

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

美國 2000年11月30日 60/250,340 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

食品工業發展研究所	2001年11月22日	CCRC 940383
食品工業發展研究所	2001年11月22日	CCRC 940384
食品工業發展研究所	2001年11月22日	CCRC 940385

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

相關申請案之定義參考

本案申請專利優先於U.S.臨時案No. 60/250,340，公告於2000年11月30日，其揭示已全文列為本案參考。

技術領域

本發明屬於轉殖基因動物，分子免疫學及醫學之技術領域。

發明背景

抗體代表一類治療性分子，可應用於許多不同的領域，包括移植，心血管疾病，感染性疾病，癌症，及自體免疫 (Goldenberg, M., 1999, Clin. Ther. 21:309-318; Present, D. et al., 1999, New Engl. J. Med. 340:1398-1405; Targan, S. et al., 1997, New Engl. J. Med. 337:1029-1035; Davis, T. et al., 1999, Blood 94:88a; Saez-Llorens, X. et al., 1998, Pediatr. Infect. Dis. J. 17:787-791; Berard, J. et al., 1999, Pharmacotherapy 19:1127-1137; Glennie, M. et al., 2000, Immunol. Today 21:403-410; Miller, R., 1982, New Engl. J. Med. 306:517-522; Maini, R., et al., 1999, Lancet, 354:1932-1939)。由於融合瘤技術之發展，使得齧齒類單株抗體之分離(也稱為MAbs)可充作候選的治療性分子(Kohler, G. and Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497)。然而，先前的研究涉及使用非人類單株抗體於活體內人類治療上，證明人類抗-老鼠抗體(HAMA)反應可限制此作用物之使用 (Schroff, R. et al., 1985, Cancer Res. 45,879-885; Shawler, D. et al., 1985, J. Immunol. 135:1530-1535)。因此可確認

五、發明說明 (2)

，治療性抗體免疫原性之減少是欲求的。已應用重組體DNA技術來減少非-人類抗體之免疫原性(Boulianne, G. et al., 1984, Nature 312, 643-646; Morrison, S. et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855; Riechmann, L. et al., 1988, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033)。然而，也可確認，完全的人類單株抗體為治療人類疾病時，低免疫原性治療劑之潛力十足的來源(Little, M. et al., 2000, Immunol. Today 21: 364-70)。在其種系構型中攜有人類免疫球蛋白(Ig)位點之轉殖基因老鼠，其應用可分離出拮抗各樣標的之高親和力完全的人類單株抗體，包括人類自我抗原，其中正常的人類免疫系是耐受的(Lonberg, N. et al., 1994, Nature 368: 856-9; Green, L. et al., 1994, Nature Genet. 7: 13-21; Green, L. & Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188: 483-95; Lonberg, N and Huszar, D., 1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93; Bruggemann, M. et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326; Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-851; Mendez, M. et al., 1997, Nat. Genet, 15: 146-156; Green, L., 1999, J. Immunol. Methods 231: 11-23; Yang, X. et al., 1999, Cancer Res. 59: 1236-1243; Bruggemann, M. and Taussig, MJ., Curr. Opin. Biotechnol. 8: 455-458, 1997)。人類抗體以輕鏈(κ 及 λ)及重鏈，(IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, 及IgM)為據屬於各種不

五、發明說明 (3)

同類型。這些不同種類潛在地提供不同的治療用途。例如，不同的重鏈同型與補體有不同的交互作用，與以細胞為基礎之Fc受體亦然。某些重鏈類型(IgM及IgA)也可形成多體，因此增加Fc及V區交互作用之價數。因此希望有一個平台可供產生針對所有同型之人類單株抗體。然而，人類Ig位點(1-2Mb)之大尺寸是將整個位點引入轉殖基因老鼠以重組完全多樣的人類抗體寶庫的主要阻礙，因為包括有完全人類Ig位點之超過百萬鹼基大小之DNA片段之選殖是困難的，即使使用酵母人工染色體亦然。近來，使用人類染色體本身充作導入外來基因之載體之新穎步驟，有助於完全IgH及IgK位點轉移至轉殖老鼠，勿需將DNA片段選殖至人工DNA載體內(Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genet. 16: 133-143; Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)證明，二個可傳導之人類染色體片段(hCFs)，一者含有免疫球蛋白(Ig)重鏈位點(IgH, ~1.5Mb)另一者是κ輕鏈位點(Igk, ~2Mb)可引入其內源IgH及Igκ位點是無活性之轉殖老鼠內。在所生成之雙重-轉殖染色體(Tc)/雙重-擊倒(KO)老鼠中，保有二種hCFs的體細胞實質比例，及Ig產製缺失上之援救，可由在無老鼠重及κ輕鏈下，人類Ig重及κ輕鏈之高水平表現顯示出來。此外，四種人類Igγ亞類之血清表現概況可在人類中看出。轉殖老鼠一旦以人類血清蛋白(HSA)免疫接種即可發展出抗原-特異的人類抗體反應，且可自其中獲得有各種同型之HSA-特異的人類單株抗體。Tomizuka et al.之研究(同上)也證明老鼠

五、發明說明 (4)

中含有Igk位點(hCF (2-W23))之由hChr.2-衍生之hCF之不穩定性。κ轉殖染色體所觀察到之不穩定性，是最適宜κ輕鏈表現及人類κ-陽性融合瘤產製之妨礙。確實，由雙重Tc/KO老鼠所得之抗-HSA融合瘤中有2/3是老鼠λ-陽性(mλ⁺)，且發現大多數(83%)的IgG/mλ融合瘤失去hCF(2-W23)。因此，在此需有可保有由Tomizuka et al.(上文)所述之轉殖染色體所提供之特性之轉殖動物，特別是動物可實質表現人類重鏈同型完全寶庫者，且對所引入之人類序列也可呈現經改進之穩定性，在獲得完全人類抗體上可有增加之效率。

發明要點

本發明提出含有二種人類免疫球蛋白位點之轉殖的非人類哺乳動物，其中二種人類免疫球蛋白位點之一是人類重鏈位點，另一位點是人類輕鏈位點；且其中該位點僅一者是轉殖染色體的。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，轉殖染色體是自主的。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，轉殖染色體含有人類第14號染色體之片段。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，人類輕鏈位點與內源的哺乳動物染色體有關。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，人類重鏈位點是屬轉殖染色體，且人類輕鏈位點與內源的哺乳動物染色體有關。在某些此轉殖非人類哺乳動物中，至少部份的人類輕鏈位點選殖至YAC載體內。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，人類重鏈位點係包括在hCF (SC20)中，且人類輕鏈位點包括在人類κ輕鏈位點導入外來基因KCo5中。在某些轉

五、發明說明 (12)

瘤細胞；並培養所稀釋之融合瘤細胞，以得純系細胞株，其可表現與預定抗原具反應性之單株人類抗體。在此方法中，純系之細胞株得自至少50%受鑑知之融合瘤細胞。

在另一方面，本發明提出可分泌人類序列抗體之老鼠融合瘤細胞，其具有IgA同型，且以至少 10^{10} M^{-1} 之平衡解離常數(K_a)結合至特異的抗原。

在另一方面，本發明提出人類序列抗體，其具有IgA同型，且以至少 10^{10} M^{-1} 之平衡解離常數(K_a)結合至特異的抗原。

附圖說明

圖1 Cmu對準目標載體之設計。A)指導合成Cmu區域之老鼠基因體DNA。B) Cmu對準目標載體。C)老鼠基因體DNA目標載體所同質重組。

圖2在雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，人類Ig μ ， γ ， κ 及老鼠 λ 鏈之血清濃度。

圖3在經免疫之雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，於第34天時，抗-CD4人類Ig γ 之血清濃度。

圖4在經免疫之雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，於第34天時，抗-CD4人類Ig κ 之血清濃度。

圖5雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，抗-CD4人類Ig γ 反應之時間曲線，顯示出在第34天時各組(N=5)間之最高血清效價。

圖6在雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，抗-CD4人類Ig κ 反應之時間曲線，顯示出在第34天時各組(N=5)間之最高血清

五、發明說明 (13)

效價。

圖7 KM2-3融合瘤細胞之生長曲線及抗-CD4人類單株抗體之產製。

圖8在經免疫接種之雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，於第34天之抗-GCSF人類Ig γ 之血清濃度。

圖9在經免疫接種之雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，於第34天之抗-GCSF人類Ig κ 之血清濃度。

圖10在雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，抗-GCSF人類Ig γ 反應之時間曲線，顯示出在第34天時於各組間(N=5)之最高血清效價。

圖11在雙重TC/KO及雜交育種老鼠中，抗-GCSF人類Ig κ 反應之時間曲線，顯示出在第34天時於各組間(N=5)之最高血清效價。

圖12抗-CTLA-4人類單株抗體對阻斷活性之劑量反應曲線。

圖13以單株抗體抑制CTLA-4(生物素)與B7.2細胞之結合。

圖14雜交育種(Fc)老鼠血清中對牛C-IV加強之反應。

詳細說明

所謂"轉殖染色體"指可轉移至非人類哺乳動物之染色體或其片段。引入轉殖染色體之示範細胞是ES細胞。轉殖染色體可含有篩選的標幟，且可衍生自非人類哺乳動物之不同種類。轉殖染色體包括部份的人類染色體。所謂"轉殖染色體的"或"轉殖染色體"表示"保留轉殖染色體"或"係轉殖染色體"。

五、發明說明 (14)

本發明的人類序列抗體可在非人類轉殖哺乳動物中產生，如轉殖的老鼠，其經由V-D-J重組作用可對各種抗原產生多種人類(如單株或多株)抗體之同型(如IgM，IgD，IgG，IgA及/或IgE)，且針對非IgM/非IgD抗體，經由同型轉換。因此，本發明各方面包括抗體及抗體片段，及其藥學組合物，以及非人類轉殖哺乳動物，及製作此單株抗體之B-細胞及融合瘤。

除非所示，"病人"或"個體"可交互使用且指哺乳動物，如人類患者及非人類靈長類，以及實驗動物如兔子，大鼠及老鼠，及其他動物。

所謂"治療"包括投予本發明化合物或作用物，以避免或延緩症狀之發作，併發症，或疾病之生化適應症，舒緩症狀或遏止或抑制疾病、狀況或失調症之進一步發展(如自體免疫疾病)。治療可以是預防性(以預防或延緩疾病之發作，或預防臨床或其次臨床症狀之表現)或治療性遏止或疾病表現後症狀之舒緩。

一般而言，"充份耐受"指在健康狀況下無不良變化，其因治療結果所發生，且可影響治療決定。

所謂"淋巴細胞"如此中所用的具有技藝中之一般定義，且指見於血液，淋巴及淋巴組織中之單核，非吞噬之白血球，即B及T淋巴細胞。

"T淋巴細胞之亞族群"或"T細胞子集"指T淋巴細胞或T細胞特徵為特殊細胞表面標幟之表現(見Barclay, A. N. et al. (eds.), 1997, THE LEUKOCYTE ANTIGEN FACTS BOOK, 2ND.

五、發明說明 (15)

EDITION, Academic Press, London, United Kingdom; 此參考文獻已針對所有目的列為本案參考)。

"胞毒性之T淋巴細胞-相關之抗原-4", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4抗原"及"CD152"(如見, Murata, 1999, Am. J. Pathol. 155: 453-460)可互換使用, 且包括人類CTLA-4之變型, 同型, 種類同系物, 及與CTLA-4具有至少一個共同表位之同系物(如見 Balzano, 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7: 28-32)。

人類CTLA-4完全的cDNA序列具有Genbank編號No. L15006。胺基酸1-37之區域是前導子肽; 38-161是細胞外類V功能部位; 162-187是穿膜功能部位; 且188-223是胞質功能部位。核苷酸序列之變化型已有所報告, 包括在第49位置之G至A之轉變, 在第272位置C至T之轉變, 及第439位置A至G之轉變。老鼠CTLA-4之完全DNA序列具有EMBL編號X05719 (Brunet et al., 1987, Nature 328: 267-270)。胺基酸1-35區域是前導子肽。

"表位"表示可與抗體特異結合之蛋白質決定子。表位通常由化學活性之表面分子群組成, 如胺基酸或糖測鏈, 且通常有特異的三度空間結構特色, 以及特異的電荷特性。構型及非構型表位可區分出來, 在於存在有變性溶劑時, 與前者之結合非後者會喪失。

完整的"抗體"包含有至少二個重鏈(H)及二個輕鏈(L), 由二硫化物鍵在之間連結。各重鏈由重鏈可變區(縮寫成VH)及重鏈固定區所組成。重鏈固定區含有三個功能部位: CH1

五、發明說明 (16)

，CH2及CH3。各輕鏈由輕鏈可變區(縮寫或VL)及輕鏈固定區組成。輕鏈固定區含有一個功能部位：CL。VH及VL區可進一步細分成超可變區，稱為互補性決定區(CDR)，由較具保留性之區域分散其間，即稱為架構區(FR)。各VH及VL由三個CDRs及四個FRs組成，在以下次序中由胺基末端排列至羧基末端"FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重及輕鏈之可變區含有一個可與抗原交互作用之結合功能部位。抗體之固定區可調升免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系的各種細胞(如效應物細胞)，經由細胞受體，如Fc受體(如FcγRI，FcγRIIa，FcγRIIb，FcγRIII，及FcRη)及典型補體系統之第一組份(C1q)。所謂抗體，包括完整抗體之抗原-結合部份，其保有與抗原結合之能力。抗原結合部份之實例包括(i) Fab片段，由VL，VH，CL及CH1功能部位組成之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，含有二個Fab片段之二價片段，由二硫化物橋在樞紐區上連結；(iii) Fd片段由VH及CH1功能部位所組成；(iv) Fv片段由抗體單臂之VL及VH功能部位所組成，(v) dAb片段(Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546)，由VH功能部位所組成；及(vi)經分離的互補性決定區(CDR)。再者，雖然Fv片段的二個功能部位，VL及VH，由分別的基因所編碼，其可利用重組方法經由合成連接子連結，其使彼可充作單一蛋白質鏈，其中VL及VH區域對可形成單價分子(已知為單鏈Fv(scFv)；如見，Bird et al., 1988, Science 242: 423-426；及Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:

五、發明說明 (17)

5879-5883)。此單鏈抗體參照"抗體"片段，可由重組體技術或完整抗體之酵素或化學解離而製備。

"人類序列抗體"包括由人類免疫球蛋白序列衍生之具有可變及固定區(若存在時)之抗體。本發明的人類序列抗體包括不為人類種系免疫球蛋白序列所編碼之胺基酸殘基(如由任意或位置-特異的試管內突變作用或活體內體細胞突變所引入之突變作用)。然而，"人類序列抗體"，如此中所用的，並不包括其中完整的CDR序列足以提供抗原特異性之抗體，且衍自另一哺乳動物之種系，如老鼠，其已移植至人類架構序列(即人類化之抗體)。

所謂"單株抗體"或單株抗體組成物"指單一分子組成物之抗體分子製劑。單株抗體組成物對特定的表位呈現單一結合特異性及親和力。因此，所謂"人類單株抗體"指呈現單一結合特異性之抗體，其具有衍生自人類種系免疫球蛋白序列之可變及固定區(若存在時)。在一個具體實例中，人類單株抗體可由融合瘤所產生，其包括由轉殖之非人類動物所得之B細胞，如轉殖之老鼠，所具有之基因體包括人類重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因融合至不朽化之細胞上。

所謂"雙純系抗體"指相對於抗原之至少二種抗體之製劑。典型而言，不同的抗體與不同的表位結合。

"寡純系抗體"指相對於抗原之3至100種不同的抗體之製劑。典型而言，在此製劑中之抗體可與不同表位範圍結合。

五、發明說明 (18)

"多株抗體"指1種以上(二種以上)不同抗體之製劑。此製劑包括可與不同表位範圍結合之抗體。

本發明提出相對於各種抗原之人類序列抗體，包括對人類CTAL-4，人類G-CSF，人類HSA，人類CD4及人類EGFR之人類抗體。本發明之人類抗體包括可阻斷或拮抗由細胞表面受體所轉導之訊號之抗體，如人類CTLA-4受體，及人類CD4輔受體。這些抗體中某些可與人類CTLA-4上之表位結合，如此可抑制CTLA-4與人類B7對映受體之交互作用。類似地，這些抗體中某些可與人類CD4上之表位結合，以抑制CD4與人類第II類MHC之交互作用。由於人類CTLA-4與人類B7之交互作用可轉導訊號，造成攜有人類CTLA-4受體之T-細胞之失活作用，交互作用之拮抗性可有效率地誘導，擴大或延長攜有人類CTLA-4受體之T細胞之活化作用，由是延長或擴大免疫反應。"阻斷性抗體"指可減少可溶性人類CTLA-4與細胞-表現之人類B7配體之結合達至少10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，99%或99.9%之抗體，且所在之條件為抗體結合至人類CTLA-4配體結合位置之比例為大於1:1，且抗體濃度大於 10^{-8} M。

本發明進一步提出相對於各種人類抗原之人類序列IgA抗體。例子IgA抗體包括：CD4，G-CSF，CTLA-4及EGFR。因為IgA抗體可形成二聚體，此IgA抗體具有改進之交叉連結特性。

其他的抗體製劑，有時稱多價製劑，以此一方式與細胞

五、發明說明 (19)

表面受體結合，如人類CTLA-4，以交聯相同細胞上之多重人類CTLA-4受體。

交聯也可由具有不同表位特異性之可溶性二價抗體之組合而完成。這些多株抗體製劑含有至少二對重及輕鏈，可與抗原上不同的表位結合，如此因為抗體-調升之交聯使訊號可被轉導。

所謂"重組體人類抗體"包括本發明所有的人類序列抗體，其可以重組方法製備，表現，生成或分離，如由動物(如老鼠)分離之抗體，其對人類免疫球蛋白基因而言是轉殖的(下文進一步說明)；抗體利用轉感至宿主細胞之重組體表現載體表現，抗體分離自重組體，組合的人類抗體庫，或抗體以其他任何方法製備，表現，生成或分離，其中涉及人類免疫球蛋白基因序列之剪接成另外的DNA序列。此重組體人類抗體具有由人類種系免疫球蛋白序列衍生之可變及固定區(若存在時)。然而，此抗體可接受試管內突變作用(或當使用動物轉殖之人類Ig序列，則行活體內之體突變作用)，且因此重組體抗體之VH及VL區胺基酸序列，雖係衍生自且相關於人類種系VH及VL序列，無法自然存在於活體內之人類抗體種系之內。

"異質抗體"之定義和產製此抗體之轉殖的非-人類有機體有關。此術語係指抗體具有胺基酸序列或編碼的核酸序列相當於有機體中所見，不包括轉殖的非人類動物，且通常來自轉殖的非-人類動物之外。

"異種雜種抗體"指具有不同有機體來源之輕及重鏈之抗

五、發明說明 (20)

體。如，具有人類重鏈加上鼠類輕鏈之抗體是異種雜種抗體。

所謂"實質上純的"或"經分離的"表示自其天然環境中被鑑知及分離及/或回收之個體(如本發明之抗體)，如此個體是存在的主要個體(即在莫耳濃度基礎上其較組成物中其他任何個別種類均更豐富)；"實質上純的"或"經分離的"組成物也表示其中的個體在所有的大分子種類中包括至少約50%(就莫耳濃度基礎而定)。實質上純的或經分離之組成物也包括所有存在於組成物中大分子種類的80-90%以上按重計。經分離之個體(如本發明抗體)也可純化至基本上均質狀(摻雜之種類以傳統之偵測方法無法在組成物中被測及)，其中的組成物基本上由單一大分子種類之衍生物所組成。例如，人類CTLA-4之經分離抗體實質上並無其他缺乏與人類CTLA-4結合但可與不同抗原結合之抗體。再者，可與人類CTLA-4之表位，同型或變型特異結合之經分離抗體，可與其他相關的抗原交叉反應，如來自其他種類(如CTLA-4種類同系物)。再者，本發明經分離的抗體實質上無其他的細胞物質(如非-免疫球蛋白相關的蛋白質)及/或化學物質。

"特異的結合"指和其他非特異抗原比較下，與特異抗原之差別結合。對抗體之"特異(或選擇性)結合"指結合反應在蛋白質及其他生物之異質族群中，存在有蛋白質之決定性的。典型而言，抗體以至少約 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 或 10^7 M^{-1} ，或約 10^8 M^{-1} 至 10^9 M^{-1} ，或約 10^{10} M^{-1} 至 10^{11} M^{-1} 或更高之結合常

五、發明說明 (21)

數(K_a)結合，並以至少2倍以上之親和力與特異抗原結合，此係與特異抗原或極相關抗原以外之非特異抗原(如BSA，酪蛋白)結合比較而言。"確認抗原之抗體"及"與抗原特異之抗體"在此可與"可與抗原特異結合之抗體"互換使用。預定的抗原是在選擇可與該抗原結合之抗體前所選定之抗原。

"特異地結合"或"結合特異的"當指肽時指有中度或高度結合親和力之肽分子，係唯一地或主要地與標的分子結合。"特異結合至"指結合反應，其在蛋白質及其他生物物質異質族群存在下，對於標的蛋白質之存在具有決定性。因此，在所設計之分析條件下，特異的結合部份可差別地結合至轉殖基因之特殊標的蛋白質且與受試樣品中之其他組份不以顯著量結合。在此條件下與標的蛋白質之特異結合需有針對特定標的抗原之特異性而選擇之結合部份。各樣的分析型式均可用來選出與特定蛋白質可特異地反應之配體。例如，固相ELISA免疫分析法，免疫沈澱作用，Biacore及Western吸漬法可用來鑑定出與抗原可特異反應之肽類。典型而言，特異的或選擇性反應將至少是背景訊號或雜訊之二倍，且較常是超過10倍背景值。

對抗體而言之"高親和力"指平衡結合常數(K_a)至少約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ，至少約 10^8 M^{-1} ，至少約 10^9 M^{-1} ，至少約 10^{10} M^{-1} ，至少約 10^{11} M^{-1} ，或至少約 10^{12} M^{-1} 以上，如高達 10^{13} M^{-1} 或 10^{14} M^{-1} 以上。然而，"高親和力"結合在其他抗體同型中可有所變化。

而此中所用的" K_a "意指特定抗體-抗原交互作用之平衡

五、發明說明 (22)

結合常數。此常數有 $1/M$ 之單位。

而此中所用的 " K_d " 意指特定抗體-抗原交互作用之平衡解離常數。此常數之單位為 M 。

" K_a " 如此中所用的，意指特定抗體-抗原交互作用之動力學結合常數。此常數單位為 $1/Ms$ 。

" K_d " 如此中所用的，指特定抗體-抗原交互作用之動力學解離常數。此常數單位為 $1/s$ 。

"特定的抗體-抗原交互作用" 指實驗條件，在此之下可偵測平衡及動力學常數。

"同型" 指為重鏈固定區基因所編碼之抗體種類。重鏈可分類成 γ ， μ ， α ， δ 或 ϵ ，且分別定義出 IgG ， IgM ， IgA ， IgD 及 IgE 之抗體同型。另外的結構變化定出 IgG (如 IgG_1 ， IgG_2 ， IgG_3 及 IgG_4) 及 IgA (如 IgA_1 及 IgA_2) 不同的亞型。

"同型轉換" 指一種現象其中抗體之類型，或同型由某一 Ig 類型改變至另一 Ig 類型。

"非轉換的同型" 指重鏈之同型類型，其當無同型轉換發生時所產生，編碼非轉換同型之 CH 基因通常是功能性重排之 VDJ 基因下游緊接之第一個 CH 基因。同型轉換可分類成典型的或非典型的同型轉換。典型的同型轉換由重組作用而發生，其涉及導入外來基因中至少一個轉換序列區域中。非一典型的同型轉換，可在人類 σ_μ 及人類 Σ_μ (δ -相關之刪除作用) 間經由同質重組作用發生。另外的非-典型轉換機制，如轉殖基因間及/或染色體間重組作用，在此中可發生，且達成同型之轉換。

五、發明說明 (23)

所謂"轉換序列"指負責轉換重組作用之DNA序列。"轉換供者"序列，通常是 μ 轉換區，為構體區之5'(即上游)在轉換重組中可被刪除。"轉換受者"區係介於欲刪除之構體區及取代作用固定區之間(如 γ ， ε 等)。由於重組作用始終發生之處並無特異部位，最初的基因序列通常無法自構體中預測出來。

"糖基化作用型式"定義為碳水化合物單位共價黏附至蛋白質之型式，較特異是結合至免疫球蛋白蛋白質。異質抗體之糖基化作用型式特徵實質上類似由非人類轉殖動物所產生之抗體所自然發生之糖基化作用型式，此係當精藝者了解異質抗體之糖基化作用型式和在非人類轉殖動物中之糖基化作用型相似，且更甚於其轉殖基因之CH基因係衍生之種屬。

所謂"自然生成的"應用至個體指個體可見於大自然之事實。例如，存在於有機體(包括病毒)之多肽或聚核苷酸序列，可分離自天然來源，且並未經人類在實驗室中故意地處理修飾，故是自然發生的。

所謂"免疫球蛋白位點"係指遺傳元件或相連結之遺傳元件組，其所含之資訊可為B細胞或B細胞前軀體所利用以表現免疫球蛋白肽。此肽可為重鏈肽，輕鏈肽，或重及輕鏈肽之融合。在未重排位點之例子中，遺傳元件為B細胞前軀體所組合以形成編碼免疫球蛋白肽之基因。在已重排之位點例子中，編碼免疫球蛋白肽之基因係含於位點內。

所謂"重排的"指重鏈或輕鏈免疫球蛋白位點之構型，其中V段位置緊接至D-J或J片段，其構型基本上分別編碼完全

五、發明說明 (24)

的VH或VL功能部位。重排的免疫球蛋白基因位點可由與種系DNA比較而鑑知；重排的位點有至少一個重組的七元/五元同系元件。

所謂"未重排的"或"種系構型"參照V段指其中V段並不重組之構型，如此可立即緊鄰至D或J段。

"核酸"或"核酸分子"指呈單一或雙股型式之去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物，且除非另有所限制，可包括天然核苷酸之已知同系物，以和自然生成核苷酸相似的方式作用。

所謂"經分離的核酸"參照編碼抗體或抗體部份(如VH，VL，CDR3)之核酸，其與抗體結合，係指其中核苷酸序列編碼抗體或抗體部份之核酸，並無其他編碼抗體或抗體部份之核苷酸序列，其與抗原結合而非如CTLA-4一類，此其他的序列可自然地鄰接在人類基因體DNA中之核酸。

所謂"實質上同質"在二段核酸或多肽之環境下指二段以上之序列，有至少約80%，約90%，約95%或更高之核苷酸或胺基酸殘基同質性，係針對最大之相當性而比較及排列時，係利用以下的序列比較方法及/或目視檢測。此"實質上同質"存在於序列區域中可長達至少約50個殘基，歷至少約100個殘基，或至少150個殘基之區域，或二個比較序列之全長。如下文所述，任二個抗體序列可僅以一方向排列，利用Kabat中之命名流程。因此，對抗體而言，同質性百分率是獨特且充份定義之意義。

來自免疫球蛋白成熟重及輕鏈可變區之胺基酸，分別命名為Hx及Lx，其中x是胺基酸之位置編號，依據Kabat之流

五、發明說明 (25)

程，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987及1991)。Kabat針對各子群之抗體列出許多胺基酸序列，並列出該子群中各殘基位置最自然發生之胺基酸，以產生一致的序列。Kabat利用方法以針對所列序列中之各胺基酸設定殘基編號，且此設計殘基編號之方法在本領域中已標準化。Kabat's的流程可延伸至不包括在其大綱中之其他抗體，係將討論中之抗體與Kabat中一致序列之一排列，並參照保留性胺基酸。Kabat命名系統的使用可容易地鑑定在不同抗體中相當位置處之胺基酸。例如，在人類抗體L50位置處之胺基酸占據老鼠抗體胺基酸L50處之相當位置。另外，編碼抗體鏈之核酸依據Kabat命名傳統排列，此當為個別核酸所編碼之胺基酸序列排列時。另一結構定義則由下列提出：Chothia, et al., 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia, et al., 1989, Nature 342: 878-883; 及Chothia, et al., J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1989)以上全針對所有目的已列為本案參考。

"選擇性(或特異地)雜交"指分子與特殊核苷酸序列在迫切雜交條件下結合，雙股化或雜交，此當序列係存在於複合物混合物中(如總細胞或庫DNA或RNA)，其中特定的核苷酸序列以至少約10倍背景偵測。在一個具體實例中，核酸經由在迫切條件下與另外決定者為本發明範圍內之核酸雜交之能力，可決定知屬本發明範圍之內(如此中所述之示範序列)。

"迫切的雜交條件"指在此條件下探針可與其標的次序列

五、發明說明 (26)

雜交，通常在核酸之複合物混合物中，但不與其他序列大量雜交(陽性訊號(如本發明核酸之鑑定)約10倍強過背景之雜交)。迫切條件是和序列有關的，且在不同環境中是不同的。較長的序列在較高溫下特異地雜交。核酸雜交之充份引導見於如：Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997) ; LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY : HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, PART I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)。

一般而言，所選用之迫切條件為在明確的離子強度pH下針對特異序列而言，較熱熔點(T_m)低約5-10°C。 T_m 指與標的互補的探針，在此溫度(在交叉之離子強度，pH及核酸濃度下)下有50%可與標的序列在平衡下雜交(因標的序列過量存在，在 T_m 下，在平衡下占據的探針達50%)。迫切條件為其中鹽濃度少於約1.0 M鈉離子，通常在pH 7.0-8.3下約0.01至1.0 M鈉離子濃度(或其他的鹽類)，且溫度對短探針(如10-50核苷酸)為至少約30°C，而對長探針為至少約60°C(如大於50個核苷酸)。迫切條件也可加去穩定劑而達成，如Sambrook(下示)所述之甲醯胺。對高迫切離交而言，陽性訊號為背景值的至少2倍，較好10倍。示例之高迫切或迫切離交條件包括：50%甲醯胺，5× SSC及1% SDS，在42°C

五、發明說明 (27)

下，或5×SSC及1% SDS培育在65℃下，洗滌在0.2× SSC及0.1% SDS下，65℃。於選擇性或特異的雜交下，陽性訊號(如本發明核酸之鑑定)是背景雜交的約10倍。在本發明範圍內用來鑑定核酸的迫切離交條件包括如在含有以下之緩衝溶液中雜交：50%甲醯胺，5× SSC及1% SDS，在42℃下，或含有下列之緩衝溶液：5× SSC及1% SDS，在65℃下，二者的洗滌均為0.2× SSC及0.1% SDS，65℃下。在本發明中，含有本發明核酸之基因體DNA或cDNA，可在迫切條件下以標準的Southern吸漬法鑑定，並利用此中揭示之核酸序列。針對此雜交的另外的迫切條件(以鑑定本發明範圍內之核酸)為包括在40%甲醯胺，1 M NaCl，1% SDS在37℃之緩衝溶液中之雜交。

然而，雜交型式之選擇並不具關鑑性-是洗滌條件具直切性，其示出之條件可決定核酸是否在本發明範圍之內。用來鑑定本發明範圍內核酸之洗滌條件，包括如：約0.02莫耳濃度之鹽濃度，在pH 7，及至少約50℃之溫度，或約55℃至約60℃；或約0.15 M NaCl之鹽濃度在72℃下約15分鐘；或約0.2X SSC之鹽濃度，在至少約50℃之溫度，或約55℃至約60℃歷約15至約20分鐘；或雜交複合物以約2X SSC之鹽濃度，含有0.1% SDS在室溫下15分鐘，洗二次及以0.1X SSC含有0.1% SDS在68℃下15分鐘，洗二次；或相當的條件。見Sambrook, Tijssen及Ausubel關於SSC緩衝溶液及相當條件之說明。

"序列同質性"指胺基酸或核苷酸序列間相似性之偵測，

五、發明說明 (28)

且可利用技藝中已知方法偵測，如下述：

"同質"或"同質"百分率，在二個以上核酸或多肽序列之環境中，指二個以上序列或次序列，其胺基酸殘基或核苷酸相同或有特示之百分率是相同的(即，60%同質性，較好65%，70%，75%，80%，85%，90%或95%同質性歷特示區域，此係當在比較窗中為求最大相當性而比較及排列，或所設定之區域利用以下序列比較演算法或手動式排列及目測之一偵測。

"實質上同質"在二個以上核酸或多肽之環境中，指二個以上序列或次序列，其有至少60%，通常至少70%，較好至少80%，最好至少90%或至少95%核苷酸或胺基酸殘基同質，此係當針對最大相當性比較及排列時，係利用下列序列比較演算法或經由目測之一偵測。較好，實質的同質性存在於序列區域可有至少約50個鹼基或殘基之長度，較好歷至少約100鹼基或殘基區域，且最好序列實質上同質可歷至少約150鹼基或殘基。在最佳的具體實例中，序列可在編碼區之全長上是實質上同質的。

於序列比較上，通常一序列充作參考序列，與此和受試序列比較。當利用序列比較演算法時，將受試及參考序列納入電腦，設定次序列座標，若必要時，再設定序列演算變數。可使用預設程式變數，或可設定不同的變變。序列比較演算法再估算出相較於參考序列，以程式變數為據，受試序列之序列同質百分率。於核酸及蛋白質之序列比較上，可使用BLAST及BLAST 2.0演算法及下述之預設變數。

五、發明說明 (29)

"比較窗"如此中所用的，包括參考連續位置編號任一者之片段，選自下列包括由20至600，通常約50至約200，較常是約100至約150，其中序列在此二序列最適宜排列後，連續位置相同編號之參考序列可與之比較。針對比較，序列之排列方法是技藝中熟知的。於比較時，序列之最佳排列可利用 Smith & Waterman之局部同質演算法(1981, Adv. Appl. Math. 2: 482)，Needleman & Wunsch的同質排列演算法(1970, J. Mol. Biol. 48: 443)，Pearson & Lipman之類似性方法(1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444，這些演算法之電腦化補助(FASTDB (Intelligenetics)，BLAST (National Center for Biomedical Information)，GAP，BESTFIT，FASTA，及 TFASTA 於 Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)，或利用人工排列及目視檢查(如見，Ausubel et al., 1987 (1999 Suppl.), Current Protocols in Molecular biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)來進行。

演算法之較佳實例，且適於決定同質性序列百分率及序列相似性者是 FASTA 演算法，其述於 Pearson, W.R. & Lipman, D.J., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444。也見 W. R. Pearson, 1996, Methods Enzymol. 266: 227-258。用於 DNA 序列之 FASTA 排列較佳變數，以估算同質性百分率，可使更臻完善，BL50 Matrix 15: -5，k-tuple=2；連結罰點(joining penalty)=40，完善性=28；間隙罰點=-12，

五、發明說明 (30)

間隙長度罰點=-2；及寬度=16。

演算法的另一較佳實例，適於決定序列同質性百分率及序列相似性者為BLAST及BLAST 2.0演算法，其述於Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402，及Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410，分別地。可使用BLAST及BLAST 2.0，配合此中所述之變數，以決定本發明核酸及蛋白質之序列同質性百分率。進行BLAST分析之軟體經由National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)取得。此演算法是先鑑定有高分之序列對(HSPs)，係鑑定疑問序列中長度W之短口令，其當與資料庫序列中具相同長度之口令排列時，或配合或滿足某些正值之閾值分數T。T指的是鄰近的口令分數閾值(Altschul et al., 上文)。這些最初的鄰近字口令短擊可充作最初研究之種子，以尋求含彼之較長HSPs。口令短擊沿著各序列以二種方向延伸，可長至累積排列分數增加之長。針對核苷酸序列，累積分數可利用變數M(對於配合殘基對之補償分數；始終>0)及N(對於不配合殘基之罰則分數；始終<0)。對胺基酸序列而言，可使用分數距陣來估計累積分數。沿著各方向延伸之口令短擊當以下狀況時可停止。累積排列分數自其所達成之最大值以X量遠離時；累積分數到達零以下，由於一個以上負分殘基排列之累積所致；或到達各序列之末端。BLAST演算法變數W，T及X可決定排列之靈敏度及速度。BLASTN程式(對核苷酸序列而言)以11之口令長度(W)，10之期望值(E)，M=5

五、發明說明 (31)

， $N=-4$ 及二股之比較為不履行之因。於胺基酸序列時，BLASTP程式使用3之口令長度，10之期望值(E)及BLOSUM62分數矩陣(見Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915) 50之排列(B)，10之期望值(E)， $M=5$ ， $N=-4$ ，及二股之比較為不履行之因。

BLAST演算法也進行二序列間相似性之統計分析(如見，Karlin & Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5787)。由BLAST演算法所提供之相似性偵測法是最小概率總合(P(N))，其提供概率之指令其中二核苷酸或胺基酸序列間之配合可隨機發生。例如，若在受試核酸與參考核酸之比較上，最小概率總合少於約0.2，較好少於約0.01，且最好少於約0.001，則核酸被視為與參考序列類似。

有用的演算法的另一實例是PILEUP。PILEUP自一群相關序列中生成多重序列排列，其中利用漸進，成對排列以類示出相互關係及序列同質性百分率。其也劃出顯示用於製出排列之叢團關係之樹圖或空狀圖。PILEUP使用Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35: 351-360漸進排列方法之簡化法。方法係和Higgins & Sharp, 1989, CABIOS 5: 151-153所述之方法類似。程式可排列達300個序列，各自最大長度為5,000個核苷酸或胺基酸。多重排列步驟始自二個最相似序列之成對排列，產生二個排列序列群。此群再與下一個最相關序列或已排列序列群排列。二序列群之排列係將二個個別序列之成對排列由單純延伸而排列。最後之排列經由一系列漸進，成對之排列來達成。此程式的進行是指定特

五、發明說明 (32)

異的序列及針對序列比較區域之胺基酸或核苷酸座標，並指定程式變數。利用PILEUP，參考序列與其他受試序列比較以決定序列同質性百分率之相互關係，利用以下變數：缺席之間隙重(3.00)，缺席之間隙長度重量(0.10)，及稱重之末端間隙。PILEUP得自GCG序列分析軟體包7.0版本(Devereaux et al., 1984, Nuc. Acids Res. 12: 387-395)。

適於多重DNA及胺基酸序列排列的另一較佳的演算法實例是CLUSTALW程式(Thompson, J. D. et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680)。ClustalW在序列群間進行多重的成對比較，並依同質性組合成多重排列。間隙開口及間隙延伸缺席狀況分別是10及0.05。於胺基酸排列上，BLOSUM演算法可充作蛋白質重量距陣(Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919)。

本發明之核酸存在於完整細胞中，溶胞產物中，或呈部份純化或實質純化型式。核酸當自其他細胞組份或其他摻雜物中純化，核酸可"被分離"或"變得實質上純化"，如，其他細胞核酸或蛋白質，利用標準技術，包括鹼/SDS處理，CsCl帶狀化，管柱層析，瓊脂糖凝膠電泳及其他技藝中熟知的(如見Sambrook, Jijssen and Ausubel此中所討論的及針對所有目的納入參考)。本發明的核酸序列及用來實行本發明的其他核酸，不論是RNA，cDNA，基因體DNA或其雜交體，可分離自各種來源，利用遺傳工程，經擴大及/或重組表現。可使用任何的重組表現系，包括如細菌，酵母，昆蟲或哺乳動物系統。另外，這些核酸可於試管內化學

五、發明說明 (33)

地合成。操作核酸之技術，如繼代選殖至表現載體，標記探針，定序，及雜交均充份述於科學及專利文獻中，如 Sambrook, Jijssen and Ausubel。核酸可以精藝者熟知之許多一般方法中任一者予以分析及定量。這些包括如分析的生化方法如 NMR，分光光度計，放射圖解，電泳，毛細電泳，高性能液相層析(HPLC)，薄層層析(TLC)，及高擴散層析，各種免疫學方法，如流體或凝膠沈澱反應，免疫擴散(單一或雙重)，免疫電泳，放射免疫分析法(RIAs)，酵素鏈結的免疫吸附分析法，(ELISAs)，免疫螢光分析，南方吸漬法，點-吸漬分析，凝膠電漿(如 SDS-PAGE)，RT-PCR，定量PCR，其他核酸或標的或訊號擴大方法，放射標記，液體閃爍計數，及親和力層析。

本發明的核酸組成物，雖然常在天然序列中(除了經修飾之限制位置及其他)，來自 cDNA，基因體或混合物可予以突變，依據標準技術可生成基因序列。至於編碼序列，這些突變可依所欲求影響胺基酸序列。特別地，也包括與天然 V，D，J，固定，轉換及此處所述之其他此種序列實質上同質或衍生之 DNA 序列(其中"衍生的"表示序列係相同的或修飾自另外的序列)。

核酸"操作連結"係當與另外的核酸序列置於功能相互關係下，例如，啟動子或加強子操作連結至編碼序列，此係當其若可影響序列之轉錄作用時。關於轉錄調控序列，操作連結表示所連結之 DNA 序列是連續的，且當必需連結二個蛋白質編碼區時，是連續的且在讀譯架構中。至於轉換

五、發明說明 (34)

序列，操作連結表示序列可達成轉換重組作用。

所謂"載體"指的是可運送另外的核酸至其所連接處之核酸分子。載體型式之一是"質體"，其指環狀雙股DNA環，在此中可連結額外的DNA片段。另一型載體是病毒載體，其中額外的DNA片段可連接至病毒基因體。某些載體可在其所引入之宿主細胞中自主地複製(如有複製源之細菌載體及游離體哺乳動物載體)。其他的載體(如非游離體哺乳動物載體)一旦引入宿主細胞中，可整合至宿主細胞之基因體中，且由是可沿著宿主基因體複製。再者，某些載體可指令與之操作連結之基因之表現。此載體在此指"重組體表現載體"(或簡化為"表現載體")。一般而言，利用於重組體DNA技術中之表現載體常呈質體型式。在本說明書中，"質體"及"載體"可互換使用，因質體是載體最常用型式。然而本發明包括表現載體其他型式，如病毒載體(如複製缺失性反轉錄病毒，腺病毒及與腺體有關之病毒)，其有相當的功能。

"重組體宿主細胞"(或簡化為"宿主細胞")指細胞，其中引入重組體表現載體。應了解此術語不僅指特殊之主題細胞，也指此細胞之子代。由於突變或環境影響，在相繼世代中可發生某些變化，此子代事實上可能與母細胞不同，但仍包括在此中所用之"宿主細胞"範圍之內。

"標幟"是可以分光光度計，光化學，生物化學，免疫化學，或化學方法偵測之組成物。如，有用的標幟包括 ^{32}P ，螢光染料，電子一稠密試劑，酵素(如常用於ELISA中)，生

五、發明說明 (35)

物素，異羥洋地黃苷元，或半抗體及蛋白質，於此可應用抗血清或單株抗體(如本發明之多肽可作為可偵測的，如將放射標幟納入肽內，並用來偵測可與肽特異地反應之抗體)。

"分類"在細胞之狀況下，如此中所用的指細胞之物理性分類，可利用如螢光活化之細胞分類機來完成，以及可依細胞表面標幟為據分析之，如在無分類下之FACS分析。

"免疫細胞反應"指免疫系統細胞對外在或內在刺激物(如抗原，細胞激素，化學激素及其他細胞)之反應，在免疫細胞中產生生化變化，其可造成標的細胞之殺拭，免疫細胞移動，吞噬作用，抗體的產生，免疫反應其他可溶性效應物，等。

"T淋巴細胞反應"及"T淋巴細胞活性"在此可互換使用，指依賴T淋巴細胞之免疫反應組份(即T淋巴細胞增殖及/或分化至輔助，胞毒性殺拭細胞，或遏止子T淋巴細胞，由輔助T淋巴細胞提供至B淋巴細胞之訊號可造成或預防抗體之產製，特異標的細胞為胞毒性T淋巴細胞之殺拭，及可溶性因子之釋出，如細胞激素其可調控其他免疫細胞之功能)。

"免疫反應"指淋巴細胞，抗原呈現細胞，吞噬細胞，顆性細胞及由上述細胞或肝產生之可溶性大分子(包括抗體，細胞激素，及補體)，其對入侵之病原體，為病原體感染之細胞或組織，癌細胞可造成選擇性損害，予以破壞，或自人體中消除，或在自體免疫力或病理性發光之例子中對象則是正常的人類細胞或組織。

五、發明說明 (36)

免疫反應的組份可於試管內以各種方法偵測，其為一般精藝者所熟知的。例如，(1)胞毒性T淋巴細胞可與具放射性之標的細胞共培育，且這些標的細胞之溶解可由放射性之釋出予以測及，(2)輔助T細胞可與抗原及抗原呈現細胞共培育，再以標準方法偵測細胞激素之合成及分泌(Windhagen, A. et al., 1995, Immunity 2: 373-80)，(3)抗原呈現細胞可與完全的蛋白質抗原共培育，且抗原在MHC上之呈現可由T淋巴細胞活化作用分析或生物物理方法偵測(Harding et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 4230-4)，(4)肥大細胞可與試劑共培育，其可交聯其Fc-epsilon受體，且組織胺之釋出可由酵素免疫分析法偵測(Siraganian, et al., 1983, TIPS 4: 432-437)。

類似地，在典型有機體(如老鼠)或人類患者中之免疫反應產物，也可利用精藝者熟知之各種方法偵測。如，(1)反應免疫接種之抗體產製，可以臨床實驗室常用之標準方法容易地偵測，如ELISA；(2)免疫細胞移動至發炎部位可由刮取皮膚表面，並置於無菌容器中以捕獲在刮取位置上移轉之細胞而予以偵測(Peters et al., 1988, Blood 72: 1310-5)；(3)周邊血液單核細胞反應有弱分裂原或混合的淋巴細胞反應之增殖作用，可利用³H-胸苷偵測；(4)在PBMCs中顆粒細胞，巨噬細胞及其他吞噬細胞之吞噬能力，可由將PBMCs置孔洞中再加上經標記的粒子，(Peters et al., 1988)；及(5)免疫系統細胞之分化可由以CD分子之抗體標記PBMCs(如CD4及CD8)，並偵測可表現這些標幟之PBMCs

五、發明說明 (37)

部份而測及。

如此中所用的，"訊號轉導路徑"或"訊號轉導事件"指至少一種生化反應，但較常是一系列生化反應，其始自細胞與刺激性化合物或作用物之交互作用。因此，刺激性化合物與細胞之交互作用可產生"訊號"，其經由訊號轉導路徑傳送，最終造成細胞反應，如上述之免疫反應。

訊號轉導路徑指各樣訊號轉導分子間之生化相互關係，其在訊號由細胞一部份傳送至另一部份中扮演角色。如此中所述的，"細胞表面受體"包括可接受訊號及傳送此訊號穿越細胞漿膜之分子及分子複合物。本發明的"細胞表面受體"實例是T細胞受體(TCR)或CTLA-4之B7配體。

細胞中訊號轉導作用路徑，可由細胞與在細胞內或外之刺激物交互作用而啟動。若外在(即在細胞外)刺激物(如MHC-抗體複合物，在抗原呈現細胞上)與細胞表面受體(如T細胞受體)交互作用，則訊號轉導路徑可穿越細胞膜傳送訊號，經過細胞之胞質，且在某些例子中是進入核內。若內在(如在細胞內)刺激物與細胞內訊號轉導分子交互作用，則訊號轉導路徑可造成訊號經由細質之傳送，且在某些例子是進入細胞核。

訊號轉導作用可經由下列發生：如分子之磷醯化作用；非共價的異位交互作用；分子之複合化；分子之構型變化；鈣之釋出；肌醇磷酸酯之產製；蛋白水解解離；環狀核苷酸之產製及二醯基甘油酯產製。典型而言，訊號轉導經由磷醯化訊號轉導分子而發生。

五、發明說明 (38)

"非特異的T細胞活化作用"指T細胞在無關其抗原特異性下之刺激作用。

總則

為了達成改進的人類κ輕鏈位點之穩定性，轉殖染色體技術組合以先前核原微量注射技術可產生轉殖的動物。人類κ輕鏈位點轉殖基因 KCo5 (Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-851; U.S. Patent No. 5,770,429)包括人類κ位點之實質部份，且可穩定地維持在老鼠種系中及在可表現衍自轉殖基因之人類κ鏈之B細胞及融合瘤細胞中。此轉殖基因混合以穩定的hCF(SC20)轉殖染色體，加上內源老鼠重及κ輕鏈位點之功能性失活作用突變作用，產生可表現廣大人類抗體曲目之動物，包括多重的人類重鏈同型。因此，相較於雙重-TC/KO老鼠，輕鏈轉殖基因經改進之穩定性(Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)可提供自各融合中大量融合瘤之回收。

本發明提出任何欲求的重鏈同型完全人類抗體之分離，包括IgA₁，IgA₂，IgD，IgE，IgG₁，IgG₂，IgG₃，IgG₄及IgM。特言之，可自單一轉殖的非人類哺乳動物中分離出對預定抗原具高親和力之許多的不同抗體。

本發明轉殖的非人類哺乳動物，較好是老鼠或其他齧齒類，也可利用貯置的物質產生。保有hCF(SC20)的雞隻DT40細胞，已在2001年5月9日於布達佩斯條約下貯置於 International Patent Organism Depository, National

五、發明說明 (39)

Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan。貯置號FERM BP-7583。細胞株命名為SC20。

保有hCF (SC20)之雞DT40細胞，已貯置於Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) in Taiwan，於1999年8月18日。貯置號CCRC 960099。細胞株命名為SC20(D)，在台灣。保持在雞DT40細胞中之hCF(SC20)可如WO 00/10383所述(EP 1106061)轉移至老鼠ES細胞內。簡言之，微細胞自雞DT-40細胞中產生，並與CHO細胞融合。之後留有hCF(SC20)之CHO細胞依G418抗性加以選擇。hCF(SC20)之滯留可以PCR或FISH分析證實，利用商品化之人類COT1 DNA或人類染色體14-特異探針。之後，微細胞自留存hCF(SC20)之CHO細胞中產生，並與老鼠ES細胞融合。保有hCF(SC20)之ES細胞可以和CHO細胞之相同方式選擇。

保有KCo5轉殖DNA之細胞貯存於美國標準菌種收集所(ATCC)，10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209在布達佩斯條約下，並於2001年11月8日註冊：17E1在酵母(YAC y17, Medarex KCo5)編號ATCC No. PTA-3842(遺傳物質是酵母人工染色體，含有人類免疫球蛋白κ可變區基因位點之嵌入子)pKV4於E. coli (Medarex KCo5)，命名為ATCC No. PTA-3843(質體含有人類免疫球蛋白可變區基因)；pKCIB於E. coli (Medarex KCo5)命名為

五、發明說明 (40)

ATCC No. PTA-3844(質體含有人類免疫球蛋白J κ 及 κ 固定區基因)。

其中DNAs之細胞，其中KCo5轉殖基因已貯置在台灣新竹食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute)，於2001年11月22日。pKV4，YACy17及pKCIB之貯置號分別為：CCRC 940383，CCRC 940384，及CCRC 940385。

轉殖基因KCo5可如先前所述地轉移至老鼠細胞內(Fishwild, D.同上，也見U.S. Patent No. 5,770,429之實例38；也見實例2下文)。

免疫球蛋白之一般特性

基礎抗體結構單位已知由亞單位的四聚體所組成。各四聚體由三個相同的多肽鏈對組成，各對有一個"輕"(約25 kDa)及一個"重"鏈(約50-70 kDa)。各鏈的胺基末端部份包括約100-110以上胺基酸之可變區，主要負責抗原之確認。各鏈之羧基末端部份定義一個固定區，主要負責效應物功能。

輕鏈可分類成 κ 或 λ 。重鏈分類成 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，且將抗體之同型定義為IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。在輕及重鏈內，可變及固定區以約12個以上的胺基酸之"J"區連結，重鏈也包括約1-10個以上胺基酸之"D"區。(大體上見，Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989)，Ch. 7(已針對所有目的以全文列為本案參考)。

各輕/重鏈對之可變區形成抗體結合位置。因此，完整的

五、發明說明 (41)

抗體有二個結合位置。除了雙產能或雙特異抗體，二個結合位置是相同的。鏈均呈現相當具保留性架構區(FR)之相同的一般結構，由三個超可變區所連結，也稱為互補性決定區或CDRs。來自各對二鏈之CDRs以架構區排列，使可與特異的表位結合。由N-末端至C-末端，輕及重鏈含有功能部位FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3及FR4。胺基酸對各功能部位之指定依Kabat之定義而行，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987及1991)或Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)。

天然人類免疫球蛋白位點

人類免疫球蛋白由三個不同的位點自然編碼：重鏈、 κ 輕鏈及 λ 輕鏈。這些天然位點分別位在染色體14、2及22號上。天然的人類重鏈位點，位在14q32.3，近人類14號染色體長臂之端粒，延伸超過約1.3百萬鹼基且編碼約45個經表現之V基因段，27 D基因庫，6J基因段及9固定(C)區基因段。天然的人類 κ 輕鏈位點，位在2號染色體之2p11.12，延伸長約1.8百萬鹼基，且含有約34個經表現之V基因段，5J基因段，及單一C區基因段。天然的人類 λ 位點，位在22q11.2，延伸約0.9百萬鹼基且編碼約30 V基因段，及4個官能性J-C對，各含有一個單一的J基因段及一個單一的C基因段。這些天然的位點各自也可含有刪除，嵌入及單一核苷酸聚合化作用。

五、發明說明 (42)

以融合瘤融合產製單株抗體

單株抗體之產製可利用下列方式完成，如以抗原(如人類蛋白質抗原，如CD4、G-CSF、HSA、EGFR或CTLA-4，病原體編碼的抗原、毒素，或其他抗原)免疫接種動物。也可使用較長的多肽，包括抗原或抗原之免疫原片段或相對於抗體或抗原之抗遺傳性型抗體。也見Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP New York, NY 1988)及Mishell and Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, (W.H. Freeman and Co. New York, NY 1980)(二個參考文獻均以所有目的納為本案參考)。此免疫原可來自天然來源，經由肽合成或重組體表現。視所需地，免疫原可在載劑蛋白質之黏附或複合下投予，如下述。視所需地，免疫原可與佐劑一起投予。如下述可使用許多型式之佐劑。完全的Freund's佐劑繼以不完全佐劑，為免疫接種實驗室動物較佳的。兔子或天竺鼠通常用來製作多株抗體。齧齒類(如老鼠、大鼠及倉鼠)通常用來製成單株抗體。這些老鼠可以是轉殖的，且可含有人類免疫球蛋白基因序列，如下述。在免疫接種之後，經免疫的動物可對所引入之免疫原發展出血清反應。此血清反應可由所收集血清利用各種不同分析法定效價而測出。常用的分析法實例是ELISA。血清反應之幅度通指效價。例如，1,000的效價顯示相對抗體之存在可以血清1000倍稀釋之分析來偵測。典型而言，免疫接種可造成血清反應數倍幅度大於未免疫接種老鼠中所見的。僅一或二倍幅度之血清反應被視為是弱

五、發明說明 (43)

的，且通常顯示可表現抗原反應性抗體之數個B細胞之存在。單株抗體一般獲得是將淋巴細胞與不朽化細胞(如骨髓瘤細胞)融合以形成融合細胞，稱之為合瘤細胞。新形成之融合瘤細胞由其親代淋巴細胞中衍生抗體表現特性，而生長特性則來自親代不朽化細胞。新形成的融合瘤細胞生長在含有培養基之培養皿中(如96孔洞之盤)。測試(通常是在融合後一及二週間)培養物上清液中欲求的重及輕鏈同型之抗原反應性抗體之存在。在一次培養物中之細胞再予以稀釋，並再塗佈，以分離出可分泌單一種單株抗體之融合瘤細胞個別純系。此二次培養物可進一步繼代選殖以得三次培養物，及以此類推。經由此繼代選殖過程，可用來獲得融合瘤純系之抗原反應性一級培養物之部份，可對繼代選殖之效力提供偵測。若所有的抗原陽性一級融合瘤培養物可用來衍生經選殖之細胞株，則繼代選殖效力是100%。若編碼經表現抗體之免疫球蛋白位點是不穩定的，即在細胞分裂中易喪失一或經由染色體，染色體片段，或轉殖染色體之喪失，或經由所嵌入排列之刪除性重組作用，或經由其他某些機製一則繼代選殖效力可減低(即，少於100%)。有一平台可供遞送單株抗體是特別有用的，其中繼代選殖效率是高的(如大於20%，較好大於50%，又較好大於80%，最好大於90%或95%)。篩選可與抗原特異結合之抗體。視所需地，篩選可與抗原特異區域結合之抗體。至於蛋白質抗原，後者篩選法可由決定抗體與抗原肽刪除突變子集合之結合，再決定哪一刪除突變子可與抗體結合。結合之

五、發明說明 (44)

評估可利用如西方墨點法或ELISA。與抗體有特異結合之最小片段可明定出抗體之表位。然而，某些表位含有非連續的結構元件，將元件刪除在確實表位之外其可喪失。另外，表位特異性可由競爭分析法決定，此是一種試驗及參考抗體與抗原競爭結合之試驗。若試驗及參考抗體競爭，則其可與相同表位結合，或表位十分接近以致一抗體之結合會干擾另一者之結合。

自B細胞融合瘤中選殖編碼抗體之核酸

編碼重及輕鏈至少可變區之核酸，可自經免疫的或原始的轉殖動物中選殖。核酸可呈基因體或cDNA型式自此動物之淋巴細胞中選殖。免疫球蛋白序列之選殖在事前勿需行此細胞之不朽化作用。通常以寡-dT引子之反轉錄作用來分離及擴大mRNA。cDNA再利用人類免疫球蛋白保留區之引子予以擴大。針對非- μ 同型，基因庫可很容易地加豐，在此利用的是非- μ 序列特異的3'引子(如IgG或IgA)。典型而言，輕鏈經擴大的族群含有至少100、1000、10,000、100,000或1,000,000個不同的輕鏈。另外，重鏈經擴大的族群含有至少100、1000、10,000、100,000或1,000,000個不同的重鏈。例如，利用IgG引子，通常經擴大的重鏈中有至少90、95或99%是IgG同型。編碼至少是重及輕鏈可變區之核酸，也可自上述之融合瘤中選殖，利用各種熟知之方法如PCR或利用與人類抗體保留區特異之DNA探針來篩選cDNA庫。編碼欲被繼代選殖之抗體鏈之核酸，可由鄰接序列之限制水解切出，或可利用與編碼序列鄰接位置之引子行PCR

五、發明說明 (45)

而擴大之。大體上可見以下參考書目關於PCR Technology ; Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H.A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992); PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, CA, 1990); Mattila, et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19:967; Eckert, et al., 1991, PCR Methods and Applications 1: 17; PCR (eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford)。這些參考文獻及此中所示者以全目的納入本案中為參考。

抗體之重組表現

編碼輕及重鏈可變區之核酸，操作鏈結至固定區，可嵌入表現載體內。輕及重鏈可選殖至相同或不同的表現載體內。編碼抗體鏈之DNA片段可操作鏈結至表現載體中之控制序列，以確保抗體鏈之表現。此控制序列包括訊號序列，啟動子，加強子，及轉錄終結序列。表現載體通常以游離體或宿主染色體之完整部份在宿主有機體中複製。

E. coli是一種原核細胞宿主，特別可用於本發明抗體之表現。其他適用的微生物宿主包括桿菌如枯草桿菌及其他腸菌屬如沙門氏菌、老賀氏菌及各種假單胞菌屬。在這些原核細胞宿主中，吾等也可製備表現載體，其通常含有與宿主細胞可相容的表現控制序列(如複製源)及調控序列如乳糖啟動子系統，色胺酸(trp)啟動子系統， β -內醯胺酶啟動子系統，或來自噬菌體入之啟動子系統。

其他微生物，如酵母，也可用於表現。釀酒酵母是較佳

五、發明說明 (46)

之宿主，有表現控制序列之適合載體，如啟動子，包括了一磷酸甘油酸激酶或其他糖解酶，及複製源，終結序列等依所欲求的。

哺乳動物組織細胞培養物，也可用來表現及產生本發明之抗體（見 Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, N.Y., 1987)。以真核細胞為較佳，因為已發展出許多可分泌完整抗體之適合的宿主細胞株。可表現編碼本發明免疫球蛋白之核酸之較佳適合的宿主細胞包括：猴腎 CV1 株為 SV40 所轉形 (COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎株 (293) (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36: 59)；幼倉鼠腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵細胞-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4216)；老鼠支持細胞 (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23: 243-251)；猴腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL 1587)；人類子宮頸腫瘤細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞 (W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞 (Hep G2, HB 8065)；老鼠乳房腫瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)；及 TRI 細胞 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-46)；杆病毒細胞。

含有重點聚核苷酸序列之載體（如重及輕鏈編碼序列及表現控制序列）可轉移至宿主細胞。氯化鈣轉感作用常用於原核細胞，而磷酸鈣處理或電泳脈動可用於其他細胞宿主

五、發明說明 (47)

。(大體上見 Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)(以全文基於所有目的納入參考)。當重及輕鏈選殖在不同的表現載體上，載體可共轉感以得完整免疫球蛋白之表現及組合。於重組體DNA引入後，表現免疫球蛋白產物之細胞株為所選擇之細胞。以可穩定表現之細胞株為較佳(即，細胞株經50代傳代後表現未減低)。

一旦表現，全部抗體，其二聚體，個別的輕及重鏈，或其他免疫球蛋白型式，可依技藝中之標準步驟純化，包括硫酸銨沈酸，親和力管柱，管柱層析，凝膠電泳等(大體上見 Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)。以至少約90-95%均質性之實質上純的免疫球蛋白為較佳，且以98-99%以上均質性為最佳。

嵌合的及人類化抗體

嵌合的及人類化抗體具有相同或類似的結合特異性及親和力，如同老鼠或其他非人類抗體般，可作為構築嵌合或人類化抗體的起始物質。嵌合型抗體其輕及重鏈基因之構築通常是利用遺傳工程，來自屬於不同種屬之免疫球蛋白基因片段。例如，來自老鼠單株抗體之基因可變(V)片段可連接至人類固定(C)片段，例如IgG₁及IgG₄。以人類同型IgG₁，為較佳。典型的嵌合抗體因此是由來自老鼠抗體之V或抗原-結合功能部位及來自人類抗體之C或效應物功能部位所組成的。

人類化抗體具有實質上來自人類抗體之可變區架構殘基

五、發明說明 (48)

(稱為接受體抗體)及實質上來自老鼠-抗體之互補性決定區(稱為供予體免疫球蛋白)。見Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033及WO 90/07861, U.S. 5,693,762, U.S. 5,693,761, U.S. 5,585,089, U.S. 5,530,101及Winter, U.S. 5,225,539(以所有目的全文列為本案參考)。

。若存在有固定區，也是實質上或完全來自人類免疫球蛋白。人類可變區功能部位通常選自人類抗體，其架構序列與CDRs衍生出處之鼠類可變區功能部位呈現高度的序列同質性。重及輕鏈可變區架構殘基可衍生自相同或不同的人類抗體序列。人類抗體序列可為自然生成的人類抗體序列，或可為許多人類抗體之固有序列。見Carter et al., WO 92/22653。針對置換作用自人類可變區架構殘基中選擇之某些胺基酸係根據其在CDR構型上及/或與抗原之結合上可能之影響力為主。此種可能的影響，其檢視可由模塑，檢查在特定所在之胺基酸特性，或特殊胺基酸在置換或突變影響上靠實驗觀察而得。

例如，當鼠類可變區架構殘基及所選定之人類可變區架構殘基間有胺基酸差異時，人類架構胺基酸通常應可為來自老鼠抗體之相當架構胺基酸所置換，此當其合理地預期該胺基酸時：

- (1) 直接地非共價結合抗原，
- (2) 鄰接至CDR區，
- (3) 另外與CDR區交互作用(如在CDR區約6 Å之內)，或者
- (4) 參與在VL-VH界面。

五、發明說明 (49)

其他供置換之候選者為接受體人類架構胺基酸，其對於該位置處之人類免疫球蛋白而言是非尋常的。這些胺基酸可為老鼠供予體抗體相當位置之胺基酸或較典型人類免疫球蛋白相當位置之胺基酸所置換。其他的置換候選者為接受體人類架構胺基酸，此對於該位置之人類免疫球蛋白而非是非尋常的。人類化免疫球蛋白之可變區架構與人類可變區架構序列序列有至少85%序列同質性。

人類抗體

直接拮抗特異抗原之人類抗體，可以下述各種技術提供。某些人類抗體之選擇是經由競爭性結合實驗，或者是如特定老鼠抗體般有相同的表位特異性，如實例中所述之老鼠單株抗體之一。人類抗體也可利用僅抗原片段為免疫原針對特定表位特異性而篩選，及/或在蛋白質抗原例子中，針對抗原刪除突變子之集合篩選抗體。

三聚瘤抗體

可用於此途徑之基本方式及供示範之細胞融合配對，SPAZ-4，述於Oestberg et al., 1983, Hybridoma 2: 361-367；Oestberg, U.S. Patent No. 4,634,664；及Engleman et al., U.S. Patent 4,634,666(其各自基於所有目的以全文列為本案參考)。以此方法所得之可產製抗體之細胞株稱為三聚瘤，因為其係得自三種細胞-二種人類及一種老鼠。最初，老鼠骨髓瘤株與人類B-淋巴細胞融合以得到非抗體-產製之異種的融合細胞，如SPAZ-4細胞株，如Oestberg上文所述。異種細胞再與經免疫的人類B-淋巴細胞融合以得到產製

五、發明說明 (50)

抗體之三聚瘤細胞株。頃發現三聚瘤產生的抗體較由人類細胞製成之尋常融合瘤更為穩定。

雖然三聚瘤在遺傳上是穩定的，但其無法以極高水平產生抗體。欲增加表現水平可將抗體基因自三聚瘤選殖至一個以上的表現載體，再將載體轉形至標準的哺乳動物，細菌或酵母細胞株內。

轉殖的非-人類哺乳動物

拮抗各種抗原之人類抗體，也可產自含有人類免疫球蛋白位點之非-人類轉殖哺乳動物。典型而言這些免疫球蛋白位點可編碼實質的人類序列抗體，較好與人類序列有95%以上之同質性，又較好98-99%以上，且最好100%同質性。免疫球蛋白位點可重排或未重排，且和天然的人類免疫球蛋白位點比較下可含有刪除或嵌入。位點中可包括來自其他種類之遺傳元件(如非-編碼元件，如加強子、啟動子、及開關序列，或編碼元件如mu固定區基因片段)，及來自非免疫球蛋白位點，其不致實質地貢獻至二次曲目(非IgM)抗體之編碼部份。可進行DNA序列改變之較佳的人類免疫球蛋白位點包括V(D)J聯結，重鏈類型切換，及在非人類轉殖哺乳動物中淋巴樣細胞及/或淋巴樣細胞前軀體之體突變作用，以產生相對於預定抗原之高親和力人類抗體。含於這些轉殖哺乳動物中之人類免疫球蛋白位點，較好含有天然人類重及人類輕鏈位點之未重排序列。通常，此轉殖哺乳動物之內源免疫球蛋白位點在功能上是無活化的(U. S. Patent No. 5,589,369; Takeda, S. et al., 1993, EMBO J.

五、發明說明 (51)

12 : 2329-2366 ; Jakobovits, A., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 : 2551-2555 ; Kitamura, D. and Rajewsky, K., 1992, Nature 356 : 154-156 ; Gu, H. et al., 1991, Cell 65 : 47-54 ; Chen, J. et al., EMBO J. 12 : 821-830 ; Sun, W. et al., 1994, J. Immunol 152 : 695-704 ; Chen, J. et al., 1993, Intl. Immunology 5 : 647-656 ; Zou, X. et al., 1995, Eur. J. Immunol 25 : 2154-2162 ; Chen, J. et al., 1993, Intl. Immunology 5 : 647-656 ; Boudinot, P., et al, 1995, Eur. J. Immunol. 25 : 2499-2505 ; Chen, J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90 : 4528-4532 ; Roes, J. and Rajewsky, K., 1991, Intl. Immunology 3 : 1367-1371 ; Gu, H. et al., 1993, Cell 73 : 1155-1164 ; Taki, S. et al., 1993, Science 262 : 1268-71 ; Kitamura, D. et al., 1991, Nature 350 : 423-6 ; Lutz, C. et al., 1998, Nature 393 : 797-801 ; Zou, Y. et al., 1994, Current Biology 4 : 1099-1103 ; Chen, J. et al., 1993, EMBO J. 12 : 4635-4645 ; Serwe, M. and Sablitzky, F., 1993, EMBO J. 12 : 2321-2327 ; Sanchez, P. et al., 1994, Intl. Immunology 6 : 711-719 ; Zou, Y. et al., 1993, EMBO J. 12 : 811-820)

。內源免疫球蛋白基因之失活作用較好可經由對準標的之同質重組作用來完成。外源人類免疫球蛋白位點可結合以內源的老鼠染色體，或可為所引入之轉殖染色體(如其部份，嵌入其內或與之黏附)。轉殖染色體可以非內源的染色體或有著絲點及二個端粒之染色體片段型式引入細胞內。這些轉殖染色體常含有端粒及著絲點序列，且和親代完整的

五、發明說明 (52)

染色體比較下可含有刪除作用。轉殖染色體也可含有額外的嵌入序列。例如，二個人類免疫球蛋白位點可混合至單一轉殖染色體內，係將第一免疫球蛋白位點序列(如來自YAC純系，轉殖染色體或完整的染色體)引入含有第二免疫球蛋白位點之轉殖染色體內。此過程也可重覆以將三個人類免疫球蛋白位點均混合至單一轉殖染色體內。含有二個或三個不同免疫球蛋白位點之單一轉殖染色體可提供這些位點之遺傳關聯，其可增加轉殖子代部份以應用於製備人類抗體。轉殖染色體較佳型式，詳述於Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727, Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-143, and WO 97/07671, WO 98/37757及WO 00/10383，其各自基於所有目的以全文列為本案參考。轉殖染色體也包括嵌入之可篩選標幟(如新黴素抗性基因)及其他未見於親代完整染色體之其他序列。在轉殖染色體及內源老鼠染色體間重組作用中，來自轉殖染色體之序列嵌入或加至內源老鼠染色體內。轉殖染色體可以刪除，轉位，置換等方式修飾，如WO 98/37757，EP 0972445及WO 00/10383中所述，以上針對所有目的已全文列為本案參考。例如，轉殖染色體可在引入老鼠胚胎幹(ES)細胞之過程中自主地成片段，經由端粒-指令之截斷成片段及/或由Cre/loxP位置-特異之重組作用而轉位，或類似方法。此重組或轉位事件可由特異嵌入之重組作用位置而促進(如loxP序列及其他；如見：Abuin, A. and Bradley, A., 1996, Mol. Cell. Biol. 16: 1851-1856；Mitani,

五、發明說明 (53)

K. et al., 1995, Somat. Cell. Mol. Genet. 21 : 221-231 ; Li, Z. W. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 : 6158-6162 ; Smith, A.J. et al., 1995, Nat. Genet. 9 : 376-385 ; Trinh, K R. and Morrison, S. L., 2000, J. Immunol. Methods 244 : 185-193 ; Sunaga, S. et al., 1997, Mol. Reprod. Dev. 46:109-113; Dymecki, S. M. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 : 6191-6196 ; Zou, YR. et al., 1994, Curr. Biol. 4 : 1099-1103 ; Rudolph, U. et al., 1993, Transgenic Res. 2 : 345-355 ; Rickert, R. C. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25 : 1317-1318)。在引入loxP位置之例子中，編碼cre重組酶之轉殖基因之表現可促進二個loxP位置間之重組作用。轉殖染色體也可因上述之轉位結果，為由不同染色體片段所組成之融合染色體。自主之轉殖染色體與內源的老鼠染色體不同，且與之非連續，並且不嵌入其中。這些自主的轉殖染色體含有端粒及著弱點序列，使自主複製變得可行。另外，轉殖染色體序列在引入老鼠細胞核之後可轉位至老鼠染色體內。內源的老鼠染色體包括19個常染色體對及X及Y染色體。

外源人類免疫球蛋白位點之引入可以各種方法來達成，包括如半天大胚胎原核之微量注射，胚胎幹細胞之轉感作用，或胚胎幹細胞與酵母原生質球狀體或含有轉殖染色體之微核之融合。由上述方法所生成之轉殖的哺乳動物，可功能上重排所引入之外源免疫球蛋白組份序列，並表現由人類免疫球蛋白基因所編碼之各種同型抗體之曲目，但不

五、發明說明 (54)

表現內源的免疫球蛋白基因。具有這些特性之哺乳動物，其產製及特性詳述於如：Lonberg et al., WO 93/12227 (1993)；U.S. Patent Nos. 5,877,397, 5,874,299, 5,814,318, 5,789,650, 5,770,429, 5,661,016, 5,633,425, 5,625,126, 5,569,825, 5,545,806, Nature 48: 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991), WO 94/02602 (1993), WO 96/34096 (1995), WO 96/33735 (1996), WO 98/24893 (1997), U.S. Patent Nos. 5,939,598, 6,075,181, 6,114,598, Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727, Tomizuka, K. et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-143, 及 Tomizuka, K., WO 97/07671, WO 98/37757, WO 00/10383 及 JP 2000-42074(其各自基於所有目的以全文列為本案參考)。以轉殖的非人類哺乳動物，如齧齒類為特佳。單株抗體之製備可將來自此哺乳動物之B-細胞與適合的不朽細胞株利用傳統的Kohler-Milstein技術融合而成。單株抗體也可直接得自個別的B細胞，分離自培養基，利用V區之PCR擴大作用(Schrader et al., 1997, U.S. Patent No. 5,627,052)。另外，FACs分類，或加豐的B細胞製劑可充作RNA或DNA來源，用於V區序列之PCR擴大作用中。也可使用噬菌體呈現方法，以自含有人類免疫球蛋白位點之經免疫轉殖老鼠中獲得抗體序列。由這些方法所之人類抗體V區序列，可再用來產生完整的抗體，其保有原先親代抗體之結合特性。此過程述於下。

五、發明說明 (55)

噬菌體呈現方法

取得人類抗體的進一步方式是依 Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281 所列之一般方法自 B 細胞中篩選 cDNA 庫。此 B 細胞可得自以欲求抗原，片段，含有抗原或片段或抗-遺傳性型抗體之較長多肽所免疫接種之人類。視所需，此 B 細胞得自未曝於抗原下之個體。B 細胞也可得自可表現人類免疫球蛋白序列之轉殖的非人類動物。轉殖的非-人類動物可以抗原或抗原集合所免疫接種。動物也可未被免疫。編碼人類抗體之 B 細胞 mRNA 序列，可利用反轉錄酶來產生 cDNA。cDNA 序列之 V 區編碼片段再選殖至 DNA 載體，其可指令抗體 V 區之表現。典型而言，在選殖前 V 區序列可以 PCR 特異地擴大。同時，V 區序列可選殖至 DNA 載體內，如此其一旦構築 V 區可呈融合蛋白質狀表現。此融合蛋白質之實例包括 m13 大腸桿菌噬菌體基因 3 及基因 8 融合蛋白質。經選殖之 V 區序列之集合再用來產生抗體 V 區之表現庫。為產生表現庫，含有經選殖 V 區序列之 DNA 載體可用來轉形真核或原核宿主細胞。除了 V 區外，載體可視所需編碼所有的或部份的病毒基因體，且可含有病毒包裝序列。在某些例子中，載體不含有完整的病毒基因體，且載體可再與輔助病毒或輔助病毒 DNA 序列合用。經表現之抗體 V 區可見於經轉形細胞或來自經轉形細胞之病毒粒子或見於其表面。此表現庫，含有細胞或病毒粒子，可再用來鑑定編碼抗體之 V 區序列，或可與預定抗原反應之抗體片段。為了鑑定這些 V 區序列，再針對經表現 V 區與預定抗

五、發明說明 (56)

原反應性加以篩選或選擇表現庫。含有經選殖V區序列，且有經表現V區之細胞或病毒粒子，利用鑑定或加豐與預定抗原之V區具反應性(如結合或催化活性)之細胞或病毒粒子之方法予以篩選或選擇。例如，可與經表現V區結合之具放射活性或螢光標記之抗原可予以偵測並用來鑑定或分出細胞或病毒粒子。結合至固體基質或珠粒上之抗原，也可用來選擇在表面具有反應性V區之細胞或病毒粒子。因此自表現庫中鑑定之V區序列可再用於經轉形宿主細胞中，指令與預定抗原具反應性之抗體或片段之表現。由Huse所述之策略再混合以噬菌體-呈現技術將變得更有效率。如見Dower et al., WO 91/17271及McCafferty et al., WO 92/01047, U.S. Patent Nos. 5,871,907, 5,858,657, 5,837,242, 5,733,743及5,565,332(其各自以所有目的已列為本案參考)。在這些方法中，噬菌體庫產生，其中各成員(呈現包裝)在其外表面呈現不同的抗體。抗體通常以Fv或Fab片段呈現。具欲求特異性之噬菌體呈現抗體，其選擇可利用親和力加豐至抗原或其片段而成。噬菌體呈現混合以可表現人類免疫球蛋白基因之經免疫的轉殖非人類動物，即使對抗原之免疫反應很弱，也可得到抗原特異的抗體。

在噬菌體-呈現方法之變化中，可產生與所選定之鼠類抗體具結合特異性之人類抗體。如見Winter, WO 92/20791。在此方法中，以所選定之鼠抗體重或輕鏈任一者可變區為起始物。若選用輕鏈可變區為起始物，所構築的噬菌體庫其中成員可呈現相同的輕鏈可變區(即鼠類起始物)及不

五、發明說明 (57)

同的重鏈可變區。重鏈可變區得自重排的人類重鏈可變區庫。選用對CTL-4具強烈特異性結合之噬菌體(如至少 10^8 且較好至少 $10^9 M^{-1}$)。再以來自此噬菌體之人類重鏈可變區為起始物質，構築進一步的噬菌體庫。在此庫中，各噬菌體呈現相同的重鏈可變區(即鑑定自第一呈現庫之區域)及不同的輕鏈可變區。輕鏈可變區得自重排的人類可變輕鏈區庫。同樣地，選出對所選擇者具強烈特異結合之噬菌體。和人類抗體類似之人工抗體可得自噬菌體呈現庫，其中在CDR區中納有任意的或合成的序列。

固定區之選擇

嵌合的，人類化的，或人類抗體之重及輕鏈可變區，可以各種熟知方法連結至至少部份的人類固定區(如見，Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033及WO 90/07861；這些參考及此中所示已以完全目的列為本案參考)。固定區之選擇部份依所欲求的到底是抗體-依賴的補體及/或細胞調介之毒性。例如，同型IgG₁，及IgG₃通常有較同型IgG₂或IgG₄較多的補體結合活性。同型之選擇也會影響抗體至腦之通路。輕鏈固定區可為 λ 或 κ 。抗體之表現可呈四聚體含有二個輕及二個重鏈，呈分別之重鏈，輕鏈，呈Fab，Fab'，F(ab')₂及Fv或呈單鏈抗體，其中重及輕鏈可變功能部位經由空間子連接。

於某些應用中，非IgG抗體可以是有用的。如，當欲求多價抗體複合物時，可使用IgM及IgA抗體。

五、發明說明 (58)

使用部份抗體序列以表現完整的抗體

與標的抗原交互作用之抗體，主要經由位在六個重及輕鏈互補決定區(CDR's)中之胺基酸殘基。基於此理由，在CDR's內之胺基酸殘基在個別抗體間之多樣性，更甚於CDR's外之序列。因為CDR序列負責大多數抗體-抗原交互作用，因此有可能可表現模擬特異地自然生成抗體之特性之重組體抗體，即構築表現載體，其CDR序列來自特異自然生成抗體並接枝至有不同特性且來自不同抗體之架構序列上(如見Riechmann, L. et al., 1988, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; 及 Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033)。此架構序列可得自公開之DNA資料庫，其中包括胚源細胞抗體基因序列。這些胚源細胞序列和成熟的抗體基因序列不同，因為其不包括完全組合之可變基因，其係在B細胞成熟中由V(D)J連結而形成。胚源細胞基因序列和高親和力二次曲目抗體序列在個別核苷酸上也有異，因為體突變之故。然而，體突變在整個可變區中並不均勻分佈。例如，體突變在架構1區之胺基末端部份及在架構4區羧基末端部份相當罕見。再者，許多體突變並不會顯著地改變抗體之結合特性。基於此理由，為了再生成與原先抗體具類似結合特性之完整的重組體抗體，必需取得特定抗體之完整DNA序列。(見PCT/US99/05535公告於1999年3月12日，其已全文列為本案參考)。占據CDR區之部份重及輕鏈序列，通常足供此目的。部份序列可用來決定是哪一

五、發明說明(59)

個胚源細胞可變及連結基因片段會造成重組之抗體可變基因。胚源細胞序列可再用來填滿可變區之遺漏部份。重及輕鏈領導子序列在蛋白質成熟中會解離，且對最終抗體特性不影響。基於此目的在表現構體上勿需使用相當的胚源細胞領導子序列。為加入遺漏序列，經選殖的cDNA序列可以連結或PCR擴大作用混合以合成的寡核苷酸。另外，完整的可變區可呈短的，重疊的寡核苷酸組型式合成，並以PCR擴大作用混合以生成完全合成之可變區純系。此過程有某些優點，如消去或納入特殊的限制位置，或使特殊密碼子更臻完善。

重及輕鏈轉錄子來自融合瘤之核苷酸序列，可用來設計合成寡核苷酸之重疊組，以生成與天然序列有相同的胺基酸編碼能力之合成的V序列。合成的重及κ輕鏈序列以三種方式異於天然序列：重覆核苷酸鹼基之長列被中斷，以助寡核苷酸合成及PCR擴大作用；依Kozak'法則納入最適宜之轉譯起始位置(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266 : 19867-19870)；及HindIII位置經遺傳操作在轉譯起始位置之上游。

關於重及輕鏈可變區，最適宜的編碼及相當的非編碼，股序列打破成30-50個核苷酸片段，如此編碼股序列核苷酸間之切口發生在相當的非編碼寡核苷酸之約中點處。因此，對各鏈而言，寡核苷酸可組合成重疊的雙股組，其完全占據欲求的序列。這些寡核苷酸混合成滙集，其中占據150-400個核苷酸片段。滙集物再充作模板以產生150-400

五、發明說明(60)

個核苷酸之PCR擴大產物。典型而言，單一可變區寡核苷酸組可打破成二個滙集，其分別地擴大以產生二個重疊的PCR產物。這些重疊產物再以PCR擴大作用混合以形成完全的可變區。在PCR擴大作用中也可納入重或輕鏈固定區之重疊片段(包括 κ 輕鏈之BbsI位置，或若是 γ 重鏈時之AgeI位置)，以產生可容易地選殖至表現載體構體之片段。

再構築之重及輕鏈可變區再混合以經選殖之啟動子，轉譯啟動作用，固定區，3'未轉譯，聚腺苷化作用，及轉錄終結等序列以形成表現載體構體。重及輕鏈表現構體可混合至單一載體內，共轉感，連續轉感，或分別轉感至宿主細胞，其再融合以形成宿主細胞以表現二鏈。

可用於構築表現載體以應用於人類IgG κ 之質體述於下文。構築質體，如此經PCR擴大之V重及V κ 輕鏈cDNA序列可用來構築完全的重及輕鏈迷你基因。這些質體可用來完全表現人類，或嵌合的IgG $_1\kappa$ 或IgG $_4\kappa$ 抗體。可構築類似的質體以表現其他的重鏈同型，或如含有 λ 輕鏈之抗體。

κ 輕鏈質體，pCK7-96 (SEQ ID NO: 1)示於下，包括 κ 固定區及聚腺苷化作用位置，如此 κ 序列以5'引子擴大其中包括HindIII位置在啟動子甲硫胺酸之上游，可以HindIII及BbsI水解，並選殖至經HindIII及BbsI水解之pCK7-96內以構築完全的輕鏈編碼序列，加上聚腺苷化作用位置。此匣可以HindIII/NotI片段般分離，並連接至轉錄啟動子序列以生成可轉感至細胞之功能性迷氣基因。

γ 1重鏈質體，pCG7-96(SEQ ID NO: 2)，包括人類 γ 固定

五、發明說明 (61)

區及聚腺苷化作用位置，如此 γ 序列可為5'引子所擴大，其中包括HindIII位置在啟動子甲硫胺酸之上游，可以HindIII及AgeI水解，並選殖至pCG7-96中(經HindIII及AgeI水解)以構築完全的 γ 重鏈編碼序列加上聚腺苷化作用位置。此匣可以HindIII/SalI片段般分離以連接至轉錄啟動子序列，生成可供轉感至細胞之功能性迷你基因。

γ 4重鏈質體，pG4HE (SEQ ID NO: 3)，包括人類 γ 4固定區及聚腺苷化作用位置，如此 γ 序列以5'引子擴大其中包括HindIII位置在啟動子甲硫胺酸上游，可以HindIII及AgeI水解，並選殖至以HindIII及AgeI水解之pG4HE內，以再構築完全的 γ 4重鏈編碼序列加上聚腺苷化作用位置。此匣可以HindIII/EcoRI片段分離，並連接至轉錄啟動子序列，以生成功能性迷你基因以轉感至細胞內。

可使用許多不同的啟動子(包括CMV、冷素、SR α 及 β -肌動蛋白)來表現再構築之重及輕鏈基因。例如，載體pCDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA)可以HindIII及或NotI、XhoI或EcoRI解離，與 κ 、 γ 1或 γ 4匣(上述)任一者連接，形成表現載體可直接轉感至哺乳動物細胞內。

pCK7-96 (SEQ ID NO: 1)

五、發明說明 (62)

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

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGCTT
TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTA
TCACGAGGCCCTTTCTGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG
CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGG
CGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTG
TACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGC
ATCAGGCGCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTC
TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGC
CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAAGCTAGCGGCCGCGGTC
CAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAGCCTGTTATCCAGCACAGTCTTGAAGAG
GCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGGCTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTC
AGACCTGTTCTGAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAG
CATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTC
CAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACAT
CAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTT
TCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTT
GTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATGTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA

五、發明說明 (63)

ATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGC
CCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCCTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTTC
CACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCTCCTCCT
CCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCT
GTGGTTTCTCTCTTTTCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTT
TCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTATATAAAATCATCCT
TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCT
GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCGTAATC
ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGC

[151] pCG7-96 (SEQ ID NO:2)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGA
GGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGAC
ACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCT
CTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCTCCACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCCGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGTCTGG
AAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGC
AAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGA
GAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAG
GCCCTGCACACAAAGGGGAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGAC
CCTGCCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCT
TCTCTCCTCCAGATTCCAGTAAGTCCCAATCTTCTCTCTGCAAGAGCCCAAATCTTGTGACA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAAGCCAGGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGG
CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGT
CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGGA
CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCTC
ACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAG
GGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCCACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAAC
CTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
AGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTC
TCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCAGCAT
GGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGG
TCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACA

五、發明說明 (64)

CTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCC
TCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGG
CCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTG
TCCTGTTCTGTGAGCGCCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAG
GTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGG
TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
CGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTTCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCC
ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGA
AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG
TCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAG
CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG
TCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTCACCGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA
TAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGT
TTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT
GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTG
GGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATA
TTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAG
GTGACACTATA

[152] pG4HE (SEQ ID NO:3)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAG
GGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAAATGCCCATGAGCCCAGACA
CTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCAGGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCC
AGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTTGCAAGCTTCCACCAAGGGCCCA

五、發明說明 (65)

TCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
 GCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
 GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
 CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG
 CTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGG
 CAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCCTTGACCACCCCACTCATGTCA
 GGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTAC
 CCCAGGCCCTGCGCATAACAGGGGAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGG
 AGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGA
 CACCTTCTCTCCTCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGG
 TCCCCCATGCCCCATCATGCCCAGGTAAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGG
 ACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCAC
 CTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA
 AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
 CCGTCTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCGAGGGCC
 ACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCCCACCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCT
 GTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGG
 GAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGG
 GGTCGCGCAGGATGCTTGGCACGTACCCCGTCTACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAA
 ATAAAGCACCCACCACTGCCCTGGGCCCCCTGTGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAG
 GCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGACATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCCTGTCCCCACACTGG
 CCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCACCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGG
 CAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGCTGCCCTGGGCTGGGCCAC
 GGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCCTGCCCTCTGTAGGAGACTGTCTT
 GTCCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCCCCCATGCCCACTCGGGGGGATCCCCGGGTACCGA
 GCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTG
 ATAAGCCAGGTAACTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGTTTGCAT
 TGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAG
 CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
 AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGC
 GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
 GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
 TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
 GCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC
 TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
 TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
 ACCTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAA
 GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT
 CTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC

五、發明說明 (66)

TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
 TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTT
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG
 CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGT
 TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGC
 TTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
 AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA
 CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
 CTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC
 ATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC
 GATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG
 GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
 TGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT
 GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTTC
 CCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAAT
 AGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACA
 CATGCAGTCCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
 GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAG
 CAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATA
 CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA

重組體抗體之表現

嵌合體，人類化及人類抗體通常由重組體表現所產生。重組體聚核苷酸構體通常包括表現控制序列，操作連接至抗體鏈之編碼序列，包括自然相關的或異質的啟動子區域。較好，表現控制序列是真核啟動子系統，在可轉形或轉感真核宿主細胞之載體中。一旦載體納入適合的宿主，宿主可在適於核苷酸序列高水平表現之條件下維持，且再收集及純化交互反應之抗體。

這些表現載體或以游離體或以宿主染色體DNA之完整部份型式在宿主有機體中複製。通常，表現載體含有選擇標幟，如：氨苄青黴素抗性或潮霉素抗性，以可偵測為欲求DNA序列的轉形之宿主細胞。

五、發明說明 (67)

*E. coli*是一種原核的宿主細胞，特別可用於選殖本發明之DNA序列。微生物，如酵母，也可用於表現。以釀酒酵母為較佳之酵母宿主，其有適合的載體，其中有表現控制序列，複製原點，終結序列等所欲求的。典型的啟動子包括3-磷酸甘油酯激酶及其他糖解酵素。可誘導之酵母啟動子包括來自乙醇脫氫酶，異細胞色素C，及負責麥芽糖及半乳糖利用之酵素。

哺乳動物細胞在表現編碼免疫球蛋白或其片段之核苷酸片段上是較佳宿主。見 Winnacker, FROM GENES TO CLONES, (VCH Publishers, NY, 1987)。可分泌完整的異質蛋白質之適合的宿主細胞株，在技藝中已有許多被發展，且包括CHO細胞株，各種COS細胞株，HeLa細胞，L細胞及骨髓瘤細胞株。較好，細胞是非人類的。用於這些細胞之表現載體包括表現控制序列，如複製源，啟動子，加強子 (Queen et al., 1986, Immunol. Rev. 89: 49)，及必要的處理修飾資料位置，如核糖體結合位置，RNA剪接位置，聚腺苷化作用位置，及轉錄終結子序列。較佳的表現控制序列為衍生自內源基因，巨細胞病毒，SV40，腺病毒，牛乳頭狀瘤病毒等之啟動子。見 Co et al., 1992, J. Immunol. 148: 1149。另外，抗體編碼序列可納入轉殖基因中以引入轉殖動物之基因體內，接下來在轉殖動物之乳汁中表現(如見 U.S. Patent Nos. 5,741,957, 5,304,489及5,849,992)。適合的轉殖基因包括輕及/或重鏈之編碼序列，並與來自哺乳動物腺體特異基因之啟動子及加強力操作性連接，如酪蛋白

五、發明說明 (68)

或 β 乳糖球蛋白。

含有令人感興趣DNA片段之載體，可以熟知的方法轉移至宿主細胞，依細胞宿主型式而定。例如，氯化鈣轉感作用常用於原核細胞，而磷酸鈣處理，電泳脈動，脂感作用，biolistics或以病毒-為基礎之轉感作用可用於其他細胞宿主。用於轉形哺乳動物細胞之其他方法包括用polybrene，原生質體融合，脂質體，電泳脈動及微量注射(大體上見Sambrook et al., 上文)。於產製轉殖動物時。轉殖基因可微量注入受精之卵細胞，或可納入胚胎幹細胞之基因體內，及此細胞轉移至摘出之卵細胞之核內。

一旦被表現，抗體可依據技藝之標準步驟純化，包括HPLC純化，管柱層析，凝膠電泳等(大體上見Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

經修飾的抗體

也包括在本發明內的是經修飾的抗體。"經修飾的抗體"包括抗體如：單株抗體、嵌合抗體，及人類化抗體，其已經由如刪除，加入，或置換部份抗體而予以修飾。例如，抗體經由刪除固定區，並以可增加半衰期之固定區置換之，如增加抗體之血清半衰期，穩定性或親和力。

本發明的抗體共軛物可用來修飾特定的生物反應，或創造生物反應(如補充效應物細胞)。藥物部份並不限於典型的化學治療劑。如，藥物部份可為具有欲求生物活性之蛋白質或多肽。此蛋白質包括如：酵素上具活性之毒素，或其活性片段，如雞母珠毒蛋白，蓖麻毒素A，假單胞菌外

五、發明說明 (69)

毒素，或白喉毒素；蛋白質如腫瘤壞死因子或 α -干擾素；或生物反應修飾劑，如淋巴激素，間白素-1("IL-1")，間白素-2("IL-2")，間白素-6("IL-6")，粒性細胞巨噬細胞集落刺激因子("GM-CSF")，粒性細胞集落刺激因子("G-CSF")，或其他生長因子。

將此治療部份共軛至抗體之技術是熟知的，如見 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)；Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)；Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy : A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)；"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62 : 119-58 (1982)。

處理療程

本發明提出藥學組合物，其中含有一種或多種單株抗體

五、發明說明 (70)

(完整的或其結合片段)，調和以藥學上可接受之載劑。某些組合物包括有多重(如二個以上)單株抗體之組合，或本發明之抗原-結合部份。在某些組合物中，組合物中各抗體或其抗原-結合部份是單株抗體或人類序列抗體，其可與抗原分離的，預選定之表位結合。

在預防應用上，藥學組合物或藥物可投予至疑似或在疾病或狀況高危險群下之患者(即免疫疾病)，以足以消除或減低危險性，減輕嚴重性，或延緩疾病發作之劑量，其中包括生化，組織學及/或行為疾病症狀，其併發症及在疾病發展中中介之病理表型呈現。在治療應用上，組合物或藥物投予至疑似患有此疾或已罹患此疾之病人，其劑量足以治癒，或至少部份遏止疾病症狀(生化，組織學及/或行為)，包括其併發症及在疾病發展中中介之病理表型呈現。將足以完成治療或預防處理之劑量定義為治療上或預防上有效劑量。在預防及治療療程中，作用物通常以數次劑量投予，直到達成足夠之免疫反應為止。典型而言，追蹤免疫反應，且若免疫反應開始減少則給予重覆劑量。

有效劑量

本發明組合物，在治療免疫-相關狀況及此中所述疾病之有效劑量，依許多不同的因素而定，包括投藥方法，標的位置，病人的生理狀況，病人是人類或動物，其他所投予之藥物，及處理是預防性或治療性。通常，病人是人類但非人類哺乳動物包括轉殖哺乳動物也可治療。治療劑量需予以效定以便安全性及效力更臻完善。

五、發明說明 (71)

投予抗體時，劑量範圍由每公斤宿主體重約0.0001至100毫克，且通常0.01至5毫克。劑量可為1毫克/公斤體重，或10毫克/公斤體重，或在1-10毫克/公斤範圍內。示範之療程為每二週投予一次或一個月一次，或每3至6個月一次。在某些方法中，同時投予有不同結合特異性的二種以上單株抗體，其中各抗體之劑量落在所示之範圍內。抗體通常在多重狀況下投予。單一劑量之間隔可為每週、每月、或每年。間隔可依所指示是不規則的，係偵測病人之抗體血液水平。在某些方法中，調整劑量以達到1-1000微克/毫升之血漿抗體濃度，在某些方法中是25-300微克/毫升。另外，抗體可呈持續釋出調和物型式投予，在此例中投藥頻率較不頻繁。劑量及頻率依病人抗體之半衰期而定。一般而言，人類抗體顯示最長的半衰期，繼之是人類化抗體，嵌合抗體，及非人類抗體。投藥之劑量及頻率依所處理的是預防或治療而定。在預防性應用上，以相當低劑量，在相當不頻繁間隔下投予長時間。某些病人在其餘時間繼續接受治療。在治療應用上，相當高劑量在相當短間隔下有時是必要的，直到疾病之進展減低或終結為止。且較好直到病人之疾病症狀部份或完全紓緩為止。之後，病人可以預防療程投予。

編碼免疫原之劑量可在約10毫微克至1克，100毫微克至100毫克，1微克至10毫克，或30-300微克DNA(每位患者)。感染性病毒載劑之劑量可在10-100或更多病毒粒子中變化(每劑量而言)。

五、發明說明 (72)

投藥路徑

誘生免疫反應之作用物可以腸外、局部、靜脈內、口服、皮下、動脈內、顱內、腹膜內、鼻內或肌內方式投予以為預防及/或治療處理。免疫原作用物最典型的投藥路徑是皮下，然而其他路徑也同樣有效。以肌內注射為最普遍路徑。如注射型式最常在手臂或腿肌肉進行。在某些方法中，作用物直接注入特殊組織，在此沈積被累積，例如臚內注射。靜脈內輸注時肌內注射為抗體較佳之投藥方式。在某些方法中，特殊的治療性抗體直接注入顱內。在某些方法中，抗體以持續釋出組合物或裝置型式投予，如 Medipad™ 裝置。

本發明作用物可組合以其他作用物視所需地投予，其在治療包括各種免疫-相關疾病之疾病上至少部份有效。在阿爾滋海默瓦及 Down's 症候群之例子中，類澱粉沈積發生在腦中，本發明作用物也可配合其他作用物而投予，後者可增加本發明作用物穿越血腦障壁(BBB)。

調和物

本發明作用物常以藥學組合物型式投予，其中含有活性治療劑，即其他各種藥學上可接受之組份。見 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)。較佳型式依欲求之投藥模式及治療應用而定。組合物依欲求之調和物而定，也可含有藥學上可接受之無毒性載劑或稀釋劑，其被定義為常用於調和供動物或人類投予之藥學組合物之溶媒。稀

五、發明說明 (73)

釋劑之選擇如此其不會影響組合物之生物活性。此稀釋劑之實例為蒸餾水，生理上磷酸鹽緩衝之食鹽水，林格瓦溶液，右旋糖溶液，及漢克氏溶液。此外，藥學組合物或調和物也可包括有其他載劑、佐劑，或無毒性，非治療性，非免疫原性穩定劑等。

藥學組合物也可包括大的，緩緩代謝之大分子，如蛋白質，多醣如脫乙醯殼多糖，聚乳酸，聚乙醇酸及共聚物（如乳汁功能化的sepharoseTM，瓊脂糖，纖維素等），聚胺基酸，胺基酸共聚物，及脂質凝集物（如油滴或脂質體）。另外，這些載劑可作用如免疫刺激劑（即佐劑）。

於腸外投藥時，本發明作用物可以物質之溶液或懸液在生理上可受之稀釋劑中之可注射劑型投予，其中並加有藥用載劑，其可為無菌液體，如水，油，食鹽水，甘油或乙醇。另外，輔助物質如沾濕或乳化劑，界面活性劑，pH緩衝物質等，均可存在於組合物中。藥學組合物之其他組份有石油醚，動物，植物或合成來源，如：花生油、大豆油，及礦油。一般而言，以甘醇類如丙二醇或聚乙二醇為較佳的液體載劑，特別是於可注射之溶液劑上。抗體之投予可呈貯存式注射或植入劑型式，其以此方式調和使活性組份可持續地釋出。示範之組合物含有5毫克/毫升之單株抗體，調和在由50 mM L-組胺酸，150 mM NaCl，組成之水性緩衝溶液中，並以HCl調至pH 6.0。

典型而言，組合物被製備成可注射的，或呈液體溶液劑或懸液劑；也可製成在注射劑適於溶液劑或懸液劑之於液

五、發明說明 (74)

體溶媒中之固體型式。製劑也可乳化或包膠在脂質體或微粒子內，如聚內交酯、聚乙交酯，或用於加強佐劑作用之共聚物，如上文所討論的(見Langer, 1990, Science 249: 1527及Hanes, 1997, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119)。本發明作用物可以貯置型注射劑或植入製劑型式投予，其以此方式調和令活性組份可持續地或脈衝式釋出。

適於其他投藥模式之額外的調和物包括口服、鼻內，及肺部調和物，栓劑及穿皮應用。

在栓劑方面，黏合劑及載劑包括如：聚伸烷甘醇類或三甘油酯類；此栓劑可由含有活性組份在0.5%至10%，較好1%-2%之混合物中形成。口服調和物包括賦形劑，如藥用等級之甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素及碳酸鎂。這些組成物可呈溶液劑、懸液劑、錠劑、丸劑、膠囊劑、持續釋出調和物或散劑型式，且含有10%-95%活性組份，較好25%-70%。

局部應用可造成穿皮或皮內遞送。局部投藥可由作用物與霍亂弧菌毒素或去毒之衍生物或其亞單位或其他類似的細菌毒素(見Glenn et al., 1998, Nature 391: 851)之共同投予而促進。共同投藥可利用組份為混合物型式或經化學交聯所得之連接的分子或以融合蛋白質型式來完成。

另外，穿皮遞送可利用皮膚貼劑或利用轉移體(transfersomes)來達成(Paul et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24; Cevc et al., 1998, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15)。

五、發明說明 (75)

藥學組合物通常調和成無菌，實質上等張的且完全符合 U.S. FDA 之 GMP 規則。

毒性

較好，此中所述蛋白質之治療有效劑量，可提供治療益處但不致引起實質的毒性。

此處所述蛋白質之毒性，可由細胞培養或實驗動物中之標準藥學步驟決定，如決定 LD₅₀ (造成 50% 族群致死之劑量) 或 LD₁₀₀ (造成 100% 族群致死之劑量)。在毒性及治療作用間之劑量比例是治療指數。自這些細胞培養分析及動物研究所得之數據，可用於調和劑量範圍，其無毒性且可用於人類。此處所述蛋白質之劑量較好在循環濃度範圍之內，其包括有少或無毒性之治療有效劑量。劑量可在此範圍內變化，依所應用之劑量型式及所利用之投藥路徑而定。確實的調和物，投藥路徑及劑量可由個別醫師基於病人的狀況而選擇 (如見，Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1)。

套組

包括在本發明內的尚有套組，其中含有本發明之組合物 (如單株抗體，人類序列抗體，人類抗體，多重特異且雙特異的分子) 及使用指示。套組可進一步含有至少一種額外的試劑，或一種以上本發明額外的人類抗體 (如，具有補體活性之人類抗體，其與抗原上之表位結合並和第一人類抗體不同)。套組通常含有標幟，顯示出套組內容物之意欲用途。所謂標幟包括任何的文字，或記錄特質，由套組供應或

五、發明說明 (76)

隨之在內，其附在套組上。

實例

實例 1

Cmu目標老鼠之產生

CMD目標載體之構築。質體pICEmu含有鼠Ig重鏈位點之EcoRI/XhoI片段、占據mu基因，其得自Balb/C基因體入噬菌體(Marcu et al., 1980, Cell 22: 187)。此基因體片段繼代選殖至質體pICEMI9H之XhoI/EcoRI位置(Marsh et al., 1984, Gene 32: 481-485)。重鏈序列包括在pICEmu中，延伸至EcoRI位置下游，正好位在mu插入之加強子3'端，至XhoI位置係位mu基因最後穿膜表現子約1kb下游處；然而，在通透至E. coli時，有許多mu轉換重覆區已被刪除。

標的的載體可如下述般構築(見圖1)。自pICEmu中切出1.3 kb HindIII/SmaI片段，並繼代選殖至經過HindIII/SmaI水解之pBluescript(Stratagene, La Jolla, CA)。此pICEmu片段由位在Cmul 5' 1kb處之HindIII位置延伸至Cmul內之SmaI位置。生成之質體以SmaI/SpeI水解，再嵌入約4 kb來自pICEmu之SmaI/XbaI片段，其由Cmul 3' Sma I位置延伸至XbaI位置正好位在最後Cmu表現子之下游。生成之質體，pTAR1，在SmaI位置處線北，並嵌入一個neo表現匣。此匣含有neo基因，並在老鼠磷酸甘油酯激酶(pgk)啟動子之轉錄控制下(XbaI/TaqI片段；Adra et al., 1987, Gene 60: 65-74)並含有pgk聚腺苷化作用位置(PvuII/HindIII片段；Boer et al., 1990, Biochemical Genetics 28: 299-308)。此

五、發明說明 (77)

匣得自質體 pKJ1(由 Tybulewicz et al., 述於 1991, Cell 65 : 1153-1163)。由此 neo 匣以 EcoRI/HindIII 片段切出，並繼代選殖至經 EcoRI/HindIII 水解之 pGEM-7Zf(+) 中，以產生 pGEM-7 (KJ1)。neo 匣以 EcoRI/SalI 水解自 pGEM-7 (KJ1) 中切出，使端成平齊並繼代選殖至質體 pTAR1 之 SmaI 位置，在基因體 Cmu 序列之相反方向。生成之質體以 Not I 線化，再嵌入單純疱疹病毒胸苷激酶(tk)匣，以令攜有同質重組子之 ES 純系加豐，如 Mansour et al., 1988, Nature 336 : 348-352 所述。此匣含有 tk 基因之編碼序列，由老鼠 pgk 啟動子及聚腺苷化作用位置所支撐，如 Tybulewicz et al., 1991, Cell 65 : 1153-1163 所述。生成之 CMD 標的載體與重鏈位點共有約 5.3 kb 之同質性，並經設計可生成突變子 mu 基因，其中在第一 Cmu 表現子單獨的 SmaI 位置上嵌入有 neo 表現匣。標的載體以 PvuI 線化，其可在質體序列內切割，此在電泳脈動至 ES 細胞之前。

標的 ES 細胞之產生及分析。AB-1 ES 細胞(McMahon, A. P. and Bradley, A., 1990, Cell 62 : 1073-1085)培養在弱分裂上無活性之 SNL 76/7 細胞餵養層上(同上)，基本上如所述(Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford, IRL Press, p. 71-112)。線化的 CMD 標的載體以 Hasty et al 所述之方法(Hasty, P. R. et al., 1991, Nature 350 : 243-246)電泳脈動至 AB-1 細胞內。經電泳脈動的細胞以 $1-2 \times 10^6$ 細胞/皿之密度塗佈至 100 毫米皿

五、發明說明 (78)

中。24小時後，在培養基中加入G418 (200微克/毫升活性組份)及FIAU ($5 \times 10^{-7}M$)，令抗藥性純系可發展8-9天。挑出純系，胰蛋白酶化，分成二份，並進一步擴大。由各純系衍生之一半細胞再冷凍，另一半進行載體及標的序列間同質重組之分析。

以南方吸漬雜交進行DNA分析。DNA如Laird et al.所述 (Laird, P. W. et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19: 4293)。

自純系中分離經分離的基因體DNA以SpeI水解，再以915 bp SacI片段(探針A)(圖1)探測，其可與介於插入加強子及mu轉換區間之序列雜交。探針A可偵測野生型位點內之9.9 kb SpeI片段，及來自mu位點之診斷性7.6 kb，其與CMD標的載體同質地重組(neo表現匣含有SpeI位置)。由南方吸漬分析所篩選的1132 G418及FIAU抗性純系中，有三者呈現7.6 kb之SpeI帶顯示在mu位點上有同質重組作用。這三個純系以BglI，BstXI及EcoRI酵素進一步水解可證實載體同質地整合至mu基因內。當與探針A雜交，以BglI，BstXI或EcoRI水解之野生型DNA，經南方吸漬可產生分別地15.7，7.3及12.5 kb片段，而標的mu對偶基因之存在可由分別的7.7，6.6及14.3 kb片段顯示。所有三個陽性純系以SpeI水解物偵測，顯示預期的BglI，BstXI及EcoRI限制片段顯示neo匣嵌入Cmul表現子內。

帶有經突變mu基因之老鼠之產生。三個標的ES純系，編號為264，272及408，解凍再注入C57BL/6J胚細胞內，如Bradley所述 (Bradley, A., 1987 於 Teratocarcinomas and

五、發明說明 (79)

Embryonic Stem Cells : a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford : IRL Press, p. 113-151)。經注射的胚細胞轉移至假懷孕雌性之子宮內以產生嵌合老鼠，代表由輸入之ES細胞衍生之細胞與宿主胚細胞之混合物。ES細胞造成嵌合體之程度，可在黑色C57BL/6J背景下，由ES細胞株衍生之野灰色外覆色彩量而目視檢測。純系272及408僅可產生低比例的嵌合體(即，野灰色比例低)但純系264產生高比例的雄性嵌合體。這些嵌合體與C57BL/6J雌性培育，可產生野灰色子代，顯示出ES細胞基因體之種系傳遞。標的mu基因之篩選以來自尾部活組織檢DNA經BglI水解之南方吸漬分析來進行(如上ES細胞DNA分析所述)。野灰色子代中約50%呈現出7.7 kb之雜交BglI帶，加上15.7 kb之野生型帶，證明標的mu基因之種系傳遞。

轉殖老鼠mu基因功能性失活之分析。為了決定neo匣嵌入Cmu1是否可使Ig重鏈基因失活，將純系264嵌合體與JHD突變之同種接合老鼠培育，其可因JH基因片段之刪除結果使重鏈表現失活(Chen et al., 1993, Immunol. 5 : 647-656)。可產生4個野灰色子代。在1個月大的這些動物中取得血清，再以ELISA分析鼠IgM之存在。4子代中二者完全缺乏IgM(表1)。表自尾部活組織檢之DNA以BglI水解再行南方吸漬分析，以探針A雜交而定出基因與圖(圖1)，以StuI水解再與475 bp EcoRI/StuI片段雜交(同上)，可證明無法表現血清IgM之動物為其中重鏈位點之一個對偶基因攜有JHD突變，另一對偶基因為Cmu1突變。JHD突變呈異合子之老鼠

五、發明說明 (80)

呈現出野生型血清Ig水平。這些數據證明，Cmu1突變可使mu基因表現失活。

表 1

老鼠	血清IgM (微克/毫升)	IgH鏈基因型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129× BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

表 1 示出以 ELISA 偵測之血清 IgM 水平，其中老鼠攜有 CMD 及 JHD 二種突變 (CMD/JHD)，老鼠為 JHD 突變異合子 (+/JHD)，野生型 (129Sv× C57BL/6J)F1 老鼠 (+/+), 及 B 細胞缺失老鼠，為 JHD 突變同合子 (JHD/JHD)。

實例 2

人類κ輕鏈轉殖基因 KCo5

人類κ輕鏈轉殖老鼠株 KCo5-9272 之產生，先前已有所述 (Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14, 845-851; U.S. Patent No. 5,770,429 中實例 38)。此株之產生是將人之人類κ輕鏈位點及含有多重人類 V κ 片段之 YAC 純系共同注射而成。YAC 純系 DNA 分離自酵母，其含有一段 450 kb 酵

五、發明說明 (81)

母菌人工染色體(YAC)。包括部份的人類V κ 位點(ICRF YAC庫命名為4 $\times$ 17E1)。自YAC DNA中擴大的V基因片段，經由DNA序列分析證明此純系含有相當部份之人類遠端V κ 區，包括約32個不同的V κ 片段。此純系之不同分離物分析(Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191 : 173-181)證實該結果，且也證明此純系代表人類 κ 位點C單元型，其中遠端V群之5'部份類似近端V群之同質區域。因此，5' O族V基因片段，在序列上與同質的近端Op族V片段極接近。

為取得經純化的YAC DNA以微量注入胚胎原核內，總基因體DNA在瓊脂糖凝膠上分級分離。含有YAC 4 $\times$ 17E1之酵母細胞於溶解前先包埋在瓊脂糖中，且YAC DNA以脈衝電場凝膠電泳自酵母染色體DNA中分離，分離，並微量注入半天大之胚胎原核內。

基因體DNA之南方吸漬分析證明，人類VkA 10基因(Cox, J. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827-836; Schable, K. & Zachau, H., 1993, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374 : 1001-1022)納入KCo5-9272老鼠之基因體內。利用探針行PCR分析(Brensing-Kuppers, J., et al., 1997, Gene 191 : 173-181)，探針與V κ O1 5'區具特異性(m217-1, Genbank X76071 ; AB129, ccaccccataaacactgattc (SEQ ID NO : 4) ; AB130, ttgatgcacacacccagggc (SEQ ID NO : 5))及與V κ L24及L25間之基因間區域(m138-13, Genbank X72824 ; AB127, cctgccttacagtgtgttag (SEQ ID NO : 6) ; AB128,

五、發明說明 (82)

ggacagcaacaggacatggg (SEQ ID NO: 7)), 顯示來自 YAC 純系 4× 17E1 之 V κ 群 5' 及 3' 區係包括在 KCo5-9272 轉殖基因整合中。將品系 KCo5-9272 老鼠與人類重鏈轉殖基因的, 內源免疫球蛋白位點突變子老鼠培育, 以獲得老鼠同合子以分裂內源重及 κ 輕鏈位點, 及半或同合子於人類重鏈轉殖基因 HC2 或 HCo7 (U.S. Patent No. 5,770,429) 及人類 κ 輕鏈轉殖基因 KCo5。同合子動物以分裂內源重及 κ 輕鏈位點, 及半-或同合子於人類重及 κ 輕鏈轉殖基因, 被命名為雙重轉殖的/雙重刪除老鼠。

直接衍生自 KCo5 雙重轉殖/雙重刪除老鼠之 cNDA 純系, 或由這些動物產生之融合瘤之 DNA 序列分析顯示以下 V κ 基因之表現: L6、A27、O12、O4/O14、A10、L15、L18、L19 及 L24。

實例 3

雜交繁育

含有染色體 14 片段 hCF(SC20) 及人類 κ 輕鏈轉殖基因之人類重鏈位點由雜交繁育混合至單一品系內。hCF(SC20) 轉殖基因老鼠品系為內源重鏈位點 (CM2D) 失活突變及內源 κ 輕鏈 (CKD) 同合子。此品系也是 $\lambda 1$ (低) 突變之同合子 Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)。CM2D 突變作用包括 3.7 kb BamHI-XhoI 片段之刪除, 涵蓋部份 Cmu2、Cmu3-Cmu4, 及 Mmu1 及 Mmu2。CKD 突變包括 2 kb SacII-BglII 片段之刪除、涵蓋 C κ 表現子。二種突變先前均有報告 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc.

五、發明說明 (84)

顯示 KCo5 轉殖基因之保留 (見實例 2)。尾部 DNAs 利用 D14S1419 及 D14S1420 引子對 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 722-727) 偵測 hCF(SC20) 之 PCR 分析顯示，所有的 h μ -陽性個體保有 hCF(SC20)，且所有的 h μ -陰性個體為 hCF(SC20) 陰性。hCF(SC20) 自雌性 hCF(SC20)/CM2D/CKD 之傳遞效率 (41%) 與先前報告之數據一致 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 722-727)。

實例 4

在雜交繁育老鼠血清中人類 Ig 之表現

製備自 6-12 週大雜交繁育老鼠之血清樣品，進行 ELISA 分析以決定人類 Ig μ 、 γ 、 κ 及老鼠 λ 鏈之濃度 (圖 2)。與內源 C μ 刪除之半合子老鼠比較，保持在類似條件下，人類 Ig μ 及 Ig γ 之平均水平分別較高於老鼠 μ 鏈水平 (273 毫克/升) 及 1/3 的老鼠 γ 鏈水平 (590 毫克/升)。這些重鏈表現水平類似雙重-Tc/雙重-KO 老鼠的 (hCF(SC20)/hCF(2-W23)/CM2D/CKD Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 722-727)。在雄及雌性雜交繁育老鼠間配對所產生的 1/4 F2 子代中預期為 m λ C1(λ 低) 突變之同合子，因為雜交繁育老鼠之第一代為此突變異合子的。人類 Ig κ 及老鼠 Ig λ 輕鏈之血清濃度以 ELISA 決定，如先前所述在 21 個 F2 雜交繁育老鼠中決定 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 722-727)。在受檢的 21 隻老鼠中，6 隻老鼠呈現低的 (<0.1) 老鼠 λ /人類 κ 比例，此為 λ 低突變之老鼠同合

五、發明說明 (89)

自雙重-Tc/雙重-KO老鼠，是 $m\lambda^+$ (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)。

實例 8

產製抗-人類CTLA-4單株抗體

抗原。構築編碼融合蛋白質之DNA片段，其中包括來自人類CTLA-4之序列及鼠CD3 ζ 基因，係以PCR擴大cDNA純系，加上橋接的合成寡核苷酸。經編碼的融合蛋白質含有以下序列：i)人類CTLA-4編碼胺基酸1-190(含有訊號肽，人類CTLA-4之細胞外功能部位及人類CTLA-4)及ii)鼠CD3 ζ 由胺基酸52至羧基末端。經擴大的PCR產物選殖至質體載體內，再決定DNA序列。所選殖的嵌入子再繼代選殖至載體pBABE，其含有指導合成嘌呤黴素抗性之基因(Morganstern, JP and Land, H, 1990 Nucl. Acids Res. 18: 3587-96)以生成pBABE-huCTAL-4/CD3 ζ 。pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ 轉感至反轉錄病毒包裝株 ψ -2，再選出具嘌呤黴素抗性之細胞群。這些細胞與鼠類T細胞融合瘤BW5147(ATCC #TIB-47)共培養。共培養2天後，移去未黏附的BW5147細胞，並選出具嘌呤黴素抗性者。嘌呤黴素抗性細胞匯集以有限稀釋繼代選殖，並以FACS測試人類CTLA-4之表面表現。選出在細胞表面可表現高水平人類CTLA-4之純系(BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12)。含有人類CTLA-4細胞外功能部位之可溶性重組體抗原購自R&D系統(Cat. #325-CT-200)。

免疫接種。三隻SC20/KCo5雜交-繁育老鼠(ID#'s 22227, 22230, 及22231)各自由腹膜內(i.p.)注入 10^7 經洗過之完

五、發明說明 (90)

全BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12細胞而免疫之其係可表現人類CTLA-4細胞外功能部位。此免疫接種步驟對老鼠#22227及22230在大約一個月間隔下重覆二次以上。在第3個月時，老鼠#22231給予第三次i.p.完全洗過細胞注射，而老鼠#22227及22230各自i.p.及皮下注入20微克可溶性重組體抗原，於MPL+TDM佐劑中(Sigma Cat. # M6536)。老鼠再休息10天，且在回收脾細胞以為融合瘤融合之前2天，老鼠#22227及22230各自i.v.經尾部注入20微克可溶性重組抗原，加上i.p.注射20微克可溶性重組體抗原，於MPL+TDM佐劑中。回收脾細胞前一天，這些老鼠給予20微克可溶性重組體抗原之額外i.v.注射。老鼠#22231給予 10^7 經洗過之BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12細胞於MPL+TDM佐劑，此在回收脾細胞前三次i.p.給予，繼之以 10^7 經洗過之BW-huCTLA-4CD3 ζ -3#12細胞，無佐劑，於融合前二天i.p.注入。

融合，以標準步驟(Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennett et al., 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, New York; Oi and Herzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, ed. Mishell and Shiigi, pp. 357-372. Freeman, San Francisco; Halk, 1984 Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, ed. Weissbach and Weissbach, pp. 766-780, Academic Press, Orlando, FL)，在三個

五、發明說明 (95)

因此，可得20個不同的繼代純系。所有20個純系使用人類 κ 輕鏈，且完全是人類。

在繼代選殖之融合瘤中5個中分離出單株抗體(1H5，4A9，4C1，8H4，及10E1)並測試其阻斷CTLA-4與B7.2結合之能力(圖12及13)。

簡言之，ELISA盤塗佈以0.7微克/毫升(100微升/孔洞)之B7.2 Ig融合蛋白質(見WO 01/14424，其以全文基於所有目的納為參考)。盤洗滌，再於PBS-T+1% BSA中阻斷30分鐘。抗體混合以等量的經生物素標記的CTLA-4 Ig (Ancell #501-030)，0.2微克/毫升下，並在室溫下預先培育1小時，再轉移至B7.2塗佈之ELISA盤，並培育1小時。盤洗滌，再加入100微升/孔洞之鏈抗生物素蛋白鹼性磷酸酶(Kirkegaard and Perry Labs 15-30-0)，並培育1小時。盤以pnpp受質展開。經生物素標記之CTLA-4結合至B7.2之抑制作用，以抗體濃度對405毫微米下之吸光度而作圖。抗體10D1是CTLA-4特異的人類IgG₁(見WO 01/14424)。抗體同型是1H5.1 (γ_1)，4A9.1 (γ_1)，4C1.1 (γ_4)，8H4.4 (γ_4)，10E1.1 (γ_4)，及10D1 (γ_1)。

頃發現二個抗體(1H5及4A9)是阻斷性抗體，而三者(4C1，8H4，及10E1)是未阻斷之抗體(圖12及13)。

投予抗-CTLA-4可加強T細胞調介之免疫反應(Krummel, 1995, J. Exp. Med. 182: 459-465; Krummel et al., 1996, Int'l Immunol. 8: 519-523)。因此，CTLA-4抗體可充作佐劑以增加另外作用物之免疫原性。當CTLA-4之抗體與另外

五、發明說明 (96)

的作用物一起投予時，二者可依序或同時投予。方法可用於各種疫苗，及其中加強的免疫反應是有益之治療。例如感染性疾病及癌症，包括黑色素瘤，結腸癌，前列腺癌，及腎癌。

CTLA-4抗體也可用於向下調控T細胞調介之免疫反應。此活性可以抗-CTLA-4抗體之多價製劑獲得。例如，塗佈以抗-TLA-4之乳膠微球(以增加抗體之效數)可抑制T細胞增殖及活化。具有相同抗體結合位置之作用物可充作CTLA-4拮抗劑，此當呈Fab或可溶性IgG時，而當高度交聯時為CTLA-4。因此，抗-CTLA-4抗體之多價型可為免疫遏止之有用的治療劑。

除了連接至乳膠微球或其他不溶粒子，抗體可互相交聯或遺傳操作以形成多聚體。交聯可經由直接的化學鏈結，或間接連結如抗體-生物素-抗生物素蛋白複合物。交聯可為共價的，其中可應用蛋白質-蛋白質或其他的蛋白質-配體交互作用。連結之遺傳操作途徑包括如，高親和力IgG抗體可變區在IgM表現載體或任何蛋白質部份之再表現(如聚賴胺酸等)。高親和力IgG抗體轉化成IgM抗體可生成有極高抗體親抗原性之十價複合物。IgA₂表現載體也可用來產生多價抗體複合物。IgA₂加上J鏈及分泌組份可形成聚合物。IgA₂可有額外的優點，即可為IgA受體CD89額外地交聯，其表現在嗜中性球，巨噬細胞，及單核球。另外，由於自C20/KCo5雜交-繁育老鼠中所產生之融合瘤有約2%是IgA，這些動物可直接產生人類IgA同型抗-CTLA-4抗體。

五、發明說明 (97)

利用 CTLA-4 多株抗體的某些製劑也可得激動作用，包括 CTLA-4 上至少二個未重疊表位之抗體。在此製劑中含有二個結合位置之抗體，可與二分子 CTLA-4 結合，形成小群集。具有不同結合位置的第二抗體可將這些小的群集再連結(凝集)形成大群集，由是形成 CTLA-4 之複合物(在細胞表面)其可轉導訊號至 T 細胞，以抑制，減低或預防攜有(表現) CTLA-4 T 細胞之活化作用。因此，多株抗體的某些製劑對上述的多價製劑顯示相似的激動作用。

因此，抗-CTLA4 抗體之多價或多株抗體製劑可用於激動 CTLA-4 受體，由是遏止由攜有 CTLA-4 受體之 T 細胞所調介之免疫反應。可利用此多價或子株抗體製劑所治療之疾病實例包括自體免疫疾病，轉移排斥，及發光。

實例 9

抗-人類 EGFR 抗體之產生

抗原。來自人類腫瘤 A431 細胞之經純化的可溶性上皮生長因子受體(EGFR)得自 Sigma Chemical Co (E3641)。人類腫瘤 A431 細胞株得自美國標準菌種收集所(ATCC CRL-1555)。Ribi MPL+TDM 佐劑得自 Sigma Chemical Co (M-6536)。

免疫接種。二隻 SC20/KCo5 雜交繁育老鼠(ID#'s 22232 及 22239)各自由腹膜內(i.p.)注入 10^7 經洗過之完全人類腫瘤細胞 A431 細胞而免疫之。此免疫接種在一個月後二隻老鼠均重覆。在第 4 個月，老鼠 22239 以 25 微克可溶性 EGFR 於 MPL+TDM 佐劑 i.p. 免疫接種之；休息七天再注入 10 微克

五、發明說明 (98)

EGFR/PBS, (iv)加上10微克EGFR/MPL+TDM佐劑, i.p.。二天後, 老鼠22239接受另10微克EGFR/PBS, i.v., 且次日自老鼠22239中回收脾細胞以進行融合。在以A431細胞前二次注射後, 老鼠22232休息三個月再以 10^7 A431細胞混合以MPL+TDM佐劑i.p.注射。4天後自老鼠22232中取得脾細胞以供融合。

融合。來自老鼠#22232及22239之脾細胞, 在二次分別實驗中與P3 X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580; 老鼠#22239)或SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581; 老鼠#22232)骨髓瘤細胞融合。融合依實例8所列之標準步驟進行。

融合瘤篩選。EGFR融合瘤篩選步驟和用於實例8 CTLA-4的相似。ELISA盤(Nunc MaxiSorp)以100微克/孔洞可溶性EGFR抗原於1微克/毫升於PBS塗佈一夜。盤再洗滌並以100微升/孔洞PBS-Tween含有1% BSA阻斷。加入50微升細胞培養上清液, 繼以1-2小時之培育。盤洗滌再與100微升/孔洞山羊抗-人類 γ 重鏈共軛至鹼性磷酸酶(抗-人類 γ (fc) AP Jackson # 109-056-098)共培育1小時。盤以PBS-Tween在各步驟間洗三次。可分泌人類IgG κ 抗-EGFR特異抗體的5及2個融合瘤分別自老鼠22232及22239融合中繼代選殖。EGFR特異抗體重及輕鏈同型分析包括四個IgG $_1\kappa$, 一個IgG $_2\kappa$ 及一個IgG $_4\kappa$ 抗體。

實例10

經純化的人類IgG κ 單株抗體之速率及平衡常數

融合瘤培養在含有1% FBS (低IgG)之eRDF中。人類MAbs

五、發明說明 (100)

實例 11

產生雜交繁育(Fc)老鼠

已熟知免疫學耐性可避免拮抗自我-抗原之反應性，通常可避免產生可拮抗外來抗原之老鼠單株抗體，其胺基酸序列係相似或相同於鼠類對映部份。可與人類抗原及其老鼠對映部份間之共同表位結合之老鼠單株抗體是有用的，因為在蛋白質抗原活性位置中之胺基酸序列傾向於充份保留。此外，由這些抗體於活體內投予所帶來的任何作用，均可在老鼠模式中容易地研究。然而，亦難以獲得拮抗此共同表位之老鼠單株抗體。如上述，本發明之雜交繁育老鼠可用以取得可拮抗各種人類抗原之人類單株抗體。然而，在某些狀況下，亦難以獲得有能力結合至充份保留性人類抗原或可與鼠對應部份交叉一反應之人類單株抗體。因此，在本發明另一方面，提出本發明額外的雜交-繁育老鼠，其中Fc γ 受體IIB已被失活。這些老鼠稱之為雜交繁育(Fc)老鼠，可用來產生與充份保留性抗原結合或可與其鼠對應部份雜交繁育之單株抗體。生化及遺傳研究顯示，免疫球蛋白(Ig)G(Fc γ RIIB)之IIB型低親和力受體，可抑制經由抗體或免疫複合物所啟動之細胞活化作用，且在預防自體免疫力出現上是十分重要的組份(Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349)。缺乏Fc γ RIIB之動物，抑制性Fc受體，已一般化地加強抗體反應，且在過敏反應之所有抗體-調升類型中增強發炎作用。(Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349)。例如，以牛膠原蛋白IV型(C-IV)免疫之突

五、發明說明 (101)

變株老鼠(C-IV)，而非野生型老鼠，對老鼠C-IV可顯示提高之自體抗體反應(Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905)。然而，此中並無FcγRIIB突變株老鼠是否可用於有效產製自體反應性單株抗體之研究報告。再者，在證明可與人類抗原及老鼠中鼠類對應部份結合之人類單株抗體之有效產製上並無報告。

如下述，FcγRIIB突變作用育種至本發明的雜交繁育老鼠中。所生成之雜交-繁育(Fc)老鼠以牛C-IV之免疫接種，可誘生拮抗牛及鼠C-IV之人類抗體反應。分泌人類單株抗體之融合瘤，其結合至牛及鼠C-IV也可產生。因此，雜交-繁育的(Fc)老鼠可用於產製人類單株抗體，其可免疫外來抗原及其鼠類對應部份。雜交-繁育(Fc)的老鼠也可用於獲得可拮抗充份保留性抗原之人類單株抗體。FcγRIIB-壓倒性(Fc(-/-))同合子之老鼠(Takai, T. et al., 1996, Nature 379: 346-349)由Dr. Toshifumi Takai所提供(Tohoku University, JAPAN)。Fc(-/-)雄性老鼠與雌性雜交繁育老鼠配對(如實例3所述)。在各F1個體中KCo5轉殖基因及hCF(SC20)之保留以ELISAs及PCRs檢查，如實例3所述。FcγRIIB-壓倒性之基因型以PCR分析決定，利用如下的三種引子

neo, 5'-CTCGTGCTTTACGGTATCGCC (SEQ ID NO: 8);
5'EC1, 5'-AAACTCGACCCCCCGTGGATC (SEQ ID NO: 9); 及
3'EC1, 5'-TTGACTGTGGCCTTAAACGTGTAG (SEQ ID NO: 10)。

自尾活組織檢中製備之基因體DNA樣品，利用AmpliTaq DNA聚合酶(Perkin Elmer)接受PCR。在含有上三種例子

五、發明說明 (102)

(各 0.5 pM)之標準反應混合物中，樣品擴大35個週期：30秒 94°C，30秒 62°C，30秒 72°C (Gene Amp PCR系統 9600，Perkin Elmer)。野生型對偶基因及同合子對偶基因示出之帶尺寸分別是161 bp及232 bp。挑出F1雄性基因體KCo5/CMD或CM2D (-/+)/CKD或JKD (-/+)/Fc (-/+)，雌性基因型hCF(SC20)/KCo5/CMD或CM2D (-/+)/CKD或JKD (-/+)/Fc (-/+)以進一步繁育。最後，可獲得基因型是hCF(SC20)/KCo5/CMD或CM2D (-/-)/CKD或JKD (-/-)/Fc (-/-)之老鼠(雜交繁育(Fc))。於雜交繁育(Fc)老鼠中，人類Ig μ 及 κ 之血清表現水平經證實是可與雜交繁育老鼠中的相比較的(見實例4)。

實例 12

產生抗-老鼠IV型膠原蛋白人類單株抗體

抗原之免疫接種。牛C-IV (Cellmatrix IV)得自 Nitta Gellatin, Inc。C-IV溶液(3.0毫克/毫升於1 mM HCl, pH 3.0)加1 mM NaOH(終濃度)再以Freund's佐劑乳化而中和之。雜交繁育老鼠及雜交繁育(Fc)老鼠在尾基部以150微克C-IV乳化於含有CFA之結核分枝桿菌株H₃₇Rv (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)免疫接種之。老鼠在26及48天後，於相同部位以150微克C-IV加IFA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)追加。(Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905)。

在老鼠中之體液反應。在第58天時收集血清。血清中之抗原反應性人類Ig γ 以ELISA如所述加上修飾偵測之(Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 899-905)。在

五、發明說明 (103)

96孔洞微滴定盤分析中(Nunc, MaxiSorp)可偵測出牛C-IV之抗體，其中在孔洞中覆上50微升/孔洞之20微克/毫升牛C-IV於PBS之溶液，4°C下一夜。利用BIOCOAT小池器皿老鼠C-IV 96孔洞盤分析(Becton Dickinson Labware)偵測老鼠C-IV之抗體。經稀釋的血清(1:20-1280)以50微升/孔洞加入，並令其在4°C下反應一夜。孔洞洗滌，且山羊抗-人類IgG (Fc)偶合至辣根過氧化酶(Sigma, A0170)在4°C下2小時，洗滌，並在室溫下以50微升TMB受質展開30分鐘(Sumitomo Bakelite, ML-1120T)。利用微量盤計讀機讀出450毫微米下之OD (Arvo, Wallac Berthold Japan)。在雜交繁育(Fc)而非雜交繁育老鼠之血清中，可觀察到對老鼠C-IV之特異的人類 γ 自體抗體反應。在雜交繁育(Fc)老鼠中可觀察到對牛C-IV加強之反應。(圖14)。

融合及融合瘤篩選。66天後，老鼠給予150微克抗原額外的腹膜內(KM#1: 雜交繁育, FC#1: 雜交繁育(Fc))或靜脈內(KM#2: 雜交繁育, FC#2: 雜交繁育(Fc))注射，69天後再回收脾細胞。來自老鼠之脾細胞與老鼠骨髓瘤細胞(Sp2/0-Ag14)以標準步驟融合。細胞懸液以每孔洞 200×10^3 脾細胞接種至96孔洞盤中。細胞培養在DMEM, 10% FBS, 胰島素, IL-G, 中。加入HAT或HT補充劑於最初的生長及選擇期間。融合瘤利用ELISA篩選。為鑑定可分泌老鼠C-IV之融合瘤，ELISA盤(Nunc MaxiSorp)以50微升/孔洞之老鼠C-IV (Sigma, C0534)在40微克/毫升於PBS中於4°C下塗佈一夜。加入50微升的細胞培養物上清液。由雜交-繁育

五、發明說明 (104)

補充

93.2.20

(Fc)老鼠中可得二個融合瘤，其分泌hy陽性，老鼠C-IV反應性抗體，並以有限稀釋成功地繼代選殖(見下表8)。

表 8

抗-膠原蛋白IV型單株抗體之產製

老鼠ID#1	陽性孔洞		
	抗-牛hy	抗-老鼠hy	
KM#1	8	0	ip
KM#2	52	0	iv
FC#1	16	0	ip
FC#2	85	2	iv

此數據顯示，雜交-繁育(Fc)老鼠可用來產製可拮抗充份保留性抗原或表位之人類單株抗體。

本發明並不限於此中示範之具體實例，其僅為本發明單一方面之說明，且任何功能性相當之任何純系，DNA或胺基酸序列均屬本發明範圍之內。確實，本發明的各種修飾變化，加上此中所述的，由上文說明及所附圖解精藝者應顯而易見。此修飾變化意欲在所附申請專利範圍之範疇之內。也應了解，對核苷酸所示之所有鹼基對均為大約數值，且供說明目的。

上示的所有刊物及專利文件均以完全目的，並以如個別所示般相同程度全文列為本案參考。

五、發明說明 (105)

序列表

<110> Tomizuka, Kazuma
Ishida, Isao
Lonberg, Nils
Halk, Ed

<120> 用於製造人類抗體之轉殖基因轉殖染色體
齧齒動物

<130> 014643-012110TW

<140> To be assigned

<141> To be assigned

<150> US 60/250,340

<151> 2000-11-30

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3881

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：κ輕鏈質體

<220>

<223> pCK7-96

<400> 1

```

tcttcgcgtt cctcgcgtac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60
tcagctcact caaaggcggt aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
tttttccata ggctccgccc ccttgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtccagagg 240
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc cccctggaag ctccctcgtg 300
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga 360
agcgtggcgc tttctcatag ctacgcgtgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc 420
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgctc cttatccggg 480
aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 540
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta gccgggtgcta cagagttcctt gaagtgggtg 600
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg ccagaaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgectg actccccgtc 1020
gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgtgctc aatgataccg 1080
cgagaccacac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccc 1200
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acggtgtgtc cattgctaca 1260
ggcatcgttg tgcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggtttagctc cttcggctc 1380
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560

```

五、發明說明 (106)

```

cgggataata cgcgcgcaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact 1680
cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 1800
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980
cgtatcacga ggccgtttcg tctcgcgctg ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
gagcagattg tactgagagt gcaccatatt cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
tcgggtcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtggc 2400
aagctagcgg cgcgcgttcc accaccaatc tcaaagcttg gtaccggga cctctgtatc 2460
ccagcacagt cctggaagag gcacagggga aataaaagcg gacggaggct ttccttgact 2520
cagccgctgc ctggtcttct tcagacctgt tctgaattct aaactctgag ggggtcggat 2580
gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa 2640
gccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag 2700
ggggaagcta ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg 2760
ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta 2820
tccgcaaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc 2880
tttctcagg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt 2940
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgcgaataaa cttctatccc agagaggcca 3000
aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 3060
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 3120
actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctgcgccg 3180
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agaggagaaa gtgccccac ctgctcctca 3240
gttcagcct gacccctcc catccttttg cctctgaccc tttttccaca ggggacctac 3300
ccctattgcg gtcctccagc tcacttttca cctcaccccc ctctcctcc ttggctttta 3360
ttatgctaata gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat ctttgacact gtgggtttctc 3420
tctttcctca atttaataat tattatctgt tgtttaccaa ctactcaatt tctcttataa 3480
gggactaaat atgtagtcac cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tccttcattc 3540
tattttaccc tatcatctc tgcaagacag tctcctcca aaccacaag ccttctgtcc 3600
tcacagtccc ctgggccatg gatcctcaca tcccaatccg cgcccgcaat tcgtaatcat 3660
ggtcatagct gtttctctgt tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 3720
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgag gagctaactc acattaattg 3780
cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 3840
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 3881

```

<210> 2
 <211> 4723
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：γI 重鏈質體

<220>
 <223> pCG7-96

```

<400> 2
gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccaggcct gacettggct ttggggcagg 60
gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccagggtga caccatagc ccatgagccc 120
agacactgga cgctgaacct cgcggacagt taagaaccca ggggcctctg cgccttgggc 180
ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg 240
ccatcgctc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 300
gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcagggcg 360
cctgaccagc ggctgcaca ccttccccgc tgtcctacag tctcaggac tctactccct 420

```

五、發明說明 (107)

cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 480
 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt ggtgagaggc cagcacaggg 540
 agggaggggtg tctgctggaa gccaggctca ggcctcctgc ctggacgcat cccggctatg 600
 cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc cegtctgcct cttcaccogg aggcctctgc 660
 ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggccttt tccccaggct ctgggcaggc 720
 acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg cacacaaagg ggcagggtgct gggctcagac 780
 ctgccaagag ccataatccg gaggaccctg cccctgacct aagccccacc caaaggccaa 840
 actctccact cctcagctc ggacacctc tctcctccca gattccagta actcccaatc 900
 ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccccacc tgcccaggta 960
 agccagccca ggccctcgcc tccagctcaa ggcgggacag gtgcccctaga gtacccctgca 1020
 tccagggaca ggcaccagcc ggggtgctgac acgtccacct ccactctctc ctcagcacct 1080
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctct tccccccaa aaccacaagg caccctcatg 1140
 atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 1200
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1260
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1320
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1380
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg acccgtgggg tgccgaggcc acatggacag 1440
 aggcgggctc ggcaccctc ctgcccctgag agtgaccgtc gtaccaacct ctgtccctac 1500
 agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tccgggatg agctgacca 1560
 gaaccaggtc agcctgacct gctggtcaa aggcctctat cccagcgaca tcgcccgtga 1620
 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 1680
 cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 1740
 gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1800
 cctctcctg tctccgggta aatgagtgcg acggccggca agcccccgct ccccgggctc 1860
 tcgctgctcg acagggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttccc ggcgcccagc 1920
 atggaaataa agcaccagc gctgcccctg gcccctgcga gactgtgatg gttctttcca 1980
 cgggtcaggg cgagtctgag gctgagtg gctgagggag gcagagcggg tccactgtc 2040
 cccacactgg cccaggctgt gcaggtgtgc ctgggcccc taggggtggg ctcagccagg 2100
 ggctgcccctc ggcagggtgg gggatttgcc agcgtggccc tccctccagc agcacctgcc 2160
 ctgggtggg ccacgggaag ccttaggagc cctggggac agacacacag cccctgcctc 2220
 tgtaggagac tgtcctgttc tgtgagcgcc cctgtcctcc cgacctccat gcccactcgg 2280
 gggcattgctc cgaggtcgac tctagaggat cccgggtac cgagctcgaa ttcctcgatg 2340
 atatcagatc tgccgggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgataag ccaggttaac 2400
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgatttg ggcctcttcc 2460
 gcttccctcg tcaactgactc gctgcgctcg gctgttcggc tgccgagagc ggtatcagct 2520
 cactcaaaag cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 2580
 tgagcaaaa ggcagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttcc 2640
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggca 2700
 aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtctc 2760
 cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctc ttctccctc gggaagcgtg 2820
 gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 2880
 ctgggtctgtg tgcacgaacc ccccgctcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 2940
 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 3000
 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 3060
 tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 3120
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 3180
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcttttgatc 3240
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg 3300
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 3360
 atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 3420
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgatg 3480
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 3540
 ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggcgagcgc 3600
 agaaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtt ccgggaagct 3660
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgaacggtt tgccattgac tacaggcatc 3720
 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 3780
 cgagttacat gatccccat gttgtgaaa aaagcgggta gtcctctcgg tccctccgat 3840
 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tctactatgg ttatggcagc actgcataat 3900
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 3960
 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 4020
 aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 4080

五、發明說明 (108)

```

cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 4140
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 4200
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 4260
ttcctttttc aatattattg aagcatttat caggggttatt gtctcatgag cggatacata 4320
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 4380
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 4440
acgaggccct ttctgtctgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg acacatgcag 4500
ctcccggaga cgttcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtcag 4560
ggcgcgtcag cgggtgttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag 4620
attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgttag aacgcggcta caattaatac 4680
ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact ata 4723

```

<210> 3

<211> 4694

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：γ4重鏈質體

<220>

<223> pG4HE

<400> 3

```

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccgggct gactttggct gggggcaggg 60
aggggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccagggtgcac acccaatgcc catgagccca 120
gacactggac cctgcatgga ccatcgcgga tagacaagaa ccgaggggccc tctgcgcct 180
ggggccagct ctgtcccaca ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca 240
agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cactccogag agcacagccg 300
ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg tggaaactcag 360
gcgcctgcag cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca ggactctact 420
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctoca gcagcttggg cacgaagacc tacacctjca 480
acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag aggccagcac 540
agggaggagg ggtgtctgct ggaagccagg ctacgcccct ctgcctggac gcaccccgcc 600
tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgcccctct gtctcctcac ccggaggcct 660
ctgaccaccc cactcatgct caggagagg gtcttctgga tttttccacc aggtcccggg 720
cagccacagg ctggatgccc ctaccccagg cctgcgcct acaggggagc gtgctgcgct 780
cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaaagg caccocaaag 840
gccaaactct ccaactccct agctcagaca ccttctctcc tcccagatct gactaactcc 900
caatcttctc tctgcagagt ccaaataatg tccccatgc ccatcatgcc caggtaagcc 960
aaccaggccc tcgcccctca gctcaaggcg ggacagggtc cctagagtag cctgcatcca 1020
gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcac ccacctccat ctcttccctca gcacctgagt 1080
tcttgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct 1140
cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgagggtcc 1200
agttcaactg gtacgtggat ggctgtggag tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 1260
agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc 1320
tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga 1380
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acgggggtgc agggccacat ggacagaggt 1440
cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt cctacaggg 1500
cagccccgag agccacagggt gtacaccctg ccccatccc agggaggagat gaccaagaac 1560
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg 1620
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1680
ggctccttct tctctacag caggctaacc gtggacaaga gcagggtggca ggaggggaat 1740
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1800
tcctgtctc tgggtaaatg agtgccaggg ccggcaagcc cccgctcccc gggctctcgg 1860
ggtcgcgcga ggatgcttgg cacgtacccc gtctacatac tcccaggca cccagcatgg 1920
aaataaagca cccaccactg ccctgggccc ctgtgagact gtgatggttc tttccacggg 1980
tcaggccgag tctgaggcct gagtgcacat agggaggcag agcgggtccc actgtcccca 2040
cactggccca ggcgtgtgag gtgtgccttg gccacctagg gtggggctca gccaggggct 2100

```

五、發明說明 (109)

```

gccctcggca ggggtggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca gctgcoctgg 2160
gctggggccac gggaagccct aggagccctt ggggacagac acacagcccc tgccctctgta 2220
ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgaccc cccatgcccc ctcgggggga 2280
tccccgggta ccgagctcga attcatcgat gatatacagat ctgocgggtct ccctatagt 2340
agtgcgtatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcgggc aacgcgcggg 2400
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctcaactgact cgctgcgctc 2460
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac ggttatccac 2520
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 2580
ccgtaaaaag gccgcgtttg tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 2640
caaaaaatga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 2700
gtttccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 2760
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 2820
tctcagttcg gtgtaggctg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca 2880
gcccagaccg tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga 2940
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 3000
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 3120
caaaaaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcaagtggaa 3240
cgaaaaactca cgtaagggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttgggtc 3360
tgacagttac caatgcttaa tcagtgaagg acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 3420
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480
tggcccccag gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc 3540
aataaaaccag ccagccggaa gggccgagcg tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3600
catccagttc attaatgtt ggcgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3660
gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgtcgtcgt ttggtatggc 3720
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tggttggtgaa 3780
aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttggtcaga agtaagttgg ccgcagtggt 3840
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgccat ccgtaagatg 3900
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgccggcagc 3960
gagttgctct tgcccgcggt caatacggga taataccgcy ccacatagca gaactttaaa 4020
agtgtctatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 4080
gagatccagt togatgtaac ccaactcgtg acccaactga tcttcagcat cttttacttt 4140
caccagcgtt tctgggtgag caaaaaacag aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag 4200
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta 4260
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 4320
aggggttccg cgcacatttc ccgaaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 4380
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcggttcgg 4440
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta 4500
agcggtatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgctca gcgggtgttg gcgggtgtcg 4560
gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatggacat 4620
attgtcggtt gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt 4680
taggtgacac tata 4694

```

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：針對Vκ01之5'區之探針

<400> 4

ccaccccata aacactgatt c

21

<210> 5

<211> 21

五、發明說明 (110)

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：針對V κ 01之5'區之探針

<400> 5

ttgatgcac cctacccaggg c

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：針對V κ L24及L25基因內區域之探針

<400> 6

cctgccttac agtgctgtag

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：針對V κ L24及L25基因內區域之探針

<400> 7

ggacagcaac aggacatggg

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：PCR引子neo

<400> 8

ctcgtgcttt acggtatcgc c

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：PCR引子5'EC1

<400> 9

aaactcgacc ccccgtagat c

21

五、發明說明 (111)

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列說明：PCR引子3'EC1

<400> 10

ttgactgtgg ccttaaactg gtag

24

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：用於製造人類抗體之轉殖基因轉殖染色體齧齒動物)

本發明提出可產生人類序列抗體之新穎的轉殖基因非人類哺乳動物，以及產製及使用此類抗體之方法。

英文發明摘要(發明之名稱：TRANSGENIC TRANSCHROMOSOMAL
RODENTS FOR MAKING HUMAN ANTIBODIES)

The present invention provides novel transgenic nonhuman mammals capable of producing human sequence antibodies, as well as methods of producing and using these antibodies.

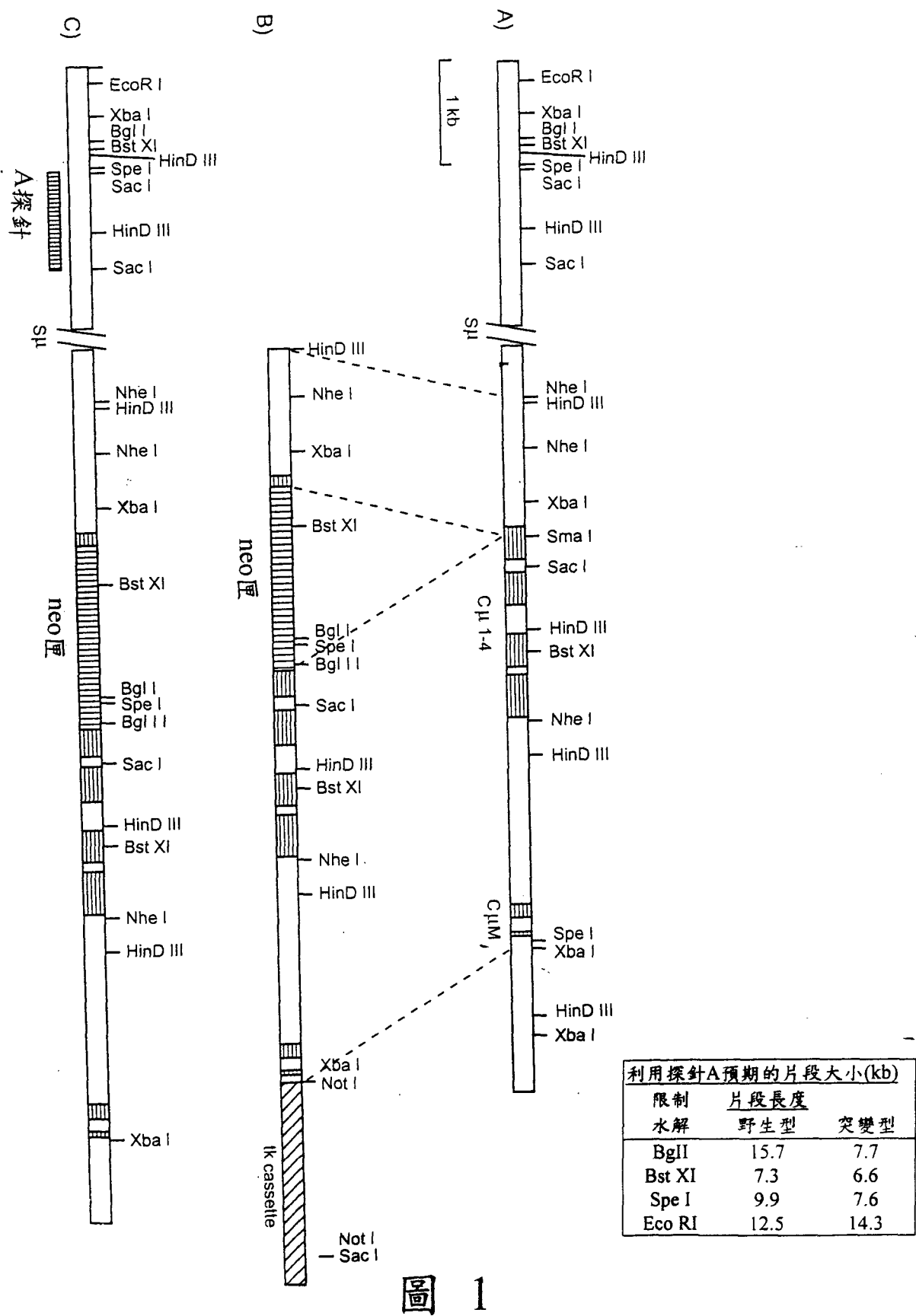


圖 1

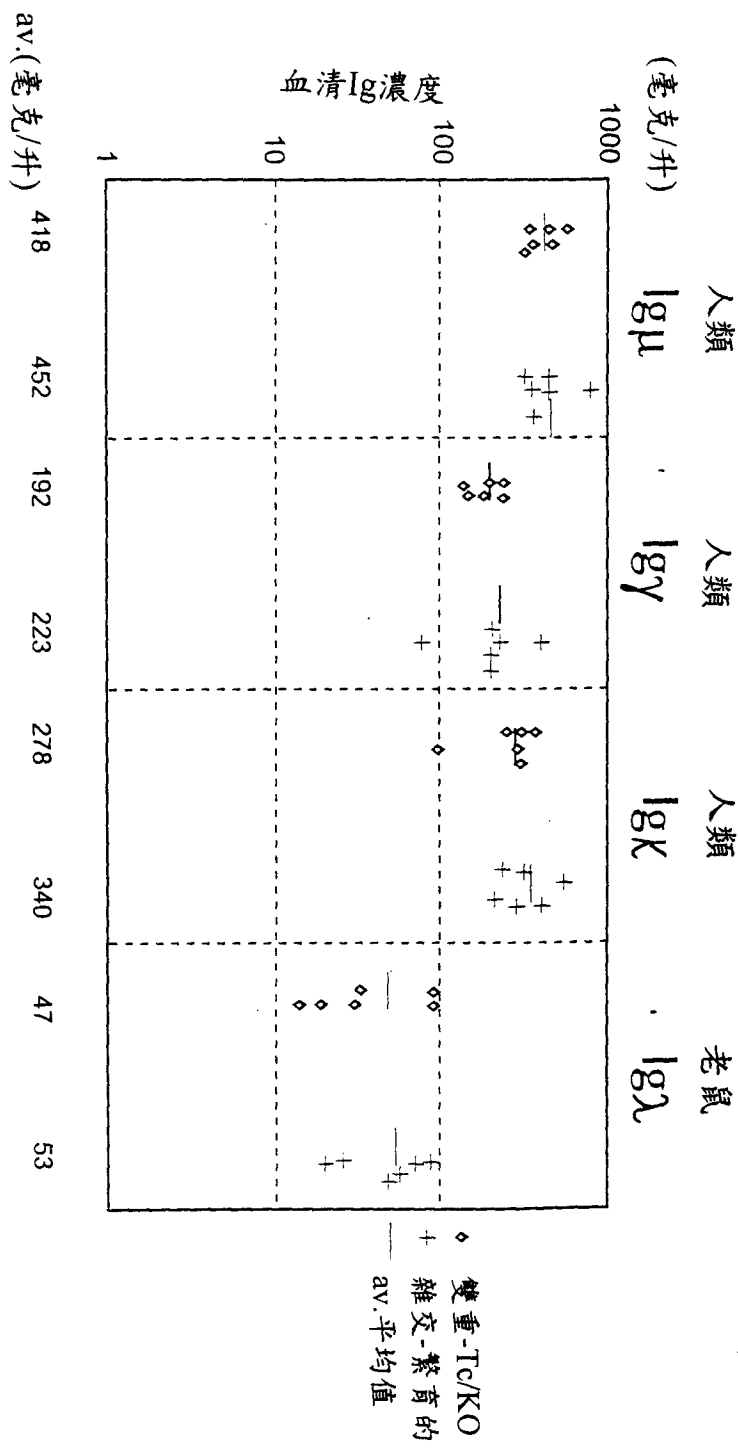


圖 2

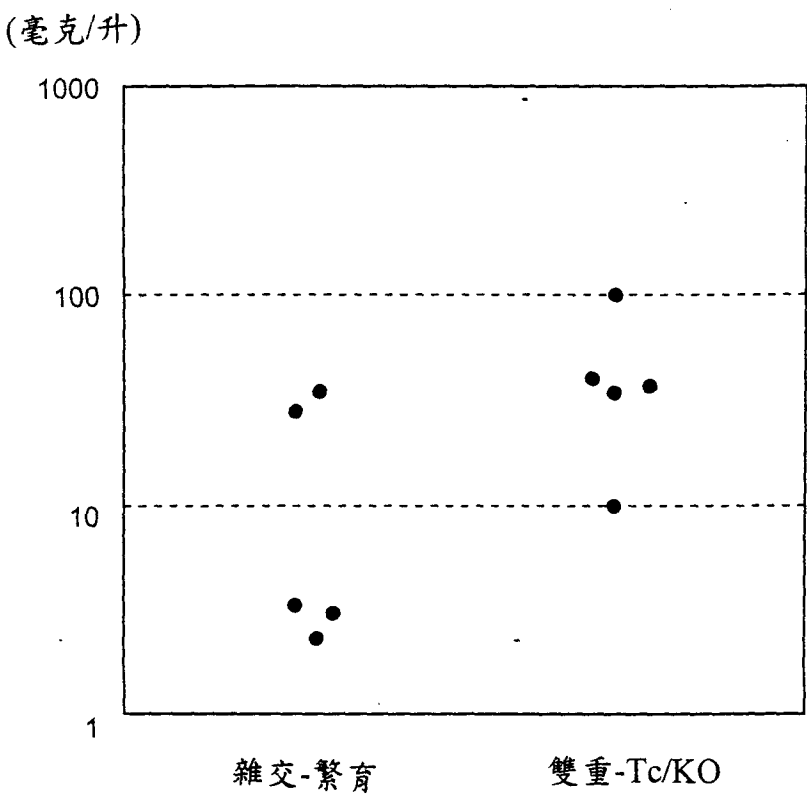


圖 3

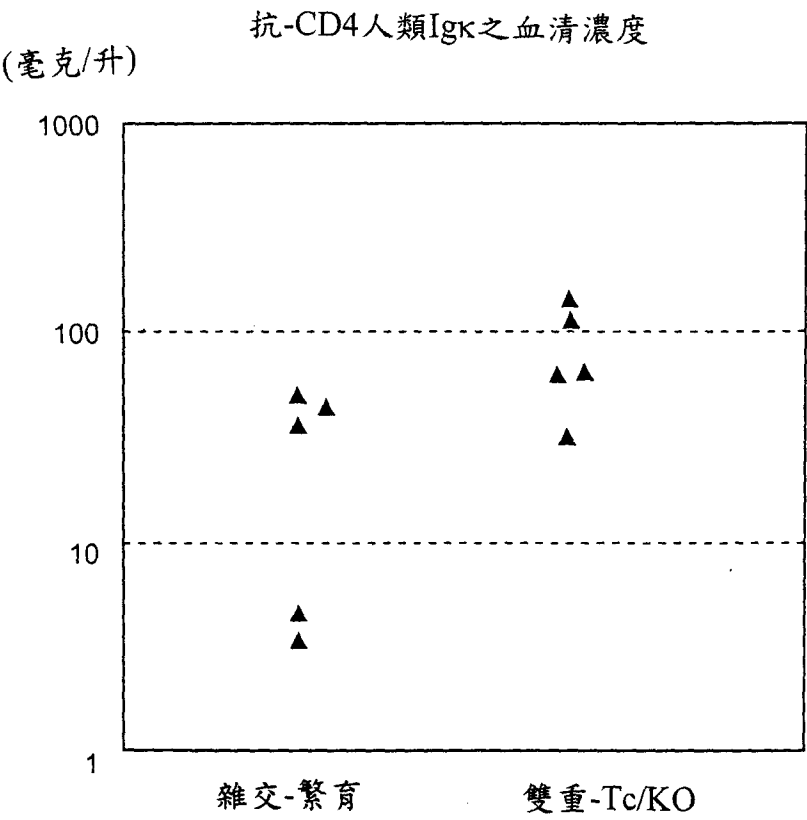


圖 4

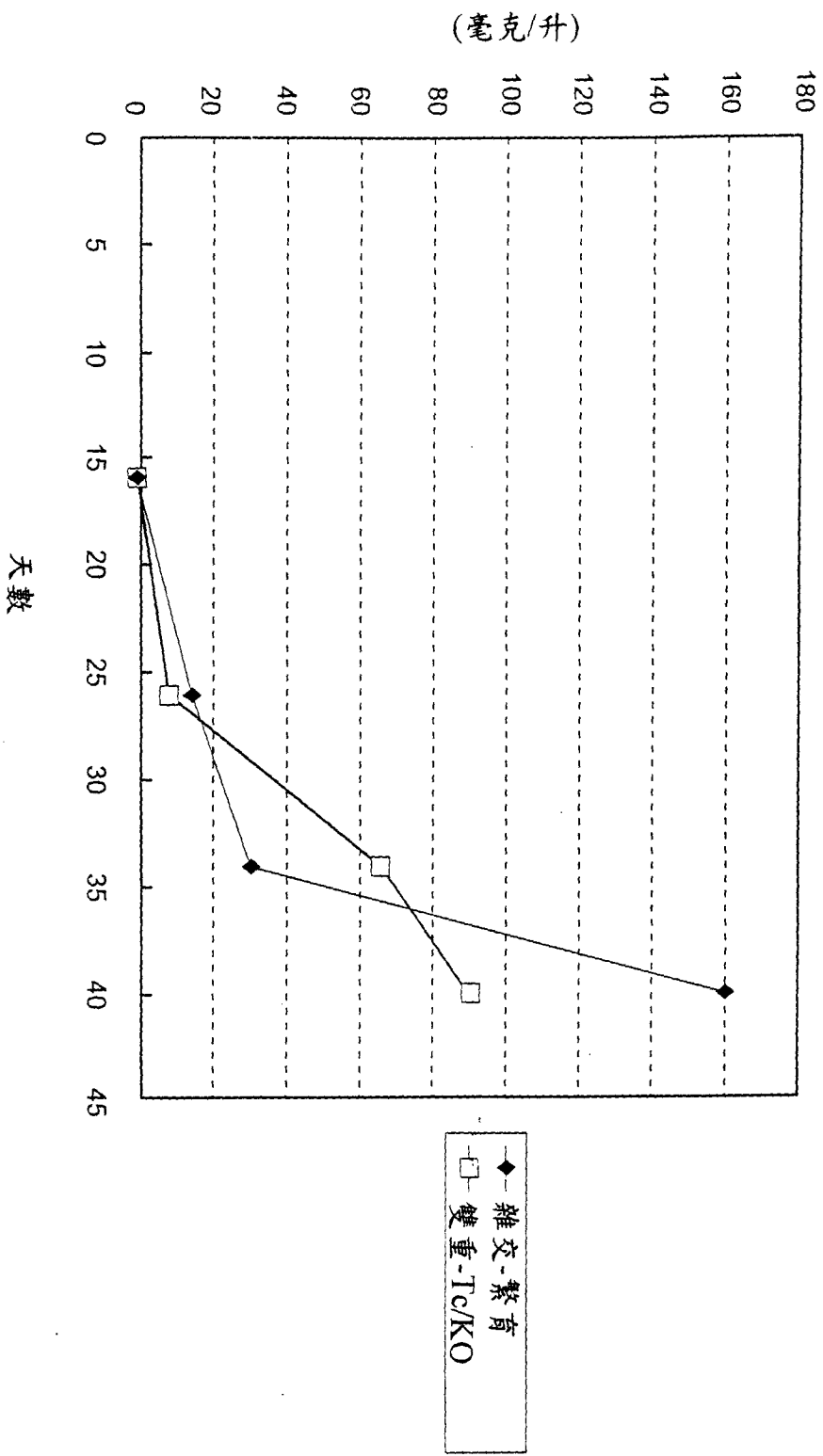


圖 5

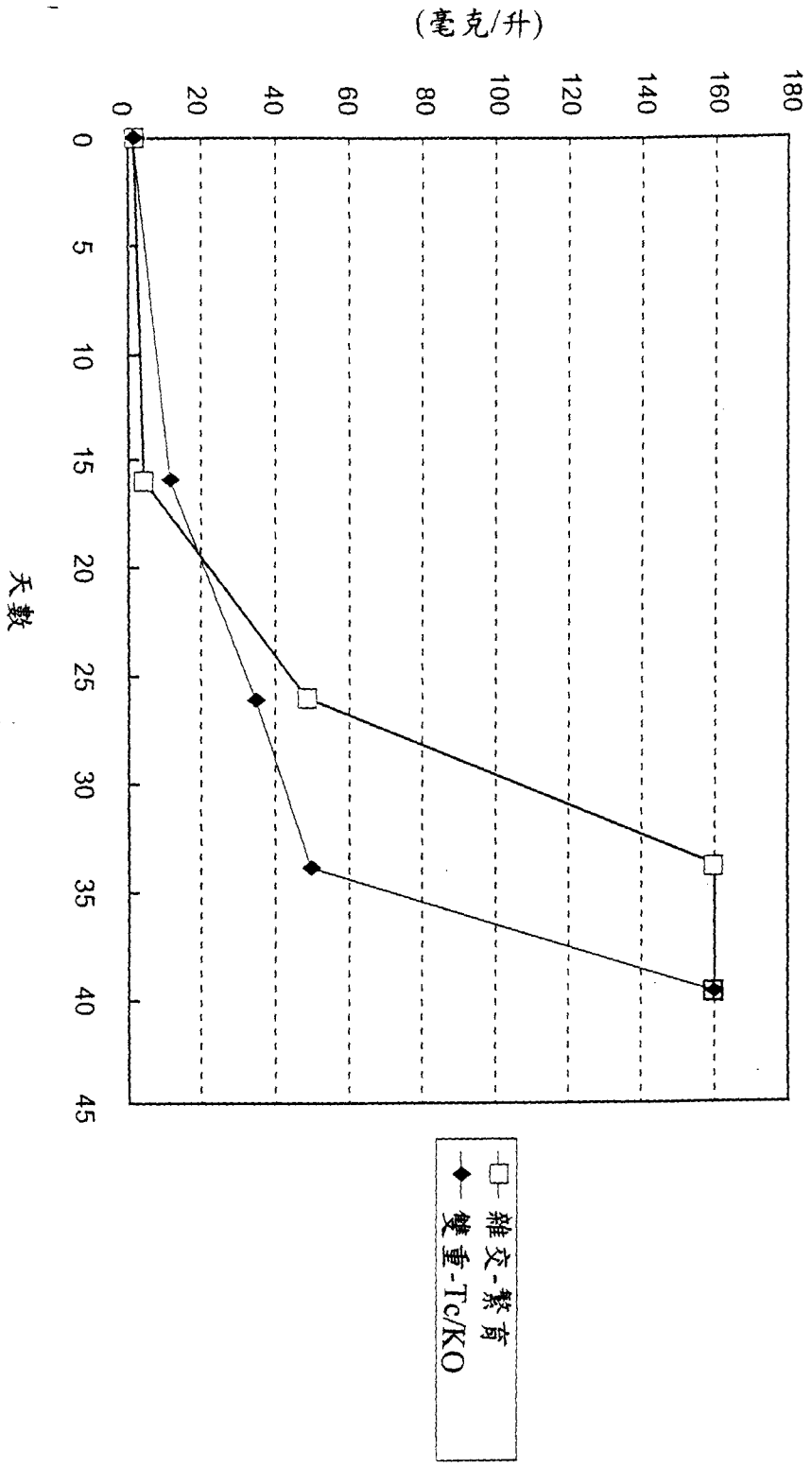


圖 6

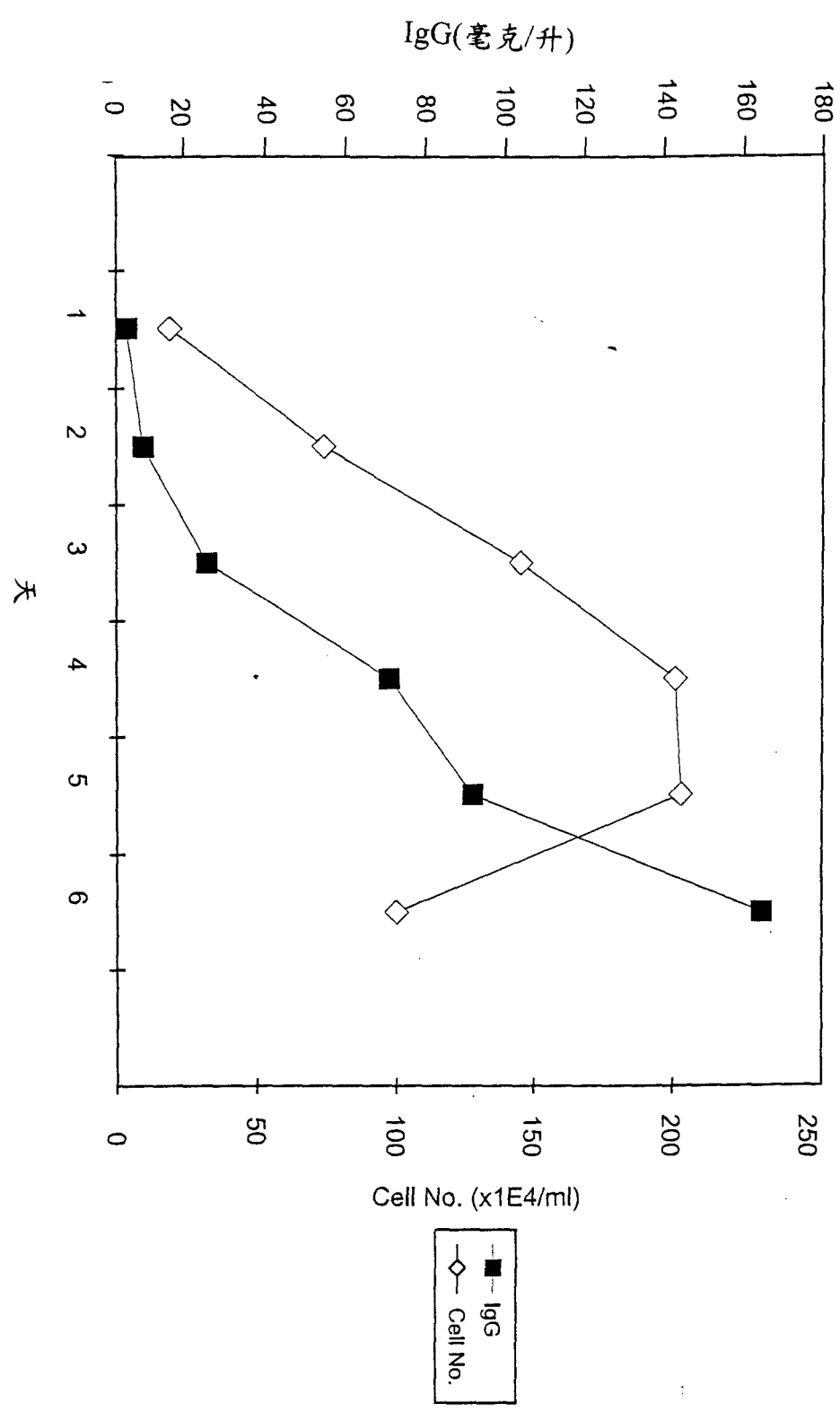


圖 7

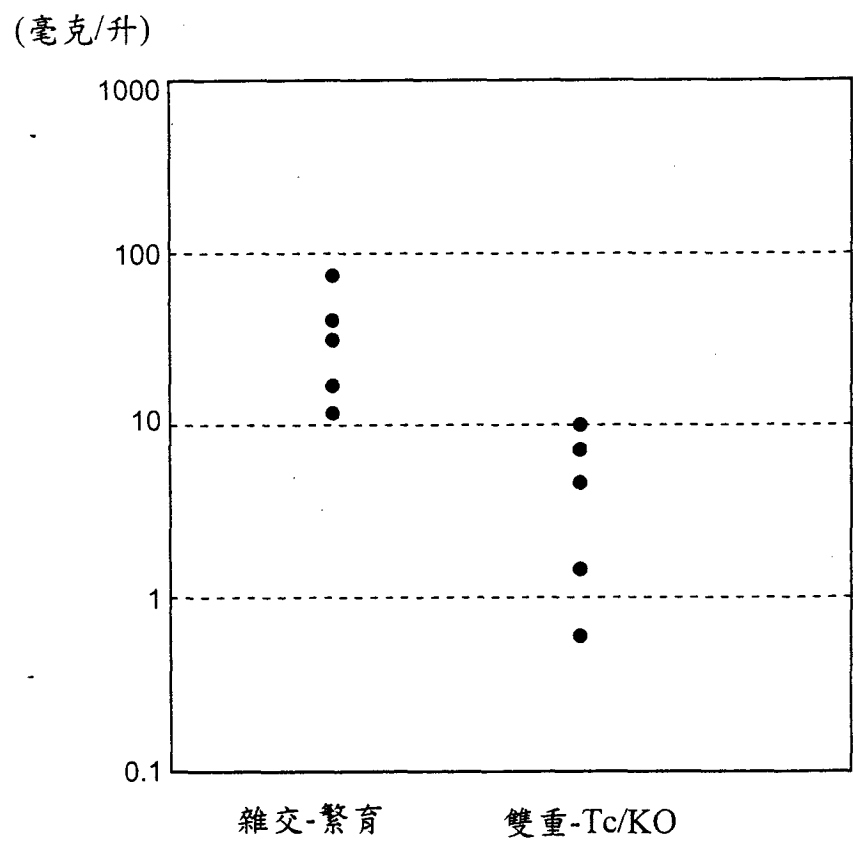


圖 8

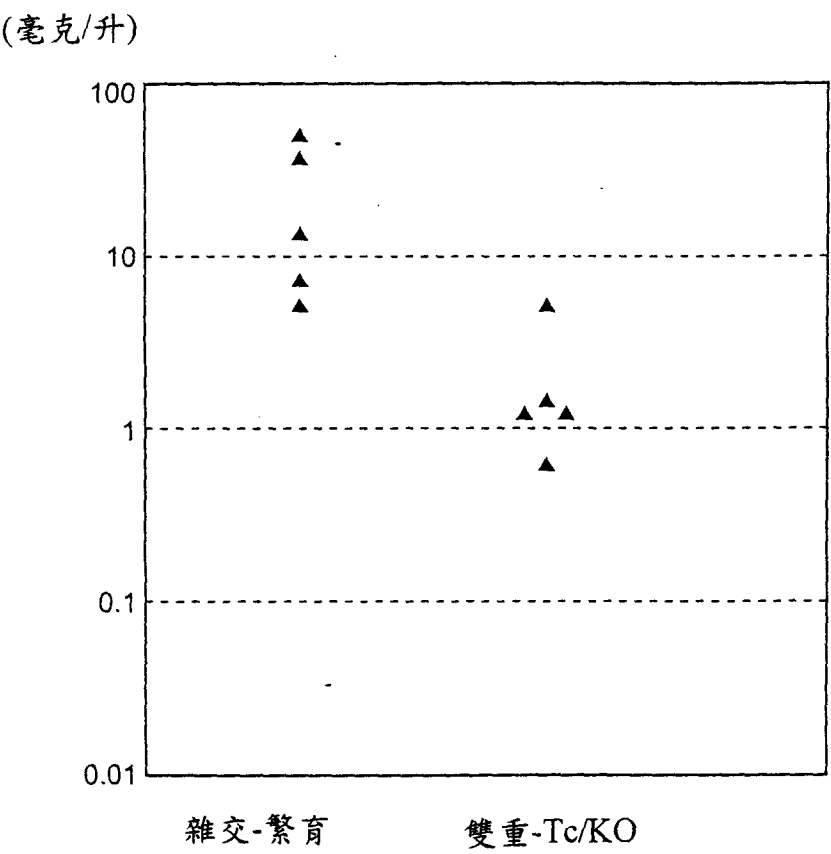


圖 9

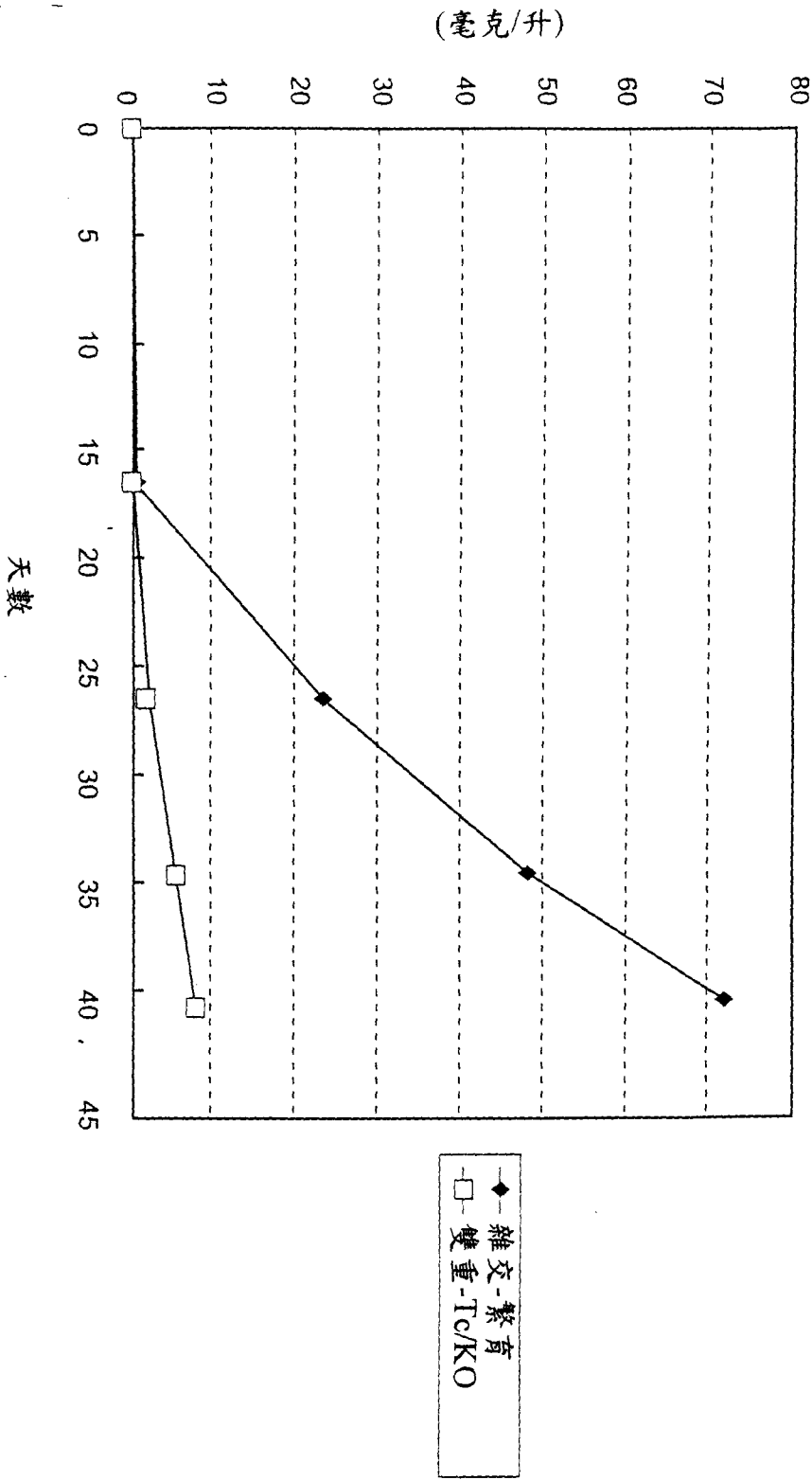


圖 10

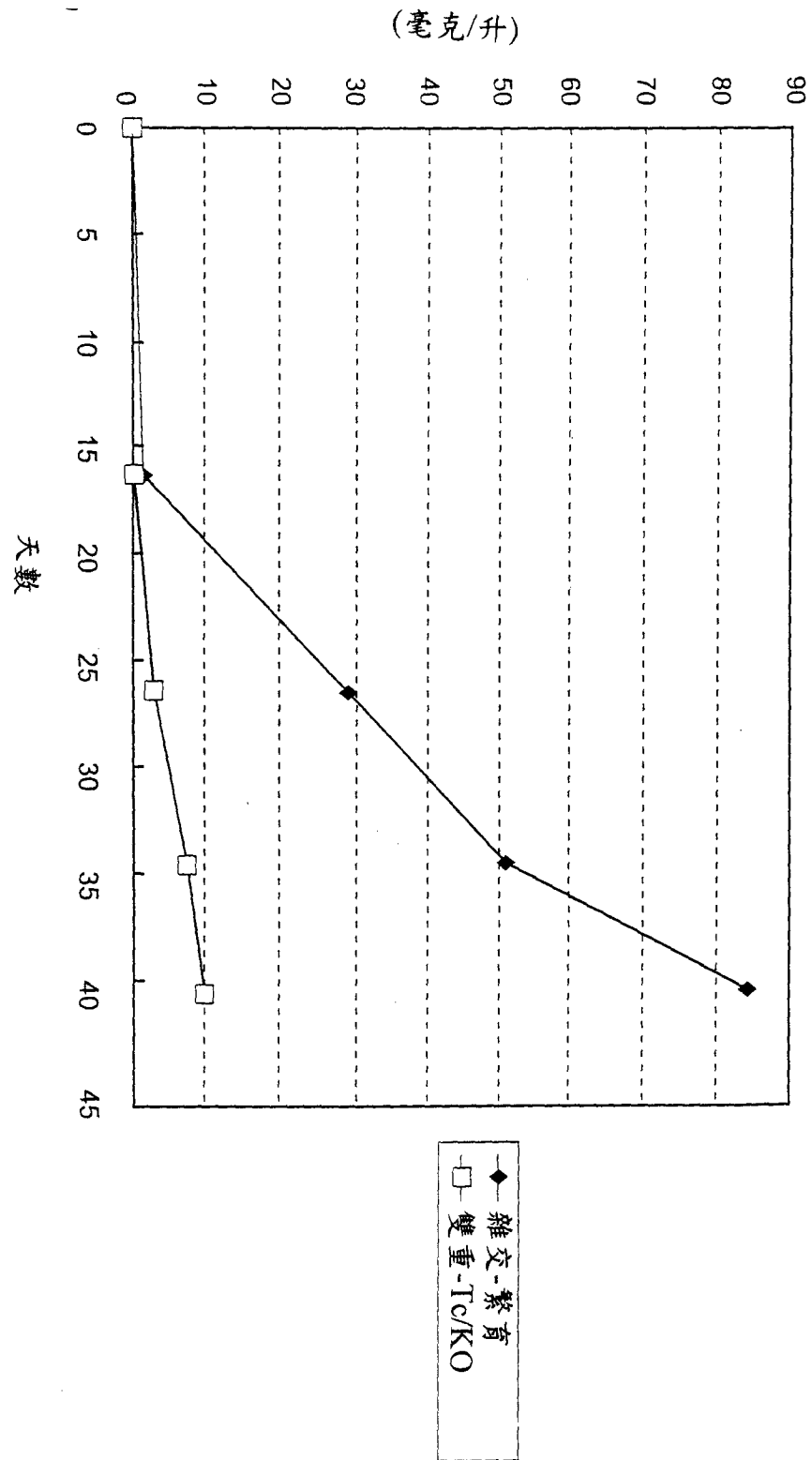


圖 11

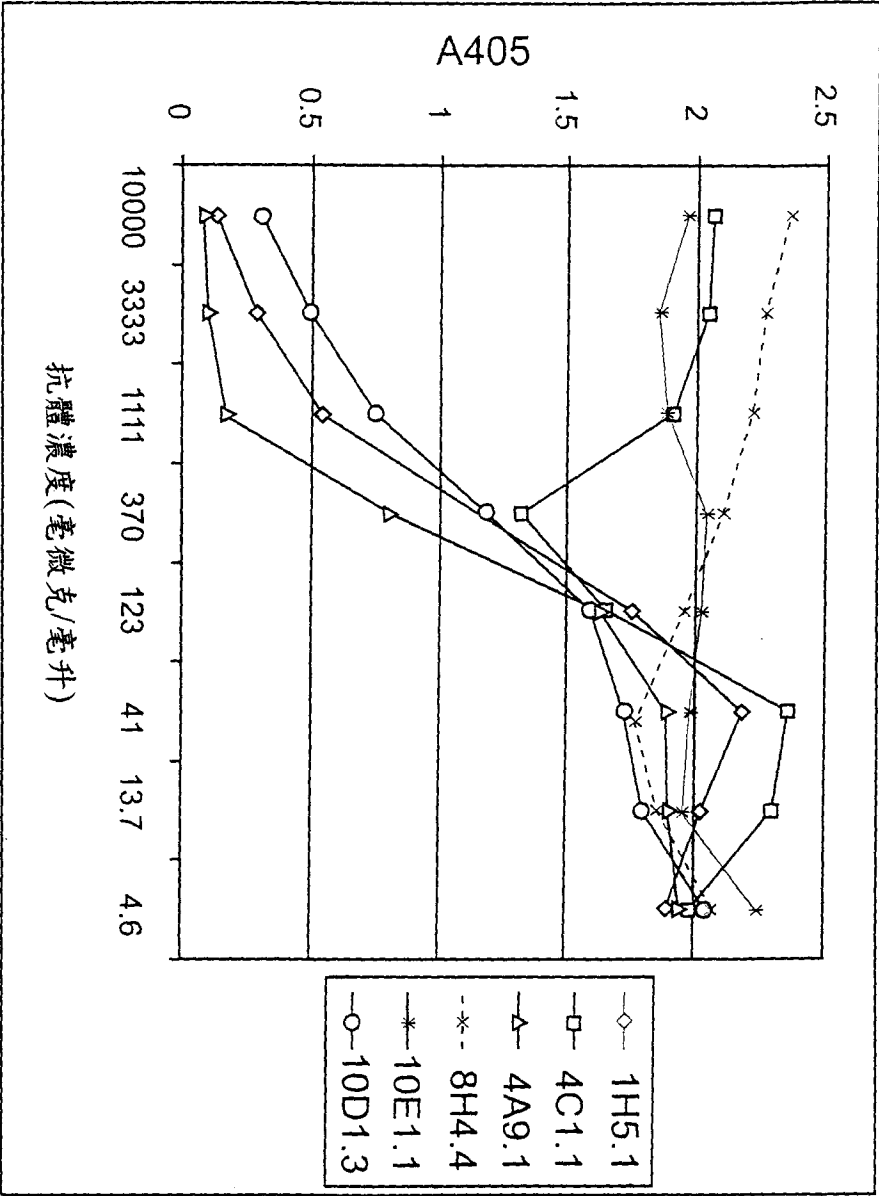


圖 12

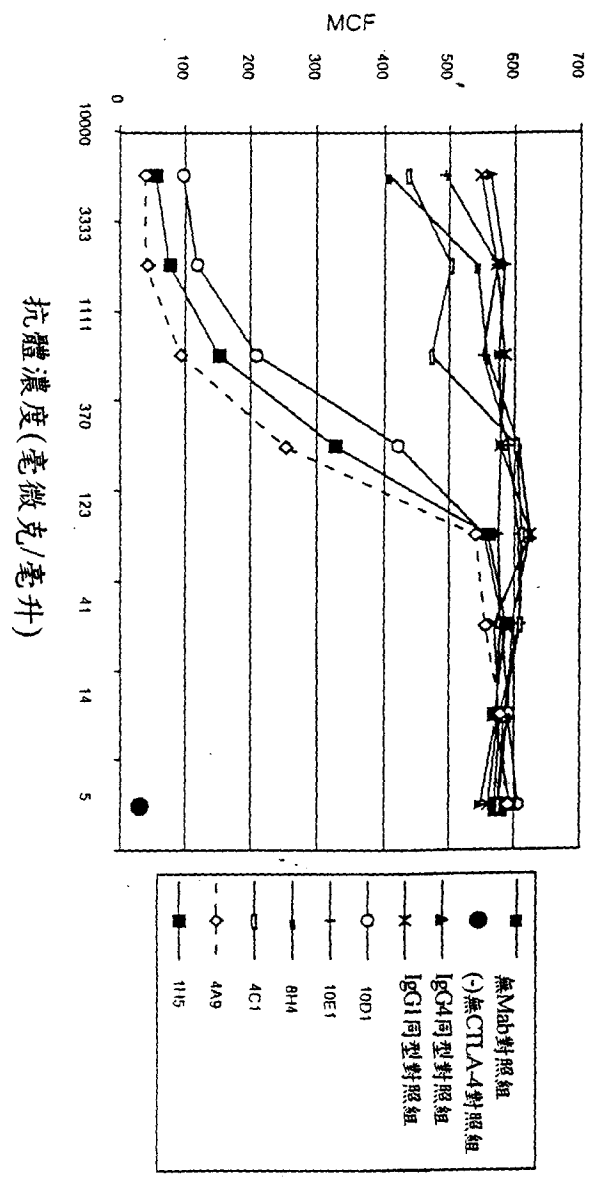


圖 13

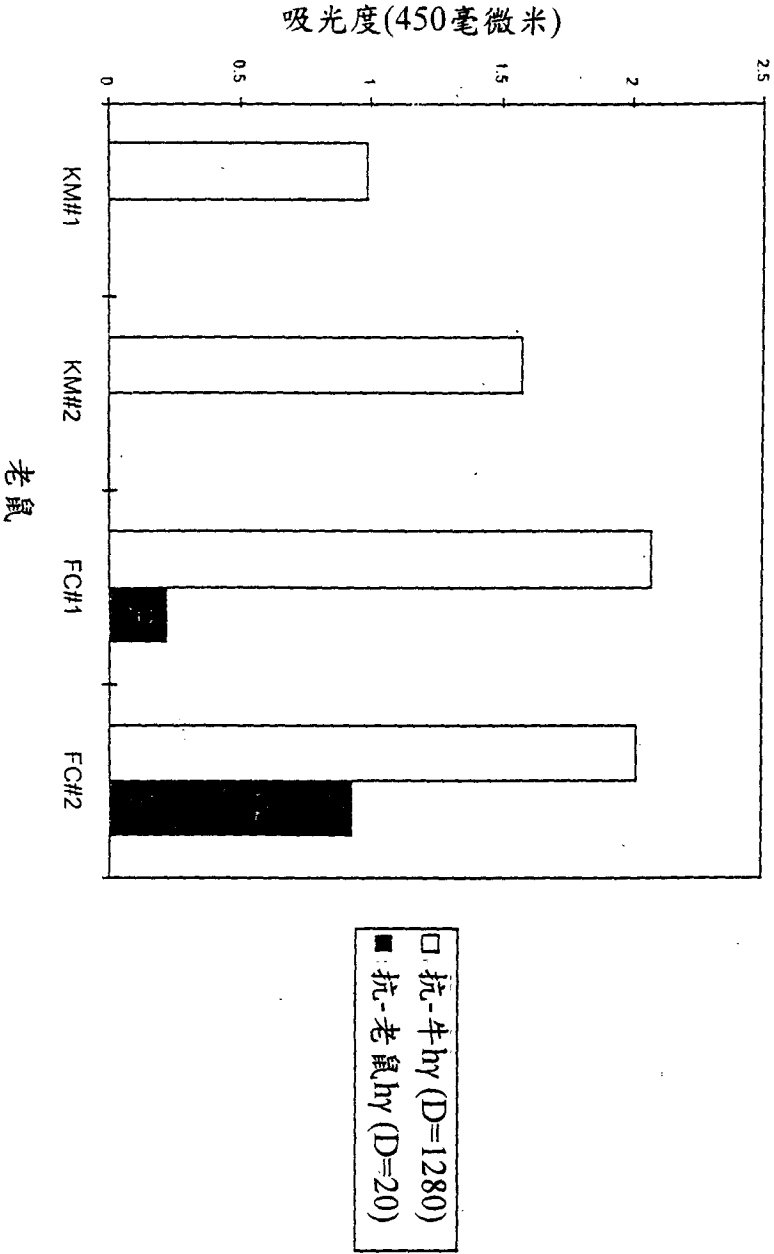


圖 14

申請日期	90.11.20
案 號	090129658
類 別	C12N ^{15/00} , 5/06, 5/00, A01K ^{67/00} , C07K ^{16/00}

A4

C4

中文說明書替換頁(97年4月)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	用於製造人類抗體之轉殖基因轉殖染色體齧齒動物
	英 文	TRANSGENIC TRANSCHROMOSOMAL RODENTS FOR MAKING HUMAN ANTIBODIES
二、發明人	姓 名	1.尼爾斯 隆伯格 NILS LONBERG 2.艾德 豪克 ED HALK 3.富塚 一磨 KAZUMA TOMIZUKA 4.石田 功 ISAO ISHIDA
	國 籍	1.-2.均美國 3.-4.均日本
	住、居所	1.美國加州伍德賽市西加州大道780號 2.美國加州陽光谷市艾德蒙大道1004號 3.日本國高崎市群馬縣矢島町110-1-405號 4.日本國神奈川縣串橋區伊勢原352-6號
三、申請人	姓 名 (名稱)	1.美商美達瑞克斯公司 MEDAREX, INC. 2.日商麒麟醫藥股份有限公司 KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA
	國 籍	1.美國 2.日本
	住、居所 (事務所)	1.美國加州麥皮塔市棉花田大道521號 2.日本國東京都涉谷區神宮前六丁目26番1號
	代 表 人 姓 名	1.W. 布蘭弗德 密斗考夫 W. BRADFORD MIDDLEKAUFF 2.淺野 克彥

五、發明說明(5)

修正

本93年2月2日

補充

殖的非人類哺乳動物中，人類輕鏈位點屬轉殖染色體，且人類重鏈位點與內源的哺乳動物染色體有關。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，轉殖的非人類哺乳動物是老鼠。在轉殖的非人類哺乳動物中，內源的哺乳動物重鏈位點及至少一種哺乳動物輕鏈位點是無活性的。在某些此轉殖的非人類哺乳動物中，內源的哺乳動物重鏈位點及 κ 輕鏈位點是無活性的。

在另一方面，轉殖的非人類哺乳動物進一步包括基因之突變，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在某些轉殖的非人類哺乳動物中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活化作用。

本發明進一步提出產生可表現人類抗體序列之許多的B細胞，方法包括：提出含有二種人類免疫球蛋白位點之轉殖的非人類哺乳動物，其中二人類免疫球蛋白位點之一是人類重鏈位點，且另一位點是人類輕鏈位點；且其中該位點僅一者屬轉殖染色體，並免疫接種轉殖的非人類哺乳動物以產生許多可表現人類抗體序列的許多B細胞。在此方法中某些，轉殖染色體是人類第14號染色體之片段。在此方法中某些，人類轉殖染色體是人類染色體片段SC20 (hCF (SC20))。此方法中某些進一步包括收集許多可表現人類抗體之B細胞表現序列。此方法中某些進一步包括將許多B細胞與經不朽化之細胞融合，以形成融合瘤。此方法其他進一步包括自融合瘤中收集人類抗體序列。在此方法中某些，人類抗體序列予以純化。此方法進一步包括收集編碼人

五、發明說明(6)

修正

本93年2月2日

補充

類抗體之序列。在此方法中，編碼人類抗體之序列係全長的。在某些方法中，編碼人類抗體之序列係在轉感細胞中表現。在某些方法中，人類輕鏈位點包括來自天然人類κ輕鏈位點之未重排的序列。在某些方法中，人類κ輕鏈位點係嵌入之KCo5導入之外來基因。在某些方法中，許多的B細胞包括至少一種第一B細胞，其所編碼的抗體有選自下列之第一同型，包括：IgA，IgD，IgE，IgG及IgM。在某些方法中，IgA同型是IgA₁或IgA₂。在某些方法中，IgG同型是IgG₁，IgG₂，IgG₃或IgG₄。在某些方法中，許多的B細胞進一步包括至少一種第二B細胞，其編碼的抗體有異於第一同型之第二同型，並選自下列包括：IgA，IgD，IgE，IgG及IgM。在某些方法中，B細胞有許多含有至少五個B細胞，其各自編碼具有不同同型之抗體，其中抗體之同型是IgA，IgD，IgE，IgG及IgM。在另一方面，轉殖的非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是FcγRIIB基因之失活化作用。

本發明進一步提出產生可與預定之抗原結合之人類序列抗體之方法，方法包括下列步驟：以預定之抗原免疫接種轉導之非人類哺乳動物，其中轉導之非人類哺乳動物包含有二個人類免疫球蛋白位點，其中二個人類免疫球蛋白位點之一是人類重鏈位點，另一者是人類輕鏈位點；且位點中僅一者是屬轉殖染色體的；並自經免疫接種之非人類哺乳動物中收集人類序列抗體。在另一方面，轉殖之非人類哺

五、發明說明(7)

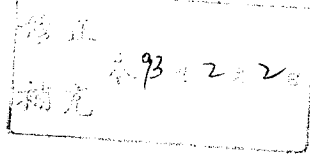
修正
93年2月2日
補充

乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活化作用。

本發明的人類序列抗體可包括各種抗體同型，或其混合物，如：IgG₁，IgG₂，IgG₃，IgG₄，IgM，IgA₁，IgA₂，IgD，及IgE。人類序列抗體可為全長的(如IgG₁，IgG₄，IgA₁或IgA₂抗體)或可僅包括抗原-結合部份(如，Fab，F(ab')₂，Fv或Fd片段)。某些人類序列抗體為重組體人類序列抗體。人類序列抗體通常可與平衡結合常數(K_a)至少10⁸ M⁻¹，10⁹ M⁻¹，10¹⁰ M⁻¹，10¹¹ M⁻¹，及10¹² M⁻¹之預定的抗原結合。本發明某些人類序列抗體是單株抗體。本發明某些人類序列抗體是抗原-特異的。

本發明進一步提出產生可分泌人類序列抗體之抗原-特異的融合瘤之方法，此方法包括：以預定的抗原免疫接種轉殖之非人類哺乳動物，其中轉殖的非人類哺乳動物包含有二個人類免疫球蛋白位點，其中二個人類免疫球蛋白位點之一是人類重鏈位點，且另一者是人類輕鏈位點；且僅一者是轉殖染色體，將來自轉殖之非人類哺乳動物之淋巴細胞與不朽化細胞融合，以形成融合瘤細胞；並決定由融合瘤細胞產生之抗體，與預定抗原之結合。在此方法中，抗原-特異的融合瘤純系，有50%以上可分泌具有人類重鏈及人類輕鏈之抗體。在另一方面，轉殖之非人類哺乳動物進一步包括基因之突變，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活

五、發明說明(8)



化作用。

本發明進一步提出產生可與預定抗原結合之人類序列抗體之方法，此方法包括以下步驟：以預定的抗原免疫接種轉殖的非人類哺乳動物；其中轉殖的非人類哺乳動物包含有二個人類免疫球蛋白位點，其中之一是人類重鏈位點，另一者是人類輕鏈位點，其中僅一者是轉殖染色體；並篩選於抗原反應性抗體存在下所形之融合瘤細胞。在此方法中，融合瘤細胞以大於20%之效率繼代選殖。在此方法中，抗原反應性抗體自培養中之融合瘤中分泌。在某些方法中，將實質上純的抗體調和以供治療使用。在另一方面，轉殖的非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是FcγRIIB基因之失去活化作用。

本發明進一步提出產製重排之免疫球蛋白序列之方法，此方法包括：提出轉殖的非人類哺乳動物，其中轉殖的非人類哺乳動物包含有二個人類免疫球蛋白位點，其中之一是人類重鏈位點，而另一者是人類輕鏈位點，其中僅一者屬轉殖染色體；並自轉殖之非人類哺乳動物中獲得重排之人類免疫球蛋白序列。在某些方法中，取得之步驟包括收集B細胞淋巴細胞，其中含有來自轉殖的非人類哺乳動物之重排之人類免疫球蛋白序列。在此方法中，取得步驟包括自B細胞淋巴細胞中分離及擴大mRNA以產生cDNA。此方法中某些包括自cDNA中分離及擴大重及輕鏈可變區序列。本發明進一步提出經分離之核酸，其編碼來自cDNA中這

五、發明說明(9)

修正

本93年2月2日

補充

些經擴大之重鏈可變區序列。本發明也提出經分離之核酸，編碼來自cDNA中這些經擴大之輕鏈可變區序列。在另一方面，轉殖之非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應，在此方法中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活作用。

在另一方面，本發明提出編碼本發明人類序列抗體，或抗原-結合部份之核酸分子。因此，重組體表現載體包括本發明之抗體-編碼之核酸，及以此載體所轉感之宿主細胞(或這些宿主細胞之子代)，包括在本發明內的尚有製備本發明抗體之方法，係培養這些宿主細胞。此方法包括在可使核酸表現之條件下培養宿主細胞；並自培養的宿主細胞或其培養基中回收核酸。宿主細胞中某些是真核細胞。此表現載體包括編碼本發明重及輕鏈可變區序列之核酸，其中重及輕鏈可變區序列與可控制宿主細胞中核酸表現之調控序列操作性連結。

本發明進一步提出產製人類抗體呈現庫之方法，此方法包括：將免疫原引入至非人類轉殖之哺乳動物中，其中的轉殖非人類哺乳動物包括有二個人類免疫球蛋白位點，其中之一是人類重鏈位點，且另一者是人類輕鏈位點，其中僅一種是屬轉殖染色體；自非人類轉殖動物之淋巴細胞中分離編碼人類抗體鏈之核酸族群；並形成可呈現出抗體鏈之呈現包裝庫，其中庫內成員包括編碼抗體鏈之核酸，且抗體鏈自包裝中呈現。在此方法中，非人類之轉殖哺乳動物當進行分離步驟時係缺乏對免疫原之可偵測效價。在此

五、發明說明(10)

修正

本93年2月2日

補充

方法中，免疫原是核酸。在此方法中，核酸編碼與膜結合之受體。在另一方面，轉殖之非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體免疫力之免疫反應。在此方法中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活化作用。

本發明進一步提出產生人類序列抗體，或其片段之方法，其係可結合至預定之抗原，方法包括以下步驟：以預定的抗原免疫接種轉殖的非人類哺乳動物，其中的轉殖非人類哺乳動物包括二個人類免疫球蛋白位點，其中之一是人類重鏈位點，且另一者是人類輕鏈位點，其中僅一者是轉殖染色體；自經免疫之轉殖非人類哺乳動物中收集抗體之V區序列；所收集之V區選殖至DNA載體內，以產生表現庫；表現基因庫以鑑定可編碼抗體之V區序列，或其片段，其係可與預定的抗原結合。在另一方面，轉殖之非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是Fc γ RIIB基因之失活化作用。

本發明進一步提出產生可與預定抗原結合之人類序列抗體或其片段之方法，此方法包括以下步驟：以預定抗原免疫接種轉殖之非人類哺乳動物，其中的轉殖非人類哺乳動物包含有至少二個人類免疫球蛋白位點，其中之一是人類重鏈位點，且另一者是人類輕鏈位點；且其中至少一個位點屬轉殖染色體；自經免疫之轉殖非人類哺乳動物之B細胞中或自B細胞與不朽細胞融合而生成之融合瘤中分離編碼

五、發明說明 (11)

修正

本93年2月27日

補充

至少一種人類抗體V區之cDNA，選殖該cDNA至表現載體；該載體引入宿主細胞中；培養該宿主細胞；自該宿主細胞或其培養基中收集人類序列抗體或其片段。在此方法中，分離步驟以PCR進行。在此方法中某些，分離步驟以cDNA庫篩選來進行，並利用至少一種DNA探針。在此方法中某些，分離步驟由噬菌體呈現庫篩選方法予以進行。在此方法中某些，cDNA可編碼全長的人類抗體序列。在某些方法中，所收集之人類序列抗體同型，與該經免疫之轉殖非人類哺乳動物之抗體產製細胞同型不同。在另一方面，轉殖之非人類哺乳動物進一步包括基因之突變作用，其中突變作用可增加對自體抗原之免疫反應。在此方法中，突變作用是FcγRIIB基因之失活化作用。

本發明進一步提出改進轉殖染色體老鼠融合瘤細胞之穩定性之方法，此細胞可表現與預定之抗原反應之人類抗體，方法包括：飼養第一隻老鼠，第一隻老鼠在轉殖染色體上含有一個第一人類免疫球蛋白位點，加上第二隻老鼠，第二隻老鼠含有一個第二人類免疫球蛋白位點，嵌入內源之老鼠染色體內；自飼養中取得第三隻老鼠，第三隻老鼠含有第一及第二人類免疫球蛋白位點；以預定的抗原免疫接種於第三隻老鼠，或其子代；自經免疫之老鼠中收集B細胞；並將B細胞與不朽化之細胞融合以得可表現與預定抗原反應之人類抗體之融合瘤細胞。此方法進一步包括：將融合瘤細胞培養在培養基中；測試培養基以鑑定可表現與預定抗原反應之人類抗體之融合瘤細胞之存在。稀釋融合

五、發明說明 (83)

修正
補充

93.2.28

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:722-727)。這些老鼠與 KCo5-9272 人類 κ 轉殖基因嵌入之同合子老鼠，及分別是內源重鏈及 κ 鏈位點 CMD 及 JKD 瓦解之同合子培育。CMD 突變述於上實例 1。JKD 突變述於 U.S. Patent No. 5,770,429 及 Chen et al., 1993, EMBO J. 12: 821-830)。由這些配對來之子代為 hCF(SC20)轉殖染色體陽性(SC20/KCo5老鼠，或雜交繁育的老鼠)，為 6 種不同遺傳修飾半合子的：SC20，KCo5，CMD，CM2D，JKD，及 CKD。然而，由於內源重鏈位點之 CMD 及 CM2D 突變可避免老鼠 μ 基因之表現，內源 κ 位點之 JKD 及 CKD 突變可避免老鼠 κ 之表現，這些 SC20/KCo5 老鼠為此二位點各自瓦解之同合子。因此，老鼠係依 SC20 及 KCo5 轉殖基因而表現含有 κ 輕鏈之抗體。其也可形成雜交的人類/老鼠抗體，因為內源老鼠 λ 輕鏈位點保留有功能。老鼠也可表現嵌合的人類/老鼠抗體，其中含有人類重鏈 V 區及老鼠非- μ 重鏈同型固定區序列。這些嵌合抗體可由人類 SC20 IgH 位點經由類型轉換由染色體轉位至老鼠 IgH 位點而形成。此"反-轉換"事件先前可見於含有迷你-位點重鏈轉殖基因之老鼠(Taylor, L. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 579-591)。40 隻雄性 Kco5/CMD/JKD 老鼠及 98 隻雌性 hCF(SC20)/CM2D/CKD 老鼠間之雜交繁育可生成 305 個子代。由這些子代血清樣品之 ELISA 分析(Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)顯示，305 中有 125 (41%) 子代為人類 Ig μ 鏈表現陽性的。偵測人類 Ig κ 鏈之進一步分析顯示，所有的 h μ -陽性個體也是 h κ -陽性，

五、發明說明 (85)

93.2.28
第九

子特有的(Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)。因此，此六隻雜交繁育老鼠為 λ (低)突變之同合子，其可用於有效率產製可分泌含有人類Ig重及 κ 輕鏈之抗體之融合瘤。

實例 5

抗-人類CD4人類單株抗體之產製

抗原之免疫接種。雜交繁育老鼠及雙重-Tc/KO老鼠(n=5)在第0天時，以100微克可溶性人類CD4(sCD4)於完全的Freund's佐劑(Sigma)中皮下注射而免疫接種，繼之在第9、19及27天時於不完全Freund's佐劑中(Sigma)免疫接種。在第37天給予40微克sCD4於PBS之最終靜脈內注射。

老鼠中之人類反應。在第0、16、26、34及40天時收集血清。以酵素-鏈結之免疫吸附分析(ELISA)偵測抗原-特異的人類Ig γ 及Ig κ ，以產製相對於sCD4之單株抗體。ELISA之詳細策略述於實例4。抗原-特異的盤以1微克/毫升抗原於重碳酸鹽緩衝溶液(Sigma)塗佈一夜。定量抗原-特異的Ig γ 及Ig κ ，利用與抗原特異的人類單株抗體IgG之一為標準品。結果示於圖3、4、5及6。人類 γ 及 κ 反應可在雜交-繁育老鼠及雙重-Tc/雙重-KO老鼠中，於最初免疫接種後34天觀察到。

融合瘤之產生。來自經免疫老鼠之脾細胞，在第40天時融合至Sp2/0-Ag14細胞。細胞懸液接種至384-孔洞盤，每孔洞有 20×10^3 脾細胞。生成之融合瘤進行sCD4單株抗體產製之篩選。結果示於表2中。

五、發明說明 (86)

93 2 2

表 2

CD4單株抗體之產製

	雜交-繁育	雙重-Tc/KO
有集溶之孔洞數目	1265	720
抗原特異的 $h\gamma/h\kappa$ 陽性孔洞數	18	4
抗原特異的 $h\gamma/m\lambda$ 陽性孔洞數	0	0
繼代選殖親代孔洞數	14	1
繼代選殖效率(%)	88	21

來自雜交-繁育老鼠之親代融合瘤，在高效率下以二輪的有限稀釋繼代選殖。來自雜交-繁育老鼠的所有融合瘤，可分泌人類 γ /人類 κ 抗-CD4 MAbs，而無一融合瘤可分泌人類 γ /鼠 λ 抗-CD4 MAbs。這些數據顯示，在產生抗原-特異的人類單株抗體上，雜交-繁育老鼠優於雙重 TC/KO 株。為這些繼代選殖融合瘤所分泌之 MAbs 同型，由許多 ELISAs 進一步檢查。7 個孔洞為 $h\gamma 1^+$ 而 7 個孔洞為 $h\gamma 4^+$ 。

抗-CD4 人類 IgG₁，單株抗體在小規模培養中之生長曲線及分泌水平。產製抗-CD4 人類 IgG₁ κ 之融合瘤純系之一 (KM2-3)，可用於決定人類單株抗體在小規模培養中之生長曲線及分泌水平。KM2-3 融合瘤細胞以 1×10^5 細胞/毫升，在第 0 天時種入 4 升之紡錘狀燒瓶內 (Bellco)。以添加有 ITS-X (Gibco BRL) 及 1% 低 IgG 血清 (Hyclone) 之 1 升 ERDF 培養基為培養。每天收集 1 毫升培養基，再以先前報告所述之

五、發明說明 (87)

修正

本 93 年 2 月 2 日

補充

ELISA 偵測細胞數及 IgG₁ κ 濃度 (Tomizuka, K. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 722-727)。這些結果示於圖 7。經估算之產製率為 24.6 微微克/細胞/天，其和在此些條件下之極佳鼠融合瘤所預期之結果類似。

實例 6

抗-人類 G-CSF 人類單株抗體之產製

抗原之免疫接種。雜交-繁育老鼠及雙重-Tc/KO 老鼠 (n=5) 在第 0, 9, 19, 27 天時，以 100 微克可溶性人類 G-CSF 於 Titer Max Gold 佐劑 (CytRx) 皮下注射免疫接種。在第 37 天對雜交-繁育老鼠及雙重-Tc/KO 老鼠給予 20 微克 G-CSF 於 PBS 之最終靜脈內注射。

老鼠各種系之體液反應。在第 0, 16, 26, 34 及 40 天時收集血清。以 ELISA 定量抗原-特異的人類 Igs 濃度。抗原-特異的盤以抗原在 1 微克/毫升下塗佈，於重碳酸鹽緩衝溶液 (Sigma) 中一夜。定量抗原-特異的 Igγ 及 Igκ，利用人類單株抗體 IgG 特異於 G-CSF 之一為標準品。結果示於圖 8, 9, 10 及 11。在雜交-繁育老鼠血清中抗原-特異的 hγ 及 hκ 濃度約 10 倍高於在雙重-Tc/KO 老鼠中。

融合瘤之產製。以經免疫老鼠之脾細胞在第 40 天時融合至 Sp2/0-Ag14 細胞，生成之融合瘤以 ELISA 篩選，以產製相對於 G-CSF 之單株抗體 (MAbs)。結果示於下表 3 中。

五、發明說明 (88)

修正

補充

93年2月2日

表 3

G-CSF單株抗體之產製

	雜交-繁育	雙重Tc/KO
有群落之孔洞數	3880	1580
抗原特異的hy/hk陽性孔洞數	13	3
抗原特異的hy/mλ陽性孔洞數	13	0
繼代選殖親代孔洞數	11	2
繼代選殖之效率(%)	83	64

可產製抗-G-CSF IgG之融合瘤有一半會分泌人類 γ /人類 κ 抗-G-CSF MAbs，其他的融合瘤分泌人類 γ /鼠 λ 抗-G-CSF MAbs。產製hy及hk抗體之融合瘤以二輪有限稀釋繼代選殖。進一步的ELISA實驗證明，5，3，及3孔洞分別是hy1⁺，hy2⁺，及hy4⁺。

實例 7

抗-人類血清白蛋白人類單株抗體之產生

雜交-繁育老鼠在第0天以50微克人類血清白蛋白於完全Freund's佐劑(Sigma)中腹膜內注射免疫接種之，繼之在第7，14及21天於不完全Freund's佐劑(Sigma)中免疫接種。

融合瘤之產生。來自經免疫老鼠之脾細胞在第24天時融合至Sp2/0-Ag14細胞，生成之融合瘤以ELISA篩選，以產製抗原之單株抗體(MAbs)。自可產製抗-白蛋白hy之融合瘤中任意選出10個融合瘤孔洞。並繼代選殖之。所有的融合瘤均可分泌人類 γ /人類 κ 抗-白蛋白。此數據顯示，雜交-繁育的老鼠在產製抗原-特異的完全人類單株抗體上優於雙重-Tc/雙重-KO老鼠，因為2/3的抗-白蛋白IgG融合瘤，得

五、發明說明 (91)

修正
本 3 + 2 + 2 =
補充

分別的實驗中，將來自老鼠 #22227，22230 及 22231 之脾細胞與老鼠骨髓瘤細胞融合(種系 P3 X63 Ag8.6.53，ATCC CRL 1580，或 SP2/0-Ag14，ATCC CRL 1581)。細胞培養在 DMEM 10% FBS，OPI (Sigma O-5003)，BME (Gibco 21985-023) 及 3% Origen Hybridoma Cloning Factor (Igen IG50-0615)。在最初的生長及選擇中，於培養基中加入 HAT 或 HT 添加物。

融合瘤篩選。為鑑定可分泌抗原反應性人類 IgG 抗體之融合瘤，ELISA 盤(Nunc MaxiSorp)在 4°C 下以 100 微升/孔洞人類 CD152 Mu-Ig 融合物(Ancel # 501-820)在 0.2 微克/毫升於 PBS 下塗佈一夜。盤洗滌，並以 100 微升/孔洞 PBS-Tween 含有 1% BSA 阻斷。加入 50 微升細胞培養物上清液，繼之培育 1-2 小時。盤洗滌，再與 100 微升/孔洞山羊抗-人類 γ 重鏈共軛至鹼性磷酸酶(抗-人類 γ (fc) AP Jackson # 109-056-098) 共培育 1 小時。盤在各步驟間以 PBS-Tween 洗三次。可鑑定出 76 個融合瘤，其可分泌 γ 陽性，抗原反應性抗體。這些純系再進一步分析以決定 γ 重鏈或輕鏈同型，以及摻雜的 IgM 分泌細胞之存在(表 4)。

表 4

自含有抗原反應性人類 IgG 抗體之 1° 融合瘤孔洞中

分析重鏈同型

Mouse ID #	IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	Ig κ	Ig λ	All IgG
22227	0	4	1	0	3	7	0	8
22230	9	25	8	5	7	48	6	45
22231	1	11	2	3	7	23	1	23
total	10	40	11	8	17	75	7	76

五、發明說明 (92)

93.2.2

先測試融合瘤上清液中是否存在有抗原反應性人類 IgG。76 個陽性上清液再針對抗原反應性人類 IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, Igκ 及老鼠 Igλ 進行測試。捕獲試劑：人類 CD152 mu-Ig 融合體 (Ancel # 501-820)。偵測試劑：抗-人類 γ (fc) HRP (Jackson # 109-036-098); 抗-人類 κ HRP (Bethyl # A80-115P); 抗-人類 γ 1 HRP (Southern Biotech #9050-05); 抗-人類 γ 2 HRP (Southern Biotech #9070-05); 抗-人類 γ 3 HRP (Southern Biotech #9210-05); 抗-人類 γ 4 HRP (Southern Biotech #9200-05); 抗-人類 mu HRP (Southern Biotech #1060-05)。

76 個 IgG 抗原陽性孔洞，於人類 κ 輕鏈抗原反應性抗體上也是陽性，而其中 7 個孔洞為含老鼠 λ 之融合抗體陽性。然而，7 個 λ 陽性孔洞中 6 個也含有 κ 輕鏈，且而其中 3 個為摻雜之 IgM 抗原反應性抗體陽性。因為這些摻雜的 IgM 抗體也可具貢獻，包括 λ 輕鏈，在共 76 個 IgG 純系中可有 3 個及 7 個之間之 IgGλ 純系。因此，內源的老鼠 λ 似乎可貢獻僅 4 至 9% IgG 陽性，抗原反應性融合瘤。76 個陽性融合瘤孔洞中 22 個之細胞再以有限稀釋再塗佈，以繼代選殖出可分泌個別單株抗體之融合瘤。1° 融合瘤中 22 個中有 19 個可得人類 IgG 繼代純系 (見下表 5)。

五、發明說明 (93)

93 2 2

表 5

抗-CTLA-4 融合瘤之繼代選殖

純系	OD	受試純系#	陽性#	陽性%
4C1	0.44	24	5	21%
2E4	1.48	24	9	38%
1H5	1.39	24	14	58%
9C4	1.30	24	5	21%
6D11	3.24	16	10	63%
10H3	1.59	16	2	13%
8H4	3.14	16	7	44%
8G5	1.38	8	3	38%
4A9	1.35	24	20	83%
10E1	1.17	24	3	13%
9F6	1.08	24	0	0%
6B9	1.16	16	5	31%
9B10	2.70	32	9	28%
10D1	0.90	48	6	13%
1B6	1.34	24	9	38%
4C7	1.34	8	2	25%
1D11	0.97	8	0	0%
1B5	2.75	8	3	38%
4E9	1.36	24	1	4%
11H7	0.40	16	0	0%
2D8	1.31	24	10	42%
8F2	1.28	16	5	31%

五、發明說明 (94)

因此可得 86% 繼代選殖效率。一旦繼代選殖，發現 1° 融合瘤之一包括 2 個不同的純系，具有不同的 IgG 同型 (見下表 6)。

表 6

人類 IgGκ 抗 CTLA-4 繼代純系之同型分析

老鼠	純系	親代孔洞	IgG ₁ κ	IgG ₂ κ	IgG ₃ κ	IgG ₄ κ
22227	8G5	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22227	6B9	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22230	1B5	IgG ₃ κ	-	-	+	-
22230	2D8	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22230	6D11	IgG ₄ κ	-	-	-	+
22230	8H4	IgG ₄ κ	-	-	-	+
22230	9C4	IgG ₃ κ	-	-	+	-
22230	10H3	IgG ₃ κ	-	-	+	-
22231	1B6	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	1H5	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	2E4	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	4A9	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	4C1.1	IgG ₄ κ	-	-	-	+
22231	9B10	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	4C7	IgG ₃ κ	-	-	+	-
22231	10D1.1	IgG ₁ κ , IgG ₄ κ	+	-	-	-
22231	10D1.4	IgG ₁ κ , IgG ₄ κ	-	-	-	+
22231	10E1	IgG ₄ κ	-	-	-	+
22231	8F2	IgG ₁ κ	+	-	-	-
22231	4E9	IgG ₁ κ	+	-	-	-

五、發明說明 (99)

修正

補充

93年2月2日

利用蛋白質 G 管柱純化。利用 BIAcore2000 儀器決定經純化 MAbs 對 G-CSF 及可溶性 CD4 之速率平衡結合常數。人類 G-CSF (120 RU) 或 CD4:Fc (1600 RU) 利用共價偶合經由胺基固化至 BIAcore2000 (BIAcore) 感應片表面，依廠商之操作指示。將單株抗體掩蓋過抗原。碎片以甘胺酸-HCl 緩衝溶液 (pH 1.5) 或 4M MgCl₂ 再現，以分別移去殘留的抗-人類 G-CSF MAb 或抗-CD4 MAb。重覆此循環，利用不同的 MAb 濃度。利用 BIA 評估 3.0 軟體決定自抗原之結合及分離。K_a 之獲得是將 K_{結合值} 除以 K_{分解值} 而得。如下表 7 所示，這些數值可與由鼠類抗-人類 G-CSF MAb，純系 3316.111 (R&D)，或鼠類抗-CD4 MAb，Leu3a (Pharmingen) 所得的比得上。

表 7

經純化人類 IgGκ MAbs 之速率及平衡常數

MAb	亞類	老鼠	抗原	K _{結合} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{分解} (s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)
#4	IgG ₁	雙重-Tc/KO	G-CSF	4.1×10 ⁵	3.1×10 ⁻⁴	1.3×10 ⁹
#5	IgG ₁	雙重-Tc/KO	G-CSF	5.9×10 ⁶	5.8×10 ⁻⁴	1.0×10 ¹⁰
#11	IgG ₄	雜交繁育	G-CSF	4.0×10 ⁶	1.5×10 ⁻³	2.8×10 ⁹
#21	IgG ₁	雜交繁育	G-CSF	1.1×10 ⁶	2.0×10 ⁻³	5.4×10 ⁸
#27	IgG ₂	雜交繁育	G-CSF	1.3×10 ⁶	1.9×10 ⁻³	6.5×10 ⁸
#23	IgG ₁	雜交繁育	CD4	7.6×10 ⁵	5.7×10 ⁻⁵	1.3×10 ¹⁰
3316.111	老鼠	野生型	G-CSF	1.5×10 ⁶	2.3×10 ⁻⁴	6.3×10 ⁹
Leu3a	老鼠	野生型	CD4	2.2×10 ⁵	7.1×10 ⁻⁶	3.1×10 ¹⁰

六、申請專利範圍

1. 一種製備編碼人類抗體鏈之核酸的方法，其包括：
製備可生產人類抗體之老鼠，其攜帶包含未經重排之整段人類抗體重鏈位點及人類第14號染色體之著絲點之轉殖染色體，及一插入老鼠染色體之轉殖基因，該轉殖基因具有未經重排之人類抗體輕鏈位點；
以預定的抗原免疫老鼠；
自老鼠中獲得表現人類抗體之B細胞；及
自B細胞或藉由融合B細胞與骨髓細胞而得之融合瘤細胞中分離編碼人類抗體鏈之核酸。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該老鼠攜帶人類染色體片段SC20及人類抗體輕鏈位點轉殖基因KCo5。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該編碼人類抗體鏈之核酸係編碼至少人類抗體重鏈或輕鏈之可變區域。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該編碼人類抗體鏈之核酸係編碼人類抗體重鏈或輕鏈之全長。
5. 一種製備人類抗體之方法，其包括：
製備可生產人類抗體之老鼠，其攜帶包含未經重排之整段人類抗體重鏈位點及人類第14號染色體之著絲點之轉殖染色體，及一插入老鼠染色體之轉殖基因，該轉殖基因具有未經重排之人類抗體輕鏈位點；

六、申請專利範圍

以預定的抗原免疫老鼠；

自老鼠中獲得表現人類抗體之B細胞；

自B細胞或藉由融合B細胞與骨髓細胞而得之融合瘤細胞中分離編碼人類抗體鏈之核酸；

將編碼人類抗體鏈之核酸導入一所欲寄主細胞中；及

培養該寄主細胞以生成人類抗體。

6. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該老鼠攜帶人類染色體片段SC20及人類抗體輕鏈位點轉殖基因KCo5。
7. 根據申請專利範圍第5項之方法，其包括選殖編碼人類抗體鏈之核酸至表現載體之步驟。
8. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該編碼人類抗體鏈之核酸係編碼至少人類抗體之可變區域，且其包括允許可變區域序列結合至一所欲人類抗體恆定區域序列之步驟。
9. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該寄主細胞係原核或真核寄主細胞。
10. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該寄主細胞係一衍生自哺乳動物之細胞株。
11. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該細胞株係選自大腸桿菌、酵母菌、昆蟲細胞、CHO細胞、COS細胞、猴腎細胞、HeLa細胞、L細胞、人類胎兒腎細胞、BHK細胞、老鼠Sertoli's細胞、非洲綠猴腎上

六、申請專利範圍

皮細胞、犬腎細胞、水牛鼠肝細胞、人類肺泡細胞、人類肝細胞、老鼠乳癌細胞、TR1細胞及骨髓細胞。

12. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該人類抗體係單株抗體。

13. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該人類抗體係選自IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。

14. 根據申請專利範圍第13項之方法，其中該IgA係IgA1或IgA2。

15. 根據申請專利範圍第13項之方法，其中該IgG係IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

16. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該人類抗體係包含抗原結合部分之片段。

17. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該人類抗體係Fab、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或scFv片段。

18. 一種製備人類抗體之方法，其包括：

製備可生產人類抗體之老鼠，其攜帶包含未經重排之整段人類抗體重鏈位點及人類第14號染色體之著絲點之轉殖染色體，及一插入老鼠染色體之轉殖基因，該轉殖基因具有未經重排之人類抗體輕鏈位點；

以預定的抗原免疫該老鼠；

自老鼠中獲得B細胞；

藉由融合B細胞與骨髓細胞製備一融合瘤；

六、申請專利範圍

自融合瘤細胞中分離編碼人類抗體鏈之核酸；
將該核酸導入一所欲寄主細胞中；及
培養該寄主細胞以生成人類抗體。

19. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該老鼠攜帶人類染色體片段SC20及人類抗體輕鏈位點轉殖基因KCo5。
20. 根據申請專利範圍第18項之方法，其包括選殖編碼人類抗體鏈之核酸至表現載體之步驟。
21. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該編碼人類抗體鏈之核酸係編碼至少人類抗體之可變區域，且其包括允許可變區域序列結合至一所欲人類抗體恆定區域序列之步驟。
22. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該寄主細胞係原核或真核寄主細胞。
23. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該寄主細胞係一衍生自哺乳動物之細胞株。
24. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該細胞株係選自大腸桿菌、酵母菌、昆蟲細胞、CHO細胞、COS細胞、猴腎細胞、HeLa細胞、L細胞、人類胎兒腎細胞、BHK細胞、老鼠Sertoli's細胞、非洲綠猴腎上皮細胞、犬腎細胞、水牛鼠肝細胞、人類肺泡細胞、人類肝細胞、老鼠乳癌細胞、TR1細胞及骨髓細胞。
25. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該人類抗體

六、申請專利範圍

係單株抗體。

26. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該人類抗體係選自IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。

27. 根據申請專利範圍第26項之方法，其中該IgA係IgA1或IgA2。

28. 根據申請專利範圍第26之方法，其中該IgG係IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

29. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該人類抗體係包含抗原結合部分之片段。

30. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該人類抗體係Fab、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或scFv片段。

31. 一種製備人類抗體呈現庫之方法，其包括：

製備可生產人類抗體之老鼠，其攜帶包含未經重排之整段人類抗體重鏈位點及人類第14號染色體之著絲點之轉殖染色體，及一插入老鼠染色體之轉殖基因，該轉殖基因具有未經重排之人類抗體輕鏈位點；

自老鼠淋巴細胞中分離編碼人類抗體鏈之核酸族群；及

形成可表現抗體鏈之呈現包裝庫，其中庫中成員包含編碼抗體鏈之核酸，且抗體鏈自包裝中呈現。

32. 根據申請專利範圍第31項之方法，其中該老鼠攜帶人類染色體片段SC20及人類抗體輕鏈位點轉殖基因KCo5。

六、申請專利範圍

33. 根據申請專利範圍第31項之方法，其包括以預定的抗原免疫老鼠之步驟。
34. 根據申請專利範圍第31項之方法，其中當進行分離步驟時，該老鼠缺少對免疫原之可偵測效價。
35. 一種製備人類抗體之方法，其包括
利用對預定抗原之親和性加以篩選根據申請專利範圍第31項所製得之人類抗體呈現庫；
將編碼人類抗體鏈之經選擇核酸導入所欲寄主細胞中；及
培養該寄主細胞以生成人類抗體。
36. 根據申請專利範圍第35項之方法，其包括選殖編碼人類抗體鏈之核酸至表現載體之步驟。
37. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該編碼人類抗體鏈之核酸係編碼至少人類抗體之可變區域，且其包括允許可變區域序列結合至一所欲人類抗體恆定區域序列之步驟。
38. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該寄主細胞係原核或真核寄主細胞。
39. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該寄主細胞係一衍生自哺乳動物之細胞株。
40. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該細胞株係選自大腸桿菌、酵母菌、昆蟲細胞、CHO細胞、COS細胞、猴腎細胞、HeLa細胞、L細胞、人類胎兒腎細胞、BHK細胞、老鼠Sertoli's細胞、非洲綠猴腎上。

六、申請專利範圍

皮細胞、犬腎細胞、水牛鼠肝細胞、人類肺泡細胞、人類肝細胞、老鼠乳癌細胞、TR1細胞及骨髓細胞。

41. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該人類抗體係單株抗體。

42. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該人類抗體係選自IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。

43. 根據申請專利範圍第42項之方法，其中該IgA係IgA1或IgA2。

44. 根據申請專利範圍第42項之方法，其中該IgG係IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

45. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該人類抗體係包含抗原結合部分之片段。

46. 根據申請專利範圍第35之方法，其中該人類抗體係Fab、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或scFv片段。