

公告本
發明專利說明書

102年6月7日修正替換頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97130577

※ 申請日期：2008 年 8 月 11 日

※IPC 分類：C12N 1/20, 1/66
C07K16/18

一、發明名稱：(中文/英文)

HCO32 與 HCO27 以及相關之範例

HCO32 AND HCO27 AND RELATED EXAMPLES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商·梅德雷克斯有限責任公司

Medarex, L.L.C.

代表人：(中文/英文)

克利利亞

KERLEY, LEAH

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國紐澤西州斯林斯頓市州立路 206 路線

Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08540, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國/U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 羅樂丹尼爾 K/ROHRER, DANIEL K.

2. 布萊克亞美麗雅南西/BLACK, AMELIA NANCY

3. 朗博格尼爾斯/LONBERG, NILS

國 籍：(中文/英文)

1. 美國/USA

2.美國/USA

3.美國/USA

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；2007 年 8 月 10 日；60/955,194

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於能夠產生異源性抗體之基因轉殖非人類動物；用於產生上述基因轉殖動物之轉殖基因；能夠在 V-D-J 重組中功能性重整異源性 D 基因的轉殖基因；能夠產生異源性抗體之永生化 B 細胞；產生多種同型之異源性抗體的方法與轉殖基因；產生異源性抗體之方法與轉殖基因，異源性抗體中之可變區序列包括相對於生殖細胞重整之可變區序列的體細胞突變；產生具有人類基本序列且結合人類抗原之抗體的基因轉殖非人類動物；上述基因轉殖動物之 B 細胞所製成之融合瘤；以及上述融合瘤表現之單株抗體。

六、英文發明摘要：

The instant invention relates to transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies, transgenes used to produce such transgenic animals, transgenes capable of functionally rearranging a heterologous D gene in V-D-J recombination, immortalized B-cells capable of producing heterologous antibodies, methods and transgenes for producing heterologous antibodies of multiple isotypes, methods and transgenes for producing heterologous antibodies wherein a variable region sequence comprises somatic mutation as compared to germline rearranged variable region sequences, transgenic nonhuman animals which produce antibodies having a human primary sequence and which bind to human antigens, hybridomas made from B cells of such transgenic animals, and monoclonal antibodies expressed by such hybridomas.

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第(5)圖。

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於能夠產生異源性抗體之基因轉殖非人類動物；用於產生上述基因轉殖動物之轉殖基因；能夠在V-D-J重組中功能上重整異源性D基因的轉殖基因；能夠產生異源性抗體之永生代(immortalized)B細胞；產生多種同型(isotype)之異源性抗體的方法與轉殖基因；產生異源性抗體之方法與轉殖基因，異源性抗體中之可變區(variable region)序列包括相對於生殖細胞重整之可變區序列的體細胞突變(somatic mutation)；產生具有人類基本序列且結合人類抗原之抗體的基因轉殖非人類動物；上述基因轉殖動物之B細胞所製成之融合瘤；以及上述融合瘤表現之單株抗體。

【先前技術】

人類單株抗體之活體內治療與診斷應用發展所面臨的主要難題之一係非人類免疫球蛋白之內在免疫原性(immunogenicity)。例如，當具有免疫能力之人類患者被施加治療劑量的啮齒類單株抗體時，患者產生對抗啮齒類免疫球蛋白序列之抗體；這些人類抗-小鼠抗體(HAMA)使治療抗體無效並會引發劇烈毒性。因此，樂見產生與特定人類抗原(有希望的治療與/或診斷目標)反應的人類免疫球蛋白。然而，產生專一性結合人類抗原之人類免疫球蛋白係有問題的。

帶有功能異源性(例如，人類)免疫球蛋白轉殖基因之基因轉殖動物的構築係一種已經產生與自我抗原反應之抗體的方法。然而，爲了得到治療有用抗體的表現或產生上述抗體之融合瘤，基因轉殖動物必須產生能夠透過B淋巴球發育途徑成熟之基因轉殖B細胞。雖然有些基因轉殖小鼠實例可透過該途徑而成熟並因此進行功能性V-D-J重組，以產生具有重組多樣性與接合多樣性兩者之抗體，上述多樣性相對於任何特定物種的完整基因體可能性係受限的。

由於上述限制，存在對有效產生具有多樣性提高(例如，將第一物種之基因序列所編碼的抗體於第二物種內產生)之異源性抗體之方法的明顯需求，其包括提高的完整基因體重鏈與輕鏈可變區庫(repertoire)部分。亦需要可用來產生融合瘤之B細胞源，融合瘤產生具有上述提高之多樣性的單株抗體，以用於經設計之特定物種的治療或診斷應用。

【發明內容】

根據上述目的，提供能產生異源性抗體(例如，人類抗體)之基因轉殖非人類動物，其包括提高的重鏈與輕鏈可變區庫部分。

再者，目標係提供來自上述能夠表現異源性抗體之基因轉殖動物的B細胞，其中上述B細胞係經永生化的以提供專一於特定抗原的單株抗體源。

根據上述目標，本發明進一步目標係提供能夠產生上述異源性單株抗體之融合瘤細胞。

再者，本文之目標係提供異源性未重整之免疫球蛋白重鏈與輕鏈轉殖基因，其可用於產生上述之非人類基因轉殖動物。

再者，本文之目標係提供破壞基因轉殖動物中內源性免疫球蛋白基因座(locus)之方法。

再者，本文之目標係提供在上述基因轉殖非人類動物中誘發異源性抗體產生之方法。

本發明進一步目標係提供產生免疫球蛋白可變區基因片段庫(可用於構築本發明之一或多個轉殖基因)的方法。

【實施方式】

定義

本文所用之詞彙「抗體(antibody)」意指包括至少兩個輕聚胜肽鏈與兩個重聚胜肽鏈之糖蛋白。各個重與輕聚胜肽鏈包含可變區(通常係聚胜肽鏈之胺基端部分)，其包含與抗原交互作用之結合區塊(domain)。各個重與輕聚胜肽鏈亦包含聚胜肽鏈的恆定區(通常係羧基端部分)，其可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括免疫系統的不同細胞、某些噬菌細胞以及正統補體系統的第一補體(C1q)。

本文所用之「異源性抗體(heterologous antibody)」係與產生上述抗體之基因轉殖非人類有機體相關而界定。其

被界定成胺基酸序列或編碼之 DNA 序列對應於非由基因轉殖非人類動物所構成之有機體中所發現的抗體，且通常係來自基因轉殖非人類動物以外之物種。

本文所用之「異雜合抗體(heterohybrid antibody)」意指具有不同有機體來源之輕鏈與重鏈的抗體。例如，具有人類重鏈結合鼠科輕鏈之抗體係異雜合抗體。

本文所用之「同型(isotype)」意指重鏈恆定區基因所編碼的抗體類型(諸如，IgM 或 IgG₁)。

本文所用之「同型轉換(isotype switching)」意指抗體的類型或同型由一 Ig 類型改變至其他 Ig 類型之一的現象。

本文所用之「未轉換同型(nonswitched isotype)」意指沒有發生同型轉換時所產生之重鏈同型類型；編碼未轉換同型之 C_H 基因通常係緊接在功能性重整之 VDJ 基因下游的第一個 C_H 基因。

本文所用之詞彙「轉換序列(switch sequence)」意指負責轉換重組之那些 DNA 序列。「轉換供應子(switch donor)」序列通常係 μ 轉換區，將位於轉換重組過程中即將刪除之構築區域的 5' (即，上游)。「轉換接受子(switch acceptor)」區介於即將刪除之構築區與替代恆定區(諸如， γ 、 ϵ 等)之間。由於沒有重組通常發生的特定位置，通常無法由構築預測最終的基因序列。

本文所用之「醣化形態(glycosylation pattern)」係界定成醣單元共價連接至蛋白(更明確地，免疫球蛋白)的形態。異源性抗體的醣化形態可被描述實質相似於自然發生

於非人類基因轉殖動物之物種所產生之抗體上的醣化形態，熟悉技術之人士可理解比起轉殖基因之 C_H 基因所衍生的物種，異源性抗體的醣化形態更相似於非人類基因轉殖動物之物種中的醣化形態。

本文所用之「專一性結合 (specific binding)」意指抗體的特性：(1) 以至少 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 的親合力結合至預定抗原，及 (2) 以比其結合預定抗原或緊密相關抗原以外之非專一性抗原 (諸如，BSA、酪蛋白) 的親合力至少高出兩倍的親合力優先結合至預定抗原。

本文所用之詞彙「自然存在 (naturally-occurring)」當應用於目標時意指可在自然中發現目標的事實。例如，有機體 (包括病毒) 中存在之聚胜肽或聚核苷酸序列，可由自然中來源分離且未經人類在實驗室中故意地修飾的係自然存在。

本文所用之詞彙「重整 (rearranged)」意指重鏈或輕鏈免疫球蛋白基因座的結構，其中 V 片段係以分別實質上編碼完整 V_H 或 V_L 區塊之構形緊鄰 D-J 或 J 片段而配置。可與生殖細胞 DNA 比較來辨別重整之免疫球蛋白基因座；重整基因座將具有至少一經重組的七聚體/九聚體同源元件。

本文所用之詞彙「未重整 (unrearranged)」或「生殖細胞結構 (germline configuration)」提及 V 片段係意指 V 片段未經重組而緊接 D 或 J 片段的結構。

針對核酸而言，詞彙「實質同源 (substantial homology)」表示兩個核酸或其指定序列在具有適當核苷酸

插入或刪除且理想配對與比較時，至少約 80% 的核苷酸，通常至少約 90% 至 95%，更佳係至少約 98 至 99.5% 的核苷酸係相同的。或者，當片段在選擇性雜合條件下雜合至互補股時存在實質同源。核酸可存在整個細胞中、細胞裂解物中或部分純化或實質純化形式。當清除其他細胞組成或其他污染物(諸如，其他細胞核酸或蛋白)時，核酸係「單離的(isolated)」或「成為實質純化(rendered substantially pure)」，其係藉由標準技術，包括鹼性/SDS 處理、CsCl 條帶化(banding)、管柱層析法(column chromatography)、瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)與其他技術中習知的技術。參見 F. Ausubel 等人編輯 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)。

本發明之核酸組合物雖然通常為天生序列(除了經修飾之限制位置(restriction site)等)，但可根據標準技術突變 cDNA、基因體或混合物任一以提供基因序列。針對編碼序列而言，這些突變可如所欲般影響胺基酸序列。明確地說，考慮過實質上同源或衍生自天生 V、D、J、恆定、轉換之 DNA 序列與其他本文所述之序列(其中「衍生」代表序列與另一序列相同或由此修飾)。

當將核酸與另一核酸序列置於功能關係中時係「操作性連接(operably linked)」。例如，若其影響序列的轉錄則啟動子(promoter)或增強子(enhancer)係操作性連接至編碼序列。至於轉錄調控序列，操作性連接意指即將連接之

DNA 序列係連續，且必要時連接兩個蛋白編碼區，連續且位於讀框(reading frame)內。

能夠產生異源性抗體之基因轉殖非人類動物

如上所論述般，樂見產生與特定人類抗原(有可能的治療與/或診斷目標)反應之人類免疫球蛋白。然而，產生專一性結合人類抗原之人類免疫球蛋白係有問題的。

首先，作為 B 細胞來源之免疫動物必須對呈送之抗原具有免疫反應。為了讓動物產生免疫反應，呈送之抗原必須為外來的且動物並須無法忍受抗原。因此，例如若欲產生具有結合人類蛋白之遺傳性型(idiotype)的人類單株抗體，自我耐受(self-tolerance)將避免免疫之人類對人類蛋白產生實質的免疫反應，這係因為可能係免疫原的抗原僅有表位為人類群體內蛋白多型性所產生之那些(同種異系(allogeneic)表位)。

其次，若作為形成融合瘤之 B 細胞來源的動物(說明實施例中係人類)對真正的自我抗原產生免疫反應，動物中將產生嚴重的自我免疫疾病。當以人類作為用於融合瘤之 B 細胞來源，上述自我免疫在當代標準來看係不道德的。因此，發展分泌專一性與預定人類抗原反應之人類免疫球蛋白鏈的融合瘤係有問題的，因為需要分泌人類抗體之 B 細胞(引起對預定人類抗原之抗體反應)的可靠來源。

能夠克服這些問題之小鼠實施例包括基因轉殖與染色體轉殖小鼠，本文中分別稱為 HuMAb Mouse®與 KM Mouse®，且本文中通稱為「人類 Ig 小鼠」。

HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) 包含人類免疫球蛋白基因微小基因座(minilocus)，其編碼未重整之人類重鏈(μ 與 γ)與 κ 輕鏈免疫球蛋白序列，以及使內源性 μ 與 κ 鏈基因座失去活性之目標突變(參見，例如 Lonberg 等人(1994) *Nature* 368(6474): 856-859)。因此，小鼠呈現減少表現的小鼠 IgM 或 κ ，而回應免疫作用，導入之人類重鏈與輕鏈轉殖基因進行類型轉換(class switching)與體細胞突變以產生高親合力之人類 IgG κ 單株抗體(Lonberg, N. 等人(1994) 如上；回顧於 Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101；Lonberg, N. 與 Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93；以及 Harding, F. 與 Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMAb Mouse®的製備與應用以及上述小鼠所帶之基因體修飾係進一步描述於 Taylor, L. 等人(1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295；Chen, J. 等人(1993) *International Immunology* 5: 647-656；Tuailon 等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724；Choi 等人(1993) *Nature Genetics* 4:117-123；Chen, J. 等人(1993) *EMBO J.* 12: 821-30；Tuailon 等人(1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920；Taylor, L. 等人(1994) *International Immunology* 6: 579-591；以及 Fishwild, D. 等人(1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851，所有其之全文係以參考資料明確地併入本文中。進一步參照全部給予 Lonberg 與 Kay 的美國專利號 5,545,806、5,569,825、5,625,126、

5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299 以及 5,770,429；給予 Surani 等人的美國專利號 5,545,807；全部給予 Lonberg 與 Kay 的 PCT 公開號 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 與 WO 99/45962；以及給予 Korman 等人的 PCT 公開號 WO 01/14424，其各個亦以參考資料併入。

另一實施例中，可利用轉殖基因與轉殖染色體上帶有人類免疫球蛋白序列的小鼠(例如，帶有人類重鏈轉殖基因與人類輕鏈轉殖染色體之小鼠)得到本發明之人類抗體。此小鼠於本文中稱為「KM Mouse®」，並詳細描述於給予 Ishida 等人的 PCT 公開案 WO 02/43478。

再者，技術中可取得表現人類免疫球蛋白基因之替代基因轉殖動物系統。例如，可應用稱為 Xenomouse (Amgen, Inc.) 的替代基因轉殖系統；上述小鼠描述於諸如給予 Kucherlapati 等人的美國專利號 5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584 以及 6,162,963。

再者，技術中可取得表現人類免疫球蛋白基因的替代染色體轉殖動物系統，並可用來得到所選目標之抗體。例如，可應用稱為「TC 小鼠」之帶有人類重鏈轉殖染色體與人類輕鏈轉殖染色體兩者之小鼠；上述小鼠描述於 Tomizuka 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727。再者，技術中已經描述帶有人類重鏈與輕鏈轉殖色體的牛(Kuroiwa 等人(2002) Nature Biotechnology 20:889-894 以及 PCT 申請案號 WO/2002/092812)，並可用

來取得本發明之抗體。

亦可利用 SCID 小鼠製備人類單株抗體，SCID 小鼠中已經重新組成人類免疫細胞以致可在免疫後產生人類抗體反應。上述小鼠描述於諸如給予 Wilson 等人的美國專利號 5,476,996 與 5,698,767。

對外來抗原刺激有所反應(帶有異源性抗體庫)之基因轉殖非人類動物的設計，需要基因轉殖動物中包含的異源性免疫球蛋白轉殖基因透過 B 細胞發育途徑而正常作用。因此，本發明之轉殖基因係經構築以產生下列一或更多：
(1)高水平與細胞類型專一性表現，(2)功能性基因重整，(3)對偶基因排除(allelic exclusion)的活化與反應，(4)足夠初級庫(primary repertoire)的表現，(5)訊息傳導，(6)體細胞超突變，與(7)免疫反應過程中轉殖基因抗體基因座的優勢。

下方揭露明顯表示並非必須達到所有上述標準。例如，基因轉殖動物之內源性免疫球蛋白基因座被功能性破壞的那些實施例中，轉殖基因並不需要活化對偶基因排除。再者，轉殖基因包含功能性重整之重鏈與/或輕鏈免疫球蛋白基因的那些實施例中，功能性基因重整的第二標準係非必需的，至少對已經重整之轉殖基因而言。而分子免疫學的基礎可參見 Fundamental Immunology，第 5 版(2003)，Paul William E. 編輯 Lippincott Williams & Wilkins, P.A.，其以參考資料併入本文中。

本發明之轉殖基因包括重鏈轉殖基因，其包括編碼至

少一可變基因片段、一多樣基因片段、一連接基因片段與至少一恆定區基因片段的 DNA。免疫球蛋白輕鏈轉殖基因包括編碼至少一可變基因片段、一連接基因片段與至少一恆定區基因片段的 DNA。編碼輕鏈與重鏈基因片段之基因片段與基因轉殖非人類動物係異源性的，其衍生自或者對應於來自非由基因轉殖非人類動物所構成之物種、編碼免疫球蛋白重鏈與輕鏈基因片段的 DNA。本發明之一態樣中，轉殖基因經構築以致各個基因片段係未重整的，即尚未重整好編碼功能性免疫球蛋白輕鏈或重鏈。上述未重整之轉殖基因支持 V、D 與 J 基因片段的重組(功能性重整)且更佳係支持當暴露於抗原時，基因轉殖非人類動物內得到之重整免疫球蛋白重鏈包括所有或一部分的 D 區基因片段。

替代實施例中，轉殖基因包括未重整之「微小基因座(mini-locus)」。上述轉殖基因通常包括 C、D 與 J 片段的實質部分以及 V 基因片段的子集(subset)。上述轉殖基因構築體中，不同的調控序列(諸如，啟動子、增強子、類型轉換區、RNA 處理的接合-供應子與接合-接收子序列、重組訊號等)包括衍生自異源性 DNA 之相對應序列。可自與本發明所用之非人類動物相同或相關物種將上述調控序列併入轉殖基因。例如，人類免疫球蛋白基因片段可與啮齒類免疫球蛋白增強子序列結合於轉殖基因以用於基因轉殖小鼠。或者，可將合成調控序列併入轉殖基因，其中上述合成調控序列與習知哺乳類基因體中自然存在之功能性

DNA 序列係非同源的。根據共識規則設計合成調控序列，例如那些載明接合-接受子位置或啟動子/增強子基序的可允許序列。例如，微小基因座包括一部分的基因體免疫球蛋白基因座，相對於自然存在之生殖細胞 Ig 基因座，其具有非必須 DNA 部分(例如，間隔序列(intervening 序列)；內子或其之部分)的至少一內部(即，不在部分的端點)刪除。

本發明亦包括基因轉殖動物，其包括具有重鏈與輕鏈轉殖基因之生殖細胞，其中轉殖基因之一包含重整之基因片段而另一者包含未重整之基因片段。較佳實施例中，重整之轉殖基因係輕鏈免疫球蛋白轉殖基因而未重整之轉殖基因係重鏈免疫球蛋白轉殖基因。

抗體的結構與產生

所有免疫球蛋白的基本結構係根據兩個輕聚肽鏈與兩個重聚肽鏈所構成之單元。各個輕鏈包括已知為可變輕鏈區與恆定輕鏈區的兩個區域。同樣地，免疫球蛋白重鏈包括標示成可變重鏈區與恆定重鏈區的兩個區域。

重鏈或輕鏈恆定區係由稱為重鏈或輕鏈恆定區基因(C_H)片段的基因體序列所編碼。特定重鏈基因片段的應用界定免疫球蛋白的類型。例如人類中， μ 恆定區基因片段界定 IgM 類型的抗體而使用 γ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 或 $\gamma 4$ 恆定區基因片段的應用界定 IgG 類型的抗體以及 IgG 子集 IgG1 至 IgG4。同樣地，使用 α_1 或 α_2 恆定區基因片段界定 IgA 類型的抗體以及子集 IgA1 與 IgA2。 δ 與 ϵ 恆定區基因片段分

別界定 IgD 與 IgE 抗體類型。

免疫球蛋白重鏈與輕鏈的可變區一起包含抗體之抗原結合區塊。因為抗體此區需要多樣性以允許結合廣泛的抗原，編碼最初或初級庫可變區的 DNA 包括許多衍生自專一性可變區基因片段家族的不同 DNA 片段。輕鏈可變區實例中，上述家族包括可變(V)基因片段與連接(J)基因片段。因此，輕鏈的最初可變區係由一 V 基因片段與一 J 基因片段所編碼，其各自選自有機體基因體 DNA 內所包含之 V 與 J 基因片段家族。重鏈可變區的實例中，編碼最初或初級庫重鏈可變區的 DNA 包括一重鏈 V 基因片段、一重鏈多樣(D)基因片段與一 J 基因片段，其各自選自基因體 DNA 內免疫球蛋白基因片段的適當 V、D 與 J 家族。

爲了提高構成抗體結合位置之序列的多樣性，重鏈轉殖基因較佳包括順式作用(cis-acting)序列，其支援可將所有或部分 D 區基因序列併入重整之 V-D-J 基因序列的功能性 V-D-J 重整。一般而言，至少約 1% 的表現轉殖基因編碼之重鏈(或 mRNA)包括可辨別之 D 區序列於 V 區中。較佳係至少約 10% 的轉殖基因編碼 V 區包括可辨別之 D 區序列，更佳係至少約 30% 且最佳係超過 50% 包括可辨別之 D 區序列。

可辨別之 D 區序列通常至少約八個連續核苷酸，對應於重鏈轉殖基因之 D 區基因片段存在的序列與/或上述 D 區核苷酸序列所編碼之胺基酸序列。例如，若轉殖基因包括 D 區基因 DHQ52，轉殖基因編碼之 mRNA 包含序列

5'-CTAACTGGGGA-3'位於 V 區中，介於 V 基因片段序列與 J 基因片段序列之間，被辨別為包含 D 區序列，明確地說，DHQ52 序列。相似地，例如若轉殖基因包括 D 區基因 DHQ52，轉殖基因編碼之重鏈聚胜肽，包含胺基酸序列 -LTG-位於 V 區中，介於 V 基因片段胺基酸序列與 J 基因片段胺基酸序列之間，且可被辨別為包含 D 區序列，明確地說，DHQ52 序列。然而，由於可以不同程度與不同讀框將 D 區片段併入 VDJ 接合，重鏈可變區之 D 區與轉殖基因中存在之 D 區片段的比較係確定特定 D 片段之併入所必須。再者，重組過程中可能的外切酶剪切可導致 V-D-J 重組過程的不正確的 V-D 與 D-J 接合。

然而，由於體細胞突變與 N 區附加，可辨別某些 D 區序列但不完全相同地對應至轉殖基因中的連續 D 區序列。例如，核苷酸序列 5'-CTAAXTGGGGA-3'，其中 X 係 A、T 或 G，且其位於重鏈 V 區並位於 V 區基因序列與 J 區基因序列側面，可被辨別成對應之 DHQ52 序列 5'-CTAACTGGGGA-3'。相似地，例如聚胜肽序列 -LNG-、-LIG-、-LSG-、-KWG-或 -NWG-位於 V 區，且胺基端位於轉殖基因 V 基因序列所編碼之胺基酸序列側面，而羧基端位於轉殖基因 J 基因序列所編碼之胺基酸序列側面，被辨別成 D 區序列。

因此，由於體細胞突變與 N 區附加可在衍生自轉殖基因 D 區之序列中產生突變，提供下列定義作為確定可辨別之 D 區序列存在的指南。假設：(1)序列位於 V 區中且一

側為 V 基因序列(核苷酸序列或推論之胺基酸序列)而另一側為 J 基因序列(核苷酸序列或推論之胺基酸序列)，且(2)序列實質相同或實質相似已知的 D 基因序列(核苷酸序列或推論之胺基酸序列)，則將胺基酸序列或核苷酸序列辨別成 D 區序列。

本文所用之詞彙「實質相同(substantial identity)」代表聚胜肽序列或核酸序列的特徵，其中聚胜肽序列至少有 50% 序列相同於參考序列，通常係至少約 80% 序列相同且有時超過約 90% 序列相同，而核酸序列有至少 70 % 序列相同於參考序列。排除總共小於 35 % 參考序列的小型刪除或附加來計算序列相同百分比。參考序列可為較大序列(例如，整個 D 基因)的子集；然而參考序列在聚核苷酸的實例中係至少 8 個核苷酸長而在聚胜肽的實例中係至少 3 個胺基殘基。一般而言，參考序列係至少 8 至 12 個核苷酸或至少 3 至 4 個胺基酸，且參考序列較佳係 12 至 15 個核苷酸或更多，或至少 5 個胺基酸。

詞彙「實質相似(substantial similarity)」代表聚胜肽序列的特徵，其中聚胜肽序列具有至少 80 % 相似於參考序列。將相同胺基酸或位置保存型胺基酸取代計分成相似來計算序列相似的百分比。位置保存型胺基酸取代係單一核苷酸取代所產生之一種；第一胺基酸由第二胺基酸所取代，其中第一胺基酸的密碼子與第二胺基酸的密碼子相差一單一核苷酸取代。因此舉例來說，序列-Lys-Glu-Arg-Val-實質相似於序列-Asn-Asp-Ser-Val-，因為可藉由僅僅導入

3 個取代突變(在四個原本密碼子其中三個內的單一核苷酸取代)將密碼子序列 -AAA-GAA-AGA-GUU- 突變成 -AAC-GAC-AGC-GUU-。參考序列可為較大序列(例如，整個 D 基因)的子集；然而參考序列係至少 4 個胺基殘基長。一般而言，參考序列係至少 5 個胺基酸，而參考序列較佳係 6 個或更多胺基酸。

初級庫

產生編碼重鏈與輕鏈免疫球蛋白基因之 DNA 過程主要發生在發育中的 B 細胞內。在連接不同免疫球蛋白基因片段之前，目前已知有 V、D、J 與恆定(C)基因片段，且大部分係於初級庫 B 細胞之前驅細胞內的 V、D、J 與 C 基因片段群集中。一般而言，重鏈或輕鏈的所有基因片段係相當鄰近地位於單一染色體上。上述不同免疫球蛋白基因片段重整前之基因體 DNA 在本文中稱為「未重整」基因體 DNA。B 細胞分化過程中，V、D、J (或者在輕鏈基因實例中，僅有 V 與 J)基因片段各個之適當家族成員的一者係經重組以形成功能上重整之重鏈與輕鏈免疫球蛋白基因。上述功能性重整係可變區片段的，以形成編碼功能性可變區之 DNA。此基因片段重整過程似乎係連續的。首先，形成重鏈 D-至-J 連接，接著為重鏈 V-至-DJ 連接與輕鏈 V-至-J 連接。編碼輕鏈與/或重鏈中此功能性可變區之最初形式的 DNA 稱為「功能性重整之 DNA」或「重整之 DNA」。重鏈實例中，上述 DNA 被稱為「重整之重鏈 DNA」而在輕鏈實例中，上述 DNA 被稱為「重整之輕鏈 DNA」。

相似的文字用來描述本發明之轉殖基因的功能性重整。

可變區基因片段重組以形成功能性重鏈與輕鏈可變區係由重組信號序列(RSS's)所介導，其位於可重組之 V、D 與 J 片段側面。RSS's 係必須的且足以引導重組，其包括一對-對稱的七聚體、富含 AT 之九聚體以及 12 或 23 鹼基對任一之中間間隔區。這些信號係保存於執行 D-J (或 V-J) 重組之不同基因座與物種間並可功能性交換。參閱 Oettinger 等人(1990), *Science*, 248, 1517-1523; Cuomo 等人(1994), *Nucleic Acids Res.*, 22(10), 1810-4; Sadofsky, (2001), *Nucleic Acids Res.*, 29(7), 1399-409; 其均以其全文藉由參考資料併入。七聚體包括序列 CACAGTG 或其類似物，接著係非保守性序列之間隔子，且接著係具有序列 ACAAAAACC 之九聚體或其類似物。這些序列發現於 J 或各個 V 與 D 基因片段的下游側上。緊接在生殖細胞 D 與 J 片段之前係再度為兩個重組信號序列，首先係九聚體接著為七聚體(再度由非保守性序列所分隔)。V_L、V_H 或 D 片段之後的七聚體與九聚體序列係與 J_L、D 或 J_H 片段之前的那些其所重組之七聚體與九聚體序列互補。七聚體與九聚體序列之間の間隔子係 12 鹼基對長或 22 與 24 鹼基對長之間任一者。

除了 V、D 與 J 片段的重整之外，可藉由輕鏈中 V 與 J 片段之間以及重鏈之 D 與 J 片段之間的可變性重組在免疫球蛋白重鏈與輕鏈之初級庫中產生進一步的多樣性。藉由改變連接上述片段之確切位置來產生上述之可變性重

組。上述輕鏈中的改變通常發生在 V 基因片段之最後一個密碼子以及 J 片段的第一個密碼子。相似的連接不準確發生在 D 與 J_H 片段之間的重鏈染色體上且可延伸 10 個核苷酸之多。再者，可在 D 與 J_H 以及 V_H 與 D 基因片段之間插入許多非由基因體 DNA 所編碼之核苷酸。已知這些核苷酸的附加係 N 區多樣性。

VJ 與 / 或 VDJ 重整之後，重整之可變區與位於重整之可變區下游之一或多個恆定區基因片段的轉錄產生初級 RNA 轉錄本，其在適當 RNA 接合後造成編碼全長重鏈或輕鏈免疫球蛋白之 mRNA。上述重鏈與輕鏈包括引導信號序列，以造成將免疫球蛋白分泌通過與 / 或插入 B 細胞的跨膜區。編碼此信號序列之 DNA 係包含於用以形成重鏈或輕鏈免疫球蛋白之可變區的 V 片段的第一外子中。適當的調控序列係存在於 mRNA 中以控制 mRNA 的轉譯以產生編碼之重鏈與輕鏈免疫球蛋白聚肽，其彼此間在適當連接後形成抗體分子。

上述連接過程中可能發生之上述可變區基因片段中之重整與可變性重組的淨效應係初級抗體庫的產生。一般而言，已經分化至此階段的各個 B 細胞產生單一初級庫抗體。此分化過程中，發生抑制除了功能性重整之 Ig 基因內包含那些基因片段之外的基因片段功能性重整的細胞事件。二倍體 B 細胞保持上述單一-專一性的過程稱為對偶基因排除。

次級庫

表現包括初級庫之序列組中之免疫球蛋白的 B 細胞植株(clone)係立即可用於反應外來抗原。由於單純的 VJ 與 VDJ 連接所產生之多樣性有限，所稱之初級反應產生的抗體親合性係相對低的。兩種不同類性的 B 細胞造成此初步反應：初級抗體形成細胞之前驅細胞以及次級庫 B 細胞之前驅細胞 (Linton 等人 Cell 59:1049-1059 (1989)；及 Hentges, Clin Exp Immunol. 97 Suppl 1:3-9 (1994)，兩者係以其全文藉由參考資料在此併入)。第一型 B 細胞回應某些抗原而成熟為 IgM-分泌漿細胞。另一 B 細胞對初步暴露於抗原的反應係進入 T 細胞依賴型(dependent)成熟路徑。

抗原刺激之 B 細胞植株的 T 細胞依賴型成熟過程中，細胞表面上的抗體分子結構朝兩方法改變：恆定區轉換成非-IgM 亞型，而可變區序列經由多個單一胺基酸取代所修飾而產生較高親合力的抗體分子。

如前所示，Ig 重鏈或輕鏈的各個可變區包含抗原結合區塊。已經由胺基酸與核酸序列所確定，次級反應過程中的體細胞突變發生在整個 V 區中，其包括三個互補決定區(CDR1、CDR2 與 CDR3)，亦稱為高可變區 1、2 與 3 (Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991) U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC，其全文藉由參考資料在此併入)。CDR1 與 CDR2 係位於可變基因片段中，然而 CDR3 主要係 V 與 J 基因片段或 V、D 與 J 基因片段之間重組的結果。非由 CDR1、2 或 3 所構成之那些可變區部分通常稱為框架區，

標示為 FR1、FR2、FR3 與 FR4。高度突變過程中，重整之 DNA 係經突變以產生帶有改變之 Ig 分子的新植株。對外來抗原具有較高親合力之那些植株係選擇性由輔助 (helper)T 細胞所擴展，造成表現之抗體的親合力成熟。植株篩選通常造成在 CDR1、2 與 / 或 3 區內包含新突變之植株的表現。然而，亦存在這些區之外的突變 (影響抗原結合區塊的專一性與親合力)。

能夠產生異源性抗體之基因轉殖非人類動物

本發明之一態樣中的基因轉殖非人類動物係藉由將本發明至少一免疫球蛋白轉殖基因 (於下討論) 導入非人類動物之接合子或早期胚胎所形成。本發明中所用之非人類動物通常包括能夠重整免疫球蛋白基因片段以產生初級抗體反應的任何哺乳類。技術中已知上述非人類基因轉殖動物可包括諸如基因轉殖豬、基因轉殖鼠、基因轉殖兔、基因轉殖牛以及其他基因轉殖動物物種，特並係哺乳類物種。特別較佳之非人類動物係小鼠或啮齒類家族的其他成員。

然而，本發明並不限於應用小鼠。反之，可應用任何能夠設置初級與次級抗體反應的非人類哺乳類。上述動物包括非人類靈長類 (例如，黑猩猩)、牛、羊與豬物種、啮齒類家族的其他成員 (例如，大鼠) 以及兔子與天竺鼠。特別較佳之動物係小鼠、大鼠、兔子與天竺鼠，最佳係小鼠。

本發明之一實施例中，來自人類基因體的不同基因片段係以未重整形式用於重鏈與輕鏈轉殖基因。此實施例中，將上述轉殖基因導入小鼠內。輕鏈與 / 或重鏈轉殖基因

之未重整基因片段具有人類物種獨特的 DNA 序列，其可與小鼠基因體中之內源性免疫球蛋白基因片段有所區分。其可輕易地於生殖細胞與非 B 細胞所構成之體細胞中偵測未重整形式而於 B 細胞中偵測到重整形式。

本發明之替代實施例中，轉殖基因包括重整之重鏈與/或輕鏈免疫球蛋白轉殖基因。上述轉殖基因的特定片段對應於功能性重整之 VDJ 或 VJ 片段，其包括亦與小鼠中內源性免疫球蛋白基因片段顯然有所區分之免疫球蛋白 DNA 序列。

上述 DNA 序列中之差異亦反應在上述人類免疫球蛋白轉殖基因所編碼之胺基酸序列與小鼠 B 細胞所編碼之那些胺基酸序列的比較中。因此，可用專一於人類免疫球蛋白基因片段所編碼之免疫球蛋白表位的抗體在本發明之基因轉殖非人類動物內偵測到人類免疫球蛋白胺基酸序列。

包含來自人類或其他物種之未重整轉殖基因的基因轉殖 B 細胞功能性重組適當基因片段以形成功能性重整之輕鏈與重鏈可變區。相當明顯的是，上述重整之轉殖基因所編碼的抗體之 DNA 與/或胺基酸序列與用來實行本發明之非人類動物中通常所遭遇者係異源性的。

未重整之轉殖基因

本文所用之「未重整之免疫球蛋白重鏈轉殖基因」包括編碼至少一可變基因片段、一多樣基因片段、一連接基因片段與一恆定區基因片段的 DNA。上述重鏈轉殖基因之各個基因片段係衍生自、或具有對應序列於編碼來自非由

導入轉殖基因之非人類動物所構成之物種的免疫球蛋白重鏈基因片段之 DNA。相似地，本文所用之「未重整之免疫球蛋白輕鏈轉殖基因」包括編碼至少一可變基因片段、一連接基因片段與至少一恆定區基因片段的 DNA，其中上述輕鏈轉殖基因的各個基因片段係衍生自、或具有對應序列於編碼來自非由導入輕鏈轉殖基因之非人類動物所構成之物種的免疫球蛋白輕鏈基因片段之 DNA。

本發明此態樣中上述重鏈與輕鏈轉殖基因包含未重整型態之上方辨別的基因片段。因此，重鏈轉殖基因中 V、D 與 J 片段之間以及輕鏈轉殖基因上 V 與 J 片段之間的介入係適當的重組信號序列 (RSS's)。此外，上述轉殖基因亦包括適當的 RNA 接合信號以連接恆定區基因片段與 VJ 或 VDJ 重整之可變區。

爲了促進包含超過一個 C 區基因片段(諸如，來自人類基因體的 C μ 與 C γ 1)之重鏈轉殖基因內的同型轉換，將下方說明之「轉換區 (switch region)」併入各個恆定區基因片段之上游與可變區基因片段的下游以允許上述恆定區間之重組好讓免疫球蛋白類型轉換，例如由 IgM 至 IgG。上述重鏈與輕鏈免疫球蛋白轉殖基因亦包含轉錄控制序列，其包括位於可變區基因片段上游的啟動子區(其通常包括 TATA 基序)。可將啟動子區大致界定成當操作性連接至下游序列時可產生下游序列之轉錄的 DNA 序列。啟動子可能需要額外連接之順式作用序列的存在以產生有效的轉錄。此外，較佳係包括參與非生育轉錄本 (sterile transcript)

之轉錄的其他序列。參與非生育轉錄本之表現的序列實例可發現於發表之文獻中，包括 Rothman 等人 *Intl. Immunol.* 2:621-627 (1990)；Reid 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:840-844 (1989)；Stavnezer 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7704-7708 (1988)；以及 Mills 等人 *Nucl. Acids Res.* 18:7305-7316 (1991)，其各個以參考資料併入本文中。這些序列通常包括緊接轉換區上游的至少約 50 bp，較佳係轉換區上游的至少約 200 bp；且更佳係轉換區上游至少約 200-1000 bp 或更多。適當序列在緊接人類 $S_{\gamma 1}$ 、 $S_{\gamma 2}$ 、 $S_{\gamma 3}$ 、 $S_{\gamma 4}$ 、 $S_{\alpha 1}$ 、 $S_{\alpha 2}$ 與 S_{ϵ} 轉換區上游出現；緊接人類 $S_{\gamma 1}$ 與 $S_{\gamma 3}$ 轉換區上游之序列可有利的應用，通常較佳係 $S_{\gamma 1}$ 。或者或搭配，可應用鼠科 Ig 轉換序列；通常有利係應用與基因轉殖非人類動物相同物種的 Ig 轉換序列。再者較佳係緊接轉殖基因轉換序列上游包括干擾素 (IFN) 可誘導之轉錄調控元件 (例如，IFN 可誘導之增強子)。

除了啟動子之外，可應用主要作用於 B-世系細胞的其他調控序列。因此舉例來說，較佳係位於輕鏈轉殖基因上 J 與恆定區基因片段間之輕鏈增強子序列係用來增強轉殖基因表現，藉此促進對偶基因排除。重鏈轉殖基因之實例中，亦應用調控增強子。上述調控序列係用來最大化轉殖基因的轉錄與轉譯，以便引發對偶基因排除並提供相對高水平的轉殖基因表現。

雖然已經一般地描述上述啟動子與增強子調控序列，上述調控序列可與取得異源性轉殖基因免疫球蛋白基因片

段之基因體 DNA 的非人類動物係異源性的。或者，上述調控基因片段係衍生自包含重鏈與輕鏈轉殖基因之非人類動物(或緊密相關之物種)基因體中的對應調控序列。

較佳實施例中，基因片段係衍生自人類。帶有上述重鏈與輕鏈轉殖基因之基因轉殖非人類動物能夠設置對施加於上述動物之特定抗原的 Ig-介導免疫反應。在能夠產生異源性人類抗體之上述動物中產生 B 細胞。永生化與適當單株抗體(Mab)的挑選之後，提供治療性人類單株抗體之來源，例如融合瘤。當治療性施加至人類時，上述人類 Mab 具有明顯減少之免疫原性。

雖然較佳實施例揭露包含人類基因片段之重鏈與輕鏈轉殖基因的構築，本發明並不因此受限。在此方面，可以理解本文所述之教意可輕易適用於來自人類以外物種之免疫球蛋白基因片段。例如，除了以本發明之抗體治療處理人類之外，適當基因片段所編碼之治療抗體可用來產生用於獸醫科學中的單株抗體。

單株抗體

可藉由熟悉技術之人士所知的不同技術來取得單株抗體。簡單地說，將以所欲抗原免疫之動物的脾臟細胞永生化，通常係藉由與骨髓瘤細胞融合(參見 Kohler 與 Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519 (1976))。永生化之替代方法包括以艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr Virus)、致癌基因或反轉錄病毒轉形、或技術中已知的其他方法。以對抗原具有所欲之專一性與親合力之抗體產生來篩選來自單一永生

化細胞之殖株，而上述細胞所產生之單株抗體產量可藉由不同技術(包括注入脊椎動物宿主的腹膜腔內)加以提高。這些領域中有用之不同技術係論述於例如 Harlow 與 Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold spring Harbor, N.Y. (1998)，其全文藉由參考資料在此併入，其包括：產生免疫球蛋白之動物免疫；單株抗體的產生；標記免疫球蛋白作為探針；免疫親合純化；以及免疫試驗。

基因轉殖初級庫

A. 人類免疫球蛋白基因座

轉殖基因功能的重要需求係初級抗體庫的產生，其係多樣到足以引起廣泛抗原的次級免疫反應。重整之重鏈基因係由單一胜肽外子、可變區外子與多-區塊恆定區(其各個係由許多外子所編碼)之串聯陣列所構成。各個恆定區基因編碼不同類型之免疫球蛋白的恆定部分。B 細胞發育過程中，刪除 V 區近側恆定區導致新重鏈類型的表現。針對各個重鏈類型而言，RNA 接合的替代型態造成跨膜與分泌免疫球蛋白兩者。

估計人類重鏈基因座係由橫跨 2 Mb 之 200 個 V 基因片段(目前數據支持約 50-100 個 V 基因片段的存在)、橫跨約 40 kb 的大約 30 個 D 基因片段、群集於 3 kb 全長內的六個 J 片段、以及延伸超過約 300 kb 之九個恆定區基因片段所構成。整個基因座橫跨染色體 14 長臂末端部分約 2.5 Mb。

B. 基因片段轉殖基因

1. 重鏈轉殖基因

較佳實施例中，免疫球蛋白重鏈與輕鏈轉殖基因包括來自人類的未重整之基因體 DNA。重鏈實例中，較佳之轉殖基因包括長度介於 670 至 830 kb 間之 NotI 片段。此片段包括所有六個已知 V_H 家族成員、D 與 J 基因片段以及 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 與 $\alpha 1$ 恆定區 (Berman 等人 EMBO J. 7:727-738 (1988)，其以參考資料併入本文中)。包含此轉殖基因之基因轉殖小鼠品系正確地表現 B 細胞發育所需之重鏈類型 (IgM) 與至少一轉換之重鏈類型 (IgG₁) 以及足夠大的可變區庫以引起針對大多數抗原的次級反應。

如同詳細描述於「較佳之實施例」章節般，較佳之轉殖基因包括重鏈基因序列，其包括 (但不限於) pH2C、pGP69-7 VHC、pVx6、VDJCE、V12DJCE、CTD-3054M17、BAC 融合 #1、BAC 融合 #2、BAC 融合 #3、BAC 融合 #4、BAC 融合 #5、yIgH24a、yIgH10 與 pIgYBac 的嵌入物。

2. 輕鏈轉殖基因

可相似地構築包含所有人類輕鏈基因座之必須基因片段與調控序列的基因體片段。上述轉殖基因係如同實施例與美國專利號 5,789,650 (名稱為 "Transgenic Non-Human Animals Capable of Producing Heterologous Antibodies") 所述般構築。

C. 微小基因座轉殖基因

本文所用之詞彙「免疫球蛋白微小基因座」代表 DNA 序列 (其可位於較長序列之中)，通常小於約 150 kb，通常

介於約 25 與 100 kb 之間，其包含下列各者至少其一：功能性可變(V)基因片段、功能性連接(J)區片段、至少一功能性恆定(C)區基因片段、以及(若為重鏈微小基因座的話)功能性多樣(D)區片段，以致上述 DNA 序列包括至少一實質非連續(例如刪除，相對於同源基因體 DNA 序列而言，通常至少約 2 至 5 kb，較佳係 10-25 kb 或更多)。輕鏈微小基因座轉殖基因長度至少係 25 kb，通常係 50 至 60 kb。重鏈轉殖基因長度通常係約 70 至 80 kb，較佳係至少約 60 kb，具有兩個恆定區操作性連接至轉換區。再者，微小基因座的個別元件較佳係處於生殖細胞結構中並能夠在基因轉殖動物前-B 細胞中進行基因重整，以便表現具有不同抗原專一性之功能性抗體分子(完全由微小基因座的元件所編碼)。再者，重鏈微小基因座包括至少兩個 C_H 基因而必須之轉換序列通常係能夠進行同型轉換，以致產生不同免疫球蛋白類型之功能性抗體分子。上述同型轉換發生在活體內，存在基因轉殖非人類動物內之 B 細胞中；或可發生於 B 細胞世系之培養細胞，其已經自基因轉殖非人類動物外植。

替代較佳實施例中，免疫球蛋白重鏈轉殖基因包括一或更多各個 V_H 、D 與 J_H 基因片段以及二或更多 C_H 基因。將至少一各個適當類型基因片段併入微小基因座轉殖基因。關於重鏈轉殖基因之 C_H 片段，較佳係轉殖基因包含至少一 μ 基因片段與至少一其他恆定區基因片段，更加係 γ 基因片段且最佳係 γ_3 或 γ_1 。此較佳係允許編碼之免疫球

蛋白的 IgM 與 IgG 型間之類型轉換以及高親合力非-IgM 免疫球蛋白之可分泌型的產生。亦可應用其他恆定區基因片段以致其編碼 IgD、IgA 與 IgE 的產生。

熟悉技術人士亦會如此構築轉殖基因，其中重鏈 C_H 基因出現順序不同於物種(作為 C_H 基因的供應者)之生殖細胞所發現之自然存在空間順序。

此外，熟悉技術人士可自物種之超過一個體選擇 C_H 基因(例如，同種異系 C_H 基因)並將上述基因併入轉殖基因做為能夠進行同型轉換之多餘 C_H 基因；某些實施例中，得到之基因轉殖非人類動物接著可產生不同類型的抗體，包括取得轉殖基因 C_H 基因之物種中呈現之所有異型(allotype)。

再者，熟悉技術人士可自不同物種挑選 C_H 基因以併入轉殖基因。功能性轉換序列係包含於各個 C_H 基因中，雖然所用之轉換序列不一定係自然存在鄰近 C_H 基因之那些轉換序列。種間 C_H 基因重組將產生基因轉殖非人類動物，其可產生對應來自不同物種之 C_H 基因的不同類型抗體。包括種間 C_H 轉殖基因之基因轉殖非人類動物可做為用於構築融合瘤(以產生獸醫應用之單株抗體)的 B 細胞來源。

人類中重鏈 J 區片段包括六個功能性 J 片段與三個假基因群集於 3 kb 長的 DNA 中。已知其相對緊密尺寸以及單離這些片段以及 μ 基因與 δ 基因 5' 部分於單一 23 kb Sfil/SpeI 片段上的能力(Sado 等人 Biochem. Biophys. Res.

Comm. 154:264271 (1988), 其以參考資料併入本文中), 較佳係所有 J 區基因片段用於微小基因座構築體中。由於此片段橫跨 μ 與 δ 基因之間的區域, 有可能包含 μ 表現所需之所有 3' 順式-連接之調控元件。再者, 由於此片段包括整個 J 區, 其包含重鏈增強子與 μ 轉換區 (Mills 等人 Nature 306:809 (1983); Yancopoulos 與 Alt, Ann. Rev. Immunol. 4:339-368 (1986), 其以參考資料併入本文中)。其亦包含轉錄開始位置, 其引起 VDJ 連接形成初級庫 B 細胞 (Yancopoulos 與 Alt, Cell 40:271-281 (1985), 其以參考資料併入本文中)。或者, 包括 D 區部分之 36 kb BssHII/SpeII 片段可用來取代 23 kb SfiI/SpeII 片段。使用上述片段可提高 5' 側序列之數量以促進有效 D-至-J 連接。

人類 D 區係由 4 個串聯連接之同源 9 kb 亞區 (subregion) 所構成 (Siebenlist 等人 (1981), Nature, 294, 631-635)。各個亞區包含高達 10 個各別 D 片段。使用兩種不同策略來產生微小基因座 D 區。第一種策略包括僅利用那些位於短連續延伸 DNA 中之 D 片段, 其包括一或兩個重複之 D 亞區。候選者係包含 12 個各別 D 片段之單一 15 kb 片段。此段 DNA 係由 2 個連續 EcoRI 片段所構成且已經完整定序 (Ichihara 等人 (1988), EMBO J., 7, 4141-4150)。12 個 D 片段應足以用於初級庫。然而, 已知 D 區的分散天性, 替代策略係將許多非連續之含有 D 片段的片段接合以產生具有較高數目之片段的較小片 DNA。可辨別額外 D-片段基因, 例如藉由特有旁側九聚體與七聚體

序列的存在，如上文並參照文獻。

至少一(且較佳高於一)V 基因片段用於構築重鏈微小基因座轉殖基因。可如下述般將重整或未重整之 V 片段、D 片段、J 片段與 C 基因(帶有或不帶有旁側序列)單離：均給予 Lonberg 與 Kay 的美國專利號 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299、與 5,770,429；給予 Surani 等人的美國專利號 5,545,807；均給予 Lonberg 與 Kay 的 PCT 公開號 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 與 WO 99/45962；以及給予 Korman 等人的 PCT 公開號 WO 01/14424，其各自以參考文獻併入。

可相似地由人類 λ 或 κ 免疫球蛋白基因座構築微小基因座輕鏈轉殖基因。因此舉例來說，編碼 V、D、J 與恆定區序列之免疫球蛋白重鏈微小基因座轉殖基因構築體(例如，約 75 kb)可由複數個 DNA 片段所形成，各個序列係實質同源於人類基因序列。序列較佳係操作性連接轉錄調控序列並能夠進行重整。具有兩個或更多適當定位之恆定區序列(例如， μ 與 γ)以及轉換區，亦發生轉換重組。可相似地由複數個 DNA 片段(實質同源於人類 DNA 並能夠進行重整)形成示範性輕鏈轉殖基因構築體，如同描述於美國專利號 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299 與 5,770,429。

D. 內源性免疫球蛋白基因座的功能性破壞

預期成功重整之免疫球蛋白重鏈與輕鏈轉殖基因的表

現藉由抑制基因轉殖非人類動物中內源性免疫球蛋白基因的重整而具有優勢。然而，產生缺少內源性抗體之非人類的另一方法係藉由突變內源性免疫球蛋白基因座。利用胚胎幹細胞技術與同源重組，可輕易排除內源性免疫球蛋白庫。下方描述小鼠免疫球蛋白基因座的功能性描述。然而，所揭露之載體與方法可輕易適用於其他非人類動物。

簡單地說，此技術包括在能夠分化成生殖細胞組織之多能性細胞株中藉由同源重組來使基因去活性。將包含經改變之小鼠免疫球蛋白基因複本的 DNA 構築體導入胚胎幹細胞的細胞核內。細胞的部分中，導入 DNA 與內源性小鼠基因複本重組，以經改變之複本替換之。將包含新進設計之基因損害的細胞注入宿主小鼠胚胎中，將胚胎重新植入雌性接受子。這些胚胎某些發育成具有完全衍生自突變細胞株之生殖細胞的嵌合小鼠。因此，藉由繁殖嵌合小鼠，有可能得到包含導入之基因損害的新品系小鼠(回顧於 Capecchi (1989), *Science*, 244, 1288-1292)。

由於小鼠 λ 基因座僅佔免疫球蛋白的 5%，重鏈與 / 或 κ -輕鏈基因座的去活性係足夠的。有三種方法可破壞各個這些基因座，刪除 J 區、刪除 J-C 內子增強子、以及藉由導入終止密碼子破壞恆定區編碼序列。最後一個選擇在 DNA 構築設計預中係最直接的。排除 μ 基因破壞了 B 細胞成熟藉此避免類型轉換至任何功能性重鏈片段。剔除這些基因座的策略係列述於下。

爲了破壞小鼠 μ 與 κ 基因，根據 Jaenisch 與同事

(Zijlstra 等人 (1989), *Nature*, 342, 435-438) 所用之設計應用目標載體以成功破壞小鼠 $\beta 2$ -微球蛋白基因。將來自質體 pMCIneo 的新黴素 (neomycin) 抗性基因 (neo) 插入目標基因的編碼區。pMCIneo 嵌入物應用雜合病毒啟動子/增強子序列來驅動 neo 表現。此啟動子在胚胎幹細胞中係活躍的。因此，可將 neo 用作剔除構築體整合的可篩選標記。將 HSV 胸腺嘧啶激酶 (thymidine kinase, tk) 基因附加至構築體末端做為對抗隨機插入事件的負向篩選標記 (Zijlstra 等人，上篇)。

破壞重鏈基因座的較佳策略係排除 J 區。此區在小鼠中係相當緊密，僅橫跨 1.3 kb。為了構築基因目標載體，單離包含所有隱藏 IgA 恆定區外子 (來自小鼠基因體庫) 的 15 kb KpnI 片段。以來自 pMCIneo 的 1.1 kb 嵌入物替換 1.3 kb 的 J 區。接著將 HSV tk 基因附加至 KpnI 片段的 5' 端。此構築體透過同源重組的正確併入將造成以 neo 基因取代小鼠 J_H 區。藉由 PCR 利用根據 neo 基因之引子以及與 D 區中 KpnI 位置的 5' 小鼠序列同源之引子來篩選重組體。

或者，藉由破壞 μ 基因的編碼區來剔除重鏈基因座。此方法包括用於先前方法的相同 15 kb KpnI 片段。將來自 pMCIneo 的 1.1 kb 嵌入物插入外子 II 中的獨特 BamHI 位置，並將 HSV tk 基因附加至 3' KpnI 末端。接著選擇排除 tk 基因發生在 neo 嵌入物任一側的雙重交叉 (double crossover) 事件。藉由 PCR 擴增自選擇之植株群中偵測。

PCR 引子之一係衍生自 neo 序列而另一者係衍生自目標載體外的小鼠序列。

E. 內源性免疫球蛋白基因座的抑制表現

除了功能性破壞內源性 Ig 基因座外，避免內源性 Ig 基因座表現之替代方法係抑制。內源性 Ig 基因的抑制可藉由下列完成：一或更多併入之轉殖基因產生的反義 RNA、反義寡核苷酸與/或施加專一於一或更多內源性 Ig 鏈的抗血清。

反義聚核苷酸

可應用反義 RNA 轉殖基因來部分或完全剔除特定基因的表現 (Juliano 等人 J Cell Biol., 169(6):847-57 (2005); Antisense Research and Application, (2002). S.T. Crooke, Ed., Springer, N.Y.; Pepin 等人 (1991) Nature 355: 725; Helene., C. 與 Toulme, J. (1990) Biochimica Biophys. Acta 1049: 99; Stout, J. 與 Caskey, T. (1990) Somat. Cell Mol. Genet. 16: 369; Munir 等人 (1990) Somat. Cell Mol. Genet. 16: 383, 其各個以參考資料併入本文中)。

「反義聚核苷酸」係聚核苷酸，其：(1)互補於所有或部分的參考序列，諸如內源性 Ig C_H 或 C_L 區的序列，以及 (2)專一性雜合至互補目標序列，諸如染色體基因基因座或 Ig mRNA。上述互補反義聚核苷酸可包括核苷酸取代、附加、篩除或移位，以致將相關目標序列的專一性雜合保持成聚核苷酸的功能特性。互補反義聚核苷酸包括可溶之反義 RNA 或 DNA 寡核苷酸，其可專一性雜合至個別 mRNA

物種並避免 mRNA 物種的轉錄與/或 RNA 處理與/或所編碼之聚胜肽的轉譯 (Juliano 等人 *J Cell Biol.*, 169(6):847-57 (2005); Ching 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10006-10010 (1989); Broder 等人 *Ann. Int. Med.* 113:604-618 (1990); Loreau 等人 *FEBS Letters* 274:53-56 (1990); Holcenberg 等人 WO91/11535; 美國編號 07/530,165 (「新人類 CRIPTO 基因」); WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641; 與 EP 386563, 其各個以參考資料併入本文中)。反義序列係互補於至少一免疫球蛋白基因序列的聚核苷酸序列, 其長度係至少約 15 個連續核苷酸、通常至少 20 至 30 個核苷酸、以及較佳係超過約 30 個核苷酸。然而某些實施例中, 反義序列相對於互補免疫球蛋白基因序列可具有取代、附加或刪除, 以便將專一性雜合保持為反義聚核苷酸的特性。一般而言, 反義序列係互補於內源性免疫球蛋白基因序列(編碼或在 DNA 重整之後有可能編碼免疫球蛋白鏈)。某些實例中, 對應於免疫球蛋白基因序列之正義序列可用來抑制表現, 特別係干擾轉錄。

反義聚核苷酸因此可抑制所編碼之聚胜肽的產生。在此方面, 抑制一或更多內源性 Ig 基因座轉錄與/或轉譯的反義聚核苷酸可改變非人類動物產生內源性 Ig 基因座編碼之免疫球蛋白鏈的能力與/或專一性。

反義聚核苷酸可由轉染細胞或或基因轉殖細胞(例如, 用於重新構成所有或部分的個體造血幹細胞群的基因轉殖多能性造血幹細胞)或基因轉殖非人類動物中之異源

性表現匣 (cassette) 所產生。或者，反義聚核苷酸可包括可溶之寡核苷酸，其可施加至外在環境，如試管內 (in vitro) 培養基中或活體內循環系統或間質液 (interstitial fluid) 中。已經顯示存在於外在環境中的可溶之反義聚核苷酸能夠進入細胞質並抑制特定 mRNA 物種的轉譯。某些實施例中，反義聚核苷酸包括甲基磷酸 (methylphosphonate) 部分，可應用硫膦酸 (phosphorothiolate) 或 O-甲基核糖核苷酸任一者，並亦可應用嵌合寡核苷酸 (Juliano 等人 J Cell Biol., 169(6):847-57 (2005); Dagle 等人 (1990) Nucleic Acids Res. 18: 4751)。針對某些應用，反義寡核苷酸可包括聚醯胺核酸 (Nielsen 等人 (1991) Science 254: 1497)。針對反義聚核苷酸相關之一般方法，參閱 Antisense Research and Application, (2002). S.T. Crooke, Ed., Springer, N.Y. 以及 Antisense RNA and DNA, (1988), D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 兩者之全文以參考資料併入)。

互補於一或更多序列的反義聚核苷酸係用來抑制同源 (cognate) mRNA 物種的轉錄、RNA 處理與/或轉譯並藉此造成各個編碼之聚胜肽數量的減少。上述反義聚核苷酸可藉由抑制活體內一或更多內源性 Ig 鏈的形成來提供治療功能。

不論做為可溶之反義寡核苷酸或反義轉殖基因轉錄之反義 RNA，本發明之反義聚核苷酸係經選擇以在活體內生理條件下優先雜合內源性 Ig 序列。最具代表性地，選擇之

反義聚核苷酸不會明顯地雜合本發明之重鏈或輕鏈轉殖基因所編碼之異源性 Ig 序列(即，反義寡核苷酸不會抑制轉殖基因 Ig 表現超過約 25 至 35 百分比)。

抗血清抑制

可藉由以對抗一或更多內源性 Ig 鏈之抗血清注射小鼠來產生內源性 Ig 鏈表現的部分或完全抑制(Weiss 等人(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 81 211, 其以參考資料併入本文中)。抗血清係經選擇以便與一或更多內源性(例如，鼠科) Ig 鏈專一性反應，但與本發明 Ig 轉殖基因所編碼之異源性 Ig 鏈具有極小或無交互反應性。因此，根據 Weiss 等人典型之表單施加選擇之抗血清將抑制內源性 Ig 鏈表現但允許本發明轉殖基因所編碼之異源性 Ig 鏈的表現。抗體的適當抗體來源包括：(1)單株抗體，諸如專一性結合鼠科 μ 、 γ 、 κ 或 λ 鏈但不與本發明之人類 Ig 轉殖基因所編碼之人類免疫球蛋白鏈反應之單株抗體；(2)上述單株抗體的混合物，以致混合物結合內源性 Ig 鏈之單一物種上的多個表位、多個內源性 Ig 鏈(諸如，鼠科 μ 與鼠科 γ)、或多個表位與多個鏈或內源性免疫球蛋白；(3)多株抗血清或其混合物，上述抗血清通常係單一專一於結合內源性 Ig 鏈的單一物種(諸如，鼠科 μ 、鼠科 γ 、鼠科 κ 、鼠科 λ)或內源性 Ig 鏈的多個物種，且上述抗血清最佳係與本發明轉殖基因所編碼之人類免疫球蛋白鏈具有微不足道的結合；與/或(4)結合內源性 Ig 鏈單一或多個物種之多株抗血清與單株抗體的混合物，且最佳係與本發明轉殖基因所編

碼之人類免疫球蛋白鏈具有微不足道的結合。一般而言，多株抗體係較佳的，且可有利地由對抗人類免疫球蛋白所產生之抗血清產生上述實質單一專一性多株抗體，這係藉由衍生自非人類動物物種(例如，鼠科)之抗體的預先吸附(pre-adsorption)與/或例如包含固定人類 Ig 之親合樹脂上抗血清的親合層析或其純化部分(其中結合部分富有抗血清中所欲之抗-人類 Ig；通常係以低 pH 條件或散亂鹽溶液洗提結合部分)。

細胞分離與/或補體固定可用來提高抗體-引導細胞缺少表現內源性(例如，鼠科)免疫球蛋白鏈之淋巴球。一實施例中，例如抗體用於活體外耗盡得自帶有人類 Ig 轉殖基因之基因轉殖小鼠的鼠科 Ig-表現外植造血細胞與/或 B-世系淋巴球。因此，自帶有人類 Ig 轉殖基因(較佳係帶有人類重鏈轉殖基因與人類輕鏈轉殖基因兩者)之基因轉殖非人類動物外植造血細胞與/或 B-世系淋巴球，並將外植細胞以抗體(或抗體們)培養，抗體(1)結合內源性免疫球蛋白(例如，鼠科 μ 與/或 κ)以及(2)缺少對轉殖基因所編碼之人類免疫球蛋白鏈的實質結合力。上述抗體被稱為「抑制抗體(suppression antibody)」以便分辨。外植細胞群係選擇性耗盡結合抑制抗體的細胞；上述耗盡可藉由不同方法完成，諸如(1)物理分隔，以自未結合之細胞移除抑制抗體結合之細胞(例如，抑制抗體可結合至固體支撐件或磁珠以固定並移除結合至抑制抗體的細胞)，(2)抑制抗體所結合之細胞的抗體-依賴型細胞死亡(例如，藉由 ADCC、補體固

定或連接至抑制抗體的毒素)，及(3)抑制抗體所引發的細胞株失能(clonal anergy)等。

通常用於內源性 Ig 鏈產生之抗體抑制的抗體能夠固定補體。上述抗體通常較佳係經選擇以充分地與便利補體來源(諸如，兔子或天竺鼠補體)反應以用於活體外/試管內耗盡。針對活體內耗盡而言，抑制抗體通常較佳係具有非人類基因轉殖動物物種中效應子功能；因此包括鼠科效應子功能(諸如，ADCC 與補體固定)之抑制抗體通常係較佳用於基因轉殖小鼠中。

一變化中，專一性結合預定內源性免疫球蛋白鏈之抑制抗體係用於活體外/試管內耗盡表現內源性免疫球蛋白之淋巴球。將來自帶有人類免疫球蛋白轉殖基因之基因轉殖非人類動物的細胞外植體(例如，淋巴球樣本)與抑制抗體接觸並耗盡專一性結合抑制抗體之細胞(諸如，藉由固定法、補體固定等)，藉此產生耗盡表現內源性(非人類)免疫球蛋白(例如，表現鼠科 Ig 之淋巴球)之細胞的細胞亞群。將得到的經耗盡之淋巴球群體(T 細胞、人類 Ig-陽性 B 細胞等)轉移至免疫相容(即，MHC-相容)之相同物種的非人類動物，且其實質上無法產生內源性抗體(諸如，SCID 小鼠、RAG-1 或 RAG-2 剔除小鼠)。接著可以抗原免疫重新構成之動物(小鼠)(或以用來免疫取得外植體之供應子動物的抗原重新免疫)以取得高親合力(親合力成熟)抗體與產生上述抗體之 B 細胞。可藉由傳統細胞融合將上述 B 細胞用來產生融合瘤並篩選之。抗體抑制可搭配其他內源性

Ig 去活性/抑制方法(諸如, J_H 剔除、 C_H 剔除、D 區消融(ablation)、反義抑制、補償式讀框轉移去活性)一起應用。

完全的內源性 Ig 基因座去活性

某些實施例中, 樂於造成內源性 Ig 基因座的完全去活性, 以致無法形成包含人類可變區與非人類(例如, 鼠科)恆定區之雜合免疫球蛋白鏈(例如, 藉由轉殖基因與內源性 Ig 序列間之反式轉換(trans-switching))。帶有僅功能性破壞 J_H 區之內源性重鏈對偶基因的剔除小鼠經常顯示反式轉換, 通常係在轉殖基因所編碼之重整人類可變區(VDJ)表現成連接至內源性鼠科恆定區之融合蛋白, 雖然其他反式轉換連接係可能的。爲了克服此可能的問題, 通常樂見藉由任何不同方法使內源性重鏈基因座完全去活性, 方法包括(但不限於下列): (1)藉由同源重組至少一(且較佳係所有)內源性重鏈恆定區基因而功能性破壞與/或刪除, (2)突變至少一(且較佳係所有)內源性重鏈恆定區基因以編碼終止密碼子(或讀框轉移)以產生截斷或讀框轉移的產物(若反式轉換的話), 以及熟悉技術人士所知的其他方法與策略。刪除實質部分或所有的重鏈恆定區基因與/或 D 區基因可藉由不同方法實現, 包括藉由同源重組目標載體的連續刪除, 特別係「打帶跑(hit-and-run)」類型等。相似地, 通常較佳係功能性破壞與/或刪除至少一內源性輕鏈基因座(例如, κ)以清除內源性輕鏈恆定區基因。

較佳實施例中, 破壞係內源性小鼠重鏈-與 κ -輕鏈免疫球蛋白基因兩者, 而具有上述破壞之小鼠中產生與表現

之抗體傾向源自導入之轉殖基因。破壞 κ 輕鏈基因座的較佳方法係描述於 Chen 等人 (1993) EMBO J. 12:811-820 中，其全文以參考資料併入。同源破壞重鏈基因座的較佳方法包括破壞 μ 重鏈基因，描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1 中 (通稱為 M 或 CMD 破壞)；及 J 重鏈基因破壞，描述於美國專利號 5,545,806 (通稱為 J 或 JHD 破壞)。

通常係樂見應用讀框轉移的轉殖基因，其中異源性轉殖基因包括 J 片段中的讀框轉移以及一或更多 (較佳係所有) 轉殖基因恆定區基因中開始區 (即，胺基端編碼部分) 的補償性讀框轉移 (即，用以重建最初的讀框)。反式轉換至內源性 IgH 基因座恆定基因 (其不包括補償式讀框轉移) 將造成截斷或錯義產物，其造成反式轉換之 B 細胞被刪除或未被選擇，藉此抑制反式轉換之表現形。

反義抑制與抗體抑制亦可用來造成內源性 Ig 基因產物表現 (例如，鼠科重鏈與輕鏈序列) 與 / 或反式轉換之抗體 (例如，人類可變 / 鼠科恆定嵌合抗體) 的實質完全功能性去活性。

去活性與抑制策略的不同組合可用來造成內源性 (例如，鼠科) Ig 鏈表現的實質完整抑制。

異增強子 (xenoenhancer)

能夠編碼人類免疫球蛋白 (例如，重鏈) 的異源性轉殖基因有利地包括順式連接之增強子，其並不衍生自小鼠基因體與 / 或其並不與異源性轉殖基因之外子順式自然連結。例

如，人類 κ 轉殖基因(例如， κ 微小基因座)可有利地包括人類 $V\kappa$ 基因、人類 $J\kappa$ 基因、人類 $C\kappa$ 基因與異增強子，上述異增強子通常包括人類重鏈內子增強子與/或鼠科重鏈內子增強子，通常位於 $J\kappa$ 基因與 $C\kappa$ 基因之間或位於 $C\kappa$ 基因下游。例如，可單離小鼠重鏈 $J-\mu$ 內子增強子(Banerji 等人(1983) Cell 33: 729)於質體 pKVe2 之 0.9 kb XbaI 片段上(參閱下方)。可單離人類重鏈 $J-\mu$ 內子增強子(Hayday 等人(1984) Nature 307: 334)於 1.4 kb MluI/HindIII 片段上(參閱下方)。將轉錄活性的異增強子附加至轉殖基因，例如主要由順式連接至小鼠 $J-\mu$ 內子增強子之人類 $J-\mu$ 內子增強子所構成的接合異增強子，可給予高水平表現的轉殖基因，特別係上述轉殖基因編碼例如人類 κ 之輕鏈。相似地，可有利地將大鼠 3'增強子包含於能夠編碼人類重鏈之微小基因座構築體中。

特定較佳實施例

本發明較佳實施例包括應用一或更多表 1 所辨別之構築體。

表 1.

構築體類型	實例	描述
質體	pHC2	~80 kb 微小基因座轉殖基因，具有 4 個功能性 V_h 片段、15 個 D 片段、6 個 J 片段、 μ 與 $\gamma 1$ 編碼外子(具有轉換區)、 $J\mu$

		內子增強子與大鼠 3'重鏈增強子。參見 Taylor 等人 Intl. Immunol. v.6 no.4, pp579-591 (1994)
質體	pGP69-7 VHC	~28 kb 轉殖基因，具有 12 個功能性人類 Vh 片段外加「同源匣 (homology cassette)」於 3' 端以促進與其他構築體 (例如，VDJCE) 的重組
質體	pVx6	~25 kb 轉殖基因，具有 3 個功能性 Vh 片段 (5-51、3-23 與 1-18；專利 WO 01/09187)
BAC	VDJCE	~240 kb 經設計之 BAC，其包括 (生殖細胞結構中) 大約 230 kb 的人類重鏈基因座。序列的 5' 範圍係 Vh 6-1 上游約 22 kb bp，3' 範圍係 IgH γ 1 下游約 8.7 kb。衍生自 BAC 構築體 CTD-2590A7 與 -2194O15。將衍生自人類 Ig 基因座的合成 Ig 增強子附加至 3' 端。
BAC	V12DJCE	~238 kb 經設計之 BAC，其包括 12 個衍生自 pGP69-7 VHC 的 Vh 片段併入 VDJCE BAC，D 區

		上游約~8 kb。
BAC	CTD-3054M17	~190 kb BAC 植株，包含未重整生殖細胞結構之人類重鏈 Ig Vh 片段(由 5'端的 Vh 4-39 至 3'端的 Vh 3-23)
BAC	BAC 融合 #1	~196 kb BAC 植株，由親本 BAC CTD-2011A5 重整而來(Vh 含量橫跨 5'端的 3-74 至 3'端的 3-53)；將「VHC」同源匣附著至 3'端
BAC	BAC 融合 #2	~217 kb BAC 植株，由親本 BAC CTD-3148C6 與 CTD-3074B5 重整而來(Vh 含量橫跨 5'端的 3-53 至 3'端的 3-38)；將「VHC」同源匣附著至 3'端
BAC	BAC 融合 #3	~202 kb BAC 植株，由親本 BAC CTD-3054M17 重整而來(Vh 含量橫跨 5'端的 4-39 至 3'端的 3-23)；將「VHC」同源匣附著至 3'端
BAC	BAC 融合 #4	~227 kb BAC 植株，由親本 BAC CTD-2548B8 與 CTD-2124N14 重整而來(Vh 含量橫跨 5'端的 3-23 至 3'端的 3-7)；將「VHC」

		同源匣附著至 3' 端
BAC	BAC 融合 #5	~114 kb BAC 殖株，由親本 BAC CTD-2304I22 重整而來 (Vh 含量橫跨 5' 端的 3-7 至 3' 端的 1-2)；將「VHC」同源匣附著至 3' 端
YAC	yIgH24a	~460 kb YAC 殖株，包含未重整生殖細胞結構之人類重鏈 Ig Vh 片段 (由 5' 端的 Vh 3-53 至 3' 端的 Vh 1-24)。參閱專利申請案 WO2005/058815 的描述。
YAC	yIgH10	~375 kb YAC 殖株，包含未重整生殖細胞結構之人類重鏈 Ig Vh 片段 (由 5' 端的 Vh 4-34 至 3' 端的 Vh 3-15)
BAC-YAC	pIgYBac	~500 kb 細菌-酵母菌穿梭載體，包含來自 yIgH10 所有相關之 Vh 片段加上整個 VDJCE

上述實施例的特定實例包括一或更多上述構築體，其包括 (但不限於) HCo20、HCo27、HCo28、HCo30、HCo31、HCo32、HCo33 與 HCo34，其各個詳細描述於包含於下之實施例中。

額外實施例包括應用表 1 描述之 VDJCE BAC 或

V12DJCE 嵌入物與衍生自第 2 圖所示之生殖細胞人類 IgH BAC 植株的任何單一嵌入物共同引入。進一步實施例應用多個生殖細胞人類 IgH BAC 構築體嵌入物與 VDJCE 或 V12DJCE 嵌入物任一者共同引入。或者，VDJCE BAC 或 V12DJCE 嵌入物可與衍生自「BAC 融合」構築體(表 1 中所辨認之 BAC 融合 #1-5)任何單一嵌入物共同引入。此外，IgH BAC 構築體的實例中，多個 BAC 融合構築體嵌入物可與 VDJCE 或 V12DJCE 嵌入物任一者共同引入。再者，可單離 BAC 融合構築體並包含或不包含 VHC 同源匣於 3' 端而引入。此外，yIgH10 與 yIgH24a 嵌入物任一或兩者可與 VDJCE 或 V12DJCE 嵌入物任一者共同引入。相似地，pIgYBac 可與第 2 圖及表 1 所述之生殖細胞人類 IgH YAC 植株、人類 IgH 生殖細胞 BAC 植株嵌入物、或 BAC 融合構築體嵌入物的任何組合共同引入，同樣可包含或不包含 VHC 匣於 BAC 融合構築體的 3' 端。

表 1 中所列且包含於第 2 圖中辨別有字首「CTD-」之 BAC 植株係衍生自「CTD」人類基因體 BAC 庫，由 Hiroaki Shizuya 實驗室(California Institute of Technology)所建並可自 Open Biosystems 商業上取得。可在 California Institute of Technology 網站：informa.bio.caltech.edu/idx_www_tree.html 上發現與 BAC 植株覆蓋與構築相關的詳細資訊，其全文以參考資料併入。

某些實施例中，較佳係產生具有預定庫之小鼠，以限制對預定抗原類型的抗體反應中呈現之 V 基因的選擇。具

有預定庫之重鏈轉殖基因包括例如人類 V_H 基因，其較佳係用於對人類中預定抗原類型之抗體反應中。或者，可因為不同理由將某些 V_H 基因自界定之庫排除(例如，對預定抗原編碼高親合力 V 區的可能性低；進行體細胞突變與親合力銳化的傾向低；或對某些人類係免疫原性的)。

因此，包含不同重鏈或輕鏈基因片段之轉殖基因的重整前，可輕易辨別(諸如，藉由雜合或 DNA 定序)上述基因片段係來自基因轉殖動物以外有機體的物種。

可用預定抗原免疫本發明之基因轉殖小鼠，預定抗原諸如跨膜蛋白、細胞表面巨分子或其他適當抗原(諸如，TNF、LPS 等)，將樂見人類抗體。小鼠將產生 B 細胞，其透過內轉殖基因轉換重組(順式-轉換)進行類型轉換並表現與預定抗原反應之免疫球蛋白。免疫球蛋白可為人類序列抗體，其中重鏈與輕鏈聚胜肽係由人類轉殖基因序列所編碼，其包括衍生自體細胞突變與 V 區重組連接的序列以及生殖細胞編碼序列；這些人類序列免疫球蛋白可視為實質相同於人類 V_L 或 V_H 基因片段與人類 J_L 或 J_H 片段所編碼之聚胜肽序列，即便存在因為體細胞突變與不同 $V-J$ 與 $V-D-J$ 重組連接的其他非生殖細胞序列。參照上述人類序列抗體，各個鏈之可變區通常至少 80 % 由人類生殖細胞 V 、 J (且在重鏈實例中， D) 基因片段所編碼；通常至少 85 % 的可變區係由轉殖基因上存在的人類生殖細胞序列所編碼；通常 90 或 95 % 或更高的可變區序列係由轉殖基因上存在的人類生殖細胞序列所編碼。然而，由於非生殖細胞

序列係由體細胞突變與 VJ 及 VDJ 連接所導入，人類序列抗體通常具有某些可變區序列(且較少有恆定區序列)，非由小鼠生殖細胞中之人類轉殖基因內發現之人類 V、D 或 J 基因片段所編碼。一般而言，上述非生殖細胞序列(或各個核苷酸位置)將群集於或接近 CDRS，或位於已知體細胞突變群集的區域中。

來自上述小鼠之 B 細胞可用來產生表現對抗不同抗原之單株高親合力(高於 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)人類序列抗體的融合瘤，抗原包括人類蛋白(諸如，CD4 等)。這些融合瘤可用來產生包括免疫球蛋白之組合物，免疫球蛋白結合預定之人類抗原的親合力常數(K_a)至少 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ，其中上述免疫球蛋白係由下列所構成：人類序列輕鏈，由下列所構成(1)輕鏈可變區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 V_L 基因片段與人類 J_L 片段所編碼之聚胜肽序列，及(2)輕鏈恆定區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 C_L 基因片段所編碼之聚胜肽序列；及人類序列重鏈，由下列所構成(1)重鏈可變區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 V_H 基因片段選擇性 D 區與人類 J_H 片段所編碼之聚胜肽序列，及(2)恆定區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 C_H 基因片段所編碼之聚胜肽序列。

人類序列重鏈與人類序列輕鏈通常係分別由人類重鏈轉殖基因與人類輕鏈轉殖基因所編碼，其各自併入小鼠細胞基因體中。然而，兩者鏈可由單一轉殖基因所編碼，或者一或兩者鏈可由多個轉殖基因所編碼。

一實施例中，本發明提供之基因轉殖小鼠包括：功能性破壞之內源性重鏈對偶基因的同源配對、功能性破壞之內源性輕鏈對偶基因的同源配對、至少一異源性免疫球蛋白輕鏈轉殖基因複本與至少一異源性免疫球蛋白重鏈轉殖基因複本，且其中上述動物在以人類抗原免疫之後產生抗體反應，其中抗體反應包括結合預定人類抗原親合力常數 (K_a) 至少 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 的免疫球蛋白，其中上述免疫球蛋白係由下列所構成：人類序列輕鏈，由下列所構成 (1) 輕鏈可變區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 V_L 基因片段與人類 J_L 片段所編碼之聚胜肽序列，及 (2) 輕鏈恆定區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 C_L 基因片段所編碼之聚胜肽序列；及人類序列重鏈，由下列所構成 (1) 重鏈可變區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 V_H 基因片段、選擇性 D 區與人類 J_H 片段所編碼之聚胜肽序列，及 (2) 恆定區，其聚胜肽序列係實質相同於人類 C_H 基因片段所編碼之聚胜肽序列。

較佳實施例中，將本發明之轉殖基因導入 HCo7/ λ 小鼠。上述 HCo7/ λ 小鼠中，不僅已經如 Chen 等人 (1993) EMBO J. 12:811-820 所述般同源地破壞內源性小鼠 κ 輕鏈基因，而且已經如 PCT 公開案 WO 01/09187 之實施例 1 所述般同源地破壞內源性小鼠重鏈基因。再者，上述小鼠帶有人類 κ 輕鏈轉殖基因 KCo5，描述於 Fishwild 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851；及人類重鏈轉殖基因 HCo7，描述於美國專利號 5,545,806、5,625,825 與

5,545,807。小鼠亦帶有包含大部分人類 Ig λ 基因座的酵母菌人造染色體所構成之人類 λ 輕鏈轉殖基因，描述於 PCT 公開案 WO 2000/26373。透過選擇性培育，可重新取得帶有重鏈與輕鏈兩者同源基因破壞且包含人類重鏈轉殖基因的小鼠，就輕鏈轉殖基因而言，包含 κ 與 λ 輕鏈轉殖基因兩者、僅有 κ 輕鏈轉殖基因或僅有 λ 輕鏈轉殖基因，所有三種基因型可用於人類抗體的免疫與恢復。

除了應用具有內源性重鏈與/或輕鏈基因座破壞的小鼠外，可藉由在基因轉殖小鼠(具有包含併入之人類免疫球蛋白轉殖基因的基因體)中擴展人類可變區基因片段庫的方法促進對抗預定抗原之高親合力人類序列抗體的發展。實現此目標的一較佳方法包括將 V 基因轉殖基因導入基因體，V 基因轉殖基因包括不存在於先前併入之人類免疫球蛋白轉殖基因中的 V 區基因片段。通常 V 區轉殖基因包括人類 V_H 或 $V_L(V_K)$ 基因片段陣列的一部分，如同自然存在於人類基因體或如同藉由重組方法個別地接合在一起，其包括失序或刪去的 V 基因片段。通常藉由此方法導入至少 5、10、20 或更多個功能性 V 基因片段。上述轉殖基因的實施例包括上述之 pHC2、pGP69-7 VHC、pVx6、VDJCE、V12DJCE、CTD-3054M17、BAC 融合 #1、BAC 融合 #2、BAC 融合 #3、BAC 融合 #4、BAC 融合 #5、yIgH24a、yIgH10 與 pIgYBac 的嵌入物。上述變化中，有可能產生藉由 V 庫擴展方法產生基因轉殖小鼠，其中小鼠表現免疫球蛋白鏈，其包括 V 區轉殖基因上存在之 V 區基因片段編碼之可變區

序列以及人類 Ig 轉殖基因上編碼之 C 區。藉由 V 庫擴展方法，可產生具有至少 5 個不同 V 基因的基因轉殖小鼠；而小鼠可包含至少約 24 個或更多 V 基因。當然，某些 V 基因片段係無功能的（諸如，假基因等）；若需要的話，可藉由熟悉技術人士可用的重組方法保留或選擇性刪除這些片段。

一但已經設計小鼠生殖細胞包含擴展之 V 片段庫，可增殖特徵並培育至其他基因背景，包括將擴展之 V 片段庫培育至具有不同之人類 Ig 轉殖基因的小鼠生殖細胞背景中。可將多個擴展之 V 片段庫培育至生殖細胞以與人類 Ig 轉殖基因（或多個人類 Ig 轉殖基因）共同作用。

本發明亦提供增殖人類序列免疫球蛋白表現特徵的方法，其包括培育具有人類 Ig 轉殖基因且選擇性亦具有擴展之 V 片段庫的基因轉殖小鼠。 V_H 與 V_L 基因片段兩者可存在於擴展之 V 片段庫。可將基因轉殖小鼠培育至實施者所欲之任何背景，包括帶有其他人類轉殖基因（包括人類 Ig 轉殖基因與/或編碼其他人類淋巴球蛋白之轉殖基因）之背景。可進一步將基因轉殖小鼠培育成帶有其他非免疫球蛋白基因（其之功能可改變抗體反應或淋巴球功能）之基因破壞的小鼠。

較佳實施例中，上述培育包括培育成 Balb/c 品系，詳細描述於實施例 12。

藥學組合物

另一態樣中，本發明提供包含本發明之單株抗體或其

之抗原結合部分之一或組合與藥學可接受載體一起配置的組合物(例如，藥學組合物)。

本發明之藥學組合物亦可結合治療一起施用，即與其他試劑結合。例如，組合式治療可包括結合至少一其他抗發炎或免疫抑制劑之本發明抗體。可用於組合式治療之治療劑實例係更加詳細描述於本發明抗體之應用的下方段落中。

本文所用之「藥學可接受載體」包括任何與全部生理相容之溶劑、散佈媒介、塗層、抗細菌與抗真菌劑、等張與吸收延遲劑等。載體較佳係適合靜脈內、肌肉內、皮下、非腸胃、脊髓或表皮施加(諸如，藉由注射或注入)。取決於施加路徑，可用材料塗覆接合之抗體與夥伴分子以保護化合物免受會使化合物失去活性之酸與其他自然狀況的作用。

本發明之藥學化合物可包括一或更多藥學可接受鹽類。「藥學可接受鹽類」代表保留原本化合物所欲之生物活性且不給予任何不欲之毒物影響之鹽類(參見，例如 Berge, S.M.等人(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。上述鹽類的實例包括酸加成鹽(acid addition salt)與鹼加成鹽(base addition salt)。酸加成鹽包括那些衍生自無毒無機酸，諸如氫氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸等之鹽類；以及衍生自無毒有機酸，諸如脂肪族單-與雙羧酸、苯基-取代之烷酸、羥基烷酸、芳香酸、脂肪族與芳香族硫酸等之鹽類。鹼加成鹽包括那些衍生自鹼土金屬，諸

如鈉、鉀、鎂、鈣等之鹽類；以及衍生自無毒有機胺類，諸如 N,N'-二苄基伸乙基二胺 (N,N'-dibenzylethylenediamine)、N-甲基葡萄糖胺 (N-methylglucamine)、氯普魯卡因 (chloroprocaine)、膽鹼 (choline)、二乙醇胺、伸乙二胺、普魯卡因 (procaine) 等之鹽類。

本發明之藥學組合物亦可包括藥學可接受抗氧化劑。藥學可接受抗氧化劑的實例包括 (1) 水溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸、鹽酸半胱胺酸、硫酸氫鈉、偏二亞硫酸鈉、亞硫酸鈉等；(2) 油溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸棕櫚酸酯 (ascorbyl palmitate)、丁羥甲醚 (BHA)、丁羥甲苯 (BHT)、卵磷脂 (lecithin)、五倍子酸丙酯 (propyl gallate)、 α -生育酚等；及 (3) 金屬螯合劑，諸如檸檬酸、伸乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

可用於本發明之藥學組合物的適當水性與非水性載體的實例包括水、乙醇、聚醇 (諸如，甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、及其適當混合物、植物油 (例如，橄欖油) 及可注射之有機酯 (例如，油酸乙酯)。可藉由利用塗覆材料 (例如，卵磷脂)、藉由維持必須的微粒尺寸 (分散劑的例子中) 及藉由利用界面活性劑來維持適當的流動。

這些組合物亦可包含佐劑，諸如防腐劑、潤濕劑、乳化劑與分散劑。可藉由上文之殺菌步驟與包含不同抗細菌與抗真菌劑兩者來確保避免微生物的存在，抗細菌與抗真菌劑諸如羥苯甲酸酯 (paraben)、氯丁醇、酚山梨酸 (phenol

sorbic acid)等。亦樂見將等張劑(諸如，糖、氯化鈉等)包入組合物中。此外，可藉由包括延遲吸收之劑(諸如，單硬脂酸鋁以及明膠)得到可注射藥學形式的延長吸收。

藥學可接受載體包括用於即興製備無菌可注射溶液或分散液之無菌水溶液或分散液與無菌粉末。技術中習知利用上述媒介與試劑於藥學活性物質。除了與活性化合物不相容之任何傳統媒介或試劑，可考慮將其用於本發明之藥學組合物中。亦可將輔助活性化合物併入組合物中。

治療組合物一般在製造與儲存狀態下並須無菌且穩定。可將組合物配置成適合高藥物濃度的溶液、微乳液、脂質體或其他有條理結構。載體可為溶劑或分散媒介，其包括諸如水、乙醇、聚醇(諸如，甘油、丙二醇與液態聚乙二醇等)及上述適當的混合物。可藉由利用塗覆材料(例如，卵磷脂)、藉由維持必須的微粒尺寸(分散劑的例子中)及藉由利用界面活性劑來維持適當的流動。許多實例中，較佳係將等張劑(諸如，糖、多元醇(諸如，甘露醇、山梨醇)或氯化鈉)包入組合物。此外，可藉由包括延遲吸收之劑(諸如，單硬脂酸鋁以及明膠)得到可注射組合物的延長吸收。

可藉由將所需數量之活性化合物與上述列舉成分之一或組合併入適當溶劑中，接著藉由殺菌微過濾來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將活性化合物併入無菌載體來製備分散液，無菌載體包含基本分散媒介與來自上述列舉那些的所須其他成分。用於製備無菌可注射溶液之無菌

粉末的實例中，較佳的製備方法係真空乾燥與冷凍乾燥(凍乾法)，其自活性成分加上任何額外所欲成分之先前無菌過濾溶液產生上述之粉末。

與攜帶材料結合以產生單一劑型之活性成份量將取決於治療之個體與特定的施加模式而改變。與攜帶材料結合以產生單一劑型之活性成份量一般而言係產生治療效果之組合物量。一般而言，在 100% 下，此活性成份量之範圍係約 0.01% 至約 99%，較佳係約 0.1% 至約 70%、更佳係約 1% 至約 30% 的活性成分與藥學可接受載體結合。

劑量方案係經調整以提供最佳所欲之反應(例如，治療反應)。例如，可施加單一大藥丸、可隨著時間施加許多分割之劑量、或者可隨著治療情況的急迫性所示按比例減少或增加。特別有利將非腸胃組合物配置成劑量單元型式，其容易施加且劑量均勻。本文所用之劑量單元型式代表適合即將治療之個體的單一劑量的物理分離單元；各個單元包含預定數量之活性化合物(經計算以產生所欲治療效果)以及所需之藥學載體。本發明劑量單元型式之說明書係規定於並直接取決於(a)活性化合物的獨特特性與即將達成之特定治療效果，及(b)化合治療個體感受性之上述活性化合物技術固有的限制。

關於抗體的施加，劑量範圍係約 0.0001 至 100 mg/kg(宿主體重)、更通常係 0.01 至 5 mg/kg(宿主體重)。諸如，劑量可為 0.3 mg/kg(宿主體重)、1 mg/kg(宿主體重)、3 mg/kg(宿主體重)、5 mg/kg(宿主體重)或 10

mg/kg(宿主體重)或 1-10 mg/kg 範圍內。示範性治療方案規定每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每月一次、每三個月一次或每三至六個月一次施加。本發明抗體之較佳劑量方案包括 1 mg/kg(宿主體重)或 3 mg/kg(宿主體重)透過靜脈內施加，前提是抗體係利用下列劑量排程之一：(i)每四週六次劑量，接著每三個月；(ii)每三週；(iii)一次 3 mg/kg(宿主體重)接著每三週 1 mg/kg(宿主體重)。

某些方法中，同時施加具有不同結合專一性之二或更多單株抗體，其中各個施加抗體之劑量落於所示範圍內。通常在多個時機上施加抗體。單一劑量間之間隔可為諸如每週、每月、每三個月或每年。如藉由測量患者內針對目標抗原之抗體血液水平所示般，間隔亦可係不規律的。某些方法中，劑量係經調整以達成約 1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血漿抗體濃度，且在某些方法中係約 25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

或者，可以持續釋出配方施加抗體，其中僅需較低頻率的施加。劑量與頻率取決於患者內抗體的半生期而改變。一般而言，人類抗體顯示最長的半生期，接著為人類化抗體、嵌合抗體與非人類抗體。施加的劑量與頻率可取決於治療係預防性或治療性而改變。預防性應用中，在長時間中以相當不常之間隔施加相對低劑量。某些患者持續接受治療以讓其生活安寧。治療應用中，有時需要相對短間隔之相對高劑量直到減少或終止疾病的進展，而較佳係直到患者顯示疾病症狀部分或完全改善。此後，可對患者

施加預防性方案。

本發明之藥學組合物中活性成分的實際劑量水平可經改變以得到有效達到對特定患者所欲之治療反應的活性成分量、組合物與施加模式，而不會對患者有毒。選擇之劑量水平將取決於許多藥學動力因子，包括本發明應用之特定組合物、或其之酯類、鹽類或醃胺之活性；施加路徑；施加時間；應用之特定化合物的分泌速率；治療持續時間；其他藥物；搭配所用之特定組合物的化合物與/或材料；即將治療之患者的年紀、性別、重量、狀況、一般健康與先前醫療史；及醫療領域習知的類似因子。

本發明之抗體的「治療有效劑量」較佳係造成疾病症狀嚴重性的減少、無疾病症狀時間的頻率與持續時間的增加、或避免疾病折磨導致的損傷或殘疾。例如針對腫瘤治療，相對於未治療個體，「治療有效劑量」較佳係抑制細胞生長或腫瘤生長至少約 20%、較佳係至少約 40%、更佳係至少約 60%、又更佳係至少約 80%。可在預估人類腫瘤中之效力的動物模式系統評估化合物抑制腫瘤生長的能力。或者，可藉由檢驗化合物抑制細胞生長的能力來評估組合物的特性，上述抑制可藉由熟悉技術人士所知的試驗於試管內測量。治療化合物的治療有效量可減少腫瘤尺寸、或改善個體內的症狀。熟悉技術之人士可根據下列因子而確定上述劑量：諸如個體尺寸、個體症狀的嚴重性及所選之特定組合物或施加路徑。

可利用一或更多技術中習知的不同方法透過一或更多

施加路徑來施加本發明之組合物。熟悉技術人士可理解施加路徑與/或模式取決於所欲結果而改變。本發明之抗體的較佳施加路徑包括靜脈內、肌肉內、真皮內、腹膜內、皮下、脊髓或其他非腸胃施加路徑(諸如，注射或注入)。本文所用之詞彙「非腸胃施加」意指除了腸道與局部施加外的施加模式，通常係藉由注射且包括(不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、脊髓膜內(intrathecal)、囊內(intracapsular)、眼窩內(intraorbital)、心臟內、真皮內、腹膜內、經氣管(transtracheal)、皮下、表皮下、關節內、囊下(subcapsular)、蛛網膜下(subarachnoid)、脊椎內、硬膜上(epidural)與胸骨內注射與注入。

或者，可透過非-非腸胃路徑施加本發明之抗體接合體，諸如局部、表皮或黏膜施加路徑(諸如，鼻內、口腔、陰道、直腸、舌下或局部)。

可用能保護化合物違抗快速釋出之載體製備活性化合物，諸如控制釋出之配方，包括植入物、皮膚貼片與微粒膠囊式傳送系統。可應用生物可分解、生物相容之聚合物，諸如乙烯醋酸乙烯(ethylene vinyl acetate)、聚酸酐(polyanhydride)、聚乙醇酸(polyglycolic acid)、膠原、聚原酸酯(polyorthoester)與聚乳酸。許多製備上述配方之方法係有專利或通常為熟悉技術人士所習知。參見，例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

可用技術中習知的醫療裝置施加治療組合物。例如較

佳實施例中，可用無針皮下注射裝置施加本發明之治療組合物，諸如描述於美國專利號 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 的裝置。可用於本發明之習知植入物與模組的實例包括：美國專利號 4,487,603，其揭露可植入之微注入泵，用經控制之速率分散藥物；美國專利號 4,486,194，其揭露透過皮膚施加藥物之治療裝置；美國專利號 4,447,233，其揭露以準確注入速率來傳送藥物之藥物注入泵；美國專利號 4,447,224，其揭露可變流速、可植入之注入設備，用於連續藥物輸送；美國專利號 4,439,196，其揭露具有多腔室隔間之滲透性藥物傳送系統；以及美國專利號 4,475,196，其揭露滲透性藥物傳送系統。這些專利以參考資料併入本文中。熟悉技術人士已知許多其他上述植入物、傳送系統與模組。

某些實施例中，本發明之人類單株抗體可經配置以確保活體內適當的分佈。例如，血腦障壁(BBB)排除許多高度親水性化合物。為了確保本發明之治療化合物跨越 BBB (若想要的話)，可將其配置於例如脂質體中。關於製造脂質體之方法，參見例如美國專利 4,522,811、5,374,548 與 5,399,331。脂質體可包括一或更多部分，其係選擇性傳送進入特定細胞或器官以藉此提高目標藥物傳送(參見，例如 V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。示範性目標部分包括葉酸或生物素(參見，例如給予 Low 等人的美國專利 5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa 等人(1988))

Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體 (P.G. Bloeman 等人 (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais 等人 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；介面活性蛋白 (surfactant protein)A 受體 (Briscoe 等人 (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)；p120 (Schreier 等人 (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)；亦參見 K. Keinänen；M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J. Killion；I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

某種程度上，本發明之人類-序列單株抗體係有用的，因為其專一性結合其所對抗之預定抗原。當預定抗原係人類抗原 (即，人類蛋白或其片段) 時，若本發明之人類免疫球蛋白亦可結合至非人類動物發現之同源抗原有時係有利的，非人類動物特別係通常用於藥物試驗 (諸如，生物活性的臨床前試驗、藥物動力學與安全性) 的動物。這些動物包括小鼠、兔子、大鼠、狗、豬與特別的非人類靈長類，諸如黑猩猩、猩猩與猴子 (諸如，恆河猴與食蟹猴)。在實驗動物中辨別抗原的能力特別有用於確定專一性結合在免疫球蛋白生物分佈上的效應。同源抗原係一種抗原，其 (i) 結構 (例如，胺基酸序列) 實質相似於人類抗原 (即，動物同源蛋白之胺基酸序列一般至少約 50% 相同於人類蛋白，通常至少約 70% 相同且常常至少約 80% 或更高相同)；(ii) 功能實質上相同於人類抗原；及 (iii) 通常與人類抗原發現於相同細胞區間中。人類與動物同源抗原通常 (但非總是) 具有相同名稱。同源抗原的實施例包括人類微管素 (tubulin) 與

小鼠微管素、人類 CD4 與恆河猴 CD4、及人類 IgG 與大鼠 IgG。

抗體的選擇與設計

本發明提供辨別分泌單株抗體之候選融合瘤的方法，單株抗體包含人類免疫球蛋白鏈，其實質上係由聚胜肽連接至人類恆定區序列之人類 VDJ 序列所構成。由融合瘤植株群辨別上述候選融合瘤，融合瘤植株群包括：(1)融合瘤植株，其表現免疫球蛋白鏈，其實質上係由人類 VDJ 區與人類恆定區所構成，及(2)反式轉換之融合瘤，其表現異雜合免疫球蛋白鏈，其實質上係由人類 VDJ 區與鼠科恆定區所構成。將個別或匯合融合瘤植株的懸浮液在結合條件下接觸預定抗原以選擇具有預定抗原結合專一性之抗體，一般係藉由吸附在固體基材(例如，微量測試孔)上來固定抗原。亦將專一性結合人類恆定區之抗體在結合條件下接觸融合瘤懸浮液與預定抗原，以便抗體選擇性結合至少一人類恆定區表位但實質上不結合鼠科恆定區表位；藉此形成實質上由結合至預定抗原之融合瘤懸浮液(基因轉殖單株抗體)與結合至專一性結合人類恆定區之抗體之融合瘤懸浮液(且其可用可偵測之標記或報導子標記)所構成之複合物。上述複合物形成的偵測指出表現人類免疫球蛋白鏈之融合瘤植株或群。

本發明較佳實施例中，抗-人類恆定區免疫球蛋白用於專一性篩選辨別非- μ 、非- δ 同型，較佳係 α 或 ϵ ，更佳係 γ 同型恆定區。 γ 同型的單株抗體係較佳的(i)因為 IgG 免

疫球蛋白特性在某些治療應用中較佳於 IgM 免疫球蛋白 (例如，因為 IgG 二聚體尺寸小於 IgM 五聚體) 及，(ii) 因為體細胞突變過程與 μ 恆定區類型轉換至非- μ (例如， γ) 恆定區有關。由已經進行過類型轉換之免疫球蛋白群體選擇之免疫球蛋白 (例如，IgG) 傾向以比未進行類型轉換群體選擇之免疫球蛋白 (例如，IgM) 較高的親合力結合抗原。參見例如，Lonberg 與 Huszar. *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)，其以參考資料併入本文中。

一實施例中，首先針對 γ 同型恆定區篩選候選融合瘤，接著針對專一性結合至預定抗原篩選表現 IgG 之融合瘤群。

因此根據該方法，以預定抗原免疫本發明之基因轉殖小鼠好引發免疫反應。自小鼠收集 B 細胞並與永生細胞融合以產生融合瘤。首先篩選融合瘤以辨認分泌非- μ 、非- δ 同型之 Ig (例如，IgG) 的個別融合瘤。接著針對專一性結合至關注之預定抗原來篩選此組融合瘤。利用描述於例如，Harlow 與 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988) 中之標準技術執行篩選。利用此方法有可能有用且有效地辨別出高親合力免疫球蛋白 (例如， K_a 高於約 10^7 M^{-1})。

另一態樣，本發明提供結合抗原之人類單株抗體，其包括至少一人工基因所編碼之聚胜肽。人工基因包括編碼聚胜肽之核酸片段，其係藉由化學或酵素方法試管內加以形成，方法並不需要細胞衍生之樣本核酸股 (例如，自細菌

細胞或免疫或融合瘤細胞取得之核酸樣本)與人工基因的後代(透過複製)，即完全合成的核酸。

雖然慣例在遺傳工程中利用短合成核酸作為引子、連接子等，亦可能藉由化學與/或酵素手段產生完全合成的、編碼蛋白的核酸，其長度係30、50或更多鹼基。本發明之人工基因包括合成核酸區與細胞衍生之核酸區兩者。人工基因的合成核酸區長度通常至少約50鹼基，通常至少約100鹼基，一般至少約200鹼基，更常至少約250鹼基且通常超過300鹼基或400鹼基。一般而言，合成核酸區編碼可變基因片段或其部分(例如，CDR區)，而恆定區由細胞衍生之核酸所編碼。可利用編碼聚胜肽之人工基因輕易地表現免疫球蛋白聚胜肽(即，免疫球蛋白重鏈與免疫球蛋白輕鏈)。通常人工基因係操作性連接至轉錄啟動子序列，例如衍生自免疫球蛋白基因或病毒(諸如，SV40、CMV、HIV、RSV)之啟動子序列或雜合啟動子。人工基因亦可連接至其他序列，諸如聚腺嘌呤(polyadenylation)序列與內子。表現免疫球蛋白聚胜肽之一方法包括將編碼免疫球蛋白聚胜肽之一區(例如，可變區或其部分)的合成核酸插入載體中，載體編碼免疫球蛋白鏈的剩餘片段或部分(諸如， μ 、 γ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 δ 、 ϵ 、 α_1 或 α_2 恆定區)與選擇性啟動子(例如，巨細胞病毒(CMV)啟動子)、聚腺嘌呤或其他序列。上述載體經構築以致導入細胞後，載體序列的細胞轉錄與轉譯造成免疫球蛋白聚胜肽。

可利用人工基因構築功能性人類序列免疫球蛋白重鏈

與輕鏈基因與聚胜肽，並用以產生對預定抗原具有所欲專一性(例如，專一性結合)之免疫球蛋白。藉由構築編碼免疫球蛋白聚胜肽之人工基因完成此項目標，免疫球蛋白聚胜肽實質相似於來自或衍生自基因轉殖動物(以預定抗原免疫)之細胞或融合瘤所表現的聚胜肽。因此，本發明提供編碼免疫球蛋白聚胜肽之人工基因以及利用人工基因產生人類-序列免疫球蛋白的方法。

根據此方法，以預定抗原(例如，人類蛋白)免疫基因轉殖動物，例如具有功能性破壞之內源性重鏈對偶基因的同源配對、功能性破壞之內源性輕鏈對偶基因的同源配對、至少一人類免疫球蛋白輕鏈轉殖基因複本與至少一人類免疫球蛋白重鏈轉殖基因複本的基因轉殖小鼠。接著自發生免疫球蛋白基因重組之細胞或細胞群收集或單離核酸(較佳係 mRNA)，並確定編碼免疫球蛋白之重鏈與/或輕鏈(特別係 V 片段)或其部分之核酸序列。此序列資訊作為人工基因序列的基礎。

序列確定通常需要單離至少部分的關注之基因或 cDNA，例如編碼免疫球蛋白聚胜肽之重組人類轉殖基因或對應 cDNA 的部分。通常此需要選殖編碼人類免疫球蛋白聚胜肽之 DNA 或較佳的 mRNA (即，cDNA)。利用標準技術(參見例如，Sambrook 等人(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*，卷 1-3，第 3 版，Cold Spring Harbor Press，其以參考資料併入本文中)執行選殖。例如，藉由反轉錄 polyA⁺ mRNA(較佳係與膜關聯之 mRNA)構築

cDNA 庫，並利用專一於人類免疫球蛋白聚胜肽基因序列的探針篩選庫。然而較佳實施例中，聚合酶鏈反應(PCR)係用來擴增編碼關注之免疫球蛋白基因片段(例如，輕鏈可變片段)之 cDNA (或全長 cDNA 的部分)。因為熟悉技術人士可輕易取得人類免疫球蛋白聚胜肽基因序列，因此可輕易設計專一性雜合或擴增人類免疫球蛋白基因或其片段的探針或 PCR 引子。參見例如，Taylor 等人 *Nuc. Acids. Res.*, 20:6287 (1992)，其以參考資料併入。再者，實施者通常已知基因轉殖小鼠之人類轉殖基因序列，因此可選擇雜合至轉殖基因適當區域的引子序列。可輕易將擴增之序列選殖入任何適當載體，諸如表現載體、微小基因載體或噬菌體呈現載體。可以理解所用之特定選殖方法非關鍵性的，以致有可能確定關注之免疫球蛋白聚胜肽某些部分的序列。如本文所用般，核酸經選殖、擴增、標記或任何方式與背景核酸有所區別以便可確定關注之核酸序列，係被視為單離的。

用於選殖與定序之一 RNA 來源係融合瘤，其藉由自基因轉殖小鼠取得 B 細胞並將 B 細胞融合至永生化細胞而加以產生。利用融合瘤的優點係其易於篩選，並可選擇產生關注之人類單株抗體的融合瘤。或者，可自經免疫之動物的 B 細胞(或整個脾臟)單離 RNA。當應用融合瘤以外之來源時，樂見以專一性結合特徵篩選編碼免疫球蛋白或免疫球蛋白聚胜肽之序列。上述篩選方法之一係利用噬菌體呈現技術。噬菌體呈現係描述於諸如，Phage Display: A

Practical Approach, Clackson 與 Lowman Eds., Oxford University Press, USA (2004); Dower 等人 WO 91/17271; McCafferty 等人 WO 92/01047; 即 Caton 與 Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990), 其各個以參考資料併入本文中。利用噬菌體呈現技術之一實施例中，單離來自經免疫之基因轉殖小鼠的 cDNA (例如，整個脾臟 cDNA)，利用聚合酶鏈反應來擴增編碼免疫球蛋白聚胜肽部分 (例如，CDR 區) 之 cDNA 序列，並將擴增之序列插入噬菌體載體中。藉由標準技術 (例如，篩選 (panning)) 辨別編碼關注之胜肽 (例如，具有所欲結合特徵之可變區胜肽) 的 cDNA。

接著確定擴增或選殖之核酸序列。通常確定編碼免疫球蛋白聚胜肽整個可變區之序列，然而有時僅定序可變區部分 (例如，CDR 編碼部分) 係足夠的。通常定序部分長度至少 30 個鹼基，更常根據編碼即將定序之可變區至少約三分之一或至少約二分之一的長度。

可在自 cDNA 庫單離之植株上進行定序，或當使用 PCR 時，在次選殖擴增之序列後直接 PCR 定序擴增之片段。利用標準技術 (參見例如，Sambrook 等人 (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 卷 1-3, 第 3 版, Cold Spring Harbor Press, 及 Sanger, F. 等人 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 其以參考資料併入本文中) 執行定序。藉由比較選殖之核酸序列與人類免疫球蛋白基因與 cDNA 之發表序列，熟悉技術人士取決於定序區

域能夠確定(i)融合瘤免疫球蛋白聚胜肽(包括重鏈的同型)的生殖細胞片段應用，及(ii)重鏈與輕鏈可變區序列，包括N-區附加與體細胞突變過程產生之序列。免疫球蛋白基因序列資訊之一來源係 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md。

替代實施例中，可藉由直接蛋白定序確定關注之免疫球蛋白的胺基酸序列。

可構築人工基因使其序列相同於或實質相似於至少部分的免疫球蛋白-表現基因(即，重整之轉殖基因)。相似地，人工基因編碼之聚胜肽可相同於或實質相似於重整之轉殖基因的定序部分所編碼之聚胜肽。遺傳密碼的退化性(degeneracy)可讓相同的聚胜肽由多個核酸序列所編碼。有時樂見改變核酸序列(例如，導入限制位置)改變密碼子應用以反應特定表現系統或移除醣化位置。此外，可將改變導入融合瘤序列以改變免疫球蛋白的特徵(例如，結合特徵)。例如，可將改變導入，特別係導入重鏈與輕鏈可變區之 CDR 區，以提高免疫球蛋白針對預定抗原的親合力。

習知構築合成核酸的方法。完全化學合成係有可能的，但通常係執行混合型化學-酵素合成，其中化學合成之寡核苷酸係用於連接反應與/或聚合酶鏈反應以產生較長的聚核苷酸。較佳實施例中，利用部分重疊之引子進行聚合酶鏈反應，引子係經挑選以致擴增結果係帶有人工基因所欲序列之 DNA。本發明之寡核苷酸可合成於固相或溶液

中。一般而言，固相合成係較佳的。可廣泛取得藉由亞磷酸-三酯、磷酸三酯與 H-磷酸酯(H-phosphonate)化學作用之寡核苷酸固相合成步驟的詳細描述。參見諸如，Itakura 美國專利號 4,401,796；Caruthers 等人美國專利號 4,458,066 與 4,500,707；Beaucage 等人 *Tetrahedron Lett.*, 22:1859-1862；Matteucci 等人 *J. Amer. Chem. Soc.*, 103:3185-3191 (1981)；Caruthers 等人 *Genetic Engineering*, 4:1-17 (1982)；Jones 第 2 章、Atkinson 等人第 3 章及 Sproat 等人第 4 章，Gait 編輯 *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1984)；Froehler 等人 *Tetrahedron Lett.*, 27:469-472 (1986)；Froehler 等人 *Nucleic Acids Res.*, 14:5399-5407 (1986)；Sinha 等人 *Tetrahedron Lett.*, 24:5843-5846 (1983)；及 Sinha 等人 *Nucleic Acids Res.*, 12:4539-4557 (1984)，其以參考資料併入本文中。

可將人工基因導入細胞並表現以產生免疫球蛋白聚肽。用於表現之細胞類型的挑選取決於許多因子(例如，所欲之蛋白糖化水平)，但較佳係能夠分泌人類免疫球蛋白之細胞。特別較佳之細胞包括 CHO 細胞與骨髓瘤衍生之細胞，諸如 SP20 與 NS0 細胞株。用於表現本發明重組抗體之較佳哺乳類宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)細胞(包括 dhfr⁻ CHO 細胞，描述於 Urlaub 與 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220；與 DHFR 可篩選標記一起使用，例如描述

於 R. J. Kaufman 與 P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621)、NSO 骨髓瘤細胞、COS 細胞與 SP2 細胞。明確地說，與 NSO 骨髓瘤細胞一起應用之另一較佳表現系統係 GS 基因表現系統，揭露於 WO 87/04462 (給予 Wilson)、WO 89/01036 (給予 Bebbington)與 EP 338,841 (給予 Bebbington)。當將編碼抗體基因的重組表現載體導入哺乳類宿主細胞時，可藉由培養宿主細胞一段時間來產生抗體，該段時間足以讓宿主細胞內的抗體表現，或者更佳為讓抗體分泌至生長宿主細胞的培養基中。可利用標準蛋白純化方法自培養基中取得抗體。習知導入核酸(例如，人工基因)之方法，且其包括轉染(諸如，藉由電穿孔或脂質介導)與轉型。表現導入基因之系統係一般地描述於 Sambrook 等人上篇中。

另一實施例中，如描述於 WO/2007/059782(其全文以參考資料併入)中之單體(UniBody)般產生抗體。

通常樂見表現兩個免疫球蛋白聚胜肽(即，重鏈與輕鏈)於相同細胞中，以致活體內產生免疫球蛋白(例如，IgG 分子)。因此有時樂見將兩個人工基因(即，一者編碼重鏈而一者編碼輕鏈)導入細胞(可在單一載體上導入兩個人工基因)。或者，可將編碼一免疫球蛋白聚胜肽之一人工基因導入已經藉由遺傳工程而表現另一免疫球蛋白聚胜肽的細胞。

可以理解隨著人工基因轉染之細胞增殖，人工基因的整個合成核酸部分將作為複製與轉錄之模板。然而，後代

基因將源自合成核酸(即，藉由化學或酵素方法而不需細胞衍生之樣板核酸股試管內合成之編碼聚胜肽的核酸分子)與本文所用般亦被視為人工基因。因此，人工基因之合成部分與融合瘤表現之轉殖基因的關係係有資訊連接(即，序列資訊)但無直接物理連接。

實施例

實施例 1. pGP69-7 VHC 的製備

爲了構築 pGP69-7 VHC，首先藉由聚合酶鏈反應(PCR)利用特定的人類 IgH BAC 構築體作為擴增用之樣板材料來擴增生殖細胞 V_h 區；設計專一於每一個別 V_h 區的寡核苷酸引子，並利用 InVitrogen's Accuprime Pfx 聚合酶 Supermix 執行反應。下表列出所用之特定寡核苷酸與同源 BAC 樣板。引子對係經設計以致各個 V_h 片段編碼區側面有 700-1000 bp 的 5'與 3'基因體序列兩者(分別相對於起始甲硫胺酸密碼子與終止密碼子)，以確保相關之啟動子、八聚體增強子及七聚體與九聚體重組信號存在於各個複製子中。下表中，底線核苷酸係專一於關注之 V_h-區；無底線字母對應於部分重疊 PCR 或特定限制位置的附加所用之附加核苷酸。表中首先列出正義寡核苷酸，接著為反義。

V _h 區	BAC 樣板	寡序列(5' - 3')
1-69	CTD-2011A5	<u>GTCGACTTGGTAATTATTTTGGGAGC</u> ; AACAGGTCAGGTAACCAGAAGTAAGATAAGC

4-59	CTD-2011A5	<u>TCTGGTTTACCTGACCTGTTATAGAGTTTTTG</u> ; <u>AGCACCTTCTACAGGAGTGGGTGGCTTAAAC</u>
5-51	CTD-3148C6	<u>CCACTCCTGTAGAAGGTGCTGGGGTTGACAC</u> ; <u>GATGATAAACTTTCTCCACGTTTGCCAGACC</u>
3-48	CTD-3148C6	<u>CGTGGAGAAAGTTTATCATCTTTCAATTAAGCCTC</u> ; <u>CTCGAGATTTTCCAGGCAATAGTGAGTG</u>
4-39 7	CTD-3054M1	<u>GTCGACGAGTTTTTGTCTGAAGTTCTCAC</u> ; <u>AATGTAGACCGTCTGAATGTAGAAGATCAAGG</u>
3-30 7	CTD-3054M1	<u>ACATTCAGACGGTCTACATTTTTCAAATCATTCAACC</u> <u>TCATGTTGGTGGTGATTAAGCAGCTTCAGC</u>
3-23 7	CTD-3054M1	<u>CTTAATCACCACCAACATGAGAAATGTATGACAC</u> ; <u>TTTCCATTTGGAAAATGGGGAGAGAAGG</u>
3-21	CTD-2548B8	<u>CCCCATTTTCCAAATGGAAATTTAGACAAGCACGG</u> <u>CTCGAGACGACAACAGGAGAGTCC</u>
1-18	CTD-2548B8	<u>GTCGACTCTGTGAGATCAGACAGGAACC</u> ; <u>GGTTCACGAGGGAGAGTCTATTATATGGG</u>
3-15	CTD-2548B8	<u>AGACTCTCCCTCGTGAACCCTAGTTCTCACC</u> ; <u>TTCCTCAGCCTCCAAACCTCAGCATCACTCAG</u>
3-11 4	CTD-2124N1	<u>GAGGTTTGGAGGCTGAGGAAGAGCAAGAAAGAG</u> ; <u>CTTCAAAATGTGCACAGAAGACAAGAGTGTCC</u>
3-7 4	CTD-2124N1	<u>CTTCTGTGCACATTTTGAAGCTGAGTTGCAGG</u> ; <u>CTCGAGAAGACAACAGGAGTGTCCAG</u>

利用標準分子生物方法，以頭-至-尾方式及生殖細胞

方向來連接產物複製子，並與稱為「VHC 同源匣 (VHC homology cassette)」的 4.9 kb 片段一起併入質體載體 pGP2-1。VHC 同源匣係衍生自人類 IgH BAC 殖株 CTD-2590A7 的 5' 端，並附加至 V_H 微小基因群的 3' 端。自 BAC CTD-2590A7 利用下方正義與反義引子 PCR 擴增此 4.9 kb 片段，正義與反義引子分別係：

5'GCGGCCGCCTGTTTACTCTGATGGTAGTT3'

5'GGCGCGCCGTTTCCTAGCCAAGGGAAGCGG3' (底線序列係專一於 BAC CTD-2590A7，而 5' 端的 8 個核苷酸分別編碼 NotI 與 AscI 限制位置)。VHC 同源匣序列相同於 BAC CTD-2590A7 與 BAC VDJCE 的 5' 端；因此當 pGP69-7 VHC 與這些構築體任一者共同引入時，重疊部分偏向同源重組並以頭-至-尾方式共同併入。最終的 pGP69-7 VHC 構築體尺寸係 31 kb；可藉由 SalI/NotI 雙重剪切互相釋放載體 (3 kb) 與嵌入物 (28 kb)。

實施例 2：BAC VDJCE 的構築

BAC VDJCE 係由三個基本元件所構成。第一者係衍生自 IgH α 2 下游區的合成三部式 (tripartite) 人類免疫球蛋白增強子，而第二與第三元件係分別衍生自人類 IgH BAC 殖株 CTD-2194O15 與 CTD-2590A7。BAC VDJCE 係利用標準分子生物技術加以構築，例如 red/ET 重組工程 (recombineering) 技術 (描述於 Nat. Biotechnol. Vol 21, pp 443-447, (2003)，其本文以參考資料併入)。

根據 Hu 等人 (J. Immunol, vol. 164, pp 6380-86,

(2000))執行的增強子分析來設計三部式人類增強子。三個個別增強子元件 Hs3、Hs1,2 與 Hs4 係分別利用下列三組引子對加以擴增 (均係 5' 至 3' 方向) :

ACGCGTTCCTGACCGCTGAGCCCT 與 GTCGACCTGGAAAGCCCTAG CTGA ;

CTCGAGCGTTGGCTCCCCTGCCCT 與 GATATCCTGGCCTTTTGCCAGTCCTC ;

CCCGGGACGCTCGCTGCCCCACTC 與 GGCGCGCCTGGGACCTCCATGCAGG。底線序列對應於基因專一區，而非-底線序列係附加以產生限制酶選殖位置。藉由 PCR 擴增利用人類基因體 DNA 或 BAC RP11-731E5 任一作為樣板材料產生 ~720、~1107 與 ~491 bp 三個複製子。這些均分別選殖入 pCR2.1 TOPO 載體 (Invitrogen)。利用引子 5'端序列產生之獨特限制酶位置，可產生單一合併的質體構築體，其包含串聯、生殖細胞方向的 Hs3、Hs1,2 與 Hs4(稱為 pCRHs3/1,2/4)。

VDJCE BAC 重組工程的第一步驟包含 red/ET-式重組並插入編碼吉歐黴素 (zeocin) 抗性之表現匣於 pCRHs3/1,2/4 中 Hs4 增強子的下游，以產生質體 pCRHs3/1,2/4zeo。利用與 BAC CTD-2194O15 之 3'端同源的引子序列旁之基因專一性引子執行包含增強子加上來自 pCRHs3/1,2/4zeo 吉歐黴素抗性基因之片段的 PCR 擴增。在吉歐黴素篩選下插入增強子-吉歐黴素匣造成此片段併入 BAC CTD-2194O15，在人類 IgH γ 1 終止密碼子下游約

8.5 kb 區中。因此，原本 CTD-2194O15 中在增強子-吉歐徵素匣插入位置下游的約 28 kb 人類序列被刪除。此後此構築體稱為「下游 BAC」。

亦藉由 red/ET 重組工程修飾 BAC CTD-2590A7，以併入卡那徵素(kanamycin)抗性匣於載體骨幹中。此經重組工程之 BAC 之後稱為「上游 BAC」。

以 PmeI + NruI 限制酶剪切下游 BAC，並單離與純化 85 kb 釋出之片段；此片段橫跨由 IgH δ 恆定區區塊下游~24 kb 至吉歐徵素抗性基因匣之區域。在其 5'端，其包含~4 kb 部分重疊於上游 BAC 包含之嵌入物的 3'端；在其 3'端，其包含~1.3 kb 部分重疊於 BAC 載體序列。接著執行下游 BAC 片段與上游 BAC 間之 Red/ET-式重組，並執行卡那徵素與吉歐徵素的雙重篩選以確保兩者成分存在於最終構築體中。藉由 PCR 擴增相關之接點並直接定序選擇之接點來證實此重組工程之最終構築體 VDJCE。簡單地說，BAC VDJCE 構築體包含來自人類 IgH 基因座的下列序列：(1) 此構築體的 5'範圍，開始於最近側 V_H 片段 6-1 上游~22 kb 位置；其在天生、生殖細胞結構中向下游延伸至 IgH γ 1 恆定區基因 3'約 8.6 kb 位置(由於重組交叉接合的不確定性，上游與下游 BAC 間之接點位於 IgH δ 恆定區下游約~24-28 kb 處的~4 kb 區中)。此生殖細胞衍生片段接著為合成人類衍生之三部式 IgH 增強子。已經將吉歐徵素與卡那徵素篩選標記兩者附加至原本的 BAC 載體骨幹 (pBeloBAC11)，雖然其非轉殖基因功能所必需的。可藉由

以 NotI 限制酶剪切釋出整個人類-型轉殖基因，釋出~231 kb 嵌入物。

實施例 3：BAC V12DJCE 的構築

此 BAC 係 BAC VDJCE 的衍生，其可利用標準分子選殖方法加以產生，例如 red/ET 重組工程(描述於 Nat. Biotechnol. Vol 21, pp 443-447, (2003)，其全文以參考資料併入)。本實例中，將存在於 pGP69-7 VHC 中之 12 個 V_h 可變區基因片段重組進入 BAC VDJCE，同時刪除 D 片段上游~25 kb 的 DNA。

構築 BAC V12DJCE 中第一步驟利用 red/ET 重組工程將氯黴素(chloramphenicol)抗性匣插入 pGP69-7 VHC 中最近端 V_h 元件 3-7 下游，以替換存在於載體骨幹中之 VHC 同源匣與鄰接之安比西林(ampicillin)抗性標記。過程中，將與 VDJCE 序列同源之 50 bp 序列插入 V_h 3-7 與氯黴素抗性基因之間。此造成對氯黴素有抗性但對安比西林敏感之質體。

構築 BAC V12DJCE 中的第二步驟包括插入安比西林抗性匣於最末端 V_h 元件 1-69 上游。安比西林抗性匣任一側旁有 flp 重組酶-專一 FRP 重組信號，與附加之同源額外旁側臂(亦同源於 BAC VDJCE)。由此構築體純化質體嵌入物。嵌入物序列包含 FRP-旁側之安比西林抗性匣與所有 12 個 V_h 區，任一側旁有同源於 VDJCE BAC 之~50 bp 序列，並藉由 PmeI + AscI 限制剪切而單離以重組入 VDJCE BAC。

此過程中第三步驟包括將描述於上之~25 kb PmeI + AscI 質體嵌入物重組入 BAC VDJCE。Red/ET 介導之重組造成成功的併入，而在安比西林(來自質體嵌入物)與卡那黴素(來自 BAC VDJCE)下生長來篩選得到之重組產物。

構築 V12DJCE 中第四與最終步驟包括移除末端 V_h 元件 1-69 上游的安比西林匣。利用 flp 重組酶，可專一性地割去 FRP-旁側之安比西林匣。藉由其在卡那黴素存在下(但不在安比西林存在下)生長的能力來確保適當轉型株的篩選。因此，最終 BAC V12DJCE 構築體與 BAC VDJCE 不同於 D 區上游 12 個 V_h 元件的插入，同時造成 BAC VDJCE ~25 kb 片段的刪除。得到之構築體產生具有 12- V_h 元件以其天生生殖細胞順序插入 VDJCE 的 BAC； V_h 元件 1-69' 旁有~9 kb 上游人類基因體 DNA(對應於 VDJCE 的原本 5' 端)，而 V_h 3-7 下游旁有~8 kb 的人類基因體 DNA(最接近 D 區)。

實施例 4：基因轉殖小鼠 HCo20 品系的構築

HCo20 基因轉殖小鼠品系係共同引入下列之結果：微小基因座重鏈轉殖基因 pHc2、含有生殖細胞可變區(V_h)之 YAC yIgH10 以及微小基因座構築體 pVx6。

單獨 pHc2 構築體完全能夠活體內重整以形成功能性人類重鏈免疫球蛋白基因座；附加 pVx6 與 yIgH10 以造成額外的生殖細胞 V_h 多樣性。用於產生 HCo20 之 DNA 混合物的各個成分係描述於下。

描述於上之 pHc2 嵌入物包含四個功能性人類生殖細

胞 V_H 基因片段：1-69 (DP-10)、5-51 (DP-73)、4-34 (DP-63) 及 3-30.3 (DP-46)。此外，此構築體亦包含人類基因體序列，其包含 15 個功能性 D 片段、所有 6 個 J 片段以及 p4 與 y1 恆定區片段以及功能性 p-Y1 轉換區。

pVx6 嵌入物包含 3 個人類生殖細胞 V_H 片段： V_{H1-18} (DP-14)、 V_{H5-51} (DP-73) 與 V_{H3-23} (DP-47)。爲了產生 pVx6 構築體，首先將 8.5 kb HindIII/SalI DNA 片段(包含生殖細胞人類 V_{H1-18} (DP-14) 基因與約 2.5 kb 的 5' 旁側及 5 kb 的 3' 旁側基因體序列)次選殖入質體載體 pSP72 (Promega) 以產生質體 p343.7. 16。接著，將 7 kb BamHI/HindIII DNA 片段(包含生殖細胞人類 V_{H5-51} (DP-73) 基因與約 5 kb 的 5' 旁側及 1 kb of 3' 的 3' 旁側基因體序列)選殖入 pBR322 式質體選殖載體 pGPIf (Taylor 等人(1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295) 以產生質體 p251f。接著以 EcoRV/BamHI 剪切衍生自 pGPIf、pGPIk 之新選殖載體並連接至 10 kb EcoRV/BamHI DNA 片段，其包含生殖細胞人類 V_{H3-23} (DP47) 基因與約 4 kb 的 5' 旁側及 5 kb 的 3' 旁側基因體序列。以 BamHI/SalI 剪切得到之質體 pl 12. 2RR. 7 並與 p25 If 之 7 kb 純化 BamHI/SalI 嵌入物連接。以 XhoI 剪切得到之質體 pVx4 並與 p343.7. 16 之 8.5 kb XhoI/SalI 嵌入物連接。之後，得到具有與其他兩個 V 基因相同方向之 V_{H1-18} 基因的植株。接著以 NotI 剪切標示爲 pVx6 的此植株以製備嵌入物。

起初藉由 PCR 篩選利用 V_h3 與 V_h4 家族專一性引子而

辨別 YAC yIgH10，並藉由 V_h 內容定位至人類染色體 14。已確定 yIgH10 包含之 V_h 片段包括 V_h 家族的成員 V_{h1} 、 V_{h2} 、 V_{h3} 與 V_{h4} ，明確地說至少 V_{h1-18} 、 V_{h1-24} 、 V_{h2-26} 、 V_{h3-15} 、 V_{h3-20} 、 V_{h3-21} 、 V_{h3-23} 、 V_{h3-30} 、 $V_{h3-30.5}$ 、 $V_{h3-30.3}$ 、 V_{h3-33} 、 V_{h4-28} 、 V_{h4-30} 、 $V_{h4-30.4}$ 、 $V_{h4-30.3}$ 、 V_{h4-31} 與 V_{h4-34} 。

將來自 pVx6 (26 kb)、pHC2 (80 kb) 與 yIgH10 (~375 kb) 之純化嵌入物以 1: 1: 1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核 (pronuclei)。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 pVx6、pHC2 與 yIgH10 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 (HCo20)。

接著將 (HCo20) 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變 (描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變 (Chen 等人 (1993) *EMBO J.* 12: 811-820) 與 (KCo5) 9272 轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 5：基因轉殖小鼠 HCo27 品系的構築

HCo27 基因轉殖小鼠品系係共同引入下列的結果：微

小基因座重鏈轉殖基因 pHC2、包含生殖細胞可變區 (V_h) 之 YAC yIgH24a 與 yIgH10。

如上所示，單獨 pHC2 構築體完全能夠活體內重整以形成功能性人類重鏈免疫球蛋白基因座；附加 yIgH24 與 yIgH10 以造成額外的生殖細胞 V_H 多樣性。用於產生 HCo27 之 DNA 混合物的各個成分係描述於下。

pHC2 與 YAC IgH10 構築體係詳細描述於實施例 4 中。

起初藉由 PCR 篩選利用 V_h3 與 V_h4 家族專一性引子來辨別酵母菌人工染色體 (YAC) yIgH24a，並藉由 V_h 內容定位至人類染色體 14。已確定 yIgH24 包含之 V_H 片段包括 V_H 家族的成員 V_H1 、 V_H2 、 V_H3 、 V_h4 與 V_H5 ，明確地說至少 V_H1 -24、 V_H1 -45、 V_H1 -46、 V_H2 -26、 V_H3 -30、 V_H3 -30.5、 V_H3 -30.3、 V_H3 -33、 V_H3 -43、 V_H3 -48、 V_H3 -49、 V_H3 -53、 V_H4 -28、 V_H4 -30、 V_H4 -30.4、 V_H4 -30.3、 V_H4 -31、 V_H4 -34、4-39 與 V_H5 -51。

將來自 pHC2 (80 kb)、yIgH10 (~375 kb) 與 yIgH24a (~460 kb) 之純化嵌入物以 1: 1: 1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 pHC2、yIgH10 與 yIgH24a 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo27。

接著將 HCo27 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突

變(描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變(Chen 等人(1993) EMBO J. 12: 811-820)與(KCo5) 9272 轉殖基因(Fishwild 等人(1996) Nature Biotechnology 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 6：基因轉殖小鼠 HCo28 品系的構築

HCo28 基因轉殖小鼠品系係共同注入三個部分重疊之人類 Ig 重鏈 BAC 植株嵌入物的結果，BAC 植株嵌入物未改變其原本生殖細胞內容：CTD-2304I22、CTD-2572O2 與 CTD-2194O15。這些一起橫跨人類 IgH 基因座區，由 5'端的 V_h 片段 3-7 至 3'端的 IgHa1。

將來自 CTD-2304I22、CTD-2572O2 與 CTD-2194O15 之純化嵌入物以 1: 1: 1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般(B. Hogan 等人 Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.)微注入半天大(BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 CTD-2304I22、CTD-2572O2 與 CTD-2194O15 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo28。

接著將 HCo28 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變(描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變(Chen 等人(1993) EMBO J. 12: 811-820)與(KCo5) 9272

轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 7：基因轉殖小鼠 HCo30 品系的構築

HCo30 基因轉殖小鼠品系係 VDJCE BAC 嵌入物與含有生殖細胞可變區 (V_h) 之 YAC yIgH24a 共同注入的結果。

VDJCE BAC 的構築與組成係詳細描述於上方實施例 2 中。酵母菌人工染色體 yIgH24a 係詳細描述於上方實施例 5 中。

將來自 VDJCE (~231 kb) 與 yIgH24a (~460 kb) 之純化嵌入物以 1:1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 VDJCE 與 yIgH24 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo30。

接著將 HCo30 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變 (描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變 (Chen 等人 (1993) *EMBO J.* 12: 811-820) 與 (KCo5) 9272 轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景

景中。

實施例 8：基因轉殖小鼠 HCo31 品系的構築

HCo31 基因轉殖小鼠品系係 VDJCE BAC 嵌入物與 CTD-3054M17 BAC 嵌入物共同注入之結果。

VDJCE BAC 的構築與組成係詳細描述於上方實施例 2 中。BAC CTD-3054M17 係 -190 kb BAC 殖株，其包含生殖細胞結構中人類重鏈 Ig V_h 片段(由 5'端的 V_h4-39 至 3'端的 V_h3-23)。

將來自 VDJCE (~231 kb)與 CTD-3054M17 (~190 kb)之純化嵌入物以 1:1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般(B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.)微注入半天大(BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 VDJCE 與 CTD-3054M17 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo31。

接著將 HCo31 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變(描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變(Chen 等人(1993) *EMBO J.* 12: 811-820)與(KCo5) 9272 轉殖基因(Fishwild 等人(1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 9：基因轉殖小鼠 HCo32 品系的構築

HCo32 基因轉殖小鼠品系係 VDJCE BAC 嵌入物與 pGP69-7 VHC 嵌入物共同注入之結果。

VDJCE BAC 的構築與組成係詳細描述於上方實施例 2 中。pGP69-7 VHC 的構築與組成係詳細描述於上方實施例 1 中。

將來自 VDJCE BAC (~231 kb) 與 pGP69-7 VHC (-28 kb) 之純化嵌入物以 1:1 莫耳比率結合，並如同 Hogan 等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 VDJCE 與 pGP69-7 VHC 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo32。

接著將 HCo32 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變 (描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變 (Chen 等人 (1993) *EMBO J.* 12: 811-820) 與 (KCo5) 9272 轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 10：基因轉殖小鼠 HCo33 品系的構築

HCo33 基因轉殖小鼠品系係注入 V12DJCE BAC 嵌入物的結果。

V12DJCE BAC 的構築係詳細描述於上方實施例 3

中，V12DJCE BAC 包含 12 個衍生自 pGP69-7 VHC 之 V_h 片段在 D 區上游約 ~8 kb 併入 VDJCE BAC。

將來自 V12DJCE 之純化嵌入物如同 Hogan 等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 V12DJCE 之序列的基因轉殖小鼠創作者品系。將此品系標示為 HCo33。

接著將 HCo33 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變 (描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變 (Chen 等人 (1993) *EMBO J.* 12: 811-820) 與 (KCo5) 9272 轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 11：基因轉殖小鼠 HCo34 品系的構築

HCo34 基因轉殖小鼠品系係注入 pIgYBAC 嵌入物的結果。

pIgYBAC 構築體係 ~500 kb 細菌-酵母菌穿梭載體，其包含來自 yIgH10 的所有相關 V_h 片段加上整個 VDJCE BAC。YAC yIgH10 係詳細描述於上方實施例 5 中。VDJCE BAC 係詳細描述於上方實施例 2 中。

將來自 pIgYBAC (~500 kb) 之純化嵌入物如同 Hogan

等人所述般 (B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.) 微注入半天大 (BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 pIgYBAC 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo34。

接著將 HCo34 品系以包含下列之小鼠培育：CMD 突變 (描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變 (Chen 等人 (1993) *EMBO J.* 12: 811-820) 與 (KCo5) 9272 轉殖基因 (Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

實施例 12：Balb/c 品系介紹

最初 HuMab 小鼠係由混合品系背景所構成；已知 C57Bl/6J、CBA/J、DBA/2J 與 129/Sv 品系的遺傳貢獻發生在產生完全功能性 HuMab 小鼠的過程中。這些親本品系的主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 單體型 (haplotype) 分別係 b、k、d 與 b。然而，HuMab 群體的例行調查顯示非篩選性培育多個世代後 b 與 k 單體型的優勢。已知 Balb/c 品系 (MHC 單體型 d) 在抗體反應上相對於上述品系 (參見例如 *Agents and Actions*, v.4 no.4, pp277-285 (1974)) 而言係「高反應者 (high responder)」。除了較佳的抗體反應外，Balb/c 品系的存在亦確保 d MHC 單

體型存在。已知 MHC 所呈現之抗原有時係取決於 MHC 單體型，因此具有較高 MHC 多樣性的品系較有能力呈現不同抗原並產生抗原專一性抗體反應。將 Balb/c 背景的有利態樣給予現存之 HuMab 品系的努力中，執行基因互換策略。將 KCo5 品系(描述於 Fishwild 等人(1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851)重複地回交(backcross)野生型 Balb/c 小鼠；5 個回交世代之後，將以存在有 KCo5 輕鏈轉殖基因、重鏈基因破壞(描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 之實施例 1 中，其全文以參考資料併入)及 κ 輕鏈基因破壞(描述於 Chen 等人(1993) *EMBO J.* 12:811-820)篩選之小鼠互交(intercross)。接著使此互交的後代彼此交配以產生同源重鏈與 κ 輕鏈基因破壞之小鼠。某些得到之小鼠帶有 KCo5 轉殖基因，其他則沒有；接著產生並增長兩個不同品系(一者包含 KCo5，另一者沒有)，通稱為 KCo5 [M/K] (Balb)。爲了產生具有 Balb/c 品系有益效果的 HuMab 小鼠，將 KCo5 [M/K] (Balb)小鼠與混合品系背景之 HuMab 小鼠交配。得到之小鼠同源重鏈與 κ 輕鏈基因兩者破壞，包含人類重鏈與輕鏈轉殖基因的至少一染色體複本，且遺傳上大約~50% Balb/c。此雜交培育方案允許下列：1)混合品系背景的多個不同 HuMab 品系(HCo7、HCo12、HCo17 等)可與相同 KCo5 [M/K] (Balb)品系交配；2)除了 HuMab 混合品系提供的 b 或 k 單體型任一者外，來自 Balb/c 之 d MHC 單體型係存在於所有雜交後代，好得到最大的單體型多樣性；3)直到最終遺傳互換才自 KCo5 [M/K] (Balb)群體

分開混合品系 HuMab 群體，以確保雜交後代世代-至-世代更一致，而非無目地的連續互交(會受到基因飄移)。

正好類似上述一者的方法中，亦將 Balb/c 遺傳背景培育至 KCo5 小鼠中，KCo5 帶有相同的 κ 輕鏈基因破壞，但具有不同的重鏈基因破壞(如此稱為 J 或 JHD 破壞；參見美國專利號 5,545,806 之描述，其全文以參考資料併入)。再者，產生同源重鏈與輕鏈基因兩者破壞的 Balb/c 小鼠，某些帶有 KCo5 轉殖基因某些則沒有，並通稱為 KCo5 [J/K] (Balb)。亦可將此品系與混合品系背景的所有類型 HuMab 小鼠交配以產生上述雜合體。

如第 4 圖所示，HCo12 與 KCo5[J/K](Balb)交配得到之雜合小鼠於天生或免疫前狀態具有實質較高的總體免疫球蛋白，並亦顯示相對於親本 HCo12 品系，其針對破傷風類毒素(tetanus toxoid,TT)抗原有較高的抗原-專一性免疫球蛋白效價(titer)。應用此策略可造成用於產生 HCo7、HCo12、HCo17 與 HCo20 品系的 Balb/c 雜合體；該策略係可進一步修改以雜合交配至所有目前與未來的 HuMab 小鼠品系，諸如本文所述之 HCo27、HCo28、HCo30、HCo31、HCo32 與 HCo33。

實施例 13：HCo7/ λ 品系介紹

HCo7/ λ 基因轉殖小鼠品系的產生包括同源破壞內源性小鼠 κ 輕鏈基因，描述於 Chen 等人(1993) EMBO J. 12:811-820 (其全文以參考資料併入)；同源破壞內源性小鼠重鏈基因，描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 (其全文以

參考資料併入)的實施例 1 中。HC07/ λ 基因轉殖小鼠品系亦帶有人類 κ 輕鏈轉殖基因 KCo5, 描述於 Fishwild 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851 (其全文以參考資料併入); 以及人類重鏈轉殖基因 HCo7, 描述於美國專利號 5,545,806、5,625,825 與 5,545,807 (其全文以參考資料併入)。此基因轉殖小鼠品系亦帶有人類 λ 輕鏈轉殖基因, 由包含大部分人類 Ig λ 基因座之酵母菌人工染色體所構成, 描述於 PCT 公開案 WO 2000/26373 (其全文以參考資料併入)。然而, 此基因轉殖小鼠品系不帶有破壞之內源性 λ 輕鏈基因座。透過選擇性培育, 可取得帶有重鏈與輕鏈兩者同源基因破壞的後代, 其包含人類重鏈轉殖基因, 而在輕鏈轉殖基因方面, 包含 κ 與 λ 輕鏈轉殖基因兩者, 僅有 κ 輕鏈轉殖基因或僅有 λ 輕鏈轉殖基因任一。詳細描述於上, 所有三個基因型可用來免疫與取得人類抗體。

實施例 14: BAC V12DJCE-*neo* 的構築

此 BAC 係 BAC V12DJCE 的衍生, 其可利用標準分子選殖方法加以產生, 例如 red/ET 重組工程(描述於 *Nat. Biotechnol.* Vol 21, pp 443-447, (2003), 其全文以參考資料併入)。本實例中, 將來自新黴素抗性基因匣之可篩選抗性標記(之後稱為 *neo*)(操作性連接至雙重原核與真核啟動子/增強子元件)插入 BAC V12DJCE 中存在的 12 個 V_h 可變區基因片段~10 kb 上游。

構築 BAC V12DJCE-*neo* 的第一步驟利用 red/ET 重組工程插入安比西林抗性匣以取代 V12DJCE 中現存之卡那

徽素抗性基因。

構築 BAC V12DJCE-*neo* 的第二步驟包括以來自第一步驟的安比西林抗性匣交換稱為 PGK-*gb2-neo* 的雜合匣。此抗性匣利用雜合原核/真核啟動子，其可讓 *neo* 匣表現於原核(即，細菌)與真核細胞兩者。*Neo* 匣給予針對卡那徽素(用於原核篩選)與新徽素(通常可與 G418 交換用於真核篩選)兩者的抗性。

所有其他態樣中，V12DJCE-*neo* 構築體相同於親本分子 V12DJCE；明確地說，免疫球蛋白基因內容完全保存於兩個構築體之間。

實施例 15：基因轉殖小鼠 HCo37 品系的構築

HCo37 基因轉殖小鼠品系係投入或轉染 V12DJCE-*neo* BAC 嵌入物的結果。

V12DJCE-*neo* BAC 的構築包含將 PGK-*gb2-neo* 抗性匣插入 V12DJCE BAC 最近端 *Vh* 片段 1-69 約 ~10 kb 上游，詳細描述於上方實施例 14 中。

將來自 V12DJCE 之純化嵌入物如同 Hogan 等人所述般(B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.)微注入半天大(BDF1 x KCo5-CMD-JKD) F1 胚胎的原核。由經注入之胚胎發育的小鼠建立包含來自 V12DJCE-*neo* 之序列的基因轉殖小鼠創立者品系。將此品系標示為 HCo37。

替代應用中，V12DJCE-*neo* 構築體係如同 Hogan 等人

所述般(B. Hogan 等人 *Manipulating the Mouse Embryo*, A Laboratory Manual, 第 2 版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.)用來轉染小鼠胚胎幹(ES)細胞。可利用篩選劑 G418 辨別並無性增殖經歷穩定與永久插入此 DNA 構築體之 ES 細胞。帶有 V12DJCE-*neo* 構築體之各個 ES 細胞植株接著可用來產生嵌合小鼠, 其藉由將經修飾之 ES 細胞注入桑葚胚(morula)-或囊胚(blastocyst)-階段的小鼠胚胎, 並使其發育成熟。上述嵌合小鼠可接著培育至其他小鼠以確保轉染之 V12DJCE-*neo* 構築體傳送至後代。將此品系標為 HCo37。

接著將 HCo37 品系以包含下列之小鼠培育: CMD 突變(描述於 PCT 公開案 WO 01/09187 的實施例 1)、JKD 突變(Chen 等人(1993) EMBO J. 12: 811-820)與(KCo5) 9272 轉殖基因(Fishwild 等人(1996) Nature Biotechnology 14: 845-851)。得到之小鼠表現人類免疫球蛋白重鏈與 κ 輕鏈轉殖基因於內源性小鼠重鏈與 κ 輕鏈基因座同源破壞的背景中。

【圖式簡單說明】

第 1 圖 微小基因座轉殖基因的示意圖。天生基因體人類 Ig 重鏈基因座描述成~1.4Mb 區; 其被分成 4 個功能性子區。顯示有可變(Vh)區、多樣(D)、連接(J)與恆定區+增強子。第 1A 圖中, HC2 微小基因係衍生自所有四個功能性子區的非連續、連接片段。如所示般, 其包含 4 個 Vh、

15 個 D、6 個 J、2 個恆定區以及大鼠 3'端免疫球蛋白增強子。第 1B 圖中，12 個選擇之 Vh 片段係衍生自基因體 DNA 樣板的 PCR 擴增，以生殖細胞順序頭-至-尾組裝並附加有免疫球蛋白基因座衍生之片段，該片段係用來促進轉殖基因間之重組。

第 2 圖 人類 Ig 重鏈基因體植株的圖示。如第 1 圖所示，人類重鏈 Ig 基因座係描述於上方並標示功能性區。YAC 植株 IgH24a 與 IgH10 係按比例顯示，反應其在 Vh 區中的相對位置與範圍。人類 IgH BAC 植株係以其相對位置與範圍顯示於下方；這些橫跨整個 Vh 區、D 與 J 區，直到包括恆定區 Igα1。

第 3 圖 雜合轉殖基因的示意圖。第 3A 圖描述包括 BAC VDJCE 之 BAC 植株與 Ig 區。由 BAC 植株 CTD-2590A7 與 CTD-2194O15 構築，具有下游 Ig 增強子 LCR2 之三部式增強子，該構築體包含功能性微小基因所需的所有元件。第 3B 圖描述 BAC 植株如何覆蓋 Vh 區，BAC 植株可經合併與修飾以產生覆蓋整個 Vh 庫的最小套 BAC 植株；附加 3' VHC 同源匣至各個 BAC 植株係用來促進轉殖基因間之重組。第 3C 圖描述 BAC VDJCE 如何經修飾以併入來自質體 pGP69-7 VHC 的 12 個 Vh 區以產生 BAC V12DJCE。第 3D 圖描述 BAC VDJCE 與 YAC IgH10 如何重組以形成轉殖基因 pIgYBAC；這係在一修飾之穿梭載體(可增殖於酵母菌與細菌兩者終)中完成。

第 4 圖 HCo12 與 HCo12 x Balb/c 雜合小鼠的比較。

比較混合品系背景之 HCo12 小鼠與 HCo12 x Balb/c 雜合小鼠的基值人類免疫球蛋白 γ (hu IgG) 以及破傷風類毒素 (TT) 專一性 hu IgG。在第 0 天抽血同一群 (各個群體 $n=12$) 接著以 TT 免疫兩次並在免疫後第 28 天抽血。確定兩者小鼠群體的血清效價；相對於親本 HCo12 混合背景小鼠，balb/c 背景上的 HCo12 小鼠顯示明顯提高的基值整體 hu IgG 與 TT-專一性 hu IgG 兩者。顯示各個群體的平均血清免疫球蛋白水平 ($\mu\text{g/ml}$)。

第 5 圖 雜合轉殖基因：BAC V12DJCE-neo 的示意圖。
第 5 圖描述插入來自新黴素抗性基因匣之可篩選抗性標記 (之後稱為「neo」)，其操作性連接至雙重原核與真核啟動子/增強子元件，在 BAC V12DJCE 中存在之 12 個 Vh 可變區基因片段上游約 10 kb。

【主要元件符號說明】

補充序列表

<110>	梅德雷克斯有限責任公司	
<120>	HCO32與HCO27以及相關之範例	
<130>	077375.0876	
<140>	TBA	
<141>	Herewith	
<150>	PCT/US08/072640	
<151>	2008-08-08	
<150>	US 60/955194	
<151>	2007-08-10	
<160>	39	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	1	
	ctaactgggg a	11
<210>	2	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(5)..(5)	
<223>	n是a、t或g	
<400>	2	
	ctaantgggg a	11
<210>	3	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	3	
	ctaactggga	10

102年9月5日修(更)正替換頁

(2-8頁)

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚胜肽

<400> 4

Lys Glu Arg Val
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚胜肽

<400> 5

Asn Asp Ser Val
1

<210> 6
<211> 12
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 6
aaagaaagag uu 12

<210> 7
<211> 12
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 7
aacgacagcg uu 12

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 8
gtcgacttgg taattatttt gggagc 26

<210>	9		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	9		32
	aacagggtcag gtaaaccaga agtaagataa gc		
<210>	10		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	10		32
	tctggtttac ctgacctgtt atagagtttt tg		
<210>	11		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	11		31
	agcaccttct acaggagtgg gtggcttaaa c		
<210>	12		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	12		31
	ccactcctgt agaaggtgct ggggttgaca c		
<210>	13		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	13		31
	gatgataaac tttctccacg tttgccagac c		
<210>	14		
<211>	35		

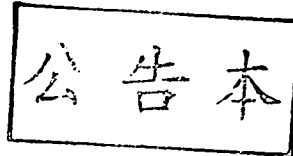
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	14		35
cgtggagaaa gtttatcatc tttcaattaa gcctc			
<210>	15		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	15		28
ctcgagattt tccaggcaat agtgagtg			
<210>	16		
<211>	29		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	16		29
gtcgacgagt ttttgtctga agttctcac			
<210>	17		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	17		32
aatgtagacc gtctgaatgt agaagatcaa gg			
<210>	18		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成寡核苷酸		
<400>	18		36
acattcagac ggtctacatt tttcaaatca ttcacc			
<210>	19		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		

	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	19	
		tcatgttggt ggtgattaag cagcttcagc	30
	<210>	20	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	20	
		cttaatcacc accaacaatga gaaatgtatg acac	34
●	<210>	21	
●	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	21	
		tttccatttg gaaaatgggg agagaagg	28
	<210>	22	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	22	
		ccccattttc caaatggaaa ttagacaag cacgg	35
●	<210>	23	
●	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	23	
		ctcgagacga caacaggaga gtcc	24
	<210>	24	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	

<400>	24	28
gtcgactctg tgagatcaga caggaacc		
<210>	25	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	25	30
ggttcacgag ggagagtcta ttcatatggg		
<210>	26	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	26	31
agactctccc tcgtgaaccc tagttctcac c		
<210>	27	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	27	32
ttcctcagcc tccaaacctc agcatcactc ag		
<210>	28	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	28	33
gaggtttgga ggctgaggaa gagcaagaaa gag		
<210>	29	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	29	32
cttcaaaatg tgcacagaag acaagagtgt cc		

<210>	30	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	30	
cttctgtgca cattttgaag ctgagttgca gg		32
<210>	31	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	31	
ctcgagaaga caacaggagt gtccag		26
<210>	32	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	32	
gcggccgcct gtttactctg atggtagtt		29
<210>	33	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	33	
ggcgcgccgt tcctagccaa gggaagcgg		29
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	34	
acgcgttcct gaccgctgag ccct		24
<210>	35	
<211>	24	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	35	24
gtcgacctgg aaagccctag ctga		
<210>	36	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	36	24
ctcgagcggtt ggctcccctg ccct		
<210>	37	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	37	26
gatatacctgg ccttttgcca gtcctc		
<210>	38	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	38	24
cccgggacgc tcgctgcccc actc		
<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	39	25
ggcgcgcctg ggacctccat gcagg		



十、申請專利範圍：

1. 一種細菌人工染色體，用於製造能夠產生人類免疫球蛋白之基因轉殖非人類哺乳類，該細菌人工染色體包括操作性連接之 1 至 20 個人類免疫球蛋白 V_H 基因片段、1 至 25 個人類免疫球蛋白 D 鏈基因片段、1 至 6 個人類免疫球蛋白 J_H 基因片段、一 S_μ 增強子序列、一或更多人類免疫球蛋白重鏈恆定區與一 3' 增強子序列。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之細菌人工染色體，其中該可變重鏈基因序列包括 V_H6-1 。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之細菌人工染色體，其中該人類 D 基因片段的數目係 25。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之細菌人工染色體，其中該 J_H 片段的數目係 6。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之細菌人工染色體，其中該重鏈恆定區包括 μ 、 δ 與 γ 。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之細菌人工染色體，其中該 γ 區包括 $\gamma 3$ 與 $\gamma 1$ 。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之細菌人工染色體，其係

VDJCE。

8. 如申請專利範圍第1項所述之細菌人工染色體，其中該 V_H 基因片段的數目係20、該D片段的數目係25而該 J_H 片段的數目係6。

9. 如申請專利範圍第1項所述之細菌人工染色體，其中該人類免疫球蛋白 V_H 基因片段係處於生殖細胞(germline)結構中。

10. 如申請專利範圍第1項所述之細菌人工染色體，其中該 V_H 基因片段的數目係12。

11. 如申請專利範圍第10項所述之細菌人工染色體，其係 $V12DJCE$ 。

12. 一種用於製造能夠產生人類免疫球蛋白之基因轉殖小鼠的核酸，該核酸包括1至12個人類免疫球蛋白 V_H 基因片段以及一同源匣(homology cassette)，該同源匣同源於申請專利範圍第1項所述之細菌人工染色體的一序列，其中該同源匣促進該核酸與該細菌人工染色體間之同源重組。

13. 如申請專利範圍第12項所述之核酸，其中該同源匣更包括一獨特限制酶位置於5'端。

14. 如申請專利範圍第12項所述之核酸，其中該核酸係一質體載體。

15. 如申請專利範圍第12項所述之核酸，其中該人類免疫球蛋白V_H基因片段的數目係12，且其中該12個V_H基因片段各自包括一完全的V_H編碼序列、一V_H啟動子序列、一增強子序列與一重組序列。

16. 如申請專利範圍第12項所述之核酸，其中該人類V_H基因片段係根據該即將產生之人類免疫球蛋白的所欲特徵加以挑選。

17. 如申請專利範圍第16項所述之核酸，其中該人類免疫球蛋白的所欲特徵包括V_H應用頻率、V_H穩定性或結合專一性。

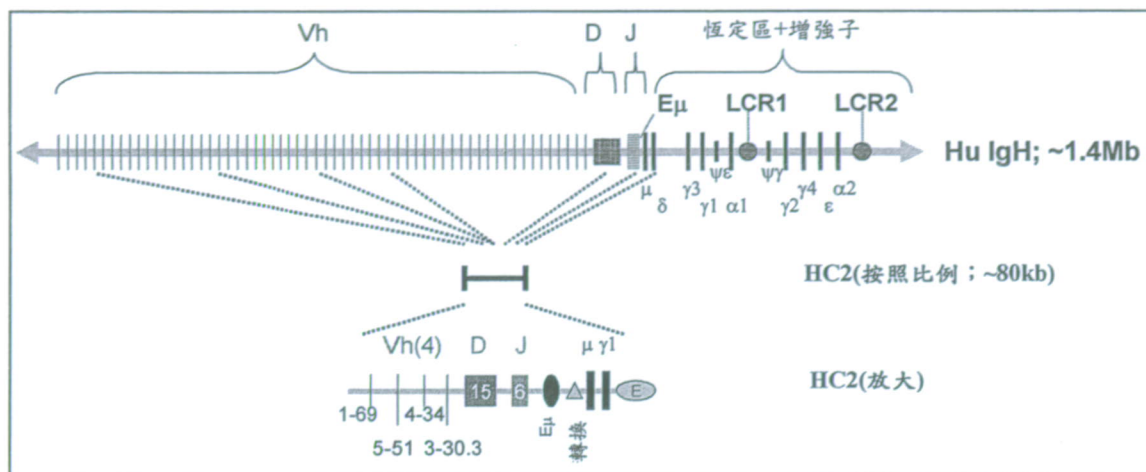
18. 如申請專利範圍第17項所述之核酸，其中該12個人類V_H基因片段係V_H 1-69、V_H 4-59、V_H 5-51、V_H 3-48、V_H 4-39、V_H 3-30、V_H 3-23、V_H 3-21、V_H 1-18、V_H 3-15、V_H 3-11與V_H 3-7。

19. 如申請專利範圍第18項所述之核酸，其係pGP69-7 VHC。

20. 如申請專利範圍第12項所述之核酸，其中該核酸係一細菌人工染色體。

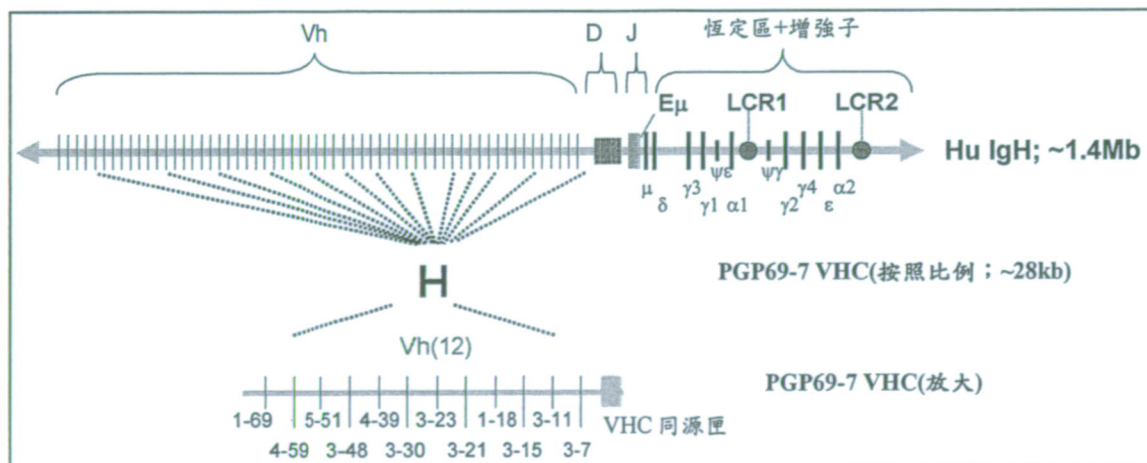
第 1A 圖

微小基因座轉殖基因：pHC2



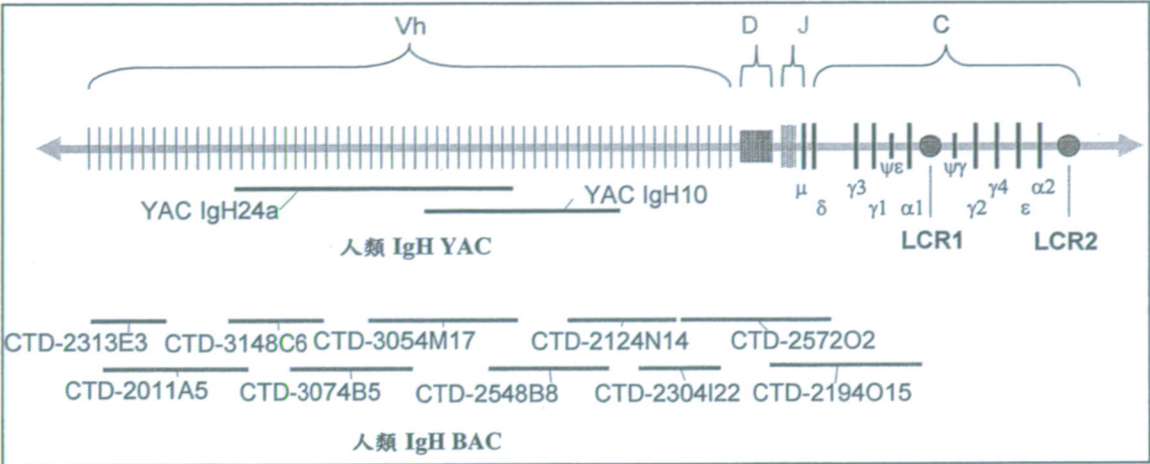
第 1B 圖

V_h 轉殖基因：pGP69-7 VHC



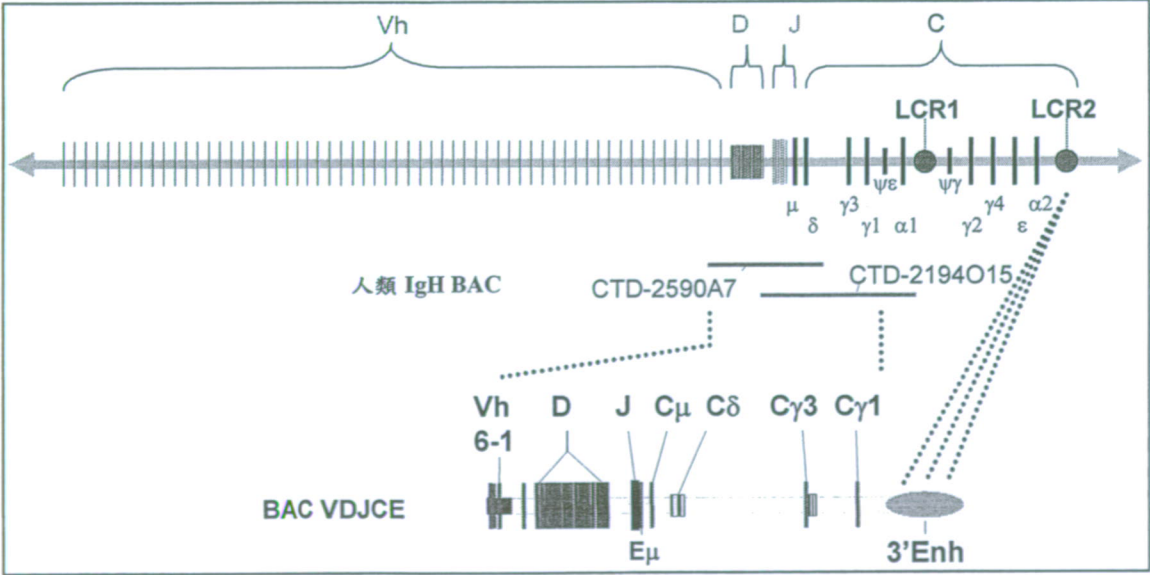
第 2 圖

生殖細胞轉殖基因：(YAC 與 BAC)



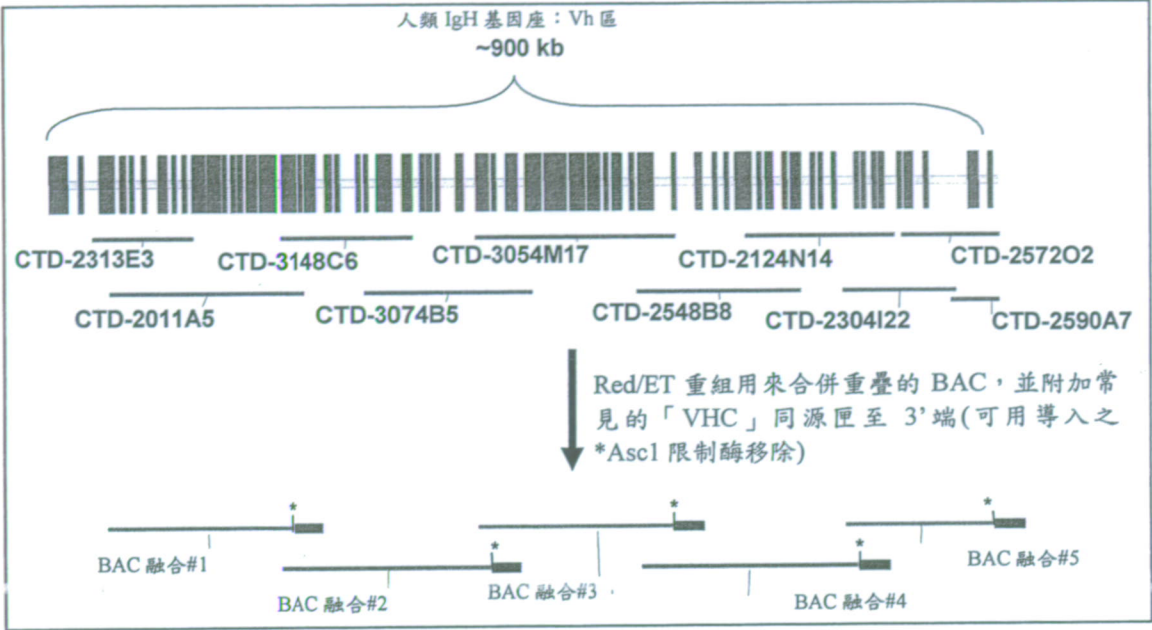
第 3A 圖

雜合轉殖基因：BAC VDJCE



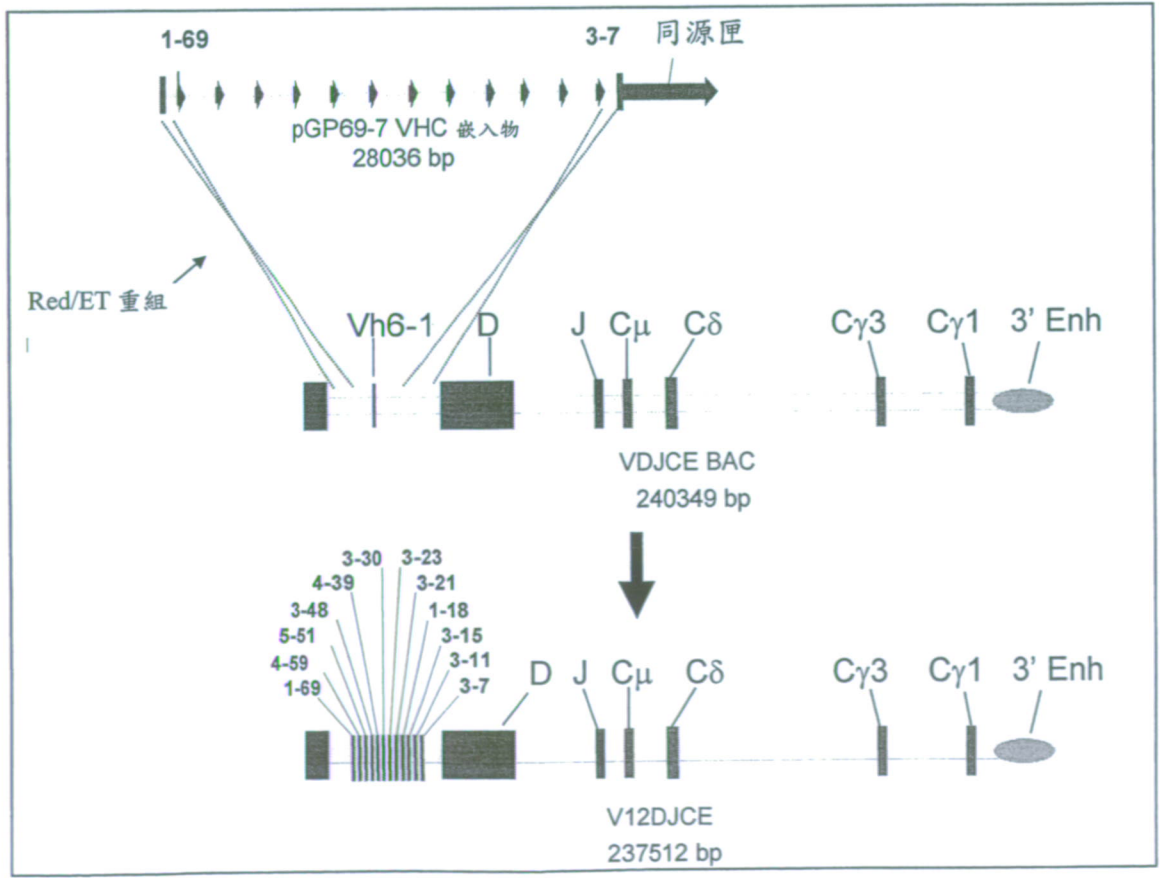
第 3B 圖

雜合轉殖基因：BAC 融合



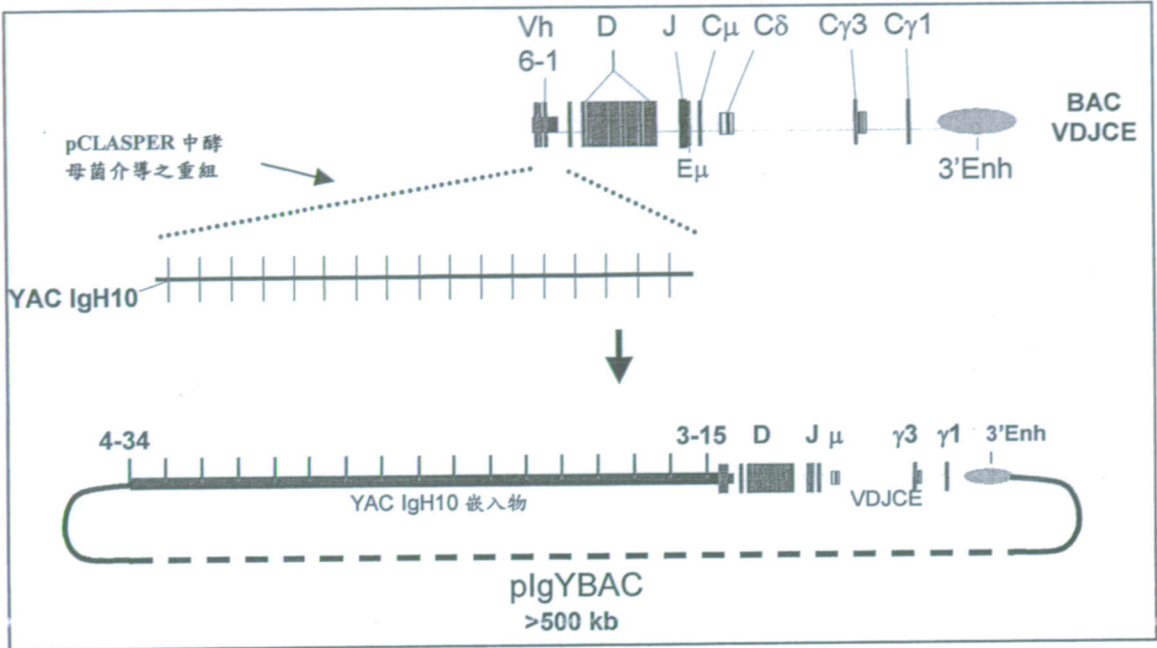
第 3C 圖

雜合轉殖基因：BAC V12DJCE

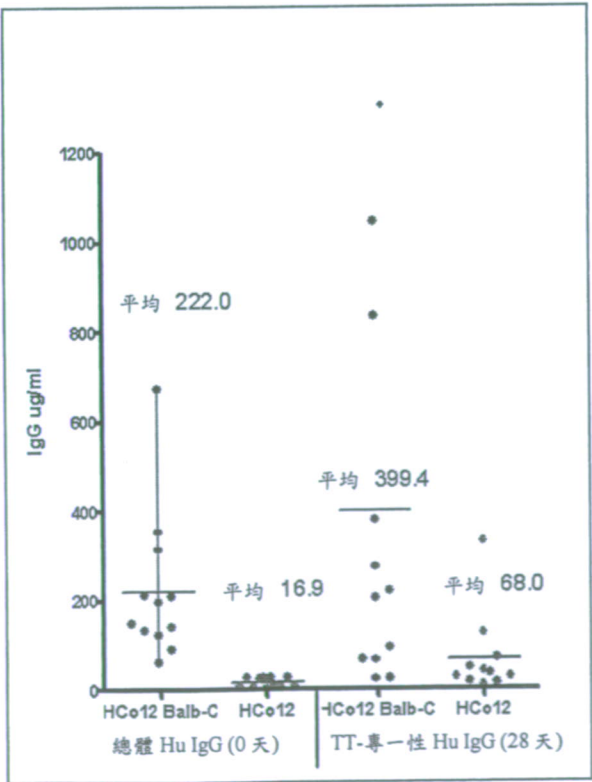


第 3D 圖

雜合轉殖基因：pIgYBAC



第 4 圖



第 5 圖

雜合轉殖基因：BAC V12DJCE-*neo*

