアグーチ皮膜色の存圧について子孫を観察する。

それらのクローンのうちの両方からのキメラ体が一貫してアグーチ子孫を生産した。重鎖遺伝子座の唯一のコピーが注入ESクローン中に標的されたので、各アグーチ子孫は変異遺伝子座を受け継ぐ見込みを50%有した。尾部生検試料からのStu I消化DNAのサザンブロット分析により、標的ESクローンの同定に用いたプローブ（プローブA、図27 f）を使って、標的遺伝子のスクリーニングを行った。予想通り、アグーチ子孫の約50%が4.7 kbの野生型バンドに加えて約3 kbのハイブリダイズする。Stu Iバンドを示した。この結果は、標的されたJ_H 遺伝子座の生殖細胞伝達を証明する。

該変異に対して同型接合のマウスを作製するために、異型接合体同士を交配し、そして上述のようにして子孫の重鎖遺伝子型を決定した。予想通り、異型接合体交配から3つの遺伝子型が誘導された：2コピーの正常J_H 遺伝子座を有する野生型マウス、該遺伝子の1つの標的コピーと1つの正常コピーを有する異型接合体、およびJ_H 変異に対して同型接合であるマウス。それらの後者のマウスからのJ_H 配列の欠失は、J_H に特異的なプローブ（プローブC、図26）を使ったサザンブロットハイブリダイゼーションにより確認した。異型接合性子孫と野生型子孫からのDNA試料において4.7 kb断片へのJ_H プローブのハイブリダイゼーションが観察されたが、一方でJ_H 変異体同型接合体からの試料には全くシグナルが検出されなかった。これは、J_H 配列の欠失により重鎖遺伝子の両方のコピーが変異されている新規マウス株の生成を証明する。

実施例12

重鎖小遺伝子座トランジーン

A. 大型DNA配列をクローニングするためのプラスミドベクターの作製

1. pGP1a

プラスミドpBR322をEcoRIとSty Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチドオリゴ-42 5' -caa gag ccc gcc taa tga gcg ggc ttt ttt ttg cat act gcg

【数 1 2 1】

(122)

gcc gct - 3'
オリゴ-43 5' -aat tag cgg ccg cag tat gca aaa aaa agc ccg ctc att ag
g cgg gct - 3'
と連結せしめた。

生じたプラスミド pGP1aを、稀少切断性制限酵素 Not I により切除することが
できる非常に大型DNA構成物をクローニングするために改変する。それは、tr
pA遺伝子に由来する強力な転写終結シグナル [Christieら、Proc. Natl. Acad.S
ci. USA 78:4180 (1981)] の下流に (アンピシリン耐性遺伝子AmpRに関して) N
ot I 制限部位を含む。この終結シグナルは、AmpR遺伝子からの読み通し転写を排
除することにより、Not I 部位中に挿入されるコード配列の潜在的毒性を低下さ
せる。加えて、このプラスミドは、pBR322コピー数調節領域を保持しているため
に pUCプラスミドに比較して低コピー数である。この低コピー数も挿入配列の潜
在的毒性を更に低下させ、そしてDNA複製による大型挿入断片に対する選択を
減少させる。ベクター pGP1b, pGP1c, pGP1dおよびpGP1f はpGP1a から誘導され
、そして異なるポリリンカークローニング部位を含む。そのポリリンカー配列を
下記に与える。

化1

10

20

30

40

【数 1 2 2】

(123)

pGP1a

NotI
GCGGCCGC

pGP1b

NotI XhoI ClaI BamHI HindIII NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC

10

pGI1c

NotI SmaI XhoI Sali HindIII BamHI SacII NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC

pGP1d

NotI Sali HindIII ClaI BamHI XhoI NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC

20

pGP1f

NotI Sali HindIII EcoRI ClaI KpnI BamHI XhoI NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC

それらの各プラスミドは大型トランスジーン挿入断片の作製に利用することができ、該挿入断片は NotIで切り出すことができ、その結果トランスジーンDNAをマイクロインジェクション前に、ベクター配列から精製することができる。

30

2. pGP1b

pGP1aを NotIで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド：

オリゴ-47 5' -ggc cgc aag ctt act gct gga tcc tta att aat cga tag tg

a tct cga ggc- 3'

オリゴ-43 5' -ggc cgc ctc gag atc act gat taa tta agg atc cag cag ta

a gct tgc - 3'

40

と連結せしめた。

生じたプラスミド pGP1bは、NotIにより隣接された短いポリリンカー領域を含む。これは、NotIにより切除することができる大型挿入断片の作製を容易にする。

。

3. pGPe

【数 1 2 3】

(124)

次のオリゴヌクレオチド

オリゴ-44 5' -ctc cag gat cca gat atc agt acc tga aac agg gct tgc -
3'

オリゴ-45 5' -ctc gag cat gca cag gac ctg gag cac aca cag cct tcc -
3'

10

を使って、ポリメラーゼ連鎖反応技術によりラット肝臓DNA由来の免疫グロブリン重鎖3' エンハンサー [S. Pettersonら、Nature344:165-168 (1990)] を増幅せしめた。

増幅生成物を BamHIとSph. Iで消化し、そして BamHI/Sph Iで消化されたpNN03 (pNN03 は、記載順に次の制限部位：Not I, BamHI, Nco I, Cla I, EcoRV, Xba I, Sac I, Xho I, Sph I, Pst I, Bgl II, EcoRI, Sma I, Kpn I, HindIII および Not Iを有するポリリンカーを含む pUC由来のプラスミドである) 中にクローニングした。生じたプラスミドpRE3を BamHIとHindIII で消化し、そしてラットIg重鎖3' エンハンサーを含む挿入断片を、BamHI/HindIIIで消化されたpGP1b中にクローニングした。生じたプラスミドpGPe (図28および(化2) 及び(化3)) は、配列をクローニングすることができそして次いで Not I消化によって3' エンハンサーと一緒に切り出すことがかできる幾つかのユニーク制限部位を含有する。

20

30

化2

及び

化3

40

【数 1 2 4】

(125)

[illegible]

10

20

30

ベクター p G P e の配列

B. IgMを発現する小遺伝子座トランスジーン pIGM1の作製

1. J- μ 定常領域クローンの単離およびpJM1の作製

ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングしたヒト胎盤ゲノム DNA ライブラリーを、ヒト重鎖 J 領域特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-1 5' -gga ctg tgt ccc tgt gtg atg ctt ttg atg tct ggg gcc aa
g-3'

を用いてスクリーニングし、そしてファージクローン λ 1.3を単離した。6つの

40

【数 1 2 5】

(126)

Jセグメント全部並びにDセグメントOHG52 および重鎖J- μ イントロンエンハンサーを含む、6 kbのHindIII/Kpn I断片をこのクローンから単離した。同じライブラリーをヒト μ 特異的オリゴヌクレオチド：

オリゴ-2 5' -cac caa gtt gac ctg cct ggt cac aga cct gac cac cta tga -3'

10

を用いてスクリーニングし、ファージクローン λ 2.1を単離した。 μ スイッチ領域および μ 定常領域エクソンの全部を含む、10.5 kbのHindIII/Xho I断片をこのクローンから単離した。それらの2断片を、Kpn I/Xho Iで消化されたpNN03と一緒に連結せしめ、プラスミドpJM1を得た。

2. pJM2

ファージクローン λ 2.1から4 kbのXho I断片を単離した。該断片は、ある種のIg0発現B細胞中での μ 遺伝子の δ 関連欠失に関与するいわゆる $\Sigma \mu$ 要素〔HYasuiら、Eur. J. Immunol 19:1399 (1989)；これは参考として本明細書中に組み込まれる〕を含む、pJM1の配列のすぐ下流の配列を含有する。この断片をDNAポリメラーゼIのクレノウ断片で処理し、そしてXho Iで切断されクレノウで処理されたpJM1と連結せしめる。生じたプラスミドpJM2 (図29) は、内部のXho I部位を失っているが、クレノウ酵素による不完全な反応の結果として3' Xh

20

30

o Iを保持している。pJM2は完全なヒトJ領域、重鎖J- μ イントロンエンハンサー、 μ スイッチ領域および μ 定常領域エクソン全部、並びに μ 遺伝子の δ 関連欠失に関与する2つの0.4 kbの直接反復 $\sigma \mu$ および $\Sigma \mu$ を含有する。

3. D領域クローンの単離およびp0H1の作製

次のヒトD領域特異的オリゴヌクレオチド

オリゴ-4 5' -tgg tat tac tat ggt tgc ggg agt tat tat aac cac agt gtc -3'

40

を用いて、ヒト胎盤ゲノムライブラリーをD領域クローンについてスクリーニングした。ファージクローン λ 4.1と λ 4.3を単離した。D要素D_{K1}、D_{N1}およびD_{M2}〔Y. Ichihara ら、EMBO J. 7: 4141 (1988)〕を含む5.5 kbのXho I断片をファージクローン λ 4.1から単離した。D要素D_{LR1}、D_{XP1}、D_{XP'1}およびD_{A1}を

【数 1 2 6】

(127)

含む上流の隣接5.2 kb Xho I断片をファージクローン λ 4.3から単離した。それらのD領域 Xho I断片の各々をプラスミドベクターpSP72 (Promega, Madison, WI)のSal I部位中にクローニングし、2配列を結合する Xho I部位を破壊した。次いで上流断片を Xho IとSma Iで切り出し、下流断片を EcoRVと Xho Iで切り出した。得られた単離断片を Sal Iで消化されたpSP2と一緒に連結せしめ、プラスミドpOH1を与えた。pOH1は、少なくとも7つのDセグメントを含みXho I (5') およびEcoRV (3') で切り出すことができる10.6kbの挿入断片を含有する。

10

4. pCOR1

プラスミドpJM2をAsp718 (Kpn Iのアイソシゾマー) で消化し、そしてDNA-ポリメラーゼ I のクレノウ断片を用いて突出末端をフィルインした。次いで生じたDNA をCla Iで消化し、挿入断片を単離した。この挿入断片をpOH1の XhoI/EcoRV 挿入断片および XhoI/Cla I消化pGPeと連結せしめ、pCOR1 を作製した (図30)。

20

5. pVH251

2つのヒト重鎖可変領域セグメントV_H 251 とV_H 105 [Humphrise ら、Hature 331:446 (1988)] を含む10.3 kbのゲノムHindIII断片をpSP72中にサブクローニングし、プラスミドpVH251を与えた。

30

6. pIGM1

プラスミドpCOR1 を XhoIで部分消化し、そしてpVH251の単離Xho I/Sal I挿入断片を上流の XhoI部位にクローニングし、プラスミド pIGM1 (図31) を作製した。pIGM1 は、下記の配列要素の全邪が NotIでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離することができそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトすることができるように、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ_H セグメント全部、ヒト μ エンハンサー、ヒト $\sigma\mu$ 要素、ヒト μ スイッチ領域、ヒト μ コードエクソン全部およびヒト $\Sigma\mu$ 要素を、ラット重鎖3' エンハンサーと共に含有する。

40

C. IgMとIgGを発現する小遺伝子座トランスジーンpHC1の作製

【数 1 2 7】

(128)

1. γ 定常領域クローンの単離

次のヒトIgG 定常領域遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド

オリゴ-29 5' -cag cag gtg cac acc caa tgc cca tga gcc cag aca ctg ga
c -3'

を用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした。ファージクローンλ 29
4とλ 29.5を単離した。γ スイッチ領域を含むファージクローンλ 29.4の 4 kbH
indIII断片を使って、ファージベクターラムダ FIXTM III (Stratagene, La Jolla
, CA)中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを探索した。
ファージクローンλ Sg1.13を単離した。異なるγ クローンのサブクラスを決定す
るために、鋳型として上記3つのファージクローンの各々のサブクローンを使っ
てそしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド

オリゴ-67 5' -tga gcc cag aca ctg gac -3'

を使って、ジデオキシ配列決定反応を実施した。

ファージクローンλ 29.5とλ S γ 1.13は両方ともγ 1サブクラスであると決定
された。

2. oγ e1

γ 1コード領域を含むファージクローンλ 29.5の7.8 kb Hind III 断片をpUC1
8中にクローニングした。生じたプラスミドpLT1を Xho Iで消化し、クレノウ断

片で処理し、そして再連結せしめて内邪Xho I部位を破壊した。生じたクローンp
LT1xkをHindIIIで消化し、挿入断片を単離し、pSP72 中にクローニングしてプラ
スミドクローンpLT1xks を作製した。ポリリンカーXho I部位とヒト配列由来のB
amHI 部位のところでのpLT1xksの消化は、γ 1 定常領域コードエクソンを含む7.
6 kb断片を与えた。この7.6 kb Xho I/BamHI 断片を、ファージクローンλ 29.5
からの隣接の下流4.5 kb BamHI断片と一緒に、Xho I/BamHI で消化されたpGPe
中にクローニングし、プラスミド pγ e1を作製した。pγ e1は、ラット重鎖3'
エンハンサーに連結された、5 kbの下流配列と共にγ 1 定常領域コードエクソン
の全部を含有する。

3. pγ e2

【数 1 2 8】

(129)

γ 1 スイッチ領域とスイッチ前繁殖不能転写物(sterile trans-crypt) [P. Siderasら、International Immunol. 1:631(1989)] の第一エクソンとを含む5.3 kbのHindIII 断片をファージクローン λ S γ 1.13から単離し、そして挿入断片の5'末端の近隣にポリリンカー Xho I部位を有するpSP71 中にクローニングし、プラスミドクローンpS γ 1sを作製した。pS γ 1sの Xho I/Sal I挿入断片をXho Iで消化されたp γ e1中にクローニングし、プラスミドクローンp γ e2を作製した(図32)。p γ e2は、ラット重鎖3' エンハンサーに連結された、下流の5kb配列と共に、 γ 1 定常領域コードエクソン全部並びに上流のスイッチ領域および繁殖不能転写物エクソンを含有する。

10

4. pHCl

プラスミドpIGM1 を Xho Iで消化し、43 kb 挿入断片を単離し、そして Xho Iで消化されたp γ e2中にクローニングし、プラスミドpHC1を作製した(図31)。pHC1は、下記の配列要素の全部が Not Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製することができるように、ラット重鎖3' エンハンサーと共に、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ μ セグメント全部、ヒトJ- μ エンハンサー、ヒト σ μ 要素、ヒト μ スイッチ領域、ヒト μ コードエクソン全部、ヒト Σ μ 要素、およびヒト γ 1 定常領域(関連のスイッチ領域および繁殖不能転写物関連エクソンを含む)を含有する。

20

30

D. IgM とIgG を発現する小遺伝子鎖トランスジーンpHC2の作製

1. ヒト重鎖V領域遺伝子 VH49.8 の単離

ヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーラムダ FIXTM II(Stratagene, La Jolla, CA)を、次のヒトVH1 ファミリー特異的オリゴヌクレオチド:

40

オリゴ-49 5'-gtt aaa gag gat ttt att cac ccc tgt gtc ctc tcc aca ggt gtc-3'

を用いてスクリーニングした。

ファージクローン λ 49.8を単離し、そして可変セグメントVH49.8を含む6.1 kb

【数 1 2 9】

(130)

Xba I断片をpNN03 中にサブクローニングし（ポリリンカー Cla I部位がVH49.8の下流にそしてポリリンカー Xho I部位が上流にくるように）、プラスミドpVH49.8を作製した。この挿入断片の800 bp領域を配列決定すると、VH49.8は転写解読枠並びに完全なスプライシングシグナルおよび組換えシグナルを有することがわかり、よって該遺伝子が機能的であることを指摘する（表2）（化4）（化5）。

10

化4

及び

化5

TTCTCAGGC	AGGATTTAGG	GCTTGGTCTC	TCAGCATCCC	ACACTTGTAC	50
AGCTGATGTG	GCATCTGTGT	TTTCTTCTC	ATCCTAGATC	AAGCTTTGAG	100
CTGTGAAATA	CCCTGCCTCA	TGAATATGCA	AATAATCTGA	GGTCTTCTGA	150
GATAAATATA	GATATATTGG	TGCCCTGAGA	GCATCACATA	ACAACCAGAT	200
TCCTCTCTA	AAGAAGCCCC	TGGGAGCACA	GCTCATCACC	ATGGACTGGA	250
CCTGGAGGTT	CCTCTTTGTG	GTGGCAGCAG	CTACAGGaa	MetAspTrpT	300
hrTrpArgPh	lLeuPheVal	ValAlaAlaA	laThr	gggcttctt	350
agtccaaagg	ctgagggaagg	gacctgggt	agtaaaga	ggatgaa	
cacccctgtg	tcctctccac	agGTGTCCAG	TCCCAGGTCC	AGCTGGTGCA	400
GTCTGGGGCT	GAGGTGAAGA	GlyValGln	SerGlnValG	lnLeuValGl	
nSerGlyAla	GluValLysL	AGCCTGGGTC	CTCGGTGAAG	GTCTCCTGCA	450
AGGCTTCTGG	AGGCACCTTC	ysProGlySe	rSerValLys	ValSerCysL	
ysAlaSerGl	yGlyThrPhe	AGCAGCTATG	CTATCAGCTG	GGTGGACAG	500
GCCCTTGGAC	AAGGGCTTGA	SerSerTyrA	lalleSerTr	pValArgGln	
AlaProGlyG	lnGlyLeuGl	GTGGATGGGA	AGGATCATCC	CTATCCTTGG	550
TATAGCAAC	TACGCACAGA	uTrpMetGly	ArgDelleP	roileLeuGl	
ylleAlaAsn	TyrAlaGlnL	AGTTCCAGGG	CAGAGTCACG	ATTACCCCGG	600
ACAAATCCAC	GAGCACAGCC	ysPheGlnGl	yArgValThr	lleThrAlaA	
spLysSerTh	rSerThrAla	TACATGGAGC	TGAGCAGCCT	GAGATCTGAG	650
GACACGGCCG	TGTATTACTG	TyrMetGluL	euSerSerLe	uArgSerGlu	
AspThrAlaV	alTyrIYrCy	TGCCAGAGAC	ACAGTGTGAA	AMCCACATC	700
CTGAGAGTG	CAGAACCCCT	sAlaArg	GACGCTGTGC	CGGGCTGAGG	750
AGATGACAGG	GTTTATTAGG	GAGGGAGAAG	TTTACAAAAT	GGGTTATATA	800
TTTGAGAAAA	AA				812

20

30

40

ヒト V_H I ファミリー遺伝子 V_H 49.8の配列

2. pV2

プラスミド pUC12中にサブクローニングされたヒト V_H IVファミリー遺伝子 V

【数 1 3 0】

(131)

H 4-21 [I. Sanz ら、EMBO J. 8: 3741 (1989)] を含む4 kb Xba Iゲノム断片をSma IとHindIII で切り出し、ポリメラーゼIのクレノウ断片で処理した。平滑末端化された断片を、Cla Iで消化されクレノウで処理されたpVH49.8 中にクローニングした。生じたプラスミド pV2は、挿入断片の3' 末端のユニーク Sal I部位および5' 末端のユニーク Xho I部位を使って、同じ方向でVH4-21[の上流に連結された、ヒト重鎖遺伝子VH49.8を含む。

10

3. pSγ1-5'

近隣の上流3.1 kb Xba I断片と一緒に0.7 kb Xba I/HindIII 断片（プラスミド pγe2中の 5.3 kb γ 1 スイッチ領域含有断片のすぐ上流で且つそれに隣接した配列を表す）をファージクローンλ Sg1.13から単離し、そしてHindIII/XbaIで消化された pUC18ベクター中にクローニングした。生じたプラスミドpSγ1-5'は、γ 1 イソタイプにスイッチする前のB細胞中に見つかる繁殖不能転写物(sterile transcript) [P. Siderasら、International Immunol., 1: 631 (1989)]の開始部位の上流の配列を表す3.8 kb挿入断片を含む。該転写物はイソタイプスイッチの開始に関係があり、そして上流のシス作用性配列はしばしば転写調節に重要であるので、繁殖不能転写物の正しい発現および関連するスイッチ組換えを促進するためにそれらの配列がトランスジーン構成物中に含まれる。

20

4. pVGE1

pSγ1-5' 挿入断片を Sma IとHindIII で切り出し、クレノウ酵素で処理し、そして次のオリゴヌクレオチドリンカー

5' -ccg gtc gac cgg - 3'

と連結せしめた。この連結生成物を Sal Iで消化し、Sal Iで消化されたpV2 に連結せしめた。

30

40

生じたプラスミドpVP は、2つの機能的ヒト可変遺伝子セグメントVH49.8とVH4-21 (表2 (化4) 及び (化5) 参照) の下流に連結された3.8 kbのγ 1 スイッチ5' 隣接配列を含む。Sal Iでの部分消化および Xho Iでの完全消化の後、アガロースゲル上での15kb断片の精製により、pVP 挿入断片を単離する。次いで該挿入断片を pγe2の Xho I部位中にクローニングし、プラスミドクローンpVGE1

【数 1 3 1】

(132)

(図33)を作製する。pVGE1 は、ヒト γ 1 定常遺伝子および関連のスイッチ領域の上流に2つのヒト重鎖可変遺伝子セグメントを含有する。可変領域と定常領域との間のユニークSal I部位を用いて、D、J および μ 遺伝子セグメントをクローニングすることができる。 γ 1 遺伝子の3' 末端にラット重鎖3' エンハンサーが連結され、そして挿入断片全体は Not I部位により隣接される。

10

5. pHc2

プラスミドクローンpVGE1をSal Iで消化し、pIGM1 のXho I挿入断片をその中にクローニングした。生じたクローンpHC2 (図31) は、4つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ- μ エンハンサー、ヒト $\sigma\mu$ 要素、ヒト μ スイッチ領域、ヒト μ コードエクソン全部、ヒト $\Sigma\mu$ 要素、およびヒト γ 1 定常領域（繁殖不能転写物開始部位の上流の4 kb隣接配列と共に、関連のスイッチ領域と繁殖不能転写物関連エクソンを含む）を含有する。

20

それらのヒト配列は、前記配列要素全部を Not Iでの消化によりベクター配列を含まない単一鎖上に単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を生ぜしめることができるように、ラット重鎖3' エンハンサーに連結される。該挿入断片の5' 末端のユニーク Xho I部位を使って、追加のヒト可変遺伝子セグメントをその中にクローニングし、この重鎖小遺伝子座の組換え多様性を更に増大させることができる。

30

E. トランスジェニックマウス

プラスミドpIGM1 およびpHC1の Not I挿入断片をアガロースゲル電気泳動によりベクター配列から単離した。精製された挿入断片を、受精した(C57BL/6×CBA) F2マウスの胚の前核中にマイクロインジェクトし、そして生存している胚を

40

、Hogan らにより記載された通りに (B. Hogan, F. Costantini およびE. Lacy, Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 偽妊娠した雌に移した。注入された胚から発育したマウスを、尾部DNAのサザンプロット分析によりトランスジーン配列の存在について分析した。既知量のクローン化DNAを含有する対照標準物に比較したバンド強

【数 1 3 2】

(133)

度により、トランスジーンコピー数を評価した。

3～8週齢において、それらの動物から血清を単離し、そしてHarlowおよびLane (E. Harlow およびD. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) により記載されたように、トランスジーンによりコードされるヒトIgMおよびIgG 1 の存在について ELISAによりアッセイした。マイクロタイタープレートのウェルを、ヒトIgMに特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンAF6, #0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME) およびヒトIgGに特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンJL512, #0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME) によりコーティングした。該ウェル中に血清試料を連続的に希釈し、予備吸着させることによってマウス免疫グロブリンとの交差反応性を最小限にしたアフィニティー単離されたアルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ヒトIg (多価) を用いて、特異的免疫グロブリンの存在を検出した。

10

20

表1と図34は、プラスミドpHC1のトランスジーン挿入断片を注入した胚から発育した2匹の動物の血清中のヒトIgMおよびIgG 1 の存在についてのELISAアッセイの結果を示す。このアッセイにより試験した対照の非トランスジェニックマウスは全て、ヒトIgMおよびIgG の発現について陰性であった。pIGN1 Not I挿入断片を含有する2系統のマウス (系統#6と15) はヒトIgMを発現するがヒトIgG 1 を発現しない。我々はpHC1挿入断片を含む6つの系のマウスを試験した。その結果、4系統 (系#26, 38, 57および122) がヒトIgMとヒトIgG 1 の両方を発現し、2系統のマウス (系統#19および21) は検出可能なレベルのヒト免疫グロブリンを発現しなかった。

30

ヒト免疫グロブリンを発現しなかったpHC1トランスジェニックマウスは、マイクロインジェクトした胚から直接発育したものであり、該トランスジーンが存在についてモザイクであり得る、いわゆるG₀マウスであった。サザンブロット分析は、それらのマウスの多くが細胞あたり該トランスジーンの数または少数のコピーを含むことを示した。pIGM1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgM、並びにpHC1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMとIgG 1 の検出は、トランスジーン配列がVDJ連結、転写およびイソタイプスイッチを指令すること

40

【数 1 3 3】

(134)

において正しく機能しているという証拠を提供する。1匹の動物(#18)は、サザンブロット分析によりトランスジーンについて陰性であり、検出可能レベルのヒトIgMまたはIgG 1を全く示さなかった。2番目の動物(#38)は、サザンブロットティングによりアッセイすると該トランスジーンの約5コピーを含んでおり、そして検出可能レベルのヒトIgMとIgG 1の両方を示した。トランスジーンを注入した胚から発育した11匹の動物についてのELISAアッセイの結果を下表(表1)に要約する。

10

表1

表1

ELISA アッセイによるトランスジェニック動物の

20

血清中のヒトIgMおよびIgG 1の検出

注入した 細胞あたりのおよその

動物#	トランスジエン	トランスジェンコピー数	ヒトIgM	ヒトIgG 1
6	pIGM1	1	++	—
7	pIGM1	0	—	—
9	pIGM1	0	—	—
10	pIGM1	0	—	—
12	pIGM1	0	—	—
15	pIGM1	10	++	—
18	pHC1	0	—	—
19	pHC1	1	—	—
21	pHC1	<1	—	—
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

30

40

表1は、組み込まれたトランスジーンDNAの存在と血清中のトランスジーンによりコードされる免疫グロブリンとの間の相関関係を示す。pHC1トランスジーンを含むことがわかった動物のうちの2匹は、検出可能なレベルのヒト免疫グロ

【数 1 3 4】

(135)

ブリノを発現しなかった。それらは共に低コピー動物であり、該トランスジーン
 の完全なコピーが含まれていないか、または該動物が遺伝的モザイクを有してい
 る（動物#21について評価された細胞あたり<1コピーにより指摘される）こと
 があり、そしてトランスジーン含有細胞が造血系統に移っていない場合がある。
 あるいは、トランスジーンがそれらの発現に至らないゲノム領域中に組み込まれ
 ている場合がある。pIGM1 トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMの検出、
 並びにpHC1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMとIgG 1の検出は、トラ
 ンスジーン配列がV D J結合、転写およびイソタイプスイッチを指令する上で正
 しく機能することを指摘する。

10

F. cDNAクローン

V D J連結およびクラススイッチ、並びにB細胞発達および対立遺伝子排除に
 おけるトランスジーンがコードするヒトB細胞レセプターの関与に関するpHC1ト
 ランスジーンの機能性を評価するために、トランスジェニックマウス脾臓mRNAか
 ら誘導した免疫グロブリンcDNAクローンの構造を調べた。DおよびJセグメント
 用法、N領域の付加、CDR3の長さ分布、並びに機能的mRNA分子をもたらし接合部
 の頻度に焦点を合わせて、該トランスジーンによりコードされる重鎖の総合的多
 様性を調べた。VH105 とVH251 を組み込んだIgM およびIgGをコードする転写物
 を調べた。

20

30

第11週の雄第二世代57系列pHC1トランスジェニックマウスからポリアデニル化
 R N Aを単離した。このR N Aを使ってオリゴd T開始一本鎖cDNAを合成した。
 次いで得られたcDNAを、次の4つの合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして
 使った4つの各P C R増幅反応のための鋳型として使用した：VH251特異的オリ
 ゴー149 ctagct cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg (g,a,t,c)
 ; VH105 特異的オリゴー150 gtt gct cga gtg aaa ggt gtc cag tgt gag gtg ca
 g

40

ctg (g,a,t,c) ; ヒト γ 1 特異的オリゴー151 ggc gct cga gtt cca cga cac cg
 t cac cgg ttc ; およびヒト μ 特異的オリゴー152 cct gct cga ggc agc caa cgg
 cca cgc tgc tcg。反応1はプライマー o-149とo-151 を使って VH251- γ 1 転

【数 1 3 5】

(136)

写物を増幅せしめ、反応2はプライマー o-149とo-152 を使って VH251- μ 転写物を増幅せしめ、反応3はプライマー o-150とo-151 を使ってVH105- γ 1 転写物を増幅せしめ、そして反応3はプライマーo-150 とo-152 を使って、VH105- μ 転写物を増幅せしめた。

得られた0.5 kbのP C R産物をアガロースゲルから単離した。対応するELISAデータ (図40) と一致して、 μ 転写物産物は γ 転写物産物よりも豊富であった。P C R産物を Xho Iで消化し、プラスミドpNN03 中にクローニングした。4つのP C R増幅の各々からの9個のクローンのミニプレプから二本鎖プラスミドD N Aを単離し、そしてジデオキシ配列決定反応を実施した。該クローンのうちの2つがDまたはJ セグメントを含まない欠失体であることがわかった。それらは正常のR N Aスプライシング生成物からは誘導することができなかったのも、おそらくP C R増幅中に導入された欠失から生じたのであろう。該D N A試料のうちの1つは、2つの個々のクローンの混合物であることがわかり、そして他の3つのクローンは読み取り可能なD N A配列を生成しなかった (おそらくD N A試料が十分に純粋でなかったためであらう)。

残りの30個のクローンからのV D J 接合部のD N A配列を (化6) (及び化7) にまとめた。各配列はユニークであり、遺伝子再配列の単一経路が優性でないこと、またはトランスジーン発現性B細胞の単一クローンが優性でないことを示す。どの2配列も類似していないという事実は、免疫グロブリンの莫大な多様性が2個のVセグメント、10個のDセグメントおよび6個のJセグメントのみを含む小型の小遺伝子座から発現され得るという暗示でもある。該トランスジーン中に含まれるVセグメントの両方、6個のJセグメントの全部および10個のDセグメントの7個がV D J 接合部に使われる。

加えて、両定常領域遺伝子 (μ と γ 1) が転写物中に含まれる。VH105プライマーは実施した反応においてVH105に特異的であることがわかった。従って、反応3および4からのクローンの多くがVH251転写物を含んでいた。更に、連結反応3のP C R産物から単離されたクローンはIgGよりもむしろIgMをコードすることがわかった；しかしながら、これは、D N Aを同一ゲル上で単離したため、

10

20

30

40

【数 1 3 6】

(137)

反応 4 からの P C R 産物による汚染を表すかもしれない。成人末梢血リンパ球（P B L）から免疫グロブリン重鎖配列を増幅せしめそして V D J 接合部の D N A 配列を決定した同様な実験が、細菌 Yamada らにより報告された〔J. Exp. Med.173:395-407（1991）；これは参考として本明細書中に組み込まれる〕。このヒト P B L からのデータを pH C 1 トランスジェニックマウスからの我々のデータと比較した。

10

化 6

及び

化 7

20

30

40

【数 1 3 7】

(138)

	V	# D=	J	C
1	VH251	DH252	GGCTTAAAGCTGGGGTTGAT	GGCTTTGATATCGGGCCAAAGGACAAATGGTCACCGGTCTCTCAG
2	VH251	DH252	CAGCTTAAACACCAACCTGG	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
3	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
4	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
5	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
6	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
7	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
8	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
9	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
10	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
11	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
12	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
13	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
14	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
15	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
16	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
17	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
18	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
19	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
20	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
21	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
22	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
23	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
24	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
25	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
26	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
27	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
28	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
29	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG
30	VH251	DH252	TACTGTGCGGAGA	CTTTGACTACTGAGGACAGGACAGGACCTGGTCACCGGTCTCTCAG

G. Jセグメント選択

表2は、成人PBL免疫グロブリン転写物中に見つかるJセグメントに対して、pHCl1トランスジーンによりコードされる転写物中に取り込まれるJセグメントの分布を比較した。それらの分布プロフィールは非常に類似しており、両系とも

10

20

30

40

【数 1 3 8】

(139)

J 4セグメントが優性セグメントであり、次いでJ 6セグメントが優性である。
J 2はヒトP B L中およびトランスジェニック動物中で最も稀なセグメントである。

表2

10

表2

Jセグメント選択

使用% (±3%)

<u>Jセグメント</u>	<u>HCIトランスジェニック動物</u>	<u>ヒトP B L</u>
J 1	7	1
J 2	3	<1
J 3	17	9
J 4	44	53
J 5	3	15
J 6	<u>26</u>	<u>22</u>
	100%	100%

20

H. Dセグメント選択

30

Yamadaらにより分析されたクローンの49% (82のうち40) が、pHC1トランスジェン中に含まれるDセグメントを含んでいた。他の11クローンは、該著者らにより既知Dセグメントのいずれにも指定されなかった配列を含んだ。それらの指定されなかった11個のクローンのうちの2つは、pHC1構成物中に含まれるD1R2セグメントの逆位から誘導されるようだ。Ichi-haraら [EMBO J. 7: 4141 (1988)] により予想されそしてSanz [J. Immunol. 147:1720-1729(1991)] により観察されたこの機構を、Yamadaら [J. Exp. Med. 171:395-407(1991)] は考慮に入れなかった。表2は、pHC1トランスジェニックマウスについてのDセグメント分布とYamadaらによりヒトP B L転写物について観察されたものとの比較である。Yamadaらのデータを、D1R2使用を包含しそしてpHC1トランスジェン中ではないDセグメントを除外するように再編集した。

40

【数 1 3 9】

(140)

表3は、Dセグメント組み込みの分布がトランスジェニックマウスとヒトPBLとにおいて非常に類似していることを証明する。2つの優性なヒトDセグメントDXP' 1とDN1は、トランスジェニックマウス中にも高頻度で見つかる。2つの分布間の最も大きな相違点は、ヒトに比べてトランスジェニックマウス中でのDHQ52の高頻度である。DHQ52の高頻度はヒト胎児肝臓中のDセグメント分布を思い出させる。Sanzは重鎖転写物の14%がDHQ52配列を含んだことを報告している。pHC1中に見つからないDセグメントを分析から除外すれば、Sanzにより分析された胎児転写物の31%がDHQ52を含んでいる。これは、不発明者らがpHC1トランスジェニックマウス中に観察した27%と同等である。

10

表3

20

表3

Dセグメント選択

使用% (± 3%)

<u>Dセグメント</u>	<u>HC1トランスジェニック動物</u>	<u>ヒトPBL</u>
DLRI	<1	<1
DXPI	3	6
DXP' 1	25	19
DA1	<1	12
DKI	7	12
DN1	12	22
DIR2	7	4
DM2	<1	2
DLR2	3	4
DHQ52	26	2
?	<u>17</u>	<u>17</u>
	100%	100%

30

40

I. V D J 接合部の機能性

【数 1 4 0】

(141)

表 4 は、pHCl トランスジェニック動物から分析された30個のクローンからの V D J 領域の推定アミノ酸配列を示す。翻訳配列は、30個の、V D J 接合部のうちの23個 (77%) が可変セグメントと J セグメントに関して枠内 (in-frame) であることを示す。

10

化 8 及び 化 9

V D J 接合部の機能性

			FR 3	CDR3	FR4	
1	VH251	DH252	J3	YCAR	RLTGVDAFDI	WGQGTMTVMSSASTK
2	VH251	DN1	J4	YCAR	HRIAAAGFDY	WGQGTMTVTSSASTK
3	VH251	D?	J6	YCAR	YYYYYYGMDV	WGQGTMTVTSSASTK
4	VH251	DXP1	J6	YCAR	HYDLTGPTTTTWTSGAKGPRSPSPQPPP	
5	VH251	DXP1	J4	YCAR	RRYYGSGSYYNVFDY	WGQGTMTVTSSADTK
6	VH251	D?	J3	YCAR	RGVSDAFDI	WGQGTMTVTSSADTK
7	VH251	DH252	J3	YCAR	ATGAFDI	WGQGTMTVTSSGSAS
8	VH251	DH252	J6	YCAR	SANWGSYYYYGMDV	WGQGTMTVTSSGSAS
9	VH251	—	J1	YCAR	YFQH	WGQGTMTVTSSGSAS
10	VH251	DLR2	J4	YCAR	HVANSFDY	WGQGTMTVTSSGSAS
11	VH251	DXP1	J4	YCAR	QITMVRGVFPDY	WGQGTMTVTSSGSAS
12	VH251	D?	J1	YCAR	QYFQH	WGQGTMTVTSSGSAS
13	VH251	DH252	J6	YCAR	QTGDYYYYGMDV	WGQGTMTVTSSGSAS
14	VH251	DXP1	J6	YCAR	HYYGSGSYDYDYYGMDV	WGQGTMTVTSSGSAS
15	VH251	DXP1	J4	YCAR	QGVGFGNPGHRLSLHQ	
16	VH105	DXP1	J5	YCVR	FWETGSTPGAREPWSPPQGVH	
17	VH251	DXP1	J4	YCAR	RRYYGSGSYYNVFDY	WGQGTMTVTSSGSTK
18	VH251	DH252	J4	YCAR	QTWGGDY	WGQGTMTVTSSGSTK
19	VH251	DK1	J6	YCAR	GYSGYDNYYYGIHV	WGQGTMTVTSSGSTK
20	VH251	DH252	J4	YCAR	QTGEDYFDY	WGQGTMTVTSSGSAS
21	VH251	DK1	J2	YCAR	YSGYDYLLVLRSLGPHWPHGCLLSLHR	
22	VH251	DIR2	J6	YCAR	ASLPSFDYYGMDV	WGQGTMTVTSSGSTK
23	VH251	DIR2	J4	YCAR	RGGGLTTGAREPWSPPQGVH	
24	VH105	D?	J6	YCVR	VETLLLLLRYGRLGPRDHGHRLLRECT	
25	VH105	DXP1	J4	YCVR	DILTQZRDY	WGQGTMTVTSSGSAS
26	VH251	DM1	J3	YCAR	HGLAAAGTAFDI	WGQGTMTVTSSGSAS
27	VH105	DH252	J3	YCVR	STGVDAFDI	WGQGTMTVTSSGSAS
28	VH251	DN1	J4	YCAE	IAAAALLZLLGPGNPGHRLRECT	
29	VH105	DN1	J4	YCVC	IAAAGKNGY	WGQGTMTVTSSGSAS
30	VH251	DH252	J4	YCAR	QNWGDY	WGQGTMTVTSSGSAS

20

30

J. COR3の長さ分布

表 4 は、pHCl トランスジェニックマウス中の枠内 V D J 接合部を有する転写物からの CDR3 ペプチドの長さをヒト P B L 中のそれと比較したものである。ヒト P B L データは同じく Yamada らから得られたものである。両分布は類似しているが、トランスジェニックマウスの分布はヒト P B L から観察されたものよりもわずかに小さい COR3 ペプチドの方に偏っていた。トランスジェニックマウスにおける COR3 の平均長さは 10.3 アミノ酸である。これは Sanz [J. Immunol. 147:1720-1729(1991)] によりヒト CDR3 ペプチドについて報告された平均サイズと実質的に同

40

【数 1 4 1】

(142)

じである。

表4

表4CDR3の長さ分布

存在率 (±3%)

10

<u>CDR3中のアミノ酸数</u>	<u>HCIトランスジェニック動物</u>	<u>ヒト P B L</u>
3～8	26	14
9～12	48	41
13～18	26	37
19～23	<1	7
>23	<u><1</u>	<u>1</u>
	100%	100%

20

実施例13再配列された重鎖トランスジーンA. 再配列されたヒト重鎖V D J セグメントの単離

ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中にクローニングされた2種のヒト白血球ゲノムDNAライブラリーを、

ヒト重鎖J- μ イントロンエンハンサーを含む λ 1.3の1 kb Pac I /HindIII断片を用いてスクリーニングする。陽性クローンを、次のV_H特異的オリゴヌクレオチド:

30

オリゴ-7 5' -tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc ac
c-3'

オリゴ-8 5' -tcc ctg aga ctc tcc tgt gca tct gga ttc acc ttc agt-
3'

40

の混合物とのハイブリダイゼーションについて試験する。

VプローブとJ- μ プローブの両方とハイブリダイズするクローンを単離し、そして再配列されたV D J セグメントのDNA配列を決定する。

B. 再配列されたヒト重鎖トランスジーンの作製

【数 1 4 2】

(143)

機能的V Jセグメントを含む断片（転写解読枠およびスプライスシグナル）を、プラスミド[®]由来の Xho I 部位が挿入断片配列の5'末端に隣接するように、プラスミドベクターpSP72中にサブクローニングする。機能的V D Jセグメントを含むサブクローンをXhoIとPacI（PacIはJ- μ イントロンエンハンサー近くの部位を認識する稀少な切断酵素である）で消化し、そして挿入断片をXhoI/PacIで消化されたpHC2中にクローニングし、機能的、V D Jセグメント、J- μ イントロンエンハンサー、 μ スイッチ要素、 μ 定常領域コードエクソンおよび γ 1定常領域（これは繁殖不能転写物関連配列、 γ 1スイッチおよびコードエクソンを含む）を有するトランスジーン構成物を作製する。上述したように、このトランスジーン構成物をNot Iで切り出し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製する。

10

20

実施例14

軽鎖トランスジーン

A. プラスミドベクターの作製

1. プラスミドベクターpGP1c

プラスミドベクターpGP1aをNo 1消化し、そして次のオリゴヌクレオチドオリゴ[®]81 5' -ggc ctc atc ccg gag ctc gag gac gac aag ctt tcg agg at c cg c-3'

30

オリコ[®] - 82 5' ggc cgc tcc tg aaa gt tgt cga cc cga gac ccg g gatgc-3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1cは、No 1部位により隣接されたXmaI, XhoI, SalI, HindIIIおよびBamHI 制限部位を有するポリリンカーを含む。

40

2. プラスミドベクターpGP1d

プラスミドベクターpGP1a Not I 消化し、そして次のオリゴヌクレオチドオリゴ[®] - 87 5' -ggc cgc tgt cga caa gt tat cga tgg atc ctc g ag tgc-3'

オリコ[®] - 88 5' -gg cgc act cga gga tcc atc gat aag ctt gtc gac a

【数 1 4 3】

(144)

gc-3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1d は、Not I 部位により隣接されたSalI, HindIII, Cla I, BamHIおよびXho I制限部位を有するポリリンカーを含む。

10

B. J_κおよびC_κクローンの単離

ファージベクターλEMBL3/SP6/T7 (Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを、ヒトκ軽鎖J領域特異的オリゴヌクレオチド：

オリコ[®]-36 5'-cac ctt cgg cca agg gac acg act gga gat taa acg taa
gca-3'

20

を用いてスクリーニングし、そしてファージクローン136.2と136.5を単離する。

136.2からJ_κ1セグメントを含む7.4kb XhoI断片を単離し、プラスミドpNN03中にサブクローニングしてプラスミドクローンp36.2を作製する。C_κ遺伝子セグメントと共にJ_κセグメント2～5を含む近隣の13 kb Xho I断片をファージクローン136.5から単離し、そしてプラスミドpNN03中にサブクローニングしてプラスミドクローンp36.5を作製する。それら2つのクローンを一緒にすると、J_κ1の7.2 kb上流で始まりC_κの9 kb下流で終わる領域に及ぶ。

30

C. 再配列された軽鎖トランスジーンの作製

1. 再配列された可変セグメントを発現させるためのC_κベクターpCK1

C_κ遺伝子を含むプラスミドクローンp36.5の13 kb Xho I断片を、9 kbの下流配列と一緒に、該挿入断片の5'末端がプラスミドXho I部位に隣接した状態で、プラスミドベクターpGP1cのSal I 部位中にクローニングする。生じたクローンpCK1は、再配列された、V J_κセグメントを含むクローン化断片をユニーク5' Xho I 部位に収容することができる。次いで該トランスジーンをNot Iで切り出し、ゲル電気泳動によってベクター配列から精製する。得られたトランスジーン構成物は、ヒトJ-C_κイントロンエンハンサーを含むであろうし、ヒト3' κエンハンサーを含むことができる。

40

【数 1 4 4】

(145)

2. 再配列された可変セグメントを発現させるための重鎖エンハンサー含有 C κ ベクター-pCK2

マウス重鎖 J- μ イントロンエンハンサー [J. Banerjiら、Cell133: 729-740(1983)] を含むマウスゲノム DNA の 0.9kb XbaI 断片を pUC18 中にサブクローニングし、プラスミド pJH22.1 を作製した。このプラスミドを SphtI により線状化し、クレノウ酵素を用いて末端をフィルインした。クレノウ処理された DNA を次いで HindIII で消化し、そしてヒト重鎖 μ イントロンエンハンサー [Haydayら、Nature 307:334-340(1984)] を含むファージクローン λ 1.3 (前の実施例) の uI (クレノウ) /HindIII 断片をそれと連結した。

生じたプラスミド pMHE1、両者が単一の BamHI/HindIII 断片上に切除されるように、pUC18 中に一緒に連結されたマウスとヒトの重鎖 μ イントロンエンハンサーから成る。この 2.3 kb 断片を単離し、pGP1c 中にクローニングして pMHE2 を作製する。pMHE2 を SalI で消化し、p36.5 の 13 kb Xho I 挿入断片をその中にクローニングする。生じたプラスミド pCK2 は、マウスとヒトの重鎖 J- μ イントロンエンハンサーがトランスジーン挿入断片の 3' 末端に融合していること以外は、pCK1 と同一である。最終トランスジーンを発現を調節するために異なるエンハンサー、即ちマウスまたはラットの 3' κ または重鎖エンハンサー [Meyer および Neubrger, EMBD J. 8:1959-1964 (1989); Pettersonら、Nature 344:165-168(1990)] を使って類似構成物を作製することができる。

3. 再配列された κ 軽鎖可変セグメントの単離

ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされた 2 つのヒト白血球ゲノム DNA ライブラリーを、p36.5 の 3.5 kb Xho I/Sma I 断片を含むヒト κ 軽鎖 J 領域を用いてスクリーニングした。陽性クローンを、次の V κ 特異的オリゴヌクレオチド

オリゴ-65 5' -agg ttc agt ggc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac
ttc ctc acc atc agc-3'

とのハイブリダイゼーションについて試験した。V プローブと J プローブの両方とハイブリダイズしたクローンを単離し、そして再配列された V J κ セグメント

【数 1 4 5】

(146)

のDNA配列を決定する。

4. 再配列されたヒト軽鎖構成物を含有するトランスジェニックマウスの作製

機能的V J セグメントを含む断片（転写解読枠およびスプライスシグナル）をベクターpCK1およびpCK2の Xho I 部位中にサブクローニングし、再配列された κ 軽鎖トランスジーンを作製する。Not Iでの消化により該トランスジーン構成物をベクター配列から単離する。アガロースゲル上で精製した挿入断片をマウス胚の前核中にマイクロインジェクトし、トランスジェニックマウスを作製する。ヒト κ 鎖を発現している動物を、重鎖小遺伝子を含有するトランスジェニック動物（実施例14）と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを作る。

10

V J κ 組合せの全部か、広域スペクトルの種々の重鎖V D J 組合せと安定な重鎖—軽鎖複合体を形成できるわけではないので、それぞれ異なる再配列されたV J κ クローンを使って幾つかの異なる軽鎖トランスジーン構成物を作製し、そして重鎖小遺伝子座トランスジーンを発現するマウスと交配させる。二重トランスジェニック（重鎖構成物と軽鎖構成物の両方）動物から、末梢血、脾臓およびリンパ節リンパ球を単離し、ヒトおよびマウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリンに特異的な蛍光抗体(Pharmlingen, San Diego, CA) で染色し、そしてFACScan 分析装置(Becton Dickinson, San Jose, CA) を使ってフローサイトメトリーにより分析する。最大数のB細胞の表面上に最高レベルのヒト重鎖／軽鎖複合体を生じ且つ免疫細胞区分に悪影響を与えない（BおよびT細胞サブセット特異的抗体を用いたフローサイトメトリー分析によりアッセイした時）再配列された軽鎖ト

20

30

ランスジーン構成物を、ヒトモノクローナル抗体の産生のために選択する。

D. 再配列されていない軽鎖小遺伝子座トランスジーンの作製

1. 小遺伝子座トランスジーンを作製するためのJ κ , C κ 含有ベクターpJCK1 p36.5の13 kbのC κ 含有 Xho I挿入断片をクレノウ酵素で処理し、HindIIIで消化されクレノウ処理されたプラスミドpGP1d中にクローニングする。挿入断片の5' 末端がベクター由来のC1aI部位に隣接するようなプラスミドクローンを選択する。生じたプラスミドp36.5-IdをC1aIで消化し、クレノウで処理する。p36.2のJ κ 1含有7.4 kb Xho I挿入断片をクレノウで処理し、そしてC1aIで消化され

40

【数 1 4 6】

(147)

クレノウ処理されたp36.5-1d中にクローニングする。p36.2挿入断片がp36.5挿入断片と同じ方向にあるクローンを選択する。このクローンpJCK1 (図35) は、7.2kbの上流配列および9 kbの下流配列と一緒に、完全なヒト J κ 領域および C κ 領域を含む。

該挿入断片はヒト J - C κ イントロンエンハンサーも含み、ヒト3' κ エンハンサーを含むこともある。該挿入断片は、追加の3' 隣接配列、例えば重鎖または軽鎖エンハンザーをクローニングする目的でユニーク3' Sal I 部位により隣接される。ユニーク:Xho I 部位は、再配列されていないV κ 遺伝子セグメント中でクローニングする目的で該挿入断片の5' 末端に置かれる。ユニークSal I およびXho I 部位は、最終のトランスジーン構成物をベクター配列から単離するために使われる Not I 部位により隣接される。

2. 再配列されていないV κ 遺伝子セグメントの単離およびヒトIg軽鎖タンパク質を発現するトランスジェニック動物の作製

V κ 特異的オリゴヌクレオチドであるオリゴ-65 (上述) を使って、ファージベクター λ EMBL3/SPG/T7 (Clonetech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAを探索する。生じたタロンからの可変遺伝子セグメントを配列決定し、機能的と思われるクローンを選択する。機能性を判断するための基準は、転写解読格、完全なスプライス受容体および供与体配列、並びに完全な組換え配列を含むことである。

選択された可変遺伝子セグメントを含むDNA断片をプラスミドpJCK1のユニークXhoI部位にクローニングし、小遺伝子座構成物を作製する得られたクローンをNot I で消化し、挿入断片を単離し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製する。それらの動物のトランスジーンは、B細胞発達の際にV - J 結合を受けるであろう。ヒト κ 鎖を発現する動物を、重鎖小遺伝子座を含有するトランスジェニック動物と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを得る。

実施例15

ゲノム重鎖ヒトIgトランスジーン

10

20

30

40

【数 1 4 7】

(148)

この実施例は、接合子中へのマイクロインジェクションまたはES細胞中への組み込みによりマウス生殖細胞中に導入される、ヒトゲノム重鎖免疫グロブリントランスジーンのクローニングを記載する。

Marzluff, W.F. ら、(1985) Transcription and Translation: A Practical Approach, B.D. Hammes および S.J. Higgins 編, 98-129頁, IRL Press, Oxford により記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核（またはPDSで洗浄したヒト精母細胞）を0.5%低融点アガロースブロック中に埋め込み、そして核については500mM EDTA, 1% SOS 中の1mg/mlのプロテイナーゼKにより、精母細胞については500mM EDTA, 1% SOS, 10mM DTT中の 1mg/mlのプロテイナーゼKにより、50℃にて18時間溶解せしめる。該ブロックを40 µg/mlのPMSE/TE中で50℃にて30分間インキュベートすることにより、プロテイナーゼKを不活性化する。次いでM. Finneyにより Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel ら編, John Wiley & Sons, 増補4, 1988, 例えば第2.5.1章) 中に記載されたように、アガロース中で該DNAを制限酵素 Not Iで消化する。

Not I 消化したDNAを、次いでAnandら、Nuc. Acids Res. 17:3425-3433(1989)により記載されたようにバルスフィールドゲル電気泳動により分画する

。Not I 断片に富む画分をサザンハイブリダイゼーションによりアッセイし、断片によってコードされる1または複数の配列を検出する。そのような配列は、重鎖Dセグメント、Jセグメントおよびγ1定常領域と共に6つのV_Hファミリー全部の代表物を含む〔この断片は、Bermanら(1988)、前掲によればHeLa細胞から670 kb断片として同定されているけれども、本発明者らはそれかヒト胎盤および精子DNAからの330 kb断片であることを発見した〕。この Not I 断片を含む画分（図4参照）を記載の如く〔McCormickら、Technique 2:65-71 (1990)〕ベクターpYACNNの Not I 部位中に連結せしめる。プラスミドpYACNNは、pYACneo(Clon tech)をEcoRIで消化しそしてオリゴヌクレオチド5' -AAT TGC GGCCGC-3' の存在下で連結せしめることにより、調製される。

Traverら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5898-5902 (1989) により言及された通りに、重鎖Not I 断片を含むYAC ベクターを単離する。クローン化さ

10

20

30

40

【数 1 4 8】

(149)

れたNot I 挿入断片を、M.Finney (前掲) により記載されたようなパルスフィールドゲル電気泳動により高分子量酵母DNAから単離する。1 mMスperminの添加によりDNAを濃縮し、上述した通り単細胞胚の核に直接マイクロインジェクトする。あるいは、DNAをパルスフィールドゲル電気泳動により単離し、そしてリポフェクション [Gnirkeら、EMBD J 10:1629-1634(1991)] によりES細胞中に導入するか、またはYAC をスフェロプラスト融合によりES細胞中に導入する。

10

実施例16

不連続ゲノム重鎖Igトランスジーン

V_H 6、Dセグメント、Jセグメント、 μ 定常領域および一部の γ 定常領域を含むヒトゲノムDNAの85 kb SpeI断片は、本質的には実施例1に記載した通りのYAC クローニングによって単離された。生殖細胞型可変領域由来の断片、例えば多コピーのV₁～V₅を含む上記の670-830kb Not I 断片の上流の570 kb Not I 断片、を含有するYACを上述の如く単離する。 [Bermanら(1988), 前掲は、各々が多数のVセグメントを含有する2つの570 kb Not I 断片を検出した。] この2断片を実施例1に記載の如くマウス単細胞胚の核中に同時注入する。

20

典型的には、2つの異なるDNA断片の同時注入は、染色の体内の同一部位のところへの両断片の組込みをもたらす。従って、該2断片各々の少なくとも1コピーを含む生じたトランスジェニック動物の約50%が、定常領域含有断片の上流に挿入されたVセグメント断片を有する。それらの動物のうち、85 kb Spe I 断片の位置に関する570 kb Not I 断片の方向性に依存して、約50%がDNA逆位によりV-D J結合を行い、そして約50%が欠失によりV-D J結合を行うだろう。生じたトランスジェニック動物からDNAを単離し、そしてサザンブロットハイブリダイゼーションにより両方のトランスジーンを含んでいることが示された動物 (詳しくは、多数のヒトVセグメントとヒト定常領域遺伝子の両方を含む動物標準技術に従って、ヒト免疫グロブリンを発現する能力について試験する。

30

40

実施例17

トランスジェニックB細胞中の機能的に再配列された可変領域配列の同定

【数 1 4 9】

(150)

着目の抗原を使って、次の遺伝的特性：J_Hの欠失（実施例10）については内因性所有鎖遺伝子座中の同型接合性；再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座トランスジーン（実施例5および14）の単コピーについては半接合性；および再配列されたヒトκ軽鎖トランスジーン（実施例6および14）の単コピーについては半接合性、を有するマウスを免疫化する〔HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1988)を参照のこと〕。

10

免疫化スケジュールの後、脾臓を取り出し、脾細胞を使ってハイブリドーマを調整する。着目の抗原と反応性である抗体を分泌する個々のハイブリドーマクローンからの細胞を使ってゲノムDNAを調整する。ゲノムDNAの試料を、ユニークな6塩基対配列を認識する幾つかの異なる制限酵素で消化し、そしてアガロースゲル上で分画する。サザンブロットハイブリダイゼーションを凹って2～10 kb範囲内の2つのDNA断片を同定する。該断片の一方は、再配列されたヒト重鎖VDJ配列の単コピーを含み、もう一方は再配列されたヒト軽鎖VJ配列の

20

単コピーを含む。それらの2断片をアガロースゲル上でサイズ分画し、pUC18中に直接クローニングする。クローン化された挿入断片を、定常領域配列を含む重鎖および軽鎖発現カセット中にそれぞれサブクローニングする。

プラスミドクローンp_γe1（実施例12）を重鎖発現カセットとして使用し、再配列されたVDJ配列をXhoI部位中にクローニングする。プラスミドクローンpCK1を軽鎖発現カセットとして使用し、再配列されたVJ配列をXhoI部位中にクローニングする。生じたクローンを一緒に使ってSP₂細胞をトランスフェクトせしめ、着目の抗原と反応する抗体を産生せしめる〔M.S. Coら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869(1991)〕。

30

あるいは、上述のクローン化ハイブリドーマ細胞からmRNAを単離し、cDNAを合成するのに使う。発現されるヒト重鎖および軽鎖VDJおよび、V_j配列を、次いでPCRにより増幅し、クローニングする〔J.W. Larrichら(1989) Bio1. Technology 7:934-938〕。それらのクローンのヌクレオチド配列を決定した後、同じポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、そしてC. Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5454-5458 (1989)により記載されたようにして合

40

【数 1 5 0】

(151)

成発現ベクターを作製する。

複合抗原によるトランスジェニック動物の免疫化

次の実験は、トランスジェニック動物がヒト赤血球上の抗原のような複合抗原により好結果に免疫化することができ、そして正常マウスにおいて観察される応答速度論に類似した速度論で応答することができることを証明する。

10

血液細胞は一般に適当な免疫原であり、赤血球と白血球の表面上には多数の異なる型の抗原を含んで成る。

ヒト血液による免疫化

一人の提供者からのヒト血液のチューブを収集し、機能的に破壊された内因性重鎖遺伝子座 ($J_H D$) を有し且つヒト重鎖小遺伝子構成物(HCI)を含有するトランスジェニックマウスを免疫化するのに使った。それらのマウスを系112と命

20

名する。血液を洗浄し、50mlのハンクス溶液中に再懸濁し、 1×10^6 細胞/mlに希釈した。次いで23ゲージの針と1ccの注射器を使って0.2ml (2×10^7 細胞)を腹腔内注射した。この免疫化プロトコールを6週間に渡りほぼ毎週繰り返した。眼窩後方出血から採血し、血清を収集し、それを特異抗体について試験することにより、血清抗体価をモニタリングした。免疫前出血を対照として取った。まさしく最後の免疫化の時、血清またはハイブリドーマを得るためにそれらの動物を犠牲にする3日前に、ハイブリドーマの生産を増大させるために尾部静脈内への 1×10^3 細胞による免疫化を1回行った。

30

表5

表5

動物

40

【数 1 5 1】

(152)

	マウスID	系	性別	HCl-112	JHD
1	2343	112	M	+	++
2	2344	112	M	-	+
3	2345	112	F	-	+
4	2346	112	F	-	++
5	2347	112	F	-	++
6	2348	112	F	+	++
7	2349	112	F	-	+

10

マウス# 2343と2348は所望の表現型を有する：重鎖破壊背景上のヒト重鎖小遺伝子トランスジェニック。

20

ハイブリドーマの作製

上述の通り免疫化された約16週齢のトランスジェニックマウス（表5）のマウス脾細胞を非分泌性H A T感受性ミエローマ細胞系X63 Ag8.653 から成る融合相手と融合せしめることにより、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマクローンを培養し、血液細胞抗原に対して特異的な結合親和性を有する免疫グロブリンを含有するハイブリドーマ上清を、例えばフローサイトメトリーにより、同定した。

30

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーを使って血清とハイブリドーマ上清を試験した。提供者からの赤血球をハンクス溶液中で4回洗浄し、50,000個の細胞を1.1 mlのポリプロピレン微小管中に入れた。細胞をハイブリドーマからの上清または抗血清と共に染色媒質〔フェノールレッドまたはビオチン(Irvlne Scientific)、3%新生ウシ血清、0.1%ナトリウムアジドを含まない1×RPMI培地〕中で氷上で30分間インキュベートした。対照は他の遺伝子型を有する同種マウスから成った。次いで細胞をSorvall RT600B中で1000 rpmで5～10分間4℃にて遠心することにより洗浄した。細胞を2回洗浄した後、蛍光生成試薬を使って細胞表面上の抗体を検出した。2種類のモノクローナル試薬を使って試験した。1つはFITCで標識されたマウス抗ヒト μ 重鎖抗体 (Pharmagen, San Diego, CA) であり、もう1つはPE

40

【数 1 5 2】

(153)

で標識されたラット抗マウス κ 軽鎖抗体 (Becton-Dickenson, San Jose, CA) であった。それらの試薬は両方とも同様な結果を与えた。全血 (赤血球と白血球) および白血球のみを標的細胞として使用した。両方の組が陽性結果を与えた。

トランスジェニックマウスおよび同腹対照の血清を提供者からの赤血球または他の個体からの白血球のいずれかと共にインキュベートし、洗浄し、次いで抗ヒトIgM FITC 標識抗体により発色させ、フローサイトメーター中で分析した。結果は、ヒト小遺伝子座についてトランスジェニックであるマウス (マウス 2343 および2348) からの血清がヒトIgM反応性を示し、一方全ての同腹動物 (2344, 2345, 2346, 2347) からの血清は該反応性を示さなかった。正常マウス血清 (N S) とリン酸塩緩衝化塩溶液 (P B S) を負の対照として使用した。赤血球は未濾過であり、白血球はリンパ球のみを含むように濾過された。比較を与えるために x 軸と y 軸上に線が引かれている。融合体2348からの 100の上清に関してフローサイトメトリーを実施した。4つの上清が血球細胞抗原に対する陽性反応性を示した。

10

20

実施例18

アンチセンスRNAによる内因性マウス免疫グロブリン発現の減少

A. アンチセンス I g 配列の発現用のベクター

30

1. クローニングベクターpGP1h の作製

ベクターpGP1b (前の実施例に記載) をXho I とBamHIで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド

5' - gat cct cga gac cag gta cca gat ctt gtg aat tcg - 3'

5 - tcg acg aat tca caa gat ctg gta cct ggt ctc gag - 3'

と連結せしめてプラスミドpGP1hを作製した。このプラスミドは、次の制限部位 : Not I, EcoRI, BglIII, Asp718, BamHI, Hind III, Not I を含むポリリンカーを含有する。

40

2. pBCE1の作製

プロモーター—リーダー配列エクソン、第一イントロンおよびヒトV_H—V_F

【数 1 5 3】

(154)

アミリー免疫グロブリン可変遺伝子セグメントの第二エクソンの一部を含む、pVH251（前の実施例に記載）の0.8 kb Xba I / Bgl II断片を、Xba I / Bgl IIで消化したベクターpXN03 中に挿入してプラスミドpVH251N を作製した。

ヒト成長ホルモン遺伝子 [hGH ; Seeburg(1982)DNA 1:239-249] のコードエクソンを含む2.2 kb BamHI / EcoRI DNA断片を、BamHI / EcoRI で消化したpGH1h中にクローニングした。生じたプラスミドをBamHIで消化し、そしてpVH251NのBamHI / EcoRI 断片をhGH 遺伝子と同じ方向において挿入し、プラスミドpVhgh を作製した。

10

マウス重鎖J- μ イントロンエンハンサー [Banerji ら (1983) Cell 33:729-740] を含むマウスゲノムDNAの0.9 kb Xba I 断片をpUC18 中にサブクローニングしてプラスミドpJH22.1 を作製した。このプラスミドをSph Iで直鎖状にし、末端をクレノウ酵素でフィルインした。次いでクレノウ処理したDNAをHindIIIで消化し、そしてヒト重鎖J- μ イントロンエンハンサー [Hayday ら (1984) Nature 307:334-340] を含むファージクローン λ 1.3（上記実施例）の1.4kb Mlu I（クレノウ）/HindIII断片をそれと連結せしめた。得られたプラスミドpMHE1は、単一の BamHI / HindIII 断片において切り出すことができるようにpUC18中に一緒に連結されたマウスおよびヒトの重鎖J- μ イントロンエンハンサーから成る。

20

30

pMHE1 の BamHI / HindIII断片を BamHI / HindIII で切断されたpVhgh 中にクローニングし、B細胞発現ベクターpBCE1を作製した。このベクター（図42に描写）はユニーク Xho IおよびAsp718クローニング部位を含有し、その中にアンチセンスDNA断片をクローニングすることができる。それらのアンチセンス配列の発現は、上流の重鎖プロモーター-エンハンサー組み合わせにより指令され、

40

下流のhGH遺伝子配列はイントロン配列に加えてトランスジーン構成物の発現を促進するポリアデニル化配列を提供する。pBCE1 から作製されたアンチセンストランスジーン構成物は Not Iでの消化によりベクター配列から分離することができる。

B. IgM アンチセンストランスジーン構成物

【数 1 5 4】

(155)

下記オリゴヌクレオチド：

5' - cgc ggt acc gag agt cag tcc ttc cca aat gtc - 3'

5' - cgc ctc gag aca gct gga atg ggc aca tgc aga - 3'

を、基質としてマウス脾臓cDNAを使ったポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によるマウス IgM定常領域配列の増幅のためのプライマーとして使用した。得られた0.3 kbのP C R産物をAsp718と Xho Iで消化し、そしてAsp718/Xho Iで消化したpBCE1 中にクローニングしてアンチセンストランスジーン構成物pMAS1 を作製した。pMAS1 の精製済 Not I挿入断片を、単独でまたは1もしくは複数の別のトランスジーン構成物と組み合わせて、半日マウス胚の前核中にマイクロインジェクトし、トランスジェニックマウスを作製した。この構成物はマウスIgMのmRNAとハイブリダイズするB細胞中のRNA転写物を発現し、よってマウスIgMタンパク質の発現をダウンレギュレーションする。

pMAS1 とpHCC1のようなヒト重鎖トランスジーン小遺伝子座とを含有する二重トランスジェニックマウス（両構成物の同時注入によるかまたは一重トランスジェニックマウスの交配により作製される）は、ヒト重鎖小遺伝子座のみについてトランスジェニックであるマウスよりも高い比率のB細胞上に、ヒトトランスジーンによってコードされるIgレセプターを発現するだろう。ヒト対マウスIgレセプター発現細胞の比は、一部はB細胞の分化と発展を促進する因子および細胞に対する2集団間の競争のためである。IgレセプターはB細胞発達において重要な役割を果たすので、表面上に減少したレベルのIgMを発現する（マウスIg特異的アンチセンスダウンレギュレーションのため）マウスIgレセプター発現B細胞も、ヒトレセプターを発現する細胞も競争しないだろう。

C. Ig κ アンチセンストランスジーン構成物

次の2つのオリゴヌクレオチド：

5' - cgc ggt acc gct gat gct gca cca act gta tcc - 3'

5' - cgc ctc gag cta aca ctc att cct gtt gaa gct - 3'

を、基質としてマウス脾臓cDNAを使ったポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によるマウスIg κ 定常領域配列の増幅のためのプライマーとして使用した。得られた0.

10

20

30

40

【数 1 5 5】

(156)

3 kbのPCR産物をAsp718とXho Iで消化し、そしてAsp718/Xho Iで消化したpBCE1中にクローニングしてアンチセンストランスジェン構成物 pKAS1を作製した。pMAS1の精製済Not I挿入断片を、単独でまたは1もしくは複数の別のトランスジェン構成物と組み合わせて、半日マウス胚の前核中にマイクロインジェクトし、トランスジェニックマウスを作製した。この構成物はマウスIg κ mRNAとハイブリダイズするB細胞中のRNA転写物を発現し、よってpMAS1について上述したのと同様にマウスIg κ タンパク質の発現をダウンレギュレーションする。

10

実施例19

この実施例は、本発明のトランスジェニックマウスにおける好結果の免疫化と免疫応答を証明する。

マウスの免疫化

20

1分子あたり400以上のジニトロフェニル基と結合させたアオガイヘモシアニン (Calbiochem, La Jolla, California) (KLH-DNP)を以前発表された方法 (Pr

actical Immunology, L. HudsonおよびF. C. Hay, Blackwell Scientific出版, 第9頁, 1980年)に従ってミョウバン沈澱させた。ミョウバン沈澱させたKLH-DNP 400 μ gを100 μ lのリン酸塩緩衝化塩溶液 (PBS)中の臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム 100 μ gと一緒に各マウスに腹腔内注射した。6日後に眼窩後洞出血により血清試料を収集した。

30

血清中のヒト抗体反応性の分析

間接エンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ(ELISA)を使って抗体の反応性および特異性を評価した。免疫原による抗体誘導を分析するために幾つかの標的抗原を試験した。タンパク質成分に対する反応性の同定にはアオガイヘモシアニン (Calbiochem)、ハブデンおよび/または修飾アミノ基に対する反応性の

40

同定にはウシ血清アルブミン、そして全免疫原に対する反応性の同定にはKLH-DNPを・使用した。抗原へのヒト抗体結合は、マウス免疫グロブリンとの交差反応性を全く持たないIgMおよびIgGサブクラスに特異的な酵素接合(本により陰出した。

【数 1 5 6】

(157)

簡単に言えば、P B S 中 5 μ g/ml のタンパク質を 37℃ にて一晩乾燥することによりマイクロタイタープレートに抗原コーティングした。P B S、5 % ニワトリ血清、0.5 % Tween-20 中に希釈した血清試料をウエル中で室温にて 1 時間インキュベートし、次いで同希釈剤中の抗ヒト IgG Fc および IgG F(ab')₂ - 西洋ワサビペルオキシダーゼまたは抗ヒト IgM Fc - 西洋ワサビペルオキシダーゼと共にインキュベートした。室温で 1 時間後、ABTS 基質 (Sigma, St. Louis, Missouri) の添加により酵素活性を評価し、30 分後に 415-490 nm で読み取った。

10

トランスジェニックマウス中の免疫応答におけるヒト重鎖の関与

図 43 は、KLH-DNP による免疫化に対する 3 匹の同腹子マウスの応答を表す。第 1296 号のマウスは再配列されていないヒト IgM および IgG トランスジーンを有し、マウス Ig 重鎖破壊について同型接合性であった。第 1299 号のマウスは無破壊の背景上にトランスジーンを有し、1301 号のマウスはそれらの遺伝子組のいずれも遺伝しなかった。別の同腹子である第 1297 号のマウスはヒトトランスジーンを有し、マウス重鎖破壊に関して半接合性であった。それを非免疫化対照として実験に組み入れた。

20

結果は、ヒト IgG と IgM 応答は両方ともタンパク質への接合という状況においてハプテンに対して発生したことを証明する。ヒト IgM は KLH に対しても発生したが、この時点では有意なレベルのヒト IgG は存在しなかった。同じマウスからの免疫前血清試料では、同じ標的抗原に対するヒト抗体の力価は有意でなかった。

30

実施例 20

この実施例は、本発明のトランスジェニックマウスにおけるヒト抗原による好

結果の免疫化および免疫応答を証明し、そしてヒトトランスジーンの変領域配列中に無作為でない体細胞変異が起こることを証明する。

40

ヒト糖タンパク質抗原に対するヒト免疫グロブリン重鎖を含んで成る抗体応答の証明

この実験に使用するトランスジェニックマウスは、機能的内因性 (マウス) 重鎖生産の欠失をもたらす J 領域のところへのトランスジーンを導入 (前掲) によ

【数 1 5 7】

(158)

り作製された機能的に破壊されたマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座について同型接合性であった。該トランスジェニックマウスは、少なくとも1つの完全な再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座トランスジーン (HC1、前掲) も含み、該トランスジーンは単一の機能的V_H 遺伝子 (V_H 251)、ヒト μ 定常領域遺伝子、およびヒト r 1 定常領域遺伝子を含んで成る。ヒト免疫グロブリントランスジーン産物を発現することが示されたトランスジェニックマウス (前掲) をヒト抗原による免疫化のため選択し、トランスジェニックマウスがヒト抗原免疫化に対して免疫応答を生じる能力を有することを証明した。HC1-26系統のマウス3匹とHC1-57系統のマウス3匹 (前掲) にヒト抗原を注射した。

10

ミョウバン上に不溶化された精製済ヒト癌胎児性抗原 (C E A) 100 μ g を不児全フロイントアジュバント中で0日目に注射し、次いで更に7、14、21および28日目に不完全フロイントアジュバント中のミョウバン沈澱C E Aを毎週注射した。C E Aの注射前の各日に眼窩後方出血により血清試料を収集した。各グループ中の3匹のマウスの各々から同容量の血清を分析用にプールした。

20

マイクロタイタープレート上に固定化したヒトC E Aに結合したヒト μ 鎖含有免疫グロブリンおよびヒト γ 鎖含有免疫グロブリンをELISA アッセイにより測定した。ヒト μ 鎖含有免疫グロブリンおよびヒト γ 鎖含有免疫グロブリンについてのELISAアッセイの結果をそれぞれ図44および45に示す。7日目までは両系統について有意なヒト μ 鎖Ig抗体価が検出され、約21日目まで上昇が観察された。ヒト γ 鎖Igについては、有意な抗体価は遅れ、前者がHC1-57系統で14日目そして後者はHC1-26系統で21日目に明らかになった。ヒト γ 鎖Igの抗体価は、実験の間じ

30

ゅう時間と共に増加を示し続けた。観察されたヒト μ 鎖Ig応答は、平坦域に達した後、遅れて発生する上昇し続ける γ 鎖応答と組み合わせると、親和性の成熟に伴って観察されるパターンに特徴的である。21日目の試料の分析は、無関係の抗原であるアオガイヘモシアニン(KLH)に対する反応性の欠失を示した。これは、抗体応答が特異的な形でC E Aに対して向けられたことを指摘する。

40

それらのデータは、再配列されていないヒト免疫グロブリン遺伝子座に関してトランスジェニックである動物が、(1) ヒト抗原 (例えばヒト糖タンパク質、

【数 1 5 8】

(159)

C E A) に対して応答でき、(2) 観察された μ から γ へのクラススイッチにより例示されるようなイソタイプスイッチ (クラススイッチ) を受けることができ、そして (3) それらの体液性免疫応答における親和性の成熟の特徴を表すことを示す。一般に、それらのデータは、(1) ヒト Ig トランスジェニックマウスが異種抗体を誘導する能力を有すること、(2) 単一のトランスジーン重鎖可変領域が限定抗原に対して応答する能力を有すること、(3) 一次方および二次応答形成に典型的な時期に渡る応答速度論、(4) IgM から IgG への、トランスジーンによってコードされる体液性免疫応答のクラススイッチ、および (5) トランスジェニック動物がヒト抗原に対してヒト配列抗体を産生する能力を有することを指摘する。

10

ヒト重鎖トランスジーン小遺伝子座における体細胞変異の証明

20

HC1 トランスジーン の多重コピーを含有する HC1-57 系統のトランスジェニックマウスを免疫グロブリン重鎖欠失マウスと交配させ、HC1 トランスジーンを含み且つ内因性マウス重鎖の両対立遺伝子に破壊を含むマウスを得た (前掲)。それらのマウスは、マウス κ および λ 軽鎖と共にヒト μ および γ 1 重鎖を発現する (前掲)。それらのマウスのうちの 1 匹を、1.5 カ月の期間に渡る反復腹腔内注射により、ヒト癌胎児性抗原に対して高度免疫化した。このマウスを犠牲にし、脾臓、鼠径部および腸間膜のリンパ節、並びにパイヤー斑からリンパ系細胞を単離した。該細胞を合わせ、全 RNA を単離した。該 RNA から第一鎖 cDNA を合成し、次の 2 つのオリゴヌクレオチドプライマー

30

149 5' - cta gtc cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg(g/a/t/c)
-3

151 5' - ggc gct cga gtt cca cga cac cgt cac cgg ttc -3'

40

を用いた PCR 増幅のための鋳型として使用した。

それらのプライマーは VH251/ γ 1 cDNA 配列を特異的に増幅する。増幅された配列を Xho I で消化し、ベクター pNN03 中にクローニングした。23 個のランダムクローンの挿入断片の DNA 配列を図 46~51 に示す；生殖細胞配列からの配列変異が指摘され、ドットは配列が生殖細胞と同じであることを示す。VH251 ト

【数 1 5 9】

(160)

ランスジーンの生殖細胞配列と該cDNA配列との比較は、クローンのうちの3個が完全に未変異であり、他の23個は体細胞変異を含むことを明らかにした。

3個の未変異配列のうちの1つは枠外 (out-of-frame) V D J 連結に由来する。特定の位置において観察された体細胞変異は、ヒトリンパ球において観察されたものと同様な頻度で且つ同様な分布パターンで起こる [Cai ら (1992) J. ExpMed. 176:1073; これは参考として不明細書中に組み込まれる]。体細胞変異の総体的頻度は約1%である; しかしアよがら、CORI同の頻度は約5%にまで及び、抗原結合に影響を及ぼすアミノ酸変化への選択を指摘する。これは、ヒト重組配列の抗原指令型親和性成熟を証明する。

10

実施例21

この実施例は、組み換わると完全なヒト軽鎖小遺伝子座トランスジーンを形成する2つの別々のポリヌクレオチドを同時導入することによる、好結果のトランスジーンの形成を証明する。

20

2つの重複DNA断片の同時注入による再配列されていない軽鎖小遺伝子座トランスジーンの作製

1. 再配列されていない機能的V_K遺伝子セグメントv_K65.3, v_K65.8およびvk65.15の単離

V_K特異的オリゴヌクレオチドであるオリゴ-65 (5' - agg ttc agt ggc agt gg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc -3')を使って、ファージベクタ

30

ーλEMBL3/SP6/T7 (Clonetechn Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクロ

ーニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを探索した。陽性ファージクローンからのV_Kセグメントを含有するDNA断片をプラスミドベクター中にサブクローニングした。

40

得られたクローンからの可変遺伝子断片を配列決定し、機能的であると思われるクローンを選択した。機能性を判断する基準は次のものを含む: 転写解読枠、完全なスプライス受容体および供与体配列、並びに完全な組換え配列。この方法により単離された4つの異なるプラスミドクローンからの4つの機能的

【数 1 6 0】

(161)

V κ 遺伝子セグメント(vk65.3, vk65.5, vk65.8およびvk65.15)のDNA配列を図52～55に示す。4つのプラスミドクローン p65.3f, p65.5gl, p65.8およびp65.15f)を下記に説明する。

(1 a)p65.3f

ファージクローン λ 65.3の3 kb Xba I断片を、ベクター由来のSal I部位が該挿入断片の3'末端に近位になり且つベクター由来の8am111部位が該挿入断片の5'末端に近位になるように pUC19中にサブクローニングした。このクローンの3 kb BamHI/Sal I挿入断片を pGP1f中にサブクローニングしてp65.3fを得た。(1 b)p65.5gl

10

ファージクローン λ 65.5の6.8 kb EcoRI断片を、ベクター由来のXho I部位が該挿入断片の5'末端に近位になり且つベクター由来の Sal I部位が該挿入断片の3'末端に近位になるようにpGP1f中にサブクローニングした。得られたプラスミドをp65.5glと命名した。

20

(1 c)p65.8

ファージクローン λ 65.3の6.5 kb HindIII断片をpSP72中にクローニングしてp65.8を得た。

(1 d)p65.15f

ファージクローン λ 65.16の10 kb EcoRI断片をpUC18中にサブクローニングしてプラスミドp65.15.3を作製した。該プラスミド挿入断片中のV κ 遺伝子セグメントを4.6 kb EcoRI/HindIII小断片にマッピングし、これをpGP1f中にサブ

30

クローニングした。得られたクローン p65.15fは、挿入断片の5'および3'末端にそれぞれユニークXho I部位およびSal I部位が置かれている。

2. pkV4

40

p65.8のXho I/Sal I挿入断片を p65.15fのXho I部位中にクローニングしてプラスミドpKV2を作製した。p65.5glのXho I/Sal I挿入断片をpKV2のXho I部位中にクローニングしてpKV3を作製した。pKV3のXho I/Sal I挿入断片をp65.3fのXho I部位中にクローニングしてプラスミドpKV4を作製した。このプラスミドは、4つの機能的V κ 遺伝子セグメントを含む単一の21 kb Xho I/Sal I挿入断

【数 1 6 1】

(162)

片を含有する。Not Iを使って挿入断片全体を切り出すことができる。

3. pKC1B

(3 a)pKcor

ヒトゲノムDNAファージλクローンに由来する2つの Xho I 断片をプラスミドベクター中にサブクローニングした。第一の断片である13 kb のJκ2-jκ5/Cκ含有断片をクレノウ酵素で処理し、そしてHndIIIで消化されクレノウ処理されたプラスミドpGP1d中にクローニングした。挿入断片の5'末端がベクター由来のCla I部位に近いプラスミドクローン (pK-31) を選択した。第二の Xho I断片である、jκ1を含有する7.4 kbのDNA断片を、3'挿入断片XhoI部位がベクターSal I部位への連結により破壊されるように、Xho I/Sal Iで消化された pSP72中にクローニングした。

10

20

得られたクローンp36.2sは、Jκ1の4.5 kb上流に挿入断片由来のCla I部位、およびJκ1とJκ2の間に天然に存在するXho I部位の少し下流にポリリンカー由来の Cla I部位を含有する。このクローンをCla Iで消化して4.7 kb断片を遊離せしめ、該断片を正しい5' - 3' 方向において、Cla Iで消化されたpK-31中にクローニングし、全部で5個のヒトJκセグメント、ヒトイントロンエンハンサー、Cκ、4.5 kbの5' 隣接配列を含有するプラスミドを作製した。このプラスミドpKcor は、挿入断片のそれぞれ5' および3' 側にユニークな隣接Xho I部位およびSal I部位を含有する。

30

(3 b) pKcorB

ヒト3' κエンハンサーを含有する4 kb BamHI断片 [JUDGE, J.G. およびMax, E.E., Mol. Cell Biol. 12:5206(1992); これは参考として本明細書中に組み込まれる] を、5' 末端がベクターのXho I部位に近位になるようにpGP1f中にクローニングした。得られたプラスミド p24BfをXho Iで切断し、pKcor の17.7kb Xho I/Sal I断片を該エンハンサー断片と同じ方向でその中にクローニングした。得られたプラスミドpKcorBは、該挿入断片の5' および3' 末端にそれぞれユニークXho IおよびSal I 部位を含有する。

40

(3 c)pKC1B

【数 1 6 2】

(163)

pKcorBの Xho I/Sal I 挿入断片をp65.3fのSal I 部位の中にクローニングして軽鎖小遺伝子座トランスジーンプラスミド pKCIBを作製した。このプラスミドは、5個のJ_κセグメント、ヒトイントロンエンハンサー、ヒトC_κ、およびヒト3' κエンハンサーを含有する。この25 kb 挿入断片全体をNot I消化により単離することができる。

10

4. Co4

プラスミドpKV4とpKCIBからの2つの Not I挿入断片を各々2.5 μg/mlの濃度でマイクロインジェクション緩衝液中に混合し、そして上記実施例に記載のようにして半日マウス胚の前核中に同時注入した。生成したトランスジーン動物は、2断片と一緒に組み込まれたトランスジーン挿入断片 (Co4 と命名、図56に示した組換えの生成物) を含有する。pKV4挿入断片の3' の3 kbとpKCIB挿入断片の5' の3 kbは全く同じである。幾つかの組み込み現象は3 kbの共通配列に渡って2断片の間で相同組換えが起こったことを表す。Co4 は遺伝子座はトランスジェニックマウス中のヒト配列軽鎖のレパートリーの発現を指令するだろう。

20

本発明の好ましい態様の今までの記載は、例示および説明のために与えられる。それらは排他的であるつもりはなく、また本発明を正確な開示形態に制限するつもりはない。上記教示に照らして多数の改良および変更が可能である。

30

本明細書中の全ての刊行物および特許出願は、あたかも各々の刊行物または特許出願が明確に且つ個別に参考として本明細書中に組み込まれると指摘されたかのように、参考として本明細書中に組み込まれる。

実施例 2 2

この例は、ヒト I g トランスジーンによりコードされるヒト免疫グロブリン鎖を含みかつ特異的免疫原と反応性をもつモノクローナル抗体を分泌するマウスのハイブリドーマクローンの産生の成功を実証している。

40

ヒト重鎖トランスジーン産物を取込むモノクローナル抗体の生成

1. ヒト重鎖トランスジーンを宿すマウスの免疫化

内因性重鎖遺伝子 (上記実施例 2 0 を参照) のノックアウト (すなわち機能的分断) について同型接合でトランスジーンをコードするヒト重鎖を含むマウスを

【数 1 6 3】

(164)

、精製されたヒト C E A で免疫化し、その後適切な免疫応答期間の後に脾細胞を収穫した。従来の技術を用いて (Kohler 及び Milstein, Eur.J.Immunol., 6:511-519 (1976), Harlow 及び Lane, 「抗体：その研究所マニュアル、Cold Spring Harbor, New York (1988) 参照) ハイブリドーマを生成するべく、マウスの脾細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させた。免疫化のために用いられたマウスは、単一の機能的 V_H 遺伝子 (V_{H251})、ヒト D 及び J セグメント、ヒト μ 恒常領域、及びヒト $\gamma 1$ 恒常領域遺伝子を含むヒトの再配置されていない重鎖ミニ遺伝子座トランスジーンを内含していた。それが由来したトランスジェニック系統は H C 1-57 (上記) と呼称された。

10

ミョウバン上で不溶化させた精製ヒトガン胎児性抗原 (C E A) (Crystal Chem, シカゴ, IL 又は Scripps Labs, サンディエゴ, CA) を $100 \mu\text{g}$ 、完全フロイントアジュバントの中で、0 日目に注入し、その後さらに 7 日目、14 日目、21 日目及び 28 日目に不完全フロイントアジュバント中のミョウバン沈降した C E A を週に一度注入した。さらに $20 \mu\text{g}$ の可溶性 C E A を 83 日目に静脈内で投与し、その後 92 日目に、不完全フロイントアジュバント中の $50 \mu\text{g}$ のミョウバン沈降させた C E A を注入した。骨髄腫細胞と脾細胞の融合に先立って血清試料中に、C E A に対するヒト重鎖応答を確認した。

20

30

95 日目に動物を安楽死させ、脾臓を除去し、ポリエチレングリコールを用いて P 3 X 6 3-A g 8. 6 5 3 マウス骨髄腫細胞 (ATCC CRC 1580, American Type Culture Collection, Rockville, MO) と融合させた。2 週間後、E L I S A によりヒト重鎖 μ 又は γ 恒常領域エピトープを含む、C E A と特異的に反応する抗体の存在について、融合ウエルからの上清をスクリーニングした。簡単に言うと、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ で P V C マイクロタイタープレート上に精製されたヒト C E A をコーティングさせ、これを、P B S、0.5% の T w e e n、5% のニワトリ血清内で 1:4 又は 1:5 に希釈された培養上清と共にインキュベートした。

40

プレートを洗浄し、その後ひきつづき、ヒト I g G F c に対し特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼで接合されたヤギ抗血清又はヒト I g M F c 5 M u に特異的なウサギ抗血清 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA)

【数 1 6 4】

(165)

を付加した。さらに洗浄した後、A B T S 基質の付加により、捕獲された抗体に結合された接合体の存在を確認した。独立した2つの融合ウエルがC E Aに対する実質的な結合力をもつ抗体を含んでいることがわかった。クローニングの後、E L I S Aにより、ヒト μ 鎖及びマウス κ 鎖の存在について、両方のハイブリドーマが陽性であることがわかった。類似の検定を用いて、いかなるマウス I g G も I g M も検出されなかった。

10

2つの独立した親ハイブリドーマのサブクローニングの結果、9 2 - 0 9 A - 4 F 7 - A 5 - 2 及び 9 2 - 0 9 A a、- I D 7 - 1 - 7 - 1 と呼称される2つのクローンが得られた。両方の系統共、ブタペスト条約に基づき A T C C 特許培養寄託所に寄託され、それぞれ A T C C 呼称 H B 1 1 3 0 7 及び H B 1 1 3 0 8 を受けた。これらの細胞系統からの培養上清に関し、E L I S A を用いていくつかの精製された標的タンパク質に対する反応性についてテストすることによって、特異性を評価した。図 5 7 に示されているように、さまざまな抗原に対するモノクローナル抗体の反応性を決定するための E L I S A 検定は、C E A 及び C E A 関連抗原 N C A - 2 のみが有意の反応性を示すことを立証したが、これは、ヘテロハイブリッド免疫グロブリン分子の可変領域について制限された反応性の発達を

20

30

表わしている。

実施例 2 3

この例は、ヒト I g ミニ遺伝子座トランスジーンによりコードされる再配置されたヒト V D J 遺伝子を、キメラヒト／マウス I g 鎖をコードするべく例えばトランススイッチメカニズムによって、内因性 I g 恒常領域遺伝子を含む写しとして転写させることができるということを立証している。

40

キメラヒトーマウス重鎖をコードするトランススイッチ写しの同定

内因性重鎖 J セグメント欠失について同型接合の高度免疫された H C 1 系統 5 7 のトランスジェニックマウスから R N A を分離させた（上記）。本書に参考として内含されている Taylor et al. (1993) Nucleic Acids Res. 20 : 6287 に従って c D N A を合成し、以下の2つのプライマを用いて P C R により増幅した。 o

【数 1 6 5】

(166)

— 1 4 9 (ヒト V_{H251}) :

5' —CTA GCT CGA GTC CAA GGA GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG(G,A,T,C)—3'

o—2 4 9 (マウスガンマ) :

5' —GGC GCT CGA GCT GGA CAG GG(A/C) TCC A(G/T)A GTT CCA —3'

オリゴヌクレオチド o—1 4 9 は、H C I でコードされた可変遺伝子セグメント V_{H251} に特異的であり、一方 o—2 4 9 は、次のような特異性順序でマウス及びヒトの両方のガンマ配列に対しハイブリッド形成する

マウス γ 1 = マウス γ 2 b = マウス γ 3 > マウス γ 2 a ≫ ヒト γ 1

P C R 産物から生成された無作為に選択した 1 0 個のクローンからの D N A 配列を決定し、これらを図 5 8 に示す。2 つのクローンが、ヒト V D J 及びマウス γ 1 を含んでいた：4 つのクローンがヒト V D J 及びマウス γ 2 b を含んでいた。又 4 つのクローンがヒト V D J とマウス γ 3 を含んでいた。これらの結果は、トランスジェニック B 細胞の一分画の中で、トランスジーンでコードされたヒト V D J が、クラススイッチ又は類似の組換えにより内因性マウス重鎖遺伝子座内に組換わったということを表している。

実施例 2 4

この例は、ヒト I g 鎖をコードし発現するクローンから、キメラヒト／マウス I g 鎖をコードするクローンを弁別するためのハイブリドーマプールのスクリーニング方法について記述する。例えば、J 領域で分断された内因性重鎖遺伝子座について同型接合でありヒト I g 重鎖トランスジーンを含むトランスジェニックマウスから作られたハイブリドーマクロンのプールの中で、トランススイッチされたヒト V D j —マウス恒常領域重鎖をコードするハイブリドーマクロンを、ヒト V D J —ヒト恒常領域重鎖を発現するハイブリドーマクロンから同定し分離することが可能である。

キメラ I g 鎖を除去するためのハイブリドーマのスクリーニング

スクリーニングプロセスには、単独で又は任意には組合わせた形で実施できる次の 2 つの段階が関与している：(1) 予備的な E L I S A に基づくスクリーン及び (2) ハイブリドーマ候補の二次的分子特徴づけ。好ましくは、ヒト V D J

【数 1 6 6】

(167)

領域及びヒト恒常領域を発現するハイブリドーマ候補の初期同定のためには、予備的な E L I S A に基づくスクリーンが用いられる。

(例えば、トランスジェニックマウス内での抗体応答を惹起するのに用いられる免疫原などの) 抗原との陽性の反応性を示すハイブリドーマを、マウス μ 、 γ 、 κ 及び λ 及びヒト μ 、 γ 及び κ と特異的に反応するモノクローナル抗体のパネルを用いてテストした。ヒト重鎖及び軽鎖に対して陽性でありかつマウス鎖について陰性であるハイブリドーマだけが、ヒト免疫グロブリン鎖を発現するハイブリドーマ候補として同定される。かくして、ハイブリドーマ候補は、特定の抗原との反応性を有し、ヒト恒常領域の特徴であるエピトープを有することがわかる。

10

R N A をハイブリドーマ候補から分離し、最初のストランドの c D N A を合成するのに使用する。この最初のストランドの c D N A を次に、(1 本鎖 D N A を連結する) R N A リガーゼを用いて、予め定められた配列の唯一の 1 本鎖オリゴヌクレオチドに連結する。連結された c D N A を次に、2 組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて P C R により 2 つの反応において増幅させる。セット H (

20

重鎖) は、(E L I S A の結果に応じて) ヒト μ 又はヒト γ 1 のいずれかへと特異的にアニールするオリゴ、及び、オリゴ X 配列へとアニールするオリゴを含む。こうして、ヒトミニ遺伝子座内へトランス再配置している可能性のあるマウス V セグメントを含め、特別な V セグメントの検出に対抗する偏が防止される。第 2 の組のプライマー、つまりセット L (軽鎖) は、ヒト κ へと特異的にアニールするオリゴと、オリゴ X へと特異的にアニールするオリゴを含む。P C R 産物を分子クローニングし、ヒト及びマウス I g 配列に対する配列比較に基づいてハイブリドーマが唯一のヒト抗体を産生しているか否かを確かめるため、そのいくつかの D N A 配列を決定する。

30

40

実施例 2 5

この例は、ヒト軽鎖 (κ) ミニ遺伝子座を宿すトランスジェニックマウスの産生を実証する。

ヒト κ ミニ遺伝子座トランスジェニックマウス

【数 1 6 7】

(168)

K C I

(上記のような κ 特異的オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションによるヒトゲノミックDNAファージライブラリから分離された) ファージクローンからの1.3kbのXhoI-J κ 2-K κ を含むフラグメントをクレノウ酵素で処理し、pK-31を産生するべくpGP1dのクレノウ処理されたHind111 部位にクローニングさせた。これにより、インサートXhoI部位が破壊され、唯一のポリリカー誘導されたXhoI部位はJ κ 2の隣り5' 末端に位置づけられた。唯一のポリリカー誘導されたClaI部位をこのXhoI部位とインセット配列の間に位置設定し、一方唯一のポリリカー誘導されたSalI部位をインサートの3' 末端に位置設定する。

10

j κ 1及び上流配列を含む7.5kbのXhoIフラグメントも同様に、(上述のように κ 特異的オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションによりヒトゲノミックDNAファージライブラリーから分離された) ヒトゲノミックDNAファージクローンから分離した。この7.5kbのXhoIフラグメントをpS

20

P72 (Promega, Madison, Wisconsin) のSalI部位内にクローニングさせ、かくして両方のXhoI部位を破壊し、J κ 1の3' にポリリンカーClaI部位を位置づけた。結果として得られたクローンをClaIで消化させると、上流配列を4.5kbとJ κ 1を含む4.7kbのフラグメントが放出された。

30

この4.7kbのフラグメントをpK-31のClaI部位内にクローニングさせ、pKcor「を作り出した。残りの唯一の5' XhoI部位をポリリンカー配列から誘導する。再配置されていないヒトV κ 111 遺伝子セグメント65.8

(プラスミドp65.8、実施例21)を含む6.5kbのXhoI/SalI DNAフラグメントをpKcorのXhoI部位内にクローニングしてプラスミドpKC1を生成させた。pKC1のNotIインサートを1/2日目のマウス胎児内に微量注射してトランスジェニックマウスを生成した。2つの独立したpKC1誘導されたトランスジェニック系統を樹立し、重鎖及び軽鎖ミニ遺伝子座を両方共含むマウスを繁殖させるのに用いた。これらの系統KC1-673及びKC1-674は、サザンブロットハイブリダイゼーションにより、それぞれト

40

【数 1 6 8】

(169)

ランスジーンのおよそ1及び10～20のコピーの組込みを含むものとして見積られた。

K C 1 e

マウス及びヒト重鎖J- μ イントロンエンハンサーを両方共含む2.3kbのインサートを切除するため、BamH I [及びHindIIIを用いてプラスミドpMHE1 (実施13及び18) を消化した。このフラグメントをクレノウ処理し、SalIリンカー (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) に連結させ、pKCIの唯一の3' SalI部位の中にクローニングさせてプラスミドpKC1eを生成した。pKC1eのNotIインサートを1/2日目のマウス胎児に微量注射してトランスジェニックマウスを生成した。4つの独立したpKC1e誘導されたトランスジェニック系統を樹立し、重鎖及び軽鎖ミニ遺伝子座を両方共含むマウスを繁殖させるのに使用した。これらの系統KC1e-1399, KC1e-1403, KC1e-1527及びKC1e-1536は、サザンブロットハイブリダイゼーションにより、それぞれトランスジーンの約20～

10

20

50, 5～10, 1～5及び3～5のコピーの組込みを含むものであると見積られた。

o K C 2

再配置されていないヒトVkIII遺伝子セグメント65.5 (プラスミドp65.5g1、実施例21) を含む6.8kbのXhoI/SalI DNAフラグメントをpKC1の唯一の5' XhoI部位内にクローニングしてプラスミドpKC2を生成した。このミニ遺伝子座トランスジーンは、2つの異なる機能的VkIII遺伝子セグメントを含む。1/2日目のマウス胎児の中にpKC2のNotIインサートを微量注射してトランスジェニックマウスを生成した。5つの独立したpKC2誘導されたトランスジェニック系統を樹立し、重鎖及び軽鎖ミニ遺伝子座の両方を含むマウスを繁殖させるのに用いた。これらの系統KC2-1573, KC2-1579, KC2-1588, KC2-1608及びKC2-1610は、サザンブロットハイブリダイゼーションにより、それぞれトランスジーン of 約1～5, 10～50, 1～5, 50～100及び5～20のコピー

30

40

【数 1 6 9】

(170)

の組込みを含むものと見積られた。

実施例 2 6

この例は、ヒト κ トランスジーンを支持するトランスジェニックマウスが、機能的ヒト κ 鎖を含む抗体を形成する抗原誘発された抗体応答を発生させることができるということを示している。

10

ヒト I g κ 軽鎖と結びつけられた抗体応答

H C 1 - 5 7 ヒト重鎖及び K C 1 e ヒト κ トランスジーンを含むトランスジェニックマウスを精製されたヒト可溶性 C D 4 (ヒト糖タンパク質抗原で免疫化した。ポリスチレンラテックス粒子 (Polysciences, Marrington, PA) に対する接合 (コンジュゲーション) により不溶化された精製ヒト C D 4 (NEN Research の製品、Westwood, MA) を $20 \mu\text{g}$ 、0 日目にジメチルジオクタデシル臭化アンモニウム (Cal bio chem, San Diego, CA) を伴う食塩水中で腹腔内注射し、その後 20 日目及び 34 日目にさらに注射を行なった。

20

25 日目と 40 日目に眼窩後方出血をとり、E L I S A により、ヒト I g M 又はヒト I g G 重鎖を含む C D 4 に対する抗体の存在についてスクリーニングした。簡単に言うと、P V C のマイクロタイタープレート上に $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で精製されたヒト C D 4 をコーティングし、P B S、0.5% T w e e n - 20、5% のニワトリ血清中で 1 : 4 / 1 : 5 に希釈された培養上清と共にインキュベートさせた。プレートを洗浄し、その後、ヒト I g G F c に特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼ接合されたヤギ抗血清又はヒト I g M F c 5 M u に特異的なウサギ抗血清 (Jackson Immuno Research, Westr Grove, PA) を付与した

30

A B T S 基質の付加によるさらなる洗浄後に、捕獲された抗体に結合された接合体の存在を見極めた。両方の出血において、抗原との反応性をもつヒト μ を検出したが、 γ 反応性は基本的に検出不能であった。40 日目に、ヤギ抗ヒト κ ペルオキシダーゼ接合体 (Sigma, St.Louis, MO) での同じ検定を用いて抗原反応性ヒト κ 鎖についても試料をテストした。この時点で C D 4 を結合する κ 反応性が検出された。検定の結果は、図 5 9 に示されている。

40

実施例 2 7

【数 1 7 0】

(171)

この例は、機能的に分断されたマウス重鎖及び軽鎖遺伝子座（重鎖及び κ 鎖遺伝子座）について同型接合であり、しかも、機能的ヒト重鎖及び機能的ヒト軽鎖をコードするべく産生的に再配置することのできるヒト軽鎖トランスジーンとヒト重鎖トランスジーンを並行して宿すマウスの生成の成功を示している。このようなマウスは「0 0 1 1」マウスと呼ばれ、ここで最初の2ケタの2つのゼロはこのマウスに機能的な重鎖及び軽鎖遺伝子座が欠如していることを表わし、次の2ケタの1は、このマウスがヒト重鎖トランスジーン及びヒト軽鎖トランスジーンについて半接合であることを表わしている。この例は、かかる0 0 1 1マウスに予め定められた抗原に対する特異的抗体応答を発生させる能力があること、又かかる抗体応答にアイソタイプスイッチが関与しうることを示している。

10

0 0 1 1 / 0 0 1 2 マウス：内因性 I g ノックアウト + ヒト I g トランスジーン

20

上述のH C 1 - 2 6 トランスジェニックマウス系統といったヒトH C 1 トランスジーンも宿し、機能的J_H領域が欠如した機能的に分断された内因性重鎖遺伝子座（J H D ÷ ÷ 又は J H Δ ÷ ÷ と呼ばれる）について同型接合であったマウスを、機能的J_H領域の欠如した機能的に分断された内因性カッパ鎖遺伝子座（ここではJ K D ÷ ÷ 又は J K Δ ÷ ÷ と呼ばれる、図9参照）について同型接合のマウスと同系交配させて、J H D ÷ ÷ / J K D ÷ ÷ と呼ばれるH C 1 トランスジーンを含む機能的に分断された重鎖及びカッパ鎖遺伝子座（重鎖 / カッパ鎖ノックアウト）について同型接合のマウスを産生した。

30

かかるマウスを、同系交配により産生させ、ゲノミックDNAのサザンブロットにより評価されたとおりの遺伝子型に基づいて選択した。H C 1 - 2 6 ÷ / J K D + ÷ / J H D + + マウスと呼ばれるこれらのマウスを、ヒトカッパ鎖トランスジーンを宿すマウス（系統K C 2 - 1 6 1 0, K C 1 e - 1 3 9 9 及びK C 1 e - 1 5 2 7 ; 実施例2 5 参照）. と同系交配させ、機能的に分断された重鎖及び軽鎖遺伝子座について同型接合でしかもH C 1 トランスジーン及びK C 2 又K C 1 e トランスジーンについて半接合である子孫マウスを同定するのに、ゲノミックDNAのサザンブロット分析を用いた。

40

このようなマウスは番号で呼称され、以下の略号を用いてその遺伝子型に関し

【数 1 7 1】

(172)

て同定された：すなわち、HC1-26÷はHC1-26系統のヒト重鎖ミニ遺伝子座トランスジーン組込みに対する半接合を表わし；JHD++はJ_Hノックアウトに対する同型接合を表わし；JKD÷÷はJ_Kノックアウトに対する同型接合を表わし；KC2-1610÷は、系統KC2-1610の場合と同じように組込まれたKC2ヒト_Kトランスジーンについての半接合を表わし；KC1e-1527÷は、系統KC1e-1527の場合と同じように組込まれたKC1eヒト_Kトランスジーンについての半接合を表わし；KC1e-1399÷は、系統KC1e-1399の場合と同じように組込まれたKC1eヒト_Kトランスジーンについての半接合を表わす。

10

結果して得られた個々の子孫には各々数字で表わした呼称（例えば6295、6907など。）が与えられ、各々J_Hノックアウト対立遺伝子、J_Kノックアウト対立遺伝子、HC1-26トランスジーン及び_Kトランスジーン（KC2又はKC1e）の存在について評価され、各遺伝子座において半接合（÷）又は同型接合（÷÷）のいずれかであることが決定された。表10は、子孫マウスのいくつかの番号呼称、性別及び遺伝子型を示している。

20

表 6

ID番号	性別	Igコード	遺伝子型
6295	M	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610+
6907	M	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC1e-1527+
7086	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC1e-1399+
7088	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC1e-1399+
7397	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC1e-1527+
7494	F	0012	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610++
7497	M	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC1e-1399+
7648	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610+
7649	F	0012	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610++
7654	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610+
7655	F	0011	HC1-26+；JH0++；JK0++；KC2-1610+

30

40

【数 1 7 2】

(173)

7839 F 0011 HC1-26+ ; JH0++ ; JK0++ ; KC1e-1399+
 7656 F 0001 HC1-26- ; JH0++ ; JK0++ ; KC2-1610+
 7777 F 1100 Co1-2141- ; JH0+ ; JK0+

我々は、生後6週間の雌マウスから脾臓をとり出した。サザンプロットハイブリダイゼーションにより、マウス#7655は、HC1（系統26）及びKC2（系統1610）トランスジーン取込みについて半接合であり、マウス μ 及び κ J領域のJH Δ 及びJ κ Δ ターゲティングされ欠失について同型接合であることが見極められた。マウス#7656は、サザンプロットハイブリダイゼーション

10

により、KC2（系統1610）トランスジーン組込みについて半接合でありマウス μ 及び κ J領域のJH Δ 及びJ κ Δ ターゲッティングされた欠失について同型接合であることが見極められた。マウス#7777は、サザンプロットハイブリダイゼーションにより、マウス μ 及び κ J領域のJH Δ 及びJ κ Δ ターゲッティングされた欠失について半接合であると見極められた。これらの欠失が劣性であることから、このマウスは表現型上野生型であるはずである。

20

0011マウスにおける内因性Ig鎖の発現

(1) 野生型マウス(7777)、(2) 重鎖及びカッパノックアウト対立遺伝子について同型接合でヒト軽鎖トランスジーン(7656)を宿す0001マウス及び(3) 重鎖及びカッパノックアウト対立遺伝子について同型接合でヒト軽鎖トランスジーン及びヒト重鎖トランスジーン(7655)を宿す0011マウスから外植されたリンパ球を選別するため、ヒト μ 、マウス μ 、ヒト κ 、マウス κ 、又はマウス λ のいずれかと反応性ある抗体のパネルを用いたFACS分析を使用した。

30

我々は、Mishell 及びShiigi (Mishell, B.B. & Shiigi.S.M. (eds)細胞免疫学における選択された方法。W.H.Freeman & Co., New York, 1980) により記述されているように、脾臓から単細胞懸濁液を調製し、NH₄Clで赤血球を溶解させた。リンパ球を以下の試薬で染色するヨウ化プロピジウム(分子プローブ、Eugene, OR)、FITC接合された抗ヒトIgM(クローンG20-1271 Pharmingen.サンディエゴ, CA)、FITC接合された抗マウスIgM(クローン

40

【数 1 7 3】

(174)

R 6 - 6 0 . 2 ; Pharmingen, サンディエゴ, CA) 、フィコエリトリン接合された抗ヒト I g κ (クローン H P 6 0 6 2 ; Cal Tag, サウスサンフランシスコ, CA) 、 F I T C 接合された抗マウス I g λ (クローン R 2 6 - 4 6 ; Pharmingen, サンディエゴ, CA) 、 F I T C 接合された抗マウス B 2 2 0 (クローン R A 3 - 6 B 2 ; Pharmingen, サンディエゴ, CA) 、及び C y - クロム接合された抗マウス B 2 2 0 (クローン R A 3 - 6 B 2 ; Pharmingen, サンディエゴ, CA) 。
我々は、F A C S c a n フロー血球計数器及び L Y S I S I I ソフトウェア (Be

10

on Dickinson, サンホゼ, CA) を用いて染色された細胞を分析した。

マクロファージ及び残留赤血球を、前方及び側方散乱をゲート・オンすることにより排除する。死濁細胞は、ヨウ化プロピジウム陽性細胞をゲート・アウトすることにより排除する。図 6 0 及び図 6 1 のフローサイトメトリーデータは、サザンブロットハイブリダイゼーションデータを確認し、マウス # 7 6 5 5 がヒト μ 及びヒト κ の両方を発現し、あったとしても比較的わずかなマウス μ 又はマウス κ を発現することを実証している。それでも、B 細胞の有意な分画 (約 7 0 ~ 8 0 %) がヒト重鎖及びマウス λ 軽鎖から成るハイブリッド I g レセプターを発現すると思われる。

20

30

図 6 0 は、細胞表面上でヒト μ 又はマウス μ を発現する B 細胞の相対的分布を示す；0 0 1 1 マウス (7 6 5 5) リンパ球はヒト μ に対し陽性であるが、相対的にマウス μ が欠如している；0 0 0 1 マウス (7 6 5 6) リンパ球は、多くのヒト μ 又はマウス μ を発現しない；野生型マウス (7 7 7 7) リンパ球はマウス μ を発現するが、ヒト μ が欠如している。

図 6 1 は、細胞表面上でヒト κ 又はマウス κ を発現する B 細胞の相対的分布を示す；0 0 1 1 マウス (7 6 5 5) リンパ球はヒト κ について陽性であるが、相対的にマウス κ が欠如している；0 0 0 1 マウス (7 6 5 6) リンパ球は多くのヒト κ 又はマウス κ を発現しない；野生型マウス (7 7 7 7) リンパ球はマウス κ を発現するが、ヒト κ が欠如している。

40

図 6 2 は、細胞表面上でマウス λ を発現する B 細胞の相対的分布を示す；0 0

【数 1 7 4】

(175)

1 1 マウス (7 6 5 5) リンパ球はマウス λ について陽性である；0 0 0 1 マウス (7 6 5 6) リンパ球は、有意なマウス λ を発現しない；野生型マウス (7 7 7 7) リンパ球はマウス λ を発現するが、0 0 1 1 マウス (7 6 5 5) に比べ相対的に低いレベルにある。

10

図 6 3 は、ヒト κ (トランスジーンでコードされたもの) に比べての内因性マウス λ について陽性の B 細胞の相対的分布を示す。左上の図版は、機能的内因性重鎖及び軽鎖対立遺伝子を有しヒトトランスジーン (単複) が欠如している野生型マウスからの細胞の結果を示す；細胞はマウスラムダについて陽性である。右上の図版は、 κ ノックアウトバックグラウンド (J K D $\div \div$) を有し K C 1 e - 1 3 9 9 系統のヒト κ トランスジーンの組込みを宿すマウス (# 5 8 2 2) からの細胞を示す；細胞は、おおまかに比例する量でヒト κ 又はマウス λ について陽性である。

20

左下図版は、 κ ノックアウトバックグラウンド (J K D $\div \div$) を有し K C 2 - 1 6 1 0 系統のヒト κ トランスジーン組込みを宿すマウス (# 7 1 3 2) からの細胞を示すヒト κ に対してよりマウス λ に対してより多くの細胞が陽性であり、K C 2 - 1 6 1 0 トランスジーン組込みが K C 1 e - 1 3 9 9 トランスジーン組込みほど効率が良くないということを表わしている可能性がある。右下図版は、ヒト κ ミニ遺伝子座トランスジーン (K C o 4) を宿し機能的内因性マウス κ 対立遺伝子が欠如しているマウスからの細胞を示す。

30

図 6 3 に示されているデータは同様に、トランスジーン間の表現型の可変性をも実証している。かかる可変性は、組込まれたトランスジーンの結果もたらされる単数又は複数の表現型上の特徴 (例えばアイソタイプスイッチ、高レベル発現、低マウス I g バックグラウンド) を発現する個々のトランスジーン及び／又はトランスジェニック系統について選択するのが望ましいことであるということを表わしている。一般に、(1) トランスジーン、(2) トランスジーン組込みの部位、及び／又は (3) 遺伝的背景により異なっている多数の個別のトランスジェニック系統を形成するため、別々に単一又は多数のトランスジーン種 (例えば p K C 1 e, p K C 2, K C o 4) が利用される。

40

【数 1 7 5】

(176)

次のような望ましいパラメータについて個々のトランスジェニック系統を検査する：（１）予め定められた抗原に対する免疫応答を高める能力、（２）トラン

スジーンでコードされた恒常領域内のアイソタイプスイッチの頻度及び／又は内因性（例えばマウス）I g 恒常領域遺伝子に対するトランススイッチの頻度、（３）トランスジーンでコードされた免疫グロブリン鎖及び抗体の発現レベル、（４）内因性（例えばマウス）免疫グロブリン、免疫グロブリン配列の発現レベル、及び（５）産生的V D J 及びV J 再配置の頻度。標準的には、トランスジーンでコードされる（例えばヒト）免疫グロブリン鎖を最大濃度で産生するトランスジェニック系統が選択される；好ましくは、選択された系統は、トランスジェニック動物の血清中で少なくとも約40 μ g/mlのトランスジーンコードされた重鎖（例えばヒト μ 又はヒト γ ）及び／又は少なくとも約100 μ g/mlのトランスジーンコードされた軽鎖（例えばヒト κ ）を産生する。

マウスの免疫化を受けていない血清及び特異的抗原つまりヒトCD4での免疫化の後の血清の中のヒト及びマウス免疫グロブリン鎖の発現について、マウスを検査した。図64はさまざまな遺伝子型の別々の4匹の免疫化を受けていない0011マウスの血清の中に存在するヒト μ 、ヒト γ 、マウス μ 、マウス γ 、ヒト κ 、マウス κ 及びマウス λ 鎖の相対的発現を示している（nt＝テストせず）；ヒト κ が最も豊富な軽鎖として優勢であり、ヒト μ 及びマウス γ （推定上はトランススイッチの産物）が最も豊富な重鎖であるが、系統間で可変性が存在しており、このことは、ヒト鎖の発現を可能にしながらマウス鎖の発現を最小限にする有利な遺伝子型組合せを同定するための選択段階の有用性を表わしている。マウス#6907及び7088は、ヒト μ からヒト γ へのアイソタイプスイッチ（トランスジーン内のシス・スイッチ）を示している。

図65は、さまざまな0011遺伝子型のマウス内のヒト μ （hu μ ）、ヒト γ （hu γ ）、ヒト κ （hu κ ）、マウス μ （ms μ ）、マウス γ （ms γ ）、マウス κ （ms κ ）、及びマウス λ （ms λ ）についての血清免疫グロブリン鎖レベルを示している。

0011マウス内の特異的抗体応答

【数 1 7 6】

(177)

0 0 1 1 マウス (# 6 2 9 5) を、次の免疫化計画に従って免疫原性用量のヒ

ト C D 4 を用いて免疫化した：0 日目、C D 4 マウス免疫血清 1 0 0 μ l の腹腔内注入；1 日目、1 0 0 μ l 中 D D A を伴いラテックス溶球上で 2 0 μ g のヒト C D 4 (American Bio-Tech) を注入する；1 5 日目、1 0 μ l 中 D D A を伴いラテックス溶球上で 2 0 μ g のヒト C D 4 (American Bio-Tech) を注入する；2 9 日目、1 0 0 μ l 中 D D A を伴いラテックス溶球上で 2 0 μ g のヒト C D A (American Bio-Tech) を注入する；4 3 日目、1 0 0 μ l 中 D D A を伴いラテックス溶球上で 2 0 μ g のヒト C D 4 (American Bio-Tech) を注入する。

10

図 6 7 は、抗 C D 4 応答におけるヒト μ 、ヒト κ 及びヒト γ 鎖の存在を立証する 3 週間目及び 7 週間目の C D 4 免疫化に対する相対的抗体応答を示す。ヒト γ 鎖は、7 週間目の血清中で著しく増大した発現量で存在し、野生型動物におけるアイソタイプスイッチのものと似た時間的關係で重鎖トランスジーン内でのシススイッチ (アイソタイプスイッチ) が発生していることを表わしている。

20

図 6 8 は、さまざまなヒト重鎖及び軽鎖トランスジーンの概略的寄せ集めを示す。

実施例 2 8

この例は、マウス λ 軽鎖遺伝子座のターゲティングされたノックアウトを提供する。

30

マウスラムダ軽鎖遺伝子座のターゲティングされた失活

I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子座とは異なり、マウス V λ J λ 及び C λ 遺伝子セグメントは、5' - 3' アレイの形に配置された 3 つのグループにまとめられておらず、その代りに散在させられている。最も 5' の部分は 2 つの V セグメント (V λ 2 及び V λ X) で構成されており、これら 2 つのセグメントの後には、3' 方向に続行して各々独自の J セグメント (J λ 2 C λ 2 及び遺伝子 J λ 4 C λ 4) と結びつけられた 2 つの恒常領域エキソンが続いている。次にくるのは最も広く用いられる V セグメント (V λ 1) であり、このセグメントの後には恒常領域エキソンの第 2 のクラスター (J λ 3 C λ 3 及び J λ 1 C λ 1) が続いて

40

【数 1 7 7】

(178)

いる。全体として、遺伝子座は約 200 kb にまたがり、2 つのクラスター間の間隔は ~20 ~90 kb である。

ラムダ遺伝子座の発現には、優越して J λ 2 までの V λ 2 又は V λ X の再配置そして稀にのみ J λ 3 又は J λ 1 に対してさらに 3' の再配置が関与する。V λ 1 は J λ 3 及び J λ 1 の両方と組換え可能である。かくして、遺伝子座の組換え及び発現を十分に削除するため、ラムダ遺伝子座を突然変異させることが可能である。

10

2 つのラムダ遺伝子クラスターの間隔は、マウス I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子座を失活させる上で用いられたとおりに、単一の精密なターゲティングされた欠失の生成を介して遺伝子座の発現を失活することを困難にする。その代り、発現ラムダ軽鎖を削除することになる小さい単一の欠失は、J λ 2 C λ 2 から J λ 1 C λ 1 までに広がる約 120 kb にまたがっている (図 69)。こうしてラムダ恒常領域或エキソンの全てならびに V λ 1 遺伝子セグメントが除去され、遺伝子座の失活が確保される。

20

欠失された 120 kb が P G K 発現カセット内で選択可能な標識遺伝子 neo と置換されている、置換型ターゲティングベクター (Thomas 及び Capecehi (1987) 前掲書中) が構築される。このマーカーは、ラムダ遺伝子座に対する相同性を提供するため欠失にフランキングするゲノミックラムタダ配列内に埋め込まれており、同様に、ベクターを相同的に組込んだ細胞についての富化を可能にするため、相同性領域の 1 つの端部に H S V - t k 遺伝子を含むこともできる。ターゲティングされている染色体 DNA に対し同質遺伝子型のターゲティングベクターの使用が相同組換えの効率を増強することが報告されていることから、ラムダ遺伝子座ゲノミッククローン配列は、ターゲティングされている E S 系統と同質遺伝子型の系 129 / S v ゲノミックファージライブラリのスクリーニングによって得られる。

30

40

ラムダ遺伝子座に対する相同性の長さで相異なるターゲティングベクターが構築される。第 1 のベクター (図 70 中のベクター 1) は、合計約 8 ~12 kb のラムダ遺伝子座配列によりフランキングされた標識遺伝子を含む。置換ベクタ

【数 1 7 8】

(179)

ーが数kbのDNAの付加又は検出を媒介するターゲティング事象については、これは、充分以上の相同性範囲であることが実証されてきた (Hasty et al. (1991)、前掲書M中; Thomas et al. (1992) 前掲書中)。フランキングラムダ配列をさらに約40～60kb伴うベクターも又構築される (図70中のベクター2)。少なくとも80kbのヒト1gミニ遺伝子座が日常的にクローニングされ、プラスミドベクターpGP1の中で増殖される (Taylor et al. (1993) 前掲書中)

10

ラムダ遺伝子座の失活のための代替的なアプローチでは、同じES細胞内において、例えば2つの恒常領域クラスター又は2つのV領域遺伝子座の突然変異といった2つの独立した突然変異が利用される。

恒常領域が両方共各々DNAの～6kb内に内含されているのに対しV遺伝子座の1つは～19kbにまたがっていることから、ターゲティングベクターは」λ2Cλ2/Jλ4Cλ4及びJλ3Cλ3/Jλ1Cλ1遺伝子座を独立して欠失するように構築される。図170に示されているように、各々のベクターは、各欠失にフランキングする合計～8～12kbのラムダ遺伝子座ゲノミックDNAによりとり囲まれた、PGK発現カセット内の選択可能なマーカー (例えばneo又はpac) から成る。陽性－陰性選択による相同組換え事象のため富化するべく、ターゲティングベクターに対し、HSV-tk遺伝子を付加することが可能である。

20

30

恒常領域遺伝子のうちの1つの欠失を支持するクローンが生成されるように、ES細胞を2つのベクターで逐次的にターゲティングさせる。次にこれらのクローンを2つのベクターで逐次的にターゲティングさせて、恒常領域遺伝子座の1つの欠失を支持するクローンが生成されるようにし、その後これらのクローンを残りの機能的恒常領域クラスターの欠失を生成するべくターゲティングさせる。両方のターゲティング事象がかくして同じ細胞に対し向けられていることから

40

、2つのターゲティングのために異なる選択可能なマーカーを使用することが好ましい。図70に示されている概略的な例においては、ベクターのうち一方はneo遺伝子を含み、もう一方はpac (ピュロマイシンN－アセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子を含んでいる。

【数 1 7 9】

(180)

第3の潜在的に優性な選択可能マーカーは、h y g (ハイグロマイニンホスフォトランスフェラーゼ) 遺伝子である。p a c 及び h y g 遺伝子は両方共、I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子座の中に n e o 遺伝子座をターゲティングするためにうまく使用される P G K 発現構成体の中に挿入され得る。2つのラムダ恒常領域クラスターは密に連鎖されるされていることから、2つの突然変異が同じ染色体上にあることが重要である。好ましくは独立した2つのターゲティング事象により同じ対立遺伝子を突然変異させる確率は50%あり、突然変異の連鎖は、2重にターゲティングされたE S細胞から誘導されたキメラの繁殖(交配)中のその同時分離により確立される。

10

実施例 2 9

この例は、マウス重鎖遺伝子座のターゲティングされたノックアウトを提供する。

20

マウス重鎖遺伝子座のターゲティングされた失活

E S細胞内での遺伝子ターゲティングによりマウス重鎖遺伝子座恒常領域遺伝子のうちの少なくとも1つ好ましくは実質的に全てを欠失するために、図91に示された構造をもつ相同組換え遺伝子ターゲティングトランスジーンを使用する。図91は、ターゲティングトランスジーンの全体的概要図を示す。セグメント (a) は、欠失されるべき恒常領域遺伝子(単複)の上流にある(すなわち遺伝子に近接する)クローニングされたゲノミックDNA配列である；セグメント (b) は、p g k - n e o といった正の選択マーカーを含みセグメント (c) は欠失すべき恒常領域遺伝子(単複)の下流にある(すなわち恒常領域遺伝子(単複)及びJ_H遺伝子に対し遠位にある)クローニングされたゲノミックDNA配列である；又任意のものであるセグメント (d) は、負の選択マーカー遺伝

30

子(例えばH S V - t k)を含む。図71は、「免疫グロブリン遺伝子」、Honjo T. Alt, FW及びRabbits TH(eds)Academic Press, MY(1939)p129からとったマウス重鎖遺伝子座の地図を示す。

40

ターゲティングトランスジーンは、図91に従った構造を有し、ここで(1) (a) セグメントは、クローンJ H 8. 1の11. 5kbのインサート(Chen eta

【数 1 8 0】

(181)

1.(1993) Int. Immunol. 5.647) 又は、マウス C μ 遺伝子上流にある少なくとも約 1 ~ 4 kb の配列を含む同等の部分であり、(2) (b) セグメントは上述のとおり p g k - n e o であり、(3) (c) セグメントは、5' -gtg ttg cg t gta tca gct gaa acc tag aaa cag ggt gac cag -3' という配列をもつ末端標識づけされたオリゴヌクレオチドでマウスゲノミッククローンライブラリをスクリーニングすることにより分離されたマウス C α 遺伝子のファージクローンから分離された 4 ~ 6 kb のインサート又は図 7 2 に示された 1 6 7 4 bp の配列を含んでおり、(4) (d) セグメントは上述の H S V - t k 発現カセットを含んでいる。

10

代替的には、第 1 のターゲティングが相同性領域すなわち恒常領域遺伝子(単複)、第 1 種の正の選択マーカー遺伝子 (p g k - n e o) 及び H S V - t k 負の選択マーカーにフランキングする配列に相同なセグメント (a) 及び (c) を含んでいる、単数又は複数の重鎖恒常領域遺伝子の段階的欠失を実施する。かくして、(a) セグメントは、C γ 3 の上流にある領域に相同な少なくとも約 1 ~ 4 kb の配列を含むことができ、(c) セグメントは C γ 2 a の上流にある領域に対して相同な少なくとも約 1 ~ 4 kb の配列を含むことができる。

20

このターゲティングトランスジーンは C γ 3, C γ 1, C γ 2 b 及び C γ 2 a 遺伝子を欠失させる。この第 1 のターゲティングトランスジーンは E S 細胞内に導入され、適正にターゲティングされた組換え体を選択され(例えば G 4 1 8 で)、適正にターゲティングされた C 領域欠失を生み出す。次に H S V - t k カセットの喪失についての負の選択が行なわれる(例えば g a n c i c l o v i r 又は

30

F I A U で)。結果として得られる適正にターゲティングされた第 1 図の C 欠失組換え体は、C γ 3, C γ 1, C γ 2 b 及び C γ 2 a 遺伝子が欠如した重鎖遺伝子座を有する。

40

第 2 のターゲティングトランスジーンは、相同性領域すなわち、恒常領域遺伝子(単複)、第 1 の種とは異なる第 2 種の正の選択マーカー遺伝子(例 g p t 又は p a e) 及び H S V - t k 負の選択マーカーにフランキングする配列と相同なセグメント (a) 及び (c) を含んでいる。かくして、(a) セグメントは、C

【数 1 8 1】

(182)

ϵ の上流にある領域に対し相同な少なくとも約 1 ～ 4 kb の配列を含むことができ、(c) セグメントは、 $C \alpha$ の上流にある領域に相同で少なくとも約 1 ～ 4 kb の配列を含むことができる。このターゲティングトランスジーンは $C \epsilon$ 及び $C \alpha$ 遺伝子を欠失させる。

この第 2 のターゲティングトランスジーンは、第 1 のターゲティング事象から得られた適正にターゲティングされた C 領域組換え型 E S 細胞の中へ導入される。第 2 のノックアウト事象のために適正にターゲティングされている（すなわち第 2 のターゲティングトランスジーンでの相同組換えによる）細胞は、第 2 種の正の選択マーカー遺伝子に特異的な選択薬剤（例えば、 $g p t$ について選択するためのミコフェノール酸 $p a c$ について選択するためのピュロマイシン）を用いて選択される。その後、 $H S V - t k$ カセットの喪失についての負の選択が行なわれる（例えば $g a n c i c l o v i r$ 又は $F I A U$ を用いて）。結果として得られるこれらの適正にターゲティングされた第 2 回目の C 領域組換え体は、 $C \gamma 3$ 、 $C \gamma 1$ 、 $C \gamma 2 b$ 、 $C \gamma 2 a$ 、 $C \epsilon$ 及び $C \alpha$ 遺伝子が欠如した重鎖遺伝子座を有する。

単数又は複数の C 領域遺伝子が欠如した適正にターゲティングされた第 1 回又は第 2 回目の組換え型 E S 細胞を、上述のとおり、胚盤胞注入のために使用し、キメラマウスを産生する。ターゲティングされた重鎖対立遺伝子の生殖細胞系伝播が樹立され、結果として得られた創立者マウスの繁殖（交配）を行なって C 領

域ノックアウトに対して同型接合のマウスを生成する。このような C 領域ノックアウトマウスは、 $J \mu$ ノックアウトマウスに比べていくつかの利点を有する：一例を挙げると、C 領域ノックアウトマウスは、ヒト重鎖トランスジーンと内因性重鎖遺伝子座恒常領域の間のトランススイッチを受ける能力が低下しており（又はこの能力が完全に欠如している）、かくしてトランスジェニックマウス内のキメラヒト／マウス重鎖の頻度を減少している。 μ 及びデルタも同様に頻繁に相同ターゲティングによって欠失させられているものの、マウスガンマ遺伝子のノックアウトが好まれる。

内因性マウス重鎖遺伝子座内のその他のターゲティングされた病巣と合わせて

【数 1 8 2】

(183)

、C領域ノックアウトを行なうことが可能である：中でも、マウス重鎖遺伝子座の産生的VDJ再配置を排除するため及びヒト重鎖トランスジーンとマウス重鎖遺伝子座の間のトランススイッチを排除又は削減するために、J_HノックアウトとC領域欠失を組み合わせることが可能である。いくつかの実施態様については、内因性重鎖遺伝子座の単数又は複数のC領域遺伝子が特定の欠如しているもの
 のその他のいくつかのC領域遺伝子を保持しているマウスを産生することが望ましい可能性
 がある。例えば、キメラヒト／マウスIgA、が有利な表現型を付与し実質的にマウスの望ましい有用性と干渉しない場合、このIgAのトランススイッチによる産生を可能にするべくマウスC α 遺伝子を保持することが好ましい可能性
 がある。

10

実施例 30

20

この例は、ヒトトランスジーンを宿トランスジェニックマウスから得られるリンパ球試料からの内因性（マウス）免疫グロブリンを発現するリンパ球の半ピボ枯渇を実証する。マウスIgを発現するリンパ球は、トランスジーン（単複）によりコードされるヒト免疫グロブリンに対する実質的結合力が欠如している抗マウス免疫グロブリン抗体に対する特異的結合により選択的に枯渇される。

マウスIg γ -発現B細胞の半ピボ枯渇

30

ヒト重鎖ミニ遺伝子座トランスジーン（HIC2）及びヒト軽鎖ミニ遺伝子座ト

ランスジーン（KC α 4）に対して同型接合のマウスをC57BL／6（B6）同系繁殖マウスと繁殖（交配）させ、2211マウス（すなわち、機能的内因性マウス重鎖遺伝子座に対し同型接合で、機能的内因性マウス軽鎖遺伝子座に対し同型接合で、かつヒト重鎖トランスジーンの一つのコピーとヒト軽鎖トランスジーンの一つのコピーを有するマウス）を得る。かかる2211マウスは同様にB6主要及び非主要組織適合抗原をも発現する。これらのマウスを、免疫原性用量の抗原でプライミングさせ、約1週間後に脾細胞を分離させる。

40

標準的方法（Wysocki et al.(1978). Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)75;2844; MACS磁気細胞選別、Miltenyi Biotec Inc. Sunnyvale, CA) に従った固相連結

【数 1 8 3】

(184)

されに抗体依存型細胞分離及び、それに続く、マウス I g に関し陽性の残留細胞を実質的に除去するための抗体依存型補体媒介の細胞溶解（「細胞免疫学における選択された方法」、Mishell 88及びshiigi SM (eds), W.M.Freeman and Company, New York, 1980, p211～212）によって、マウス I g に関して陽性の B 細胞を除去する。枯渇された試料中の残りの細胞（例えば、ヒト I g について陽性な B 細胞、T 細胞）を、好ましくは発生する B 細胞に対する付加的な抗マウス I g 抗体と合わせて、S C I D / B 6 又は R A G / B 6 マウスに静脈内注射する。再構成されたマウスを次に、さらに抗原に対し免疫化させ、ハイブリドーマクローンを産生するための抗体及び親和力の成熟した細胞を得る。

10

実施例 3 1

体細胞キメラ内の完全にヒトの抗体の産生

20

体細胞キメラマウス内で完全にヒトの抗体を産生するための方法が記述される。これらのマウスは、ヒト免疫グロブリン（I g）重鎖及び軽鎖トランスジーンを有し、機能的マウス I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子が欠如した胚幹（E S）細胞を、R A G - 1 又は R A G - 2 欠損マウスからの胚盤胞の中に導入することによって生成される。

R A G - 1 及び R A G - 2 欠損マウス (Mombaerts et al. (1992)Cell 68:

30

869 ; Shinkai et al. (1992)Cell 68 : 855) には、V D J 再配置を開始し I g s をコードする遺伝子セグメント及び T 細胞レセプタ（T C R）を組立てることができないため、マウス B 及び T 細胞が欠如している。B 及び T 細胞の産生におけるこの欠陥は、R A G - 2 欠損動物から誘導された胚盤胞内への野生型 E S 細胞の注入によって補完できる。結果として得られたキメラマウスは、注入された E S 細胞から完全に誘導された成熟した B 及び T 細胞を産生する (Chen et al (1993)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90 : 4528) 。

40

キメラの B 及び／又は T 細胞全ての中に、規定の突然変異及び／又は外因性 D N A 構成体を導入するために、注入された E S 細胞の遺伝子操作を使用する。Chen et al. (1993), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90 : 4528—4532)

R A G 胚盤胞内に注入された時点で、B 細胞が無い状態で T 細胞を作るキメラ

【数 1 8 4】

(185)

を産生した、I g 重鎖遺伝子座の同型接合失活を有する生成された E S 細胞（原文不明瞭）。突然変異体 E S 細胞内への再配置されたマウス重鎖のトランスフェクションの結果、B 細胞の発達が救われ、キメラ内で B 細胞及び T 細胞の両方が再生されることになる。

マウス I g 重鎖又はカッパ軽鎖の合成が無い状態で完全にヒトの抗体を発現するキメラマウスを生成することが可能である。マウス I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子の両方の失活について同型接合である E S 細胞の中に、ヒト I g 重鎖及び軽鎖構成体を導入する。このとき E S 細胞を、R A G 2 欠損マウスから誘導された胚盤胞の中に注入する。結果として得られるキメラは、マウス I g 重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子を発現することはできないもののヒト I g 遺伝子は発現する注入された E S 細胞から排他的に誘導された B 細胞を含んでいる。

10

20

免疫グロブリン重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子の失活について同型接合の E S 細胞の生成

それぞれ既知の手順に従った (Chen et al.(1993)EMBO J. 12:821; 及び Chen et al.(1993)Int.Immunol. 前掲書中)、E S 細胞内での I g J_H 及び J_K/C_K 配列のターゲティングされた欠失により、失活された I g 重鎖及びカッパ

軽鎖遺伝子座を支持するマウスを生成した。2つの突然変異体系のマウスを合わせて繁殖させて、両方の I g 遺伝子座の失活について同型接合の系を生成した。この2重突然変異体の系を、E S 細胞の誘導のために使用した。使用されたプロトコルは、基本的に、Robertson により記述されたものであった (1987、「奇形ガン腫及び胚幹細胞；1つの実践的アプローチ」中。

30

p71~112。E.J.Robertson 編、I R L プレス)。簡単に言うと、同系接合の2重突然変異体マウスの自然交配により、胚盤胞が生成された。受胎した雌を妊娠2.5日目に卵巣摘出し、妊娠7日目に子宮から「遅延した」胚盤胞を洗い流し、支持細胞上で培養して、それらの未分化状態の維持を助けた。その形態で同定できる胚盤胞の内部細胞質量からの幹細胞をとり出し、解離させ、支持細胞上で継代させた。正常な核型をもつ細胞を同定し、雄細胞系統は、キメラを生成しマウスの生殖細胞に寄与するその能力についてテストされることになる。雄キメラ

40

【数 1 8 5】

(186)

ははるかに多くの子孫を産生できることから、雌系統よりも雄 E S 細胞の方が好ましい。

マウス I g 重鎖及びカッパ軽鎖欠損 E S 細胞内へのヒト I g 遺伝子の導入

H C S 及び K C - C O 4 といったミニ遺伝子座構成体又は J 1 . 3 P といった Y A C クロンのいずれかとして、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を突然変異体 E S 細胞内に導入する。ヒト I g D N A での E S 細胞のトランスフェクションを、電気穿孔又は陽イオン脂質でのリポフェクションといった技術によって行なう。ヒト D N A を取込んだ E S 細胞の選択を可能にするため、選択可能マーカーを構成体に連結させるか又は E S 細胞へと構成体と同時トランスフェクションさせる。突然変異体 E S 細胞は、I g 遺伝子失活を生成した遺伝子ターゲティング事象の結果としてネオマイシンホスフォトランスフェラーゼ (n e o) 遺伝子を含んでいることから、ヒト I g 遺伝子を E S 細胞内に導入するため、ハイグロマイシンホスフォトランスフェラーゼ (h y g) 又はピュロマイシン N - アセチルトランスフェラーゼ (p a c) といったさまざまな選択可能なマーカーが使用される。

10

20

ヒト I g 重鎖及び軽鎖遺伝子は、異なる選択可能マーカーを用いて、突然変異体 E S 細胞内に同時に又は逐次的に導入することができる。トランスフェクションの後、適切な選択可能マーカーで細胞を選択し、ヒト遺伝子配列の組込みを確認し分析するべく凍結し D N A 分析する目的で薬剤耐性コロニーを拡張させる。

30

キメラの生成

記述されているとおり (Bradley, A. (1987), 「奇形ガン腫及び胚幹細胞：1 つの実践的アプローチ」中、p113~151, E.J.Robertson編、I R L プレス) R A G - 2 胚盤胞内にヒト I g 重鎖及び軽鎖遺伝子を含む E S クローンを注入し、偽妊娠の雌の子宮内にトランスファさせる、血清試料の E L I S A 検定により、ヒト抗体の存在について子孫をスクリーニングする。ヒトモノクローナル抗体の免疫化及び産生のために陽性動物を使用する。

40

実施例 3 2

この例は、スイッチ組換えを受ける B 細胞の欠失へと導くマウス重鎖遺伝子座

【数 1 8 6】

(187)

内へのターゲティングされたフレームシフト突然変異の、E S細胞内の相同組換えを介しての導入について記述する。フレームシフトされたマウスは、ヒト配列免疫グロブリンをコードするマウス以外の（例えばヒトの）トランスジーンを宿主するための適切な宿主である。

新しいフレームシフトされたマウスは、なかでも、重鎖トランスジーン（単複）及び／又は軽鎖トランスジーンによりコードされる非マウス（例えばヒト）配列免疫グロブリンを発現させるため、及び導入されたトランスジーンからのクラススイッチされた親和力が成熟したヒト配列抗体を発現するハイブリドーマの分離のために使用可能である。4つのマウスJ H遺伝子セグメントのうちの1つの中、そしてマウス μ 遺伝子の第1のエキソンの中に、フレームシフトを導入する。導入された2つのフレームシフト突然変異は、互いに補償し合い、かくして、機能的V D J連結のためにB細胞がフレームシフトされたJ Hを使用するときの完全に機能的なマウス μ 重鎖の発現を可能にする。残りのJ H遺伝子内で補償されない μ 内のフレームシフトのため、その他の3つのJ Hセグメントのいずれも

10

20

機能的V D Jジョイニングに使用することができない。代替的には、多数のマウスJ H遺伝子の中に、補償するフレームシフトを工作することもできる。

補償されフレームシフトされた免疫グロブリン重鎖対立遺伝子に対し同型接合のマウスは、ほぼ生理学的レベルの末梢B細胞及び、マウスとヒトの μ を両方共含むほぼ生理学的レベルの血清I g Mを有する。しかしながら胚中心内に動員されたB細胞は、頻繁に、非 μ アイソタイプへのクラススイッチを受ける。内因性マウス μ 鎖を発現するB細胞内のこのようなクラススイッチは、残りの非 μ C_H遺伝子が補償するフレームシフトを有していないことから、補償されていないフレームシフトmRNAの発現を導く。結果として得られるB細胞は、B細胞レセプタを発現せず、欠失される。従って、マウス重鎖を発現するB細胞はそれらがアイソタイプスイッチの起こる分化段階にひとたび達した時点で欠失される。しかしながら、アイソタイプスイッチの能力をもちかかるアイソタイプ制限フレームシフトを含まない、非マウス（例えばヒト）トランスジーンによりコードされる重鎖を発現するB細胞は、アイソタイプスイッチ及び／又は親和力成熟などを

30

40

【数 1 8 7】

(188)

含むさらなる発達の能力をもつ。

従って、フレームシフトを受けたマウスはマウス重鎖(μ)に関して二次応答が損なわれているが、トランスジーンコードされた重鎖に関しては有意な二次応答を有する。クラススイッチを受けることのできる重鎖トランスジーンがこの突然変異体バックグラウンド内に導入された場合、非-I g M二次応答は、B細胞を発現するトランスジーンにより支配される。かくしてこれらのフレームシフトされたマウスからハイブリドーマを発現する親和力成熟したヒト配列免疫グロブリンを分離することが可能である。さらに、フレームシフトされたマウスは一般に、ヒト重鎖トランスジーンが可変領域の制限された能力能囲しかコードできない場合に有利でありうるマウス I g Mの免疫防御レベルを有する。

10

ヒト配列モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作るために、トランスジェニック突然変異体マウスを免疫化し、その脾臓を骨髓細胞系統と融合さ

20

せ、結果として得られたハイブリドーマを、トランスジーンでコードされたヒト非 μ アイソタイプの発現についてスクリーニングする。さらに、フレームシフトしたマウスは、シススイッチのための活性基質として役立つ転写されたV D Jに隣接した搬能的 μ スイッチ配列を含むことになり (Gu et al, (1993) *Cell* 73;1155)、かくしてキメラヒト/マウス抗体を発現するトランススイッチされたB細胞レベルを低下させるため、J H欠失したマウスに比べ有利でありうる。

30

フレームシフトベクターの構築

2つの別々のフレームシフトベクターを構築する。これらのベクターのうちの1つは、マウスJ 4遺伝子セグメントの3'末端で2つのヌクレオチドを導入するのに用いられ、もう1つのベクターは、マウス μ 遺伝子のエキソン1の5'末端からこれらの同じ2つのヌクレオチドを欠失させるために用いられる。

40

1. J Hベクター

ホスホグリセリン酸キナーゼプロモータの制御下でヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドベクター内に、マウス重鎖J領域及び μ イントロンエンハンサーを網羅する3.4kbのX h o I / E c o R Iフラグメントをサブクローニングする (t k / n e oカセット, Hasty et al.

【数 1 8 8】

(189)

，(1991) Nature 350：243)。次に以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて2つの異なるPCRフラグメントを生成するための基質として、このクローンを使用する：

o-A1 5' -cca cac tct gca tgc agc aga agc ttt tct gat-3'

o-A2 5' -ggg gac tga ggt acc ttg acc cca gta gtc cag-3'

o-A3 5' -ggg tac ctc agt cac cgt ctc ctc aga ggt aat aat ggc ctc
-3'

o-A4 5' -agg ctc cac cag acc tct cta gac agc aac tac-3'

Sph I 及び Kpn I 消化される 1.2 kb のフラグメントを増幅するため、オリゴヌクレオチド o-A1 及び o-A2 を使用する。Kpn I 及び Xba I で消化される 0.6 kb のフラグメントを増幅するため、オリゴヌクレオチド o-A3 及び o-A4 を使用する。次にこれら2つの消化されたフラグメントを、Sph I / Xba I で消化されたプラスミド A の中にクローニングし、プラスミド B

を生成する。

プラスミド B は、J4 の末端に 2 ヌクレオチド挿入を含み、さらに挿入の上流に新しい Kpn I 部位を含む。挿入のための診断マーカーとして、Kpn I 部位を使用する。

相同組換え効率を増大させるため、プラスミドの 5' Xho I 部位及び 3' EcoR I 部位の中に、付加的フランキング配列をクローニングすることができる。その後、Sph I 又はインサート内に単一の部位をもつもう1つの制限酵素で、結果として得られたプラスミドを消化し、胚幹細胞へと電気穿孔させ、これらの細胞を次に、Hasty et al (1991)、前掲書中、により記述されているとおりに、G418 で選択させる。サザンプロットハイブリダイゼーションにより相同組換え体を同定し、次に Hasty et al により記述されているとおりに FIAU により選択させて、2塩基対挿入と JH4 内の新たな Kpn I 部位のみを含む欠失されたサブクローンを得る。これらを、Kpn I 消化された DNA のサザンプロットハイブリダイゼーションにより同定し、PCR 増幅された JH4 DNA の DNA 配列分析により確認する。

【数 1 8 9】

(190)

結果として得られたマウスは、突然変異されていない配列：すなわち

...TGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG gtaagaatggcctctcc.

TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGlu

から突然変異体配列すなわち、

...TGGGGTCAAGGTACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGgtaagaatggcctctcc...

10

TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGlu

へと変換された J H 4 セグメントを含む。

μエキソン1ベクター

J H d 遺伝子セグメント内への 2 塩基対挿入を工作するべく上述したものと類似の インビトロ 突然変異誘発を用いて、第 1 の μエキソンの 5' 末端で 2 塩基対欠失を含むベクターを作り出すため、P C R 産物及びゲノミックサブクローンを組立てる。さらに突然変異をマーキングするため、A を G に変更することにより

20

新しい X m n I 部位も下流に導入する。

突然変異を受けていない μ 遺伝子の配列は以下のとおりである：

...ctggctcctcagAGAGTCAGTCCTTCCCA AATGTCTTCCCCCTCGTC.

GluSerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal

突然変異を受けけた μ 遺伝子の配列は以下のとおりである。

30

XmnI

...ctggctcctcag AGTCAGTCCTTCCCGAATGTCTTCCCCCTCGTC...

SerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal

突然変異体配列を含む相同組換えベクターを、J H 4 挿入を含む E S 細胞系統へと線形化させ電気穿孔させる。ネオマイシン耐性クローンから相同組換え体を同定する。J H 挿入と同じ染色体上のフレームシフト挿入を含むこれらの相同組換え体を、K o n I / B a m H I で消化された D N A のサザンブロットハイブリダイゼーションにより同定する。野生型 1 1. 3 kb から突然変異体 9 kb までの K p n I / B a m H I を含む J - μ イントロンのサイズを減少させる新しい K p n I 部位と J H 4 挿入を結びつける。次に、F I A U を用いて、挿入された t k / n e o カセットの欠失のために、結果として得られたクローンを選択する。突然

40

【数 1 9 0】

(191)

変異体 μ エキソンを含むクローンを、Xmn I で消化された DNA のサザンブロットハイブリダイゼーションにより同定する。突然変異は、PCR 増幅された μ エキソン I DNA の DNA 配列分析により確認される。

フレームシフトされたマウスの生成

次に、JH4 内の 2 塩基対挿入及び μ エソキン 1 内の 2 塩基対欠失の両方を含む ES 細胞系統を、キメラを生成するべく偽妊娠の雌の体内に挿入される胚盤胞段階の胚の中に導入する。キメラ動物を繁殖させて生殖細胞系列の伝播を得、結果として得られた動物を同型接合まで繁殖させて、補償されたフレームシフトされた重鎖遺伝子座に対し同型接合でかつマウス重鎖を発現する B 細胞内の二次体液性免疫応答が損なわれている突然変異体動物を得る。例えば pHCI 又は pH C 2 といったヒト重鎖トランスジーンを、フレームシ

10

20

フトされたマウス IgH 遺伝子座をもつマウスの中にかかるヒトトランスジーンを宿すマウスを交雑育種することによってマウス重鎖フレームシフトバックグラウンドへと繁殖させることができる。同系交配及び戻し交配を介して、 μ 補償されフレームシフトされたマウス IgH 対立遺伝子に対してマウス IgH 遺伝子座で同型接合で（すなわちマウスの非 μ 鎖ではなく μ 鎖のみの補償された枠内発現をすることのできる）しかも機能的ヒト重鎖トランスジーン（例えば pHCI 又は pH C 2）の少なくとも 1 つの組込みコピーを宿すマウスを産生させる。かかるマウスは任意には、上述のとおりの内因性マウス κ 及び／又は λ 遺伝子のノックアウトを内含していてよく、又任意には、ヒト又はその他の非マウス軽鎖トランスジーン（例、pKC1e, pKC2t など）を含む可能性がある。

30

代替的には、トランスジーン恒常領域遺伝子（単複）内のフレームシフトにより補償されるフレームシフトがトランスジーン J 遺伝子（単複）に含まれるように、ヒトトランスジーン（単複）（重鎖及び／又は軽鎖）にば補償フレームシャフトが含まれていてもよい、内因性恒常領域遺伝子に対するトランススイッチは、補償されず、切形の又はナンセンス産生を産生する；かかる補償されていないトランススイッチされた免疫グロブリンを発現する B 細胞に対し選択を行ない、これを枯渇させる。

40

【数 1 9 1】

(192)

実施例 3 3

D領域切除による内因性重鎖の失活

この例は、マウス生殖細胞系統免疫グロブリン重鎖D領域を非機能的な再配置されたVDJセグメントで置換するための正一負選択相同組換えベクターについて記述する。結果として得られる対立遺伝子は、対立遺伝子内重鎖クラススイッチを受けかくしてトランススイッチレベルを活性トランスジーン遺伝子座まで減少させている状態で、正常な非産生的対立遺伝子としてB細胞内で機能する。

10

D領域ターゲティング構成体

マウスD領域の上流にある8～15kbのDNAフラグメントを、Gen BankにリストアップされたDFL16.1セグメントに対する公表済み配列の約50の連

20

続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、マウス系129ファージライブラリから分離し、サブクロニングする。DFL16.1は、上流Dセグメント（すなわち、V領域遺伝子クラスターに近位で、恒常領域遺伝子クラスターに遠位のもの）である。

同様に、JH3, JH4, E μ , S μ 及び μ 恒常領域の最初の2つのコーディングエクソンを含む9.5kbのBamHIフラグメントを、マウス系129ゲノミックファージライブラリーから分離しサブクロニングする。

30

次にマウスハイブリドーマ（あらゆる系）から5～10kbの再配置されたVDJを分離し、停止コドンを含む合成リンカーをJセグメント内に挿入する。V置換再配副が可能であるため、枠外VDJ連結よりもJの内部の停止リンカーが好まれる。

これら3つのフラグメントをPGKneo正の選択カセット及びPGKHSVtk負の選択カセットと合わせて組立てて、相同組換えにより129-誘導ES細胞（例えばAB1）内のマウスD領域を削除するための正一負選択ベクターを形成する。ターゲティングベクターは、それ自体9.5kbのBamHIフラグメントに連結される再配置された5～10kbの再配置済みVDJにそれ自体連結されている正の選択カセット（例えばPGKneo）に8～15kbのDNAフラグメントを連結させることによって形成される。次に、ターゲティング構成体のい

40

【数 1 9 2】

(193)

ずれかの端部で負の選択カセット（例えば P G K H S V t k）を連結させる。かかる D 領域ターゲティングベクターの構成は、図 7 3 に概略的に示されている。

D 領域ターゲティング構成体を、A B 1 E S 細胞内にトランスファし、正及び負の選択を上述のとおりに行ない、適正にターゲティングされた E S 細胞をクローニングする。胚盤胞注入のために、適正にターゲティングされた E S 細胞クローンを使用し、キメラマウスを産生する。D 領域失活された重鎖対立遺伝子を宿す創始者マウスを産生するため、キメラマウスを繁殖させる。機能的内因性重鎖遺伝子座が欠如した同型接合体を産生するため、子孫の同系交配を行なう。

10

このような同型接合体を用いて、ヒト I g トランスジーン（例えば p H C 1, p H C 2, p K C 2, p K C 1 e, K C o 4）を宿マウスまで交雑育種し、（さらに、機能的 D 領域が欠如した同型接合体までもどし交配することにより）、機能的内因性重鎖遺伝子座が欠如しかつヒト重（鎖）トランスジーン（そして好ましくはヒト軽鎖トランスジーンも）を宿すマウスを生み出す。

20

いくつかの機能的内因性軽鎖遺伝子座（例えば λ 遺伝子座）が残る実施態様においては、一般に、トランスジーンがヒト軽鎖（例えば κ ）ポリペプチドの高レベル発現を誘導する転写制御配列を含み、かくしてトランスジーンの遺伝子座が残りの同因性軽鎖（例えば λ ）遺伝子座と有効に競合できるようにすることが好ましい。例えば、C o 4 カップ軽鎖トランスジーンは、トランスジェニック動物内の内因性 λ 遺伝子座と有効に競合する能力に関して p K C 1 に比べ一般に好まれている。

30

実施例 3 4

この例は、ヒト V κ 遺伝子座の一部分を含む酵母人工染色体とヒト κ 軽鎖ミニ遺伝子座の同時注入によるヒト軽鎖トランスジーン V 遺伝子の能力範囲の拡張について記述する。

40

V κ 含有 Y A C DNA と κ ミニ遺伝子座の同時注入による機能的ヒト軽鎖 V セグメントの導入

一般に入手可能な I C R F Y A C ライブラリーのクローン 4 $\times$ 1 7 E 1 から、増幅されていない Y A C DNA として、ヒト V κ 遺伝子座の一部を含む約 4

【数 1 9 3】

(194)

50 kbのYACクローンを得た (Larin et al. (1991)Proc.Natl.Acad.Sci(U.S.A) 88:4123; Imperial Cancer Research Fund、ゲノム分析研究所、ロンドン、UK)。メーカーの仕様に従って標準的なパルプフィールドゲル電気泳動法により、予め増幅することなく、450 kb]のYACクローンを分離した (CHEF DR-(I、電気泳動セル、Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)。臭化エチジウムを用いて6つの個別のバルスフィールドゲルを染色し、YACクローンD

10

NAを含むゲル材料をゲルから切除し、次に三角形のゲルトレイ内に流し込まれた新しい(標準ゲル緩衝液中の低融点アガロース)ゲル内にこれを埋込む。標準電気泳動緩衝液に加えて2 MのNaOAcを伴う狭いアガロースゲルを用いて頂点において、結果として得られた三角形のゲル(6つの切除されたYAC含有ゲルブロックを内含する)を伸展させた。次にゲルを、標準ゲル緩衝液中に浸漬された電気泳動チャンバ内に入れた。

20

Y形状のゲルフォーマは、電流(流動?)が狭く高いソルトゲル部分までだけ流れるように、緩衝液の表面より上に立上っている。緩衝液内へのNaOAcの拡散を防ぐため、高ソルトゲル切片全体にわたり、アクリルのブロックを置いた。次に、YAC DNAを切片化された(埋込まれた)もとの切除ゲルから狭い高ソルトゲル部分内へと電気泳動させた。低ソルトゲルから高ソルトゲルへの遷移の時点で、三角形のゲルの頂点でDNAの移動を有効に停止させる抵抗の低下が存在する。

30

電気泳動及び臭化エチジウムでの染色の後、濃縮したYAC DNAを残りのゲルから切り離し、アガロースをGELase (Epi Centre Technologies, Madison, Wisconsin)で消化した。次に、結果として得られたYAC含有液体に塩化セシウムを付加し、1.68 g/mlの密度を得た。この溶液を36時間37000rpmで遠心分離し、あらゆる汚染物質からYAC DNAを分離した。結果として得られた密度勾配の0.5ml分画を分離し、5mMのTris (pH7.4)、5mMのNaCl、0.1MのEDTAに対してピークDNA分画を透析した。

40

透析の後、結果として得られたYAC DNAの0.65ml溶液の濃縮は、2 µg/mlのDNAを含んでいることがわかった。このYAC DNAを、20:

【数 1 9 4】

(195)

1 : 1 (マイクログラム Y A C 4 × 1 7 E 1 : K C 1 B : K V 4) の比率で、プラスミド p K C 1 B 及び p K V 4 からの精製された D N A インサートと混合した。半日の B 6 C B F 2 の胚の前後の中に、結果として得られた $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を注入し、95の存続する微量注入された胚を偽妊娠の雌の卵管内に移送した。

10

微量注入された胚から発達した 1 2 匹のマウスが生まれた。

実施例 3 5

この例は、失活した内因性免疫グロブリン遺伝子座に対して同型接合でありかつ H C 1 又は H C 2 重鎖トランスジーンを含む免疫化したトランスジェニックマウスの中でのクラススイッチ、体細胞突然変異及び B 細胞発達について記述する

ヒト配列生殖細胞系統配置ミニ遺伝子座が真正遺伝子座と置換できることを実証するために、我々は、ヒト生殖細胞系統配置 I g H トランスジーンを含む系を用いて、内因性 I g H が欠如したマウス系を繁殖させた。2つのトランスジーンミニ遺伝子座 H C 1 及び H C 2 は、それぞれ 1 つ及び 4 つの機能可変 (V) セグメント、10 及び 16 の多様性 (D) セグメント、6 つのジョイニング (J H) セグメント全て、及び両方の μ 及び γ 1 垣常領域でグメントを含む。ミニ遺伝子座は、コーディングでグメントに密に連鎖されている—J H— μ イントロンエンハンサー及び μ 及び γ 1 スイッチ配列といった—ヒトシス作用性調節配列を含む。

20

30

これらは同様に、ラット I g H 遺伝子座の 3' 末端から誘導された付加的なエンハンサー要素も含んでいる。我々は、H C 1 及び H C 2 トランスジェニックマウスを、記述のとおり (前出) J H セグメント (J H D マウス) が欠如し従って機能的重鎖再配置を受けることのできない幹細胞由来の突然変異マウスと交配させた。結果として得られたトランスジェニック—J H D マウスは、導入された重鎖配列に依存する B 細胞を含んでいる。

40

免疫化及びハイブリドーマ

我々は、50 ~ 100 μg の抗原の腹腔内注入によりマウスを免疫化した。抗原には、ヒトのガン胎児性抗原 (C E A ; Crystal Chem, Chicago, IL) 、ニワトリ卵白リゾチーム (H E L ; Picrce, Rockford, IL) 及びキーホールリンペッ

【数 1 9 5】

(196)

トヘモシアニン (K L H ; Pierce. Rockford, IL)が含まれていた。一次注入のために、我々は抗原を完全フロイントアジュバントと混合し、その後の注入については不完全フロイントアジュバント (Gibco BRL. Galthersburg, MD)を用いた。脾細胞を、非分泌性マウス骨髄腫 P 3 X 6 3 - A g 8. 6 5 3 (ATCC, CRL1580) と融合させた。

10

我々は、E L I S Aにより、ヒト重鎖配列を含む特異的及び非特異的抗体の存在について血清試料及びハイブリドーマ上清を検定した。非特異的抗体の検出のために、我々は、ヒト重鎖アイソタイプ特異的抗体 (マウス M A b α ヒト I g G 1、クローン H P 6 0 6 9、Cal bio chem, La Jolla, CA; マウス M A b α ヒト I g M、クローン C H 6、The Binding Site. Birmingham, UK) でマイクロタイターウエルをコーティングし、ペルオキシダーゼ接合抗血清 (ポリクローナルヤギ α ヒト I g G (f c) からのホースラディッシュペルオキシダーゼ接合の親和性精製された f a b フラグメント、c a t # 1 0 9 - 0 3 6 - 0 9 8 ; 親和性精製されたホースラディッシュペルオキシダーゼ接合されたポリクローナルウサギ α ヒト I g M (f c) . c a t # 3 0 9 - 0 3 5 - 0 9 5。

20

jackson Immuno Research, West Grove, PA) を用いて発達させた。抗原特異的抗体の検出のため、我々はマイクロタイターウエルを抗原でコーティングし、ペルオキシダーゼ接合されたヒト重鎖アイソタイプ特異血清を用いて発達させた。我々は、過酸化水素及び 2, 2' - アジノーピスー (3 - エチルベンズテアソリン - b - スルホン酸、Sigma Chem. Co., St. Louls, Mo) でのインキュベーションにより、結合ペルオキシダーゼを検出した。反応産物を 4 1 5 nm で吸収により測定し、4 9 0 nm での吸収について補正する。

30

フローサイトメトリー

40

我々は、脾臓、骨髄及び腹腔から単細胞懸濁液を調製し、Mishell及びShiigiにより記述されているとおりに N H₄ C l で赤血球を溶解した。次の試薬でリンパ球を染色した：すなわち、フィコエリトリン接合された抗マウス I g k (クローン X 3 6 ; Becton Dickinson. San Joss. CA) , F I T C 接合された抗マウス I g D (クローン S B A I . Southern Biotech. AL) . F I T C 接合された抗マ

【数 1 9 6】

(197)

ウスCD5 (クローン53-7.3; Becton Dickinson, San Jose, CA), FITC接合された抗マウスIgλ (クローンR26-46); Pharmingen, San Diego, CA) 及びCy-クロム接合された抗マウスB220 (クローンRA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA)、我々はFACSscanクローン血球計算器及びLYSIS IIソフトウェア(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて染色した細胞を分析した。前方及び側方散乱器上でのゲーティングにより、大部分のマクロファージ、好中球及び残留赤血球を排除する。

10

B細胞区画の救助

H C 1 トランスジェニック-J H D 動物の腹腔内では、CD⁵⁺ B細胞の正常レベル及び従来のCD⁵⁻ B細胞の正常レベルの約4分の1が見られる。トランスジェニック腹腔CD⁵⁺ B細胞は、正常な動物内での記述されたいわゆるB-1細胞に類似している：すなわち、これらは従来のB及びTリンパ球よりも大きく、脾臓内で見られる従来のB細胞よりも低いレベルのB220を発現し、より高い割合のλ軽鎖発現細胞を含んでいる。脾臓B細胞の90%以上がκを発現し、一方最高50%の腹腔B細胞がλを発現する。かくして、従来のB細胞のレベルは全ての組織内で均等に減少している一方で、自己更新の能力がはるかに大きいものとして報告されているB-1のレベルは、H C 1 トランスジェニック-J H D 動物において正常であると思われる。

20

30

クラススイッチ

トランスジェニック-J H D マウスにおいては、抗原に対して反復的に露呈することにより、ヒト γ 1抗体ならびに μ 抗体が結果として産生される。我々は、一週間の間隔でトランスジェニック-J H D マウス内にヒトCEAを注入し、4週間にわたり抗原特異的IgM及びIgG1の血清レベルを監視した(図74)。1週間目に、検出可能なIgM応答があるがIgG1応答は全く無い。しかしながらIgG1応答は2週間後IgM応答よりも大きく、IgM応答が比較的恒常な状態にとどまっているのに対して増大し続けている。このパターン、すなわち初期のIgM応答とそれに続くIgG反応は、二次免疫応答に典型的なものであり、これは、トランスジェン内に内含されているシス作用性配列が、クラススイッチを導くサイトカインに対し応答しているかもしれないということを示唆し

40

【数 1 9 7】

(198)

ている。我々は、各々文献中で論述されてきた非 μ アイソタイプの発現について考えられる 3つのメカニズムを考慮した。これらのメカニズムとはすなわち、 μ 遺伝子の欠失が関与しない交互のスプライシング；フランキング反復配列間の相同組換えを介しての μ 遺伝子の欠失が関与した「 δ 型」スイッチ；そしてスイッチ領域間の非相同組換えである。以下で記述する我々の実験の結果はスイッチ領域組換えモデルを表わしている。

10

アイソタイプシフトを説明するのに 2つのタイプの非欠失性交互スプライシングメカニズムを喚起することができる。第 1 に、 μ 及び $\gamma 1$ の両方をカバーする単一の写しをトランスジーンから発現させることが可能である；この写しは抗原に対する露出により誘発されたサイトカインに応答して交互にスプライグさせることができた。代替的には、サイトカイン誘発された $\gamma 1$ の上流で開始する不稔写しを、 μ 写しにトランススプライシングさせることができた。これらのメカニズムのうちのいずれかがヒト $\gamma 1$ 配列の発現の原因であったならば、 μ 及び $\gamma 1$ の両方を発現するハイブリドーマを分離できるということを期待したであろう。しかしながら、ヒト μ 又はヒト $\gamma 1$ のいずれかを発現する数百のハイブリドーマをスクリーニングしてきたものの、かかる二重産生者 (μ^+ , $\gamma 1^+$) ハイブリドーマは全く発見されなかった。このことは、 $\gamma 1$ の発現に μ 遺伝子の欠失が供っていることを表わしている。

20

30

μ 遺伝子の欠失は、 μ と $\gamma 1$ スwitch領域の間の非相同組換えによって、又は HC 1 及び HC 2 トランスジーン内に含まれている 2つのフランキングする 400bp の直接反復 ($\sigma \mu$ 及び $\Sigma \mu$) の間の、相同組換えによって媒介されうる。 $\sigma \mu$ 及び $\Sigma \mu$ の間の欠失組換えは、いくつかのヒト B 細胞の $I g D^+$, $I g M^-$ 表現型の原因であることが報告されてきた。第 1 のメカニズムすなわち非相同スイッチ組換えは可変的な長さのスイッチ産物を産生するはずであるが、一方第 2 のメカニズムすなわち $\sigma \mu / \Sigma \mu$ 組換えはつねに同じ産物を生成するはずである。我々は、 μ を発現するもの 1つと $\gamma 1$ を発現するもの 2つの計 3つのハイブリドーマ (図 7 5) から分離したゲノミック DNA のサザンプロット分析を行なった。

40

$\gamma 1$ スwitch領域のうち 2つの中にのみトランスジーン $\gamma 1$ の上流にゲノミッ

【数 1 9 8】

(199)

ク再配置が発見される(図7 6)。さらに、観察した構造のうちいずれも $\sigma\mu$ と $\Sigma\mu$ の間の相同組換えと両立性がない。従って、我々の結果は、トランスジーンでコードされた μ 及び $\gamma 1$ のスイッチ領域の間での欠失性非同組換えによって媒介される $\gamma 1$ アイソタイプ発現のためのモデルと一貫性を有する。

トランススイッチ

ヒト $\gamma 1$ に加えて、HC 1及びHC 2トランスジェニック-JHDマウスの血清中にマウス γ が見い出される。これらの動物から、マウス γ 発現ハイブリドーマも得られた。非トランスジェニック同型接合JHD動物は、検出可能なレベルのマウス免疫グロブリンを発現しないことから、HC 1及びHC 2トランスジェニック-JHD動物内のマウス γ の発現は、トランススイッチ現象のせいであると思われる。我々が分析したトランスジェニック・ハイブリドーマの全ては、マウス又はヒトのいずれかの恒常領域配列を発現するものの両方を発現することはない。従ってトランススプライシングメカニズムが関与する可能性は低い。トランススイッチ産物のcDNAクローンを分離するためのPCR増幅を用い、結果として得られるクローンのうちの10個のヌクレオチド配列を決定した(図7 7)。PCR増幅中の5'オリゴヌクレオチドはトランスジーンコードされたVH251に特異的であり、3'オリゴヌクレオチドはマウス $\gamma 1$ 、 $\gamma 2b$ 及び $\gamma 3$ 配列に特異的である。これら3つのマウス恒常領域の全てを取込んだトランススイッチ産物の例が見られる。

体細胞突然変異

図7に示されているトランススイッチ産物の可変領域内のヌクレオチドの約1%が、生殖細胞系統コーディングを受けていない。これはおそらく、体細胞突然変異のせいであると思われる。突然変異を受けた配列は内因性遺伝子座にトランスロケートされていたため、これらの突然変異を導くシス作用性配列は、マウス γ スイッチから3'のどこにでも位置設定することができた。しかしながら以下で論述するとおり、かかるトランスロケーションを受けなかったVDJでセグメント内の体細胞突然変異も観察される。そしてこの結果は、重鎖体細胞突然変異が必要とする配列がトランスジーン内に内含されているということを表わしている

10

20

30

40

【数 1 9 9】

(200)

。

H C 1 及び H C 2 構成体が、トランスジェニック J H D マウス円体細胞突然変異が起こるのに十分なシス作用性配列を含んでいるか否かを決定するため、我々は、2つの独立した H C 1 トランスジェニック系統そして1つの H C 2 系統から誘導された c D N A クローンを分離し部分的に配列決定した。トランスジェニック J H D マウスからの γ 1 写しのいくつかは、広範な体細胞突然変異を伴う V 領域を含んでいることがわかる。これらの突然変異を受けた写しの頻度は、免疫化の反復に伴って増大するように思われる。図 7 8 及び 7 9 は、2組の c D N A 配列を示す：すなわち 1 組は、R N A を分離する 5 日前に抗原の一回の注入で免疫化した H C 1 (系統 2 6) トランスジェニック J H D マウスから誘導体

10

されている；第 2 の組は、R N A を分離する 5 カ月前から始めて異なる日に 3 回抗原を注入することによって高度免疫させた H C 1 (系統 2 6) トランスジェニック J H D マウスから誘導されている；第 2 の組は、R N A を分離する 5 カ月前から始めて異なる日に 3 回抗原を注入することによって高度免疫させた H C 1 (系統 2 6) トランスジェニック J H D マウスから誘導されている (原文重複)。露呈後 5 日目から 1 3 の V 領域のうちわずか 2 つだけがいずれかの生殖細胞系統コーディングを受けていないヌクレオチドを含んでいる。これらの V の各々は単一のヌクレオチド変更しか含まず、この試料について 0. 1 % 未満の全体的体細胞突然変異頻度を与えている。これとは対照的に、高度免疫された動物からの 1 3 の V 配列のいずれも完全に生殖細胞系統ではなく、全体的体細胞突然変異頻度は 1 6 % である。

20

30

単一の組織試料から分離された μ 及び γ 1 写しの比較は、体細胞突然変異の頻度がクラススイッチを受けたトランスジーンコピーの場合よりも高いということを示している。我々は高度免疫した C H 1 系統 5 7 トランスジェニック J H D マウスからの 4 7 の独立した μ 及び γ 1 c D N A クローンを分離し、部分的に配

40

列決定した (図 8 0 及び 8 1)。 μ c D N A クローンのほとんどは、生殖細胞系統配列との関係において修正されておらず、一方 γ 1 クローンの半数以上は、多

【数 2 0 0】

(201)

数の生殖細胞系統コーディングを受けていないヌクレオチドを含んでいる。 γ 1 発現細胞は、 μ 発現細胞とは全く異なり、2つのプロセスは必ずしも連関されていないものの、クラススイッチと体細胞突然変異は、B細胞の同じ副次集団内で起こっている。

高度免疫を受けていないC H 1 トランスジェニックマウス同にV H 2 5 1 遺伝子の広範な体細胞突然変異は見られないが、特定の実験を受けていないH C 2 トランスジェニックマウスにおいてはV H 5 6 p 1 及びV H 5 1 p 1 遺伝子の中で著しい体細胞突然変異が発見された。生後9週間の免疫化を受けていない雌のH C 2 トランスジェニック動物から脾臓及びリンパ節R N Aを分離した。我々は、V及び γ 1 特異的プライマを用いてH C 2 トランスジェン内の4つのV領域の各々を取込む γ 1 写しを個別に増幅した。特異的P C R産物の各々の相対的収量はV H 5 6 p 1 $\gg$ V H 5 1 p 1 > V H 4. 2 1 > V H 2 5 1であった。この技術は厳密に定量的ではないものの、H C 2 マウス同でのVセグメントの使用における偏りを表わす可能性がある。

図8 2は、4つのV特異的プライマ全ての等モル混合物を用いたP C R増幅から誘導された、無作為にとり上げた2 3個の γ 1 c D N A配列を示している。ここでも又、V H 5 6 p 1 (1 9 / 2 3 クローン) 向かっての偏りが見られる。さらに、V H 5 6 p 1 配列は、V遺伝子セグメント内で2. 1 %の全体的頻度で、著しい体細胞突然変異を示している。C D R 3配列を検査すると、1 9のうち1 7の個別のV H 5 6 p 1 クローンが固有のものであるけれども、それらがわずか7つの異なるV D J組換え事象のみから誘導されている、ということかわかる。従って、特定の実験を受けていない動物において、恐らくは内因性病原体又は自己抗原によりV H 5 6 p 1 発現B細胞が選択されるように思われる。この同じ遺伝子がヒトの胎児能力範囲内で過剰表示されることが適切である可能性がある。

要約

上流シス作用性配列は、個々のスイッチ領域の機能性を規定し、クラススイッチには必要なものである。H C 1 トランスジェン内のクラススイッチが二次応答に関与する細胞に大幅に制限されており、全B細胞集団を横切って無作為に発生

【数 2 0 1】

(202)

しないという我々の観察は、トランスジーンと共に内含される最低限の配列が充分なものであるということを示唆している。この構成体の中に内含される γ 配列は、 γ 1 不稔写しの開始部位の上流わずか 116 個のヌクレオチドのところで始まっていることから、スイッチ調節領域はち密なものである。

我々の結果から、これらの重要なシス作用性調節要素が個々の γ 遺伝子に密に連鎖されているか又は HC 1 及び HC 2 トランスジーン内に含まれている 3' 重鎖エンハンサーと結びつけられているかであるということが立証される。HC 1 及び HC 2 インサートは、体細胞突然変異を受けている可能性の高い配列に対するマーカーとして役立つトランスジーン自律性クラススイッチを受けていることから、我々は内因性遺伝子座へのトランスロケーションに由来したものでない高度に突然変異を受けた写しを容易に見い出すことができた。我々は、3つの独立したトランスジェニック系統（2つの HC 1 系統及び1つの HC 2 系統）の中に体細胞突然変異を受けた γ 写しを見い出した。従って、トランスジーンの組み込み部位にフランキングする配列がこのプロセスに影響を及ぼすという可能性は低い：その代り、トランスジーン配列は、体細胞突然変異を導くのに充分なものである。

実施例 3.6

この実施例は、失活した内因性免疫グロブリン遺伝子座について同型接合であり、ヒト配列重鎖及びヒト配列軽鎖をコードするトランスジーン配列を含むマウスからのハイブリドーマの生成について記述する。ここで記述されるハイブリドーマは、ヒト配列重鎖及びヒト配列軽鎖を含むモノクローナル抗体を分泌し、T細胞上で発現される予め定められた抗原に結合する。この実施例は同様に、ヒト

由来の免疫原ヒト CD 4 に応えてヒト配列抗体を作るマウスの能力、及びヒト抗原と反応性あるヒト配列モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作るための供給源としてのかかるマウスの適性をも立証する。

A. ヒト CD 4 抗原で免疫化された HC 1 トランスジェニックマウスから誘導されたヒト Ig モノクローナル抗体の生成

機能的に分断された J μ 遺伝子座について同型接合でしかも、ヒト配列重鎖を

【数 2 0 2】

(203)

コードするべく再配置可能なトランスジーン及びヒト配列軽鎖をコードするべく再配列可能なトランスジーンを宿すトランスジェニックマウスを免疫化した。マウスの遺伝子型は $H C 1-26^{+} K C 1 e-1536^{+} J_{H} D^{+/+} J_{K} D^{-}$ であり、これはマウス重鎖失活に対する同型接合、及び $H C 1$ ヒト配列重鎖トランスジーン及び $K C 1 e$ ヒト配列軽鎖トランスジーン生殖細胞系統コピーの存在を表わしていた。

10

マウスを、安定した形でトランスフェクションされたポリヌクレオチドによりコードされたマウス-ヒトハイブリッド $C D 4$ 分子を発現する $E L 4$ 細胞系統 ($A T C C$) の変異体で免疫化した。発現された $C D 4$ 分子は、実質的にヒト様の $C D 4$ 配列を含む。 $100 \mu l$ の完全フロイントアジュバント ($C F A$) を伴う $100 \mu l$ の $P B S$ 中の約 5×10^5 の細胞を、0日目に1腹腔内注入を介してマウス体内に導入した。7日目、14日目、21日目、28日目、60日目及び77日目に接種をくり返し行ない、18日目、35日目及び67日目にテスト出血を行なった。81日目に脾臓を除去し、標準的な方法 ($P E G$ 融合) により約 1.2×10^7 の融合パートナー細胞 ($P 3 \times 63 A g 8.653$ 細胞系統: $A T C C$) に対して約 7.2×10^7 の脾細胞を融合させ、 $R P M I 1640$ 、15% $F C S$ 、4mMグルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウムに $H A T$ 及び $P S N$ 培地を加えたものの中で培養させた。多数の融合を実施した。

20

30

ハイブリドーマを成長させ、 $C H O$ 細胞内で発現された精製組換え型可溶性ヒト配列 $C D 4$ (Amcricon Bio-Technologies, Inc.(ABT), Cambridge, MA) 及び/又は $NEW-DuPont$ から得られる $C D 4$ といった市販の供給源に対する結合力につ

いて、 $E L I S A$ を用いて上清をテストした。 $A B T$ 試料は、ヒト $C D 4$ の $V_1 \sim V_3$ ドメインから成る精製された55kDのヒト $C D 4$ 分子を含んでいた。検定プレートに対して、組換え型ヒト配列 $C D 4$ ($C H O-K 1$ 細胞内で産生されたもの) を吸着させ、ハイブリドーマ上清からの抗体を捕獲するのに用い、次に捕獲した抗体を、ヒト μ 、ヒト κ 、ヒト γ 、マウス μ 又はマウス κ のいずれかを結合する抗体のパネルに対する結合力について評価した。

40

1つのハイブリドーマを、1F2と呼ばれるその培養プレートウエルからサブ

【数 2 0 3】

(204)

クローニングした。A B T C D 4 調製物に対して結合された 1 F 2 抗体は、ヒト μ 及びヒト κ について陽性であり、ヒト γ 、マウス γ 及びマウス κ について陰性であった。

B. ヒト C D d 及びヒト I E で免疫化された H C 2 トランスジェニックマウスから誘導されたヒト I g モノクローナル抗体の生成

10

重鎖トランスジーン H C 2 は図 6 8 に示され、上で記述したきた（実施例 3 4 参照）。

図 6 8 に記されているヒト軽鎖トランスジーン K C o 4 は、マウスゲノム内の単一部位での 2 つの個別にクローニングされた D N A フラグメントの同時組込みにより生成される。フラグメントは 4 つの機能的 V_{κ} セグメント、5 J セグメント、 C_{κ} エキソンそしてイントロン及び下流の両方のエンハンサー要素を含んでいる（実施例 2 1 参照）（Meyer 及び Neuberger (1989), EMBO J. 8 : 1959-1964; jude 及び Max (1992), Mol. Cell Biol. 12 : 5206-5216）。2 つのフラグメントは共通の 3 Kb 配列を共有していることから（図 6 7 参照）、これらは、重複する配列の間の相同組換えの後、隣接する 4 3 kb のトランスジーンとしてゲノミック D N A の中に潜在的に組込まれる。

20

かかる組換え事象は、重複する D N A フラグメントの微量注入の時点で頻繁に発生することが立証されてきた（Pieper et al. (1992), Nucleic Acids Res. 20 : 1259-1264）。同時注入された D N A は同様に接合体内に同時組込みされる

30

傾向をもち、個々にクローニングされたフラグメント内に含まれた配列は、その後 B 細胞の発達中 D N A 再配置により連結されることになる。表 8 は、トランスジェニック系統のうち少なくとも 2 つからのトランスジーンインサートが機能的であることを示す。4 つのトランスジーンコーディングを受けた V セグメントの各々及び 5 J セグメントの各々を取込んだ V J 連結の例が、この 3 6 クローンの組の中に表わされている。

40

【数 2 0 4】

(205)

表 8

line	V κ 65.5	V κ 65.8	V κ 65.15	V κ 65.3	J κ 1	J κ 2	J κ 3	J κ 4	J κ 5
14436	0	11	4	3	14	1	0	2	1
14437	1	3	7	7	5	2	1	7	3

10

上記の表はK C o 4トランスジェニックマウスにおけるヒト軽鎖V及びJセグメントの使用を示す。この表は、示されたヒトカッパー配列を含有する、2つのトランスジェニック系に由来するc D N Aから増幅されたP C Rクローンの数を示す。w個々のK C o 4トランスジェニックマウス（マウス# 8 4 9 0、3mo、雄性K C o 4系4 4 3 7；マウス# 8 8 6 7、2. 5mo.、雌性、K C o d系4 4 3 6）から単離された脾臓R N Aを用いてc D N Aを合成した。C k特異的オリゴヌクレオチド5・TAG AAG GAA TTC AGC AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA 3'、並びに2つのV k特異的オリゴヌクレオチド5' AGC TTC TCG AGCTCC TGC TGC TCT GTT TCC CAG GTG CC3' 及び5' CAG CTT CTC GAG CTC CTG CTA CTC TGG CTC (C,A)CA GAT ACC 3' の1：3混合物を用いてP C Rによりc D N Aを増幅した。このP C R生成物をX h o I及びE c o R Iにより消化し、そしてプラスミドベクター中にクローニングした。各動物からの無作為にとり上げた18個のクローンにつき、ジデオキシチェンターミネーション法により部分ヌクレオチド配列を決定した。各クローンの配列を未組換え（unrearranged）トランスジーンのジャームライン配列と比較した。

20

30

23の軽鎖ミニ遺伝子座陽性及び18の重鎖陽性マウスが、注射した胚から発達した。機能的マウス重鎖及びκ軽鎖遺伝子座が無い状態でヒト重鎖及びκ軽鎖を含むマウスを得るため、内因性マウス重鎖（系j H D）及びκ軽鎖遺伝子座（系J C K D）の中にターゲティングされた突然変異を含むマウスを用いて、これらのマウス及びその後代を繁殖させた。これらのマウスにおいて、あったとしても、マウスの軽鎖の寄与のみがマウスλ遺伝子座からのものである。

40

表7は、体細胞突然変異がトランスジェニックマウスのトランスジーンコーディングを受けたヒト重鎖写しの可変領域の中で発生することを示している。H C

【数 2 0 5】

(206)

2トランスジェニックマウスからの23のcDNAクローンを部分的に配列決定して可変領域内の生殖細胞系統コーディングされていないヌクレオチドの頻度を決定した。データには各クローンからのVセグメントコドン17～94の配列のみが含まれており、N領域は含まれていない。RNAは、マウス5250の脾臓及びリンパ節から分離した（HC2系統2550半接合、JHD同型接合）、記述されているとわり（参考）一本鎖cDNAを合成し、 γ 写しをPCRで増幅した。増幅したcDNAをプラスミドベクターにクローニングし、ジデオキシ読み終り方法により23の無作為にとり上げたクローンを部分的に配列法定した。PCR導入されたヌクレオチド変更の頻度は、恒常領域成配列から<0.2%として見積られる。

10

20

表7

表7：HC2トランスジェニックマウス内のヒト γ 写しの可変領域は、生殖細胞系統コーディングされていないヌクレオチドを含む

VHセグメント	クローン数	生殖細胞系統 コーディング されていない ヌクレオチド の数	生殖細胞系統 コーディング されていない ヌクレオチド の頻度 (%)
V251	0		
V56P1	10	100	2.1
V51P1	1	5	2.0
VH4.21	3	0	0.0

30

フローサイトメトリー

40

我々は、FACScanフロー血球計算器及びLYSISIIソフトウェア（Becton Dickinson, San Jose, CA）を用いて染色した細胞を分析した。以下の試薬を用いて脾細胞を染色した；ヨウ化プロビシウム（分子プローブ、Eugene, OR）、フィコエリトリン接合された α -ヒトIg κ （クローンHP6062；Caltag, S.San Francisco, CA）、フィコエリトリン接合された α -マウスIg κ （ク

【数 2 0 6】

(207)

ローンX36; Becton Dickinson, San Jose, CA)、FITC接合された α -マウスIg λ (クローンR26-46; Pharmingen, San Diego, CA)、FITC接合された α -マウスIg μ (クローンR6-602; Pharmingen, San Diego, CA)、FITC接合された α -ヒトIg μ (クローンG20-127; Pharmingen, San Diego, CA)、及びCyクロム接合された抗マウスB220 (

10

クローンRA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA)。

ヒトIgトランスジーンの発現

図83は、JHD及びJCKDの両方の突然変異について同型接合であるKCo4及びHC2マウスからの脾細胞のフロー血球計算法による分析を示す。ヒト配列HC2トランスジーンはJHD突然変異バックグラウンド内でのB細胞の発達を救助し、脾臓内のB220⁺細胞の相対的数を野生型動物の約半分まで回復させた。これらのB細胞はトランスジーンコーディングを受けた重鎖を用いた細胞表面免疫グロブリンレセプタを発現した。ヒトKCo4トランスジーンは同様に機能的であり、無傷の内因性 λ 軽鎖遺伝子座をうまく競合した。重鎖及び軽鎖ヒトトランスジーンを両方共含む(2重トランスジェニック)JHD/JCKD同型接合突然変異体マウスの中のB脾細胞のほぼ95%が、完全にヒト細胞表面IgM κ を発現した。

20

30

血清Igレベルを以下のとおりELISAによって決定した：ヒト μ ：マウスMab α ヒトIgM (クローンCH6、結合部位、Birmingham, UK)でコーティングされベルオキシダーゼ接合されたウサキ α ヒトIgM (fc) (cat# 309-035-095, Jackson Immuno Research, West Grove, PA)で発達させられたマイクロタイターウエル。ヒト γ 4：マウスMab α ヒトIgG1 (クローンHP6069, Calbiochem, La Jolla, CA)でコーティングされ、ベルオキシダーゼ接合されたヤギ α ヒトIgG (fc) (cat# 109-036-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA)で発達させられたマイクロタイターウエル。

40

ヒト κ ：マウスMab α ヒトIg κ (cat# 0173, AMAC, Inc, Ig κ (cat# A7164, Sigma Chem. Co., St Louis, MO)でコーティングされ

【数 2 0 7】

(208)

マイクロタイターウエル。マウス γ : ヤギ α マウス IgG (cat # 115-006-071, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) でコーティングされたマイクロタイターウエル。マウス λ : ラット MA b α マウス Ig λ (cat # 02171D, Pharmingen, San Diego, CA) でコーティングされ、ペルオ

10

キシダーゼ接合されたウサギ α マウス IgM (fc) (cat # 309-035-095, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) で発達させられたマイクロタイターウエル。結合したペルオキシダーゼを、過酸化水素及び 2, 2'-アジノービス-1,3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸、Sigma ChemCo., St. Louis, MO) を用いたインキュベーションにより検出する。反応産物を、415nmでの吸収により測定する。

20

2重トランスジェニックマウスは、血清中で完全にヒトの抗体をも発現する。図84は、いくつかの異なるトランスジェニック創立者動物から誘導された重及びカッパ軽鎖失活について同型接合である18の個々の2重トランスジェニックマウスに関する免疫グロブリンタンパク質の測定された血清レベルを示す。我々は、検出可能なレベルのヒト μ γ 1 及び κ を発見した。我々は以上で、発現されたヒト γ 1 がトランスジーン μ 及び γ 1 スイッチ領域の間のゲノミック組換えによる真正なクラススイッチの結果として得られるということを示した。その上、我々は、トランスジーン内邪のクラススイッチが重鎖可変領域の体細胞突然変異により達成されることを発見した。

30

ヒト免疫グロブリンに加えて、我々は血清内のマウス γ 及び λ をも発見した。内因性遺伝子座が完全に無傷であることからマウス λ タンパク質の存在が予想される。我々は他の箇所でも、マウス γ 発現が、内因性重鎖遺伝子座内へのトランスジーンVDJセグメントのトランススイッチ組換えの結果であるということを示した。当初野生型重鎖対立遺伝子及び再配置されたVDJトランスジーンについて立証されていたこのトランススイッチ現象 (Durdik et al.(1989), Proc.Natl .Acad.Sci.USA 86:2346-2350; Gerstein et al.(1990), 細胞63:537-548) は、下流重鎖恒常領域及びそのそれぞれのスイッチ要素がなおも無傷であることから、突然変異体JHDバックグラウンド内で起こる。

40

【数 2 0 8】

(209)

2重トランスジェニックマウス内のヒト Ig M κ の血清濃度は約 0.1 mg/ml であり、動物間又は系統間での偏差はほとんど無い。しかしながら、ヒト γ 1、

マウス γ 及びマウス λ レベルは 0.1 ~ 1.0 マイクログラム/ml の範囲に及んでいる。個々の動物間で見られた γ レベルの変動は、 γ が誘発可能な恒常領域であるという事実の結果である可能性がある。発現はおそらく、動物の健康、抗原に対する露呈そして場合によっては MHC タイプといった要因により左右されられると思われる。マウス λ 血清レベルは、個々のトランスジェニック系統と相関すると思われる唯一のパラメータである。

1 回の組込みあたりのトランスジーンのコピー数が最も少ない (約 1 ~ 2 コピー) KC o 4 系統 4 4 3 6 マウスは、最高の内因性 λ レベルを有し、一方 KC o 4 系統の 4 4 3 7 マウス (組込み一回あたり ~ 1.0 コピー) は最低の λ レベルを有する。これは、 κ トランスジーンに続いて内因性 λ が再配置し、血清 λ レベルが選択されずその代りに前駆体 B 細胞プールの相対的サイズを反映しているような 1 つのモデルと一貫性をもつ。多数の軽鎖インサートを含むトランスジーン遺伝子座は、1 つ以上の V ~ J への組換え事象を受ける機会を有する可能性があり、そのうちの 1 つが機能的なものとなる確率は増大する。かくして、高いコピー系統は、より小さい潜在的 λ 細胞プールを有することになる。

ヒト CD 4 及び Ig E での免疫化

免疫応答に参加するトランスジェニック B 細胞の能力をテストするために、我々はヒトタンパク質抗原で 2 重トランスジェニックマウスを免疫化し、ELISA により抗原特異的免疫グロブリンの血清レベルを測定した。腹腔内注入により完全フロイントアジュバント内のポリスチレン溶球 (cat # 08226, Polysciences Inc., Warrington, PA) に共役結合された 50 μ g (7) 組換え型 s CD 4 (cat, # 013101, American Bio-Technologies Inc., Cambridge, MA) でマウスを免疫化した。マウスの各々は、内因性 μ 及び κ 遺伝子座の分断について同型接合であり、ヒト重鎖トランスジーン HC 2 系統 2 5 0 0 及びヒト κ 軽鎖トランスジーン KC o 4 系統 4 4 3 7 について半接合である。

方法

【数 2 0 9】

(210)

血清試料を、組換え型 s C D 4 でコーティングされたマイクロタイターウエル

へと希釈させた。ベルオキシダーゼ接合されたウサギ α ヒト I g M (f c) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) 又はベルオキシダーゼ接合されたヤギの抗ヒト I g κ (Sigma, St.Louis, MO) を用いて、ヒト抗体を検出した。

10

図 8 5 は、組換えヒト可溶性 C D 4 で免疫化されたトランスジェニックマウスの一次応答を示す。

免疫化された 4 匹の動物は全て、抗原特異的ヒト I g M 応答を 1 週間目に示す。C D 4 特異的血清抗体は、ヒト μ 重鎖及びヒト κ 軽鎖の両方を含んでいる。

H C 2 トランスジーンの二次応答に参加する能力を評価するため、我々は、抗原を反復的に注入することによりトランスジェニックマウスを高度免疫し、誘発された抗体の重鎖アイソタイプを監視した。ヒト重鎖トランスジーン H C 2 及びヒト κ 軽鎖トランスジーン K C o 4 について同型接合であるマウスを、0 日目に完全フロイントアジュバント内の 2 5 μ g のヒト I g E κ (The Binding Site, Birmingham, UK) で免疫化した。その後、約一週間おきで不完全フロイントアジュバント中で I g E κ をマウスに注入した。血清試料を 1 対 1 0 の割合で希釈させ、ヒト I g E, λ でコーティングされたプレート上で抗原特異的 E L I S A を行なった。

20

30

図 8 6 は、これらの動物からの免疫応答の標準的時間的経過を示している。我々は、完全フロイントアジュバント中のヒト I g E を 2 重トランスジェニックマウスに注入し、その後週一回、不完全フロイントアジュバント内の I g E で追加免疫した。初期ヒト抗体応答は I g M κ であり、その後抗原特異的ヒト I g G κ が現われた。これらのマウス内の誘発された血清抗体は、ヒト I g M 又は B S A に対していかなる反応反応性も示さなかった。ヒト I g G の経時的発達、(原文抜け) 。

40

我々は、重鎖トランスジーンのインビトロでのクラススイッチを受ける能力もテストした：同じ重鎖構成体 (H C 2、系統 2 5 5 0) について半接合である脾臓 B 細胞が精製された形の動物は、L P S 及び組換え型マウス I L - 4 の存在下

【数 2 1 0】

(211)

で、ヒト I g M からヒト I g G 1 へとスイッチする。しかしながら、インビトロスイッチは、L P S 及び組換え型マウス I L - 2 又は L P S 独自の存在下で起こらなかった。

2 重トランスジェニック／2 重ノックアウト (0 0 1 1) マウスの脾臓、リンパ節、腹膜及び骨髓内にヒト I g M 発現細胞が見られる。腹腔には正常な数の B 細胞が含まれているものの、骨髓及び脾臓中のトランスジェニック B 細胞の絶対数は、正常値の約 1 0 ～ 5 0 % である。トランスジーン依存性の B 細胞の発達における遅延の結果として、減少がもたらされる可能性がある。2 重トランスジェニック／2 重ノックアウト (0 0 1 1) マウスは同様に、これらのマウスにおけるヒト μ 、 γ 1 及び κ のレベルが有意なものである状態で、血清中で完全にヒトの抗体を発現する。発現されたヒト γ 1 は、トランスジーン μ と γ 1 のスイッチ領域の間でのゲノミック組換えによる真正のクラススイッチの結果として得られる。

さらに、トランスジーン内のクラススイッチには、トランスジーンによりコードされた重鎖可変領域の体細胞突然変異が伴う。ヒト免疫グロブリンに加えて、これらのマウス内にはマウス μ 及びマウス λ が見られる。マウス μ 発現は、トランスジーン V D J 遺伝子が内因性マウス重鎖遺伝子座内に組込まれるトランススイッチ組換えの結果であると思われる。もともと野生型重鎖対立遺伝子及び再配置された V D J トランスジーンについて文献内に見られたトランススイッチは、マウス下流重鎖恒常領域及びそのそれぞれのスイッチ要素がなおも無傷であることから、我々の $J_H^{-/-}$ バックグラウンド内で起こる。

トランスジェニック B 細胞の免疫応答に参加する能力を実証するため、我々は、ヒトタンパク質抗原で 0 0 1 1 マウスを免疫化し、抗原特異的免疫グロブリンの血清レベルを監視した。初期ヒト抗体応答は I g M であり、その後抗原特異的ヒト I g G の発現が続く (図 8 6 及び図 8 8)。ヒト I g G 抗体が現われる前の遅延は、抗原に対する二次応答とクラススイッチの間の結びつきと一貫性をもつ

ヒト C D 4 で免疫化されたトランスジェニックマウスにおいては、C D 4 抗原に対するヒト I g G の反応性は、 $2 \times 10^{-2} \sim 1.6 \times 10^{-4}$ の範囲の血清濃

【数 2 1 1】

(212)

度で検出可能であった。

抗ヒト体CD4ハイブリドーマの同定

ヒト重鎖トランスジーンHC2及びヒトκ軽鎖トランスジーンKCα4について同型接合のトランスジェニックマウスを、0日目に完全フロイントアジュバント内の組換え体ヒトCD4 20 μgで免疫化した。その後、約一週間の間隔において不完全フロイントアジュバント中のCD4をマウスに注入した。図88は、トランスジェニックマウスの血清中のヒトCD4に対するヒト抗体応答を示す。血清試料を1:50で希釈し、ヒトCD4でコーティングされたプレート上で抗原特異性ELISAを行なった。各々のラインは、個々の試料の測定値を表わす。黒丸はIgMを、白丸はIgGを表わす。

我々は同様に、ヒトCD4免疫化に応答したマウスの一匹からハイブリドーマ細胞系統も分離した。クローニングされたハイブリドーマのうちの5つは、組換え型ヒトCD4に結合しその他の糖タンパク質抗原のパネルと交叉反応しない（ELISAにより測定される通り）ヒトIgGκ（ヒトγ1/ヒトκ）抗体を分泌する。IgGκハイブリドーマ、4E4.2及び2C5.1の2つにより分泌されたモノクローナル抗体に対する免疫化用ヒトCD4抗原の結びつき及び解離の速度を測定した。実験的に誘導された結合定数（Ka）はそれぞれ抗体4E4.2及び2C5.1について約 $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 及び 8×10^{-1} であった。これらのKaの値、その他の者による臨床的試験に万いて用いられてきた（Chenet al. (1993) *Int. Immunol.* 6.647）マウスIgG抗ヒトCD4抗体の範囲内に入る。

ライン#749d（0012；HC1-26+；；JHD++，JKD++；KC2-1610++）のマウスを0日目、13日目、20日目、28日目、33日目及び47日目にヒトCD4で免疫化すると、ヒトκ及びヒトμ又はγから成る抗ヒトCD4抗体を産生した。

28日目に、血清中にヒトμ及びヒトκが見られた。47日目までに、ヒトCD4に対する血清応答には、ヒトμ及びヒトγよらびにヒトκが含まれていた。50日目に、P3×63-Ag8.653マウス骨髓腫細胞で脾細胞を融合させ、培養した。700のウエルのうち44（6.3%）がヒトγ及び／又はκ抗ヒ

10

20

30

40

【数 2 1 2】

(213)

トCD4モノクローナル抗体を含んでいた。これらのウエルのうち3つは、ヒト γ 抗CD4モノクローナル抗体を含んでいることが確認されたが、ヒト κ 鎖（おそらくはマウス λ を発現する）が欠如していた。9つの1次ウエルは、完全にヒトのIgM κ 抗-CD4モノクローナル抗体を含んでおり、さらなる特徴づけのため選択された。完全にヒトのIgM κ 抗-CD4モノクローナル抗体を発現する1つのこのようなハイブリドーマを2C11-8と呼称した。

10

限界希釈法により一次ハイブリドーマをクローニングし、CD4に対して反応性あるヒト μ 及び κ モノクローナル抗体の分泌について評価した。9つのハイブリドーマのうち5つがCD4ELISAにおいて陽性にとどまった。ヒトCD4についてのこれらのヒトIgM κ モノクローナル抗体の特異性は、オバルブミン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、キーホールリンペットヘマシアニン及びガン胎児性抗原を含むその他の抗原との反応性が欠如していることによって実証された。

20

これらのモノクローナル抗体が細胞表面上のCD4（例えば未変性CD4）を認識できるか否かを見極めるため、CD4+T細胞系統、SupT1との反応性について、これら5つのクローンの上清もテストした。5つのヒトIgM κ モノクローナル抗体のうち4つがこれらのCD4+細胞と反応した。これらのIgM κ モノクローナル抗体の特異性をさらに確実にするため、これらの抗体で、分離されたばかりのヒト末梢血リンパ球（PBL）を染色した。5つの一次ハイブリッドのうちの4つから誘導されたクローンからの上清はCD4+リンパ球のみに結合し、CD8+リンパ球には結合しなかった（図87）。

30

図87は、ヒトPBLとのIgM κ 抗CD4モノクローナル抗体の反応性を示す。ヒトPBLを各クローンからの上清又はアイソタイプ整合された負の対照モ

40

ノクローナル抗体及びそれに続くPEに接合されたマウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体（上段）又はFITCに接合されたマウス抗ヒトCD8Ab（下段）のいずれかを用いてインキュベートした。それぞれFITC又はPEに接合されたマウス抗ヒト μ で、あらゆる結合したヒトIgM κ を検出した。クローンの1つ、2C11-8（右側）及び対照IgM κ （左側）についての代表的結果が示さ

【数 2 1 3】

(214)

れている。予想通り、負の対照 I g M κ は T 細胞と反応せず、ヤギ抗ヒト μ は、おそらくはヒト B 細胞である約 10 % の P B L と反応した。

I g M κ 抗- C D 4 モノクローナル抗体の産生のレベルの高さ及び優れた成長は、発達のためのクローナルハイブリドーマ細胞を選択する上で重要な要因である。ハイブリドーマの 1 つ 2 C 1 1 - 8 からのデータは、最高 5 pg / 細胞 / 日が産生されうること示している (図 8 9)。第 2 のクローンの場合にも類似の結果が見られた。一般に観察されるように、細胞が定常期成長に入るにつれて産生は劇的に増大する。図 8 9 は、細胞の成長及び小規模培養におけるヒト I g M κ 抗- C D 4 モノクローナル抗体の分泌を示す。総量 2 ml の甲に 1 ml あたり 2×10^5 細胞の割合で重複培養を播種した。その後 4 日間 24 時間毎に、培養を収穫した。生存可能な細胞を計数することにより細胞の成長を決定し、全ヒト μ (上の図版) について E L I S A により I g M κ 産生の量を計った。I g M κ の量を細胞の数で除することにより、一日細胞一個あたりの産生を計算した (下の図版)。

図 9 0 は、ヒト I g M κ 抗- C D 4 モノクローナル抗体のエピトープ地図作製を示す。I g M κ 抗- C D 4 モノクローナル抗体 2 C 1 1 - 8 (H B 1 1 6 6 8) により認識されるエピトープを位置設定するため競合結合フロー皿球計算実験を使用した。これらの研究のためには、C D 4 上の重複しないユニークエピトープに結合するマウス抗 C D 4 モノクローナル抗体 L e u 3 a 及び R P A - T 4 を用いた。減少する濃度の R P A - T 4 又は L e u - 3 a のいずれかで予備インキュベートされその後ひきつづき 2 C 1 1 - 8 で染色させた C D 4 $\div$ 細胞の P E 蛍光を、P E 接合されたヤギ抗ヒト I g M で検出した。L e u 3 a によるヒト I g M κ 抗- C D 4 モノクローナル抗体 2 C 1 1 - 8 の結合については濃度依存性

競合が存在したが、R P A - T 4 によるその結合については存在しなかった。かくして、2 C 1 1 - 8 により認識されたエピトープは、モノクローナル抗体 L e u 3 a により認識されたエピトープと類似していたか又は同一であったが、R P A - T 4 により認識されたものとは全く異なっていた。

要約すると、我々は、未変性ヒト C D 4 と特異的に反応しヒト P B L S を C D

10

20

30

40

【数 2 1 4】

(215)

4⁺ 及び CD4⁻ 副次集団へと弁別するのに用いることのできるヒト IgM κ モノクローナル抗体を分泌する複数のハイブリドーマクローンを産生した。これらの抗体のうち少なくとも1つはモノクローナル抗体 Leu3aにより構成されたエピトープに又はその近くに結合する。このエピトープに対して誘導されたモノクローナル抗体は、混合型の白血球応答を阻害するものであることが示されてきた (Engleman et al., J. Eyp. Med (1981) 153:193)。モノクローナル抗体 Leu3aのキメラバージョンは、菌状患肉腫を患う患者においていくつかの臨床的効力を示した (Knox et al. (1991) Blood 77:20)。

10

われわれは、3つの異なるハイブリドーマ細胞系 (2C11.8、2C5.1および 4E4.2) からcDNA クローンを分離し、これらの細胞系のそれぞれにおいて、発現された免疫グロブリン遺伝子のいくつかの部分的ヌクレオチド配列を決定した。

20

配列の分析のために、全 RNAを約 5x10⁶ ハイブリドーマ細胞から分離した。オリゴdT での逆転写をプライミング (Priming) することにより、sscDNA を合成した。このsscDNA の部分を、二重 PCR 反応において使用した。この反応は、(i) HC1 または HC2トランスジーン内に含まれる重鎖可変骨格領域および定常ヒトガンマ配列に特異的な単一の下流オリゴ、または(ii) KC2 または KCo4 トランスジーン内に含まれる軽鎖可変骨格領域および定常ヒトカッパ配列に特異的な単一の下流オリゴについて特異性を有するオリゴのプールによってプライムされた。これらのPCR反応からの産物を適当な制限酵素によって消化し、ゲル精製し、そしてpNN03 ベクターへと独立にクローン化した。DNAを分離し、手動のジデオキシおよび／または自動の蛍光配列化反

30

応をdsDNAに行った。

3つのハイブリドーマ2C11.8、2C5.1および4E4.2の特性を以下の表11に示す。

40

表11 ハイブリドーマにおけるヒト可変領域使用

サブクローン	特異性	イソタイプ	Vh	Dh	Jh	Vk	Jk
2C11.8	nCD4	IgM κ	251	nd.	nd.	nd.	nd.
2C5.1	rCD4	IgG κ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4
4E4.2	rCD4	IgG κ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4

【数 2 1 5】

(216)

nd.= 測定せず

2つのIgGkハイブリドーマ 2C5.1および 4E4.2からの発現された重鎖および軽鎖配列のヌクレオチド配列分析は、それらが、同じプロゲニターB細胞から誘導された同胞クローンであることを示す。正確なヌクレオチド配列は予定運命体細胞突然変異によって異なるが、2つのクローンからの重鎖および軽鎖V(D)J接合は一致する。重鎖 VDJ結合配列は、

10

VH251					N			DHQ52				JH5			
TAT	TAC	TGT	GCG	AG	(g	gct	cc)	A	ACT	GGG	GA	C	TGG	TTC	GAC
Y	Y	C	A	R	A	P		T	G	D		W	F	D	

である。軽鎖 VJ接合は、

20

Vk65.15						N		Jk4		
TAT	AAT	AGT	TAC	CCT	CC	(t)		ACT	TTC	GGC
Y	N	S	Y	P	P			T	F	G

以下の非生殖細胞系エンコードコドン进行同定した（予定運命体細胞突然変異）

:

2CS.1	重鎖	AGC→AGG	S28R	(置換)
	軽鎖	CCG→ACG	P119T	(置換)
4E4.2	重鎖	AGC→AGG	S28R	(置換)
		CTG→CTA	L80L	(沈黙)
	軽鎖	GAG→GAC	E41D	(置換)
		AGG→AAG	R61K	(置換)
		CCG→ACG	P119T	(置換)

30

40

これらの2つのガンマハイブリドーマは、規定された量の体細胞突然変異を受けたB細胞から誘導されたと推断する。このデータは、HC2トランスジェニック動物がVH5-51 (aka VH251) Vセグメントを使用することを示す。VH4-34、VH1-69 および VH3-30.3がこれらのマウスによって発現されることを、われわれは予め示した。これらの結果の組合せは、HC2 トランスジェニックマウスは、ヒトVH

【数 2 1 6】

(217)

遺伝子をエンコードしたトランスジーンの4つすべてを発現することを証明する。

ヒト免疫グロブリン発現B細胞は、発生を経験し、かつマウス免疫系の状況において抗原に応答することを我々は推断した。抗原応答性は、免疫グロブリン重鎖イソタイプスイッチおよび可変領域体細胞突然変異に至る。われわれはまた、慣用のハイブリドーマ技術を、これらのマウスからモノクローナルヒト配列抗体を得るために使用することができることを証明した。したがって、これらのトランスジェニックマウスは、ヒトターゲット抗原に対するヒト抗体の供給源を意味する。

10

実施例37

この実施例は、不活化された内因性重鎖および κ 鎖遺伝子座についてホモ接合であり、かつ多重下流ヒトC_H遺伝子にイソタイプスイッチ可能なトランスジーンを収容する、トランスジェニックマウスの生

20

成を記載する。この実施例はまた、重複する相同の配列結合（図92をみよ）を含む多重DNAフラグメント（断片）の共マイクロ注入によって、大きいトラスジーン（例えば160kb）を集めるためのクローニング方法を証明し、これは、インビトロで集められるべきフラグメントの組の、例えばマイクロ注入されたES細胞またはそのクローン子孫において、遠位端での複数の相同領域の相同の組換えによって、2より多い重複するフラグメント（断片）からの大きなトランスジーンの構成を許す。この実施例はまた、とりわけ、トランスジェニック動物から分離されたリンパ球が、例えばIL-4 およびLPS を用いて、インビトロでのイソタイプスイッチを受けるために導入され得ることを示す。

30

5つの異なるプラスミドクローンの組を、プラスミド挿入部が分離され得、実質的にベクター配列がないように；かつ挿入部は共におよそ150kbの長さに及ぶ重複配列の単一の重なった組を形成するように構成した。この組は、ヒトV、D、J、 μ 、 γ 3および γ 1コード配列ならびにマウス重鎖3' エンハンサー配列を含む。5つのクローンは、5' から3' 順で、pH3V4D、pC0R1xa、p11-14、pP1-570 および pHP-3aである（図92）。このクローンの組を生成するために、いくつかの

40

【数 2 1 7】

(218)

異なるクローニングベクターを使用した。ベクターのいくつかは、大きいトランスジーンを構築する目的で特異的に設計された。これらのベクター(pGP1a、pGP1b、pGP1c、pGP1d、pGP1f、pGP2a、およびpGP2b)は、pUCベクターより細胞当たりのコピー数が低く保持された pBR322に基づくプラスミドである (ヤニッシュペロンら、(1985年) Gene33:103-119)。これらのベクターはまた、ポリリンカーとプラスミドβラクターゼ遺伝子の3' 末端との間にtrpA転写終止シグナルを含む。ポリリンカーは、まれな切断 (rare cutting) 酵素 NotI についての制限部位によって隣接され; かくして胎児マイクロ注入に先立つベクター配列から挿入部を分離することを見込む。NotI 部位の内部で、ポリリンカーは、どちらの末端でも、ユニークXhoI およびSalI 部位を含む。pGP1 ベクターは、テイラーら、(1992年)、NucleicAcids Res.

10

20

23:6287に記載されている。pGP2 ベクターを生成するために、pGP1fをまずAlwNI で消化し、合成オリゴヌクレオチドo-236 および o-237 (o-236、5'-ggc gcg cct tgg cct aag agg cca-3'; o-237、5'-cct ctt agg cca agg cgc gcc tgg-3') でライゲート(ligate)した。得られたプラスミドは pGP2a と呼ばれる。プラスミド pGP2a は次に、KpnI および EcoRI で消化され、オリゴヌクレオチド o-288 および o-289 (o-288、5'-aat tca gta tcg atg tgg tac-3'; o-289、5'-cac atc gat act g-3') でライゲートされて、pGP2b を作った (図 93A および 93B)。

30

pGP プラスミドを用いてトランスジーンを構成するための一般的スキームは、図 94 (パス A および B) に略述されている。要素DNAフラグメントのすべてがまず、pGP ベクターにおいて同じ5' から3' 定位方向で独立してクローン化される。挿入部 NotI、XhoI および SalI部位は、オリゴヌクレオチド突然変異生成によって、または可能なら、部分的消化、ポリメラーゼ充填および平滑末端連結反応によって壊される。これは、各挿入部の5' および3' 末端に、ポリリンカー誘導 XhoIおよび SalI 部位のみを残す。個々の挿入部は次に、1つのクローンからXhoI/salI フラグメントを分離し、かつ分離されたフラグメントを別のクローンの5' XhoI または 3' SalI 部位に挿入する方法によって、段階的に結合されること

40

【数 2 1 8】

(219)

ができる(図 94、パス A)。形質転換体を次に、1以上の挿入部フラグメントを用いてフィルターハイブリッド化によってスクリーニングして、集められたクローンを得る。XhoI/SalI結合はいずれの酵素によっても裂くことができないので、得られた産物は、ユニーク 5' XhoI および 3' SalI部位を維持し、構成の段階で使用され得る。このスキームの変形は、ベクターpGP2a およびpGP2bを用いて行われる(図 94、パス B)。これらのプラスミドは、アンピシリン抵抗性遺伝子と複製のプラスミド源との間に SfiI部位を含む。SfiI およびXhoI またはSalIを用いての切断によって、薬剤抵抗性配列または複製の起源と共に、挿入部が分離され得る。合成の各段階

10

において、1つのSfiI/XhoI フラグメントが、1つの SfiI/SalIフラグメントにライゲートされる。このスキームには、3つの利点がある：(i)アンピシリンの存在中で、両方のフラグメントからの配列がプラスミドの複製に必要とされるので、バックグラウンド形質転換体が減らされる；(ii)ライゲーションは単一の5' から3' 定位方向でのみ起こり得る；および(iii) SfiI 末端が自己和合性でなく、SalIまたはXhoI と和合性でなく、かくして非生産的ライゲーションのレベルを下げる。このスキームの不都合は、挿入部SfiI 部位が NotI、XhoIおよびSalI と同様に除去されなければならないことである。これらの培地複写ベクターは、よく使われる pUC 誘導クローニングベクターより改良されている。これらのベクターの能力を比較して大きい DNA 挿入部を維持するために、ヒト JH/C μ 領域を含む 43kb のXhoI フラグメントを、pSP72 (プロメガ、マジソン、WI)、pUC19 (BRL、グラント アイランド、ニューヨーク) およびpGP1f の SalI 部位にライゲートした。形質転換体クローンをニトロセルロースに移し、挿入部を含むクローンを放射能標識したプローブでのハイブリッド化により選択した。正のクローンを 3mlの培地で一晩育て、DNA を分離した：得られたDNA のEcoRI消化は、すべてのpSP72およびpUC19 誘導クローンが挿入部を欠失した(図95)が；18のpGP1f誘導クローンのうちの12が完全な挿入部を含んでいたことを示す。両方の定位方向が、これらの 12 のクローンにおいて示される。

20

30

40

HC07 トランスジーンを生成するために使用された5つのクローン (pH3V4D、p

【数 2 1 9】

(220)

COR1xa、p11-14、pP1-570 および pH3V4D) の構成および分離を以下に略述する。

pH3V4D

生殖細胞系配置重鎖可変遺伝子セグメントを、VH1 およびVH3 クラスについての合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて、ファージ1ゲノムDNA ライブラリーから分離した。VH1 クラスプローブは、o-49であった：

5'-gtt aaa gaggat ttt att cac ccc tgt gtc ctc tcc aca ggtgtc -3'

VH3 クラスプローブは、o-184 であった：

5'-gtt tgc agg tgt cca gtg t(c,g) aggt gca gct g(g,t)t ggagtc (t,c)(g,c) g -3'

正にハイブリッド化されたクローンを分離し、部分的に制限地図を作成し、サブクローン化し、そして部分的に配列した。ヌクレオチド配列から、o-49プローブで分離されたVH1 クローンの1つが、hv1263遺伝子の公開された配列に含まれたものと一致するアミノ酸配列を含む、VII 遺伝子セグメント、49.8 をエンコードすることが決定された(チェンら、(1989年)、Arthritis Rheum. 32 : 72)。o-184プローブで分離されたVH3遺伝子のうちの3つ、184.3、184.14、および184.17は、VII 遺伝子 DP-50、DP-54 および DP-45 について公開されたものに含まれるものに一致するアミノ酸配列をエンコードする配列を含んでいた(トムリンソンら、(1992年)、J.Mol.Biol. 227 : 776)。これら4つのVH遺伝子は、pH3V4Dプラスミドを構築するために使用された。

184.3 遺伝子は、3kbのBamHI エフラグメント内に含まれるべきことが見出された。このフラグメントは、ポリリンカーの XhoI 部位が遺伝子の5'であり、かつ SalI 部位が3'であるように、プラスミドベクターpGP1f へとサブクローン化された。得られたプラスミドはp184.3.36f と呼ばれる。184.14遺伝子は、4.8kb の HindIIIフラグメント内に含まれるべきことが見出された。このフラグメントは、遺伝子がさらに、遺伝子のゲノムXhoI 部位 0.7kb上流でおよびポリリンカーが誘導した遺伝子のsalI 部位3'でのXhoI/salI 消化によって3.5kbのフラグメントとして分離され得るような定位方向で、プラスミドベクターpUC19

【数 2 2 0】

(221)

へとサブクローン化された。得られたプラスミドはp184.14.1 と呼ばれる。184.17遺伝子は、5.7kbの HindIII

フラグメント内に含まれるべきことが見出された。このフラグメントは、ポリリンカー誘導XhoI およびSalI 部位がそれぞれ、遺伝子の5' および3' であるような定位方向で、プラスミドベクターpSP72 (プロメガ、マジソン、WI) へとサブクローン化された。このプラスミドの挿入部は、XhoI での部分消化、クレノーフラグメント充填、および再ライゲーションによって除去された遺伝子の3' 末端に XhoI 部位を含む。得られたプラスミドは p184.17SK と呼ばれる。49.8 遺伝子は、6.3kb の XbaI フラグメント内に含まれるべきことが見出された。このフラグメントは、ポリリンカー誘導 XhoI および ClaI 部位がそれぞれ、遺伝子の5' および3' であるような定位方向で、プラスミドベクターpNN03 へとサブクローン化されて、プラスミドpVH49.8 を作った (テイラーら、(1994年)、International Immunol., 6 : 579)。pVH49.8のXhoI/ClaI 挿入部を次に、pGP1f へとサブクローン化して、プラスミドp49.8fを作り、これは、ユニークXhoI および SalI 部位をそれぞれ49.8遺伝子の5' および3' 末端に含む。

p184.14.1 の 3.5kb の XhoI/SalI フラグメントを、p184.3.36fのXhoI 部位にクローン化して、プラスミド pRMVH1 を生じ、これは184.14および 184.3 遺伝子の両方を同じ定位方向に含む。このプラスミドを XhoI で消化し、そして p184.17SKの 5.7kbの XhoI/SalIフラグメントを挿入してプラスミドpRMVH2 を作り、これは 5' から 3' へ、3つのVH 遺伝子、184.17、184.14および 184.3 を、すべて同じ定位方向で含む。プラスミドpRMVH2 を次にXhoI で切断し、そしてp49.8fの 6.3kbの XhoI/SalI 挿入部を挿入してプラスミドpH3VH4を作り、これは 5' から3' へ、4つのVH 遺伝子、49.8、184.17、184.14および184.3 を、すべて同じ定位方向で含む。

ヒトD領域クローンpDH1 の10.6kb の XhoI/EcoRV 挿入部 (前述した ; 例えば実施例12において) を、XhoI/EcoRV 消化 pGPe プラスミドベクターへとクローン化して新しいプラスミドpDH1eを作った。次にこのプラスミドをEcoRVで消化し、そしてSalI 部位を含む合成

【数 2 2 1】

(222)

リンカーフラグメント (5' - ccg gtc gac ccg -3') でライゲートした。得られたプラスミド、pDH1es は、XhoI 部位は5' 末端にあり、SalI 部位は3' 末端にあるように、XhoI およびSalI で除去され得る挿入部内にヒトD1 クラスターのほとんどを含む。この挿入部を分離し、pH3VH4 のSalI 部位にクローン化してプラスミド pH3VH4D を作り、これは4つの生殖細胞系配置ヒトVH 遺伝子セグメントおよび8つの生殖細胞系配置ヒトDセグメントを含み、すべてが同じ 5' から 3' への定位方向にある。このクローンの挿入部は、NotI での消化によって、ベクター配列を実質的に含まず、分離されることができる。

10

pCOR1xa

9つのヒトDセグメント、6つのヒトJセグメント、J μ イントロン重鎖エンハンサー、 μ スwitch領域およびC μ コードエクソンを含む32kb の XhoI 挿入部を含むプラスミドpCUR1 (前記) を、XhoI で部分的に消化し、クレノー処理し、そして合成SalI リンカーライゲートして、新しいプラスミドpCOR1xa を生じ、これはユニークXhoI 部位を 5' 末端に有し、ユニークSalI 部位を 3' 末端に有する。pCOR1およびpCOR1xa の両方が 0.6kbのラット重鎖 3' エンハンサーフラグメントを 3' 末端に含み、これは、プラスミドがXhoI または XhoI/salIの代わりにNotI で消化されるなら、挿入部に含まれる。

20

pP1-570

30

ファージ P1 ライブラリー (Genome systems Inc., セントルイス、ミズーリ州) を、次のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて PCRによってスクリーニングした：

5' - tca caa gcc cag caa cac caa g -3'

5' - aaa agc cag aag acc ctc tcc ctg -3'

このプライマー対を、ヒト γ 遺伝子鋳型を有する216 bp PCR 産物を生成するようにデザインした。同定されたP1 クローンの1つはヒト γ 3および γ 1遺伝子の両方を 80kb の挿入部内に含むことが見出され

40

た。このクローンの挿入部 (図9 6に示す) は、NotIおよび SalIでの消化によって、ベクター配列を実質的に含まず、分離されることができる。

【数 2 2 2】

(223)

p11-14

ヒト $\gamma 3/\gamma 1$ クローン P1-570 の制限酵素地図化は、挿入部の5'末端に近い14kbのBamHエフラグメントを示した。この14kbのフラグメントを、ポリリンカー誘導SalI 部位が挿入部の5'末端に隣接するように、プラスミドベクターpGP1fへサブクローン化した。得られたプラスミドはpB14 と呼ばれる。別に、プラスミドクローン pJ1NA (チョイら、(1993年) *Nature Genetics* 4: 117) から誘導された、ヒト μ 遺伝子の3'末端およびヒト δ 遺伝子の5'末端をカバーする11kbのNdeI/SpeI ゲノムDNA フラグメントを、合成オリゴヌクレオチドアダプターを用いて、pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA) の SalI 部位へサブクローン化した。次に、得られたSalI挿入部を分離し、pJ1NA からの μ フラグメントの5'から3'への相対的定位方向がP1-570からの γ フラグメントと同じであるように、pB14のSalI 部位へクローン化した。得られたクローンはp11-14と呼ばれる。このクローンの挿入部は、NotI での消化によって、ベクター配列を実質的に含まず、分離することができる。

10

20

pHP-3a

マウス重鎖3' エンハンサー (ダリアバツハら、(1991年) *Eur. J. Immunol.* 21: 1499; リーベルソンら、(1991年) *Nucleic acids Res.* 19: 933) をbalb/cマウスゲノムDNA ファージライブラリーからクローン化した。プローブを得るために、全balb/cマウス胸腺DNAを、以下の2つのオリゴヌクレオチドを用いたPCR増幅のための鋳型として使用した：

30

cck76: 5' - caa tag ggg tca tgg acc c -3'

cck77: 5' - tca ttc tgt gca gag ttg gc -3'

得られた220bpの増幅産物を、TAクローニング (商標) キット (Invitrogen、サンジエゴ、CA) を用いてクローン化し、挿入部を、マウスファージライブラリーをスクリーニングするために使用した。得られたファージクローンの1つからの正にハイブリッド化された5.8kbの HindIIIエフラグメントをpGP1fへサブクローン化した。このサブクローンの挿入部、pHC3' ENfa の定位方向は、ポリリンカーXhoI部位が挿入部の5'末端に隣接し、SalI 部位が3'末端に隣接するよ

40

【数 2 2 3】

(224)

うな方向である。このHindII フラグメントの部分のヌクレオチド配列分析は、それが 3' 重鎖エンハンサーを含むことを確認した。pHC3' ENfaの挿入部はエンハンサー配列のコアで、ECoR1 部位の約 1.9kb 上流にXhoI 部位を含む。この XhoI 部位は、部分消化、クレノー充填および再ライゲーションによって除去されて、クローン pH3' Efxを 作り、これはユニークXhoI および SalI 部位をそれぞれ、挿入部の 5' および3' 末端に含む。

10

ヒト $\gamma 3/\gamma 1$ クローンP1-570の 3' 末端を次のようにしてサブクローン化した：P1-570 DNA をNotI で消化し、クレノー処理し、次いでXhoI で消化し；そして13kb の末端フラグメントを分離し、プラスミドベクターpGP2b (BamHI で消化し、クレノー処理し、次いでXhoIで消化されている) ヘライゲートした。得られたプラスミド、pPX-3は挿入部の5' 末端でポリリンカーXhoI 部位に隣接するポリリンカーNotI 部位を失った；しかし、XhoI 部位はそのまま残り、挿入部はNotIおよびXhoI または、SalI およびXhoI での消化により分離され得る。pH3' EfxのXhoI/SalI 挿入部を含む3' エンハンサーを分離し、そしてpPX-3 の3' SalI 部位ヘライゲートして、プラスミドpHP-3a を作った。pHP-3a挿入部内にフラグメントを含むエンハンサーは、P1-570 クローンの3' 末端として逆の定位方向でライゲートされる。したがって、pHP-3a は内部SalI 部位を含み、挿入部はXhoI およびNotIの消化によって分離される。これはエンハンサー要素であるので、5

20

30

から 3' 方向は一般に機能のために重要でない。

HCo7.

前核ミクロ注入用のHCo7 DNA 混合物を調製するために、上記した5つのプラスミドのそれぞれからのDNA を制限酵素で消化し、アガロースゲル上で分離した。クローンpH3V4D を NotI で切断し；pCOR1xaをNotI で切断し；p11-14をNotI で切断し；pP1-570 をNotI およびSalI で切断し；そしてpHP-3a をNotI およびXhoI で切断した。DNA 挿入部を電気溶出し(electroeluted)、さらにEtBr なしの平衡CsCl 勾配上で精製した。挿入部を注入緩衝液中へ透析し、次のように混合した：50マイクロリットルのpH3V4D 挿入部@20.4ng/マイクロリットル；50

40

【数 2 2 4】

(225)

マイクロリットルのpC0R1xa 挿入部@20.8ng/マイクロリットル；50マイクロリットルのp11-14 挿入部@15.6ng/マイクロリットル；300マイクロリットルのpP1-570 挿入部@8.8ng/マイクロリットル；60マイクロリットルのpHP-3a 挿入部@10.8ng/マイクロリットル；および1.49 ml の注入緩衝液。

HCo7トランスジェニック動物

10

HCo7 DNA 混合物を、1/2 日令の胚の前核にマイクロ注入し、ホーガンらによって記載されている（マウスの胚の操作、コールド スプリング ハーバー ラボラトリーズ、コールド スプリング ハーバー NY）ように、この胚を偽妊娠したメスの卵管に移した。

テールチップDNA (tail tip DNA) を、マイクロ注入した胚から発生した202 の動物から分離した。ヒト μ およびDH 配列を含むプローブを用いた、このDNA のサザンブロット分析は、HCo7 トランスジーンの少なくとも一部を組込んだ22の創立動物を示した。図 97は、HCo7 DNAをマイクロ注入された胚から発生した6 匹のG0 動物の血清におけるヒト μ およびヒト γ 1 の発現の分析を示す。ヒト免疫グロブリン蛋白質の血清濃度を、ロンバーグら、（1994年）nature 368：865 に記載さ

20

れたELISA によって測定した。これら 6 匹のマウスのうちの 4 匹は、サザンブロット分析によるトランスジーンを組み込みの証拠を示し、これらのマウスのうちの3 匹は、それらの血清中にヒト μ およびヒト γ 1 蛋白質の両方を発現した。ヒト免疫グロブリン蛋白質を発現しなかった1 匹のトランスジェニックマウスが、サザンブロット分析により、トランスジーンの数のコピーのみを含むことが決定され、全部のトランスジーンが組込まれなかったこと、またはこのマウスが遺伝モザイクであったことの可能性がある。創立HCo7 マウスのうちの2 匹、#11952および#11959は、ヒト κ ミニ遺伝子座（または小遺伝子座）(KCo4 系4436)トランスジェニックマウス（このマウスはまた、内因性重鎖および κ 軽鎖遺伝子座（ロンバーグら、前述）の分裂についてホモ接合であった）を用いて繁殖されて、2つの内因性遺伝子座分裂についてホモ接合であり、かつ2つの誘導されたヒトミニ遺伝子座、KCo4 およびHCo7 についてヘミ接合であるマウスを生じた。こ

30

40

【数 2 2 5】

(226)

これらのいわゆる二重トランスジェニック／二重欠失マウスのうちの5匹を、ヒト IgM、ヒトIgG1 およびヒトIgG3 の発現について分析した。対照として、3匹の HC2/KCo4 二重トランスジェニック／二重欠失マウスを分析に含めた。この実験を図 98に示す。この図におけるELISA データを、ロンバーグら（前述）におけるように（ただしヒトIgG3 の欠失を除く）集め、コーティング抗体はヒト IgG3 (cat. #08041、ファーマーミンゲン、ラ ジョラ、CA) に対して向けられた特異的m Ab であり；IgG3 アッセイの他の詳細はIgG1 について公開されたものと同一であつた。HC2/KCo4 マウスがヒトIgM およびヒトIgG1 のみを発現し、一方HC2/KCo4 マウスはまた、これら2つのイソタイプのほかにヒトIgG3 を発現する。HCo7 マウスにおけるヒト γ 3および χ 1の発現はまた、トランスジェニックマウスの脾臓から分離されたRNA から合成されたcDNA のPCR 増幅によって検出された。図 99は、トランスジェニックマウスの3つの異なる系統からの脾臓cDNA を用いて合成されたPCR 増幅産物を示す：系2550 はHC2 トランスジェニック系であり、

10

20

系11959 および11952 はHCo7 トランスジェニック系である。単一の残された(st randed)cDNA を、テイラーら、(1992年)、NucleicAcidRes.20:6287 に記載されたように、脾臓RNA から合成した。このcDNAを次に、以下の2つのオリゴヌクレオチドを用いて、PCR増幅した：

30

o-382 : 5' - gtc cag aat tcg gt(c,g,t) cag ctg gtg (c,g)agtct gg -3'

o-383 : 5' -ggg ttc tcg agg aag agg aag act qac ggt cc-3'

このプライマーの対は、ヒト γ 転写のヒンジ領域に及ぶPCR 産物の合成を支配する。ヒト γ 1および γ 3ヒンジ領域の構造の違いの故に、PCR 増幅は、これら2つの転写の間を区別する。ヒト γ 1 鋳型は752 bpPCR 産物の合成を支配し、一方、ヒト γ 3は893 bp 産物の合成を支配する。ヒト γ 1 鋳型のみが、HC2 系2550 およびHCo7 系11959 脾臓で検出可能であるが、 γ 1 および γ 3 転写の両方が、HCo7 系11952脾臓で検出可能である。このアッセイの非定量性の故に、かつ個々の動物の間の γ 3 発現における違い（図98においてELISAによって示した）の故に、図99におけるHCo7系11959脾臓に γ 3 を観察することの不能は、 γ 3 がこ

40

【数 2 2 6】

(227)

の系に発現されないことを示さない。HCo7/KCo4マウスから分離された脾臓細胞はまた、LPS およびIL4 での刺激によりイン ビトロで、IgG1 およびIgG3 の両方を発現するように誘導され得る。この実験は、図 100に示される。7 周令のオスの HCo7/KCo4二重トランスジェニック／二重欠失マウス（# 12496；系11959／4436）から分離された脾臓細胞を、単独で、および種々のサイトカインと結合して、胸腺非依存 B 細胞分裂促進因子、LPS に応答しての免疫グロブリン分泌について試験した。脾臓細胞は、T 細胞による細胞障害性除去によって、B 細胞が豊富にされた。B-豊富にされた細胞を、24のウェルプレート中で、RPMI-1640 中10 %FCS 2 ml中、 2×10^6 細胞／ウェルで、培養した。LPS を、10 マイクログラム／ml で、すべてのウェルに添加した。IL-2 を50 単位／ml で添加し、IL-4 を15 ng／mlで添加し、IL-6を15 ng／ml で添加し、 γ IFN を100 単位／ml

10

20

で添加した。培養物を37℃、5%CO₂ で10日間インキュベートした後、上清をELISA によつてヒトIgG1 およびIgG3 について分析した。ELISAのためのすべての試薬は、ジャクソン イム ノロジカルズ（ウエスト グローブ、PA）からのポリクローナル抗血清であったが、ただし、キャプチャー抗ヒト IgMは、ザバインディングサイト（バーミンガム、UK）からのモノクローナル抗体であった。

30

実施例38

この実施例は、ヒト κ 軽鎖ミニ遺伝子座および、多重ヒトV κ セグメントを含む YAC クローンの共注入（co-injection）による、機能的ヒト軽鎖Vセグメントのマウスゲノムへの好結果の導入を説明する。この実施例は、YAC に含まれるV κ セグメント遺伝子が、得られたマウスにおいてヒト κ 鎖の発現されたレパートリーに寄与することを示す。この実施例は、トランスジーンエンコードヒト免疫グロブリン蛋白質のレパートリー拡張のための方法を証明し、詳細には、ヒト κ 鎖可変領域レパートリーが、結合されていないポリヌクレオチド（ヒト免疫グロブリン可変領域セグメントを含む）の共導入(co-introduction) によってどのようにして拡張され得るかを示す。

40

V κ 含有酵母人工染色体クローンDNAおよび κ 軽鎖ミニ遺伝子座クローン DNA の共注入による機能的ヒト軽鎖 v セグメントの導入

【数 2 2 7】

(228)

I. クローン化されたヒトV_K 遺伝子セグメントを含む酵母株の分析

全ゲノムDNAを、ヒトV_K 遺伝子座 (ICRF YAC ライブラリー デザイネーション 4x17E1)の部分を含む、450kb の酵母人工染色体(YAC)を含む酵母株から分離した。このYACクローンに含まれるV_K 遺伝子セグメントのいくつかの同一性を決定するために、一連のV_K ファミリー特異的PCR 増幅反応のための基質として、ゲノムDNA を使用した。4組の増幅において、4つの異なる5' プライマーを、単一のコンセンサス3' プライマーとそれぞれ対にした。この5' プライマーは：o-270

10

(5'-gac atc cag ctg acc cag tct cc-3'), o-271 (5'-gat attcag ctg act cag tct cc-3'), o-272 (5'-gaa att cag ctg acgcag tct cc-3') および o-273 (5'-gaa acg cag ctg acg cag tctcc-3')であった。これらのプライマーは、マークスら (Eur. J.Immunol. 1991.21, 985) により、V_K ファミリー特異的プライマーとして使用される。3' プライマー、o-274 (5'-gca agc ttc tgt cccaga cc c act gcc act gaa cc-3') は、FR3 のためのコンセンサス配列に基づく。4組のプライマーのそれぞれが、YACクローン4x17E1を含む酵母ゲノムDNAからの期待された0.2kb のフラグメントの増幅を支配した。次に、異なる4組の増幅産物はゲル精製され、プラスミドベクターpSP72 (プロメガ) の PvuII/HindIII 部位へクローン化された。11 の得られたクローンのヌクレオチド配列分析は、7つのはっきりとしたV遺伝子を同定した。これらの結果を以下の表14に示す。

20

30

表14. YAC 4x17E1 上でのヒトV_K セグメントの同定

PCR プライマー	クローン#	同定された遺伝子	V _K ファミリー
o-270/o-274	1	L22*	I
o-270/o-274	4	L22*	I
o-270/o-274	7	O2*または O12	I
o-271/o-274	11	A10*	VI
o-271/o-274	15	A10*	VI
o-272/o-274	20	A4*または A20	I
o-272/o-274	21	A11*	III
o-272/o-274	22	A11*	III
o-272/o-274	23	A11*	III
o-272/o-274	25	O4*または O14	I
o-273/o-274	36	L16*または L2	III

40

* 遺伝子セグメントは、遠位のV_K クラスター内で地図を描いた (コックスら、E

【数 2 2 8】

(229)

ur. J. Immunol. 1994. 24, 827; パージェントら、Eur. J. Immunol. 1991. 21, 1829; スカブル及びザツチュー、Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1993. 374, 1001)。

YAC クローンから増幅された配列のすべてが、遠位のクラスターに地図を描かれる V_{κ} 遺伝子に明白に割り当てられるか、またはそれらは遠位の遺伝子配列と適合し得る。配列はどれも近位の V 遺伝子に明白に割り当てられないので、YAC 4x17E1 は遠位の V_{κ} 領域からの配列を含むことが明白である。さらに、同定された配列のうちの1つ、クローン# 7 (Vk02) は、遠位のクラスターの J 近位末端の近くに地図を描き、一方、別の配列、クローン# 1 および 4 (VkL22) は、遠位のクラスターの J 遠位末端の近くに、300kb を超えて上流に地図を描く。かくして、450kb の YAC クローン 4x17E1 が、対応するヒトゲノムフラグメントの非欠失コピーを示すなら、それは、少なくとも32の異なる V_{κ} セグメントを含む。しかし、これらのうちのいくつかは、非機能偽遺伝子である。

10

20

2. YAC 誘導 V_{κ} 遺伝子セグメントを含むトランスジェニックマウスの生成

胚の前核へのマイクロ注入のための精製 YAC DNA を得るために、全ゲノム DNA をアガロースゲル上で、サイズ分画 (size fraction) をした。YAC 4x17E1 を含む酵母細胞を、溶解に先立ってアガロース中に埋め込み、そして YAC DNA を、標準パルスフィールドゲル電気泳動 (製品明細: CHEF DR-II 電気泳動細胞、BIO-RAD ラボラトリーズ、リッチモンド CA) によって、酵母染色体 DNA から分離した。6つの独立のパルスフィールドゲルを、エチジウムブロマイドで染色し、YAC クローン含有ゲル物質をゲルの残部から切り離した。次に、YAC 含有ゲル片を、三角形のゲルトレイ中の新たな (低い融点の) アガロースゲルキャスト (cast) 中に埋め込んだ。得られた三角形のゲルを、標準ゲル緩衝液の他に 2 モル/リットルの酢酸ナトリウムを含む細いゲルを用いて、頂点で広げた (図 101)。次に、ゲルを、標準ゲル緩衝液に浸した電気泳動チャンバー中に置いた。電流が細い高塩ゲル片にだけ流れることができるように、Y 字形のゲル型を緩衝液の表面より上に上げ

30

40

た。プレキシグラスブロックを細い高塩ゲル片の上に置いて、NaOAc がゲル緩衝

【数 2 2 9】

(230)

液へと拡散するのを防いだ。次に、YAC DNAを、元のゲル片から細い高塩ブロックへと電気泳動した。低塩ゲルから高塩ゲルへの移動の時点で、ゲルを通ったYAC DNAの移動を効果的に停止させる抵抗低下がある。これは、三角形のゲルの頂点でYAC DNAの濃縮に至る。電気泳動および染色に続いて、濃縮したYAC DNAをDNAの残部から切り離し、アガロースをGELase (EPICENTRE Technologies) で消化した。次に、塩化セシウムをYAC DNA含有液体に添加して、1.68g/mlの密度を得た。この溶液を37,000 rpmで36時間遠心分離して、汚染物質からDNAを分離した。得られた密度勾配の0.5ml画分を分離し、ピークDNA含有画分を、5 mM トリス (pH7.4) / 5 mM NaCl / 0.1M EDTAに対して透析した。透析後、YAC DNAの得られた0.65ml溶液の濃度は、2 マイクログラム/mlであることがわかった。このDNAを、プラスミドpKC1BおよびpKV4からの精製DNA挿入部 (ロンバーグラ、1994年、ネイチャー 368、856) と、20:1:1 (マイクログラムYAC4x17E1:KC1B:KV4) で混合した。得られた2 マイクログラム/ml溶液を、半日マウス胚の前核に注入し、95の生き残ったマイクロ注入した胚を、偽妊娠したメスの卵管に移した。マイクロ注入した胚から発生した、39のマウスが生まれた。これらマウスのうちの2匹、#9269および#9272を、トランスジェニック系を確立するために使用した。この系は、KCo5-9269およびKCo5-9272と称する。

系KCo5-9269およびKCo5-9272マウスからのゲノムDNAのサザンブロット分析を行って、YAC 4x17E1誘導V_k セグメントがそれらのゲノム中に組込まれたかどうかを決定した。遠位のV_k クラスターの中央からのV_k 遺伝子セグメント、VkA10 (アセッション#:x12683; ストロービンガーら、1988、Biol. chem. Hoppe-Seyler 369、601-607) を、サザンブロット分析のためのプローブとして選択した。クローン化したプローブを得るために、VkA10遺伝子をまずPCRによって増幅した。2つのオリゴヌクレオチド、o-337(5'-cgg tta aca tag

ccc tgg gac gag ac -3')およびo-338 (5'-ggg tta act cattgc ctc caa agc ac -3')を、YAC 4x17E1から1 kbフラグメントを増幅するためのプライマーとして使用した。増幅産物をゲル精製し、HincIIで消化し、そしてpUC18へクローン化して、プラスミドp17E1A10を得た。次に、このプラスミドの挿入部を、KCo5

【数 2 3 0】

(231)

—9269およびKCo5—9272 DNAのサザンブロットを調べるために使用した。ブロットは、KCo5—9272マウスDNAのみにいて予想される制限フラグメントへのプローブのハイブリッド化を示した。このことは、VkA10遺伝子が、KCo5—9272マウスのゲノムに組込まれ、KCo5—9269マウスには組込まれなかったことを示す。次に、系KCo5—9272マウスをHC2-2550/JHD/JKDマウスと交配して、内因性重鎖および κ 軽鎖遺伝子座の分断についてホモ接合であり、かつHC₂およびKCo5トランスジーンについてヘミまたはホモ接合であるマウスを得た。内因性重鎖および κ 軽鎖遺伝子座の分断についてホモ接合で、ヒト重鎖および κ 軽鎖トランスジーンについてヘミまたはホモ接合である動物は、二重トランスジェニック／二重欠失マウスと称する。

10

cDNAクローニング実験を行って、YAC誘導Vk₁遺伝子のいずれかがKCo5—9272系マウスに発現されるかどうかを決定した。二重トランスジェニック／二重欠失マウス#12648 (HC2-2550/KCo5—9272/JHD/JKD)を犠牲にし、全RNAを脾臓から分離した。1つのよられたcDNAをRNAから合成し、オリゴヌクレオチドo-270、o-271、o-272およびo-273を5'プライマーとして用い、かつCk特異的オリゴヌクレオチド、o-186 (5'-tag aag gaa ttc agc agg cac acaaca gag gca gtt cca -3')を3'プライマーとして用いて、4つの別々のPCR反応における鋳型として使用した。増幅産物をpCRIITAクローニングベクター (インビトロゲン)へクローン化した。19の挿入部のヌクレオチド配列を決定した。配列分析の結果を以下の表15にまとめる。

20

30

表15.マウス系KCo5-9272に発現されたヒトVk₁遺伝子の同定

40

【数 2 3 1】

(232)

PRC プライマー	クローン#	同定された遺伝子	V _k ファミリー
o-270/o-186	1	L15*	I
o-270/o-186	3	L18**	I
o-270/o-186	7	L24**	I
o-270/o-186	9	L15*	I
o-270/o-186	10	L15*	I
o-271/o-186	15	A10**	VI
o-271/o-186	17	A10**	VI
o-271/o-186	18	A10**	VI
o-271/o-186	19	A10**	VI
o-271/o-186	21	A10**	VI
o-272/o-186	101	A27*	III
o-272/o-186	102	L15*	I
o-272/o-186	103	A27*	III
o-272/o-186	104	A27*	III
o-273/o-186	35	A27*	III
o-273/o-186	38	A27*	III
o-273/o-186	44	A27*	III
o-273/o-186	45	A27*	III
o-273/o-186	48	A27*	III

* トランスジーンプラスミド配列によってエンコードされたV_k 遺伝子

** YAC誘導トランスジーン配列によって唯一にエンコードされたV_k 遺伝子

これらの結果は、少なくとも3のYAC誘導V_k 遺伝子セグメント、A10、L18およびL24が、KCo5-9272系マウスの発現されたヒトレパートリーに寄与することを示す。

骨髄および脾臓での種々のB220⁺ 細胞集団のサイズにおけるこの増加したレパートリーの効果を決定するために、KCo5-9272系マウスにおいて、フローサイトメトリー分析を行った。この分析の一部が、図102および図103に示されている。2匹の二重トランスジェニック/二重欠失マウス（一匹はKCo5トランスジーンを含み、一匹はKCo4トランスジーンを含む）をこの実験において比較した。これら2つのトランスジーンは、同じ結合および定常領域配列、ならびに同じイントロンおよび3' エンハンサー配列を共にする。それらはまた、4つの

異なるクローン化されたV遺伝子セグメントを共にするが；KCo5トランスジーンは、KCo4トランスジーンには含まれない、YAC 4x17E1から誘導された追加のVセグメントを含む。細胞を、マウス#13534（HC2-2550/KCo5-9272/JHD/JKD）およびマウス#13449（HC2-2550/KCo4-4436/JHD/JKD）から分離した。骨髄細胞を、

【数 2 3 2】

(233)

抗マウスB220（カルタグ、サウス サンフランシスコ、CA）、抗マウスCD43（ファーマーミンゲン、ラ ジョラ、CA）および抗ヒトIgM（ジャクソン イムノロジック、ウエストグローブ、PA）で染色した。脾臓細胞を抗マウスB220および抗ヒトIgMで染色した。

図102は、KCo5およびKCo4マウスの骨髄における B 細胞および B 細胞前駆体集団の比較を示す。骨髄中の B 細胞の画分 ($B220^{+}$ 、 IgM^{+}) は、KCo5マウスにおいて (6%) は、KCo4マウスにおける (2%) より、約 3 倍高い。プレ B 細胞集団 ($B220^{+}$ 、 $CD43^{-}$ 、 IgM^{-}) がまた、KCo5マウスにおいて、より高い (9%、KCo4の 4% に比べて)。さらに、プロ B 区画 ($B220^{+}$ 、 $CD43^{+}$) がこれらのマウスにおいて上昇している (KCo5では 11%、KCo4では 5%)。これら 3 つの区画のそれぞれは、KCo5マウスでは、KCo4マウスにおけるより大きい、そのレベルはなお、野生型マウスにおいて見出された約半分である。骨髄 B 細胞の数の増加はたぶん、増加したレパトリリーサイズの直接の結果である。これらのマウスのより大きい第 1 のレパトリリーは、内因性の抗原についていくらかの最小の閾値親和性を膜 Ig に提供し得る。次に、レセプターライゲーションが反応性 Ig を発現するそれら B 細胞の増殖を見込むことができた。しかしながら、プレ B およびプロ B 細胞は軽鎖遺伝子を発現しないので、KCo5マウスにおけるこれら 2 つの区画の増加したサイズについての説明は直ぐに明らかではない。増加した B 細胞の数は、これらの集団の拡張に、より助けとなる骨髄環境をつくるので、B 細胞前駆体区画は KCo5マウスにおいてより大きくあり得る。この効果は、分泌された因子によって、または B 細胞と前駆細胞との間の細胞-細胞接触によって直接媒介されることができたか、または、さもな

ければ前駆細胞の生存または増殖を阻害するであろう因子または細胞の滴定によって、間接的に媒介されることができた。

図103は、KCo5およびKCo4マウスにおける脾臓 B 細胞 ($B220^{+}$ 、 IgM^{+}) 集団の比較を示す。これらの 2 匹のマウスの間の主な違いは、 $B220^{+}$ B 細胞集団の相対的サイズである (KCo5マウスでは 6%、かつ KCo4マウスでは 13%)。 $B220^{+}$ 細胞は、 $B220^{+}$ B 細胞より大きく、それらのより高い画分は、1 つの

【数 2 3 3】

(234)

軽鎖を発現する。これらは、通常、野生型マウスでの末梢B細胞集団を支配する、いわゆるB1細胞集団の特性である。KCo4マウスの脾臓は、B220^{陽性}細胞の変則的に高い画分を含み、一方、KCo5マウスは、これらの細胞のより普通の分布を有する。しかしながら、両方の系統が、脾臓のB細胞の通常の数⁶の約1/2～1/3を含む。

10

実施例39

この実施例は、高親和性の抗原特異的なヒトIgGモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマクローンを分離するために、実施例38のKCo5トランスジェニックマウスの好結果の使用を説明する。

免疫化

二重欠失／二重トランスジェニックマウス (KCo5-9272/HC2-2550/JHD/JKD、#12657) を、8週間1週おきに、腹腔内に、 $4 \sim 10 \times 10^6$ 照射T4D3細胞、ヒトCD4を発現するネズミT細胞系 (ドクタージェインパーンズ、スタンフォード大学) で免疫し、次いで2週間後、不完全フロイントアジュバント (シグマ) 中の20 mgの可溶性組換えヒトCD4 (sCD4；イントラセル) を腹腔内に1回注入した。このマウスを、20 mgのsCD4と融合するに先立って3日間に1度、静脈内に追加した。

20

ハイブリドーマ融合

免疫したマウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液を、1/6の数のP3X63-Ag8.653非分泌マウスミエローマ細胞(ATCC CRL 1580)

30

に、50%PEG (シグマ) を用いて融合した。平底マイクロ滴定プレートに、約 2×10^6 で、細胞を移植し、次いで、20%胎児クローン血清(HyClone)、18%「653」ならし培地、5%オリジエン(Origen)(IGEN)、4 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50単位/ml mMペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml mMゲンタマイシンおよび1 xHAT (シグマ；融合の24時間後にHATを添加した) を含有する選択培地中で2週間インキュベートした。2週間後、HATをHTで置き換えた培地中で細胞を培養した。広範囲のハイブリドーマの成長または培地が使われたことが観察されたら、

40

【数 2 3 4】

(235)

ウェルをELISAおよびフローサイトメトリーでスクリーニングした。

ELISAによるハイブリドーマのスクリーニング

抗CD4 mAbを検出するために、マイクロ滴定プレート（ファルコン）を、PBS中 2.5mg/mlのsCD4 50mlで、4℃にて1晩被覆し、PBS中5%のチキン血清100 mLで1時間室温にてブロックし、次いで室温にて1時間インキュベートした。インキュベーションはそれぞれ、ハイブリドーマからの上清の希釈1:4、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP0)結合ヤギ抗ヒトIgG（ジャクソン）のF(ab')₂フラグメントの1,1000希釈または、HRP0結合ヤギ抗ヒトIgK抗体（シグマ）プラス1%通常のマウス血清の1:250希釈で行い、および最後に、0.0024% H₂O₂を有する、0.1Mのクエン酸リン酸緩衝液(pH4)中0.22mg/ml ABTSを用いて行った。最初以外はすべてのインキュベーション間で、プレートを洗浄緩衝液(PBS中0.5% Tween-20)で3~6回洗浄した。希釈液（5%チキン血清を有する洗浄緩衝液）を使用して、上清およびHRP0コンジュゲートを希釈した。二重波長を用いて吸光度を測定した（490nmの参照波長でのODを415nmでのODから引いた）。

マウスλ含有mAbを検出するために、以下のこと以外は、上記のELISAプロトコールを使用した。マイクロ滴定プレートのウェルを、100mlの1) 1.25mg/mlヤギ抗マウスλ（ピラス）、2) 1.25mg/ml

ヤギ抗ヒトFcγ（ジャクソン）、または3) 2.5mg/ml sCD4(ABT)で被覆した。検出段階について、ビオチンに結合した1:5000ヤギ抗マウスλ(SBA)100mlを使用し、次いでHRP0（ジャクソン）に結合した1:1000ストレプトアビジン100mlを使用した。ネズミおよびヒトのmAb標準を、示された濃度でを使用した。関連のない抗原に対する交差反応性をさがすために、ウェルを、CEA（クリスタルケム）、KLH（カルバイオケム）、HSA（シグマ）、BSA（シグマ）またはOVA（シグマ；すべて2mg/ml、ただしCEAは2.5mg/mlであった）で被覆した。

適当な抗体を滴定し、正の対照（ヒトIgM抗CEA（ジェンファーム）、ウサギ抗KLH（シグマ）、ヒツジ抗HSA（ザ バインディングサイト）、ヒツジ抗BSA（ザ バインディングサイト）およびヒツジ抗OVA（ザ バインディングサイト））として使用した。どの結合された抗体も、ヤギ抗ヒトIgM、ロバ抗ウサギIgGまたはロバ

【数 2 3 5】

(236)

抗ヒツジIgG(すべて、1:1000に希釈され、ジャクソンから得た)のHRP0コンジュゲートで検出された。さもないと、標準ELISAプロトコールは、以下のようであった。

フローサイトメトリーアッセイによるハイブリドーマスクリーニング

自生種細胞の表面CD4と反応性のmAbをさらにスクリーニングするために、 5×10^5 のSupT1細胞(ATCC CRL 1942)を、融合プレートからの使われた上清の1:2希釈を用いて氷上で30分間インキュベートし、冷染色緩衝液(0.1%BSA、0.02%NaN₃、PBS中)で2回洗浄し、FITC結合ヤギ抗ヒトFcγ(FITC-GaHuIgG;ジャクソン)のF(ab')₂フラグメント1.5mg/mlで15分間インキュベートし、1回洗浄し、そしてFACScan(ベクトン・ディッキンソン)で直ちに分析した。

10

CD4反応性ハイブリドーマ

20

上記したELISAおよびフローサイトメトリー技術を用いて、自生種ヒトCD4と特異的に反応するヒトIgGを分泌する12のハイブリドーマクローンを同定した。これら12のクローンのうちの10をさらにサブクローン化した。これらサブクローンのうちの8つをヒトIgG1k分泌ハイブリドーマとして同定した。他の2つは、マウスλ軽鎖を発現

した。8つの完全なヒトクローンのためのペアレントウェルは、1E11、2E4、4D1、6C1、6G5、7G2、10C5および1G1であった。完全なヒトIgGkサブクローンのうちの3つ(4D1.4、6G5.1および10C5.6)の結合のフローサイトメトリーアッセイを図104に示す。

30

図104は、IgGk抗nCD4モノクローナル抗体のnCD4+SupT1細胞への結合を示す。ログフェーズグロース培養(log phase growth culture)からの細胞を洗浄し、モノクローナル抗体なし、4E4.2(負の対照として)、キメラLeu3a(正の対照として)または10のヒトIgG抗nCD4モノクローナル抗体のうちの1つで染色した。どの結合したモノクローナル抗体も、FITC結合ヤギ抗ヒトFcγで検出された。10のモノクローナル抗体のすべてがSupT1細胞に結合した。ただし、そのうちの3つしか、データがここに示されていない。

40

クローン化されたハイブリドーマによるヒト抗体分泌の分析

【数 2 3 6】

(237)

mAbの成長および分泌レベルを比べるために、サブクローンを複製培養物（ 2×10^5 細胞/mlの初期密度で、24のウェルプレート中、HT培地中）に入れた。7日間毎日、各サブクローンについての複製培養物の1つを取り、細胞数、細胞生存度（トリパンブルー排除による）および上清中のmAbの量（全ヒト γ について定量的ELISAによる）を測定した。表16は、ハイブリドーマサブクローンのうちの7つによる抗体分泌についてのデータを示す。

10

表16. ヒトIgG抗nCD4モノクローナル抗体についての分泌レベル

サブクローン	pg/細胞	pg/細胞/d
1E11.15	3.9	0.56
1G1.9	11	1.5
4D1.4	1.4	0.91
6C1.10	3.3	0.48
6G5.1	7.8	1.1
7G2.2	4.4	0.63
10C5.6	8.0	1.1

20

★ pg/細胞 = (mAbの最大量) / (生存細胞の最大数)

pg/細胞/d = (pg/細胞) / 7 日

ヒトmAbの精製

個々のハイブリドーマクローンをHTおよびオリジェンなしの培地中で成長させ、FCSを徐々に減らして、最終1リットル培地中で約2～3%までにした。ハイブリドーマの生存度が約30%より下に落ちたら、上清を取った。IgGk mAbを精製するために、使用した上清を遠心分離して細胞を除去し、超音波にて約50～100mlに濃縮し、PBS、pH7.4で1:5に希釈し、そして5mlのプロテインA（ファルマシア）カラムに載せた。カラム体積の3～5倍のPBSで洗浄した後、ヒトIgGk mAbを、0.1HCl、150 mM NaCl、pH2.8で溶出し、そして直ちに1Mトリス塩基で中和した。OD₂₈₀ >0.2の物質を含むカラム画分を集め、PBSに透析した。次に、OD₂₈₀を測定し、1.4の吸収係数(absorbtivitycoefficient)を使用して、ヒトIgGの蛋白質濃度を計算した。流れの中にmAbは検出されず、%回収率は93～100%の範囲であった。3～6 mgの各精製mAbが得られ、純度>90%であった。

30

40

クローン化されたハイブリドーマからのモノクローナル抗体の分析

mAbの結合の特異性を調べるために、ヒトPBMCをフィコール上で分離し、以下

【数 2 3 7】

(238)

のように染色した。染色緩衝液中のヒトPBMC(10^6)を氷上で30分間インキュベートし、別々の反応において、サブクローン化したハイブリドーマの3つ(4D1.4、6G5.1および10C5.6)のそれぞれ

れからの同体積の上清を用いて、またはイソタイプが合った負の対照mAbを用いて行い、2回洗浄し、そして、フィコエリトリン(PE)に結合したマウス抗ヒトCD4mAb(Leu3a;ベクトンディッキンソン)10ml、PEに結合したマウス抗ヒトCD8 mAb(Leu2a;ベクトンディッキンソン)10mlまたはPEに結合したマウス抗ヒトCD19mAb(SJ25-C1;カルタグ)5mlと一緒に1mg/mlのFITC-GaHulIgGを用いて、20分間氷上でインキュベートした。次に、ゲートリンパ球(gated lymphocyte)をFACScanフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン、サンジョゼ、CA)で分析した。3つの抗体すべてが、ヒトPBMCのCD4画分に特異的に結合することが見出された。

これら3つのmAbによって認識されるエピトープの位置を近づけるために、 5×10^5 SupT1細胞を、緩衝液、2.5mg/ml RPA-T4、または染色緩衝液中の2.5mg/ml Leu3aを用いて氷上で20分間、次いで10のヒトIgG mAb(1:2に希釈した上清中)のうちの1つを用いて30分間、そして最後に0.5mg/ml FITC結合ヤギ抗ヒトFc γ を用いてプレインキュベートして、結合したヒトIgGをいずれも検出した。最後の段階の前に2回、その後に1回、細胞を染色緩衝液で洗浄した。このプロッキングアッセイの結果を図105に示す。3つの抗体のどれも、RPA-T4とエピトープを共にしないが、6G5.1および10C5.6は、Leu3aによって認識されたのと同じ(または隣接する)エピトープを認識するようである。

速度および平衡定数の測定

ヒトsCD4(2500~4200RU)を、製品の指示に従って、センサーチップ表面に、アミン基を介して共有結合によって固定した。抗体希釈物を、平衡に到達するまで、抗原結合センサーチップの上を流し、次いで緩衝液のみを流れるようにした。反応、結合および解離の各相について、結合した抗体の画分を時間に対してプロットした。結合曲線の導関数(dR/dt)を計算し、各濃度についての応答に対してプロットした。会合速度定数($k_{\text{会合}}$)を計算するために、それらの得られた

【数 2 3 8】

(239)

線の勾配を、モノクローナル抗体の濃度に対してプロットした。このグラフからの線の勾配が $k_{\text{会合}}$ に対応した。解離速度定数 ($k_{\text{解離}}$) を、時間間隔に対しての応答 (緩衝液の流れ相中) における低下の対数から、計算した。 $k_{\text{会合}}$ を $k_{\text{解離}}$ で除して、 K_a を誘導した。KCo5/Hc2二重トランスジェニック/二重欠失マウスから誘導された5つの異なる精製モノクローナル抗体および、市販の供給源 (ベクトンディッキンソン、サン ジョゼ、CA) から得られた1つの精製抗体について測定した速度および親和性定数データを表17に示す。

表17. ヒトCD4に結合したモノクローナル抗体についての速度および親和性定数

ハイブリドーマ	抗体	供給源	$k_{\text{会合}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{解離}}$ (s^{-1})	K_a (M^{-1})
1E11.15	ヒト IgG1k	HC2/KCo5 トランスジェニック	2.7×10^5	4.6×10^{-5}	5.8×10^9
1G1.9	ヒト IgG1k	HC2/KCo5 トランスジェニック	9.1×10^4	2.2×10^{-5}	4.2×10^9
4D1.4	ヒト IgG1k	HC2/KCo5 トランスジェニック	9.8×10^4	4.2×10^{-5}	2.3×10^9
6G5.1	ヒト IgG1k	HC2/KCo5 トランスジェニック	1.1×10^5	1.0×10^{-5}	1.1×10^{10}
10C5.6	ヒト IgG1k	HC2/KCo5 トランスジェニック	7.4×10^4	1.6×10^{-5}	4.5×10^9
Leu3a	マウス IgG1k	ベクトン ディッキンソン	1.5×10^5	4.2×10^{-6}	3.7×10^{10}

混合リンパ球反応(MLR)

KCo5トランスジェニックマウスから誘導されたヒトモノクローナル抗体10C5.6のインビトロでの効力を、マウス抗体Leu3aと比較するために、MLRアッセイを行った。2人の関連のないドナーからのヒトPBMCをフィコール上で分離し、各ドナーからのCD4+PBLを、製品の指示に従って、CD4カラム (ヒトCD4セレクト、バイオテックス ラボラトリーズ、インク., カナダ) を用いて精製した。両方のドナーか

らのPBMCを、培地 (次のものを含むRPMI 1640: 10%加熱不活化ヒトAB血清(NA BIから)、ヘペス、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン、pen/strep、およびb-メルカプトエタノール(すべて製品の推奨濃度で使用)) 中の100mg/mlマイトマイシン c (アルドリッチ) を用いて、37℃で30分間処理した後、培地で3回洗浄

【数 2 3 9】

(240)

することによって、不活化された刺激物細胞(stimulator cell)を得た。培地で希釈した種々の濃度のmAbまたは培地のみを、滅菌ろ過し、96ウェルの丸底プレートに、トリプル (triplicate) でウェル当たり100μlを加えた。次に、1人のドナーからの 10^5 CD4+PBL (培地中) 50μlおよび別のドナーからの 10^5 マイトマイシンC処理したPBMC (50μlの培地中) を、各ウェルに加えた。mAbのいかなる毒性または分裂促進因子効果についても対照するために、CD4+PBL反応物(responder)のみプラスmAbを有する対照プレートをセットした。刺激物のみの対照および培地バックグラウンド対照をまた含めた。37°C、5 %CO₂ 加湿インキュベータにて7日間の後、各ウェルから上清100μlを除去し、20μlの比色分析試薬 (セルタイター96AQキット、プロメガコーポレーション、マジソン、WI) を加えた。4～6時間発色させ、490nmにてプレートを読んだ。図106に示されたこの実験の結果は、ヒトIgG1k抗体10C5.6は、このアッセイにおいて、ヒトPBMC CD4細胞の機能を妨げることに於いて、少なくともLeu3aと同様に有効であることを示す。

10

20

実施例40

ヒトIgGカッパ抗CD4モノクローナル抗体の結合特性

この実施例は、ヒトCD4で免疫したHC2/KCo5/JHD/JCKDトランスジェニックマウスから得たハイブリドーマクローンから誘導されたヒトIgGkモノクローナル抗体の結合特性を提供する。このモノクローナル抗体は、組換えおよび天然ヒトCD4に対して高い結合力および親和性(avidity and affinity)を有することが示された。

30

ヒトCD4と反応性のヒトIgGカッパモノクローナル抗体(mAb)を分泌する、10の個々のハイブリドーマ細胞系 (1E11、1G2、6G5、10C5、1G1、6C1、2E4、7G2、1F8および4D1) からの細胞を、

40

JHD/JCKD/HC2/KCo5トランスジェニックマウスから誘導した。細胞系を培地で成長させ、抗体蛋白質を上清から分離した (フィッシュワイルドラ、1996年、ネイチャーバイオテクノロジー14、845-851)。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーにより精製した抗体を結合定数を測定するために使用した。結果を表18および19に示す。

【数 2 4 0】

(241)

表18に示された速度および平衡定数は、センサーチップに結合されたヤギ抗ヒトIgG (Fc特異的) を使用し、飽和濃度のmAbを流して、次いで種々の抗原 (rCD4) 濃度で、BIAcore (ファルマシア バイオセンサー) を用いて測定された。これらの定数は、精製したmAbを用いた3つの実験から誘導された。

表18. 親和性および速度定数

10

速度定数 (平均±SD)			
ヒト mAb	$k_{\text{結合}} (M^{-1}S^{-1})$	$k_{\text{解離}} (S^{-1})$	$K_a (M^{-1})$
1E11.15	$1.7 (\pm 0.15) \times 10^5$	$3.5 (\pm 0.09) \times 10^{-3}$	5.0×10^7
6C1.10	$1.8 (\pm 0.44) \times 10^5$	$3.3 (\pm 0.04) \times 10^{-3}$	5.4×10^7
1G1.9	$1.2 (\pm 0.18) \times 10^5$	$9.4 (\pm 0.22) \times 10^{-4}$	1.3×10^8
6G5.1	$9.3 (\pm 1.1) \times 10^4$	$6.9 (\pm 0.36) \times 10^{-4}$	1.4×10^8
10C5.6	$9.4 (\pm 0.98) \times 10^4$	$7.1 (\pm 0.36) \times 10^{-4}$	1.3×10^8
2E4.2	$1.8 (\pm 0.10) \times 10^5$	$2.5 (\pm 0.05) \times 10^{-3}$	7.1×10^7
4D1.4	$2.5 (\pm 0.55) \times 10^5$	$3.4 (\pm 0.15) \times 10^{-3}$	7.3×10^7
7G2.2	$2.4 (\pm 0.31) \times 10^5$	$3.3 (\pm 0.07) \times 10^{-3}$	7.3×10^7
1F8.3	$1.8 (\pm 0.24) \times 10^5$	$4.3 (\pm 0.14) \times 10^{-3}$	4.3×10^7
1G2.10	$2.2 (\pm 0.26) \times 10^5$	$2.3 (\pm 0.03) \times 10^{-3}$	9.8×10^7
chi Leu3a	$1.5 (\pm 0.35) \times 10^5$	$2.3 (\pm 0.12) \times 10^{-4}$	6.6×10^8

20

表19に示した速度および平衡定数は、センサーチップに結合した抗原 (rCD4) を用い、次いでmAbを流して、BIAcoreにて測定した。これらの定数は、精製mAbを用いて、少なくとも3つの独立した実験から誘導された。

30

表19. 結合力および速度定数

40

【数 2 4 1】

(242)

速 度 定 数 (平均 ± SD)			
ヒ ト mAb	$k_{\text{会合}} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{\text{解離}} (s^{-1})$	$K_a (M^{-1})$
1E11.15	$2.8 (\pm 0.22) \times 10^5$	$4.5 (\pm 0.43) \times 10^{-5}$	6.2×10^9
6C1.10	$2.0 (\pm 0.25) \times 10^5$	$4.0 (\pm 0.63) \times 10^{-5}$	5.1×10^9
1G1.9	$9.1 (\pm 0.95) \times 10^4$	$2.2 (\pm 0.71) \times 10^{-5}$	4.2×10^9
6G5.1	$1.1 (\pm 0.41) \times 10^5$	$1.0 (\pm 0.34) \times 10^{-5}$	1.1×10^{10}
10C5.6	$7.4 (\pm 1.5) \times 10^4$	$1.6 (\pm 0.57) \times 10^{-5}$	4.5×10^9
2E4.2	$1.4 (\pm 0.15) \times 10^5$	$2.2 (\pm 0.25) \times 10^{-5}$	6.3×10^9
4D1.4	$9.8 (\pm 0.69) \times 10^4$	$4.2 (\pm 1.3) \times 10^{-5}$	2.3×10^9
7G2.2	$1.7 (\pm 0.20) \times 10^5$	$5.0 (\pm 0.42) \times 10^{-5}$	3.4×10^9
1F8.2	$1.7 (\pm 0.13) \times 10^5$	$9.7 (\pm 1.2) \times 10^{-5}$	1.7×10^9
1G2.10	$1.7 (\pm 0.04) \times 10^5$	$6.3 (\pm 0.49) \times 10^{-5}$	2.7×10^9
chi Leu3a	$4.0 (\pm 0.45) \times 10^5$	$1.2 (\pm 0.25) \times 10^{-5}$	3.4×10^{10}
Leu3a	$1.5 (\pm 0.30) \times 10^5$	$4.2 (\pm 0.49) \times 10^{-6}$	3.7×10^{10}

表20は、科学文献に示された抗CD4 mAbについての平衡定数を与える。

表20. 抗CD4モノクローナル抗体について報告された結合力および速度定数

速 度 定 数 (平均 ± SD)			
ヒ ト mAb	$k_{\text{会合}} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{\text{解離}} (s^{-1})$	$K_a (M^{-1})$
CE9.1 ⁽⁴⁾	NR*	NR	3.1×10^{10}
cMT412 ⁽¹⁾	NR	NR	5.0×10^9
chi Leu3a ⁽²⁾	NR	NR	1.0×10^{11}
BL4 ⁽³⁾	NR	NR	5.5×10^7
BB14 ⁽³⁾	NR	NR	3.3×10^8
CA2 ⁽⁵⁾	NR	NR	1.8×10^9
CDP571 ⁽⁶⁾	NR	NR	7.1×10^9

NR=報告なし、

(1)J.Cell.Biol.15E:A179

【数 2 4 2】

(243)

(2)J.Immunol.145:2839(3)Clin.Immunol.Immunopath.64:248(4)Biotechnology.10:1455(5)Mol.Immunol.30:1443

(6)欧州特許出願#0626389A1

10

上記した結合力および親和性の測定は、組換えCD4 (rCD4) を用いて行った。野生種CD4 (nCD4) についてのヒトモノクローナル抗体の結合力を測定するために、変性されるべき抗体を必要としない、追加の結合アッセイを使用した。特異的に、抗体の連続希釈物を、SupT1細胞と共に、6時間氷上でインキュベートし、洗浄し、FITCヤギ抗ヒトFc γ と結合したどの抗体をも検出した。Kaを、最大蛍光の1/2を与える抗体の濃度から測定した(4つのパラメータフィットを使用した)。その結果は、10のヒトモノクローナル抗体すべてが、Ka値 $>10^9 \text{ M}^{-1}$

20

で、nCD4に非常によく結合したことを証明する(表21)。ほとんどの抗体(キメラLeu3aを含む)が、rCD4よりもnCD4に、あまりよく結合しなかった。このことは、抗原の密度の差ならびに2つの抗原の間の差異に帰することができた。

表21.フローサイトメトリーにより測定された結合力定数

30

ヒト mAb	Ka 値 (M ⁻¹)		Kaの比 (rCD4/nCD4)
	rCD4	nCD4*	
1E11.15	6.2×10^9	3.3×10^9	1.9
6C1.10	5.1×10^9	3.1×10^9	1.6
1G1.9	4.2×10^9	2.3×10^9	1.9
6C5.1	1.1×10^{10}	1.9×10^9	5.9
10C5.6	4.5×10^9	1.8×10^9	2.5
2E4.2	6.3×10^9	1.1×10^9	5.8
4D1.4	2.3×10^9	2.0×10^9	1.2
7G2.2	3.4×10^9	3.3×10^9	1.0
1F8.2	1.7×10^9	3.2×10^9	0.5
1G2.10	2.7×10^9	1.9×10^9	1.4
chi Leu3a	3.4×10^{10}	5.6×10^9	6.1

40

* ヒトモノクローナル抗体は、SupT1細胞と共に、連続希釈物中で6時間インキ

【数 2 4 3】

(244)

ュベートし、2回洗浄し、FITC結合ヤギ抗ヒトFc γ 抗血清と共にインキュベートし、洗浄し、固定した。4つのパラメータフィットから測定したように、最大蛍光の1/2を与える抗体の濃度からKaを計算した。

実施例41

10

ヒトIgG κ 抗CD4抗体をエンコードするヌクレオチド配列の同定

この実施例は、試験したハイブリドーマのそれぞれが1つの機能的重鎖または軽鎖RNA転写物のみを生成することを証明し、これは、適当な機能する対立遺伝子排除と一致する。さらに、重鎖および軽鎖CDRセグメントの配列分析は、免疫グロブリントランスジーンの体細胞突然変異が起こったことを示す。

ヒトCD4と反応するヒトIgG κ モノクローナル抗体を分泌し、
JHD/JCKD/HC2/KCo5トランスジェニックマウスから誘導された、5つの個々のハイブリドーマ細胞系(1E11、1G2、6G5、10C5および4D1)からの細胞が、個々の抗体のそれぞれをエンコードするRNAを分離するために使用された(フィッシュワイルドら、1996年、Nature Biotechnology 14、845-851)。RNAが、cDNAを合成するための基質として使用され、これは次に、ヒトVH、V κ 、C γ 、およびC κ に特異的なプライマーを用いて、PCRによってヒトIg γ および κ 転写配列を増幅するために使用された(テイラーら、1992年、Nucleic Acids Res. 20、6287-6295；ラリック、J.W.ら、(1989年)、Bio/Technology 7、934-938；マークス、J.D.ら、(1991年)、Eur. J. Immunol. 21、985-991；テイラーら、1994年、Int. Immunol. 6、579-591)。増幅されたIg重鎖および κ 軽鎖の配列を、細菌のプラスミドへクローン化し、ヌクレオチド配列を決定した。重鎖VDJおよび軽鎖VJ結合に広がる配列の分析は、5つのクローンのそれぞれについてフレーム内(in frame)重鎖および軽鎖転写を示し、いくつかの場合には、非機能的対立遺伝子を表している追加のフレーム外(out of frame)無菌転写物を示す。適当な機能する対立遺伝子排除と一致して、個々のクローンのそれぞれについて同定された1より多いユニーク機能的重鎖または軽鎖転写物がある場合はない。10の機能的転写物のそれぞれについて、部分ヌクレオチド配列が、以下の配列I.D. 番号に割り当てられ：1E11 γ [配列I.D.No. 1]；1E11

20

30

40

【数 2 4 4】

(245)

κ [配列I.D.No.2] ; 1G2 γ [配列I.D.No.3] ; 1G2 κ [配列I.D.No.4] ; 6G5

γ [配列I.D.No.5] ; 6G5 κ [配列I.D.No.6] ; 10C5 γ [配列I.D.No.7] ; 10C5 κ [配列I.D.No.8] ; 4D1 γ [配列I.D.No.9] ; 4D1 κ [配列I.D.No.10]、表22に示される。
。総ての配列が5'から3'への方向で示される。

10

表22.機能的転写物についての音分ヌクレオチド配列

1E11 γ [配列 I.D.No.1]

TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTTCATCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTAIGGTGGTCCCTTCAGTGGTTACTTCTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCCATCATC
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCGAGAGTGCAGTCAACCTATCAGTAGACA
CGTCCAAAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGACATTACTATGGTTCGGGGAGTACCTCACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACC

20

1E11 κ [配列 I.D.No.2]

GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGAAGTGTGGCGGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

30

1G2 γ [配列 I.D.No.3]

TCCACCATCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGA
GTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTTACTGGATCGCC
TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCGATCCTGCT
GACTCTGATACCAGATACAACCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACCATCTCAGCCGAC
AAGTCCATCAGTACCGCCTATTTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC
ATGTATTACTGTGCGAGACCAGCGAACTGGAAGTGGTACTTCGTTCTCTGGGGCCGT
GGCACCCTGGTCACT

40

【数 2 4 5】

(246)

1G2 κ [配列 I.D.No.4]

GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA
CTGTCAACAGTTTATTAGTTACCCTCAGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGA
GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

10

6G5 γ [配列 I.D.No.5]

TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATA
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACA
CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACC

20

6G5 κ [配列 I.D.No.6]

GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTA
TTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

30

10C5 γ [配列 I.D.No.7]

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGAAGCACC
AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCC
TCAG

40

【数 2 4 6】

(247)

10C5 κ [配列 I.D.No.8]

ATGGACATGATGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTCCCAGGT
 TCCACATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTCTGCATCTGTAGGA
 GACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
 TATCAGCATAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG
 CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAT
 AGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

10

4D1 γ [配列 I.D.No.9]

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCC
 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAG
 ATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCGGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGC
 CAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTCGTGACTCTGAT
 ACCACATACAGCCCCCTCCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCCATC
 AGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTAC
 TGTGCGAGAGACCAACTGGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
 AAGCTT

20

30

4D1 κ [配列 I.D.No.10]

ATGGACATGGAGTTCCCCGTTTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGA
 GACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
 TATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCTAAGTCCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTG
 CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATGAT
 AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAAGCTT

40

これらのDNA配列の分析は、5つのハイブリドーマクローンが4つの個々のブライマリーB細胞の子孫を示すことを証明する。表23は、10のCDR3領域のそれぞれについて誘導されたアミノ酸配列およびこれらの転写物をエンコードする遺伝

【数 2 4 7】

(248)

子のそれぞれに挿入された生殖細胞系遺伝子セグメントについての割り当てを示す。生殖細胞系の割り当ては、ナショナルセンターオブバイオテクノロジー インフォメーション(National Center for Biotechnology Information)、ナショナル ライブラリー オブ メディシン (National Library of Medicine)、ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス(National Institutes of Health)、Bethesda, Md.から入手可能な公開された遺伝子配列に基づく。また、次をみよ：クックら、1994年、Nature Genet. 7、162-168；トムリンソンら、1992年、J. Mol. Biol. 227、776-798；マツダら、1993年、Nature Genet. 3、88-94；スカブル&ザッチュー、1993年、Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374、1001-1022；コックスら、1994年、Eur.J.Immunol.24、827-836；ラベッチら、1981年、Cell 27、583-591；イチハラら、1988年、EMBO J. 7、4141-4150；ヤマダら、1991年、J. Exp. Med. 173、395-407；サンツ、1991年、J. Immunol. 147、1720-1729。

10

20

表23. ハイブリドーマ転写物における生殖細胞系V(D)Jセグメント使用

クローン	h.c. CDR3	VH	DH	JH	l.c. CDR3	Vk	Jk
1E11	DITMVRGVPH (配列 I.D. No. 63)	VH4-34	DXP'1	JH4	QQYGSSPLT (配列 I.D. No. 67)	VkA27/A11	Jk4
1G2	PANWNWYFVL (配列 I.D. No. 64)	VH5-51	DHQ52	JH2	QQFISYPQLT (配列 I.D. No. 68)	VkL18	Jk4
6G5	VINWFDP (配列 I.D. No. 65)	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT (配列 I.D. No. 69)	VkL19	Jk2
10C5	VINWFDP	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT	VkL19	Jk2
4D1	DQLGLFDY (配列 I.D. No. 66)	VH5-51	DHQ52	JH4	QQYDSYPYT (配列 I.D. No. 70)	VkL15	Jk2

30

40

【数 2 4 8】

(249)

n.d.は、ヌクレオチド配列から決定することができなかった。

実施例42

トランスフェクトされた細胞系におけるヒトIgG κ 抗CD4抗体の発現のためのミニジーンの構成

この実施例は、免疫グロブリンポリペプチド（すなわち、免疫グロブリン重鎖または軽鎖）をエンコードする、完全に人工の遺伝子を作る方法を説明する。PCR増幅したV重鎖およびV軽鎖cDNA配列が完

10

全な重鎖および軽鎖ミニジーンを再構成するために使用され得るように、プラスミドを構成した。

κ 軽鎖プラスミド、pCK7-96は、 κ 定常領域およびポリアデニル化部位[配列ID No.11]を含む。それは、イニシエーターメチオニンの上流のHindIII部位を含む5'プライマーで増幅された κ 配列が、HindIIIおよびBbsIで消化されることができ、かつHindIIIおよびBbsIで消化されたpCK7-96へクローン化されて、ポリアデニル化部位と共に配列をコードする完全な軽鎖を再構成するように行われる。このカセットは、HindIII/NotIフラグメントとして分離され、転写プロモータ配列にライゲートされて、細胞へのトランスフェクションのための機能的ミニジーンを作ることができる。

20

30

γ 1 重鎖プラスミド、pCG7-96は、ヒトガンマ1 定常領域およびポリアデニル化部位[配列ID No.12]を含む。それは、イニシエーターメチオニンの上流のHindIII部位を含む5'プライマーで増幅された γ 配列が、HindIIIおよびAgeIで消化されることができ、かつHindIIIおよびAgeIで消化されたpCG7-96へクローン化されて、ポリアデニル化部位と共に配列をコードする完全な γ 1 重鎖を再構成するように行われる。このカセットは、HindIII/SalIフラグメントとして分離され、転写プロモータ配列にライゲートされて、細胞へのトランスフェクションのための機能的ミニジーンを作ることができる。

40

以下の実施例は、ハイブリドーマからのヌクレオチド配列データがどのようにして、機能的Ig 重鎖および軽鎖ミニジーンを再構成するために使用され得るかを説明する。ハイブリドーマ6G5および10C5からの重鎖および軽鎖転写物のヌク

【数 2 4 9】

(250)

レオチド配列が、合成オリゴヌクレオチドの重複する組をデザインして、自然配列と一致するアミノ酸コードキャパシティーを有する合成V配列を作るために使用された。合成重鎖および κ 軽鎖配列（示されたHC6G5[配列I.D. No.61]およびLC6G5[配列I.D. No.62]は、3つの方法において自然配列と異なっていた：反復したヌクレオチド塩基の糸が中断されてオリゴヌクレオ

10

チド合成およびPRC増幅を促進する；最適翻訳開始部位がコザクの規則（Kozak、1991年、J.Biol.Chem.266、19867－19870）に従って挿入された；およびHindIII部位が翻訳開始部位の上流で操作された）。

A. 合成 κ 軽鎖

軽鎖PCR反応 1

20

以下のオリゴヌクレオチドをプールし：o-548[配列ID No.13]、o-549[配列ID No.14]、o-550[配列ID No.15]、o-551[配列ID No.16]、o-552[配列ID No.17]、o-563[配列ID No.18]、o-564[配列ID No.19]、o-565[配列ID No.20]、o-566[配列ID No.21]、o-567[配列ID No.22]、以下の2つのプライマーで増幅した：o-527[配列ID No.23]およびo-562[配列ID No.24]。

軽鎖PCR反応 2

30

以下のオリゴヌクレオチドをプールし：o-553[配列ID No.25]、o-554[配列ID No.26]、o-555[配列ID No.27]、o-556[配列ID No.28]、o-557[配列ID No.29]、o-558[配列ID No.30]、o-559[配列ID No.31]、o-560[配列ID No.32]、o-561[配列ID No.33]、o-562[配列ID No.24]、そして以下の2つのプライマーで増幅した：o-552[配列ID No.17]およびo-493[配列ID No.34]。軽鎖PCR反応 3

次に軽鎖PCR反応 1 および 2 の産物をまとめ、かつ次の2つのプライマーで増幅した：o-493[配列ID No.34] およびo-527[配列ID No.23]。

40

次に軽鎖PCR反応 3 の産物をHindIIIおよびBbsIで消化し、HindIII／BbsI消化pCK7-96[配列ID No.11]にクローン化して、pLC6G5[配列ID No.35]を生成した。

B. 合成 γ 重鎖

重鎖PCR反応 1

以下のオリゴヌクレオチドをプールし：o-528[配列ID No.36]、

【数 2 5 0】

(251)

o-529[配列ID No.37]、o-530[配列ID No.38]、o-531[配列ID No.39]、o-532[配列ID No.40]、o-543[配列ID No.41]、o-544[配列ID No.42]、o-545[配列ID No.43]、o-546[配列ID No.44]、o-547[配列ID No.45]、そして以下の2つのプライマーで増幅した：o-496[配列ID No.46]およびo-542[配列ID No.47]。

重鎖PCR反応2

10

以下のオリゴヌクレオチドをプールし：o-533[配列ID No.48]、o-534[配列ID No.49]、o-535[配列ID No.50]、o-536[配列ID No.51]、o-537[配列ID No.52]、o-538[配列ID No.56]、o-539[配列ID No.53]、o-540[配列ID No.54]、o-541[配列ID No.55]、o-542[配列ID No.47]、ならびに、pCG7-96[配列ID No.12]の分離した439 bp BbsIフラグメント、そして以下の2つのプライマーで増幅した：o-490[配列ID No.57]およびo-520[配列ID No.58]。

20

重鎖PCR反応3

次に重鎖反応1および2の産物をまとめ、かつ次の2つのプライマーで増幅した：o-520[配列ID No.58]およびo-521[配列ID No.59]。

次に重鎖反応3の産物をHindIIIおよびAgeIで消化し、HindIII/AgeI消化pCG7-96[配列ID No.12]にクローン化して、pHC6G5[配列ID No.60]を生成した。

表24. ミニジーン構成において使用されるプライマー、ベクターおよび産物

30

pCK7-96 [配列, I.D. No. 11]

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAACACAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTC
AGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGCTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAG

40

【数 2 5 1】

(252)

CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCC
GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTCGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCACCGTTTCTGGCTCAGCAAAAAAGGAAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGGCC
TTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGUGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCCGTCAGCGGTGTTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
AAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCC
AGTGCCAAGCTAGCGGCCGCGTCCAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAG
CCTGTTATCCCAGCACAGTCCTGGAAGAGGCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGG
CTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTCAGACCTGTTCTGAATTCTAAACT
CTGAGGGGGTCCGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAG
GTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATT
TAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCAAGATTT
TAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTC
GTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAACACACCCCAAGGGCAGAACT
TTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTCCTCAGGAACGTGTGGCTGCACCAT

10

20

30

40

【数 2 5 2】

(253)

CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
TGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCC
TGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTAT
TGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTGGCTTTAATTA
TGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTGCACCTGTGGTTTCTC
TCTTTCCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCACTACTCAATTTCTCTTA
TAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCT
TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGC
CTTCTGTCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCA
ATTGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTC
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAACTGTAAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTG
GGCGC

10

20

pCG7-96 [配列 I.D. No. 12]

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGC
AGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCAT
GAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCCCTCTGC
GCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTGCATGGCACCACCTCTCTTCAGC
CTCCACCAAGGGCCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGCTGGA
CAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGC
TCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGG
CAGGCCCCGTCTGCCTCTTCAACCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGG
AGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCTA
ACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATA
TCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCC
CTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTG
CAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAG
CCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCC

30

40

【数 2 5 3】

(254)

AGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTCTGGTCAGCGTCCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTG
CGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCAACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGC
TGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATGAGTGCGACGGCCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTCCGACGAGGAT
GCTTGCCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCAC
CCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTCAGGCCG
AGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTG
GCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCTTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGC
CCTCGGCAGGGTGGGGGATTGCGCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTG
GGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACAGCCCCCTGCCTC
TGTAGGAGACTGTCTGTCTGTGAGCGCCCCCTGTCTCTCCCGACCTCCATGCCCACT
CGGGGGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCA
TCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGC
CAGGTAAACCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT
GGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGG
CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCCTAAAAAG
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGCACTATAAAGATACCAGGCGTTT
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGG
TATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
GTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTG

10

20

30

40

【数 2 5 4】

(255)

AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCT
ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA
TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTC
GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGA
AGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAT
TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT
GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGC
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TTAAAAGTGCTCATTCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTA
CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCA
TCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA
AAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGITATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACG
AGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG
CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGCTCAGCGGTGTTGGCGGTGTCTGGGGCTGGCTTAATATCGGGCATCA
GAGCAGATTGTAAGTGCAGCATATGGACATATTGTCTGTTAGAACGCGGCTAC
AATTAATACATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACACTATA

10

20

30

O-548 [配列 I.D. No. 13]

ATCGTCCCAGCTCAGCTCCTCGCTCTCCTGCTGCTCTGGTTCCC

O-549 [配列 I.D. No. 14]

AGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCG

O-550 [配列 I.D. No. 15]

TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCG

40

O-551 [配列 I.D. No. 16]

【数 2 5 5】

(256)

AGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAACC

O-552 [配列 I.D. No. 17]

AGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC

O-563 [配列 I.D. No. 18]

AGGAGCTTAGGTGCTTTACCTGGTTTATGCTGATACCAGGCTAA

10

O-564 [配列 I.D. No. 19]

CCAGCTGCTAATATCCTGACTCGCCGACAAGTGATGGTGACTC

O-565 [配列 I.D. No. 20]

TGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATGGAGACTGGGTCATC

O-566 [配列 I.D. No. 21]

TGGATGTGCGCATCTGGAACCTGGGAACCAGAGCAGCAGGAGACC

20

O-567 [配列 I.D. No. 22]

GAGGAGCTGAGCTGGGACCATCATGCTGGCAAGCTTAGAGTC

O-527 [配列 I.D. No. 23]

GACTCTAAGCTTGCCACCATGATGGTCC

O-562 [配列 I.D. No. 24]

ACCTTGATGGGACACCACTTTGCAAACCTGGATGCAGCATAGATC

30

O-553 [配列 I.D. No. 25]

AAAGTGGTGTCCCATCAAGTTTCAGCGGAAGTGGATCTGGGACA

O-554 [配列 I.D. No. 26]

GATTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGC

O-555 [配列 I.D. No. 27]

AACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTG

40

O-556 [配列 I.D. No. 28]

GTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA

【数 2 5 6】

(257)

O-557 [配列 I.D. No. 29]

TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA

O-558 [配列 I.D. No. 30]

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGA

O-559 [配列 I.D. No. 31]

TCTCCAGCTTGGTTCCCTGACCAAAAGTGTACGGGAAACTATTA

10

O-560 [配列 I.D. No. 32]

GCCTGTTGACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCT

O-561 [配列 I.D. No. 33]

GCTGATGGTGAGAGTGAATCTGTCCCAGATCCACTTCCGCTGA

O-493 [配列 I.D. No. 34]

TCAACTGCTCATCAGATGCC

20

pLC6G5 [配列 I.D. No. 35]

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCIGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCCAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCCCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAG
CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA

30

40

【数 2 5 7】

(258)

GACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCC
GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGACTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGCGGTATCACGAGGCC
TTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
AAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGCCATTCAAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
CGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCC
AGTGCCAAAGCTAGCGGCCGCGGTCCAACCAATCTCAAAGCTTGCCACCATGATG
GTCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTCCAGGTTCCAGATGCGAC
ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCGGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAA
CCAGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGTGTG
CCATCAAGGTTCAAGCGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTAC
ACTTTTGCTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCCTGACC
CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGG

10

20

30

40

【数 2 5 8】

(259)

TCCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTTGGCTTTAATTATGCTA
ATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTT
CCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGG
GACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAAATCATCCTTCATT
CTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCT
GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCTG
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC

10

O-528 [配列 I.D. No. 36]

TTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGATGGGTCTGTCTC

O-529 [配列 I.D. No. 37]

AGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC

20

O-530 [配列 I.D. No. 38]

GGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTC

O-531 [配列 I.D. No. 39]

AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGG

O-532 [配列 I.D. No. 40]

GTCTGGAGTGGATTGGTGAATCAATCATAGTGAAGCACCAA

30

O-543 [配列 I.D. No. 41]

TTCACCAATCCACTCCAGACCCTTACCTGGTGGCTGGCGGATC

O-544 [配列 I.D. No. 42]

CAGCTCCAGTACTAACCCTGAAGGAACCATAGACAGCGC

O-545 [配列 I.D. No. 43]

AGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAGTCCTGCGCC

40

O-546 [配列 I.D. No. 44]

CCACTGCTGTAGCTGCACCTGAGACAGGACCCATCTAGGAGCT

【数 2 5 9】

(260)

O-547 [配列 I.D. No. 45]

GCCACCAGGAGGAGGAAGAACCACAGGTGTTTCATGGTGGCAAGCTTG

O-496 [配列 I.D. No. 46]

CATGAAACACCTGTGGTTCTTCC

O-542 [配列 I.D. No. 47]

TCTTGAGAGACGGGTTGTAGTTGGTGCTTCCACTATGATTGAT

10

O-533 [配列 I.D. No. 48]

CTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC

O-534 [配列 I.D. No. 49]

ACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCG

O-535 [配列 I.D. No. 50]

CTGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTG

20

O-536 [配列 I.D. No. 51]

GTTTCGACCCTTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

O-537 [配列 I.D. No. 52]

GCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC

O-539 [配列 I.D. No. 53]

CCTGGCCCCAAGGGTCGAACCAATTAATTACTCTCGCACAGTA

30

O-540 [配列 I.D. No. 54]

ATACACAGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGTTTCAGA

O-541 [配列 I.D. No. 55]

GAGAACTGGTTCTTGGACGTGTCTACTGATATGGTGACTCGAC

O-538 [配列 I.D. No. 56]

CGATGGGCCCTTGGTTGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

40

O-490 [配列 I.D. No. 57]

GAAGCACCAACTACAACCCG

【数 2 6 0】

(261)

O-520 [配列 I.D. No. 58]

GAGTTCCACGACACCGTCACC

O-521 [配列 I.D. No. 59]

GACCTCAAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGG

pHC6G5 [配列 I.D. No. 60]

GAAC TCGAGCAGCTGAAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTG
GTGGCAGCTCCTAGATGGGTCCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGA
CTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAGCTGGCTGTCTATGGTGGTTCCTTC
AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATT
GGTGAATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAAGAGTGCAGTC
ACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACC
GCTGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTTGG
GGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCTCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAG
GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGG
CTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTCAACCGGAG
GCCTCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCTCCAGGC
TCTGGG CAGGCACAGGCTAGGTGCCCCCTAACCAGGCCCTGCACACAAAGGGG CAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCCCTGACCTAAG
CCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCA
GATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTG CAGAGCCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCA
CACATGCCCCACCGTCCCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCG
GGACAGGTGCCCTAGACTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACA
CGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCTG CACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCUAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTC
GGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC

10

20

30

40

【数 2 6 1】

(262)

CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCAAGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGC
TCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCCCTGTACATACTT
CCCGGGCGCCAGCATGGAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGAC
TGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAG
GCAGAGCGGGTCCCCTGTCCCCACACTGGCCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCC
CCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCG
TGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCC
CCTGGGGACAGACACACAGCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCCTGTTCTGTGAGCG
CCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAG
AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCC
TATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCC
AACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGCTATCACCTCACTCAAAGGCGG
TAATACGGTTATCCACAGAATCAGCGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTC
CTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCG
GTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC
TTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGT
CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAA
CTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
CGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTAC

10

20

30

40

【数 2 6 2】

(263)

GCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTG
TCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
CTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA
AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAC
GGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATTCATTGGAAAAAGTT
CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAAC
CCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGT
GAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGA
CATTAACTTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGTGTTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCAT
TGGACATATTGTCCTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAC
ACATACGATTTAGGTGACACTATA

10

20

HC6G5 [配列 I.D. No. 61]

AAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGA
TGGGTCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCCTCAGTGGTTACTACTGG
AGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATTGGTGAATCAATCAT
AGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC
ACGTCCAAGAACAGTTCTCTCTGAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTTCGACCCTTGGGGCCAGGGAACCCCTG
GTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGT

30

LC6G5 [配列 I.D. No. 62]

AAGCTTGCCACCATGATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTC
CCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTA
GCCTGGTATCAGCATAAACCAGGTAAGACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC
AGTTTGCAGAGTGGTGTCCCATCAAGGTTGAGCGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTT
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAG

40

GCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTGGTTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACT
GTGGCTGCACCATCTGTCTTC

【数 2 6 3】

(264)

実施例43

ヒト抗CD4モノクローナル抗体の非ヒト霊長類リンパ球への結合

動物モデルにおいて、ヒト抗CD4モノクローナル抗体の前臨床的毒物学および薬物動力学的研究を行うことができるのは望ましい。いくつかの目的で、動物が、モノクローナル抗体でそれが認識されるように、ヒトCD4と交差反応性のエピトープを含むCD4を発現する非ヒト霊長類であることが更に望ましい。3匹の異なる非ヒト霊長類種、チンパンジー、アカゲザル（リーサスモンキー）(rhesus monkey)およびカニクイザル（シノモルガスモンキー）(cynomolgus monkey)を、ハイブリドーマ1E11、1G2、6G5、10C5および4D1からの5つの異なるヒト抗CD4モノクローナル抗体と交差反応性CD4エピトープについて試験した。チンパンジー、アカゲザルおよびカニクイザルの全血から末梢血リンパ球を分離した。分離した細胞を、これら5つのハイブリドーマのそれぞれからのヒト抗体（FITC-抗ヒトIgGで検出した）およびPE-抗CD8またはPE-抗CD4で二重染色した。染色した細胞を次に、フローサイトメトリーで分析して、ヒトモノクローナル抗体のそれぞれが、これら3種の非ヒト霊長類のそれぞれからのリンパ球の表面の内因性CD4に結合したかどうか決定した。5つの抗体のうちの4つ、1E11、6G5、10C5および4D1が、チンパンジーのCD4細胞に結合することがわかった。さらに、5つの抗体のうちの4つ、1G2、6G5、10C5および4D1が、アカゲザルおよびカニクイザルの両方のCD4細胞に結合することがわかった。かくして、5つの抗体のうちの3つ、6G5、10C5および4D1が、試験した3種の非ヒト霊長類のそれぞれにおけるCD4細胞に結合する。

10

20

30

実施例44

モノクローナル抗体(mAb)が患者において非欠乏または免疫抑制的であるかどうかを確実に予言することができる、インビボでのアッセイは知られていない。しかしながら、ヒトおよび非ヒト霊長類例えばチンパンジーおよびカニクイザルにおいて、3つの異なるmAbの、不足する（または不足しない）能力の間に相関関係が観察された（例えばM. ジョンカーら、Clin.Exp.Immunol.,93:301-307(1993年)；およびJ.A.パウエルソンら、Transplantation, 57:788-793(1994年)）

40

【数 2 6 4】

(265)

。したがって、非ヒト霊長類においてヒトmAbを用いて研究を行った。

この研究にチンパンジーを使用した。というのは、抗CD4 mAbのうちの1つ、1E11はチンパンジーにおいてのみCD4を認識し、アカゲザルまたはカニクイザルでは認識しないからである。第2のmAb、6G5は、チンパンジー、アカゲザルおよびカニクイザルにおいてCD4を認識する。第3のmAb、1G2は、チンパンジーにおいてCD4を認識しないが、アカゲザルおよびカニクイザルにおいてCD4を認識する。そのmAbはすでに、カニクイザルにおいてインビボで非欠乏であることが示された。

10

末梢血中でCD4+ T細胞数におけるヒトmAbの効果を調べるだけでなく、インビボでのT細胞機能におけるmAb投与の効果をまた評価した。これを行うために最も受け入れられるやり方は、抗原例えばツベルクリンまたは破傷風トキソイドに前感作された、かつ皮膚に過敏性反応を固定する動物を使用することである。

20

3匹のオスのチンパンジーをこの研究に登録した。-7、-3および1日に、ベースライン全血試料を得た。1日に血液を採取した後、1匹のチンパンジー毎に、2mg/kgにて、2つのヒトmAbのうちの1つ（1E11または6G5）を静脈内注入した。第3のチンパンジーは、等体積/kgの緩衝液のみを受け入れた。血液を、注入後30分、2時間、8時間、24時間および48時間に採取した。2日に、皮膚反応性試験を行った。

30

以下の表25に示された結果は、1E11が末梢血リンパ球の一時的欠乏を引起し、ほとんどのCD4+ T細胞が欠乏されていることを明らかに証明している。6G5はリンパ球またはCD4+ T細胞の欠乏を引起さなかったが、mAbの両方が、対照チンパンジーに比べて、破傷風トキソイドへの過敏性応答を阻害することができた。かくして、ヒトmAbは両方、インビボで免疫抑制的であるのが明らかであり、この免疫抑制は、必ずしもT細胞欠乏を必要としない。

40

表25.末梢チンパンジーリンパ球におけるヒトmAbの効果

【数 2 6 5】

(266)

末梢血リンパ球 (100万/ml)			
調 査 日	1E11	6G5	対照
-7	4.2	6.4	4.2
-4	4.0	9.9	4.4
1, 注 入 前	4.8	5.7	5.8
1, 30 分 後	1.6	5.0	4.0
1, 2 時 間 後	1.0	6.7	5.2
1, 6 時 間 後	1.5	8.0	4.2
2	3.5	9.6	5.7
3	3.9	9.7	5.9

10

前述した本発明の好ましい実施態様は、説明し、記載する目的のために示されたものである。それらは、網羅されていること、または本発明を開示された通りの形に限定することを意図せず、上記の教示に照らして、多くの修正および変形が可能である。いくらかの変化および変形が請求の範囲内で行われ得ることが明らかである。

20

すべての公開物および特許出願は、各公開物または特許出願が詳細にかつ個々に示されたのと同じ程度に、参照することにより本明細書に組込まれている。一般に挙げられた出願USSN 08/544,404 (1995

30

年10月10日出願)、USSN 08/352,322 (1994年12月7日出願)、USSN 08/209,741 (1994年3月9日出願)、USSN 08/165,699 (1993年12月10日出願) およびUSSN 08/161,739 (1993年12月3日出願) (これは、08/155,301 (1993年11月18日出願) の部分継続出願である)、国際特許出願W092/03918、USSN 07/810,279 (1991年12月17日出願)、USSN 07/853,408 (1992年3月18日出願)、USSN 07/904,068 (1992年6月23日出願)、USSN 07/990,860 (1992年12月16日出願)、国際特許出願W093/12227 およびUSSN08/053131 (1993年4月26日出願) は、参照することにより本明細書に組込まれている。

40

ここで、ヒト免疫グロブリンを発現するB細胞が発達を受け、マウス免疫系の

【数 2 6 6】

(267)

状況の下で抗原に応答するという結論を下したい。抗原反応性は免疫グロブリン重鎖アイソタイプスイッチ及び可変領域体細胞突然変異を導く。我々は又、これらのマウスからモノクローナルヒト配列抗体を得るのに従来のハイブリドーマ技術を用いることができるということも実証してきた。従ってこれらのトランスジェニック抗体は、ヒト標的抗原に対するヒト抗体の供給源である。

10

本発明のトランスジェニックマウスを、下記の表B及びCから選択されたヒト抗原により免疫する。トランスジェニックマウスは前記ヒト抗原に結合するヒト抗体を生産する。免疫されたトランスジェニックマウスからのB細胞を用いて、前記選択されたヒト抗原に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ

20

を作製する。

表B

ヒトCD抗原

標示	認識される膜成分
C01a	gp49
C01b	gp45
C01c	gp43
C02	CD58(LFA-3)レセプタ、gp50
C02R	C02活性Tに限定されるエピトープ
C03	C03-複合体(5鎖)、gp/p26, 20, 16
C04	ClassII/HIVレセプタ、gp59
C05	gp67
C06	gp100
C07	gp40
C08	クラス1レセプタ、gp32. $\alpha\alpha$ 又は $\alpha\beta$ ダイマー
C09	p24
C010	gp100, CALLA
C011a.	LFA-1, gp180/95

30

40

【数 2 6 7】

(268)

C011b	C3biレセプタ、gp155/95	
C011c	gp150/95	
C0w12	p90-120	
C013	gp150	
C014	gp55	10
CD15	3-FAL, X-ハプテン	
C016	FcRIII, gp50-65	
C0w17	ラクトシルセラマイド	
C018	CD11a, b, c に対する β 鎖	
C019	gp95	
		20
C020	p37/32	
C021	C3d/EBV-Rec. (CR2), p140	
C022	gp135, ミエリン関連gpに対する相同性(MAG)	
C023	FcER11, gp45-50	
C024	gp41/38	
CD25	IL-2R β 鎖、 gp55	
C026	gp120	30
C027	p55(ダイマー)	
C028	gp44	
C029	VLA β -抗原 β 1 -鎖、Plt GPIIa	
C030	gp120, Ki-1	
C03L	gp140,Plt, GPIIa	
C0w32	FcRII, GP40	40
C033	gp67	
C034	gp105-120	
C035	CR1	
C036	gp90, Plt GPIV	
C037	gp40-52	

【数 2 6 8】

(269)

C038	p45	
C039	gp70-100	
C040	gp50,NGF レセプタに対して相同	
C041	Plt GPIIb-IIIa 複合体及びGPIIb	
C042a	Plt GPIX, gp23	10
C0w42b	Plt GPIb, gp135/25	
C043	ロイコンアリン、gp95	
<u>表C</u>		
C044	Pgp-1, gp80-95	
C045	LCA, T200	
		20
C045RA	制限処理されたT200, gp220	
C045RB	制限処理されたT200	
C045R0	制限処理されたT200, gp180	
C046	膜コファクター蛋白質(MCP)、gp66/56	
C047	gp47-52, N-連結グリカン	
C048	gp41, P1-連結	
C0w49b	VLA- α 2鎖、Plt GPIa	30
C0w49d	VLA- α 4鎖、gp150	
C0w49f	VLA- α 6 鎖、Plt GPIc	
C0w50	gp148/108	
C0w51	VNR- α 鎖	
C0w52	カンフー 1, gp21-28	
C053	gp32-40	40
CD54	ICAM-1	
C055	DAF (デシル保追因子)	
C056	gp220./135, NKH1, N-CANのアイソ型	
C057	gp110, HNK1	
C058	LFA-3, gp40-65	

【数 2 6 9】

(270)

C059	gp18-20	
C0w60	NeuAc-NeuAc-Gal-	
C061	Integrin β 3-, VNR- β 鎖、Plt GPIIIa	
C062	GMP-140(PA0GEM), gp140	
C063	gP53	10
C064	FcR4, gp75	
C0w65	セラミド-ドデカサッカライド 4C	
C066	ホスホプロテインgp180-200	
C067	P100, P1-連結	
C068	gp110	
C069	gp32/28, AIM	20
C0w70	Ki-24	
C072	gp43/39	
C073	p69	
C074	gp41/35/33	
C0w75	P53	
C076	gp85/67	30
CD77	グロボトリアアオシルセラミド (Gb3)	
C0w78		

上記表Bは不発明のトランスジェニックマウスを免疫し、そしてヒト抗原に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを発生させるためのヒトの分化のクラスター (cluster of differentiation) (CD) の例のリストである。

上記表Cは、本発明のトランスジェニックマウスを免疫し、そしてヒト抗原に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを発生させるためのヒトの非-CD抗原の例のリストである。

不発明のトランスジェニックマウスを表Dから選択されたヒト病原体又は抗原により免疫する。トランスジェニックマウスは、ヒト病原体と結合する抗体を生産する。免疫されたトランスジェニックマウスからのB細胞を用いて、前記

40

【数 2 7 0】

(271)

選択されたヒト病原体に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製する。

表D

O K T 3	
O K T 4	10
腫瘍壊死因子	
I g E	
H e r - 2	
I L - 2 レセプタ (p 5 5, p 7 5)	
L y m - 1	20
フィブリン	
α - フエトプロテイン	
M y 9	
インシュリン	
インシュリンレセプタ	
癌胎児性抗原 (C E A)	
グルコース転送蛋白質	30
β - インターフェロン	
γ - インターフェロン	
組織プラスミノーゲンアクチベーター (P B A)	
α - インターフェロン	
神経成長因子 (N G F)	
内皮成長因子 (E G F)	40
N G F レセプタ	
E G F レセプタ	
血小板由来成長因子 (P D G F)	
P G D F レセプタ	
インシュリン様成長因子 (I G F - 1)	

【数 2 7 1】

(272)

I G F - 1 レセプタ	
毛様体向神経因子 (C N F F)	
C N F F レセプタ	
脳由来向神経因子 (B D N F)	
B D N F レセプタ	10
神経分化因子 (N D F)	
N D F レセプタ	
ヘパリン結合向神経因子 (H B N F)	
H B N F レセプタ	
形質転換成長因子 α (T G F - α)	
	20
T G F - α レセプタ	
形質転換成長因子 β (T G F - β)	
T G F - β レセプタ	
骨成長因子-1 (B M P - 1, O M P - 1)	
B M P - 1 レセプタ	
骨成長因子-2 (B M P - 2, O M P - 2)	
B M P - 2 レセプタ	30
インターロイキン-1 (I L - 1)	
I L - 1 レセプタ	
インターロイキン-3 (I L - 3)	
I L - 3 レセプタ	
インターロイキン-4 (I L - 4)	
I L - 4 レセプタ	40
インターロイキン-6 (I L - 6)	
I L - 6 レセプタ	
インターロイキン-8 (I L - 8)	
I L - 8 レセプタ	
インターロイキン-12 (I L - 12)	

【数 2 7 2】

(273)

I L - 1 2 レセプタ	
インターロイキン - 1 3 (I L - 1 3)	
I L - 1 3 レセプタ	
顆粒球 / マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)	
顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)	10
幹細胞因子 (S C G F)	
I L - 1 β 転換酵素	
G M - C S F レセプタ	
G - C S F レセプタ	
スロンモモシュリン	
補体因子	20
補体レセプタ	
プロテイン C	
カドヘリン	
ギャップジャンクションプロテイン	
U L A - 4	
I C A M - 1	30
L F A - 3	
E L A M	
P - セレクチン	
E - セレクチン	
多剤耐性蛋白質 (M D R)	
心房性ナトリウム利尿ペプチド	40
T - 細胞レセプタ (T C R) ペプチド	
サブスタンス P	
アンジオテンシン換換酵素 (A C E)	
共通急性リンパ球性白血病抗原 (C A L L A)	
B 1 6 (黒色腫抗原)	

【数 2 7 3】

(274)

じゅう毛性刺激ホルモン (F S H)

黄体形成ホルモン (L H)

上記表Dは、本発明のトランスジェニックマウスを免疫し、そしてヒト病原体に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを発生せしめるための、ヒト病原体及びその抗原の例のリストである。

10

表E

H I V - 1 及び H I V - 2 ウィルス抗原 (g p 1 2 0, g p 1 6 0 等)

H I V プロテアーゼ

H I V R NアーゼH

サイトメガロウィルス (C M V) 及び C M V ウィルス抗原 (g H, g p 等)

20

ヒト T - 細胞向リンパ性ウィルス - 1 (H T L V - 2) 及びその表面抗原

ヒト T - 細胞向リンパ性ウィルス - 2 (H T L V - 2) 及び表面抗原

肝炎 A ウィルス及びウィルス抗原

肝炎 B ウィルス及びウィルス抗原 (例えば、HBsAg, HBcAg, HBeAg)

肝炎 C ウィルス及びウィルス抗原

肝炎 D ウィルス及びウィルス抗原

肝炎 X ウィルス及びウィルス抗原

30

ヒトパピローマウィルス (H P V) 及びウィルス抗原

バリセラ・ゾスター (Varicella zoster) ウィルス及びウィルス抗原

単純ヘルペス I ウィルス及びウィルス抗原

単純ヘルペス II ウィルス及びウィルス抗原

エボラ (又はアハブルグ) ウィルス及びウィルス抗原

日本脳炎 B ウィルス (J B E) 及びウィルス抗原

40

カリホルニア脳炎ウィルス及びウィルス抗原

灰白髄炎ウィルス及びウィルス抗原

コクサッキーウィルス及びウィルス抗原

リノウィルス及びウィルス抗原

狂犬病 (ラブドビリデー科) ウィルス及びウィルス抗原

【数 2 7 4】

(275)

インフルエンザ（オルトミキソウイルス科）ウイルス及びウイルス抗原
 パラミキソウイルス科（パラインフルエンザ 1 ～ 5、mumps）ウイルス及び抗原
 麻疹ウイルス及びウイルス抗原
 呼吸シンキチアルウイルス（RSV）及びウイルス抗原
 バリオラウイルス（天然痘）及びウイルス抗原 10
 アデノウイルス（マスタデノウイルス）及びウイルス抗原
 エプスタインバー（単該症）ウイルス及びウイルス抗原
 プラスモジウム ファルシパルム（*Plasmodium falciparum*）及びウイルス抗原
 コリネバクテリウム・ジフテリア及び表面抗原及び毒素
 コリネバクテリウム・ヘモリティクム及び表面抗原及び毒素
 サルモネラ・スペーシス及び表面抗原及び L P S 20

 シゲラ・スペーシス及び表面抗原及び L P S
 プロテウス・ミラビリス・スペーシス及び表面抗原及び L P S
 シュードモナス・アエルギノーサ及び表面抗原
 ビブリオ・コリラ及び表面抗原及び毒素
 ビブリオ・パラヘモリティクス及び表面抗原及び毒素
 ナイゼリア・メニンジティデイス及び表面抗原 30
 ナイゼリア・ゴノルホエア及び表面抗原
 バジルス・アンスラシス及び表面抗原
 クロストリジウム ボツリヌム及び表面抗原及び毒素
 クロストリジウム・テタニ及び表面抗原及び毒素
 クロストリジウム・ペルフリンゲンス及び表面抗原及び毒素
 ヘモフィルス・インフルエンザ及び表面抗原 40
 トレコネマ・パリドウム及び表面抗原
 リステリア モノシトゲネス及び表面抗原
 ノカルジア・アステロイデス及び表面抗原
 ニューモシスティス・カルニー及び表面抗原
 パステウレラ・ロイコトキシン

【数 2 7 5】

(276)

スタフィロコッカス・エンテロトキシン及びヒアルロニダーゼ及びコアギュラーゼ

ストレプトコッカス (β -溶血性) 及びヘモリシン及びストレプトキナーゼ
グラム陰性リポポリサッカライド複合体 (L P S)

上記の表 E は、不発明のトランスジェニックマウスを免疫し、そしてヒト病原体に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを発生させるためのヒト病原体及びそれらの抗原の例のリストである。

本発明を理解の明確化の目的で例示によって幾分詳細に記載してきたが、請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行えることは明らかであろう。

10

【図面の簡単な説明】

【0005】

20

【図 1】図 1 は、再配列されていないゲノム DNA 中および再配列された免疫グロブリン重鎖遺伝子から発現される mRNA 中の相補性決定領域 C D R 1, C D R 2 および C D R 3、並びにフレームワーク領域 F R 1, F R 2, F R 3 および F R 4 を表す。

【図 2】図 2 はヒト λ 鎖鎖遺伝子座を表す。

【図 3】図 3 はヒト κ 鎖鎖遺伝子座を表す。

【図 4】図 4 はヒト重鎖鎖遺伝子座を表す。

【図 5】図 5 は、ヒト γ 3 および γ 1 定常領域を含有する 2.5 kb 断片に次いでラット鎖 3' エンハンサー配列を含む 700 bp 断片に連結された再配列された I g M 遺伝子を含有するトランスジェン構成物を表す。

【図 6】図 6 は、生体内相同キ目同組換えによって軽鎖トランスジェンを形成させるために使うことができる断片を表す、ヒト κ 鎖鎖遺伝子座の制限地図である。

【図 7】図 7 は p G P 1 の作製を示す。

【図 8】図 8 は p G P 1 中に含まれるポリリンカーの構成を示す。

【図 9】図 9 は、本発明のヒト重鎖トランスジェンを作製するのに使う断片を示す。

【図 10】図 10 は p H I G 1 および p C O N 1 の作製を示す。

【図 11】図 11 は、o R E G 2 を形成させるために p R E 3 (ラットエンハンサー 3') 中に挿入されるヒト C γ 1 断片を示す。

【図 12】図 12 は p H I G 3' および p C O N の作製を示す。

【図 13】図 13 は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒト D 領域セグメントを含む断片を示す。

40

【図 14】図 14 は、p H I G 2 (D セグメント含有プラスミド) の作製を示す。

【図 15】図 15 は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒト J κ およびヒト C κ 遺伝子セグメントを包含する断片を示す。

【図 16】図 16 は p E μ の構造を示す。

【図 17】図 17 は p K a p H の作製を示す。

【図 18】図 18 は、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選別ベクターの作製を示す。

【図 19】図 19 は、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

【図 20】図 20 は、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖鎖遺伝子座を機能的に破壊するた

50

めのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、マウスの内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、マウスの内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選別ベクターの作製を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、マウスの内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

【図 2 5】図 2 5 は κ 軽鎖標的用ベクターの構造を示す。

10

【図 2 6】図 2 6 はマウス重鎖標的用ベクターの構造を示す。

【図 2 7】図 2 7 はマウス重鎖標的用ベクターの構造を示す。

【図 2 8】図 2 8 はベクター p G P e の地図を示す。

【図 2 9】図 2 9 はベクター p J M 2 の構造を示す。

【図 3 0】図 3 0 はベクター p C O R 1 の構造を示す。

【図 3 1】図 3 1 は p I G M 1, p H C 1 および p H C 2 のトランスジェン構成物を示す

【図 3 2】図 3 2 は p γ e 2 の構造を示す。

【図 3 3】図 3 3 は p V G E 1 の構造を示す。

【図 3 4】図 3 4 は p H C 1 トランスジェニックマウス中でのヒト I g 発現のアッセイ結果を示す。

20

【図 3 5】図 3 5 は p J C K 1 の構造を示す。

【図 3 6】図 3 6 は合成重鎖可変領域の作製を示す。

【図 3 7】図 3 7 は、重鎖小遺伝子座構成物 p I G M₁, p H C 1 および p H C 2 の略図である。

【図 3 8】図 3 8 は、重鎖小遺伝子座構成物 p I G G 1 並びに κ 軽鎖小遺伝子座構成物 p K C 1, p K V e 1 および p K C 2 の略図である。

【図 3 9】図 3 9 は、機能的に再配列された軽鎖遺伝子を再構成するための方策を表す。

【図 4 0】図 4 0 は血清 E L I S A 結果を表す。

【図 4 1】図 4 1 は、8 匹のトランスジェニックマウスからの血清の E L I S A アッセイの結果を表す。

30

【図 4 2】図 4 2 はプラスミド p B C E 1 の略図である。

【図 4 3】図 4 3 は、K L H-D N P (4 3 A), K L H (4 3 B) および B S A-D N P (4 3 C) に特異的な I g G および I g M レベルを測定することによる、K L H-D N P に対する本発明のトランスジェニックマウスの免疫応答を表す。

【図 4 4】図 4 4 は、ヒト癌胎児性抗原 (C E A) に結合しそしてヒト μ 鎖を含んで成る抗体の存在を証明する E L I S A データを示す：各パネルは、免疫処置後の指示日においてマウスから得られたプールした血清試料からの逆数系列希釈を示す。

【図 4 5】図 4 5 は、ヒト癌胎児性抗原 (C E A) に結合しそしてヒト γ 鎖を含んで成る抗体の存在を証明する E L I S A データを示す：各パネルは、免疫処置後の指示日においてマウスから得られたプールした血清試料からの逆数系列希釈を示す。

40

【図 4 6】図 4 6 は、ヒト癌胎児性抗原 (C E A) によって免疫処置された H C 1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた m R N A より生成された 2 3 個の無作為選択 c D N A の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列 (最上行) に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される (もしあれば)。重鎖 C D R 1, C D R 2 および C D R 3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

【図 4 7】図 4 7 は、ヒト癌胎児性抗原 (C E A) によって免疫処置された H C 1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた m R N A より生成された 2 3 個の無作為

50

選択 cDNA の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列（最上行）に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される（もしあれば）。重鎖 CDR1, CDR2 および CDR3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

【図 48】図 48 は、ヒト癌胎児性抗原（CEA）によって免疫処置された HC1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた mRNA より生成された 23 個の無作為選択 cDNA の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列（最上行）に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される（もしあれば）。重鎖 CDR1, CDR2 および CDR3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

10

【図 49】図 49 は、ヒト癌胎児性抗原（CEA）によって免疫処置された HC1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた mRNA より生成された 23 個の無作為選択 cDNA の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列（最上行）に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される（もしあれば）。重鎖 CDR1, CDR2 および CDR3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

20

【図 50】図 50 は、ヒト癌胎児性抗原（CEA）によって免疫処置された HC1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた mRNA より生成された 23 個の無作為選択 cDNA の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列（最上行）に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される（もしあれば）。重鎖 CDR1, CDR2 および CDR3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

30

【図 51】図 51 は、ヒト癌胎児性抗原（CEA）によって免疫処置された HC1 トランスジェニックマウスのリンパ系組織から得られた mRNA より生成された 23 個の無作為選択 cDNA の整列された可変領域配列を、生殖細胞トランスジェン配列（最上行）に比較して示す。各行において、生殖細胞配列に対するヌクレオチド変化は推定アミノ酸配列中の変化の上に表示される（もしあれば）。重鎖 CDR1, CDR2 および CDR3 に相当する領域が示されている。生殖細胞によってコードされないヌクレオチドは大文字で示されている。推定アミノ酸配列は、慣例的な一文字表記法を使ってヌクレオチド配列の下に与えられている。

【図 52】図 52 は、V_K 遺伝子セグメントを含有する vk65.3 と命名されたヒト DNA 断片のヌクレオチド配列を示す；V_K コード領域推定アミノ酸配列も示される；スプライシング配列と組換えシグナル配列（ヘプタマー／ノナマー）は枠内に示される。

40

【図 53】図 53 は V_K 遺伝子セグメントを含有する vk65.5 と命名されたヒト DNA 断片のヌクレオチド配列を示す；V_K コード領域推定アミノ酸配列も示される；スプライシング配列と組換えシグナル配列（ヘプタマー／ノナマー）は枠内に示される。

【図 54】図 54 は、V_K 遺伝子セグメントを含有する vk65.8 と命名されたヒト DNA 断片のヌクレオチド配列を示す；V_K コード領域推定アミノ酸配列も示される；スプライシング配列と組換えシグナル配列（ヘプタマー／ノナマー）は枠内に示される。

【図 55】図 55 は、V_K 遺伝子セグメントを含有する vk65.15 と命名されたヒト DNA 断片のヌクレオチド配列を示す；V_K コード領域推定アミノ酸配列も示される；スプライシング配列と組換えシグナル配列（ヘプタマー／ノナマー）は枠内に示される。

50

【図 5 6】図 5 6 は、同時に注入された 2 つの重複断片の間での相同組換えによる軽鎖小遺伝子座の形成を示す。s

【図 5 7】抗原結合の特異性を示す C E A 及び非 C E A 抗原と反応性あるモノクローナル抗体についての E L I S A の結果を示す。

【図 5 8】ヒト V D J 及びフウス恒常領域配列を有する写しを増幅するべく P C R により増幅された 1 0 個の C D N A の D N A 配列を示す。

【図 5 9】ヒト重鎖ミニ遺伝子座トランスジーン及びヒト κ ミニ遺伝子座トランスジーンの両方を支持するマウスから得た血清のさまざまな希釈度に対する E L I S A の結果を示している；マウスはヒト C D 4 で免疫化されたものであり、示されているデータは、ヒト C D 4 と反応性をもちそれぞれヒト κ 、ヒト μ 、又はヒト γ エピトープを有する抗体を表わしている。 10

【図 6 0】3 つのマウス遺伝子型について F A C S により決定される、ヒト μ 又はマウス μ についてのリンパ球染色の相対的分布を示す。

【図 6 1】3 つのマウス遺伝子型について F A C S により決定される、ヒト κ 又はマウス κ についてのリンパ球染色の相対的分布を示す。

【図 6 2】3 つのマウス遺伝子型について F A C S により決定される、マウス λ についてのリンパ球染色の相対的分布を示している。

【図 6 3】4 つのマウス遺伝子型について F A C S により決定される、マウス λ 又はヒト κ についてのリンパ球染色の相対的分布を示す。

【図 6 4】免疫化されていない 0 0 1 1 マウスの血清中のヒト μ 、ヒト γ 、ヒト κ 、マウス μ 、マウス γ 、マウス κ 、及びマウス λ 鎖の量を示す。 20

【図 6 5】さまざまな遺伝子型の免疫化されていない 0 0 1 1 マウスの血清中のヒト μ 、ヒト γ 、ヒト κ 、マウス μ 、マウス γ 、マウス κ 、及びマウス λ 鎖の量を示す散乱プロットを示している。

【図 6 6】0 0 1 1 マウスにおける抗ヒト C D 4 タイターを示す。

【図 6 7】ヒト C D 4 での 0 0 1 1 マウスの免疫化に続く免疫化後 3 週間目又は 7 週間目に採取した血清中の抗 C D 4 抗体内のヒト μ 、ヒト γ 、又はヒト κ 鎖を含む抗体力価を示す。

【図 6 8 A】ヒト重鎖ミニ遺伝子座トランスジーン P H C 1 及び P H C 2、及び軽鎖ミニ遺伝子座トランスジーン p K C 1, p K C 1 e 及び指示された部位で P K C 2 と C o 4 の間の相同組換えにより作り出された軽鎖ミニ遺伝子座トランスジーンの概略図である。 30

【図 6 8 B】ヒト重鎖ミニ遺伝子座トランスジーン P H C 1 及び P H C 2、及び軽鎖ミニ遺伝子座トランスジーン p K C 1, p K C 1 e 及び指示された部位で P K C 2 と C o 4 の間の相同組換えにより作り出された軽鎖ミニ遺伝子座トランスジーンの概略図である。

【図 6 9】S t o r b e t a l. (1989) 前掲書中、からとられた、ネズミラムダ軽鎖遺伝子座の連鎖地図を示す。点刻囲みは偽遺伝子を表わす。

【図 7 0】相同遺伝子ターゲティングによるマウス λ 遺伝子座の失活を概略的に表わしている。

【図 7 1】「免疫グロブリン遺伝子」、H o n j o, T, A l t, F W, 及び R a b b i t s T H (e d s) A c a d e m i c P r e s s, N Y (1989) p 129 から取られた B A L B / c マウス重鎖遺伝子座の地図を示す。構造遺伝子は上部ラインに閉じた囲みで示されている。第 2 及び第 3 のラインは表示された記号を伴って制限部位を示している。 40

【図 7 2】マウス重鎖遺伝子座 α 恒常領域遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

【図 7 3】マウス重鎖遺伝子座 J₄ 遺伝子内に 2 つの b p フレームソフトを導入するためのフレームシフトベクター（プラスミド B）の構成を示す。

【図 7 4】高度免疫中のトランスジェニック動物のアイソタイプ特異応答を示す。反応性のヒト μ 及び γ 1 の相対的レベルは、比色 E L I S A 検定法（y-軸）によって示されている。我々は、フロイントアジュバント中の C E A の腹腔内注入により、同型接合の J H D バックグラウンド内で 3 匹の生後 7 ~ 1 0 週目の雄の H C 1 系統 5 7 のトランスジェニ 50

ック動物（#1991, #2356, #2357）を免疫化した。図は、C E Aでコーティングされたマイクロタイターウェルに対するプールした血清（各注入に先立って収集したもの）の250倍希釈液の結合を描いている。

【図75】クラススイッチ組換えにより媒介されたトランスジーンでコードされた $\gamma 1$ アイソタイプの発現を示す。2つの異なるヒト $\gamma 1$ 発現ハイブリドーマ内の組込まれたトランスジーンのゲノミック構造は、 μ 及び $\gamma 1$ スイッチ領域の間の組換えと一貫性をもつ。図75は、3つのトランスジーン発現ハイブリドーマから分離したP a c 1 / S f i 1消化されたDNAのサザンブロットを示す。左から右へ：クローン92-09A-5H1-5、ヒト $\gamma 1^+ / \mu^-$ ；クローン92-90A-4G2-2、ヒト $\gamma 1^+ / \mu^-$ ；クローン92-09A-4F7-A5-2、ヒト $\gamma 1^- . \mu^+$ 。3つのハイブリドーマは全て、H C 1-57の組込みについて半接合でJ H D分断について同型接合の生後7カ月のマウス（マウス#1991）から誘導される。プロットは、ヒト $\gamma 1$ スイッチ領域の3'半部分にまたがる2.3 kbのB g I I I / S f i I [DNAフラグメントから誘導されたプローブでハイブリッド形成される。 μ 発現ハイブリドーマの中にはいかなるスイッチ産物も見い出せないが、2つの $\gamma 1$ 発現ハイブリドーマ92-09A-5H1-5及び92-09A-4G2-2は、それぞれ、5.1 kb及び5.3 kbのP a c I / S f i I [フラグメントを結果としてもたらすスイッチ産物を含む。

【図76】図76は、 μ から $\gamma 1$ へのクラススイッチを産生させることのできる考えられる2つの欠失メカニズムの図である。ヒト μ 遺伝子には、 μ を決失するべく組換えできる400 bpの直接的反復（ $\sigma \mu$ 及び $\Sigma \mu$ ）がフランキングしている。このメカニズムによるクラススイッチングはつねに6.4 kb t 11, ; bのP a c 1 / S f i Iフラグメントを生成するが、一方 μ 及び $\gamma 1$ スイッチ領域の間の組換えによるクラススイッチは、個々のスイッチ事象の間でサイズの変動を示しながら、4 kbと7 kbの間のP a c I / S f i Iフラグメントを生成する。図75で検討されている2つの $\gamma 1$ 発現ハイブリドーマは、 μ 及び $\gamma 1$ スイッチ領域の間で組換えを受けていると思われる。

【図77】トランススイッチにより生成されたキメラヒト/マウス免疫グロブリン重鎖を示す。トランススイッチ産物のcDNAクローンは、高度免疫されたH C 1トランスジェニック-J H Dマウス（#2357；動物及び免疫計画の説明については図74に対する凡例を参照のこと）から分離した脾臓とリンパ筋のRNAの混合物の逆転写及びP C R増幅により生成された。10個の無作為にとり出したクローンの部分的ヌクレオチド配列が示されている。小文字は、コードされた生殖細胞系を表わし、大文字は、既知の生殖細胞系配列に割当てることのできないヌクレオチドを示す。これらは体細胞突然変異、Nヌクレオチド又は切形Dセグメントであることが考えられる。両面タイプはマウス γ 配列を表わす。

【図78-1】図78および図79再配置されたV H 2 5 1トランスジーンが高度免疫されたものの中での体細胞突然変異を受けることを示している。図78では抗原に対する一次反応を図79では二次反応を示すC H 1系統26のマウスからのI g G重鎖可変領域cDNAクローンの部分的ヌタレオチド配列。生殖細胞系配列が上部に示され；生殖細胞系からのヌクレオチド変更は、各クローンについて表わされている。1つの周期は、生殖細胞系配列との同一性を示し、大文字はいかなる生殖細胞系源も同定されないことを示している。配列は、Jセグメントの用途に応じてまとめられている。Jセグメントの各々の生殖細胞系配列が示されている。C D R 3配列円の小文字はH C 1トランスジーン円に含まれている既知のDセグメントに対する同一性を表わす。割当てられたDセグメントは、各配列の最後に表されている。割当てされていない配列は、N領域の付加又は体細胞突然変異から誘導されうる。又は、場合によって、これらな単にあまりにも短かすぎて既知のDセグメントから無作為のN個のヌクレオチドを区別できないこともある。図78の一次応答：13の無作為にとり上げたV H 2 5 1- $\gamma 1$ cDNAクローン。生後4週間の雌のH C 1系統26-J H Dマウス（#2599）にK L H及び完全フロイントアジュバントを一回だけ注入した。5日後に脾臓細胞RNAを分離した。Vセグメントでグメント内の体細胞突然変異の電体的頻度は0.06%（2/3, 198 bp）である。図79の二次

10

20

30

40

50

応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後2カ月の雌HC1系統26-JHDマウス（#3204）に対して1カ月にわたり3回HEL及びフロイントアジュバントを注入した（一次注入は完全アジュバントで、又追加免疫は1週間目と3週間目に不完全アジュバントで）；4カ月後に脾臓とリンパ節のRNAを分離した。Vセグメント内での体液性突然変異の全体的頻度は1.6%（52/3.198bp）。

【図78-2】図78および図79再配置されたVH251トランスジーンが高度免疫されたもののなかでの体細胞突然変異を受けることを示している。図78では抗原に対する一次反応を図79では二次反応を示すCH1系統26のマウスからのIgG重鎖可変領域cDNAクローンの部分的ヌタレオチド配列。生殖細胞系配列が上部に示され；生殖細胞系からのヌクレオチド変更は、各クローンについて表わされている。1つの周期は、生殖細胞系配列との同一性を示し、大文字はいかなる生殖細胞系源も同定されないことを示している。配列は、Jセグメントの用途に応じてまとめられている。Jセグメントの各々の生殖細胞系配列が示されている。CDR3配列円の小文字はHC1トランスジーン円に含まれている既知のDセグメントに対する同一性を表わす。割当てられたDセグメントは、各配列の最後に表されている。割当てされていない配列は、N領域の付加又は体細胞突然変異から誘導される。又は、場合によって、これら単にあまりにも短かすぎて既知のDセグメントから無作為のN個のヌクレオチドを区別できないこともある。図78の一次
10
20
応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後4週間の雌のHC1系統26-JHDマウス（#2599）にKLH及び完全フロイントアジュバントを一回だけ注入した。5日後に脾臓細胞RNAを分離した。Vセグメント内での体細胞突然変異の電体的頻度は0.06%（2/3, 198bp）である。図79の二次
30
40
応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後2カ月の雌HC1系統26-JHDマウス（#3204）に対して1カ月にわたり3回HEL及びフロイントアジュバントを注入した（一次注入は完全アジュバントで、又追加免疫は1週間目と3週間目に不完全アジュバントで）；4カ月後に脾臓とリンパ節のRNAを分離した。Vセグメント内での体液性突然変異の全体的頻度は1.6%（52/3.198bp）。

【図79-1】図78および図79再配置されたVH251トランスジーンが高度免疫されたもののなかでの体細胞突然変異を受けることを示している。図78では抗原に対する一次反応を図79では二次反応を示すCH1系統26のマウスからのIgG重鎖可変領域cDNAクローンの部分的ヌタレオチド配列。生殖細胞系配列が上部に示され；生殖細胞系からのヌクレオチド変更は、各クローンについて表わされている。1つの周期は、生殖細胞系配列との同一性を示し、大文字はいかなる生殖細胞系源も同定されないことを示している。配列は、Jセグメントの用途に応じてまとめられている。Jセグメントの各々の生殖細胞系配列が示されている。CDR3配列円の小文字はHC1トランスジーン円に含まれている既知のDセグメントに対する同一性を表わす。割当てられたDセグメントは、各配列の最後に表されている。割当てされていない配列は、N領域の付加又は体細胞突然変異から誘導される。又は、場合によって、これら単にあまりにも短かすぎて既知のDセグメントから無作為のN個のヌクレオチドを区別できないこともある。図78の一次
30
40
応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後4週間の雌のHC1系統26-JHDマウス（#2599）にKLH及び完全フロイントアジュバントを一回だけ注入した。5日後に脾臓細胞RNAを分離した。Vセグメント内での体細胞突然変異の電体的頻度は0.06%（2/3, 198bp）である。図79の二次
40
50
応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後2カ月の雌HC1系統26-JHDマウス（#3204）に対して1カ月にわたり3回HEL及びフロイントアジュバントを注入した（一次注入は完全アジュバントで、又追加免疫は1週間目と3週間目に不完全アジュバントで）；4カ月後に脾臓とリンパ節のRNAを分離した。Vセグメント内での体液性突然変異の全体的頻度は1.6%（52/3.198bp）。

【図79-2】図78および図79再配置されたVH251トランスジーンが高度免疫されたもののなかでの体細胞突然変異を受けることを示している。図78では抗原に対する一次反応を図79では二次反応を示すCH1系統26のマウスからのIgG重鎖可変領域c

10

20

30

40

50

DNA クローンの部分的ヌクレオチド配列。生殖細胞系配列が上部に示され；生殖細胞系からのヌクレオチド変更は、各クローンについて表わされている。1つの周期は、生殖細胞系配列との同一性を示し、大文字はいかなる生殖細胞系源も同定されないことを示している。配列は、Jセグメントの用途に応じてまとめられている。Jセグメントの各々の生殖細胞系配列が示されている。CDR3配列円の小文字はHC1トランスジーン円に含まれている既知のDセグメントに對する同一性を表わす。割当てられたDセグメントは、各配列の最後に表されている。割当てされていない配列は、N領域の付加又は体細胞突然変異から誘導される。又は、場合によって、これら単にあまりにも短かすぎて既知のDセグメントから無作為のN個のヌクレオチドを区別できないこともある。図78の一次応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後4週間の雌のHC1系統26-JHDマウス（#2599）にKLH及び完全フロイントアジュバントを一回だけ注入した。5日後に脾臓細胞RNAを分離した。Vセグメント内での体細胞突然変異の電体的頻度は0.06%（2/3, 198bp）である。図79の二次応答：13の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。生後2カ月の雌HC1系統26-JHDマウス（#3204）に対して1カ月にわたり3回HEL及びフロイントアジュバントを注入した（一次注入は完全アジュバントで、又追加免疫は1週間目と3週間目に不完全アジュバントで）；4カ月後に脾臓とリンパ節のRNAを分離した。Vセグメント内での体液性突然変異の全体的頻度は1.6%（52/3, 198bp）。

【図80】図80および図81広範な体細胞突然変異がγ1配列に制限されていることを示している：体細胞突然変異及びクラススイッチはB細胞の同じ集団で発生する。CEAに対し高度免疫された（免疫化計画については図74参照）HC1系統57のトランスジェニック-JHDマウス（#2357）の脾臓及びリンパ節細胞から分離したVH251cDNAクローンの部分的ヌクレオチド配列。図80：IgM：23の無作為にとり上げたVH251-μcDNAクローン。CDRs1及び2の周囲残基を含む156bpのセグメントのヌクレオチド配列。体細胞突然変異の全体的レベルは0.1%（5/3, 744bp）である。図81：IgG：23の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。CDRs1～3及び周囲残基を含むセグメントのヌクレオチド配列。Vセグメント内の体細胞突然変異の全体的頻度は1.1%（65/5, 658bp）である。図80中のμ配列との比較のため；最初の156個のヌクレオチドに対する突然変異頻度は1.1%（41/3, 588bpである）。記号の説明については、図78及び79の凡例を参照のこと。

【図81-1】図80および図81広範な体細胞突然変異がγ1配列に制限されていることを示している：体細胞突然変異及びクラススイッチはB細胞の同じ集団で発生する。CEAに対し高度免疫された（免疫化計画については図74参照）HC1系統57のトランスジェニック-JHDマウス（#2357）の脾臓及びリンパ節細胞から分離したVH251cDNAクローンの部分的ヌクレオチド配列。図80：IgM：23の無作為にとり上げたVH251-μcDNAクローン。CDRs1及び2の周囲残基を含む156bpのセグメントのヌクレオチド配列。体細胞突然変異の全体的レベルは0.1%（5/3, 744bp）である。図81：IgG：23の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。CDRs1～3及び周囲残基を含むセグメントのヌクレオチド配列。Vセグメント内の体細胞突然変異の全体的頻度は1.1%（65/5, 658bp）である。図80中のμ配列との比較のため；最初の156個のヌクレオチドに対する突然変異頻度は1.1%（41/3, 588bpである）。記号の説明については、図78及び79の凡例を参照のこと。

【図81-2】図80および図81広範な体細胞突然変異がγ1配列に制限されていることを示している：体細胞突然変異及びクラススイッチはB細胞の同じ集団で発生する。CEAに対し高度免疫された（免疫化計画については図74参照）HC1系統57のトランスジェニック-JHDマウス（#2357）の脾臓及びリンパ節細胞から分離したVH251cDNAクローンの部分的ヌクレオチド配列。図80：IgM：23の無作為にとり上げたVH251-μcDNAクローン。CDRs1及び2の周囲残基を含む156bp

のセグメントのヌクレオチド配列。体細胞突然変異の全体的レベルは0.1% (5/3, 744 bp) である。図81: IgG: 23の無作為にとり上げたVH251-γ1cDNAクローン。CDRs 1~3及び周囲残基を含むセグメントのヌクレオチド配列。Vセグメント内の体細胞突然変異の全体的頻度は1.1% (65/5, 658 bp) である。図80中のμ配列との比較のため; 最初の156個のヌクレオチドに対する突然変異頻度は1.1% (41/3, 588 bp) である。記号の説明については、図78及び79の凡例を参照のこと。

【図82A】VH51P1及びVH56P1が、免疫化を受けていないマウス内の広範な体細胞突然変異を示す。生後9週目の免疫化を受けていない雌のHC2系統2550のトランスジェニック-JHDマウス (#5250) からのIgG重鎖可変領域cDNAクローンの部分的ヌクレオチド配列。19VH56p1でセグメントでの体細胞突然変異の全体的頻度は、2.2% (101/4, 674 bp) である。単一のVH51p1セグメント内の体細胞突然変異の全体的頻度は2.0% (5/246 bp) である。記号の説明については図78及び79に対する凡例を参照のこと。

【図82B】VH51P1及びVH56P1が、免疫化を受けていないマウス内の広範な体細胞突然変異を示す。生後9週目の免疫化を受けていない雌のHC2系統2550のトランスジェニック-JHDマウス (#5250) からのIgG重鎖可変領域cDNAクローンの部分的ヌクレオチド配列。19VH56p1でセグメントでの体細胞突然変異の全体的頻度は、2.2% (101/4, 674 bp) である。単一のVH51p1セグメント内の体細胞突然変異の全体的頻度は2.0% (5/246 bp) である。記号の説明については図78及び79に対する凡例を参照のこと。

【図83】分析された内因性Ig遺伝子座をもつ2重トランスジェニックマウスは、ヒトIgMκ陽性B細胞を含んでいる。異なる遺伝子型をもつ4匹のマウスの脾臓から分離された細胞のFACS。左欄: 対照マウス (#9944、生後6週目の雌、JH÷/-, JCκ÷/-; 異型接合野生型マウス重鎖及びκ-軽鎖遺伝子座、非トランスジェニック)。第2欄: ヒト重鎖トランスジェニック (#9877、生後6週目の雌JH-/-, JCκ-/-, HC2系統2550±; 分断されたマウスの重鎖及びκ-軽鎖遺伝子座について同型接合で、HC2トランスジーンについて半接合)。第3欄: ヒトκ-軽鎖トランスジェニック (#9878、生後6週目の雌JH-/-, JCκ-/-, KCο4系統4437÷; 分断されたマウスの重鎖及びκ-軽鎖遺伝子座について同型接合で、KCο4トランスジーンについて半接合)。右欄: 2重トランスジェニック (#9879、生後6週目の雌、JH-/--m JCκ-/-, HC2系統2550÷, KCο4系統4437÷; 分断されたマウスの重鎖及びκ-軽鎖遺伝子座について同型接合で、HC2及びKCο4トランスジーンについて半接合)。上段: マウスλ軽鎖 (x軸) 及びヒトκ軽鎖 (y軸) の発現について染色された脾細胞。第2段: ヒトμ重鎖 (x軸) 及びヒトκ軽鎖 (y軸) の発現について染色された脾細胞、第3段: マウスのμ重鎖 (x軸) 及びマウスのκ軽鎖 (y軸) の発現について染色された脾細胞。下段: マウスB220抗原の発現について染色された脾細胞のヒストグラム (対数蛍光: X軸: 細胞数: y軸)。2つの色図版の各々について、表示された象眼の各々の中の細胞の相対数は、ヨウ化プロピジウム染色及び光散乱に基づくe-パラメータゲートの百分率として与えられている。下段に表示されている試料の各々におけるB220÷細胞の分画は、リンパ球光散乱ゲートの百分率として与えられている。

【図84】2重トランスジェニックマウスの血清中の分泌された免疫グロブリンレベル。内因性重鎖及びκ-軽鎖遺伝子座分断について同型接合の18の個々のHC2/KCο4 2重トランスジェニックマウスからのマウスγ及びλ及びヒトμ、γ及びκ。マウス: (÷) HC2系統2550 (組込み1回につき最高5つのHC2コピー)、KCο4系統4436 (組込み1回につき1~2つのKCο4コピー); (○) HC2系統2550, KCο4系統4437 (組込み一回につき最高10個のKCο4コピー); (×) HC2系統2550, KCο4系統4583 (組込み一回につき最高5つのKCο4コピー); (□) HC2系統2572 (組込み1回につき30~50のHC2コピー、KCο4系統

10

20

30

40

50

4 4 3 7 ; (△) H C 2 系統 5 4 6 7 (組込み 1 回につき 2 0 ~ 3 0 個の H C 2 コピー、K C o 4 系統 4 4 3 7)。

【図 8 5】図 8 5 および図 8 6 ヒト抗原に対するヒト抗体応答を示す。図 8 5 : 組換え型ヒト可溶性 C D 4 に対する一次応答。ヒト I g M 及びヒト κ 軽鎖のレベルが、4 つの 2 重トランスジェニックマウスからの出血前 (○) 及び免疫化後 (●) の血清について報告されている。図 8 6 : インヒボでヒト I g G に対するスイッチが起こる。非特異的交叉反応性を阻害するべく 1 . 5 μ / m l の余分な I g E , κ 及び 1 % の正常なマウス血清の存在下で使用されたベルオキシダーゼ接合されたポリクローナル抗ヒト I g G を用いて、ヒト I g G (円) を検出した。ヒト κ 軽鎖 (正万形) は、1 % の正常なマウスの血清の存在下でベルオキシダーゼ接合されたポリクローナル抗ヒト κ 試薬を用いて、検出した。1 匹のマウス (# 9 3 4 : H C 2 系統 2 5 5 0 . K C o 4 系統 4 4 3 6) からの代表的結果が示されている。各々の点は、重複ウェルの平均からバックグラウンド吸収を引いたものを表わしている。 10

【図 8 6】図 8 5 および図 8 6 ヒト抗原に対するヒト抗体応答を示す。図 8 5 : 組換え型ヒト可溶性 C D 4 に対する一次応答。ヒト I g M 及びヒト κ 軽鎖のレベルが、4 つの 2 重トランスジェニックマウスからの出血前 (○) 及び免疫化後 (●) の血清について報告されている。図 8 6 : インヒボでヒト I g G に対するスイッチが起こる。非特異的交叉反応性を阻害するべく 1 . 5 μ / m l の余分な I g E , κ 及び 1 % の正常なマウス血清の存在下で使用されたベルオキシダーゼ接合されたポリクローナル抗ヒト I g G を用いて、ヒト I g G (円) を検出した。ヒト κ 軽鎖 (正万形) は、1 % の正常なマウスの血清の存在下でベルオキシダーゼ接合されたポリクローナル抗ヒト κ 試薬を用いて、検出した。1 匹のマウス (# 9 3 4 : H C 2 系統 2 5 5 0 . K C o 4 系統 4 4 3 6) からの代表的結果が示されている。各々の点は、重複ウェルの平均からバックグラウンド吸収を引いたものを表わしている。 20

【図 8 7】ヒト C D 8 + リンパ球からヒト C D 4 + リンパ球を弁別するハイブリドーマ上清を用いたヒト P B L の F A C S 分析を示す。

【図 8 8】トランスジェニックマウスの血清内のヒト α - C D 4 I g M a n f I g G を示す。

【図 8 9】トランスジェニックマウスの α - ヒト C D 4 ハイブリドーマモノクローナル、2 C 1 1 - 8 を R P A - T A 及び L e u - 3 A モノクローナルと比較する競合結合実験を示す。 30

【図 9 0】培養された 2 C 1 1 - 8 ハイブリドーマの I g 発現についての産生データを示す。

【図 9 1】遺伝子、例えば重鎖定常領域遺伝子を欠失するための相同組換えターゲティングトランスジーンの構造を概略的に示す。

【図 9 2】図 9 2 は、H C o 7 トランスジーンを構成するプラスミド挿入部 (i n s e r t s) の重複する組を示す。

【図 9 3 A】図 9 3 A は、p G P 2 b プラスミドベクターのヌクレオチド配列および制限酵素地図を示す。

【図 9 3 B】図 9 3 B は、p G P 2 b プラスミドベクターの制限酵素地図を示す。 40

【図 9 4】図 9 4 (部分 A および B) は、大きいトランスジーンを組み立てるためのクローニング法を示す。

【図 9 5】図 9 5 は、大きな挿入部が、高複写 (h i g h - c o p y) p U C 誘導プラスミドにおいて不安定であることを示す。

【図 9 6】図 9 6 は、ファージ P 1 クローン P 1 - 5 7 0 を示す。挿入部は、スイッチ要素と共に、γ 3 および γ 1 をカバーするヒト重鎖定常領域の部分に及ぶ。N、N o t I ; S、S a l I、X、X h o I。

【図 9 7】図 9 7 は、H C o 7 トランスジェニック創立動物におけるヒト μ および γ 1 の血清発現を示す。

【図 9 8】図 9 8 は、H C o 7 / K C o 4 二重トランスジェニック / 二重欠失マウスにお 50

けるヒト免疫グロブリンの血清発現を示す。

【図 99】図 99 は、HC o 7 トランスジェニックマウス脾臓 RNA におけるヒト $\gamma 1$ および $\gamma 3$ 転写の RT-PCR 欠失を示す。

【図 100】図 100 は、インビトロでの LPS および IL-4 によるヒト IgG1 および IgG3 の誘導を示す。

【図 101】図 101、YAC-DNA の濃縮のためのアガロースゲル電気泳動装置。

【図 102】図 102、HC2/KC o 5/JHD/JKD および HC2/KC o 4/JHD/JKD マウスからの骨髄細胞の二色 FACS 分析。B220⁺/CD43⁻、B220⁺/CD43⁺ および B220⁺/IgM⁺ ゲートのそれぞれにおける細胞の画分はパーセントで示される。

【図 103】図 103、HC2/KC o 5/JHD/JKD および HC2/KC o 4/JHD/JKD マウスからの脾臓細胞の二色 FACS 分析。B220^{明るい}/IgM⁺ および B220^{曇っている}/IgM⁺ ゲートのそれぞれにおける細胞の画分はパーセントで示される。

【図 104】図 104、IgGk 抗-nCD4 モノクローナル抗体の CD4⁺ SupT1 細胞への結合。

【図 105】図 105、フローサイトメトリーによる IgG 抗-nCD4 モノクローナル抗体のエピトープ測定。SupT1 細胞は、緩衝液（左のカラム）、2.5 mg/ml RPA-T4（真中のカラム）または 2.5 mg/ml Leu3a（右のカラム）で、次いで 10 のヒト IgG モノクローナル抗体（1:2 に希釈した上清中）の 1 つまたはキメラ Leu3a で、プレインキュベートされた。3 つの典型的ヒト IgG モノクローナル抗体についての結果をこの図に示す。

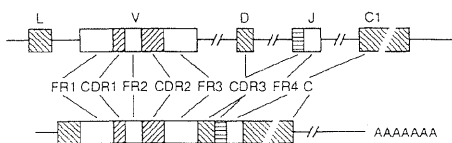
【図 106】図 106、ヒト IgGk 抗-CD4 モノクローナル抗体による MLR の阻害。本発明のトランスジェニックマウスを、下記の表 B 及び C から選択されたヒト抗原により免疫する。トランスジェニックマウスは前記ヒト抗原に結合するヒト抗体を生産する。免疫されたトランスジェニックマウスからの B 細胞を用いて、前記選択されたヒト抗原に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製する。

10

20

【図 1】

図 1



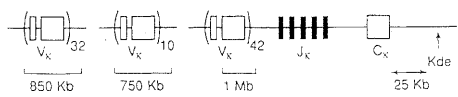
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



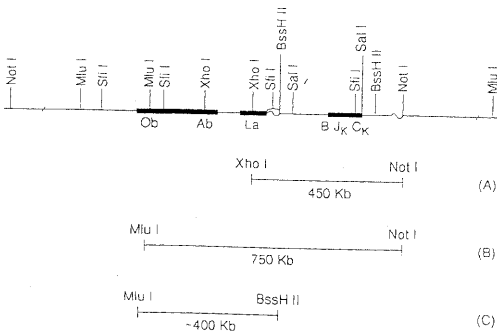
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【図 4】

図 4

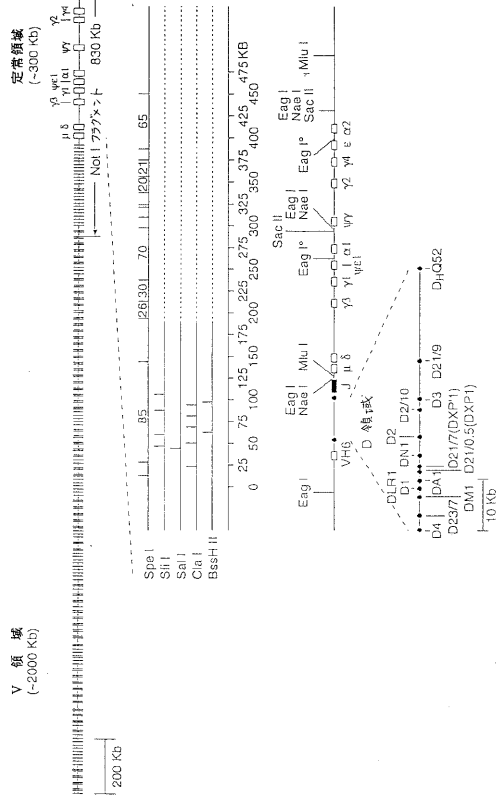
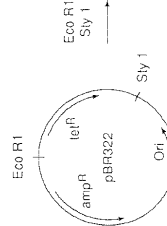
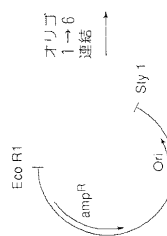
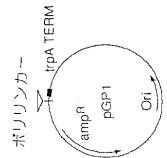


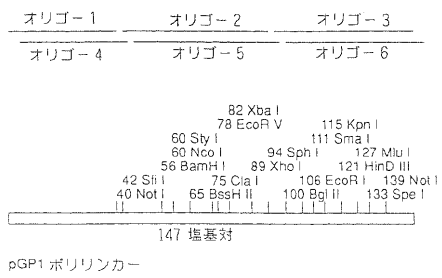
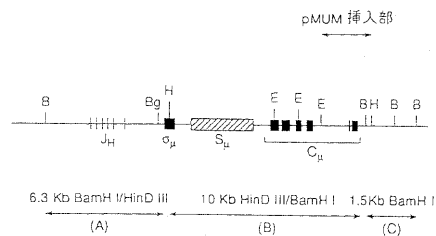
図 4

V 領域
(~2000 Kb)

【図 7】

図 7



【図 8】
図 8【図 9】
図 9ヒト μ 遺伝子座

【図 10】

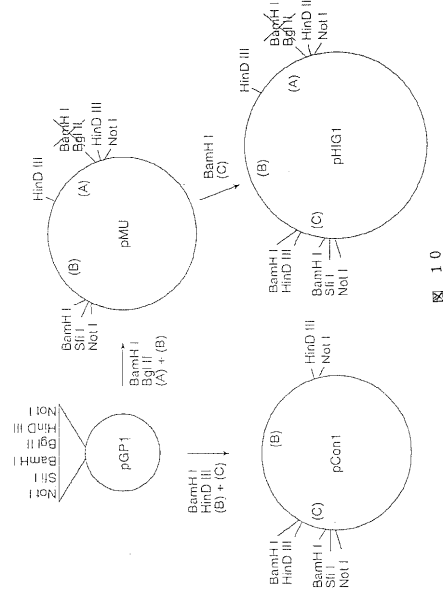
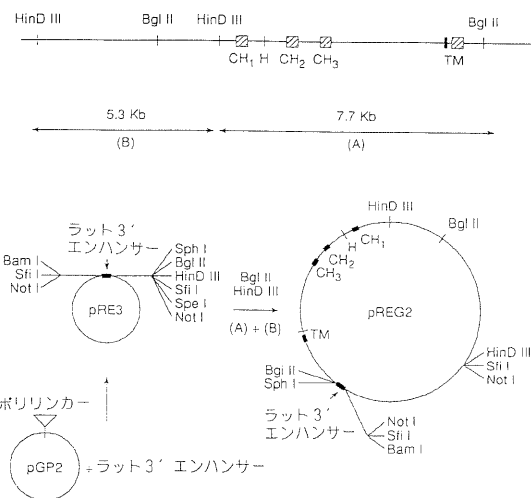
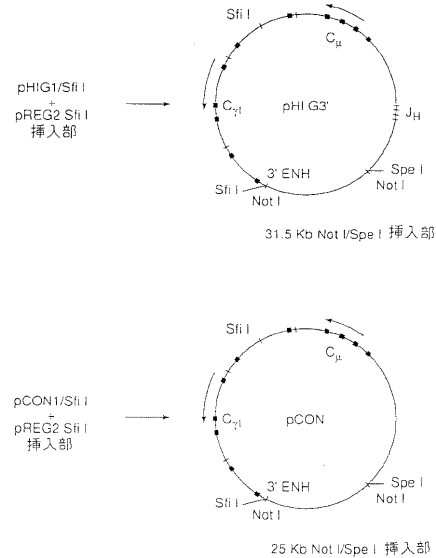
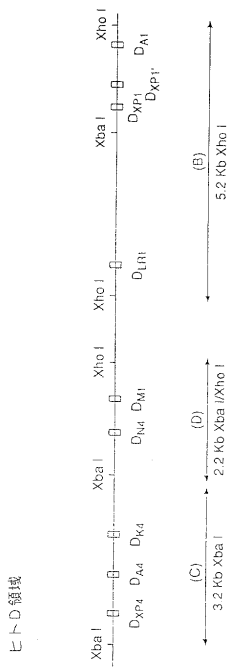


図 10

【図 11】
図 11ヒト γ 遺伝子【図 12】
図 12

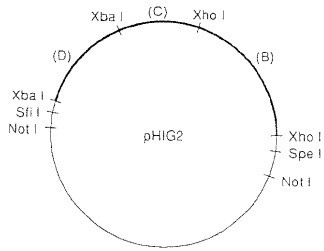
【図 13】

図 13



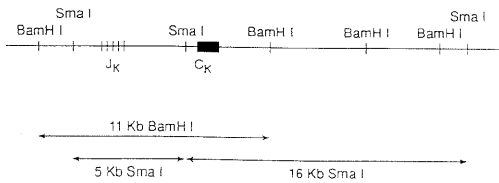
【図 14】

図 14



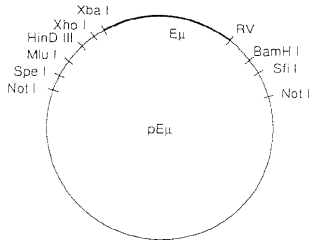
【図 15】

図 15



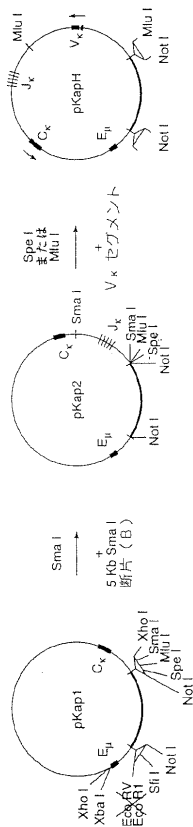
【図 16】

図 16



【図 17】

図 17



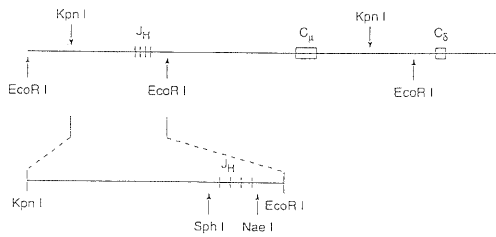
【図 18】
マウス重鎖遺伝子座

図 18

【図 19】

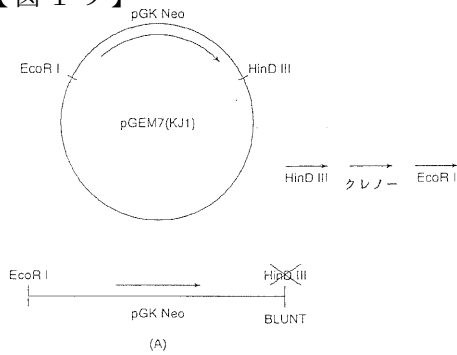


図 19

【図 20】

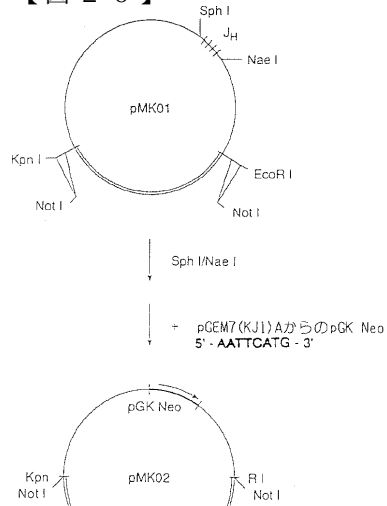


図 20

【図 21】

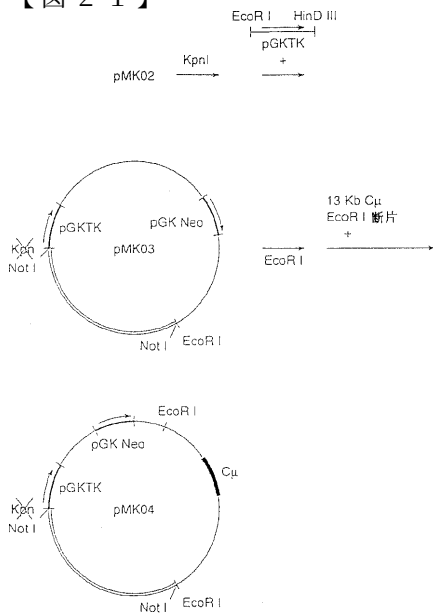


図 21

【図 22】

マウスカッパー遺伝子

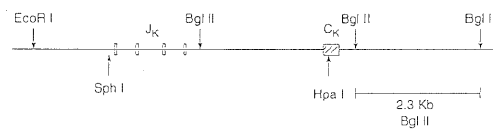


図 22

【図 23】

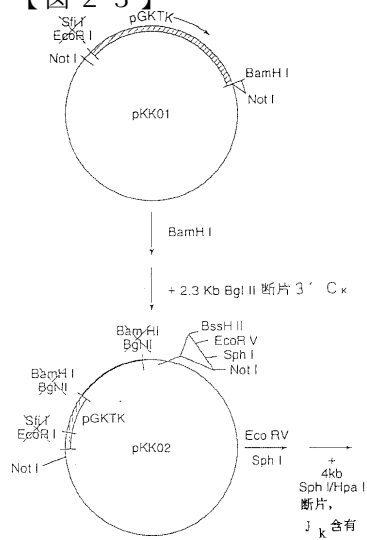


図 23

【図 24】

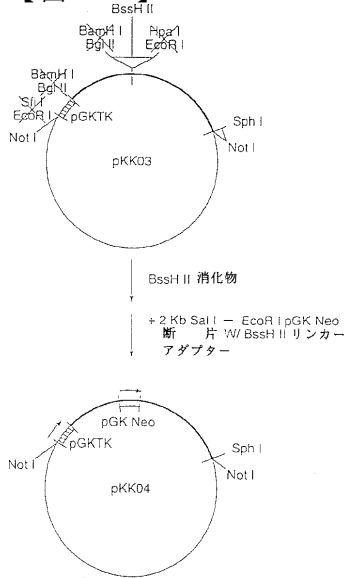


図 24

【図 25】

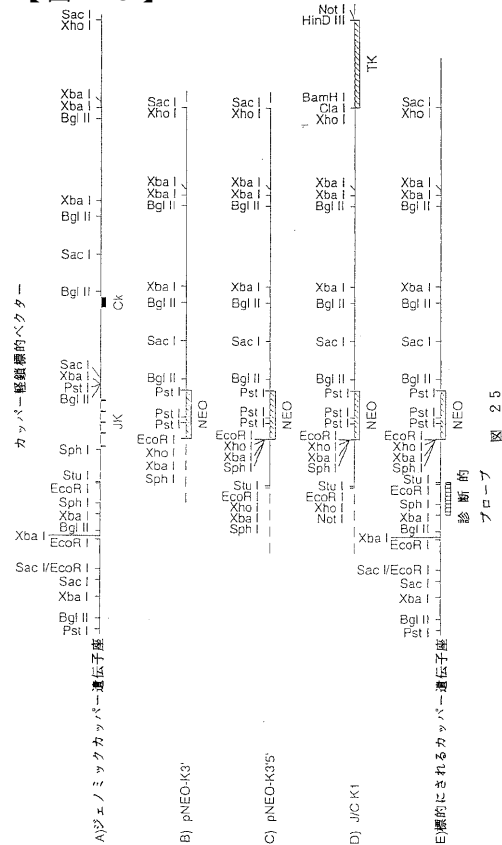


図 25

【図 26】

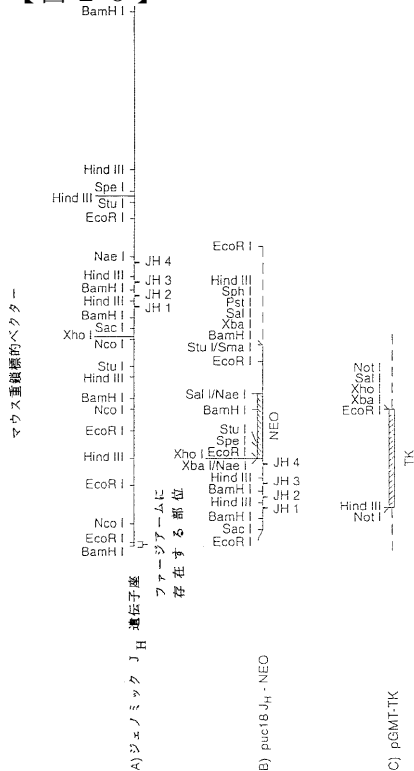


図 26

【図 27】

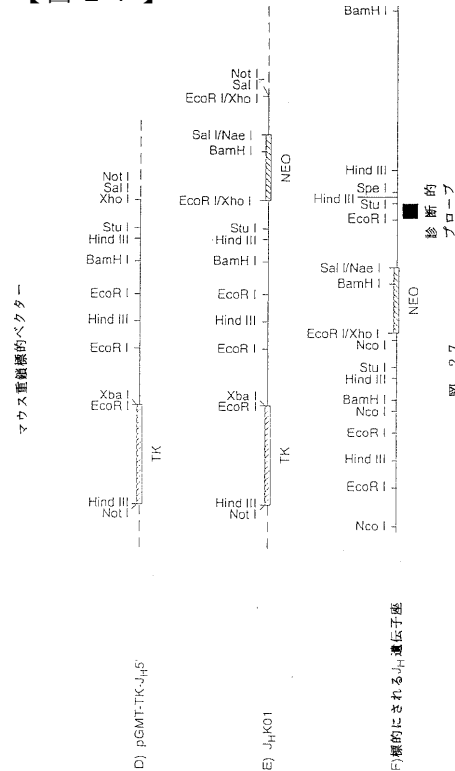
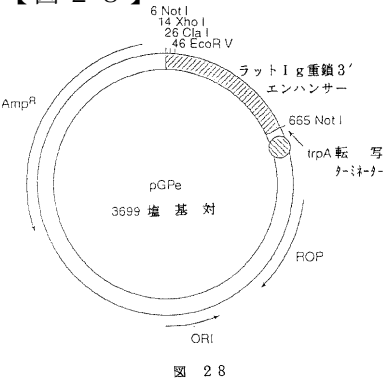
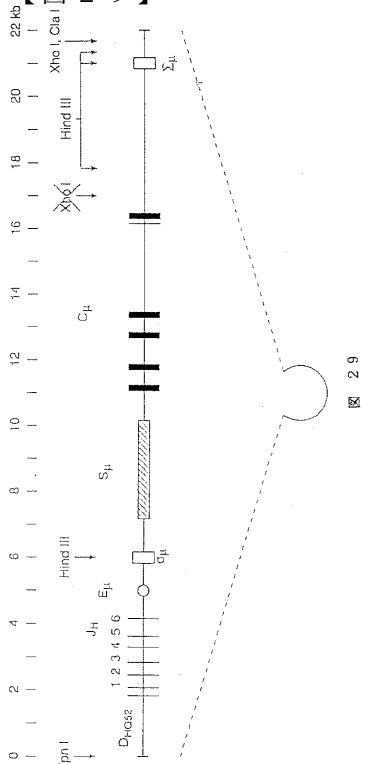


図 27

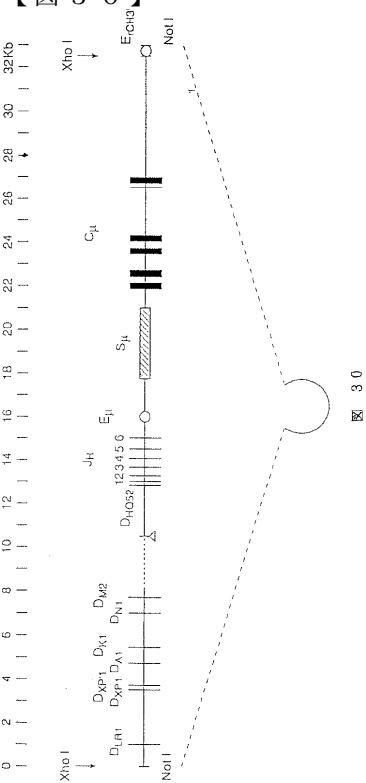
【図 28】



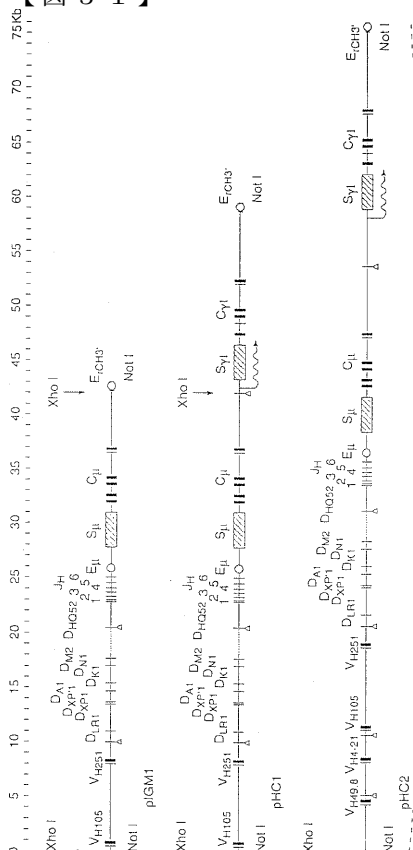
【図 29】



【図 30】



【図 31】



【図 37】

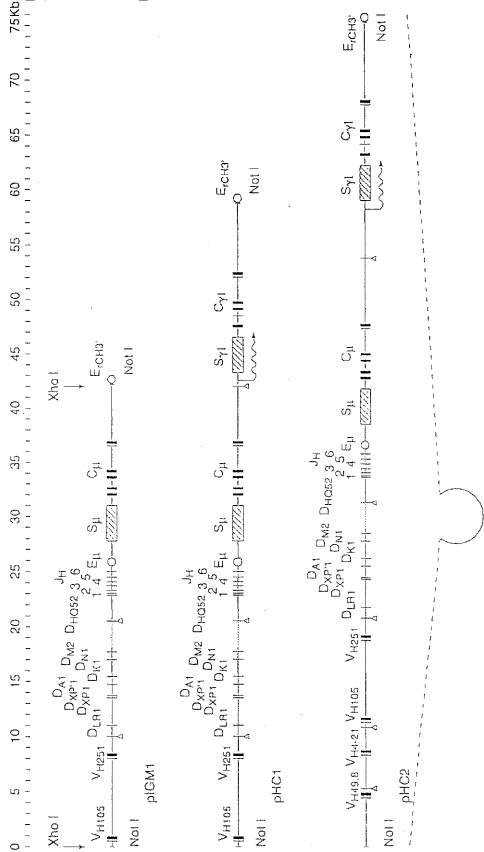


図 37

【図 38】

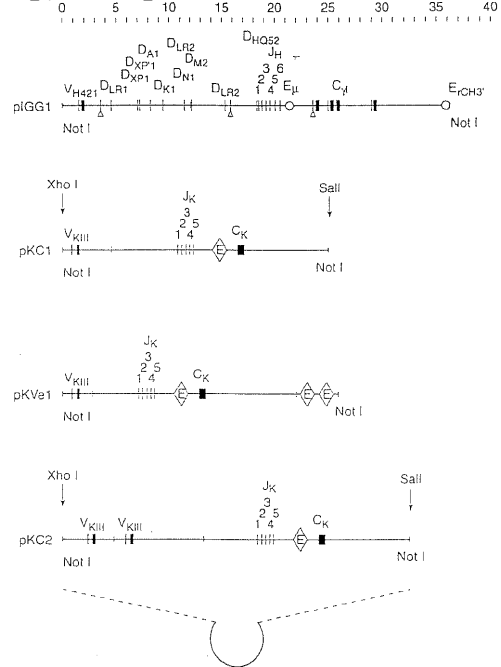


図 38

【図 39】

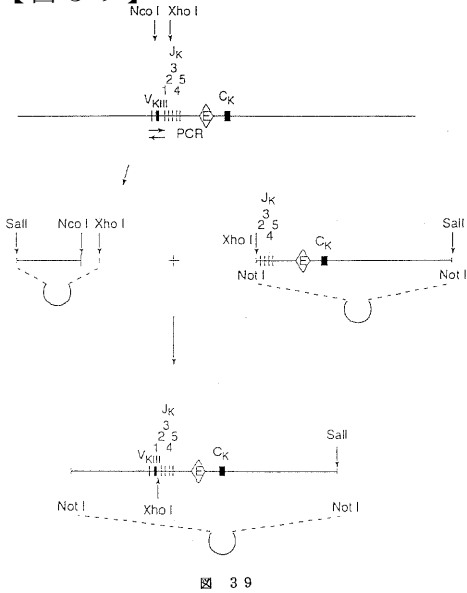


図 39

【図 40】

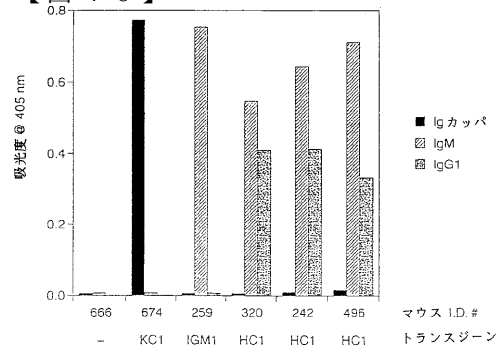


図 40

【図 41】

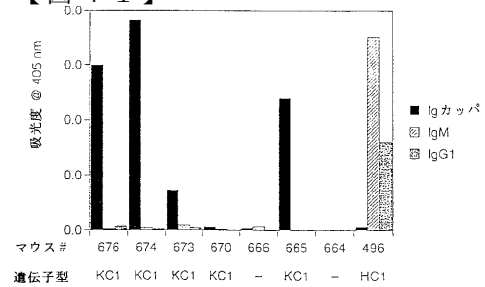


図 41

【図 4 2】

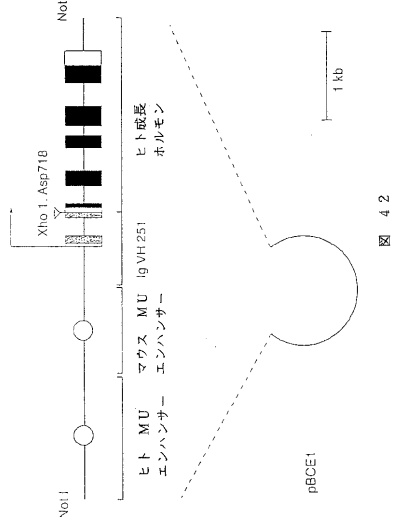


図 4 2

【図 4 3】

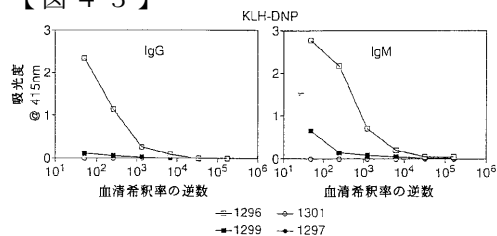


図 4 3 A

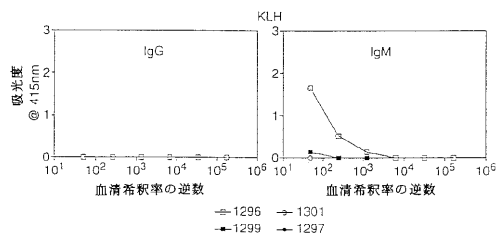


図 4 3 B

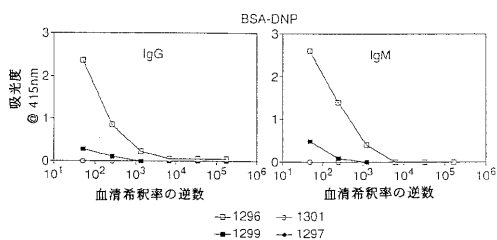


図 4 3 C

【図 4 4】

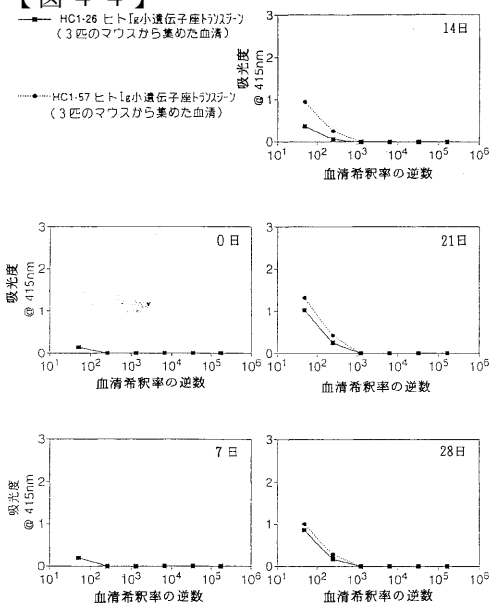


図 4 4

【図 4 5】

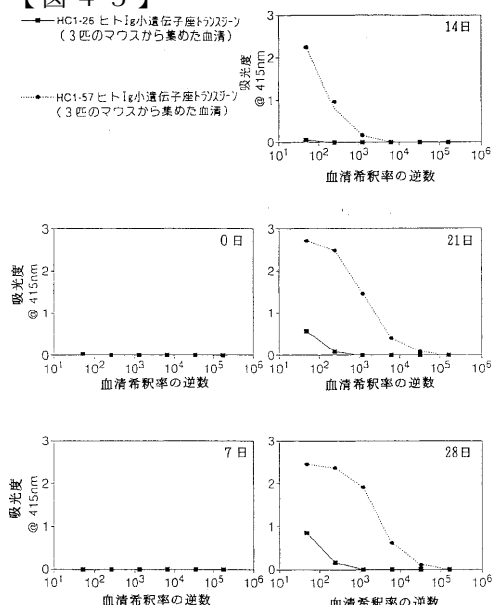


図 4 5

[illegible]

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515

[illegible][illegible]

46 ~ 51

52

46 ~ 51

图 5-3

【図 5 4】

CCGCCCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCCGCCCTGC AGTCCAGAGC 50
C(ATATCAAT) GCCTGGGTCA GAGCTCTGGA GAAGAGCTGC TCAGTTAGGA 100
ACCCCCAGAGG GAACCATGGA AACCCAGCG CAGCTTCTCT TCCTCTGCT 150
MetGl uThrProAla GlnLeuLeuP heLeuLeuLe
ACTCTGGCTC CAGGtgagg ggaacatggg atggttttgc atgtcagtga 200
uLeuTrpLeu Pro
aaaccctctc aagtcttgtt acctgggaac tctgctcagt caatacaata 250
attaagactc aatataaagc aataattctg gctctttctg gaagacaatg 300
ggtttgattt agattacatg ggtgactttt ctgttttatt tccaatctca 350
gATACACCG GAGAAATTGT GTTGACGCAG TCTCCAGGCA CCCTGTCITT 400
AspThrThrG lyGluIleVa lLeuThrGln SerProGlyT hrLeuSerLe
GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCTCG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA 450
uSerProGly GluArgAlaT hrLeuSerCy sArgAlaSer GlnSerValS
GCAGCAGCTA CTTAGCCTGG TACCAGAGA AACCTGGCCA GGCTCCAGG 500
erSerSerTy rLeuAlaTrp TyrGlnGlnL ysProGlyGl nAlaProArg
CTCCTCATCT ATGGTGATC CAGCAGGGCC ACTGGCATCC CAGACAGGTT 550
LeuLeuIleT yrGlyAlaSe rSerArgAla ThrGlyIleP roAspArgPh
CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC TCTCACCATC AGCAGACTGG 600
eSerGlySer GlySerGlyT hrAspPheTh rLeuThrIle SerArgLeuG
AGCCTGAAGA TTTTGAGTGT TATTACTGTC AGCAGTATGG TAGCTCACCT 650
luProGluAs pPheAlaVal TyrTyrCysG lnGlnTyrGl ySerSerPro
CC(CACAGTGA) TTCAGCTTGA A(CAAAAAC) TCTGCAAGAC CTTATTGTT 700
TACTAGATTA TACCAGCTGC TTCCTTACA GATAGCTGCT GCAATGACAA 750
CTCAATTAG CATCTCTCTC TGCTTGGGCA TTTTGGGGAT CTAAAAAAG 800
TAATCCCTTG ATATATTTTT GACTCTGATT CCTGCATTTT TCCTCAGACC 850
AAGATGGACA GCCAGGTTTA AGCAGAGTTT CACAGTAATG GCCACTGGAT 900

図 5 4

【図 5 5】

AAACACATTC TCTGCAGACA AATTTGAGCT ACCTTGATCT TACCTGGACA 50
GGTGGGGACA CTGAGCTGGT GCTGAGTTAC TCAGATGCGC CAGCTCTGCA 100
GCTGTGCCCC GCCTGCCCCA TCCCCTGCTC ATTTGCATGT TCCAGAGCA 150
CAACCTCTG CCCTGAAGCC TTATTAATAG GCTGGTCAGA CTTTGTGAG 200
GAATCAGACC CAGTCAGGAC ACAGCATGGA CATGAGGGTC CTCGCTCAGC 250
MetAs pMetArgVal LeuAlaGlnL
TCCTGGGGCT CCTGCTGCTC TGTTTCCAG gtaaggatgg agaocactag 300
eLeuGlyLe uLeuLeuLeu CysPhePro
cagtttactc agcccagggt gctcagtact gctttactat tcagggaat 350
tctcttcaaa catgattaat tegtgtggaco tttgttttta tgtttccaat 400
ctcagGTGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT 450
GlyAla ArgCysAspI leGlnMetTh rGlnSerPro SerSerLeuS
CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTGTCTGGGC GAGTCAGGGT 500
erAlaSerVa lGlyAspArg ValThrIleT hrCysArgAl aSerGlnGly
ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG AAACCAGAGA AAGCCCTAA 550
IleSerSerT rpLeuAlaTr pTyrGlnGln LysProGluL ysAlaProLy
GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT 600
sSerLeuIle TyrAlaAlaS erSerLeuGl nSerGlyVal ProSerArgP
TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTCCA CTCACCAT CAGCAGCTG 650
heSerGlySe rGlySerGly ThrAspPheT hrLeuThrIl eSerSerLeu
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC 700
GlnProGluA spPheAlaTh rTyrTyrCys GlnGlnTyrA snSerTyrPr
ACC(CACAGTG) TTACACACCC AAACATAAAC C(CCCAGGGA) GCAGATGTGT 750
o
GAGGCTGGGC TGCCCCAGCT GCTTCTCTG ATGCCTCCAT CAGCTGAGAG 800
TGTTCTCTAG ATGCAGCCAC ACTCTGATGG TGTTGGTAGA TGGGGAC 847

図 5 5

【図 5 6】

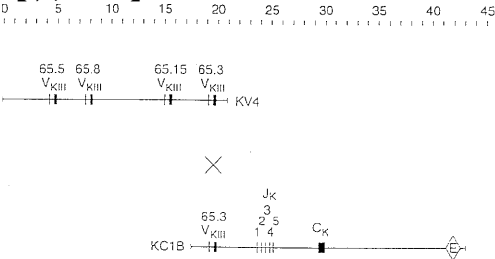


図 5 6

【図 5 7】

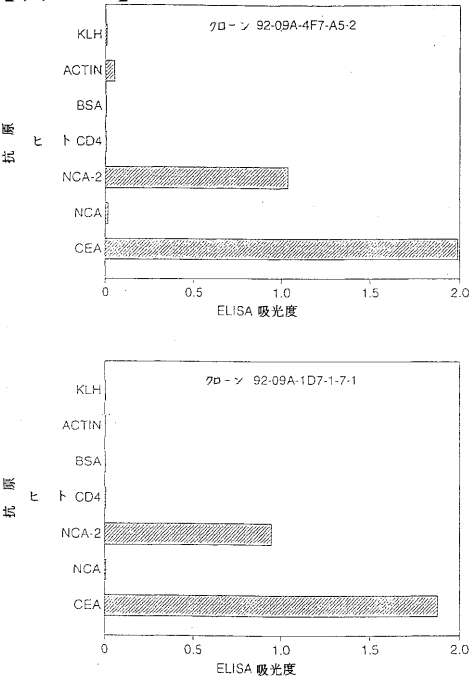
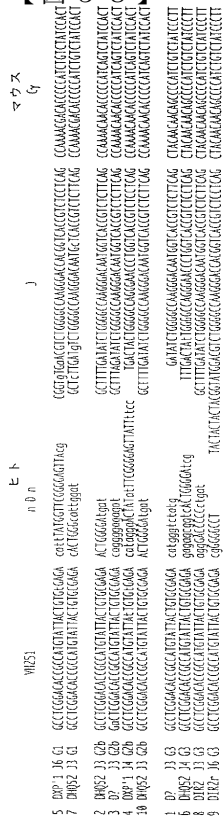


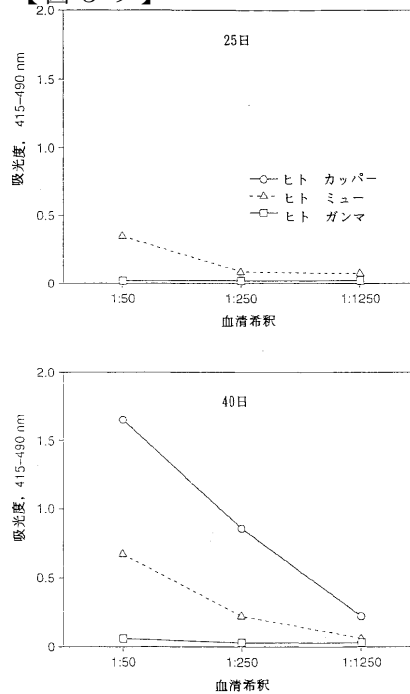
図 5 7

【图 5 8】



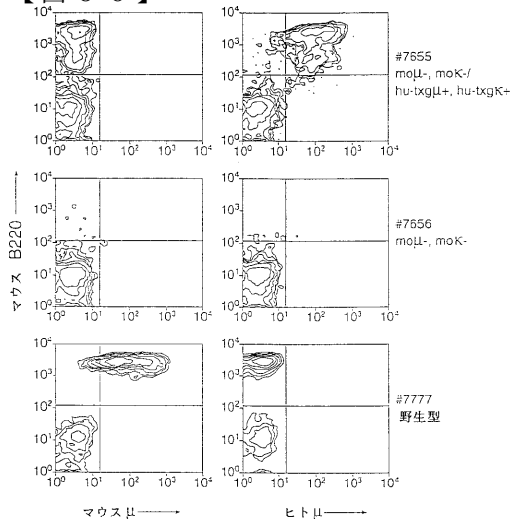
85 ☒

【图 5 9】



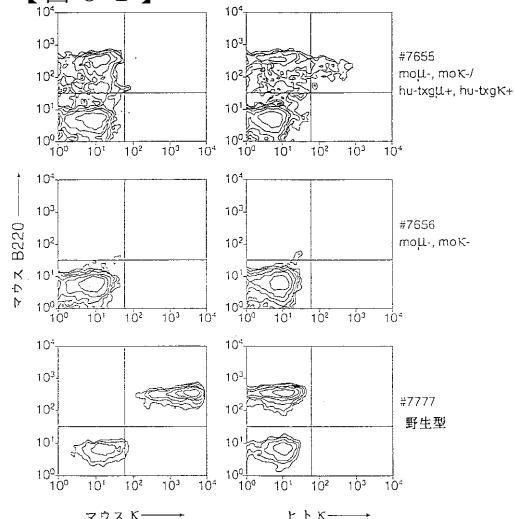
59

【图 6 0】



60

【図 6 1】



61

【図 6 2】

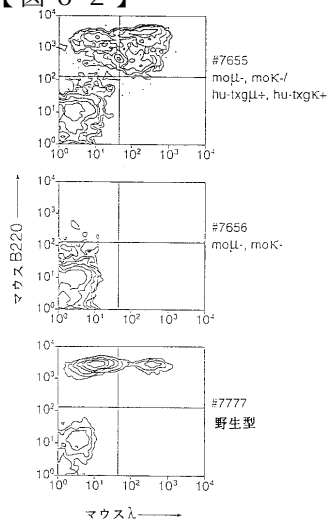


図 6 2

【図 6 3】

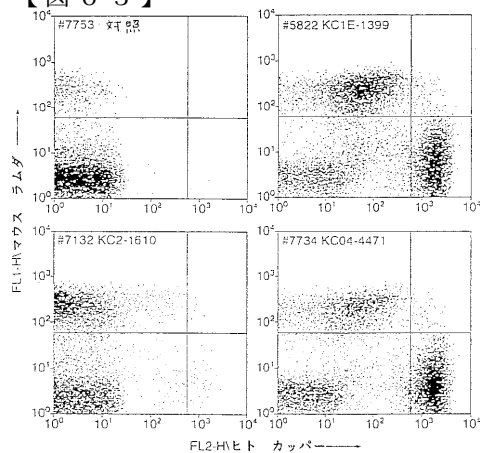


図 6 3

【図 6 4】

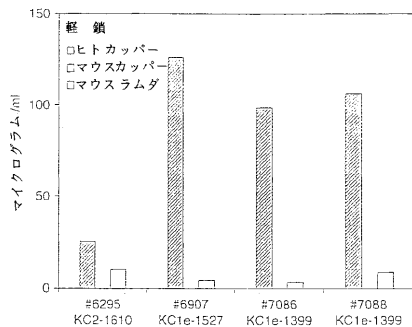
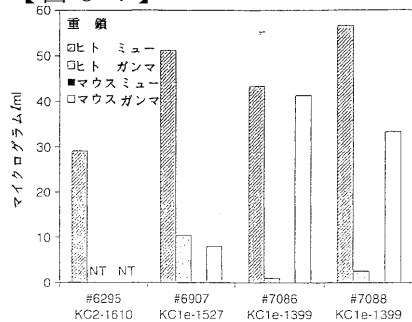


図 6 4

【図 6 5】

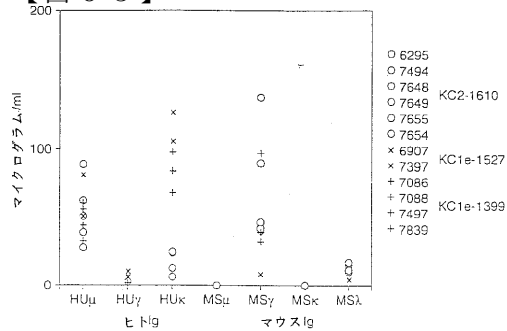


図 6 5

【図 6 6】

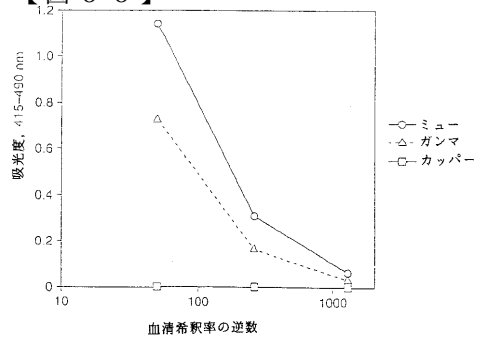


図 6 6

【図 67】

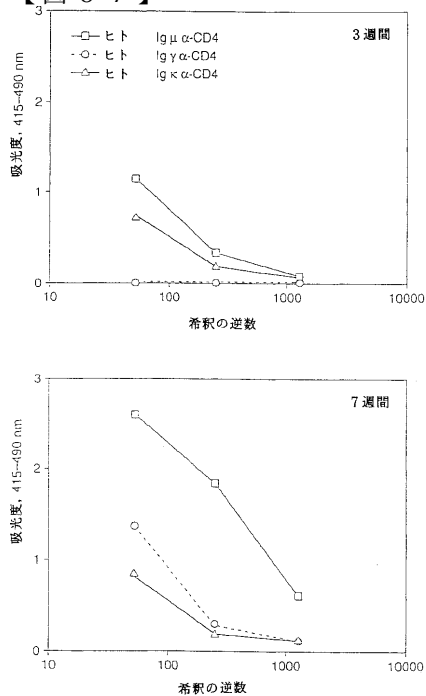


図 67

【図 68 A】

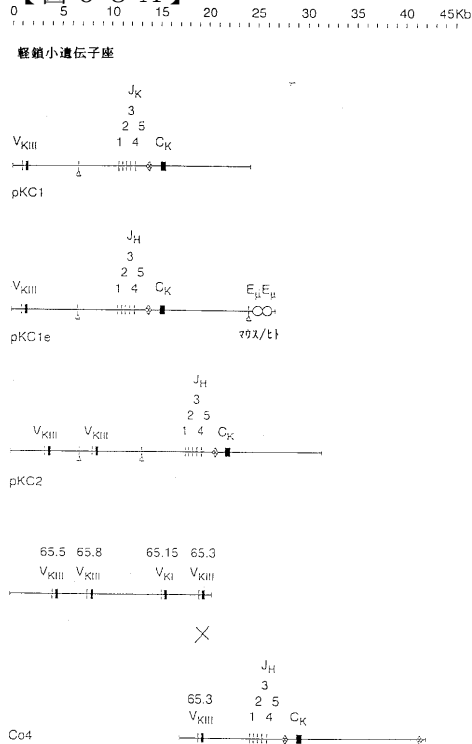


図 68 A

【図 68 B】

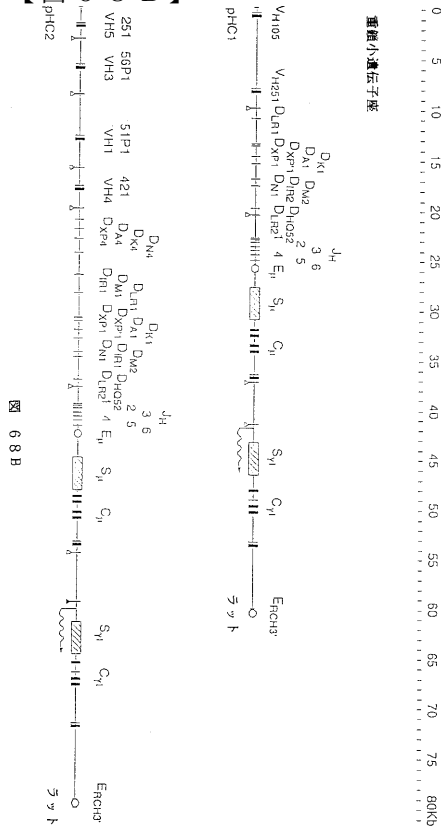


図 68 B

【図 69】

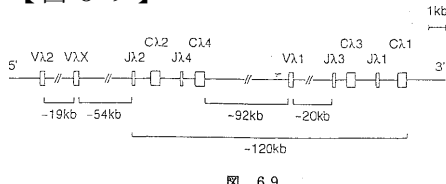


図 69

【図 70】

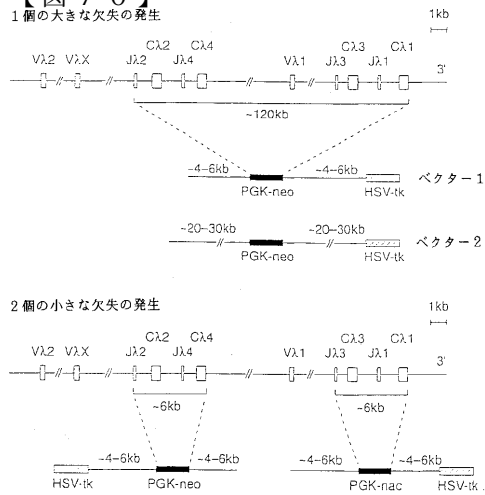
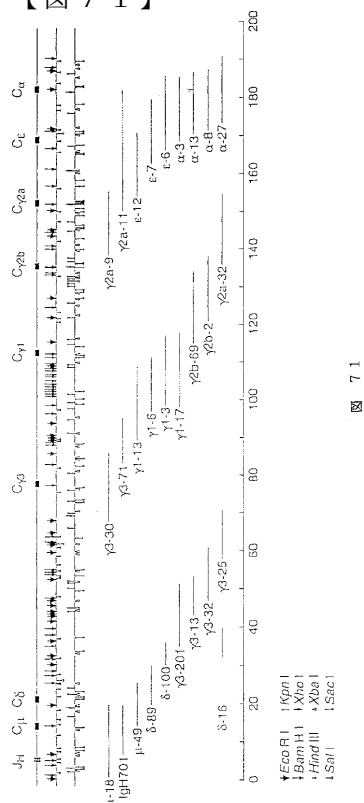


図 70

【图 7-1】



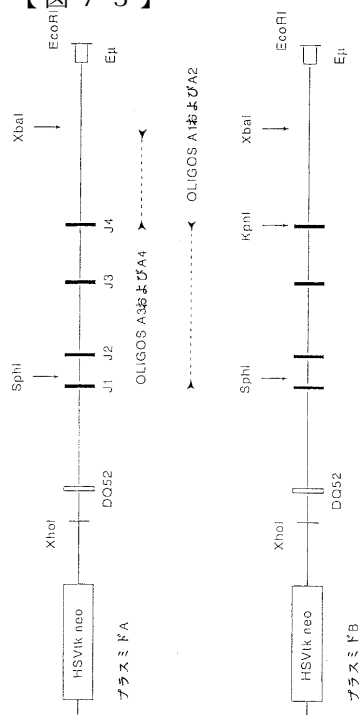
71

【图 7 2】

CTGAGGGGCGGGGGGAAGCTACTATCCAGGCAGGTTTATAGTTCCAGAGCTCGCGA
 AATCCCACTATTCACCTAGCATCCCAACAGCTCGTGCGAGTATCCCGTGATAAT
 CGGCTGCTGATTACCACTGATCTTCCCTTCGGCAGCATGAATGTGACCTGGGGAAGAG
 TGGGAAGGATATACCACCTGAACCTTTCACCTGCCCTCGCTCTGGGGAGGCTACAC
 CATGAGCAGGCAGTAACTCTGCTCGAGCTGTGAGTGCCACAGAAGGAGTCCGTGAAATCT
 TTCCTGCAACATGACCTCTAACCCGCTCAGAAGTTGGATGTAGCTGTCTGTGAAAGA
 ACCTTAGGGGGTCACTGAGGCGGTGGGAATGACTTCACTTATGTAGTCAATATATCCCT
 CTGATGCACACCTCACAGGAATCCCTCAGAAACCTCCACTATGGGGATTTGGGGGAAGGA
 AGCTAAACAGGCTTGAAGGAGGCTGAGGGCTTCAGAAACATCAGAAACGGGACAGCAA
 AGGACAGCAAGGAGACATCTATTGTTCTAGGACATCTCTGTTACAGSTCTACTCTCTCT
 CTCTCTCTATTATCTTCTCTCTGCCAGGCCAGCTCTGACTCGACGGCCGACCTTTG
 AGGACGTGCTCTGGGTTAGAGTGCAGCTACATGTACTCTGAATGGCTCAGAAATCT
 CTGAGGGGAGCTGTTCTCATCTGGGAGCCCTCACTGGGGAAGGATCGCTCAGAAAGAA
 CTGGCCAGAATTTCTGCGCTGTACAGTTGTGTCGAGCTCTGCCGTGGCTGTGCTGAG
 GCTGGAACAGTGGCGCATCTTCAAGTGCAAGTTACCATCTCTGATCTGGCACCTTAA
 CTGGCCAAATGTCGAAGTACAGGTGAGCTGAGCTATGATACGATACAGGACATCTGATGAGCT
 TCCCTCTCACTGCTCCCTTCTTCTCTATATAGCATGCTCMAACTACTCTCTATGCT
 CTTATATCACAGAGGAAATGGAGCTATCTGAGGAAGTCCCAAGAGGGAAGGCGAG
 GGGCTCTGCTCTCTTTGTCGAGCCATACTCTTTTCTACTCTCTAGTGAACACTTTC
 CACCCCGAGTGCACCTGCTACCTCCGCCCTCGGAGGAGCTGGCCCTGAATGAGCTCTG
 TCCCTGACATGCTGGTGCGAGCTTTCAACTTAAAGAGAGCTGGTGCGAGTGCTGATCT
 GGAATGAGGAGCTCTCCACAGAAAGCTACCTAGTGTTTGAGCCCCAAGGAGCCAGGC
 GAGGGAGCCACCACTCACTGGTGACAGGCTGTGCTGTGATCAGCTGAACCTGGAAA
 CAGGGTGACAGTACTCTGTGCGGTAAACCCACCAATGTCAGCGTGTCTGTGATCATGTC
 AAGACGATCAGCGCTCTGTGGGTAAACCCACCAATGTCAGCGTGTCTGTGATCATGTC
 GAGGAGATGGCATCTGCTATGAGCCACCTGCTCTGCTCTACTCTAGTAATAAACTCT
 GTGCTATCACAAAGTATCCCTGAGCTTCCACCTGCTCTCCACCATCTGGGCTCTA
 CGAAACACAGGAGGAGTGGAGCCCTCAGGAGGAGGAGAAATACACCACTTAAGC

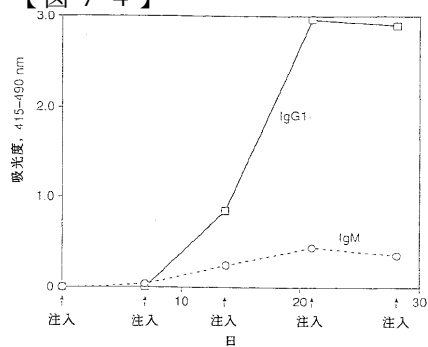
72

【图 7 3】

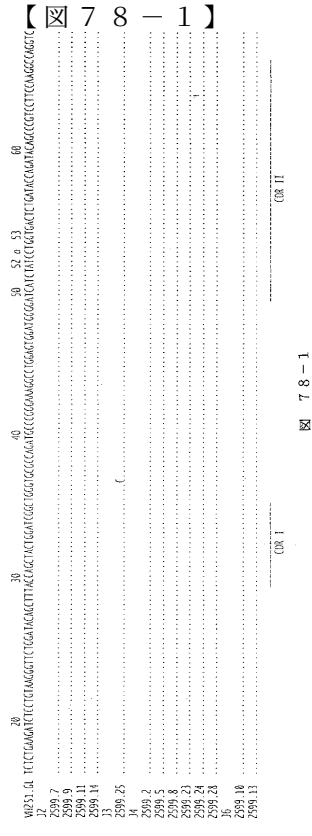
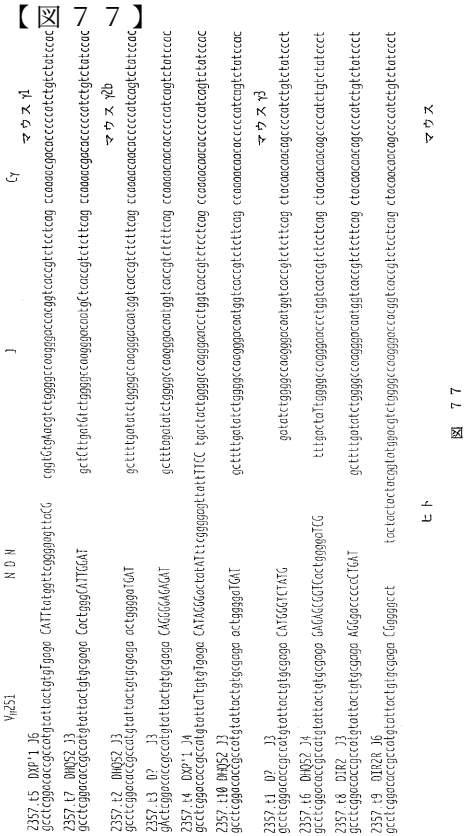
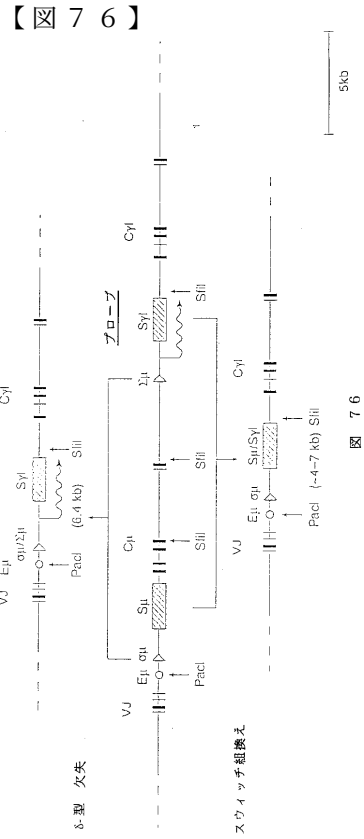
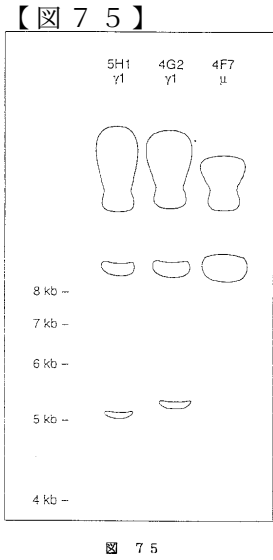


73

【圖 7 4】



74



70	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA	80	a b c 83	90	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA
71		81		91	
72		82		92	
73		83		93	
74		84		94	
75		85		95	
76		86		96	
77		87		97	
78		88		98	
79		89		99	
80		90		100	

図 7 8 - 2

70	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA	80	a b c 83	90	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA
71		81		91	
72		82		92	
73		83		93	
74		84		94	
75		85		95	
76		86		96	
77		87		97	
78		88		98	
79		89		99	
80		90		100	

図 7 9 - 2

70	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA	80	a b c 83	90	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA
71		81		91	
72		82		92	
73		83		93	
74		84		94	
75		85		95	
76		86		96	
77		87		97	
78		88		98	
79		89		99	
80		90		100	

図 7 9 - 1

70	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA	80	a b c 83	90	ATCTCTGACCTGACAGATCATACAGACCTCCCTACCTGACAGACCTTGACAGACCTCATGATATCTGACGA
71		81		91	
72		82		92	
73		83		93	
74		84		94	
75		85		95	
76		86		96	
77		87		97	
78		88		98	
79		89		99	
80		90		100	

図 8 0

[illegible][illegible]

78	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

[illegible]

【図 8 3】

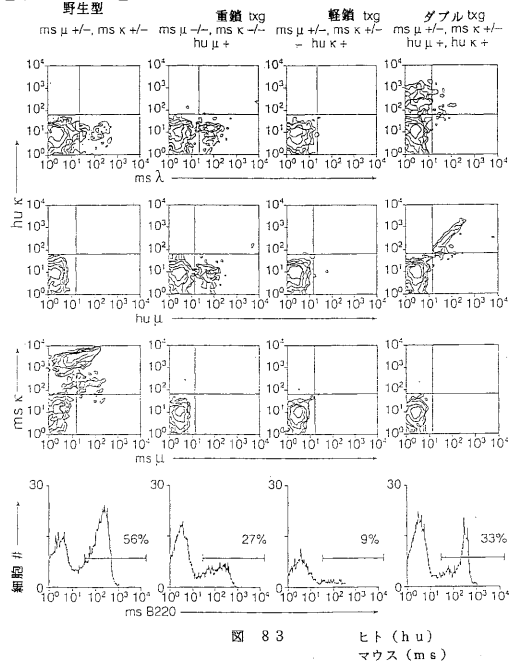


図 8 3

【図 8 4】

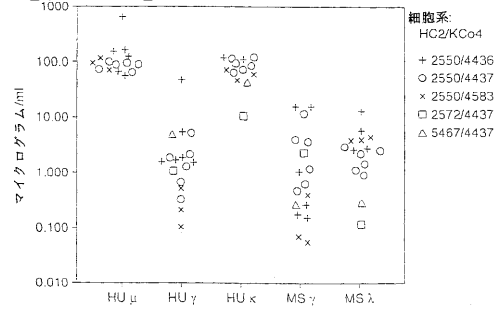


図 8 4

【図 8 5】

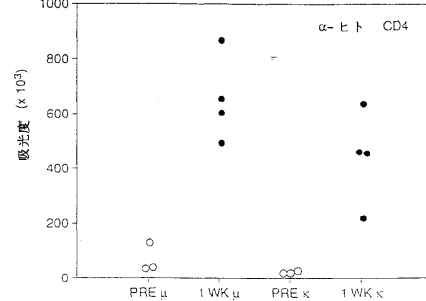


図 8 5

【図 8 6】

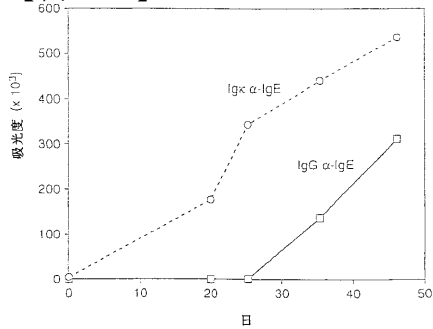


図 8 6

【図 8 8】

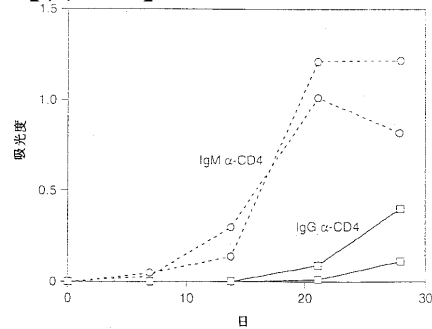


図 8 8

【図 8 7】

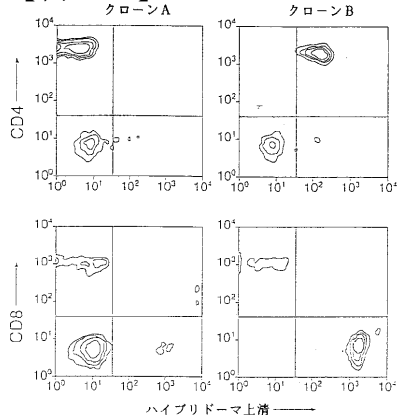


図 8 7

【図 89】

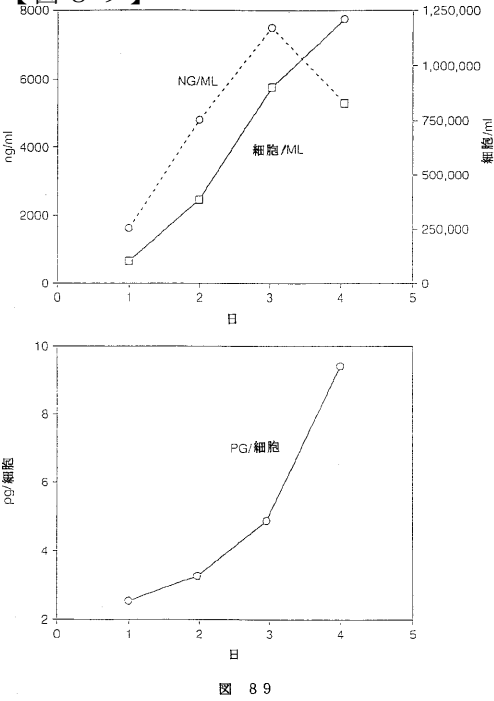


図 89

【図 90】

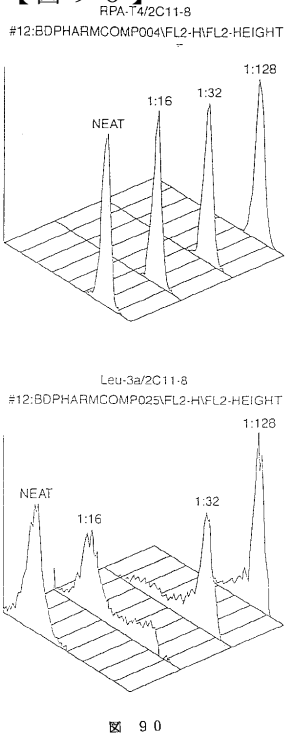


図 90

【図 91】

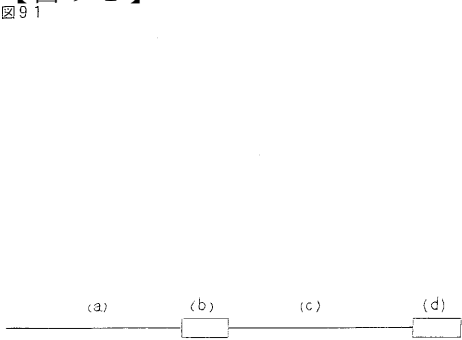


図 91

【図 92】

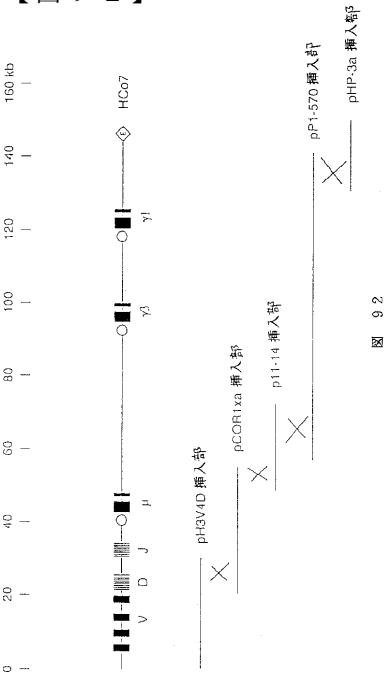
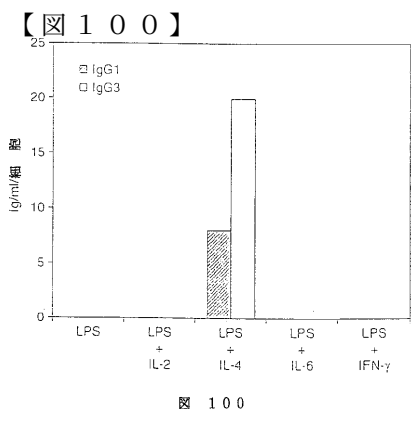
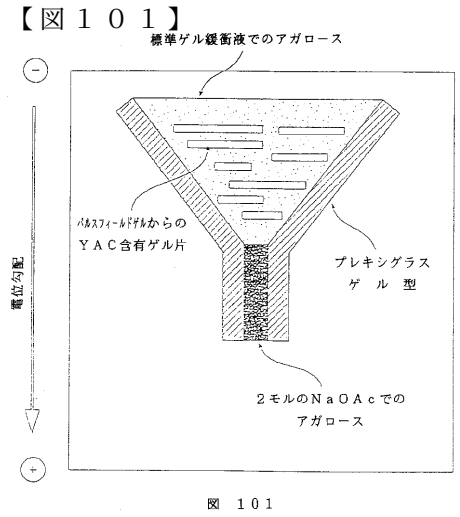
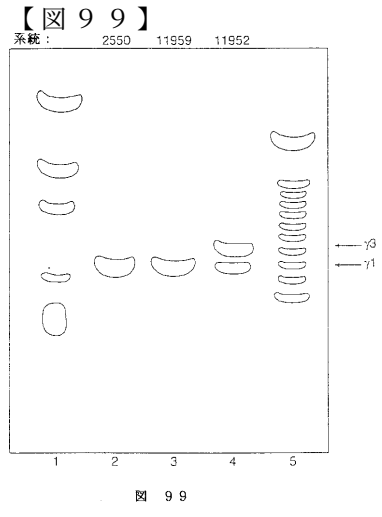
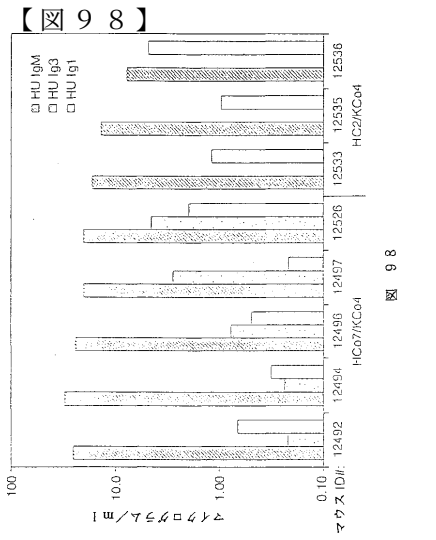
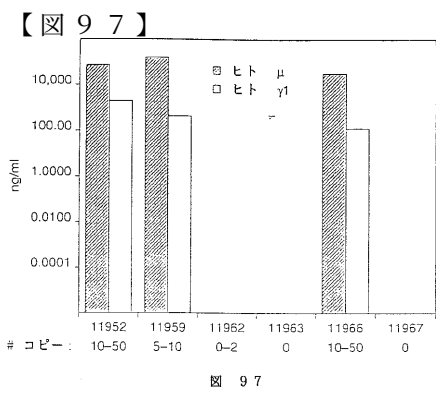
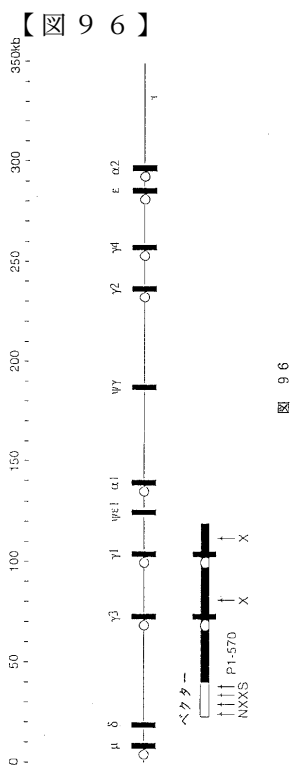


図 92



【図 102】

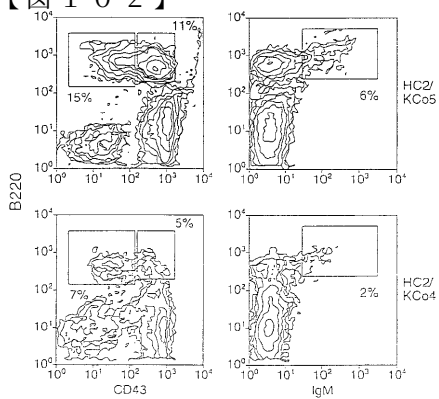


図 102

【図 103】

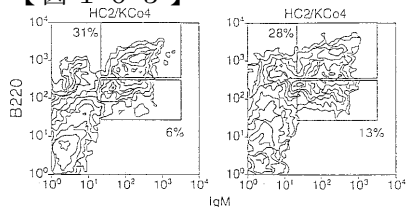


図 103

【図 104】

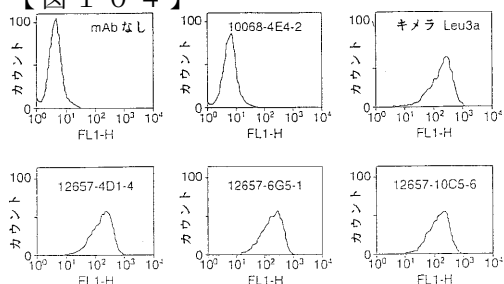


図 104

【図 105】

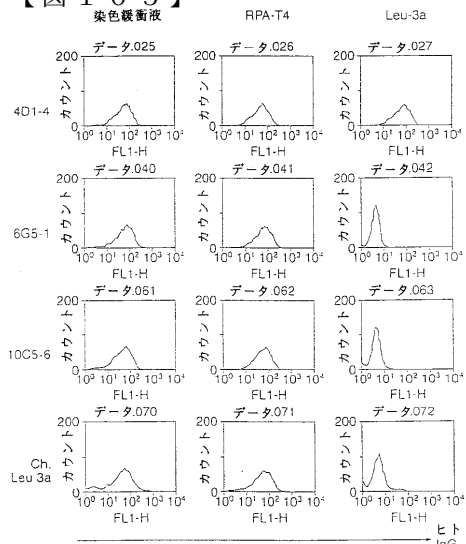


図 105

【図 106】

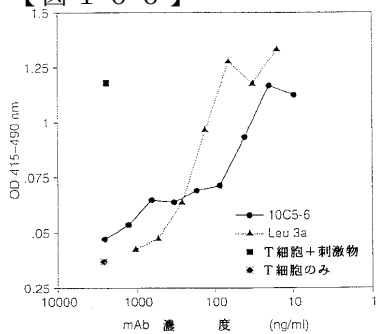


図 106

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月31日(2007.8.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

トランスジェニックマウスであって、

機能的に破壊された内因性重鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、機能的に破壊された内因性軽鎖対立遺伝子のホモ接合の一对、ヒト免疫グロブリン κ 軽鎖トランスジーン、およびヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンを含み、

ここで、該ヒト免疫グロブリン κ 軽鎖トランスジーンは、5つのヒト軽鎖V κ セグメントを含み、該5つのヒト軽鎖V κ セグメントは、L15、L18、L24、A10およびA27であり、

ここで、該マウスは、ヒト抗原での免疫化後に抗体応答を行う、

トランスジェニックマウス。

【請求項2】

前記ヒト免疫グロブリン κ 軽鎖トランスジーンはKC05である、請求項1に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項3】

前記ヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンはHC2またはHC07である、請求項1に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項4】

前記抗体応答は、少なくとも 10^8 M^{-1} の親和性定数(Ka)で前記抗原に結合する免疫グロブリンを含む、請求項1に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項5】

前記ヒト抗原は、CD4、IL-8、ジゴキシン、SLT、Staph A、HER2-neu、PSMA、IRTA-5、PD-1、CD30、IP-10およびそれらの抗原性フラグメントからなる群より選択される、請求項1に記載のトランスジェニックマウス

。

【請求項6】

請求項1に記載のトランスジェニックマウスによって産生される、免疫グロブリン。

【請求項7】

請求項1に記載のトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含む、ハイブリドーマ

。

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		A 0 1 K 67/027		
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 N 5/00		B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/02		C
		C 1 2 P 21/08		

(72)発明者 ロバート エム. カイ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94115, サンフランシスコ, ブロードウエー 5, 21
27

F ターム(参考)	4B024	AA01	AA10	AA11	AA20	BA44	BA53	BA61	CA03	CA04	CA09
		CA20	DA02	EA04	GA03	GA11	GA12	GA18	GA25	GA27	HA20
	4B064	AG26	AG27	CA01	CA10	CA19	CA20	CC01	CC24	CE12	DA01
		DA13									
	4B065	AA91X	AA93Y	AB01	AB05	AC14	AC20	BA01	BA02	BA04	BA08
		BA16	BA24	BD14	CA25	CA43	CA44	CA46			
	4C085	AA33	AA34	BB31	CC02	CC22	DD62	DD63	EE01		
	4H045	AA11	AA20	AA30	CA40	DA75	DA76	EA20	EA50	FA71	FA72
		FA74	GA26								