

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96197554.7

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1286975C

[22] 申请日 1996.10.10 [21] 申请号 96197554.7
[30] 优先权
[32] 1995.10.10 [33] US [31] 08/544,404
[86] 国际申请 PCT/US1996/016433 1996.10.10
[87] 国际公布 WO1997/013852 英 1997.4.17
[85] 进入国家阶段日期 1998.4.10
[71] 专利权人 真药物国际公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 尼尔斯·隆博格 罗伯特·M·凯
审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平

权利要求书 4 页 说明书 196 页 附图 93 页

[54] 发明名称

针对人抗原的高亲合力免疫球蛋白及生产该
免疫球蛋白的杂交瘤

[57] 摘要

本发明涉及能够生产异源抗体的转基因非人动物和用于生产具有显著亲合力的人序列抗体的方法，所述抗体与人抗原结合。

1. 含有免疫球蛋白的组合物，所述免疫球蛋白与人抗原结合的亲和力常数至少为 $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ ，其中所述免疫球蛋白由下列成分组成：

具下列组成的人序列轻链：(1)具有与由人 V_L 基因片段和人 J_L 片段编码的多肽序列至少 80% 相同的多肽序列的轻链可变区，和(2)具有与由人 C_L 基因片段编码的多肽序列至少 80% 相同的多肽序列的轻链恒定区；和

具下列组成的人序列重链：(1)具有与由人 V_H 基因片段、任选的 D 区以及人 J_H 片段编码的多肽序列至少 80% 相同的多肽序列的重链可变区，和(2)具有与由人 C_H 基因片段编码的多肽序列至少 80% 相同的多肽序列的重链恒定区，

其中免疫球蛋白得自非人 B 细胞。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所述人序列重链和人序列轻链分别由已整合到小鼠细胞基因组中的人重链转基因和人轻链转基因编码。

3. 权利要求 1 的组合物，其中所述组合物含有 IgG 同种型的单克隆抗体。

4. 权利要求 1 的组合物，其中所述人抗原是人蛋白，所述人蛋白是作为在人至少一种体细胞细胞类型中的表面或跨膜蛋白而自然存在的。

5. 权利要求 1 的组合物，其中所述人序列轻链含有 κ 恒定区。

6. 权利要求 1 的组合物，其中所述人序列重链含有 γ 恒定区。

7. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫球蛋白含有具有 κ 恒定区的人序列轻链和具有 γ 恒定区的人序列重链。

8. 权利要求 4 的组合物，其中所述人抗原是人 CD4 蛋白或其抗原性片段。

9. 权利要求 7 的组合物，其中所述人抗原是人 CD4 蛋白或其抗原性片段。

10. 权利要求 1 的组合物，其中免疫球蛋白与人抗原结合的亲和力常数至少为 $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。

11. 权利要求 10 的组合物，其中所述人抗原是人蛋白，所述人蛋白是作为在人至少一种体细胞细胞类型中的表面或跨膜蛋白而天然存在的。

12. 权利要求 11 的组合物，其中所述人蛋白质是人 CD4 或其抗原性片段。

13. 权利要求 10 的组合物，其中所述人序列轻链是 κ 链且人序列重链是 γ 链。

14. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

含有 VH4-34 片段、DXP'1 片段、JH4 片段的轻链可变区和含有序列 DITMVRGPH[SEQ. ID No. 63]的重链 CDR3 区；和

含有 VkA27/A11 片段、Jk4 片段的轻链可变区和含有序列 QQYGSSPLT[SEQ. ID No. 67]的轻链 CDR3 区。

15. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

含有 VH5-51 片段、DHQ52 片段、JH2 片段的轻链可变区和含有序列 PANWNWYFVL[SEQ. ID No. 64]的重链 CDR3 区；和

含有 VkL18 片段、Jk4 片段的轻链可变区和含有序列 QQFISYPQLT[SEQ. ID No. 68]的轻链 CDR3 区。

16. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

含有 VH4-34 片段、JH5 片段的轻链可变区和含有序列 VINWFDP[SEQ. ID No. 65]的重链 CDR3 区；和

含有 VkL19 片段、Jk2 片段的轻链可变区和含有序列 QQANSFPYT[SEQ. ID No. 69]的轻链 CDR3 区。

17. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

含有 VH5-51 片段、DHQ52 片段、JH4 片段的轻链可变区和含有序列 DQLGLFDY[SEQ. ID No. 66]的重链 CDR3 区；和

含有 VkL15 片段、Jk2 片段的轻链可变区和含有序列

QQYDSYPYT[SEQ. ID No. 70]的轻链 CDR3 区。

18. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 1 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 2 核苷酸序列编码的轻链可变区。

19. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 3 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 4 核苷酸序列编码的轻链可变区。

20. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 5 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 6 核苷酸序列编码的轻链可变区。

21. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 7 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 8 核苷酸序列编码的轻链可变区。

22. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 9 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 10 核苷酸序列编码的轻链可变区。

23. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白包含：

由 SEQ. ID No. 61 核苷酸序列编码的重链可变区和由 SEQ. ID No. 62 核苷酸序列编码的轻链可变区。

24. 权利要求 8 的组合物，其中免疫球蛋白与人的 CD4 特异性结合并且和得自至少一种非人灵长类动物的 CD4 特异性结合。

25. 权利要求 1 的组合物，其中免疫球蛋白通过含有至少 5 种不同的人 Vk 基因的转基因小鼠产生。

26. 由得自转基因小鼠的 B 细胞组成的杂交瘤，所述转基因小鼠含有含人重链转基因和人轻链转基因的基因组，所述 B 细胞已与适宜于产生杂交瘤的无限增殖细胞融合，其中所述杂交瘤在培养上清液中产生可检测量的权利要求 1 的免疫球蛋白。

27. 权利要求 26 的杂交瘤，其中所述免疫球蛋白由人序列 κ 链和人序列 γ 链组成。

28. 权利要求 26 或 27 的杂交瘤，其中所述免疫球蛋白以至少 $1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 的亲合力与人 CD4 结合。

针对人抗原的高亲合力免疫球蛋白及生产该免疫球蛋白的杂交瘤

能够生产异源抗体的转基因非人动物

相关申请

本申请是 1995 年 10 月 10 日申请的美国系列申请号为 08/544,404 的接续申请, 08/544,404 是 1994 年 12 月 7 日申请的美国系列申请号为 08/352,322 的接续申请,

08/352,322 是 1994 年 3 月 9 日申请的美国系列申请号为 08/209,741 的接续申请, 08/209,741 是 1993 年 12 月 10 日申请的美国系列申请号为 08/165,699 的接续申请, 08/165,699 是 1993 年 12 月 3 日申请的美国系列申请号为 08/161,739 的接续申请, 08/161,739 是 1993 年 11 月 18 日申请的美国系列申请号为 08/155,301 的接续申请, 08/155,301 是 1993 年 7 月 22 日申请的美国系列申请号为 08/096,762 的接续申请, 08/096,762 是 1993 年 4 月 26 日申请的美国系列申请号为 08/053,131 的接续申请, 08/053,131 是 1992 年 12 月 16 日申请的美国系列申请号为 07/990860 的接续申请;

07/990,860 是 1992 年 6 月 23 日申请的美国系列申请号为 07/904,068 的接续申请; 07/904,068 是 1992 年 3 月 18 日申请的美国系列申请号为 07/853,408 的接续申请, 07/853,408 是 1991 年 12 月 17 日申请的美国系列申请号为 07/810,279 的接续申请, 07/810,279 是 1990 年 8 月 31 日申请的美国系列申请号为 07/575,962 (现已放弃) 的接续申请, 07/575,962 是 1990 年 8 月 29 日申请的美国系列申请号为 07 / 574 ,748 (现已放弃) 的接续申请。本申请根据 Title 35, United States Code, Section 119, 要求 PCT 申请 PCT/US91/ 06185(对应于 1992 年 2 月 5 日申请的美国系列申请号为 07/834,539)和 PCT/US92/ 10983 的外国优先权。

技术领域

本发明涉及能够生产异源抗体的转基因非人动物、用于生产所述动物的转基因、能够以 V-D-J 重组功能性重排异源 D 基因的转基因、能够生产异源抗体的无限增殖化 B 细胞、用于生产多种同种型异源抗体的方法和转基因、用于生产异源抗体的方法和转基因 (其中与种系重排的可变区序列相比, 可变区序列含有体细胞突变)、生产具有人一级序列并

与人抗原结合之抗体的转基因非人动物、从所述转基因动物 B 细胞制备的杂交瘤以及由所述杂交瘤表达的单克隆抗体。

发明背景

发展单克隆抗体在人体中的体内治疗和诊断应用所面临的主要障碍是非人免疫球蛋白的内在免疫原性。例如，当给具有免疫能力的病人施用治疗剂量的啮齿类单克隆抗体时，病人产生抗啮齿类免疫球蛋白序列的抗体；这些人抗小鼠抗体(HAMA)中和了治疗抗体并会引起急性毒性。因此需要生产与特异性人抗原反应的人免疫球蛋白，所述抗原是预定的治疗和/或诊断靶。但是，生产与人抗原特异性结合的人免疫球蛋白还有很多问题。

目前用于生产单克隆抗体的技术涉及用抗原预接触或引发动动物(通常是大鼠或小鼠)、从所述动物中收集 B 细胞并产生杂交瘤克隆文库。通过筛选具有抗原结合特异性(个体型)的杂交瘤群并筛选免疫球蛋白类型(同种型)，可以筛选出分泌所需抗体的杂交瘤克隆。

但是，当将现有生产单克隆抗体的技术用于生产具有人抗原结合特异性的人抗体时，获得生产人免疫球蛋白的 B 淋巴细胞则出现了严重的障碍，因为人通常对自身抗原不产生免疫反应。

因此，现有生产能与人抗原特异性反应的人单克隆抗体的方法显然不适当。显然，当用非人品种作为制备杂交瘤的 B 细胞源时，对于生产抗真正自身抗原的单克隆抗体也有同样的限制。

构建含有功能性异源免疫球蛋白转基因的转基因动物是可以生产与自身抗原有反应性的抗体的一种方法。但为了表达有治疗用途的抗体或获得生产所述抗体的杂交瘤克隆，转基因动物必须产生能够通过 B 淋巴细胞发育途径成熟的转基因 B 细胞。所述成熟要求在转基因 B 细胞上存在表面 IgM，但有治疗用途的只有不是 IgM 的同种型。因此，需要转基因和含所述转基因的动物，所述转基因通过功能性 V-D-J 重排可产生重组多样性和连接多样性。此外，所述转基因和转基因动物优选包含顺式作用序列，所述序列有利于从 B 细胞成熟所需的第一同种型转变成有良好治疗效用的同种型。

已经报道了许多试验，这些试验利用转染的细胞系确定 Ig 基因重

排所需的特异性 DNA 序列(见 Lewis and Gellert(1989), *Cell*, 59,585-588 中的综述)。所述报告鉴定了推测的序列并得出结论: 这些序列对重排所用重组酶的可接近性受转录调节(Yancopoulos and Alt(1985), *Cell*, 40,271-281)。报道认为 V(D)J 连接的序列是高度保守的接近回文的七聚体以及由 12 或 23 bp 间隔序列分开的不太保守的富集 AT 的九聚体(nanomer) (Tonegawa (1983), *Nature*, 302, 575-581;Hesse, et al.,(1989), *Genes in Dev.*,3,1053-1061)。报道说有效重组仅发生在含重组信号序列的位点之间, 所述信号序列含有不同长度的间隔区。

Ig 基因重排, 尽管在组织培养细胞中进行了研究, 但在转基因小鼠中还未得到广泛地验证。只有很少的报告公开描述了导入到小鼠中的重排试验构建体[Buchini,et al., (1987), *Nature*, 326,409-411(未重排的鸡 λ 转基因); Goodhart,et al.,(1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,84,4229-4233(未重排的兔 κ 基因); 和 Bruggemann,et al.,(1989),*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86,6709-6713(杂种小鼠—人重链)]。但这些试验的结果是不确定的, 在一些情况下, 发生了转基因的不完全或很少的重排。

此外, 抗体分子的各种生物学功能由分子的 Fc 部分产生, 如通过 Fc ϵ 与肥大细胞或嗜碱细胞相互作用、通过 Fc μ 或 Fc γ 进行补体结合, 还需要通过同种型的改变使具有给定特异性的抗体产生功能多样性。

尽管已经有了带有编码异源抗体的一条或多条链的转基因的转基因动物, 但尚未有成功地进行同种型转换的异源转基因的报道。不能转换同种型的转基因动物只能生产单一同种型异源抗体, 更具体地说, 只限于生产 B 细胞成熟所必需的同种型, 如 IgM 和可能的 IgD, 因此只有有限的治疗应用。因此需要异源免疫球蛋白转基因和转基因动物, 它们可将 B 细胞发育所需的同种型转换成具有治疗所需特征的同种型。

基于上述原因, 显然需要能够有效生产异源抗体, 例如在第二个品种中生产由第一品种的遗传序列编码的抗体的方法。更具体地说, 本领域需要异源免疫球蛋白转基因和转基因动物, 它们能够进行掺入全部或部分 D 基因片段的功能性 V-D-J 基因重排, 所述 D 基因片段是产生重组多样性的原因。此外, 本领域还需要可支持 V-D-J 重组和同种型转换的转基因和转基因动物, 以便(1)功能性 B 细胞可发育和(2)可生产治疗上有用的异源抗体。还需要可用于制备杂交瘤的 B 细胞源, 所述杂交瘤生产在所针对的特定靶种中有治疗或诊断用途的单克隆抗体。能够进行

功能性 V-D-J 重组和/或能够进行同种型转换的异源免疫球蛋白转基因可满足这些需要。

根据前述目的,提供了能够生产异源抗体如人抗体的转基因非人动物。

此外,另一个目的是提供来自所述转基因动物的能够表达异源抗体的 B 细胞,其中所述 B 细胞是可无限增殖的,是产生特异于特定抗原的单克隆抗体的源。

根据前述目的,本发明的另一目的是提供能够生产所述异源单克隆抗体的杂交瘤细胞。

另外,本文的又一个目的是提供异源未重排和重排的免疫球蛋白重链和轻链转基因,这些转基因可用于生产前述非人转基因动物。

此外,本文的再一个目的是提供破坏转基因动物中内源免疫球蛋白座位的方法。

另外,本文的另一个目的是提供在前述转基因非人动物中诱导异源抗体生产的方法。

本发明的另一目的是提供生产免疫球蛋白可变区基因片段库的方法,该库可用于构建本发明的一种或多种转基因。

本文所讨论的参考文献仅仅是本申请申请日之前其公开的内容。本文没有任何内容表明发明人不可以通过在先发明而将所述文献内容的公开日期提前。

发明综述

提供了能够生产异源抗体,如人抗体的转基因非人动物。所述异源抗体可以是各种同种型,包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgA_{sec}、IgD、IgE。为了使所述转基因非人动物产生免疫反应,需要使转基因 B 细胞和前 B 细胞产生表面结合的免疫球蛋白,特别是 IgM(或可能是 IgD)同种型,以便实现 B 细胞发育以及抗原刺激的成熟。IgM(或 IgD)表面结合免疫球蛋白只需在 B 细胞发育的抗原-刺

激成熟期表达,然后成熟 B 细胞可以生产其它同种型,尽管一次只能生产单一转换的同种型。

通常, B 细胞系的细胞一次只能生产单一的同种型,尽管可进行顺式或反式 RNA 剪接,例如天然产生的 μ_s (分泌的 μ)和 μ_M (膜结合的 μ)型,但 μ 和 δ 免疫球蛋白链会导致一个细胞同时表达多种同种型。因此,为了产生多同种型的异源抗体,具体地说是治疗上有用的 IgG、IgA 和 IgE 同种型,就需要有同种型转换发生。所述同种型转换可以是经典的型-转换,或者可源于一种或多种非经典的同种型转换机制。

本发明提供了异源免疫球蛋白转基因和含所述转基因的转基因非人动物,其中所述转基因动物能够通过同种型转换生产多种同种型的异源抗体。经典的同种型转换是通过重组而进行的,该重组过程至少与转基因的一个转换序列区有关。非经典的同种型转换可通过例如人 σ_μ 和人 Σ_μ 序列之间的同源重组(δ -相关的缺失)而进行的。其它非经典转换机制如包括转基因间和/或染色体间重组以及其它方式也可以发生并可实现同种型转换。所述转基因和转基因非人动物生产受抗原-刺激的 B 细胞成熟所必需的第一免疫球蛋白同种型,然后可转换成编码并产生具有治疗和/或诊断用途的一种或多种异源同种型。因此,本发明的转基因非人动物在一个实施方案中能够生产,由人免疫球蛋白遗传序列编码并以高亲和力与特异性人抗原结合的 IgG、IgA 和/或 IgE 抗体。

本发明还包括来自能够表达各种同种型异源抗体的转基因动物的 B 细胞,其中所述 B 细胞被无限增殖化以便提供特异于特定抗原的单克隆抗体源。衍生于所述 B 细胞的杂交瘤可作为所述异源单克隆抗体的一种来源。

本发明提供异源未重排和重排的免疫球蛋白重链和轻链转基因,所述转基因能够在前述非人转基因动物体内或来自所述转基因动物 B 细胞谱系的人工培养的淋巴细胞内进行同种型转换。所述同种型转换可以自发发生或者通过促进同种型转换的试剂如 T-细胞衍生的淋巴因子(如 IL-4 和 IFN γ)处理转基因动物或人工培养的 B 谱系淋巴细胞而诱导产生。

此外,本发明包括在前述转基因非人动物中诱导异源抗体生产的方法,其中所述抗体可以是各种同种型。这些方法包括在转基因非人动物

中产生抗原-刺激的免疫反应以产生异源抗体，特别是转换的同种型的异源抗体(即，IgG、IgA和IgE)。

本发明也提供了使转基因含有可实现同种型转换的序列的方法，以便在转基因动物中产生的异源免疫球蛋白和衍生于所述动物 B 细胞的单克隆抗体克隆是各种同种型的。

本发明还提供了有利于转基因同种型转换的方法，以便特定同种型之间的转换可以以比通常发生于种系免疫球蛋白座位高或低得的多频率或以不同的时间顺序发生。转换区可取自各种 C_H 基因，然后在转基因构建体中与其它 C_H 基因相连；这样移植出的转换序列通常对于相连的 C_H 基因来说是功能上独立的，以便在转基因构建体中的转换通常是相连转换区的一种功能。另一种方法是，或与转换序列组合，可将δ-相关缺失序列与不同 C_H 基因相连，通过缺失两个δ-相关缺失序列之间的序列来实现非经典转换。因此，可以构建转基因以便将特定的 C_H 基因与不同转换序列相连，由此，使转换以高于使用天然相关转换区时的频率发生。

本发明还提供了确定在含免疫球蛋白转基因的转基因动物中是否发生了转基因序列的同种型转换的方法。

本发明提供了免疫球蛋白转基因构建体以及生产免疫球蛋白转基因构建体的方法，其中的一些构建体含有种系免疫球蛋白座位序列的子序列(可包含缺失)。本发明包括便于进行克隆并构建免疫球蛋白转基因的具体方法，所述方法涉及使用 XhoI 和 SalI 单限制位点的载体，所述限制位点两侧翼各有一个 NotI 位点。该方法研究了 XhoI 和 SalI 限制位点的互补末端，并可用于将限制片段依次连接到载体中产生大构建体。

本发明的转基因包括重链转基因，包含编码至少一个可变基因片段、一个多样性基因片段、一个连接基因片段和一个恒定区基因片段的 DNA。免疫球蛋白轻链转基因包含编码至少一个可变基因片段、一个连接基因片段和一个恒定区基因片段的 DNA。编码轻和重链基因片段的基因片段对于转基因非人动物来说是异源的，即它们衍生于或相应于编码与转基因非人动物不同的品种的重和轻链基因片段的 DNA。在本发明的一个方面，构建转基因以便个各基因片段是未重排的，即没有被重排以便编码有功能的免疫球蛋白轻或重链。所述未重排的转基因可以

进行基因片段的重组(功能性重排)并当将所述动物与抗原接触后,在所述转基因非人动物中可以表达重排的免疫球蛋白重和/或轻链。

在本发明的一个方面,异源重和轻链免疫球蛋白转基因含有未重排异源 DNA 的相对大的片段。所述大片段通常含有来自异源免疫球蛋白座位 C、J(在重链的情况下,和 D)片段的必需部分。此外,所述片段还含有可变基因片段的必需部分。

在一个实施方案中,所述转基因构建体含有与衍生于异源 DNA 的序列对应的调节序列(如启动子、增强子)、型转换区、重组信号等。另外,也可将所述调节序列掺入到转基因中,所述转基因来自与本发明所用非人动物相同或相关的种。例如,可将人免疫球蛋白基因片段与啮齿类免疫球蛋白增强子序列组合以用于转基因小鼠。

在本发明的方法中,将含有种系未重排轻和重免疫球蛋白转基因(在 D 细胞分化过程中进行了 VDJ 连接)的转基因非人动物与抗原接触,以便在二级 B 细胞库中诱导异源抗体的生产。

本发明还包括在本发明中所用的载体和破坏本发明所用非人动物中的内源免疫球蛋白座位的方法。所述载体和方法利用转基因,优选阳性-阴性选择载体,使所构建的载体靶向功能性破坏的一组编码本发明所用非人动物的内源重和/或轻免疫球蛋白链的基因片段。所述内源基因片段包括多样性、连接和恒定区基因片段。在本发明的该方面,将阳性-阴性选择载体与非人动物的至少一种胚胎干细胞接触,此后,选择其中将阳性-阴性选择载体通过同源重组整合到非人动物基因组中的细胞。移植后,由于所述载体同源整合到染色体 DNA 中,所得的转基因非人动物基本上不能发生免疫球蛋白介导的免疫反应。因此可将所述免疫缺陷型非人动物用于研究免疫缺陷或用作免疫球蛋白重和轻链转基因的受体。

本发明海提供了用于抑制一种或多种免疫球蛋白链表达,而不破坏内源免疫球蛋白座位的载体、方法和组合物。所述方法可用于抑制一种或多种内源免疫球蛋白链的表达,但却可以表达一种或多种转基因-编码的免疫球蛋白链。与从遗传上破坏内源免疫球蛋白链座位不同,免疫球蛋白链表达的抑制不需要耗时的、建立被破坏了内源 Ig 座位纯合的转基因动物的育种过程。与内源 Ig 基因破坏相比,抑制作用的另一优点是

在特定实施方案中，在个体动物中链抑制是可逆的。例如，Ig链抑制可利用下列序列完成：(1)编码并表达反义RNA的转基因，所述反义RNA与内源Ig链基因序列可特异性杂交，(2)与内源Ig链基因序列可特异性杂交的反义寡核苷酸，和(3)与内源Ig链多肽特异性结合的免疫球蛋白。

本发明提供了转基因非人动物，所述动物含有：纯合的功能被破坏了的内源重链等位基因，纯合的功能被破坏了的内源轻链等位基因，至少一个拷贝的异源免疫球蛋白重链转基因，和至少一个拷贝的异源免疫球蛋白重链转基因，其中在用抗原如人抗体(如CD4)免疫接种后，所述动物产生抗体反应。本发明还提供了所述的转基因非人动物，其中所述功能破坏了的内源重链等位基因是同源重组失效的 J_H 区，所述功能破坏了的内源轻链等位基因是同源重组失效的 J_K 区，所述异源免疫球蛋白重链转基因是HC1或HC2人小基因(minigene)转基因，所述异源轻链转基因是KC2或KC1e人 κ 转基因，而且其中所述的抗原是人抗原。

本发明还提供了抑制、除去和/或功能破坏内源非人免疫球蛋白座位的各种实施方案。

本发明还提供了表达人重链序列和嵌合重链的转基因小鼠，所述嵌合重链含有人重链可变区序列和鼠重链恒定区序列。所述嵌合重链通常通过在功能重排的人转基因和内源鼠重链恒定区(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$)之间的反转换(trans-switching)而产生。含所述嵌合重链的抗体(通常与转基因编码的人轻链序列或内源鼠轻链组合)是应答用预定抗原进行的免疫接种而形成的。这些实施方案的转基因小鼠可含有B细胞，所述B细胞在第一时间点产生(表达)人重链序列，并在第二(随后)的时间点反转换产生(表达)由人可变区和鼠恒定区(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$)组成的嵌合重链；将所述人序列和嵌合重链掺入到带轻链的有功能抗体中；所述抗体存在于所述转基因小鼠的血清中。因此重申：这些实施方案的转基因小鼠可含有表达人重链序列并随后进行转换(经反式转换或顺式转换)表达嵌合或同种型转换的重链(由人可变区和其它恒定区(如鼠 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ ；人 γ 、 α 、 ϵ)组成)的B细胞；所述人序列和嵌合或同种型转换的重链被掺入到带轻链(人或小鼠)的有功能抗体中；所述抗体存在于所述转基因小鼠的血清中。

本发明还提供了产生大的转基因的方法，所述方法包括：

将至少三种多核苷酸导入到哺乳动物细胞中；第一种多核苷酸含有

与第二种多核苷酸享有序列一致性的重组(recombinogenic)区,第二种多核苷酸含有与第一种多核苷酸享有序列一致性的重组区和与第三种多核苷酸享有序列一致性的重组区,而第三种多核苷酸含有与所述第二种多核苷酸享有序列一致性的重组区。

重组区是具有足以在哺乳动物细胞(如 ES 细胞),优选还在非哺乳动物真核细胞(如糖酵母属和其它酵母或真菌细胞)中产生体内同源重组的必需的序列一致性区。通常,重组区通常为至少 50 — 100000 个核苷酸或更长,优选 500-10000 个核苷酸长,而常常有 80 — 100 %一致性,优选 95 — 100 %一致性,最好是同基因的。

本文讨论的参考文献仅提供了在本申请申请日之前的其公开的内容。本文没有任何内容表明发明人不可以通过在先发明而将所述文献内容的公开日期提前。

附图的简要说明

图 1 描述了在未重排基因组 DNA 和重排免疫球蛋白重链基因表达的 mRNA 中的互补决定区 CDR1 、 CDR2 和 CDR3 和框架区 FR1 、 FR2 、 FR3 和 FR4 。

图 2 描述了人 λ 链座位;

图 3 描述了人 κ 链座位;

图 4 描述了人重链座位,

图 5 描述了含有重排的 IgM 基因的转基因构建体,所述 IgM 基因依次与含有人 $\gamma 3$ 和 $\gamma 1$ 恒定区的 25kb 片段、含大鼠链 3' 增强子序列的 700 bp 片段相连,

图 6 是人 κ 链座位的限制图谱,描述了通过体内同源重组,用于形成轻链转基因的片段。

图 7 描述了 pGP1 的构建。

图 8 描述了 pGP1 中所含多接头的构建。

图 9 描述了用于构建本发明人重链转基因的片段。

图 10 描述了 pHIG1 和 pCON1 的构建。

图 11 描述了插入到 pRE3(大鼠 3' 增强子)以形成 pREG2 的人 C $\gamma 1$ 片段。

图 12 描述了 pHIG' 和 pCON 的构建。

图 13 描述了含人 D 区片段的片段,所述 D 区片段用于构建本发明的转基因。

图 14 描述了 pHIG2(含 D 片段的质粒)的构建。

图 15 描述了用于构建本发明的转基因的跨人 J κ 和人 C κ 基因的片段。

图 16 描述了 pE μ 的构建。

图 17 描述了 pKapH 的构建。

图 18A-18D 描述了阳性-阴性选择载体的构建, 该载体用于功能性破坏小鼠内源重链免疫球蛋白座位。

图 19A-19C 描述了阳性-阴性选择载体的构建, 该载体用于功能性破坏小鼠内源轻链免疫球蛋白座位。

图 20A-20E 描述了以小鼠 κ 轻链为靶的载体的结构。

图 21A-21F 描述了以小鼠重链为靶的载体的结构。

图 22 描述了载体 pGPe 的图谱。

图 23 描述了载体 pJM2 的结构。

图 24 描述了载体 pCOR1 的结构。

图 25 描述了用于 pIGM1、pHIC1 和 pHIC2 的转基因构建体。

图 26 描述了 pye2 的结构。

图 27 描述了 pVGE1 的结构。

图 28 描述了在 pHIC1 转基因小鼠中人 Ig 表达的检测结果。

图 29 描述了 pJCK1 的结构。

图 30 描述了人工合成的重链可变区的构建。

图 31 是重链小座位构建体 pIGM₁、pHC1 和 pHC2 的示意图。

图 32 是重链小座位构建体 pIGG1 和 κ 轻链小座位构建体 pKC1、pKVe1 和 pKC2 的示意图。

图 33 描述了重建功能重排的轻链基因的示意图。

图 34 描述了血清 ELISA 结果。

图 35 描述了 8 只转基因小鼠血清的 ELISA 检测结果。

图 36 是质粒 pBCE1 的示意图。

图 37A-37C 描述了本发明转基因小鼠对 KLH-DNP 的免疫反应, 这是通过测量 KLH-DNP(37A)、KLH(37B)和 BSA-DNP(37C)特异性的 IgG 和 IgM 水平得到的。

图 38 是 ELISA 数据, 说明存在结合人癌胚抗原(CEA)并含有人 μ 链的抗体; 每个图均表示出免疫接种后表明的天数时, 小鼠血清样品的系列稀释倍数。

图 40 表示与种系转基因序列(上线)相比,从 mRNA 产生的 23 个随机选择 cDNA 的排列的可变区序列,所述 mRNA 是从用人癌胚抗原(CEA)免疫接种的 HC1 转基因小鼠的淋巴样组织中获得;在每一行上表明了相对于种系序列的核苷酸变化。表明了对应于重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的区。用大写字母表示非种系编码的核苷酸。

图 41 表示称为 vk65.3 的人 DNA 片段的核苷酸序列,该片段含有 V_{κ} 基因片段;还表示了 V_{κ} 编码区推测的氨基酸序列;用方框表示剪接和重组信号序列(七聚体/九聚体)。

图 42 表示称为 vk65.5 人 DNA 片段的核苷酸序列,该片段含有 V_{κ} 基因片段;还表示了由 V_{κ} 编码区推测的氨基酸序列;用方框表示剪接和重组信号序列(七聚体/九聚体)。

图 43 表示称为 vk65.8 人 DNA 片段的核苷酸序列,该片段含有 V_{κ} 基因片段;还表示了由 V_{κ} 编码区推测的氨基酸序列;用方框表示剪接和重组信号序列(七聚体/九聚体)。

图 44 表示称为 vk65.15 人 DNA 片段的核苷酸序列,该片段含有 V_{κ} 基因片段;还表示了由 V_{κ} 编码区推测的氨基酸序列;用方框表示剪接和重组信号序列(七聚体/九聚体)。

图 45 表示通过共注射的两个重叠片段之间的同源重组形成轻链小座位。

图 46 表示与 CEA 和非 CEA 抗原反应性的单克隆抗体的 ELISA 结果,说明抗原结合的特异性。

图 47 表示通过 PCR 扩增的 10 个 cDNA 的 DNA 序列以扩增含有人 VDJ 和鼠恒定区序列的转录物。

图 48 表示小鼠不同稀释度血清的 ELISA 结果,所述小鼠携带了人重链小座位转基因和人 κ 小座位转基因;用人 CD4 免疫接种小鼠,所列的数据说明与人 CD4 有反应性并分别含有人 κ 、人 μ 或人 γ 表位的抗体。

图 49 表示由 FACS 确定人 μ 或小鼠 μ 的淋巴细胞染色的相对分布情

况，以说明三种小鼠的基因型。

图 50 表示由 FACS 确定人 κ 或小鼠 κ 的淋巴细胞染色的相对分布情况，以说明三种小鼠的基因型。

图 51 表示由 FACS 确定小鼠 λ 的淋巴细胞染色的相对分布情况，以说明三种小鼠的基因型。

图 52 表示由 FACS 确定小鼠 λ 或人 κ 的淋巴细胞染色的相对分布情况，以说明四种小鼠的基因型。

图 53 表示在未免疫接种的 0011 小鼠血清中，人 μ 、人 γ 、人 κ 、小鼠 μ 、小鼠 γ 、小鼠 κ 和小鼠 λ 链的量。

图 54 表示不同基因型的非免疫 0011 小鼠血清中，说明人 μ 、人 γ 、人 κ 、小鼠 μ 、小鼠 γ 、小鼠 κ 和小鼠 λ 链的量的散点图。

图 55 表示在用人 CD4 免疫接种 0011 小鼠后 3 星期或 7 星期所取的血清中，在抗 CD4 抗体中，含人 μ 、人 γ 或人 κ 链之抗体的滴度。

图 56 是人重链小座位转基因 pHC1 和 pHC2，以及轻链小座位转基因 pKC1pKC1e，和在所示出的位点通过 pKC2 和 Co4 之间的同源重组而得到的轻链小座位转基因的示意图。

图 57 表示摘自 Storb 等(1989)的书中的鼠 λ 轻链座位谱系图；条框表示假基因。

图 58 是以同源基因为靶，使鼠 λ 座位失活的示意图。

图 59 图示说明用于缺失基因，如重链恒定区基因的同源重组靶转基因的结构。

图 60 是从 Immunoglobulin Genes, Honjo, T, Alt, FW and Rabbits TH(eds) Academic Press, NY(1989) p.129 得到的 BALB/c 鼠重链座位图谱。在顶线中用封闭的框表示结构基因；第二和第三条线表示用符号表明的限制位点。

图 61 表示小鼠重链 α 座位恒定区基因的核苷酸序列。

图 62 表示移码载体(质粒 B)的构建, 该载体用于将 2 个 bp 的移码导入到鼠重链座位 J₄ 基因中。

图 63 表示在超免疫过程中, 转基因动物的同种型特异性反应。用比色 ELISA 测定值表示反应性人 μ 和 $\gamma 1$ 的相对水平(Y 轴)。在纯合 JHD 背景下, 通过腹膜内注射弗氏佐剂中的 CEA, 我们免疫接种了 7-10 周龄的雄性 HC1 57 品系的转基因动物(#1991,#2356,#2357)。该图描述了稀释 250 倍的采集血清(在各次注射前收集的)与 CEA 包被的微滴定孔的结合情况。

图 64A 和 64B 说明通过型转换重组介导的转基因编码的 $\gamma 1$ 的同种型的表达。在表达两种不同人 $\gamma 1$ 的杂交瘤中, 整合的转基因的结构与 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间的重组一致。图 64A 表示从三个表达转基因的杂交瘤中分离的 Pac I/Sfi I 消化之 DNA 的 Southern 印迹。从左到右: 克隆 92-09A-5H1-5, 人 $\gamma 1^+/\mu^-$; 克隆 92-90A-4G2-2, 人 $\gamma 1^+/\mu^-$; 克隆 92-09A-4F7-A5-2, 人 $\gamma 1^-, \mu^+$ 。所有 3 个杂交瘤均衍生于对于 HC1-57 整合是半合子的、对于 JHD 破坏是纯合的 7 月龄雄性小鼠(小鼠#1991)。将印迹与衍生自含有人 $\gamma 1$ 的转换区 3' 那一半的 2.3 kb BglIII/SfiI DNA 片段的探针杂交。在表达 μ 的杂交瘤中未发现转换产物, 而在表达 $\gamma 1$ 的两个杂交瘤 92-09A-5H1-5 和 92-9A-4G2-2 中, 含有分别得自 5.1 和 5.3 kb 的 Pac I/Sfi I 片段的转换产物。图 64B 是两种可能的缺失机制示意图, 通过该机制可发生从 μ 到 $\gamma 1$ 的型转换。在人 μ 基因的两侧翼为可进行重组以缺失 μ 的 400 bp 同向重复片段($\sigma\mu$ 和 $\Sigma\mu$)。由该机制进行的型转换总是产生 6.4 kb Pac I/Sfi I 片段, 而通过 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间的重组而发生的型转换则产生 4-7 kb 的 Pac I/Sfi I 片段, 在每次转换中, 片段大小会发生变化。在图 64A 中检测的表达 $\gamma 1$ 的两个杂交瘤似乎已经在 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间进行了重组。

图 65 表示通过反式转换产生的嵌合人/小鼠免疫球蛋白重链。反式转换产物的 cDNA 克隆通过反转录和 PCR 扩增脾和淋巴结 RNA 的混合物产生, 所述 RNA 混合物从超免疫的 HC1 转基因-JHD 小鼠(#2357, 参见图 63 关于动物和免疫方案的说明中的图标)分离得到。给出了 10 种随机检出的克隆的部分核苷酸序列。小写字母表示种系编码的, 大写字母表

示不能定为已知种系序列的核苷酸；这些可能是体细胞突变、N 核苷酸或截短的 D 片段。两种都表示是小鼠 γ 序列。

图 66A 和 66B 表示超免疫小鼠中的重排 VH251 转基因发生体细胞突变。IgG 重链可变区 cDNA 的部分核苷酸序列克隆自对抗原展示出一级反应(图 64A 和对抗原展示出二级反应(图 64B)的 HC1 系 26 小鼠。在该图的顶部列出了种系序列；给出了各克隆种系的核苷酸变化。A 区表示与种系序列的一致性，大写字母表示未鉴定的种系源。将序列按照 J 片段的用法分组。列出了各 J 片段的种系序列。CDR3 序列内的小写字母表示与 HC1 转基因中所含已知 D 片段的一致性。在各序列的末端列出了指定的 D 片段。未指定的序列可能衍生于 N 区添加或体细胞突变；或在某些情况下，它们很短以致不能从已知的 D 片段中区分出随机 N 核苷酸。图 66A 一级反应：13 个随机检出的 VH251- γ 1 cDNA 克隆。给 4 周龄的雌性 HC1 系 26-JHD 小鼠(#2599)注射一次 KLH 和完全弗氏佐剂；5 天后分离脾细胞 RNA。在 V 片段内体细胞突变的总频率为 0.06%(2/3198 bp)。图 66B 二级反应：13 个随机检出的 VH251- γ 1 cDNA 克隆。给 2 月龄的雌性 HC1 系 26-JHD 小鼠(#3204)在一个月內注射 3 次 KLH 和弗氏佐剂(第一次注射完全弗氏佐剂，在 1 周和 3 周后，用不完全弗氏佐剂加强注射)；4 个月后分离脾细胞和淋巴结。在 V 片段内体细胞突变的总频率为 1.6%(52/3198 bp)。

图 67A 和 67B 表示限于 γ 1 序列的广泛的体细胞突变：体细胞突变和类型转换发生在 B 细胞的相同种群中。从超免疫的抗 CEA(参见图 63 的免疫过程)的 HC1 系 57 转基因-JHD 小鼠(#2357)的脾和淋巴结细胞中分离 VH251 cDNA 克隆的部分核苷酸序列。图 67A：IgM：23 个随机检出的 VH251- μ cDNA 克隆。156 bp 的核苷酸序列包含 CDR1 和 2 的周围残基。体细胞突变的总水平为 0.1%(5/3744 bp)。图 67B：IgG：23 个随机检出的 VH251- γ 1 cDNA 克隆。核苷酸序列包含 CDR1 — 3 和周围残基。V 片段内体细胞突变的总频率为 1.1%(65/5658 bp)。与图 67A 中的 μ 序列进行比较：前 156 个核苷酸的突变频率为 1.1%(41/3588 bp)。参见图 66A 和 66B 的解释符号的标注。

图 68 表示 VH51P1 和 VH56P1 在未免疫小鼠中显示有广泛的体细胞突变。IgG 重链可变区 cDNA 的部分核苷酸序列克隆自 9 周龄、未免疫雌性 HC2 系 2550 转基因-JHD 小鼠(#5250)。在 19 个 VH56P1 片段内体细胞突变的总频率为 2.2%(101/4674 bp)。在单个 VH51P1 片段内体细

胞突变的总频率为 2.0% (5/246bp)。图示参见图 66A 和 66B 的解释符号的标注。

图 69 表示带有内源 Ig 座位被破坏了的双转基因小鼠含有人 IgM κ 阳性 B 细胞。从 4 个不同基因型的小鼠脾中分离细胞的 FACS。左边：对照小鼠(#9944,6 周龄雌性 JH+/-,JC κ +/-;杂合野生型小鼠重和 κ 轻链座位, 非转基因的)。第二列：人重链转基因(#9877,6 周龄雌性 JH-/-,JC κ -/-,HC2 系 2550 +;被破坏的小鼠重和 κ 轻链座位纯合, 半合子的 HC2 转基因)。第三列：人 κ 轻链转基因(#9878,6 周龄雌性 JH-/-,JC κ -/-, KCo4 系 4437 +;被破坏的小鼠重和 κ 轻链座位纯合, 半合子的 KCo4 转基因)。右列：双转基因(#9879,6 周龄雌性 JH-/-m,JC κ -/-, HC2 系 2550 +, 被破坏的小鼠重链和 κ 轻链座位纯合; KCo4 系 4437 +;半合子的 HC2 和 KCo4 转基因)。顶行：表达小鼠 λ 轻链(x-轴)和人 κ 轻链(y-轴)的染色的脾细胞。第二行：表达人 μ 重链(x-轴)和人 κ 轻链(y-轴) 的染色的脾细胞。第三行：表达小鼠 μ 重链(x-轴)和人 κ 轻链(y-轴) 的染色的脾细胞。底行：表达小鼠 B220 抗原的染色的脾细胞的直方图(对数荧光: x-轴; 细胞数: y-轴)。对于两个颜色组的各图, 所示四个象限中的相对细胞数量基于碘化丙锭(propidium)染色和光散色给出的相对于 e 参数通经的百分数。在底行所示的各样品中的 B220+细胞馏分以淋巴细胞光散色栅的百分数给出。

图 70 表示在双转基因小鼠血清中分泌的免疫球蛋白水平。来自 18 个 HC2/KCo4 双转基因小鼠的人 μ 、 γ 和 κ 以及小鼠 γ 和 λ , 所述小鼠是内源重链和 κ -轻链座位破坏纯合的。小鼠: (+)HC2 系 2550(每次整合~5 个 HC2 拷贝), KCo4 系 4436(每次整合 1—2 个 KCo4 拷贝); (O)HC2 系 2550, KCo4 系 4437(每次整合~10 个 KCo4 拷贝); (X)HC2 系 2550, KCo4 系 4583(每次整合~5 个 KCo4 拷贝); (□)HC2 系 2572(每次整合 30—50 个 HC2 拷贝), KCo4 系 4437; (Δ)HC2 系 5467(每次整合 20—30 个 HC2 拷贝), KCo4 系 4437。

图 71A 和 71B 表示对人抗原的人抗体反应。图 71A：对重组可溶 CD4 的一级反应。报道了 4 只双转基因小鼠在取血前(O)和免疫后(•) 血清中人 IgM 和人 κ 轻链的水平。图 71B：体内转换成 IgG。为了抑制非特异性交叉反应, 在存在 1.5 μ /ml 过量 IgE、 κ 和 1 % 正常小鼠血清条件下, 用与过氧化物酶结合的多克隆抗人 IgG 检测人 IgG(圈)。在存在 1 % 正常小鼠血清条件下, 用与过氧化物酶结合的多克隆抗人 κ 试剂

检测人 κ 轻链(方块)。列出了一个小鼠(#9344;HC2 系 2550, KCo4 系 4436)的代表性结果。各点代表两个孔减背景吸收值的平均值。

图 72 表示用杂交瘤上清液进行人 PBL 的 FACS 分析, 将人 CD4 + 淋巴细胞和人 CD8 + 淋巴细胞区分开来。

图 73 表示在转基因小鼠血清中的人 α -CD4 IgM 和 IgG。

图 74 表示竞争结合试验, 以比较转基因小鼠 α -人 CD4 杂交瘤单克隆、2C11-8 与 RPA-TA 和 Leu-3A 单克隆。

图 75 表示培养的 2C11-8 杂交瘤的 Ig 表达的生产数据。

图 76 表示构成 Hco7 转基因的重叠的质粒插入片段组。

图 77A 描述了 pGP2b 质粒载体的核苷酸序列和限制图谱。

图 77B 描述了 pGP2b 质粒载体的限制图谱。

图 78(A 和 B)描述了组装大转基因的克隆策略。

图 79 表示大插入片段在高拷贝的 pUC 衍生的质粒中是不稳定的。

图 80 表示噬菌体 P1 克隆 P1 - 570。插入片段覆盖包含 γ 3 和 γ 1 的人重链恒定区部分以及转换元件。N, NotI; S, Sall; X, XhoI。

图 81 表示在 HCo7 转基因动物中, 人 μ 和 γ 1 的血清表达。

图 82 表示在 HCo7/Kco4 双转基因/双缺失小鼠中, 人免疫球蛋白的血清表达。

图 83 表示在 HCo7 转基因小鼠脾 RNA 中, 人 γ 1 和 γ 3 转录物的 RT-PCR 检测。

图 84 表示用 LPS 和 IL - 4 体外诱导人 IgG1 和 IgG3。

图 85 表示浓缩 YAC DNA 浓度的琼脂糖凝胶电泳装置。

图 86 表示来自 HC2/KCo5/JHD/JKD 和 HC2/KCo4/JHD/JKD 小鼠的骨髓细胞的双色 FACS 分析。以百分数给出了 $B220^+/CD43^-$ 、 $B220^+/CD43^+$ 和 $B220^+ IgM^+$ 栅的细胞馏分中的细胞数。

图 87 表示来自 HC2/KCo5/JHD/JKD 和 HC2/KCo4/JHD/JKD 小鼠的脾细胞的双色 FACS 分析。以百分数给出了在各 $B220^{亮}/IgM^+$ 和 $B220^{暗}/IgM^+$ 栅的细胞馏分的细胞数。

图 88 $IgG\kappa$ 抗-nCD4 单克隆抗体与 $CD4^+$ SupT1 细胞的结合。

图 89 通过流式细胞计数对 IgG 抗-CD4 单克隆抗体的表位测定。SupT1 细胞与缓冲液(左列)、2.5 mg/ml RPA-T4(中列)、或 2.5 mg/ml Leu3a(右列)预保温,然后再与 10 种人 IgG 单克隆抗体(用上清液 1:2 稀释的)之一,或嵌合 Leu3a 预保温。在该图中表明了 3 种人 IgG 单克隆抗体的结果。

图 90 用人 $IgG\kappa$ 抗-CD4 单克隆抗体抑制 MLR。

表 1 描述载体 pGPe 的序列。

表 2 描述基因 $V_H49.8$ 的序列。

表 3 描述在本发明转基因小鼠血清中人 IgM 和 IgG 的检测结果。

表 4 描述 VDJ 连接的序列。

表 5 描述了掺入到编码转录物的、pHC1 转基因中的 J 片段在成人外周血淋巴细胞(PBL)的 J 片段中的分布。

表 6 描述了掺入到编码转录物的、pHC1 转基因中的 D 片段在成人外周血淋巴细胞(PBL)的 D 片段中的分布。

表 7 描述了在 pHC1 转基因小鼠和人 PBL 中,来自框架区 VDJ 连接的转录物的 CDR3 肽的长度。

表 8 描述了在 30 个被分析的 pHC1 转基因克隆中,VDJ 区的推测氨基酸序列。

表 9 列出了在所说明的试验中,所用品系 112 的转基因小鼠; (+) 表示存在相应的转基因, (++) 表示动物对 V_HD 失效转基因是纯合的。

表 10 表示数个 0011 小鼠的基因型。

表 11 表示人可变区用于转基因小鼠的杂交瘤。

表 12 表示转基因 V 和 J 片段的使用。

表 13 表示在转基因小鼠的 HC2 重链转基因中，体细胞突变的发生率。

表 14 表示在 YAC 4x17E1 上鉴定人 V_{κ} 片段。

表 15 列出了在小鼠品系 KCo5-9272 中表达的人 V_{γ} 基因的鉴定。

表 16 列出了 IgG κ 抗-nCD4 单克隆抗体的分泌水平。

表 17 列出了与人 CD4 结合的单克隆抗体的速率和亲合力常数。

表 18 列出了人抗-人 CD4 单克隆抗体的亲合力和速率常数。

表 19 列出了人抗-人 CD4 单克隆抗体的亲合力和速率常数。

表 20 报道了抗-CD4 单克隆抗体的亲合力和速率常数。

表 21 列出了用流式细胞计数确定的人抗-人 CD4 单克隆抗体的亲合力常数。

表 22 列出了功能转录物的部分核苷酸序列。

表 23 列出了在杂交瘤转录物中种系 V(D)J 片段的使用。

表 24 描述了在小基因构建中所用的引物、载体和产物。

表 25 描述了人 mAb 对猩猩外周淋巴细胞的影响。

发明详述

如上文所讨论的，需要生产与特异性人抗原反应性的人免疫球蛋白，所述抗原是有前途的治疗和/或诊断靶。但生产与人抗原特异性结合的人免疫球蛋白还有许多问题。

首先，作为 B 细胞源的被免疫的动物必须对提呈的抗原产生免疫反应。为了使动物产生免疫反应，提呈的抗原必须是外源的，而且所述动物对所述抗原不耐受。因此例如，如果需要生产与人蛋白质结合的、具有个体型的单克隆抗体，自身耐受性会使被免疫的人不会对人蛋白质产生实质性的免疫反应，因为可致免疫的抗原表位仅是起因于人群中的蛋白质多态性的表位(同种异型表位)。

第二，如果作为形成杂交瘤的 B 细胞源的动物(以人为例)对真正的自身抗原产生免疫反应，在动物中将产生严重的自身免疫疾病。若人作为杂交瘤的 B 细胞源，根据目前的标准，认为所述自身免疫是不道德的。因此，开发分泌与预定人抗原特异性反应之人免疫球蛋白的杂交瘤存在许多问题，因为需要可靠的分泌人抗体的 B 细胞源，所述 B 细胞会引发抗预定抗原的抗体反应。

可用于得到与人抗原有特异性反应的人抗体的一种方法是,生产带有本发明人免疫球蛋白转基因构建体的转基因小鼠。总之,将含全部或部分人免疫球蛋白重链和轻链座位的转基因,或含合成“小座位”的转基因(下文描述的,在未决申请 U.S.S.N.08/352322, 1994 年 12 月 7 日申请; U.S.S.N. 07/990860, 1992 年 12 月 16 日申请; U.S.S.N. 07/810279, 1991 年 12 月 17 日申请; U.S.S.N. 07/904068, 1992 年 6 月 23 日申请; U.S.S.N. 07/853408, 1992 年 3 月 18 日申请; U.S.S.N. 07/574748, 1990 年 8 月 29 日申请; U.S.S.N. 07/575962, 1990 年 8 月 31 日申请, 以及 PCT/US91/06185, 1991 年 8 月 28 日申请, 以上文献均引入本文作为参考)用于生产转基因非人动物, 所述转基因均含有人重链和轻链座位必需的功能元件。所述转基因非人动物有能力生产由人免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白链, 此外并能对人抗原产生免疫反应。因此, 所述转基因动物可作为与特定人抗原具有反应性的免疫血清源, 可将来自所述转基因动物的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合以产生分泌由人免疫球蛋白基因编码的、并与人抗原有特异性反应的单克隆抗体的杂交瘤。

此前已经报道了含各种免疫球蛋白基因的转基因小鼠的制备。已经用重排的小鼠免疫球蛋白重链或轻链基因生产转基因小鼠。此外, 在转基因小鼠中已经表达了含 μ 或 $\gamma 1$ 恒定区的功能重排的人 Ig 基因。但其中含未重排的(V-D-J 或 V-J 未重排)免疫球蛋白基因的转基因的试验是不稳定的, 在某些情况下, 产生出不完整或很小的重排转基因。但没有公开的实例说明重排或未重排的免疫球蛋白转基因在转基因内的 C_H 基因之间进行了成功地同种型转换。

本发明还提供了鉴定候选杂交瘤的方法, 所述杂交瘤分泌含人免疫球蛋白链的单克隆抗体, 所述免疫球蛋白链主要是由与人恒定区序列相连的多肽中的人 VDJ 序列组成。从含有下列杂交瘤的杂交瘤克隆池中鉴定所述候选杂交瘤: (1)表达主要由人 VDJ 区和人恒定区组成的免疫球蛋白链的杂交瘤克隆, 和(2)表达主要由人 VDJ 区和鼠恒定区组成的异种杂种免疫球蛋白链的反式转换的杂交瘤。在筛选与预定抗原具有结合特异性之抗体的结合条件下, 将各个或合并的杂交瘤克隆上清液与预定的抗原接触, 通常是与通过吸附到固体基质(如微滴定孔)上而固定的抗原接触。还将与人恒定区特异性结合的抗体与杂交瘤上清液和预定抗原在结合条件下接触, 以便所述抗体选择性地与至少一种人恒定区表位结合, 并基本上不与鼠恒定区表位结合; 因此形成复合物, 所述复合物主要由与预定抗原结合的杂交瘤上清液(转基因单克隆抗体)和与人恒定区

特异性结合的抗体(并可用可检测标记或报告基团标记)组成。所述复合物的形成表明杂交瘤克隆或克隆池表达人免疫球蛋白链。

在本发明优选的实施方案中,在筛选中所用的抗人恒定区免疫球蛋白特异性地识别非 μ 、非 δ 同种型,优选 α 或 ϵ ,更优选 γ 同种型恒定区。 γ 同种型的单克隆抗体是优选的(i)因为对于一些治疗应用而言,IgG免疫球蛋白的特征比IgM免疫球蛋白的更好(例如由于IgG二聚体比IgM五聚体小些)和(ii)因为体细胞突变的过程与从 μ 恒定区向非 μ (如 γ)恒定区的型转换有关。从已经进行了型转换的免疫球蛋白种群中选出的免疫球蛋白(如IgG)与抗原的亲合力,高于从未经型转换的种群中选出的免疫球蛋白(如IgM)与抗原的亲合力。参见例如 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1999), 该文献引入本文作为参考。

在一个实施方案中,首先就 γ 同种型恒定区来筛选候选杂交瘤,然后就与预定抗原的特异性结合来筛选表达IgG的杂交瘤群。

因此根据本发明方法,将本发明的转基因小鼠用预定的抗原免疫以诱导免疫反应。从所述小鼠中收集B细胞,然后将所述B细胞与无限增殖细胞融合以产生杂交瘤。首先筛选杂交瘤以鉴定分泌非 μ 、非 δ 同种型Ig(如IgG)的杂交瘤。然后对针对与所需预定抗原的特异性结合该组杂交瘤进行筛选。用如 Harlow and Lane, 抗体: 实验室手册, 冷泉港, 纽约(1988)中所述的标准技术完成筛选。利用该方法,可以从实践上有效鉴定高亲和力的免疫球蛋白(如 K_a 大于约 $10^7 M^{-1}$)。

定义

如本文所用的,术语“抗体”指含有至少两个轻多肽链和两个重多肽链的糖蛋白。每个重和轻多肽链都含有可变区(通常是多肽链的氨基末端部分),所述可变区含有与抗原可相互作用的结构域。每个重和轻链还含有多肽链的恒定区(通常为羧基部分),所述恒定区介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞、一些吞噬细胞和常规补体系统的第一组分(C1q))的结合。

如本文所用的“异源抗体”是相对于生产所述抗体的转基因非人动物而言的。将其定义为具有在不构成转基因非人动物的生物(通常来自于除转基因非人动物以外的品种)中发现之氨基酸序列或相应DNA序列编码的抗体。

如本文所用的,“异种杂种抗体”指含有不同生物源的轻和重链的抗体。例如,具有与鼠轻链相结合的人重链的抗体就是异种杂种抗体。

如本文所用的,“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体类型(如 IgM 或 IgG₁)。

如本文所用的,“同种型转换”指抗体类型或同种型从一种 Ig 类型转变成另一种 Ig 类型的现象。

如本文所用的,“未转换的同种型”指在未发生同种型转换时生产的重链的同种型类型;编码未转换同种型的 C_H 基因通常是紧接功能重排的 VDJ 基因下游的第一个 C_H 基因。

如本文所用的,术语“转换序列”指引起转换重组的 DNA 序列。“转换供体”序列,通常是 μ 转换区,是转换重组过程中待缺失构建体区的 5'(即上游)。“转换受体”区则是在待缺失构建体区和取代恒定区之间的区(如 γ , ϵ 等)。由于没有总是发生重组的特异性位点,因此通常从构建体无法预测最后的基因序列。

如本文所用的,“糖基化方式”是指与蛋白质,更具体地说与免疫球蛋白共价相连的碳水化合物单位的方式。本领域专业人员可认识到与转基因 C_H 基因从中衍生的品种相比,在异源抗体的糖基化方式与非人转基因动物中的所述糖基化方式更相似时,可将异源抗体的糖基化方式表征为与天然发生的非人转基因动物品种产生之抗体的糖基化方式基本相似。

如本文所用的,“特异性结合”指下列抗体特征:(1)与预定抗原结合的亲和力至少为 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$,和(2)以比其与除预定抗原或极为相关抗原以外的非特异性抗原(如 BSA、酪蛋白)结合的亲和力至少高 2 倍的亲和力,优先与预定抗原结合。

本文中用于形容某对象的术语“天然产生的”是指该对象可以在自然界中发现。例如,在生物(包括病毒)中存在的并从天然来源分离的以及未经实验室人们故意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然产生的。

本文所用的术语“重排(的)”指重链或轻链免疫球蛋白座位的构型，其中在分别主要编码完整 V_H 或 V_L 结构域的结构中，V 片段与 D-J 或 J 片段紧密相连。可通过与种系 DNA 进行比较来鉴定重排的免疫球蛋白基因座位；重排的座位至少是一个重组的七/九聚体同源元件。

本文所用的与 V 片段有关的“未重排(的)”或“种系构型”指其中 V 片段不进行重组以便紧邻 D 或 J 片段的一种构型。

对于核酸而言，术语“基本同源”指在进行最佳排列和比较时，两个核酸或指定的序列至少约 80 % 的核苷酸，通常至少约 90 % — 95 %，最佳至少约 98 — 99.5% 的核苷酸是相同的，所述核酸含有适宜的核苷酸插入或缺失。或者，在选择性杂交的条件下，当片段与互补链杂交时，则表示基本同源。核酸可存在于完整细胞、细胞溶解产物中或是以部分纯化的或基本上纯的形式存在。当通过标准技术包括碱/SDS 处理、CsCl 分带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他技术，纯化掉其他细胞组分或其他污染物如其他细胞核酸或蛋白质后，则核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见 F.Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)。

尽管常常是天然序列(除修饰的限制位点等外)，可按照标准技术将来自 cDNA、基因组 DNA 或其混合物的本发明核酸进行突变以提供基因序列。对于编码序列，这些突变可按需要改变氨基酸序列。具体地说，提供了与天然 V、D、J、恒定区、转换区和本文所述的其他序列基本上同源或自这些序列衍生的 DNA 序列(其中“衍生”指序列是与另一序列相同的或从另一序列修饰得到的)。

核酸是“可操作相连的”指与另一核酸序列的功能关系。例如，如果要使启动子或增强子影响序列的转录，则需将其与编码序列可操作相连。就转录调节序列而言，若需连接两个蛋白质的编码区，可操作相连指被连接的 DNA 序列是相邻的，而且必要的时候使两个蛋白质的编码区相邻连接在解读框架中。对于转换序列，可操作相连指序列能够影响转换重组。

能够生产异源抗体的转基因非人动物

以异源抗体库应答外源抗原刺激的转基因非人动物的设计要求在

转基因动物中所含的异源免疫球蛋白转基因在 B 细胞发育的整个过程中均能正确地发挥其功能。在优选的实施方案中，异源重链转基因的正确功能包括同种型转换。因此，构建本发明的转基因以便产生同种型转换以及实现下列一种或多种功能：(1)高水平和细胞类型特异性的表达，(2)功能基因重排，(3)激活并应答等位排斥，(4)表达足够的一级抗体，(5)信号传导，(6)体细胞超突变，和(7)在免疫反应过程中，转基因抗体座位的控制。

从下列公开中显而易见的是，并不需要满足前述所有标准。例如，在其中转基因动物的内源免疫球蛋白座位被功能性破坏的那些实施方案中，转基因不需激活等位排斥。此外，在其中转基因含有功能性重排的重和/或轻链免疫球蛋白基因的那些实施方案中，无需功能基因重排的第二种标准，至少对于已经重排的转基因是如此。关于分子免疫学背景，参见 *Fundamental Immunology*, 2nd edition(1989), Paul William E., ed., Raven Press, N.Y.，该文献引入本文作为参考。

在本发明的一个方面，提供了在转基因动物种系中含重排的、未重排的或重排和未重排组合的异源免疫球蛋白重和轻链转基因的转基因非人动物。每个重链转基因至少含有一个 C_H 基因。此外，重链转基因可含有功能同种型转换序列，该序列能够支持编码多个 C_H 基因的异源转基因在转基因动物的 B 细胞中进行同种型转换。所述转换序列可以是来自作为转基因 C_H 基因来源之品种的种系免疫球蛋白座位中天然的转换序列，或所述转换序列可衍生于接受转基因构建体的品种(转基因动物)中的转换序列。例如，如果人转基因构建体含有类似于天然小鼠重链座位中转换序列的转换序列，用于产生转基因小鼠的人转基因构建体可发生较高频的同种型转换，可能是由于小鼠转换序列与小鼠转换重组酶系统一起可发挥最佳功能，而人转换序列则不行的缘故。可通过常规克隆方法分离并克隆所述转换序列，或以与免疫球蛋白转换区序列有关的公开的序列资料为基础设计的重叠合成寡核苷酸，重新合成所述转换序列(Mills et al., *Nucl. Acids Res.* 18:7305-7316 (1991); Sideras et al., *Intl. Immunol.*, 1:631-642 (1989), 所述文献引入本文作为参考)。

对于前述各个转基因动物，在转基因动物的大部分 B 细胞(至少 10 %)中发现了功能重排的异源重和轻链。

本发明的转基因包含重链转基因，含有编码至少一个可变片段、一

个多样性基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA。免疫球蛋白轻链转基因含有编码至少一个可变基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA。编码轻和重链基因片段的基因片段与转基因非人动物异源，因为它们衍生于或相应于编码免疫球蛋白重和轻链基因片段的 DNA，所述 DNA 来自转基因非人动物以外的品种。在本发明的一个方面，构建转基因以便各个基因片段是未重排的，即不被重排以便编码有功能的转基因轻或重链。所述未重排的转基因有利于 V、D 和 J 基因片段的重组(功能性重排)，并当与抗原接触时，优选有利于将全部或部分 D 区基因片段掺入到转基因非人动物内所得的重排免疫球蛋白重链中。

在另一实施方案中，转基因含有未重排的“小座位”。所述转基因通常含有 C、D 和 J 片段的主要部分以及 V 基因片段的子序列。在所述转基因构建体中，各种调节序列，如启动子、增强子、型转换区、用于 RNA 加工的剪接-供体和剪接-受体序列、重组信号等，含有衍生于异源 DNA 的相应序列。可将所述调节序列掺入到转基因中，所述转基因来自与本发明所用非人动物相同的或相关的品种。例如，可将人免疫球蛋白基因片段与啮齿类免疫球蛋白增强子序列组合在转基因中，用于转基因小鼠。或者，可将合成的调节序列掺入到转基因中，其中所述合成调节序列与哺乳动物基因组中已知的天然功能性 DNA 序列不同源。按照一致的规则如说明剪接-受体位点或启动子/增强子基元之许可序列的规则来设计合成的调节序列。例如，与天然种系的 Ig 座位相比，小座位含有基因组免疫球蛋白座位的一部分，所述免疫球蛋白座位含有至少一个非必需 DNA 部分(例如间插序列；内含子或其部分)的中间(即不在该部分末端)缺失。

本发明还包括含具有重和轻链转基因之种系细胞的转基因动物，其中所述转基因之一含有重排的基因片段，另一个含有未重排的基因片段。在优选的实施方案中，重排的转基因是轻链免疫球蛋白转基因，而未重排的转基因是重链免疫球蛋白转基因。

抗体的结构和产生

所有免疫球蛋白的基本结构均是以由两个轻多肽链和两个重多肽链组成的单位为基础。每个轻链均含有称为可变轻链区和恒定轻链区的两个区。同样，免疫球蛋白重链含有称为可变重链区和恒定重链区的两个区。

重或轻链的恒定区均由被称为重或轻恒定区基因(C_H)片段的基因组序列编码。用特定的重链基因片段定义免疫球蛋白的类型。例如,在人类中, μ 恒定区基因片段确定了 IgM 类型的抗体,而 γ 、 γ_2 、 γ_3 或 γ_4 恒定区基因片段确定了 IgG 类型的抗体以及 IgG 亚型 IgG 1- IgG 4 抗体。同样,用 α_1 或 α_2 恒定区基因片段确定了 IgA 类型的抗体以及亚型 IgA1 和 IgA2 抗体。 δ 和 ϵ 恒定区基因片段分别确定了 IgD 和 IgE 抗体类型。

重和轻免疫球蛋白链的可变区都含有抗体的抗原结合结构域。因为需要抗体在该区具有多样性以结合各种抗原,所以编码起始或一级可变区的 DNA 含有许多不同的 DNA 片段,所述 DNA 片段衍生于特定可变区基因片段的家族。在轻链可变区的情况下,所述家族含有可变(V)基因片段和连接(J)基因片段。因此,轻链的起始可变区由一个 V 基因片段和一个 J 基因片段编码,所述 V 基因片段和 J 基因片段分别选自生物基因组 DNA 中所含的 V 和 J 基因片段家族。在重链可变区的情况下,编码重链的起始或一级可变区的 DNA 含有一个重链 V 基因片段、一个重链多样性(D)基因片段和一个 J 基因片段,每个片段分别选自基因组 DNA 中免疫球蛋白基因片段的 V、D 和 J 家族。

为了增加有助于形成抗体结合位点的序列多样性,优选重链转基因包括有利于 V-D-J 功能重排的顺式作用序列,在所述重排过程中,可将全部或部分 D 区基因序列掺入到重排的 V-D-J 基因序列中。通常至少约 1 %表达的由转基因-编码的重链(或 mRNA)在 V 区中包含可识别的 D 区序列。优选,至少约 10 %转基因-编码的 V 区包含可识别的 D 区序列,更优选至少约 30 %,且最优选 50 %以上包含可识别的 D 区序列。

可识别的 D 区序列通常是对应于重链转基因 D 区基因片段中的序列的至少约 8 个的连续的核苷酸和/或由所述 D 区核苷酸序列编码的氨基酸序列。例如,如果转基因包含 D 区基因 DHQ52,则含有位于 V 基因片段和 J 基因片段之间的 V 区内之序列 5'-TAACTGGG-3'的转基因-编码的 mRNA 就可识别为含 D 区序列,具体地说为 DHQ52 序列。同样,例如如果转基因包含 D 区基因 DHQ52,则含有位于 V 基因片段氨基酸序列与 J 基因片段氨基酸序列之间的 V 区内的氨基酸序列-DAF-的转基因-编码的重链多肽就可识别为含 D 区序列,具体地说是 DHQ52 序列。但,由于可将 D 区片段以不同程度掺入到 VDJ 连接和各解读框架中,

所以就需要将重链可变区的 D 区与转基因中的 D 区片段进行比较以确定掺入的特定 D 片段。此外，重组过程中，可能的外切核酸酶消化也会在 V-D-J 重组过程中产生不精确的 V-D 和 D-J 连接。

但由于体细胞突变和 N 区添加，有些 D 区序列也是可识别的，但可能不会等同于转基因中的连续的 D 区序列。例如，可将核苷酸序列 5'-CTAAXTGGGG-3' (其中 X 是 A、T 或 G，而且位于重链 V 区，两侧翼为 V 区基因序列和 J 区基因序列) 识别为对应于 DHQ52 序列 5'-CTAACTGGG-3'。同样，例如可将位于 V 区内的多肽序列-DAFDI-、-DYFDY-或-GAFDI-(这些序列在氨基末端一侧翼为由转基因 V 基因序列编码的氨基酸序列，在羧基末端一侧翼为由转基因 J 基因序列编码的氨基酸序列) 识别为 D 区序列。

因此，由于体细胞突变和 N 区添加可在衍生于转基因 D 区的序列中产生突变，所以用下列定义作为确定是否存在可识别 D 区序列的标准。氨基酸序列或核苷酸序列可识别为 D 区序列如果：(1) 该序列位于 V 区内，而且其两侧翼一侧翼为 V 基因序列(核苷酸序列或推测的氨基酸序列)，另一侧翼为 J 基因序列(核苷酸序列或推测的氨基酸序列)和(2) 该序列基本上相同或相似于已知的 D 基因序列(核苷酸序列或编码的氨基酸序列)。

本文所用术语“基本相同”指多肽序列或核酸序列的特征，其中多肽序列与参考序列有至少 50 % 的一致性，常常有至少约 80 % 的序列一致性，有时有约 90 % 以上的序列一致性，而核酸序列与参考序列有至少 70 % 的序列一致性。除去总共占不到参考序列 35 % 的小缺失或增加，计算出该序列一致性的百分数。参考序列可以是较大序列如整个 D 基因的子序列；但如果是多核苷酸，参考序列至少应有 8 个核苷酸长，如果是多肽，至少应有 3 个氨基酸长。通常，参考序列至少是 8-12 个核苷酸或至少 3-4 个氨基酸，优选参考序列是 12-15 个核苷酸或更多，或至少 5 个氨基酸。

术语“基本相似”指多肽序列的特征，其中多肽序列与参考序列有至少 80 % 的相似性。通过记录相同氨基酸或位置保守的相似氨基酸取代来计算序列相似性百分比。位置保守的氨基酸取代是由单个核苷酸取代产生的；第一个氨基酸由第二个氨基酸取代，其中第一个氨基酸的密码子与第二个氨基酸的密码子只因一个核苷酸取代而不同。因此，例如

序列-Lys-Glu-Arg-Val-与序列-Asn-Asp-Ser-Val-基本相似,因为通过只导入3个取代突变,在4个源密码子中的3个进行单个核苷酸取代,就可将序列-AAA-GAA-AGA-GUU-突变成-AAC-GAC-AGC-GUU-。参考序列可以是较大序列如整个D基因的子序列;但参考序列至少有4个氨基酸长。通常,参考序列至少有5个氨基酸,优选参考序列有6个氨基酸长或更多。

初级库

产生编码重和轻链免疫球蛋白基因DNA的过程主要发生在正在发育的B细胞中。在连接各免疫球蛋白基因片段前,在初级B细胞的前体中,发现大部分V、D、J和恒定(C)基因片段是V、D、J和C基因片段簇。通常重或轻链的所有基因片段位于一个染色体上相当接近的位置上。在各免疫球蛋白基因片段重组前,将所述基因组DNA称为“未重排的”基因组DNA。在B细胞分化的过程中,V、D、J(或在轻链基因的情况下只有V和J)的适宜的家庭成员之一进行重组以形成功能重排的重和轻免疫球蛋白基因。所述功能重排是可变区片段重排,以便形成编码有功能可变区的DNA。该基因片段重排过程似乎是按序进行的。首先,产生重链D到J连接,然后产生重链V到DJ连接和轻链V到J连接。将编码轻和/或重链中有功能可变区的该起始形式的DNA称为“功能重排的DNA”或“重排的DNA”。在重链的情况下,将所述DNA称为“重排的重链DNA”,在轻链的情况下,将所述DNA称为“重排的轻链DNA”。用相似的语言来描述本发明转基因的功能重排。

形成功能性重和轻链可变区的可变区基因片段的重组是由重组信号序列(RSS)介导的,该序列位于可发生重组的V、D和J片段侧翼。必需并足以进行同向重组的RSS含有一对称的七聚体、一个AT富集九聚体和一个12或23个碱基对的间插序列区。在不同的座位和进行D-J(或V-J)重组的品种中,这些信号是保守的并且是功能上可交换的。参见 Oettinger, et al.,(1990),科学, 248, 1517 — 1523 及其中引述的参考文献。七聚体含有序列CACAGTG或其类似物,其后是一不保守的序列的间隔区,接下来的九聚体含有序列ACAAAACC和其类似物。这些序列是在J或V和D基因片段的下游发现的。紧接着种系D和J片段之前,又是两个重组信号序列,第一个是九聚体,然后是七聚体,两者由一非保守序列隔开。在V_L、V_H或D片段后的七聚体和九聚体序列与它们将与之重组的J_L、D或J_H片段前的序列互补。七聚体与九聚体之间的间隔序列有12个碱基对或22-24个碱基对长。

除 V、D 和 J 片段的重排外，通过轻链 V 和 J 片段之间以及重链 D 和 J 片段之间的可变重组，也可在初级免疫球蛋白重和轻链中产生多样性。所述可变重组是通过在所述片段的被连接处发生变化而产生的。在轻链中的所述改变通常发生在 V 基因片段最后的密码子内以及在 J 片段开始的密码子内。同样的不精确连接也会在 D 和 J_H 片段之间的重链染色体上发生，并可能延伸长达 10 个核苷酸。此外，可将不由基因组 DNA 编码的数个核苷酸插入在 D 和 J_H 之间以及 V_H 和 D 基因片段之间。这些核苷酸的添加称为 N 区多样性。

在 VJ 和/或 VDJ 重排后，位于重排可变区下游的重排可变区和一个或多个恒定区基因片段的转录，产生一初级 RNA 转录物，将其适当剪接后，得到编码全长重或轻免疫球蛋白链的 mRNA。所述重和轻链包含一个前导信号序列以使免疫球蛋白分泌和/或插入到 B 细胞的跨膜区。编码该信号序列的 DNA 被包含在用于形成重或轻免疫球蛋白链可变区之 V 片段的第一外显子内。适宜的调节序列也存在于所述 mRNA 中以控制 mRNA 的翻译，从而产生编码的重和轻免疫球蛋白多肽，在将其彼此适宜连接后，形成抗体分子。

可变区基因片段中的所述重排以及所述连接过程中可能发生之可变重组的结果是产生了初级抗体库。通常，已经分化到该阶段的一种 B 细胞产生单一的初级抗体。在该分化过程中，抑制基因片段功能重排的细胞事件发生，所述基因片段不是功能重排的 Ig 基因中所含的那些片段。将二倍体 B 细胞保持所述单特异性的过程称为等位排斥。

二级库

为应答外源抗原从含有初级库的一组序列表达免疫球蛋白的 B 细胞克隆是立即可得的，由于简单 VJ 和 VDJ 连接所产生的有限的多样性，由所谓初级应答产生的抗体的亲合力相对较低。两种不同类型的 B 细胞产生这种初始反应：形成初级抗体之细胞的前体和产生二级抗体的 B 细胞的前体(Linton et al., 细胞, 59: 1049-1059(1989))。在应答特定的抗原时第一类 B 细胞成熟成分泌 IgM 的浆细胞。另一类 B 细胞通过进入 T 细胞依赖的成熟途径而对与抗原的最初接触作出反应。

在抗原刺激的 B 细胞克隆的 T 细胞依赖性成熟作用中，细胞表面上的抗体结构以两种方式发生改变：恒定区转换成非 IgM 亚型，通过多

个的单氨基酸取代而修饰可变区的序列以产生亲合力较高的抗体分子。

如前所述，重或轻 Ig 链的各可变区含有抗原结合结构域。通过氨基酸和核酸测序已经确定，二级反应过程中的体细胞突变可在包含三个互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)的整个 V 区内均可能发生，所述决定区也称为超变区 1、2 和 3(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest(1991) U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 该文献引入本文作为参考)。CDR1 和 CDR2 位于可变基因片段内，而 CDR3 主要是 V 和 J 基因片段或 V、D 和 J 基因片段重组的结果。不由 CDR1、2 或 3 组成的可变区的那些部分通常称为框架区，FR1、FR2、FR3 和 FR4。参见图 1，在超突变过程中，重排的 DNA 产生突变以产生具有改变的 Ig 分子的新克隆。与外源抗原具有较高亲合力的那些克隆通过辅助 T 细胞选择性地扩增，使表达的抗体亲合力成熟。克隆选择通常会导致在 CDR1、2 和/或 3 区内含有新突变的克隆表达。但突变也会在这些区外发生，从而影响抗原结合结构域的特异性和亲合力。

能够生产异源抗体的转基因非人动物

本发明一个方面的转基因非人动物是通过将本发明的至少一种免疫球蛋白转基因(下文讨论的)导入到非人动物的受精卵或早期胚胎中而产生的。用于本发明的非人动物通常包含能够重排免疫球蛋白基因片段以产生初级抗体反应的任何哺乳动物。所述非人转基因动物包括，例如转基因猪、转基因大鼠、转基因兔、转基因牛以及其它转基因动物品种，特别是本领域已知的哺乳动物。特别优选的非人转基因动物是小鼠和啮齿类的其它成员。

但，本发明不限于使用小鼠。反之，能够产生初级和二级抗体反应的任何非人哺乳动物均可使用。所述动物包括非人灵长类如猩猩、牛、绵羊和猪，啮齿类家族的其它成员如大鼠，以及兔和豚鼠。特别优选的动物是小鼠、大鼠、兔和豚鼠，最佳为小鼠。

在本发明的一个实施方案中，可将来自人基因组的各种基因片段以未重排的形式用于重和轻链转基因中。在该实施方案中，将所述转基因导入到小鼠中。轻和/或重链转基因的未重排基因片段具有人独特的 DNA 序列，它们不同于小鼠基因组中的内源免疫球蛋白基因片段。它

们在不由 B 细胞组成的种系和体细胞中很容易以未重排形式检测到，在 B 细胞中以重排形式很容易被检测到。

在本发明的另一实施方案中，转基因包括重排的重和/或轻免疫球蛋白转基因。相应于功能性重排的 VDJ 或 VJ 片段的所述转基因的具体片段含有明显区别于小鼠内源免疫球蛋白基因片段的免疫球蛋白 DNA 序列。

与由小鼠 B 细胞编码的氨基酸序列相比，在 DNA 序列中的这些差异也反映在由所述人免疫球蛋白转基因编码的氨基酸序列中。因此用抗体可以检测本发明转基因非人动物中的人免疫球蛋白氨基酸序列，所述抗体是对人免疫球蛋白基因片段编码之免疫球蛋白表位特异性的。

含来自人或其它品种之未重排转基因的转基因 B 细胞，可功能性地重排适宜的基因片段以形成功能重排的轻和重链可变区。显而易见的是，由所述重排转基因编码的抗体含有的 DNA 和/或氨基酸序列与实施本发明所用的非人动物中的正常 DNA 和/或氨基酸序列是异源的。

未重排的转基因

如本文所用的，“未重排的免疫球蛋白重链转基因”含有编码至少一个可变基因片段、一个多样性基因片段、一个连接基因片段和一个恒定区基因片段的 DNA。所述重链转基因的每个基因片段都衍生于编码免疫球蛋白重链基因片段的 DNA，或具有与其相应的序列，所述重链基因片段来自与所述转基因被导入的非人动物不同的种。同样，如本文所用的，“未重排的免疫球蛋白轻链转基因”含有编码至少一个可变基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA，其中所述轻链转基因的各基因片段衍生于编码免疫球蛋白轻链基因片段的 DNA，或具有与其相应的序列，所述轻链基因片段来自与所述轻链转基因被导入的非人动物不同的种。

本发明该方面的所述重和轻链转基因含有未重排形式的上述基因片段。因此，适宜的重组信号序列(RSS)被置于重链转基因的 V、D 和 J 片段之间以及轻链转基因的 V 和 J 片段之间。此外，所述转基因还包含适宜的 RNA 剪接信号以便将恒定区基因片段与 VJ 或 VDJ 重排的可变区相连。

为了有利于在含有一个以上 C 区基因片段,如来自人基因组的 C μ 和 C γ 1 的重链转基因内进行同种型转换,将下文解释的“转换区”插入到各恒定区基因片段的上游和可变区基因片段的下游以便在所述恒定区之间进行重组,使得免疫球蛋白发生类型转换,如从 IgM 转换成 IgG。所述重和轻链免疫球蛋白转基因还含有位于可变区基因片段上游的包含启动子区的转录控制序列,它们通常含有 TATA 基元序列。可近似地将启动子区定义为当与下游序列可操作相连时,可使下游序列进行转录的 DNA 序列。启动子还需要其它相连的顺式作用序列存在以便产生有效的转录。此外,优选还可包括参与无效(Sterile)转录物转录的其它序列。在公开的文献中可发现参与无效转录物表达的其它序列的实例,所述文献包括 Rothman et al., Intl. Immunol. 2:621-627 (1990); Reid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:840-844 (1989); Stavnezer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7704-7708(1988); and Mills et al., Nucl. Acids Res. 18:7305-7316(1991), 各文献均引入本文作为参考。这些序列通常包括紧接转换区上游的至少 50 bp, 优选转换区上游的约至少 200 bp; 更优选转换区上游约至少 200-1000 bp 或更长的序列。适宜的序列在紧接着人 S γ 1、S γ 2、S γ 3、S γ 4、S α 1、S α 2 和 S ϵ 转换区的上游; 优选紧接人 S γ 1 和 S γ 3 转换区上游的序列, 其中 S γ 1 最为优选。另外, 或者结合鼠 Ig 转换序列一起使用; 一般最好使用与转基因非人动物相同种的 Ig 转换序列。此外, 在紧邻转基因转换序列的上游优选包含干扰素(IFN)可诱导转录调节元件如 IFN-可诱导增强子。

除启动子外, 可使用主要在 B 谱系细胞中发挥功能的其它调节序列。因此, 例如采用优选位于轻链转基因的 J 和恒定区基因片段之间的轻链增强子序列, 来增强转基因的表达, 由此有利于等位排斥。在重链转基因的情况下, 也使用调节增强子。用所述调节序列使转基因的转录和翻译达到最大程度以便诱导等位排斥并产生相对高水平的转基因表达。尽管已经对前述启动子和增强子调节控制序列进行了一般性描述, 但所述调节序列可以是与非人动物异源的, 从所述非人动物的基因组中得到异源转基因免疫球蛋白基因片段。或者, 所述调节基因片段衍生于含重和轻转基因的非人动物或很相近品种基因组中的相应调节序列。

在优选的实施方案中, 基因片段衍生于人类。含所述重和轻转基因的转基因非人动物能够针对施用于该动物之特异性抗原产生 Ig-介导的免疫反应。在所述动物体内产生能够生产异源人抗体的 B 细胞。无限增殖化并针对适宜的单克隆抗体(Mab)进行筛选后, 提供了治疗性的人单

克隆抗体源，如杂交瘤。当治疗性地施用于人时，所述人 Mab 具有显著降低的免疫原性。

尽管优选的实施方案公开了含人基因片段的重和轻转基因的构建，但本发明不限于此。就此而言，应理解本文所述的教导很容易适用于来自人以外品种的免疫球蛋白基因片段。例如，除用本发明的抗体治疗人外，可将由适宜基因片段编码的治疗抗体用于产生用在兽类中的单克隆抗体。

重排的转基因

在另一实施方案中，转基因非人动物含有转基因动物种系中的至少一个功能重排的异源重链免疫球蛋白转基因。所述动物含有表达所述重排重链转基因的所有初级 B 细胞。当与抗原接触后，所述 B 细胞优选能够发生体细胞突变以形成与抗原具有高亲和力和对抗原具特异性的异源抗体。所述重排的转基因含有至少两个 C_H 基因以及同种型转换所必需的相关序列。

本发明还包括含有带重和轻链转基因之种系细胞的转基因动物，其中所述转基因之一含有重排的基因片段，另一个含有未重排的基因片段。在所述动物中，重链转基因应含有至少两个 C_H 基因以及同种型转换所必需的相关序列。

本发明还包括生产本发明转基因所用的合成的可变区基因片段库的方法。所述方法包括产生免疫球蛋白 V 片段 DNA 的种群，其中每个 V 片段 DNA 编码一个免疫球蛋白 V 片段，并在每个末端含有一个限制核酸内切酶切割识别位点。此后将免疫球蛋白 V 片段 DNA 种群串连起来以形成合成的免疫球蛋白 V 片段群。所述合成的可变区重链转基因应含有至少两个 C_H 基因以及同种型转换所必需的相关序列。

同种型转换

在 B 淋巴细胞的发育中，细胞最初生产具有结合特异性的 IgM，所述结合特异性是由产生重排的 V_H 和 V_L 区决定的。随后各 B 细胞和其子代细胞合成具有相同 L 和 H 链 V 区的抗体，但它们可转换 H 链的同种型。

μ 和 δ 恒定区的使用主要是由不同的剪接决定的，这样可以在单一

细胞中共表达 IgM 和 IgD。在基因重排缺失了 C_{μ} 和 C_{δ} 外显子后, 其它重链同种型($\gamma\alpha$ 和 ϵ)只天然表达。称为同种型转换的该基因重排过程通常是通过位于各重链基因上游的所谓转换片段(除 δ 外)之间的重组而进行的。各转换片段为 2-10 kb 长, 并主要由短重复序列组成。重组的精确位置随各类型的转换而不同。研究表明转换可能是与细胞 C_H 序列的丢失有关, 所述研究是利用溶液杂交动力学或采用 cDNA 衍生的 C_H 探针的 Southern 印迹进行的。

μ 基因的转换(S)区, S_{μ} 位于编码序列 5' 的约 1-2 kb-处, 并由许多串联重复的 $(GAGCT)_n(GGGGT)$ 序列组成, 其中 n 通常为 2 到 5, 但最多可达 17。(参见 T. Nikaido et al., Nature 292:845-848(1981))。

在其它 C_H 基因的 5' 也发现了类似的跨数千个碱基对的内部重复转换序列。 S_{α} 区已被测序并发现其由串联重复的 80-bp 同源单位组成, 而鼠 $S_{\gamma 2a}$ 、 $S_{\gamma 2b}$ 和 $S_{\gamma 3}$ 均含有彼此很相似的重复的 49-bp 同源单位。(参见 P. Szurek et al., J. Immunol 135: 620-626(1985) and T. Nikaido et al., J. Biol. Chem. 257:7322-7329(1982), 所述文献引入本文作为参考)。所有已测序的 S 区均包含出现率很高的五聚体 GAGCT 和 GGGGT, 它们是 S_{μ} 基因的基本重复元件(T. Nikaido et al., J. Biol. Chem. 257:7322-7329(1982), 所述文献引入本文作为参考); 在其它 S 区, 这些五聚体不象在 S_{μ} 中那样精确地串联重复, 但它们夹在较大的重复单位中间。 $S_{\gamma 1}$ 区有另外的较高级的结构: 两个同向重复序列, 两侧翼各有两个 49-bp 串联重复序列簇。(参见 M.R.Mowatt et al., J. Immunol. 136:2674-2683(1986), 该文献引入本文作为参考)。

已发现人 H 链基因的转换区与小鼠 H 链基因的转换区很相似。实际上, 发现人与小鼠 C_H 基因 5' 克隆之间的相似性只限于 S 区, 这证明了这些区在生物学上是很重要的。

μ 和 α 基因之间的转换重组产生了混合的 S_{μ} - S_{α} 序列。在总是发生重组的 S_{μ} 或在任何其它 S 区中, 通常都没有特异性位点。

通常, 与 V-J 重组的酶机制不同, 转换机制显然容纳了种系 S 前体的重复同源区的不同排列, 然后在排列内的不同位置将序列连接。(参见 T.H. Rabbits et al., Nucleic Acids Res. 9:4509-4524(1981) and J. Ravetch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6734-6738(1980), 该文献引入本文

作为参考)。

尚不了解转换成特定同种型的选择性激活机制的确切内容。尽管内源性因素如淋巴因子和细胞因子可能会上调同种型-特异性重组酶，但也可能是相同的酶促机制催化向所有同种型的转换，而且特异性依赖于将这种机制靶导向特异的转换区。

已经表明 T 细胞衍生的淋巴因子 IL-4 和 IFN γ 特异性地促进某些同种型的表达：在小鼠中，IL-4 降低 IgM、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 的表达，提高 IgE 和 IgG1 的表达；而 IFN γ 选择性地刺激 IgG2a 的表达并对 IL-4-诱导的 IgE 和 IgG1 表达的增加有拮抗作用(Coffman et al., J. Immunol. 136:949(1986) and Snapper et al., Science 236:944(1987)，所述文献引入本文作为参考)。IL-4 和 IL-5 的组合可促进 IgA 的表达(Coffman et al., J. Immunol. 139:3685(1987))。

说明 T 细胞对转换所起作用的大部分试验并未排除这样一种可能性，即在发生特定转换重组的细胞中观察到的增加可能反映了对转换前或定型前细胞的选择；但最可能的解释是淋巴因子实际上促进了转换重组。

类型转换的诱导似乎是与无效转录物有关，所述转录物起始于转换片段的上游(Lutzker et al., Mol. Cell. Biol. 8:1849(1988); Stavnezer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7704(1988); Esser and Radbruch, EMBO J. 8:483(1989); Berton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2829(1989); Rothman et al., Int. Immunol. 2:621(1990)，各文献均引入本文作为参考)。例如，观察到的 IL-4 对 γ 1 无效转录物的诱导作用和 IFN- γ 的抑制作用分别与 IL-4 促进培养 B 细胞中向 γ 1 的转换以及 IFN- γ 抑制 γ 1 表达有关。因此，包含影响无效转录物转录的调节序列也可以影响同种型的转换率。例如，增加特定无效转录物的转录通常会提高涉及相邻转换序列的同种型转换重组的频率。

出于以上原因，优选在用于同种型转换的各转换区上游的约 1-2 kb 处，转基因包含转录调节序列。这些转录调节序列优选包括启动子和增强子元件，更优选包含与转换区天然相连(即在种系构型中存在的)的 5' 侧翼区(即上游)。该 5' 侧翼区通常约至少 50 个核苷酸长，优选约至少 200 个核苷酸，最佳为至少 500 - 1000 个核苷酸。

尽管可将来自一个转换区的 5' 侧翼序列与用于转基因构建的不同转换区相连(例如, 可将来自人 $S_{\gamma 1}$ 转换序列的 5' 侧翼区移植到 $S_{\alpha 1}$ 转换序列的上游; 将鼠 $S_{\gamma 1}$ 侧翼区移到与人 $\gamma 1$ 转换序列相邻处; 或将鼠 $S_{\gamma 1}$ 转换序列移到人 $\gamma 1$ 编码区上), 在一些实施方案中, 优选插入在转基因构建体中的各转换区含有 5' 侧翼区, 该侧翼区在天然种系构型的上游。

单克隆抗体

可用本领域熟知的各种技术生产单克隆抗体。总之, 将来自用目标抗原免疫之动物的脾细胞无限增殖化, 通常是通过与骨髓瘤细胞融合而达到的(参见, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976))。无限增殖化的其它方法包括用 E-B 病毒、癌基因或反转录病毒转化或本领域熟知的其它技术。从单一无限增殖细胞产生的克隆中筛选生产对所需抗原具特异性和亲和力的抗体, 通过各种技术, 包括注射到脊椎动物宿主的腹腔中, 可提高所述细胞的单克隆抗体产率。这些领域有用的各种技术的有关讨论参见例如 Harlow and Lane, 抗体: 实验室手册, 冷泉港, 纽约(1988), 所述技术包括: 免疫接种动物以生产免疫球蛋白; 生产单克隆抗体; 标记免疫球蛋白以用作探针; 免疫亲和纯化; 以及免疫检测。

转基因初级库

A. 人免疫球蛋白座位

转基因功能的一个重要要求是产生初级抗体库, 所述成分必需足够多以引发对各种抗原的二级免疫反应。重排的重链基因由一个肽外显子、一个可变区外显子和串联排列的多-结构域恒定区组成, 每个组分均是由数个外显子编码的。每个恒定区基因编码不同类型免疫球蛋白的恒定部分。在 B 细胞发育的过程中, 缺失与 V 区邻近的恒定区, 从而表达新的重链。对各类型的重链, RNA 剪接的不同方式会产生跨膜和分泌的免疫球蛋白。

估计人重链座位由近 200 个 2 Mb 的 V 基因片段(目前的数据认为存在约 50 — 100 个 V 基因片段)、约 40 kb 的近 30 个 D 基因片段、3 kb 内的 6 个 J 片段簇和约 300 kb 以上的 9 个恒定区基因片段组成。整个座位占据 14 号染色体长臂远端的约 2.5 Mb。

B. 基因片段转基因

1. 重链转基因

在优选的实施方案中,免疫球蛋白重和轻链转基因含有来自人的未重排的基因组 DNA。在重链的情况下,优选的转基因含有长度为 670-830 kb 的 NotI 片段。该片段的长度是不确定的,因为尚未精确确定 3' 的限制位点。但已知其位于 $\alpha 1$ 和 $\psi\alpha$ 基因片段之间。该片段含有已知 V_H 家族的所有 6 个成员、D 和 J 基因片段,以及 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 和 $\alpha 1$ 恒定区(Berman et al., EMBO J. 7:727-738(1988), 该文献引入本文作为参考)。含所述转基因的转基因小鼠品系正确地表达 B 细胞发育所需的重链(IgM),和至少一种转换的重链(IgG₁),以及足够大量的可变区库以引发针对大部分抗原的二级反应。

2. 轻链转基因

可同样构建含有来自人轻链座位所有必需基因片段和调节序列的基因组片段。按实施例和题目为“能够生产异源抗体的转基因非人动物”(1990 年 8 月 29 日申请, U.S.S.N 07/574748)的未决申请中的描述构建所述转基因。

C. 通过体内重组在细胞内产生的转基因

无需分离在一个 DNA 片段上的所有或部分重链座位。因此例如可在转基因(transgenesis)过程中,在非人动物体内形成来自人免疫球蛋白重链座位的 670 — 830 kb NotI 片段。所述体内转基因构建是通过将两个或多个重叠 DNA 片段导入到非人动物的胚胎核内而产生的。DNA 片段的重叠部分含有基本上同源的 DNA 序列。在与包含在胚胎核内的重组酶接触后,重叠的 DNA 片段以适宜的方向进行同源重组以形成 670 — 830 kb NotI 重链片段。

可将体内转基因构建用于形成任何数量的免疫球蛋白转基因,这是因为用目前的技术很难或不可能进行如此大小的操作。因此体内转基因构建可用于产生比用 YAC 载体操作产生的 DNA 片段大的免疫球蛋白转基因(Murray and Szostak, Nature 305:189-193)。可将所述转基因构建用于将基本上整个的免疫球蛋白座位导入非人动物中,所述免疫球蛋白座位来自与转基因非人动物不同的种。

除形成基因组免疫球蛋白转基因外,还可将体内同源重组用于形成实施例中所描述的“小座位”转基因。

在利用体内转基因构建体的优选实施方案中，各重叠的 DNA 片段优选含有重叠的基本上同源的 DNA 序列，该序列位于一个 DNA 片段的一个末端和第二个 DNA 片段的一个末端之间。DNA 片段的所述重叠部分优选含有约 500 bp-约 2000 bp，最佳为 1.0 kb-2.0 kb。在普通转让的题目为“通过 DNA 片段的同源重组而使 DNA 在细胞内产生”(1990 年 8 月 29 日申请，U.S.S.N. 07/574,747)的美国专利申请中也描述了在体内形成转基因的重叠 DNA 片段的同源重组。

D. 小座位转基因

如本文所用的，术语“免疫球蛋白小座位”指通常不到约 150 kb，一般在约 25-200 kb 之间，含至少一种下列组分的 DNA 序列(可在较长的序列内)：功能可变(V)基因片段、功能连接(J)区片段、至少一个功能恒定(C)区基因片段，而且如果是重链小座位，还可以含有功能多样性(D)区片段，以便所述 DNA 序列含有至少一种实质性的不连续(如相对于基因组 DNA 序列而言，通常至少约 2—5 kb，优选 10-25 kb 或更长)。轻链小座位转基因至少 25 kb 长，通常为 50—60 kb。重链转基因通常约 70—80 kb，优选至少约 60 kb，并含有两个与转换区可操作相连的恒定区。此外，小座位的个体元件优选是种系构型的，并能够在转基因动物的前 B 细胞中进行基因重排以便表达具有各种抗原特异性的功能抗体分子，所述各种抗原特异性全部是由小座位元件编码的。另外，含有至少两个 C_H 基因和必需转换序列的重链小座位通常能够进行同种型转换，以便产生不同免疫球蛋白类型的功能抗体分子。所述同种型转换可在转基因非人动物体内的 B 细胞中发生，或发生在从转基因非人动物中取出的 B 细胞谱系的培养细胞中。

在另一优选实施方案中，免疫球蛋白重链转基因含有一个或多个各种 V_H、D 和 J_H 基因片段以及两个或多个 C_H 基因。至少将每种适宜类型的基因片段中的一个插入到小座位转基因中。就重链转基因的 C_H 片段而言，优选转基因含有至少一个 μ 基因片段和至少一个其它恒定区基因片段，优选 γ 基因片段，最佳为 γ_3 或 γ_1 。这种优先选择会在编码的免疫球蛋白的 IgG 与 IgM 形式之间进行类型转换并生产可分泌的高亲和力非 IgM 免疫球蛋白。也可以使用其它恒定区基因片段如编码用于 IgD、IgA 和 IgE 生产的那些。

本领域专业人员还可以构建这样的转基因，即其中重链 C_H 基因出现的顺序不同于作为 C_H 基因供体之品种种系中的天然空间顺序的转基因

因。

另外,本领域专业人员可以选择来自品种内多个个体的 C_H 基因(如同种异体的 C_H 基因)并将所述基因插入到转基因中,作为能够进行同种型转换的额外的 C_H 基因;然后在一些实施方案中,所得的转基因非人动物可生产各种类型的抗体,包括转基因 C_H 基因所得自的品种所代表的所有同种异型。

另外,本领域专业人员可从不同品种中选择 C_H 基因以将其插入到转基因中。各 C_H 基因包括功能转换序列,尽管所用的转换序列不必是那些与 C_H 基因天然相邻的那些序列。种间 C_H 基因组合会产生可生产各种类型抗体的转基因非人动物,所述抗体对应于来自各个种的 C_H 基因。含种间 C_H 转基因的转基因非人动物可作为构建杂交瘤的 B 细胞源以生产兽用单克隆抗体。

人中的重链 J 区片段含有 6 个功能 J 片段和 3 个 DNA 为 3 kb 长的假基因簇。已知其相对紧密的大小和分离这些片段以及 μ 基因和一个 23 kb SfiI/SpeI 片段上 δ 基因 5' 部分的能力(Sado ,et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 154:264271(1988), 该文献引入本文作为参考),优选将所有 J 区基因片段均用于小座位构建体。由于该片段包括 μ 和 δ 基因之间的区域,因此它可能含有 μ 表达所需的所有顺式连接的 3' 调节元件。此外,由于该片段包括整个 J 区,所以它含有重链增强子和 μ 转换区(Mills et al., Nature 306:809(1983);Yancopoulos and Alt, Ann. Rev. Immunol. 4:339-368(1986), 所述文献引入本文作为参考)。该片段还含有引发 VDJ 连接以形成初级 B 细胞的转录起始位点(Yancopoulos and Alt, Cell 40:271-281(1985), 该文献引入本文作为参考)。或者,可用包含部分 D 区的 36 kb BssHII / SpeI 片段代替 23 kb SfiI / SpeI 片段。用所述片段增加 5' 侧翼序列的量以促进有效的 D 到 J 连接。

人 D 区由 4 个同源的 9 kb 亚区组成,所述亚区是串联的(Siebenlist, et al, (1981)Nature ,294,631-635)。各亚区含有最多达 10 个 D 片段。已将这些片段中的一些作了图谱分析并列在图 4 中。可用两种不同的方法产生小座位 D 区。第一种方法是只使用位于短连续区之 DNA 上的那些 D 片段,该 DNA 包含一个或两个重复的 D 亚区。候选物是含 12 个 D 片段的一个 15 kb 片段。该 DNA 由 2 个连续的 EcoRI 片段组成,并已将其完全测序(Ichihara ,et al.,(1988), EMBO J. ,7,4141-4150)。12 个 D 片段

足以满足初级库。但由于 D 区分散的性质, 因此另一种方法是将数个不连续的含 D-片段的片段连接在一起, 以产生片段数量较多的小片段 DNA。例如通过确定是否存在侧翼九聚体和七聚体序列(同上文)并参考有关文献可鉴定出其它的 D-片段基因。

用至少一个, 优选一个以上的 V 基因片段来构建重链小座位转基因。按未决申请 U.S.S.N 07/574748(1990 年 8 月 29 日申请)、PCT/US91/06185(1991 年 8 月 28 日)和 U.S.S.N 07/810279(1991 年 12 月 17 日申请)(所述文献均引入本文作为参考)所述, 可分离带有或不带有侧翼序列的重排的或未重排的 V 片段。

按未决申请 U.S.S.N 07/574748(1990 年 8 月 29 日申请)、PCT / US 91 / 06185 (1991 年 8 月 28 日)中所述, 可分离带有或不带有侧翼序列的重排的或未重排的 V 片段、D 片段、J 片段和 C 基因。

可从人 λ 或 κ 免疫球蛋白座位相似地构建小座位轻链转基因。因此例如可从多个 DNA 片段构建例如约 75 kb 编码 V、D、J 和恒定区序列的免疫球蛋白重链小座位转基因构建体, 所述每个序列均与人基因序列基本同源。优选将所述序列与转录调节序列可操作相连并使所述序列能进行重排。用两个或多个适宜排列的恒定区序列(如 μ 和 γ)和转换区, 也可进行转换重组。如未决申请 U.S.S.N 07/574748(1990 年 8 月 29 日申请)中所述, 从多个与人 DNA 基本上同源并能进行重排的 DNA 序列可构建举证性的轻链转基因构建体。

E. 能够进行同种型转换的转基因构建体

理论上, 要进行类型转换的转基因构建体应包括调节无效转录物所需的所有顺式作用序列。天然转换区和上游启动子以及调节序列(如 IFN- γ 可诱导的元件)是优选包含在能够进行同种型转换的转基因构建体中的顺式作用序列。应将转换区(优选人 1γ 转换区)相邻上游的至少 50 个碱基对, 优选约至少 200 个碱基对, 最佳至少 500 — 1000 个碱基对或更长的序列与转换序列优选人 $\gamma 1$ 转换序列可操作相连。此外, 可将转换区与天然不和特定转换区相连的 C_H 基因的上游相连(并与之相邻)。例如, 但不是为了限制, 可将人 $\gamma 1$ 转换区与人 $\alpha_2 C_H$ 基因的上游相连, 或可将鼠 $\gamma 1$ 转换区与人 C_H 基因相连。

在转基因小鼠中达到非典型同种型转换(如 δ 相关的缺失)的其它方

法涉及包含在人 μ 基因侧翼的400 bp同向重复序列($\sigma\mu$ 和 $\varepsilon\mu$)(Yasui et al., Eur. J. Immunol. 19:1399(1989))。这两个序列间的同源重组使只产生 IgD 的 B 细胞中的 μ 基因缺失了。可用下列结构式表示重链转基因:

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

其中:

V_H 是重链可变区基因片段,

D 是重链 D(多样性)区基因片段,

J_H 是重链 J(连接)区基因片段,

S_D 是能够参与与 S_A 受体区的片段重组以便同种型转换发生的供体区片段,

C_1 是 B 细胞发育中所用的编码同种型的重链恒定区基因片段(如 μ 和 δ),

T 是含至少一个启动子的顺式作用转录调节区片段,

S_A 是能够参与与所选 S_D 供体区片段进行重组以便进行同种型转换的受体区片段,

C_2 是编码除 μ 以外同种型(如 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 、 γ_4 、 α_1 、 α_2 、 ε)的重链恒定区基因片段。

x 、 y 、 z 、 m 、 n 、 p 和 q 是整数。 x 是1—100, n 是0—10, y 是1—50, p 是1—10, z 是1—50, q 是0—50, m 是0—10。通常当转基因能够进行同种型转换时, q 必须至少是1, m 至少是1, n 至少是1, m 大于或等于 n 。

V_H 、D、 J_H 、 S_D 、 C_1 、T、 S_A 和 C_2 片段可以来自各种品种, 优选哺乳动物, 最好是人和鼠种系DNA。

V_H 片段可来自各种品种, 但优选来自在人种系中天然存在的 V_H 片段, 如 V_{H251} 。通常包括约2个 V_H 片段, 优选包括约4个 V_H 片段, 最佳至少包含约10个 V_H 片段。

通常至少包含一个D片段, 尽管优选至少包含10个D片段, 而且一些实施方案中包括10个以上的D片段。一些优选的实施方案包含人D片段。

通常将至少一个 J_H 片段插入到转基因中, 尽管转基因优选包含约6

个 J_H 片段，而某些优选实施方案包括约 6 个以上的 J_H 片段。一些优选的实施方案包含人 J_H 片段，而在更为优选的实施方案中包含 6 个人 J_H 片段，而不包含非人 J_H 片段。

S_D 片段是能够参与与转基因的 S_A 片段重组的供体区。对于典型的同种型转换， S_D 和 S_A 是象 S_μ 、 $S_{\gamma 1}$ 、 $S_{\gamma 2}$ 、 $S_{\gamma 3}$ 、 $S_{\gamma 4}$ 、 S_α 、 $S_{\alpha 2}$ 、 S_ϵ 这样的转换区。优选转换区是鼠或人的，更优选 S_D 是人或鼠的 S_μ ，以及 S_A 是人的或鼠 $S_{\gamma 1}$ 。对于非典型同种型转换(如 δ 相关的缺失)， S_D 和 S_A 优选是在人 μ 基因侧翼的 400 bp 同向重复序列。

C_1 片段通常是 μ 或 δ 基因，优选 μ 基因，更优选人或鼠 μ 基因。

T 片段通常包含与转换区天然相邻的(即种系)S' 侧翼序列。T 片段通常为至少约 50 个核苷酸，优选约至少 200 个核苷酸，更优选约至少 500 — 1000 个核苷酸。优选 T 片段是种系构型中与人或鼠转换区上游紧邻的 5' 侧翼序列。对于本领域专业人员显而易见的是，T 片段可包含在动物种系中不天然存在的顺式作用转录调节序列(如病毒增强子和启动子，如在 SV40、腺病毒和其它感染真核细胞的病毒中发现的那些)。

C_2 片段通常是 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 、 γ_4 、 α_1 、 α_2 、 ϵ C_H 基因，优选这些同种型的人 C_H 基因，更优选人 γ_1 或 γ_3 基因。也可使用鼠 γ_{2a} 和 γ_{2b} ，作为各品种下游(即转换的)同种型基因。若重链转基因含有免疫球蛋白重链小座位，则转基因的全长通常为 150 kb 或少一些。

总之，转基因不是天然重链 Ig 座位。因此例如，可以缺失非必需区或用其它品种的相应区进行取代。

F. 确定 Ig 转基因中功能同种型转换的方法

可以用本领域已知的任何方法确定转基因非人动物中同种型转换出现的频率。优选的实施方案包括下列内容，单独或组合使用：

1. 检测 mRNA 转录物，所述转录物含有与至少一个转基因下游 C_H 基因而不是 δ 同源的序列以及与转基因 V_H - D_H - J_H 重排的基因同源的相邻序列；所述缺失可通过 Northern 杂交、 S_1 核酸酶保护检测、PCR 扩增、cDNA 克隆或其它方法来检测。

2. 在转基因动物血清或从转基因动物 B 细胞制备的杂交瘤细胞培

养物的上清液中检测由下游 C_H 基因编码的免疫球蛋白，其中可通过免疫化学方法表明所述蛋白质含有功能可变区；

3. 在来自转基因动物 B 细胞的 DNA 或杂交瘤细胞的基因组 DNA 中检测 DNA 重排与转基因中同种型转换的出现是否一致，所述检测可通过 Southern 印迹杂交、PCR 扩增，基因组克隆或其它方法来完成；或

4. 鉴定同种型转换的其它标志，如无效转录物的生产、与转换有关的特征酶(如“转换重组酶”)的生产、或其它可检测、测量或通过目前技术可观察到的其它特征。

由于各转基因品系可代表转基因整合的不同位点，以及转基因插入片段可能不同的串联排列，而且由于转基因和侧翼 DNA 序列各自不同的构型会影响基因表达，因此优选鉴定并使用表达高水平人免疫球蛋白（特别是 IgG 同种型）并含有最少拷贝的转基因的小鼠品系。单拷贝的转基因可使出现不完全等位基因表达的情况降之最少。通常将转基因整合到宿主染色体 DNA 中，最经常的是插入到种系 DNA 中，并通过随后培育种系转基因种畜动物来扩增。但是，实施者可按情况或需要使用本领域已知或随后开发出的其它载体和转基因方法。

内源非人重链恒定区基因可发生反式转换，并产生嵌合重链和含有所述嵌合人/小鼠重链的抗体。所述抗体可能适用于本文所述的某些用途，也可能是不令人满意的。

G. 内源免疫球蛋白座位的功能性破坏

通过抑制转基因非人动物中内源免疫球蛋白基因的重排，预期成功重排的免疫球蛋白重和轻链转基因的表达会具有显性效果。但是另一种产生没有内源抗体的非人动物的方法使内源免疫球蛋白座位突变。利用胚胎干细胞技术和同源重组，可以很容易地除去内源免疫球蛋白库。下面描述对小鼠免疫球蛋白座位的功能性破坏。但公开的载体和方法很容易经改变而适用于其它非人动物。

总之，该技术包括通过同源重组使能够分化成生殖细胞组织的多潜能细胞系中的基因失活。将含有改变的、小鼠免疫球蛋白基因拷贝的 DNA 构建体导入到胚胎干细胞核中。在细胞的一部分中，导入的 DNA 与内源小鼠基因拷贝重组(用不同的拷贝代替之)。将含新的遗传工程损伤的细胞注射到宿主小鼠胚胎中，然后将该胚胎再植入到雌性受体中。

有些胚胎发育成嵌合小鼠，这些小鼠具有完全衍生于突变细胞系的生殖细胞。因此，通过繁殖嵌合小鼠，可以得到含导入的遗传损伤的新小鼠品系(见 Capecchi(1989), *Science*, 244,1288-1292 中的综述)。

由于小鼠 λ 座位只占免疫球蛋白的5%，所以重链和/或 κ 轻链座位的失活就足够了。有3种方法来破坏这些中的每个座位，缺失J区、缺失J-C内含子增强子以及通过导入终止密码子而破坏恒定区编码序列。就DNA构建体的设计而言，最后这种方法是最直接的。除去 μ 基因破坏了B细胞的成熟，由此防止通过类型转换而转换成任何有功能的重链片段。下面列出使这些座位失效的方法。

为了破坏小鼠 μ 和 κ 基因，以 Jaenisch 和其同事(Zijlstra, et al.(1989), *Nature*, 342,435-438)用于成功地破坏小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因的设计为基础，使用靶向载体。将来自质粒 pMCIneo 的新霉素抗性基因(neo)插入到靶基因的编码区。pMCIneo 插入片段使用杂合病毒启动子/增强子序列以驱动 neo 表达。该启动子在胚胎干细胞中有活性。因此，可用 neo 作为失效构建体整合的选择性标记。将 HSV 胸苷激酶(tk)基因加到构建体的一端，作为抗随机插入的阴性选择性标记(Zijlstra, et al.同上文)。

破坏重链座位的一种优选方法是除去J区。该区在小鼠中相当小，只有1.3 kb。为了构建基因的靶向载体，分离15 kb KpnI 片段，该片段含有小鼠基因组文库中的所有分泌的A恒定区。用来自 pMCIneo 的1.1 kb 插入片段取代1.3 kb 的J区。然后将 HSV tk 基因加到 KpnI 片段的5'末端。通过同源重组，该构建体的正确整合，会导致用 neo 基因取代小鼠 J_H 区。采用以 neo 基因为基础的引物和与D区 KpnI 位点5'末端的小鼠序列同源的引物，通过PCR筛选重组体。

或者，通过破坏 μ 基因的编码区使重链座位失效。该方法也使用前述方法中所用的相同的15 kb KpnI 片段。将来自 pMCIneo 的1.1 kb 插入片段插入到外显子II中特有的 BamHI 位点，然后，将 HSV tk 基因加到 KpnI 3'末端。然后筛选在 neo 插入片段任一侧翼的、除去 tk 基因的双交换。通过PCR扩增，从筛选的克隆池中检测这些结果。一个PCR引入衍生于 neo 序列，另一分来自靶向载体外的小鼠序列。在实施例中说明了小鼠免疫球蛋白的功能性破坏。

G. 内源免疫球蛋白座位的抑制表达

除内源 Ig 座位的功能性破坏外，抑制是防止内源 Ig 座位表达的另一种方法。可用从一种或多种整合转基因产生的反义 RNA，通过反义寡核苷酸，和/或通过施用一种或多种对内源 Ig 链具特异性的抗血清来抑制内源 Ig 基因。

反义多核苷酸

可用反义 RNA 转基因使特定的基因部分或完全不能表达(Pepin et al., (1991) Nature 355:725; Helene., C. and Toulme, J. (1990) Biochimica Biophys. Acta 1049 : 99; Stout, J. and Caskey ,T. (1990) Somat. Cell Mol. Genet. 16:369;Munir et al., (1990) Somat. Cell Mol. Genet. 16: 383，各文献均引入本文作为参考)。

“反义多核苷酸”是有下列性质的多核苷酸：(1)与全部或部分参考序列，如内源 Ig C_H 或 C_L 区的序列互补，和(2)与靶序列如染色体基因座位或 Ig mRNA 特异性杂交。所述互补反义多核苷酸可包含核苷酸取代、增加、缺失或转座，只要还保留了与相关靶序列特异性杂交的所述多核苷酸的功能特性。互补的反义多核苷酸包括可与各种 mRNA 特异性杂交并防止 mRNA 转录和/或 RNA 加工和/或所编码多肽翻译的可溶性反义 RNA 或 DNA 寡核苷酸(Ching et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10006-10010(1989);Broder et al., Ann. Int. Med. 113:604-618(1990); Loreau et al., FEBS Letters 274:53-56 (1990); Holcenberg et al., WO91/11535; U.S.S.N. 07/530165(“新的人 CRIPTO 基因”);WO91/09865; WO91/04753;WO90/13641；和 EP 386563，所述文献均引入本文作为参考)。反义序列是与至少一种至少约 15 个连续核苷酸长，通常至少 20—30 个核苷酸长，且优选 30 个以上核苷酸长的免疫球蛋白基因序列互补的多核苷酸序列。但在某些实施方案中，与互补的免疫球蛋白基因序列相比，反义序列可以有取代、增加或缺失，只要还保留了与相关靶序列可特异性杂交的反义多核苷酸特性。通常反义序列与在 DNA 重排后编码或可以编码免疫球蛋白链的内源免疫球蛋白基因序列互补。在一些情况下，对应于免疫球蛋白基因序列的有义序列可以发挥功能以便抑制表达，特别是通过干扰转录来抑制表达。

因此反义多核苷酸抑制所编码多肽的生产。就此而言，抑制一种或多种内源 Ig 座位之转录和/或翻译的反义多核苷酸可使非人动物的能力和/或特异性发生变化，以生产由内源 Ig 座位编码的免疫球蛋白链。

可在转染的细胞或转基因细胞(例如用于重建个体或转基因非人动物的全部或部分造血干细胞群的转基因多潜能造血干细胞)中, 可从异源表达盒生产反义多核苷酸。或者, 反义多核苷酸可包括在体外培养基中或在体内循环系统或组织液中被施用到外环境的可溶性寡核苷酸。已经表明在外环境中存在的可溶性反义多核苷酸可接近胞质并抑制特定种类 mRNA 的翻译。在一些实施方案中, 反义多核苷酸含有甲基磷酸酯部分, 或者也可以用硫代磷酸酯或邻甲基核糖核苷酸, 也可用嵌合寡核苷酸(Dagle et al.,(1990) Nucleic Acids Res. 18:4751)。对于某些应用, 反义寡核苷酸可含有多酰胺核酸(Nielsen et al.,(1991) Science 254:1497)。与反义多核苷酸有关的一般方法, 参见反义 RNA 和 DNA(1988), D.A.Melton, Ed.,冷泉港实验室, 冷泉港(NY)。

用与一种或多种序列互补的反义多核苷酸抑制转录、RNA 加工和/或相应 mRNA 的翻译, 以此降低所编码多肽的数量。所述反义多核苷酸可通过抑制体内一种或多种内源 Ig 链的形成而提供治疗作用。

无论是作为可溶性的反义寡核苷酸, 还是作为从反义转基因转录出的反义 RNA, 都可以对本发明的反义多核苷酸进行筛选以便在体内生理条件下优先与内源 Ig 序列杂交。最典型的是, 所选的反义多核苷酸不会与由本发明重或轻链转基因编码的异源 Ig 序列杂交(即反义寡核苷酸对转基因 Ig 表达的抑制不会超过约 25 – 35 %)。

抗血清抑制

通过用抗一种或多种内源 Ig 链的抗血清注射小鼠来部分或完全抑制内源 Ig 链的表达(Weiss et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:211, 该文献引入本文作为参考)。对抗血清进行筛选以便其只与一种或多种内源(如小鼠)Ig 链发生特异性反应, 而与由本发明 Ig 转基因编码的异源 Ig 链的交叉反应最小或没有。因此, 按照 Weiss 等人确立的方案(出处同上), 施用所选的抗血清将抑制内源 Ig 链的表达, 但可以表达由本发明转基因编码的异源 Ig 链。用于抗体的适宜的抗体源包括:

(1)单克隆抗体, 如与鼠 μ 、 γ 、 κ 或 λ 链特异性结合但不与由本发明的人 Ig 转基因编码的人免疫球蛋白链反应的单克隆抗体;

(2)所述单克隆抗体的混合物, 以便所述混合物与一种内源 Ig 链上的多个表位、多个内源 Ig 链(如鼠 μ 和鼠 γ)或多表位和多链或内源免疫球蛋白结合;

(3)多克隆抗血清或其混合物，通常所述抗血清是单特异性的，用于结合一种内源 Ig 链(鼠 μ 、鼠 γ 、鼠 κ 或鼠 λ)或多种内源 Ig 链，最优选的是所述抗血清与由本发明转基因编码的人免疫球蛋白链只有微不足道的结合；和/或

(4)与一种或多种内源 Ig 链结合的多克隆抗血清和单克隆抗体的混合物，最优选的是与由本发明转基因编码的人免疫球蛋白链只有微不足道的结合。通常多克隆抗体是优选的，而且该基本上单特异性的多克隆抗体最好是由抗人免疫球蛋白抗血清生产的，即通过用衍生于非人动物(如鼠)的抗体预吸附和/或例如通过在含固定的人 Ig(其中富集抗血清中具有所需抗人 Ig 结合的馏分；通常用低 pH 或离液序列高的盐溶液洗脱结合的馏分)的亲树脂上对抗血清或其纯化的馏分进行亲和色谱来制备。

可以用细胞分离和/或补体固定来增加抗体-针对的细胞的消耗，所述细胞是表达内源(鼠)免疫球蛋白链的淋巴细胞。在一个实施方案中，例如用抗体在间接体内消除表达鼠 Ig 的外植的造血细胞和/或从含人 Ig 转基因的转基因小鼠中得到的 B 谱系淋巴细胞。因此从含人 Ig 转基因(优选同时含人重链转基因和人轻链转基因)的转基因非人动物中移植造血细胞和/或 B 谱系淋巴细胞，并将植出的细胞与具有下列性质的抗体一起保温：(1)与内源免疫球蛋白(如鼠 μ 和/或 κ)结合，和(2)基本上不与由转基因编码的人免疫球蛋白链结合。为了清楚起见，将所述抗体称为“抑制抗体”。移植出的细胞群选择性地消耗与抑制抗体结合的细胞，所述消耗可通过各种方法完成，如(1)物理分离以从未结合的细胞中除去抑制抗体结合的细胞(如可将抑制抗体与固体支持物或磁珠结合以固定并除去与抑制抗体结合的细胞)，(2)通过抗体依赖性的细胞杀死作用来杀死抑制抗体结合的细胞(如通过 ADCC，通过补体固定、或通过与抑制抗体结合的毒素)，和(3)由抑制抗体诱导的克隆无反应性等。

通常，用于产生内源 Ig 链的抗体抑制的抗体能够固定补体。通常优选对所述抗体进行筛选以便使之与用于间接体内/体外消耗的方便补体源，如兔或豚鼠补体很好地进行反应。对于体内消耗，通常优选抑制剂抗体在非人转基因动物中具有效应子功能；因此具有鼠效应子功能(如 ADCC 和补体固定)的抑制抗体通常可优选用于转基因小鼠。

另一种情况是，将与预定内源免疫球蛋白链特异性结合的抑制抗体用于间接体内/体外消耗表达内源免疫球蛋白的淋巴细胞。将来自含人免

疫球蛋白转基因的转基因非人动物的细胞外植体(如淋巴细胞样品)与抑制抗体结合,与抑制抗体特异性结合的细胞(如通过固定、补体固定等)就被消耗掉了,因此,产生一细胞亚群,表达内源(非人)免疫球蛋白的细胞(如表达鼠 Ig 的淋巴细胞)则被消耗掉了。将所得的消耗过的淋巴细胞种群(T 细胞,人 Ig 阳性 B 细胞等)转移到免疫相容的(即 MHC 相容的)相同种的非人动物中,该动物基本上不能生产内源抗体(如 SCID 小鼠、RAG - 1 或 RAG - 2 失效小鼠)。然后可用抗原免疫该重建的动物(小鼠)(或用于免疫供体动物的抗原再免疫接种,外植物是从所述供体动物中得到的)以得到高亲和力(亲和力成熟的)抗体和生产所述抗体的 B 细胞。可用所述 B 细胞通过常规细胞融合产生并筛选杂交瘤。可将抗体抑制作用与其它内源 Ig 失活/抑制方法(如 J_H 失效、C_H 失效、D 区删除、反义抑制、补偿的移码失活)结合使用。

完全的内源 Ig 座位失活

在某些实施方案中,需要产生内源 Ig 座位的完全失活以便不会形成含人可变区和非人(如鼠)恒定区的杂合免疫球蛋白链(如通过转基因和内源 Ig 序列之间的反式转换)。携带内源重链等位基因的小鼠(该小鼠在 J_H 区发生功能性破坏),只是经常表现为反式转换,通常其中由转基因编码的重排的人可变区(VDJ)表达为与内源鼠恒定区相连的融合蛋白,尽管其它反式转换连接也是可能的。为了克服这一潜在的问题,通常需要用各种方法使内源重链座位完全失活,所述方法包括但不限于:(1)通过同源重组来进行功能性破坏和/或消耗掉至少一个优选所有内源重链恒定区基因,(2)使至少一个优选所有内源重链恒定区基因发生突变以编码一终止密码子(或移码),从而产生截短的或移码产物(如果是反式转换的话),以及对于本领域专业人员是显而易见的其它方法和策略。可以用各种方法来缺失主要或全部重链恒定区基因和/或 D 区基因,所述方法包括通过同源重组特别是“hit-and-run”型的靶向载体而进行连续缺失等。同样,常常优选的是功能性地破坏和/或缺失至少一个内源轻链座位(如κ)以除去内源轻链恒定区基因。

通常,需要使用移码的转基因,其中异源转基因在 J 片段含有移码而在一种或多种(优选所有的)转基因恒定区基因的起始区(即氨基末端的编码区)含有补偿移码(即,重新产生原始的解读框架)。反式转换内源 IgH 座位恒定基因(不含有补偿移码)会产生截短的或错义产物,所述产物会导致应被缺失或不选择的反式转换 B 细胞的产生,因此抑制反式转换表型。

也可用反义抑制和抗体抑制来使内源 Ig 基因产物的表达(如鼠重和轻链序列)和/或反式转换的抗体(如人可变/鼠恒定嵌合抗体)基本上完全功能性地失活。

可以用失活和抑制策略的各种组合来基本上实现内源(如鼠)Ig 链表达的完全抑制。

反式转换

在某些方案中,可以生产反式转换的免疫球蛋白。例如,所述反式转换的重链可以是嵌合(非鼠(人)可变区和鼠恒定区)的。可以将含所述嵌合反式转换免疫球蛋白的抗体用于需要具有非人(如鼠)恒定区的各种应用中(如抑制在宿主中的效应子功能,用于存在鼠免疫决定簇的情况,如用于结合不与人恒定区结合的二级抗体)。例如,就针对特定抗原而言,与鼠可变区库相比,人可变区库可能更有利。可能在进化过程中,已经对人 V_H 、 D 、 J_H 、 V_L 和 J_L 基因编码免疫球蛋白的能力进行了选择,所述免疫球蛋白可结合进化上重要的某些抗原;给鼠库提供进化选择压力的抗原不同于给人库提供进化压力的那些抗原。可能存在其它库上的优点,当与鼠恒定区(如反式转换的鼠)同种型结合时,使人可变区库更有利。鼠恒定区的存在可比人恒定区有利。例如与人可变区相连的鼠 γ 恒定区通过反式转换可提供具有鼠效应子功能(如 ADCC、鼠补体固定)的抗体,以便与预定抗原(如人 IL - 2 受体)反应的所述嵌合抗体(优选单克隆)可用小鼠疾病模型来检测,如移植-宿主疾病的小鼠模型,在该模型中小鼠中的 T 淋巴细胞表达功能性人 IL - 2 受体。随后可分离人可变区编码序列(如通过 PCR 扩增或自来源(杂交瘤克隆)进行 cDNA 克隆)并与编码所需人恒定区的序列剪接在一起以编码更适用于人治疗用途的人序列抗体,对所述抗体而言,优选使免疫原性最小。可在宿主细胞中表达含有所得全长人编码序列的多核苷酸(如在哺乳动物中从表达载体开始表达)并将其纯化用于药物制剂。对于某些应用,可直接用嵌合抗体而无需用人恒定区取代鼠恒定区。反式转换的嵌合抗体的其它改变和用途对于本领域专业人员是显而易见的。

本发明提供了含 B 淋巴细胞的转基因非人动物,所述 B 淋巴细胞表达嵌合抗体,所述抗体通常是人重链转基因和内源鼠重链恒定区基因之间的反式转换而产生的。所述嵌合抗体含有人可变区序列和鼠恒定区,通常是鼠转换的(即非 μ 、非 δ)同种型。如果编码人可变区和人恒定

区基因的人重链和其轻链转基因均被整合,则能够产生与预定抗原反应之嵌合抗体的转基因非人动物也能生产全部的人抗体序列。最典型的是,所述动物是功能性破坏的重链座位和/或轻链座位纯合的,但保留了一个或多个能够进行反式转换的内源重链恒定区基因(如 γ 、 α 、 ϵ)并通常保留顺式连接的增强子。用预定抗原(通常与佐剂结合)免疫接种所述小鼠,产生含有可检测量嵌合抗体的免疫反应,所述嵌合抗体含有由与鼠恒定区序列相连的人可变区序列组成的重链。通常所述免疫动物的血清会含有浓度约至少为 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、经常约至少 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、常常至少 $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或高达 $50 - 100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或更多的嵌合抗体。含有包含嵌合人可变/小鼠恒定区重链之抗体的抗血清通常也含有包含人的变/人恒定区(完全的人序列)重链的抗体。嵌合反式转换的抗体通常含有(1)由人可变区和鼠恒定区(通常是鼠 γ)组成的嵌合重链,和(2)人转基因编码的轻链(通常 κ)或鼠轻链(通常 κ 失效背景中的 λ)。所述嵌合反式转换的抗体通常与预定的抗原(如免疫原)结合,亲和力为约至少 $1 \times 10^7\text{ M}^{-1}$,优选亲和力为约至少 $5 \times 10^7\text{ M}^{-1}$,更优选亲和力为至少 $1 \times 10^8\text{ M}^{-1}$ - $1 \times 10^9\text{ M}^{-1}$ 或更高。通常预定的抗原是人蛋白质,如人细胞表面抗原(如CD4、CD8、IL-2受体、EGF受体、PDGF受体),其它人生物大分子(如凝血调节蛋白、蛋白C、碳水化合物抗原、sialyl Lewis 抗原、L-选择蛋白)或非人疾病相关的大分子(如细菌LPS、病毒颗粒衣壳蛋白或包膜糖蛋白)等。

本发明提供了含基因组的转基因非人动物,所述基因组含有:(1)纯合的功能性破坏了的内源重链座位,所述座位含有至少一个能够反式转换的鼠恒定区基因(如与功能性转换重组序列并通常与功能性增强子顺式连接的恒定区基因), (2)能够进行重排以编码并表达功能性人重链可变区并能够反式转换的(如,含有顺式连接的RSS)人重链转基因;可选择性地含有(3)能够进行重排以编码功能性人轻链可变区并表达人轻链序列的人轻链(如, κ)转基因;还可选择性地含有(4)纯合的功能性破坏了的内源轻链座位(κ , 优选 κ 和 λ);并可选择性地含有(5)含有包含嵌合重链之抗体的血清,所述嵌合重链由人转基因编码的人可变区序列和内源鼠重链恒定区基因编码的鼠恒定区序列(如, $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$)组成。

所述转基因小鼠还可含有含嵌合抗体的血清,所述嵌合抗体与预定的人抗原(如CD4、CD8、CEA)结合,亲和力为约至少 $1 \times 10^4\text{ M}^{-1}$,优选亲和力为约至少 $5 \times 10^4\text{ M}^{-1}$,更优选亲和力为至少 $1 \times 10^7\text{ M}^{-1}$ 至

$1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 或更高。通常可制备所产单克隆抗体的亲和力至少为 $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 的杂交瘤。含由鼠恒定区和人可变区组成的重链的、并经常能够与非人抗原结合的嵌合抗体也可存在于血清或从杂交瘤分泌的抗体中。

在一些改变中, 需要产生转基因小鼠, 所述转基因小鼠保留了完整重链恒定区基因的内源小鼠重链座位已经失活了, 并含有能够进行反式转换的人重链转基因, 另外可选择性地含有人轻链转基因, 所述轻链转基因可选择性地含有一个或多个失活的内源小鼠轻链座位。所述小鼠通过反式转换可有利于生产 B 细胞, 所述 B 细胞能够表达含全部人重链的抗体以及含嵌合(人可变/小鼠恒定区)重链的抗体。所述小鼠的血清应含有包含全部人重链的抗体和包含嵌合(人可变/小鼠恒定区)重链的抗体, 所述重链优选与完整人轻链组合。可从所述小鼠的 B 细胞产生杂交瘤。

通常, 可通过反式转换生产所述嵌合抗体, 其中编码人可变区(如由体内生产性 V-D-J 重排编码的)与人恒定区(通常是人 μ)的人转基因, 与非转基因免疫球蛋白恒定基因转换序列(RSS)进行转换重组, 由此将转基因编码的人可变区与不由所述转基因编码的重链恒定区(通常是内源鼠免疫球蛋白重链恒定区或由第二转基因编码的异源(如人)重链恒定区)可操作相连。而顺式转换指通过转基因内 RSS 元件的重组而进行的同种型转换, 反式转换指转基因 RSS 与转基因外 RSS 元件(常常位于与含所述转基因之染色体不同的染色体上)之间的重组。

反式转换通常发生于被表达转基因重链恒定区基因的 RSS 与内源鼠恒定区基因(非 μ 同种型, 通常是 γ)的 RSS 或在第二转基因(通常整合在另外的染色体上)中所含的人恒定区基因的 RSS 之间。

当反式转换发生于被表达转基因重链恒定区基因(如 μ)的 RSS 与第二转基因上所含的人重链恒定区基因的 RSS 之间时, 会生产出基本上含有完整人序列的非嵌合抗体。例如但并非限制, 可将编码人重链恒定区(如 $\gamma 1$)的多核苷酸和可操作相连的 RSS(如 $\gamma 1$ RSS)导入(如转染进)从转基因小鼠 B 细胞(或 B 细胞种群)产生的杂交瘤细胞中, 所述 B 细胞表达含转基因编码的人 μ 链的抗体。可凭所得的杂交瘤细胞是否存在导入的多核苷酸和/或表达含重链的反式转换的抗体而对杂交瘤进行筛选, 所述重链带有人 μ 链可变区(个体型/抗原反应性)和由导入的多核苷酸序列编码

的恒定区(如人 $\gamma 1$)。在转基因编码的人 μ 链的 RSS 与编码下游同种型(如 $\gamma 1$)的导入的多核苷酸 RSS 之间的反式转换重组可产生反式转换的抗体。

本发明还提供了生产所述嵌合反式转换之抗体的方法,所述方法包括用预定抗原免疫接种转基因小鼠的步骤,所述转基因小鼠的基因组含有:(1)纯合的功能性破坏了的内源重链座位,所述座位含有至少一个能够反式转换的鼠恒定区基因(如, $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 3$), (2)能够进行重排以编码有功能的人重链可变区并表达人重链序列而且能够进行同种型转换(和/或反式转换)的人重链转基因;可选择性地含有(3)能够进行重排以编码有功能的人轻链(如, κ)可变区并表达人轻链序列的人轻链(如, κ)转基因;还可选择性地含有(4)纯合的功能性破坏了的内源轻链(κ , 优选 κ 和 λ)座位;并可选择性地含有(5)含有包含嵌合重链之抗体的血清,所述嵌合重链由人转基因编码的人可变区序列和内源鼠重链恒定区基因编码的鼠恒定区序列(如, $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$)组成。

亲和力标记: 转换同种型的筛选

有利的是,反式转换(和顺式转换)与体细胞突变有关。体细胞突变扩大了由 B 细胞克隆子代编码的抗体的亲和性范围。例如由进行了转换(反式或顺式)的杂交瘤细胞生产的抗体,其抗原结合亲和性的范围大于在未进行转换的杂交瘤细胞中的抗体的。因此,可从表达第一抗体的杂交瘤细胞群(通常是克隆的)(所述细胞群表达含一重链的第一抗体,所述重链含有在多肽中与第一人重链恒定区(如 μ)相连的人重链可变区)中筛选杂交瘤细胞克隆变体,所述变体表达含有在多肽中所述第一人重链可变区与第二重链恒定区(如人 γ 、 α 或 ϵ 恒定区)相连的重链的抗体。可通过产生体外顺式转换的自然克隆变异、通过施用促进同种型转换的试剂如 T 细胞衍生的淋巴因子(如 IL - 4 和 IFN γ)诱导类型转换(反式或顺式)、通过导入含功能性 RSS 和异源(如人)重链恒定区基因的多核苷酸作为反式转换的底物或通过上述方法的结合等可生产所述克隆变体。通常将含人下游同种型恒定区(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 3$ 等)和可操作连接的 RSS 的多核苷酸导入杂交瘤细胞以促进通过反式转换机制的同种型转换。

类型转换和亲和力成熟发生在由本发明转基因动物产生的 B 细胞的同一种群中。因此可将鉴定类型转换的 B 细胞(或从其衍生的杂交瘤)作为得到高亲和力单克隆抗体的筛选步骤。可以用各种方法促进类型转换如顺式转换(基因内转换)、反式转换或两者。例如可将含有 μ 和 γ 恒定

区基因以及相关 RSS 元件和转换调节元件(如无效转录物启动子)的单个连续人基因组片段用作转基因。但是,所需单个连续人基因组片段的某些部分可能很难有效地克隆,例如由于当在克隆宿主中复制时不稳定等问题;具体地说,证明 δ 与 $\gamma 3$ 之间的区域很难有效克隆,特别是含 μ 基因、 $\gamma 3$ 基因、V基因、D基因片段和J基因片段的连接片段。

例如不连续的人转基因(小基因)由人 μ 基因、人 $\gamma 3$ 基因、人V基因、人D基因片段和人J基因片段组成,其中可带有一个或多个间插序列(内含子)或其它非必需序列(如一个或多个V、D和/或J片段和/或一个或多个非 μ 恒定区基因)的缺失。与含有免疫球蛋白有效表达和转换所必需的所有元件的单个连续基因组DNA片段相比,所述小基因有一些优点。例如所述小基因不需分离大的DNA片段,所述大DNA片段可能含有很难克隆的序列(如不稳定的序列、毒序列等)。此外含进行顺式或反式转换所必需的同种型转换元件(如人 γ 无效转录物启动子)的小座位对于进行体内体细胞突变和类型转换也有利。由于许多真核DNA序列很难克隆,因此删除非必需序列是有利的。

在一种改变中,从衍生于转基因小鼠B细胞的杂交瘤池中,通过筛选得到生产具有高亲和力(如至少 $1 \times 10^7 M^{-1}$,优选至少 $1 \times 10^8 M^{-1}$,更优选至少 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 或更高)之抗体的杂交瘤克隆,所述转基因小鼠含有能够进行同种型转换(见上文)并基本上没有内源鼠重链座位(能够进行生产性(框架内)V-D-J重排)的人重链转基因,所述杂交瘤表达含重链的抗体,所述重链含有在多肽中与人(或小鼠)非 μ 重链恒定区相连的人重链可变区;将所述抗体称为“转换的抗体”,因为它们含有作为体内顺式转换和/或反式转换或细胞培养结果的“转换的重链”。生产所述转换抗体的杂交瘤通常可进行体细胞突变,所述杂交瘤池通常具有很宽的抗原结合亲和性,从中可筛选分泌高亲和力抗体的杂交瘤。通常通过包括两个步骤的方法,可筛选分泌人序列抗体的杂交瘤,所述人序列抗体具有与预定抗原的主要结合亲和力(大于 $1 \times 10^7 M^{-1} - 1 \times 10^8 M^{-1}$),而且其中所述人序列抗体含有人免疫球蛋白可变区。一个步骤是鉴定并分离能分泌含有转换的重链免疫球蛋白的杂交瘤细胞(如通过将杂交瘤细胞与固定的免疫球蛋白结合,所述固定的免疫球蛋白与转换的重链特异性结合,并基本上不与未转换的同种型(如 μ)结合)。另一步骤是鉴定以主要结合亲和力与预定抗原结合的杂交瘤细胞(如通过杂交瘤克隆上清液的ELISA、使用标记抗原的FACS分析等)。通常,在鉴定与预定抗原结合的杂交瘤细胞前,进行分泌转换抗体的杂交瘤的筛选。

分离表达与预定抗原具有主要结合亲和力的转换抗体的杂交瘤细胞，然后在本领域已知的适宜生长条件下培养(通常为单个选择的克隆)。可选的，所述方法还可包括在适宜于表达单克隆抗体的条件下培养所选克隆的步骤；收集所述单克隆抗体并可将其用于治疗、预防和/或诊断目的。

通常，所选的杂交瘤克隆可作为 DNA 或 RNA 源，用于分离编码与预定抗原结合的(或能使其与之结合的)免疫球蛋白(如可变区)的免疫球蛋白序列。随后，可(如通过 PCR 扩增或从源(如杂交瘤克隆)进行 cDNA 克隆)分离人可变区编码序列，然后与编码所需人恒定区的序列剪接在一起以编码更适用于人治疗用途的人序列抗体，在所述治疗用途中优选抗体的免疫原性最小。可将含有所得全长人编码序列的多核苷酸在宿主细胞(如来自哺乳动物细胞中的表达载体)中表达，然后纯化用于药物制剂。

异增强子

能够编码人免疫球蛋白(如重链)的异源转基因最好含有顺式连接的增强子，所述增强子不是衍生于小鼠基因组，和/或不是与所述异源转基因的外显子以顺式天然相连。例如，人 κ 转基因(如 κ 小座位)最好含有人 V_{κ} 基因、人 J_{κ} 基因、人 C_{κ} 基因和一异增强子，通常所述异增强子含有人重链内含的增强子和/或鼠重链内含子增强子，通常它们位于 J_{κ} 基因和 C_{κ} 基因之间，或位于 C_{κ} 基因下游。例如可将小鼠重链 $J-\mu$ 内含子增强子(Banerji et al., (1983) Cell 33:729)分离在质粒 pKVe2 0.9 kb XbaI 片段上(参见下文)。可将人重链 $J-\mu$ 内含子增强子(Hayday et al., (1984) Nature 307:334)分离为 1.4 kb MluI/HindIII 片段(见下文)。将有转录活性的异增强子，如主要由与小鼠 $J-\mu$ 内含子增强子顺式相连的人 $J-\mu$ 内含子增强子组成的结合异增强子加到转基因中，这样可以高水平地表达所述转基因，特别是在所述转基因编码轻链如人 κ 的情况下。同样，最好将大鼠 3' 增强子包含在能够编码人重链的小座位构建体中。

具体的优选实施方案

本发明优选的实施方案是含至少一种、通常 2 — 10、有时 25 — 50 或更多拷贝的实施例 12 所述转基因(pHC1 或 pHC2)的动物，所述动物是用含单拷贝的实施例 5、6、8 或 14 中所述轻链转基因的动物和实施例 10 所述 J_H 缺失动物繁殖的后代繁殖的。将动物培育至这三个特征均纯合。所述动物具有下列基因型：单拷贝(每个单倍体的染色体组)的

人重链未重排的小座位(实施例 12 中所述的)、单拷贝(每个单倍体的染色体组)重排的人 κ 链构建体(实施例 14 所述的)、并在除去所有功能性 J_H 片段的各内源小鼠重链座位上有缺失(实施例 10 所述)。用 J_H 片段缺失(实施例 10)纯合的小鼠繁殖所述动物以产生 J_H 缺失纯合和人重链和轻链构建体半合的后代。将所得动物用抗原注射并用其生产抗这些抗原的人单克隆抗体。

就人重和轻链而言,从所述动物中分离的 B 细胞是单特异性的,因为它们只含各基因的一个拷贝。此外,就人或小鼠重链而言,它们是单特异性的,因为由于按实施例 9 和 12 所述缺失了 J_H 区,所以两个内源小鼠重链拷贝均是非功能性的。另外,就人或小鼠轻链而言, B 细胞的主要馏份也是单特异性的,因为单拷贝的重排的人 κ 轻链基因的表达从等位基因和同种型上,在 B 细胞的主要馏份中排除了内源小鼠 κ 和 λ 链基因的重排。

优选实施方案的转基因小鼠可生产含有库的大部分的免疫球蛋白,理想的是基本上与天然小鼠的相似。因此,例如在内源 Ig 基因已失活的实施方案中,总的免疫球蛋白水平为约 0.1-10 mg/ml 血清,优选 0.5-5 mg/ml,理想的至少约 1.0 mg/ml。在已经将能够使 IgM 转换成 IgG 的转基因导入到转基因小鼠中后,成年小鼠血清 IgG 与 IgM 的比例优选为约 10:1。当然,在未成熟的小鼠中, IgG 与 IgM 的比例要低些。通常,约 10%,优选 40—80%以上的脾和淋巴结 B 细胞仅仅表达人 IgG 蛋白质。

该库理想的是接近非转基因小鼠的,通常至少高达约 10%,优选 25—50%或更多。通常,主要根据导入到小鼠基因组中的不同 V、J 和 D 区的数量,可生产至少约一千个不同的免疫球蛋白(理想的是 IgG),优选 10^4 - 10^6 或更多。这些免疫球蛋白通常识别一半或更多的高抗原性蛋白质,包括但不限于鸽子细胞色素 C、鸡溶菌酶、商陆促分裂原、牛血清白蛋白、匙孔蛾血蓝蛋白、流感血凝素、葡萄球菌蛋白 A、精鲸肌红蛋白、流感神经氨酸酶和 λ 阻遏物蛋白。其中一些免疫球蛋白与预选抗原的亲和力至少为约 $10^7 M^{-1}$, 优选 $10^8 M^{-1}$ - $10^9 M^{-1}$ 或更高。

在一些实施方案中,优选产生具有预定库的小鼠,以对预定抗原的抗体反应所代表的 V 基因进行有限的筛选。具有预定库的重链转基因可含有例如人 V_H 基因,该基因在人中对预定抗原的抗体反应中被优先使

用。或者，由于各种原因(如编码针对预定抗原的高亲和力 V 区的可能性低；进行体细胞突变和亲和力加强的倾向低；或对某些人是致免疫的)，可从确定的库中除去一些 V_H 基因。

由于来自与转基因动物不同的生物种，因此在含各重或轻链基因片段的转基因重排之前，如通过杂交或 DNA 测序可很容易地鉴定出所述基因片段。

可用预定抗原如跨膜蛋白、细胞表面大分子或其它需要人抗体的抗原(如 TNF、LPS 等)免疫接种本发明的转基因小鼠。所述小鼠将生产 B 细胞，所述 B 细胞经转基因内转换重组(顺式转换)进行了类型转换并表达与预定抗原反应的免疫球蛋白。所述免疫球蛋白可以是人序列抗体，其中重和轻链多肽由人转基因序列编码，所述转基因序列可包含通过体细胞突变和 V 区重组连接而产生的序列以及种系编码的序列；尽管由于体细胞突变和不同的 V-J 和 V-D-J 重组连接，可能存在其它非种系序列，但可以认为这些人序列免疫球蛋白基本等同于由人 V_L 或 V_H 基因片段和人 J_L 或 J_H 片段编码的多肽序列。就所述人序列抗体而言，各链的可变区通常至少 80 % 由人种系 V、J(在重链的情况下，还包括 D 片段)编码；通常至少 85 % 的可变区由转基因上的人种系序列编码；经常 90 % 或 95 % 或更多的可变区由转基因上的人种系序列编码。但是，由于通过体细胞突变和 VJ 以及 VDJ 连接而导入了非种系序列，因此人序列抗体通常含有一些不由小鼠种系中的人转基因内的人 V、D 或 J 基因片段编码的可变区序列(而在恒定区序列中不常见)。通常，所述非种系序列(或各个核苷酸位置)在 CDR 中或靠近 CDR 处成簇，或是在已知体细胞突变成簇的区中。

与预定抗原结合的人序列抗体可产生于同种型转换，以便产生含人序列 γ 链(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 或 $\gamma 3$)和人序列轻链(如 κ)的人抗体。所述同种型转换的人序列抗体经常在可变区中含有一个或多个体细胞突变，体细胞突变经常在 CDR 的约 10 个残基处或之内，这是亲和力成熟和由于抗原特别是随后二级(或随后)抗原攻击而选择 B 细胞的结果。这些高亲和力人序列抗体的结合亲和力至少为 $1 \times 10^9 M^{-1}$ ，一般亲和力为约至少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ ，通常亲和力为至少 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ ，有时为 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 至 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 或更高。可将所述高亲和力人序列抗体制备成与人抗原如 CD4 等人大分子(如人跨膜或细胞表面蛋白或其它细胞表面抗原)有高结合亲和力。

可将来自所述小鼠的 B 细胞用于产生表达高亲和力(大于 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)的单克隆人序列抗体的杂交瘤, 该人序列抗体可以抗各种抗原, 包括人蛋白质如 CD4 等。可用这些杂交瘤生产含有免疫球蛋白的组合物, 所述免疫球蛋白与预定人抗原的亲和力常数(K_a)为至少 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 其中所述免疫球蛋白由下列成分组成:

具有下列组成的人序列轻链: (1)含有多肽序列的轻链可变区, 所述多肽序列基本上等同于由人 V_L 基因片段和 J_L 片段编码的多肽序列, 和(2)含有多肽序列的轻链恒定区, 所述多肽序列基本上等同于人 C_L 基因片段编码的多肽序列; 和

有下列组成的人序列重链: (1)含有多肽序列的重链可变区, 所述多肽序列基本上等同于由人 V_H 基因片段、或 D 区以及人 J_H 片段编码的多肽序列; 和(2)含有多肽序列的恒定区, 所述多肽序列基本上等同于人 C_H 基因片段编码的多肽序列。

通常人序列重链和人序列轻链分别由人重链转基因和人轻链转基因编码, 所述转基因被分别整合到小鼠细胞基因组中。但是, 两个链可由一个转基因编码, 或一个或两个链由多个转基因编码, 如由从含 V_H 排列的 YAC 的 V 基因片段衍生的人重链转基因(如 HC2)编码, 所述 V_H 排列不被整合在与小鼠种系中人重链转基因相同的座位上。

在一实施方案中, 组合物含有免疫球蛋白, 所述免疫球蛋白含有具有 κ 恒定区的人序列轻链和具有 γ 恒定区的人序列重链。

所述小鼠(和从其衍生的杂交瘤)是免疫球蛋白的来源, 所述免疫球蛋白与预定人抗原的亲和力常数(K_a)为至少 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 其中所述免疫球蛋白由下列成分组成:

有下列组成的人序列轻链: (1)含有多肽序列的轻链可变区, 所述多肽序列基本上等同于人 V_L 基因片段和 J_L 片段编码的多肽序列, 和(2)含有多肽序列的轻链恒定区, 所述多肽序列基本上等同于人 C_L 基因片段编码的多肽序列; 和

有下列组成的人序列重链: (1)含有多肽序列的重链可变区, 所述多肽序列基本上等同于人 V_H 基因片段、或 D 区以及人 J_H 片段编码的多肽序列; 和(2)含有多肽序列的恒定区, 所述多肽序列基本上等同于人

C_H 基因片段编码的多肽序列。

本发明提供了具有下列基因型的转基因小鼠：一对纯合的功能性破坏了的内源重链等位基因、一对纯合的功能性破坏了的内源轻链等位基因、至少一个拷贝的异源免疫球蛋白轻链转基因和至少一个拷贝的异源免疫球蛋白重链转基因，其中所述动物在用人抗原免疫后产生抗体反应，其中所述抗体反应含有与预定人抗原的亲和力常数(K_a)为至少 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 的免疫球蛋白，其中所述免疫球蛋白由下列成分组成：

有下列组成的人序列轻链：(1)含有多肽序列的轻链可变区，所述多肽序列基本上等同于人 V_L 基因片段和 J_L 片段编码的多肽序列，和(2)含有多肽序列的轻链恒定区，所述多肽序列基本上等同于人 C_L 基因片段编码的多肽序列；和

有下列组成的人序列重链：(1)含有多肽序列的重链可变区，所述多肽序列基本上等同于人 V_H 基因片段、或 D 区以及人 J_H 片段编码的多肽序列；和(2)含有多肽序列的恒定区，所述多肽序列基本上等同于人 C_H 基因片段编码的多肽序列。

所述转基因小鼠可生产人序列免疫球蛋白，所述免疫球蛋白与至少一种人体细胞上的人表面或跨膜蛋白质结合，其中所述免疫球蛋白与所述人表面或跨膜蛋白质结合的亲和力常数(K_a)为 $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ - $1.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 。所述表面或跨膜蛋白质的一个实例是 CD4，尽管根据需要也可以使用其它蛋白质。

通过扩展转基因小鼠中人可变区基因片段库的方法，促进了抗预定抗原的高亲和力人序列抗体的发展，所述转基因小鼠具有含有整合的人免疫球蛋白转基因的基因组，所述方法包括将含有 V 区基因片段的 V 基因转基因导入到基因组中，所述 V 基因转基因不存在于所述被整合的人免疫球蛋白转基因中。通常 V 区转基因是酵母人工染色体，该染色体含有部分人 V_H 或 V_L(V_K)基因片段排列，所述排列可能在人基因组中天然存在或可通过重组方法分别剪接在一起，所述排列可含有无序的或删除的 V 基因片段。通常在 YAC 中含有至少 5 个或更多的功能性 V 基因片段。在该改变中，可通过 V 库扩展法生产转基因小鼠，其中所述小鼠表达免疫球蛋白链，所述免疫球蛋白链含有由 V 区转基因上的 V 区基因片段编码的可变区序列和由人 Ig 转基因编码的 C 区。通过 V 库扩展法，可以产生具有至少 5 个不同 V 基因的转基因小鼠；小鼠可含至少 24

个 V 基因或更多。当然有些 V 基因片段可能是无功能的(如假基因等);如果需要可以保留这些片段或通过本领域专业人员已知的重组方法将其选择性地缺失。

在小鼠种系经过遗传工程处理使之含有带扩展 V 片段库的有功能的 YAC 后,所述 V 片段库基本上不存在于含 J 和 C 基因片段的人 Ig 转基因中,将所述特征繁殖并培育到其它遗传背景中,包括将具有扩展的 V 片段库的功能性 YAC 培育到含有不同人 Ig 转基因的小鼠种系中的背景。可将具有扩展的 V 片段库的多功能性 YAC 培育到种系中以便与人 Ig 转基因(或多个人 Ig 转基因)一起发挥作用。尽管本文称为 YAC 转基因,但整合到基因组中的所述转基因基本上不含酵母序列,如酵母自我复制所需的序列;在酵母中复制后,不再需要的话(即在导入小鼠 ES 细胞或小鼠前受精卵之前),也可将所述序列通过遗传工程方法(如限制消化和脉冲场凝胶电泳或其它适宜的方法)除去。

本发明还提供了扩增人序列免疫球蛋白表达之特征的方法,该方法包括培育具有人 Ig 转基因,或也含有具有扩展的 V 片段库的功能性 YAC 的转基因小鼠。V_H和 V_L基因片段均可在 YAC 上。实践者可将转基因小鼠培育到任何所需的背景中,包括含其它人转基因的背景,所述人转基因含有人 Ig 转基因和/或编码其它人淋巴细胞蛋白的转基因。

本发明还提供了由转基因小鼠生产的高亲和力人序列免疫球蛋白,所述转基因小鼠含有扩展的 V 区库的 YAC 转基因。

尽管前文描述了本发明转基因动物的优选实施方案,但本文公开的内容,更具体地说,由实施例中描述的转基因定义了其它实施方案。可定义四种转基因动物:

- I. 含未重排重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。
- II. 含未重排重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。
- III 含重排重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。
- IV 含重排重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

在这几种转基因动物中，优选的顺序是 II>I>III>IV，其中通过同源重组(或其它方法)已经使内源轻链基因(或至少 κ)失效，以及 I>II>III>IV，其中内源轻链基因未被失效并必须通过等位排斥而显性化。

如上文所讨论的，本发明提供了用于治疗人疾病的人序列单克隆抗体。单克隆抗体的治疗用途参见如 Larrick and Bourla, *Journal of Biological Response Modifiers*, 5:379-393，该文献引入本文作为参考。人单克隆抗体的用途包括治疗自身免疫性疾病、癌、感染性疾病、移植排斥、血液病如凝集紊乱和其它疾病。

可将本发明的抗体通过蛋白质传递药物领域已知的任何方法施用给患者。抗体特别适用于胃肠道外给药(即皮下、肌肉内或静脉内给药)。本发明的药物组合物也适用于通过其它药物传递方法施用(参见如 Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990))。

用于胃肠道外给药的药物组合物通常含有单克隆抗体溶解于可药用载体优选含水载体中的溶液。可以使用各种含水载体，如水、缓冲液、0.4%盐水、0.3%甘油等。这些溶液是无菌的并通常不含颗粒物质。可通过常规的熟知的消毒技术将这些组合物消毒。所述组合物可含有接近生理条件所需的可药用添加成分，如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂等，例如醋酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。根据所选的具体给药方式，抗体在这些制剂中的浓度可在很宽的范围内变化，即从不到约 0.5%，通常至少约 0.1%-1.5%或 2.0%（重量），而且主要以液体体积、粘度来选择制剂中的抗体浓度。制备胃肠道外给药的组合物的实际方法是本领域专业人员已知的，并在例如 Remington's *Pharmaceutical Sciences* 17th Ed. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1985)(该文献引入本文作为参考)中有更详细的描述。

可以施用含本发明抗体或其混合物的组合物以用于预防和/或治疗。在治疗应用中，以足以治愈或至少部分抑制其感染和其并发症的量，将组合物施用给患者。将足以达到该目的的量定义为“治疗有效量”。有效达到该目的的量通常为约 0.05 mg/kg 体重-约 5 mg/kg 体重，优选约 0.2mg/kg-体重至 1.5mg/kg 体重。

在某些情况下，需要修饰本发明的免疫球蛋白分子以改变其生物活

性。例如可将免疫球蛋白与其它化疗药物直接或间接结合。可结合各种化疗药物作为靶。例如可结合的抗炎药包括免疫调节剂、血小板激活因子(PAF)拮抗剂、环氧合酶抑制剂、脂质氧合酶抑制剂和白细胞三烯拮抗剂。一些优选的结合基包括环孢菌素 A、消炎痛、naproxen、FK-506、酶酚酸等。同样，抗氧化剂如过氧化物歧化酶也可用于治疗再灌注损伤。同样，抗癌剂如柔毛霉素、阿霉素、长春花硷、博莱霉素等也可使用。

还可将本发明的抗体用于将两亲物质(amphipaths)(如脂质体)导向患者体内位点。在这些制剂中，待传递的药物被作为脂质体的一部分掺入，在该脂质体中包埋了人单克隆抗体。

本发明的人序列单克隆抗体是有用的，部分是因为它们特异性地结合它们所针对的预定抗原。当预定抗原是人抗原(即人蛋白质或其片段)时，如果本发明的人免疫球蛋白也与非人动物中的同源抗原结合，则本发明的抗体就是有利的，所述非人动物特别是指常用于药物试验(如生物活性、药物动力学和安全性的临床前试验)的动物。这些动物包括小鼠、兔、大鼠、狗、猪，特别是非人灵长类如猩猩、类人猿和猴(如恒河猴和 cynomolgus 猴)。在试验动物中识别抗原的能力对于确定特异性结合对免疫球蛋白生物分布的影响是特别有用的。同源抗原是有下列性质的抗原(i)结构(如氨基酸序列)基本上类似于人抗原(即动物同源蛋白质的氨基酸序列与人蛋白质通常有约 50 % 的一致性，优选至少约 70 % 的一致性，最佳为至少约 80 % 或更高的一致性)；(ii)与人抗原具有基本相同的功能；和(iii)通常在与人抗原相同的细胞部分上发现。人和动物同源抗原通常(但不总是)有相同的名称。同源抗原的实例包括人微管蛋白和小鼠微管蛋白、人 CD4 和恒河猴 CD4 以及人 IgG 和大鼠 IgG。

另一方面，本发明提供了结合抗原的人单克隆抗体，所述单克隆抗体含有至少一条由人工基因编码的多肽。人工基因包括在体外通过化学或酶促方法合成的编码多肽的核酸片段和人工基因的子代(通过复制)，即全部合成的核酸，所述化学或酶促方法不需要细胞衍生的模板核酸链(如从细菌细胞和免疫或杂交瘤细胞达到的核酸模板)。

尽管在遗传工程中，用短的合成核酸作为引物、接头等是常规的，但还可以通过化学和/或酶促方法产生完全合成的长为 30、50 或更多碱基的编码蛋白质的核酸。本发明的人工基因可包括合成的核酸区和细胞

衍生的核酸区。人工基因的合成核酸区通常至少约 50 个碱基，一般至少约 100 个碱基，常常至少约 200 个碱基，经常的是至少约 250 个碱基，且通常超过 300 个碱基或 400 个碱基。通常合成的核酸区编码可变基因片段或其部分，如 CDR 区，恒定区通常由细胞衍生的核酸编码。用编码多肽的人工基因，可方便地表达免疫球蛋白多肽(即免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链)。通常人工基因与转录启动子序列，如衍生于免疫球蛋白基因或病毒(如 SV40、CMV、HIV、RSV)的启动子序列或杂种启动子可操作相连。还可将人工基因与其它序列如聚腺苷酸化序列和内含子相连。表达免疫球蛋白多肽的一种方法包括将编码免疫球蛋白多肽一个区(如可变区或其片段)的合成核酸插入到载体中，所述载体编码免疫球蛋白链的剩余片段或部分(如 μ 、 γ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 δ 、 ϵ 、 α_1 、 α_2)，以及启动子(如 CMV(细胞肥大病毒)启动子)、聚腺苷酸化或其它序列。构建所述载体以便在导入细胞后，载体序列的细胞转录和翻译产生免疫球蛋白多肽。

用人工基因可构建有功能的人序列免疫球蛋白重和轻链基因以及多肽，并用其生产具有所需特异性(如与预定抗原的结合特异性)的免疫球蛋白。这可通过构建人工基因来完成，所述人工基因编码与细胞或杂交瘤表达的多肽基本相似的免疫球蛋白多肽，所述细胞或杂交瘤来自用预定抗原免疫的转基因动物。因此，本发明提供了编码免疫球蛋白多肽的人工基因以及用人工基因生产人序列免疫球蛋白的方法。

根据该方法，将转基因动物(如具有一对纯合的功能性破坏了的内源重链等位基因、一对纯合的功能性破坏了的内源轻链等位基因、至少一个拷贝的人免疫球蛋白轻链转基因和至少一个拷贝的人免疫球蛋白重链转基因的转基因小鼠)用预定的抗原如人抗原免疫接种。然后从发生免疫球蛋白基因重排的一个细胞或细胞群中收集或分离核酸，优选 mRNA，确定编码免疫球蛋白重和/或轻链(特别是 V 片段)的核酸序列或其部分。用该序列资料作为人工基因序列的基础。

序列确定通常需要分离所需基因或 cDNA 的至少一部分，如重排的人转基因的一部分或编码免疫球蛋白多肽的相应 cDNA 的一部分。通常这要求克隆编码人免疫球蛋白多肽的 DNA，或优选 mRNA(即 cDNA)。用标准技术(参见 Sambrook et al., (1989) 分子克隆：实验室手册，1—3 卷，冷泉港出版社，该文献引入本文作为参考)完成克隆。例如通过 polyA⁺ mRNA，优选膜相关 mRNA 的反转录来构建 cDNA 文库，然后

用对人免疫球蛋白多肽基因序列特异的探针筛选所述文库。但在优选的实施方案中，用聚合酶链反应(PCR)扩增编码所需免疫球蛋白基因片段(如轻链可变片段)的 cDNA(或全长 cDNA 的一部分)。由于本领域专业人员很容易得到人免疫球蛋白多肽基因的序列，因此可很容易设计出特异性地与人免疫球蛋白基因或其片段杂交的探针或扩增该人免疫球蛋白基因或其片段用的 PCR 引物。参见例如 Taylor et al., Nuc. Acids. Res. ,20:6287 (1992)，该文献引入本文作为参考。此外，转基因小鼠的人转基因序列通常对实施者而言是已知的，因此可以选择与转基因的适宜区杂交的引物序列。很容易将扩增的序列克隆到任何适宜的载体，如表达载体、小基因载体或噬菌体展示载体中。应理解所用的具体克隆方法并不重要，只要它可以确定所需免疫球蛋白多肽某一部分的序列即可。如本文所述，将经克隆、扩增、标记的或不同于背景以便所需核酸的序列可被测定的核酸看作是分离的核酸。

用于克隆并测序的 RNA 的一个来源是通过获得转基因小鼠的 B 细胞并将 B 细胞与无限增殖细胞融合而得到的杂交瘤。使用杂交瘤的优点是很容易对杂交瘤进行筛选，并且杂交瘤生产所需的人单克隆抗体。或者可从被免疫动物的 B 细胞(或全脾)中分离 RNA。当使用杂交瘤以外的来源时，还需要筛选编码具有特异性结合特征之免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽的序列。用于所述筛选的一种方法是使用噬菌体展示技术。噬菌体展示描述于如 Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, 和 Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990)，所述文献均引入本文作为参考。在采用适宜噬菌体展示技术的一个实施方案中，分离来自被免疫的转基因小鼠的 cDNA(如全脾 cDNA)，用聚合酶链反应扩增 cDNA 序列，所述序列编码部分免疫球蛋白多肽的一部分，如 CDR 区，然后将扩增的序列插入到噬菌体载体中。用标准技术如淘选来鉴定编码所需肽，如具有所需结合特征的可变区肽的 cDNA。

然后确定经过扩增或克隆的核酸序列。通常确定编码免疫球蛋白多肽全部可变区的序列，但有时只确定部分可变区如 CDR-编码区部分就足够了。通常测序的部分至少 30 个碱基长，优选对至少 1/3 或至少一半可变区的编码碱基进行测序。

可对从 cDNA 文库分离的克隆进行测序，或使用 PCR 时，在亚克隆扩增序列后进行测序或对扩增的片段进行直接 PCR 测序。用标准技

术(参见例如 Sambrook et al.,(1989)分子克隆: 实验室手册, 1—3 卷, 冷泉港出版社, 以及 Sanger ,F.et al., (1977) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74:5463-5467, 该文献引入本文作为参考)完成测序。将克隆的核酸序列与公开的人免疫球蛋白基因和 cDNA 序列进行比较, 根据已测序的区域, 本领域专业人员很容易确定(i)杂交瘤免疫球蛋白多肽(包括重链的同种型)的种系片段用法和(ii)重和轻链可变区序列, 包括因 N-区添加和体细胞突变而产生的序列。免疫球蛋白基因序列资料的一个来源是国家生物技术信息中心, 国家药物库, 国家健康研究所, Bethesda, Md。

在另一实施方案中, 通过直接蛋白质测序来确定所需免疫球蛋白的氨基酸序列。

可构建一人工基因, 所述人工基因含有等同于或基本上类似于至少部分表达免疫球蛋白之基因(即重排的转基因)的序列。同样, 人工基因可编码等同于或基本相似于由重排转基因的已被测序部分编码的多肽的多肽。遗传密码的简并性使得相同的多肽可以由多个核酸序列编码。有时需要改变核酸序列, 例如以导入限制位点、改变密码子的使用, 以反映特定的表达系统, 或除去糖基化位点。另外, 可在杂交瘤序列中导入改变以改变免疫球蛋白的特征(如结合特征)。例如, 可将改变导入特别是重和轻链可变区的 CDR 区中, 以提高免疫球蛋白与预定抗原的亲合力。

构建合成核酸的方法是熟知的。尽管全部都用化学合成是可能的, 但通常用混合的化学-酶促合成法, 其中将化学合成的寡核苷酸用于连接反应和/或聚合酶链反应以得到较长的多核苷酸。在最优选的实施方案中, 用所选的重叠引物完成聚合酶链反应以便扩增的结果是含有人工基因所需之序列的 DNA。可用固相或在溶液中合成本发明的寡核苷酸。通常固相合成是优选的。有关通过亚磷酸三酯、磷酸三酯和 H-磷酸酯固相合成寡核苷酸的方法的详细描述非常多。参见例如 Itakura, 美国专利 4401796; Caruthers 等美国专利 4458066 和 4500707; Beaucage 等, Tetrahedron Lett.,22:1859-1862; Matteucci et al.,J. Amer. Chem. Soc., 103:3185-3191(1981); Caruthers 等, Genetic Engineering, 4:1-17 (1982); Jones,第 2 章, Atkinson 等, 第 3 章, 和 Sproat 等, 第 4 章, 在 Gait 编的 Oligonucleotide Synthesis:A practical Approach ,IRL Press,Washington ,D.C.(1984); Froehler 等, Tetrahedron Lett.,27:469-472(1986); Froehler 等, Nucleic Acids Res., 14:5399-5407(1986); Sinha

等, *Tetrahedron Lett* ; 24:5843-5846(1983); and Sinha 等, *Nucleic Acids Res.*, 12:4539-4557(1984), 所述文献均引入本文作为参考。

可将人工基因导入细胞中, 并表达以生产免疫球蛋白多肽。用于表达的细胞类型的选择取决于许多因素(如所需的蛋白质糖基化水平), 但优选能够分泌人免疫球蛋白的细胞。特别优选的细胞包括 CHO 细胞和骨髓瘤衍生的细胞如 SP20 和 NS0 细胞系。标准细胞培育是熟知的, 并描述于 Newman 等, *Biotechnology* 10:1455-1460(1992); Bebbington 等 *Biotechnology* 10:169 - 175(1992); Cockett 等, *Biotechnology* , 8: 662 - 667(1990); Carter 等, *Biotechnology* 10:163-167 (1992), 各文献均引入本文作为参考。导入核酸如人工基因的方法是熟知的, 包括转染(如通过电穿孔或脂质体介导)和转化。:在 Sambrook 等(同上文)的书中全面描述了导入基因的表达系统。

经常需要在同一细胞中表达两种免疫球蛋白多肽(即重链和轻链), 以便在体内生产免疫球蛋白(如 IgG 分子)。因此, 有时需要将两种人工基因(即一个编码重链, 一个编码轻链)导入细胞中。(可将两种人工基因导入同一个载体上)。或者, 可将编码一种免疫球蛋白多肽的人工基因导入已经经过遗传工程加工而表达另一免疫球蛋白多肽的细胞中。

显然, 由于人工基因经转染导入其中的细胞的繁殖, 人工基因全部的合成核酸部分都会作为复制和转录的模板。然而, 如本文所用的, 认为来源于合成核酸(即通过不需要细胞衍生的核酸模板链的化学或酶促方法, 体外合成的编码多肽的核酸分子)的子代基因也是人工基因。因此, 人工基因的合成部分与杂交瘤表达的转基因间的关系是一种其中只有信息联系(即序列信息)而没有直接的物理联系的关系。

本发明还提供了用于治疗和诊断, 特别是治疗人疾病的抗-CD4 单克隆抗体。CD4 是主要在胸腺细胞和 T 细胞中表达的细胞表面蛋白, 它与 T 细胞功能和 MHC II 型抗原的识别有关。抗 CD4 的抗体可降低 CD4 细胞的活性, 因此可降低不需要的自身免疫反应、炎性反应和移植器官的排斥。

事实上, 已经表明, 施用抗-CD4 单克隆抗体可防止(Wofsy, 等, *J. Exp. Med.*, 161:378-391(1985).)或逆转(Wofsy, 等, *J. Immunol.*, 138:3247-

3253(1987), Waldor 等, *Science*,227:415-417(1985))动物模型中的自身免疫疾病。给类风湿性关节炎患者施用鼠或嵌合抗-CD4 单克隆抗体有显著的临床效果(Knox., et al., *Blood*,77:20-30(1991); Goldbery et al., *J. Autoimmunity* ,4:617-630; Herzog et al., *Lancet*, ii: 1461-1462; Horneff ,et al., *Arthritis Rheum.* 34:129-140; Reiter ,et al., *Arthritis Rheum.* 34:525-536; Wending et al, *J. Rheum.* 18:325-327; Van der Lubbe et al.,*Arthritis Rheum.* 38:1097-1106; Van der Lubbe et al.,*Arthritis Rheum.* 36:1375-1379; Moreland et al., *Arthritis Rheum.* 36:307-318, and Choy et al, *Arthritis and Rheumatism*, 39(1):52-56(1996);所有文献均引入本文作为参考)。另外, 如上所述, 已经表明嵌合抗一 CD4 单克隆抗体在患真菌样霉菌病的患者中有一些临床效果(Knox et al.,(1991) *Blood* 77:20 ; 该文献引入本文作为参考)。在 Newman 等的生物技术, 10 : 1455-1460(1992)(该文献引入本文作为参考)中也讨论了抗 CD4 抗体。

实验实施例

方法和材料

按照 Hogan et al., “操作小鼠胚胎: 实验室手册”(冷泉港实验室, 该文献引入本文作为参考)的方法得到转基因小鼠。

按照公开的方法(Teratocarcinomas and embryonic stem cell: a practical approach, E. J. Robertson ,ed .,IRL Press, Washington, D.C. ,1987; Zjilstra et al., *Nature* 342:435-438(1989); and Schwartzberg et al.,*Science* 246:799-803(1989),所述文献均引入本文作为参考)操作胚胎干细胞。

按照 J.Sambrook et al., 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 1989 , 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, N.Y.(该文献引入本文作为参考)所述完成 DNA 克隆步骤。

按照制造商提供的说明, 用 Applied Bio Systems 寡核苷酸合成仪合成寡核苷酸。

按照“抗体: 实验室手册”, Ed Harlow and David Lane , 冷泉港实验室(1988)(该文献引入本文作为参考)所述, 操作杂交瘤细胞和抗体。

实施例 1

基因组重链人 Ig 转基因

本实施例描述人基因组重链免疫球蛋白转基因的克隆和显微注射，将所述转基因注射到鼠受精卵中。

按 Marzluff 等 (“ Transcription and Translation: a Practical Approach ” , B.D. Hammes and S.J. Higgins ,eds .,pp.89-129,IRL Press ,Oxford(1985))所述从新鲜人胎盘组织中分离核。将分离的核(或 PBS 洗涤的人精母细胞)包埋入低熔点的琼脂糖基质中，用 EDTA 和蛋白酶 κ 溶解以暴露高分子量的 DNA ，然后按 M.Finney in Current Protocols in Molecular Biology(F.Ausubel ,et al., eds ,Jhon Wiley & Sons ,Supp. 4,1988,Section 2.5.1)中所述在琼脂糖中用限制酶 NotI 消化。

然后按照 Anand 等， Nucl. Acids Res. 17:3425-3433(1989)所述，用脉冲场凝胶电泳分级分离 NotI 消化的 DNA 。通过 Southern 杂交检测富集的 NotI 片段馏分以检测一个或多个由该片段编码的序列。所述序列包含重链 D 片段、J 片段、 μ 和 γ 1 恒定区以及所有 6 个 VH 家族的代表(尽管 Berman 等，(1988)同上文，从 Hela 细胞中将该片段定义为 670 kb 片段，我们从人胎盘中发现该片段为 830 kb 的精 DNA)。合并含 NotI 片段的那些馏分，然后克隆到酵母细胞中 pYACNN 载体的 NotI 位点。通过用 EcoRI 消化 pYAC-4 Neo(Cook et al., Nucl. Acids Res. 16 :11817(1988))然后在寡核苷酸 5'-AAT TGC GGC CGC-3' 存在的条件下进行连接来制备质粒 pYACNN 。

按 Brownstein 等 Science 244:1348-1351(1989) 和 Green 等,Prox. Natl. Acad. Sci. USA 87:1213-1217(1990)(所述文献引入本文作为参考)所述分离含重链 NotI 片段的 YAC 克隆。按 M.Finney(出处同上)所述，通过脉冲场凝胶电泳从高分子量酵母 DNA 中分离克隆的 NotI 插入片段。通过加入 1 mM 精胺浓缩 DNA ，并直接微注射到前述单细胞胚胎核中。

实施例 2

通过体内同源重组形成的基因组 κ 轻链人 Ig 转基因

Lorenz 等 Nucl. Acids Res.15:9667-9677(1987)(该文献引入本文作为参考)中描述了人 κ 轻链的图谱。

分离含所有 C κ 、3' 增强子和所有 J 片段以及至少 5 个不同 V 片段

的 450 kb XnoI-NotI 片段，然后显微注射到实施例 1 所述的单细胞胚胎核中。

实施例 3

通过体内同源重组形成的基因组 κ 轻链人 Ig 转基因

按实施例 1 所述分离包含所有上述片段加至少 20 或更多 V 片段的 750 kb MluI- NotI 片段，然后用 BssHII 消化以产生与 400 kb 的片段。

450 kb XnoI-NotI 片段和大约 400 kb MluI- NotI 片段含有 BssHII 和 XnoI 限制性位点所确定的序列重叠。在显微注射到小鼠受精卵中后，这两个片段的同源重组得到含至少增加了 15-20 个 V 片段的转基因，所述 V 片段发现于 450 kb XnoI/NotI 片段(实施例 2)上。

实施例 4

构建重链小座位

A. 构建 pGP1 和 pGP2

用 EcoRI 和 StyI 消化 pBR322，然后与下列寡核苷酸连接以产生含图 8 所示限制性位点的 147 bp 插入片段的 pGP1。在图 9 中也列出了这些寡核苷酸的一般重叠。

所示寡核苷酸是：

```

oligo-1  5' - CTT GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC TTT
           TTT TTG CAT ACT GCG GCC - 3'

oligo-2  5' - GCA ATG GCC TGG ATC CAT GGC GCG CTA
           GCA TCG ATA TCT AGA GCT CGA GCA -3'

oligo-3  5' - TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG
           CTT ACG CGT ACT AGT GCG GCC GCT -3'

oligo-4  5' - AAT TAG CGG CCG CAC TAG TAC GCG TAA
           GCT TGG TAC CCG GGA ATT - 3'

oligo-5  5' - CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA
           TCG ATG CTA GCG CGC CAT GGA TCC - 3'

oligo-6  5' - AGG CCA TTG CGG CCG CAG TAT GCA AAA
           AAA AGC CCG CTC ATT AGG CGG GCT - 3'
  
```

该质粒含一个大型多接头，该多接头侧翼为稀少的 NotI 切割位点以构建可从载体序列中分离的大插入片段以便进行显微注射。该质粒是以 pBR322 为基础的，pBR322 与 pUC 为基础的质粒相比，拷贝数相对

较少(pGP1 保留了靠近复制原点的 pBR322 拷贝数控制区)。低拷贝数降低了插入片段的潜在毒性。另外, pGP1 含有衍生于 trpA(Christie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180(1981))的强转录终止序列, 该序列插入在氨苄青霉素抗性基因与多接头之间。这样通过抑制从氨苄青霉素启动子开始的连读转录而进一步降低了与某些插入片段有关的毒性。

质粒 pGP2 衍生于 pGP1, 以便将另一限制性位点(SfiI)导入多接头。用 MluI 和 SpeI 消化 pGP1 以切割质粒多接头部分的识别序列。

将下列衔接子寡核苷酸连接到由此消化的 pGP1 中以形成 pGP2。

```
5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3'
5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3'
```

除含有位于 MluI 和 SpeI 位点之间的另一 SfiI 位点外, pGP2 等同于 pGP1。这样可以用 SfiI 和 NotI 完全切割插入片段。

B. 构建 pRE3(大鼠 3' 增强子)

在重链构建体中包含位于大鼠恒定区下游的增强子序列。

分离并克隆 Petterson 等 Nature 344:165-168(1990) (本文引用作为参考) 所述的重链区 3' 增强子。用下列寡核苷酸 PCR 扩增大鼠 IGH3' 增强子序列:

```
5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'
5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'
```

用 BamHI 和 SphI 消化由此形成的编码 3' 增强子的双链 DNA, 然后克隆到 BamHI/SphI 切割的 pGP2 以产生 pRE3(大鼠增强子 3')。

C. 克隆人 J-μ 区

通过组合分离自 λ 噬菌体插入片段的两个或多个片段来克隆该区的实质部分。见图 9。

用寡核苷酸 GGA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATG TCT GGG GCC AAG 从人基因组 DNA 文库中分离包含所有人 J 片段的 6.3 kb BamHI/HindIII 片段(Matsuda et al., EMBO J. 7:1047-1051(1988); Ravetech et al., Cell 27:583-591(1981), 所述文献引入本文作为参考)。

用寡核苷酸 CAC CAA GTT GAC CTG CCT GGT CAC AGA CCT GAC CAC CTA TGA 相似地分离相邻的 10 kb HindIII/BamHI 片段, 该片段含有增强子、转换和编码外显子的恒定区(Yasui et al., Eur. J. Immunol. 19:1399-1403(1989))。

用克隆 pMUM 插入片段(pMUM 是用寡核苷酸:
CCT GTG GAC CAC CGC CTC CAC CTT CAT
CGT CCT CTT CCT CCT μ 膜外显子 1 从人基因组 DNA 文库中分离的 4 kb EcoRI/HindIII 片段-)作探针相似地分离相邻 3' 1.5 kb BamHI 片段, 然后克隆到 pUC19 中。

用 BamHI 和 BglII 消化 pGP1, 然后用牛肠碱性磷酸酶处理。

将图 9 中的片段(a)和(b)克隆到消化的 pGP1 中。然后分离正向克隆以便使用 BamHI/Bgl 融合破坏 5' BamHI 位点。将其鉴定为 pMU(参见图 10)。用 BamHI 消化 pMU, 并插入从图 9 中的片段(c)。用 HindIII 消化来检查方向。所得的质粒 pHIG1(图 10)含有编码 J 和 C μ 片段的 18 kb 插入片段。

D. 克隆 C μ 区

用 BamHI 和 HindIII 消化 pGP1, 然后用牛肠碱性磷酸酶处理(图 14)。将图 14 所处理的片段(b)和图 14 的片段(c)克隆到 BamHI/HindIII 切割的 pGP1 中。用 HindIII 消化来检查片段 c 的合适方向以形成 pCON1, pCON1 含有编码 C μ 区的 12 kb 插入片段。

而 pHIG1 在其 18 kb 的插入片段中含有 J 片段、转换和 μ 序列, 该插入片段在多接头中含有 SfiI 3' 和 SpeI 5' 位点, 多接头侧翼为 NotI 位点, 用于重排 VDJ 片段。pCON1 相同, 但区别是它没有 J 区并只含有一 12 kb 插入片段。下文将描述用 pCON1 构建含重排 VDJ 片段的片段。

E. γ -1 恒定区的克隆(pREG2)

图 16 中描述了人 γ -1 区的克隆。

Yamamura 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2152-2156(1986)报道了从转基因构建体表达人膜结合的 γ -1, 所述构建体已经被部分整合缺失。其结果表明 3' BamHI 位点描述了一个序列, 该序列包含跨膜重排和转换拷贝的 γ 基因, 该基因含有不到 5 kb 的 V-C 内含子。因此, 在未

重排、未转换的基因中，全长转换区被包含在第一 γ -1 恒定外显子 5' 端的不到 5 kb 的序列中。因此，它被包含在 5' 5.3 kb HindIII 片段(Ellison et al., *Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079(1982)该文献引入本文作为参考)中。Takahashi 等, *Cell* 29:671-679(1982)(该文献引入本文作为参考)还报道该片段含有转换序列，而且该片段与 7.7 kb HindIII-BamHI 片段一起必须包含我们用于转基因构建体所需的所有序列。内含子序列是在具体基因内含子中的，至少 15 个连续核苷酸的核苷酸序列。

· 用下列 γ -1 第三外显子(CH3)特异性的寡核苷酸鉴定并分离含 γ -1 区的噬菌体克隆。

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

将 7.7 kb HindIII-BglII 片段(图 11 中的片段(a))克隆到 HindIII/BglII 切割的 pRE3 中以形成 pREG1。将上游 5.3 kb HindIII 片段(图 11 中的片段(b))克隆到 HindIII 消化的 pREG1 以形成 pREG2。用 BamHI/SpeI 消化证实正确的方向。

F. 组合 C_γ 和 C_μ

前述质粒 pHIG1 含有人 J 片段和 C_μ 恒定区外显子。为了提供含 C_μ 恒定区基因片段的转基因，用 SfiI 消化 pHIG1(图 10)。用 SfiI 消化质粒 pREG2 以产生含人 C_γ 外显子和大鼠 3' 增强子序列的 13.5 kb 插入片段。组合这些序列以产生质粒 pHIG3' (图 12)，在 31.5 kb 的插入片段中，该质粒含人 J 片段、人 C_μ 恒定区、人 C_γ 恒定区和大鼠 3' 增强子。

通过用 SfiI 消化 pCON1 并将其与用 SfiI 消化 pREG2 所得的含人 C_γ 区和大鼠 3' 增强子的 SfiI 片段组合，构建编码人 C_μ 和 C_γ 1，而不编码 J 片段的第二质粒。所得质粒 pCON(图 12)含有 26 kb NoyI/SpeI 插入片段，该插入片段含有人 C_μ 、人 C_γ 1 和大鼠 3' 增强子序列。

G. 克隆 D 片段

图 13 中描述了用于克隆人 D 片段的策略。用多样性区序列特异性探针从含 D 片段的人基因组文库中鉴定并分离噬菌体克隆(Ichihara et al., *EMBO J.* 7:4141-4150(1988))。用下列寡核苷酸：

DXP1: 5' - TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT
AAC CAC AGT GTC - 3'

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

DN4: 5' - GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC
GCA CCT GAC ACC - 3'

用寡核苷酸 DXP1 从鉴定的噬菌体克隆中分离含 DLR1、DXP1、DXP'1 和 DA1 的 5.2kb XhoI 片段(图 13 中片段(b))。

用寡核苷酸 DXP4 从鉴定的噬菌体克隆中分离含 DXP4、DA4 和 DK4 的 3.2 kb XbaI 片段(图 13 中片段(c))。

组合图 13 中的片段(b)、(c)和(d)，然后克隆到 pGP1 的 XbaI/ XhoI 位点以形成含 10.6 kb 插入片段的 pHIG2。

依次完成该克隆。首先用牛肠碱性磷酸酶处理图 13 中的 5.2 kb 片段(b)和图 13 中的 2.2 kb 片段(d), 然后克隆到用 XhoI 和 XbaI 消化的 pGPI 中。用 5.2 kb 和 2.2 kb 插入片段筛选所得的克隆。正如用 BamHI 消化确定的, 试验阳性的带 5.2 kb 和 2.2 kb 插入片段的克隆, 其中一半以适当的方向含有 5.2 kb 插入片段。然后将图 13 中的 3.2 kb XbaI 片段克隆到含片段(b)和(d)的该中间质粒以形成 pHIG2。该质粒含有克隆到多接头中的多样性片段, 所述多接头含有特有的 5' SfiI 和特有的 3' SpeI 位点。整个多接头两侧翼为 NotI 位点。

H. 构建重链小座位

下文描述含一个或多个 V 片段的人重链小座位的构建。

用下列寡核苷酸分离未重排的 V 片段,该片段对应于 Newkirk 等(J. Clin. Invest. 81:1511-1518(1988), 该文献引入本文作为参考)的杂交瘤中所含的 V 片段:

5' - GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG GAT TTT
ATT CAC CCC TGT GTC - 3'

确定未重排 V 片段的限制图谱以鉴定特有的限制位点，所述位点在消化后可提供约 2 kb 的 DNA 片段，所述片段含有未重排的 V 片段以及 5' 和 3' 侧翼序列。5' 引物将包含启动子和其它调节序列，而 3' 侧翼

序列提供用于 V-DJ 连接所必需的重组序列。将所述约 3.0 kb V 片段克隆到 pGB2 的多接头中以形成 pVH1。

SfiI 消化 pVH1，将所得的片段克隆到 pHIG2 的 SfiI 位点以形成 pHIG5'。由于 pHIG2 只含有 D 片段，因此所得的 pHIG5' 质粒含有单个 V 片段以及 D 片段。pHIG5 所含插入片段的大小是 10.6 kb 加 V 插入片段的大小。

通过用 NotI 和 SpeI 消化切割来自 pHIG5 的插入片段，然后分离。用 SpeI 和 NotI 消化含 J、C μ 和 C γ 1 片段的 pHIG3'，分离含所述序列和大鼠 3' 增强子序列的 3 kb 序列。组合这两个片段，然后连接到 NotI 消化的 pGB1 中以产生 pHIG，pHIG 含有编码 V 片段、9 个 D 片段、6 个功能性 J 片段、C μ 、C γ 1 和大鼠 3' 增强子的插入片段。该片段的大小近似 43 kb 加 V 插入片段的大小。

I. 通过同源重组构建重链小座位

如上部分所述，在使用单个 V 片段时，pHIG 的插入片段约 43-45 kb。该插入片段的大小在或接近很容易克隆到质粒载体中的限制。为了提供更多的 V 片段，下面描述重叠 DNA 片段的体内同源重组，所述 DNA 片段在受精卵或 ES 细胞内进行同源重组后，形成含大鼠 3' 增强子、人 C μ 、人 C γ 1、人 J 片段、人 D 片段和多个人 V 片段的转基因。

用下列衔接子将含人 J 片段(参见图 9 中片段(a))的 6.3 kb BamHI/HindIII 片段克隆到 Mlu/SpeI 消化的 pHIG5' 中：

5' GAT CCA AGC AGT 3'

5' CTA GAC TGC TTG 3'

5' CGC GTC GAA CTA 3'

5' AGC TTA GTT CGA 3'

所得的质粒命名为 pHIG5' O(重叠)。该质粒中所含的插入片段含有人 V、D 和 J 片段。当使用来自 pVH1 的单个 V 片段时，该插入片段的大小接近 17 kb 加 2 kb。分离该插入片段并与含人 J、C μ 、 γ 1 和大鼠 3' 增强子序列的 pHIG3' 的插入片段组合。两个插入片段均含有人 J 片段，这样在两个 DNA 片段之间，提供了约 6.3 kb 的重叠。当共注射到小鼠受精卵中时，发生体内同源重组，产生等同于 pHIG 中所含之插入片段的转基因。

该方法可将多个 V 片段加入到在体内形成的转基因中。例如，不将单个 V 片段插入到 pHIG5' 中，而将包含在下列组成中的多个 V 片段克隆到 pHIG2 的 SfiI 位点以产生 pHIG5' V_N：(1)分离的基因组 DNA，(2)衍生于基因组 DNA 的连接的 DNA，或(3)编码合成的 V 片段库的 DNA。然后将图 9 的 J 片段(a)克隆到 pHIG5' V_N 中，分离插入片段。该插入片段现在含有多个 V 片段以与分离自 pHIG3' 所含之插入片段上所含的 J 片段重叠的 J 片段。当共同导入小鼠受精卵核后，发生同源重组以体内产生转基因，所述转基因编码多个 V 片段和多个 J 片段、多个 D 片段、C_μ、C_{γ1}(均来自人)和大鼠 3' 增强子序列。

实施例 5

构建轻链小座位

A. 构建 pE_μ1

图 16 中描述了 pE_μ1 的构建。用下列寡核苷酸从噬菌体克隆中分离在 XbaI-EcoRI 678 bp 片段上的小鼠重链增强子(Banerji et al., Cell 33:729-740 (1983)):

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

将该 E_μ 片段克隆到通过补平 EcoRI 位点，用 EcoRV/ XbaI 消化的 pGP1 中。将所得质粒命名为 pEmu1。

B. 构建κ轻链小座位

构建体含有至少一个人 V_κ 片段、所有 5 个人 J_κ 片段、人 J-C_κ 增强子、人κ 恒定区外显子，而且理想的，人 3' κ 增强子(Meyer et al., EMBO J. 8:1959-1964(1989))。小鼠中的κ 增强子在 C_κ 下游 9 kb。但在人类中尚未鉴定出。另外，该构建体含有一个拷贝的小鼠重链 J-C_μ 增强子。

从下列 4 个组成片段构建小座位：

(a) 16 kb SmaI 片段，与小鼠座位类型，该片段含人 C_κ 外显子和 3' 人增强子；

(b) 5' 相邻的 5 kb SmaI 片段，该片段含所有 5 个 J 片段；

(c) 包含从 pE_μ1 中分离的小鼠重链内含子增强子(包含该序列以在 B 细胞发育中尽可能早地诱导轻链构建体的表达。由于重链基因转录早于轻链基因，该重链增强子可能在比内含子κ 增强子早的阶段有活性)；

和

(d) 含一个或多个 V 片段的片段。

按如下制备该构建体。用 SmaI 消化人胎盘 DNA，然后在琼脂糖凝胶上通过电泳分级分离。同样，用 BamHI 消化人胎盘 DNA，然后通过电泳分级分离。从 SmaI 消化的凝胶中分离 16 kb 的馏分，从含用 BamHI 消化的 DNA 中分离 11 kb 区。

将 16 kb SmaI 馏分克隆到已用 XhoI 消化，用 Klenow 片段 DNA 聚合酶处理以补平 XhoI 限制消化产物的 λ FIX II(Stratagene, La Jolla, California) 中。16 kb SmaI 馏分的连接破坏了 SmaI 位点和 XhoI 位点的完整。

将 11 BamHI 馏分克隆到克隆前用 BamHI 消化的 λ EMBL3 (Stratagene, La Jolla, California) 中。

用下列 C_{κ} 特异性寡核苷酸检测来自各文库的克隆：

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

将 16 kb XhoI 插入片段亚克隆到 XhoI 切割的 pE μ 1 中以便 C_{κ} 与 SmaI 位点相邻。将所得的质粒命名为 pKap1。

用上述 C_{κ} 特异性寡核苷酸检测 λ EMBL3/ BamHI 文库以鉴定一 11 kb 的克隆。将 5 kb SmaI 片段(图 20 的片段(b))亚克隆并随后插入用 SmaI 消化的 pKap1 中。将含正确方向的 J 片段、 C_{κ} 和 E μ 增强子的那些质粒命名为 pKap2。

此后将一个或多个 V_{κ} 片段亚克隆到 pKap2 的 MluI 位点以产生质粒 pKapH，该质粒编码人 V_{κ} 片段、人 J_{κ} 片段、人 C_{κ} 片段和人 E μ 增强子。NotI 消化 pKapH 切割该插入片段，然后用琼脂糖凝胶电泳纯化。将由此纯化的插入片段显微注射到前述小鼠受精卵的前核中。

C. 通过体内同源重组构建 κ 轻链小座位

将 11 kb BamHI 片段克隆到 BamHI 消化的 pGP1 中以便 3' 末端朝向 SfiI 位点。将所得的质粒命名为 pKAPint。将一个或多个 V_{κ} 片段插

入到 pKAPint BamHI 和 SpeI 位点之间的多接头中以形成 pKapHV。通过用 NotI 消化切割 pKapHV 的插入片段，然后纯化。通过用 NotI 消化切割 pKap2 的插入片段，然后纯化。每个片段均含有同源区，即来自 pKapHV 的片段含有 5 kb 的 DNA 序列，该 DNA 序列含有与得自 pKap2 的插入片段中所含的 5 kb SmaI 片段基本上同源的 J_κ 片段。这样，这些插入片段在微注射到小鼠受精卵中时能够同源重组以形成编码 V_κ、J_κ 和 C_κ 的转基因。

实施例 6

分离对应于免疫球蛋白κ轻链基因之重排和表达拷贝的基因组克隆

本实施例描述从表达所需免疫球蛋白的培养细胞中克隆免疫球蛋白κ轻链基因。所述细胞可含有给定免疫球蛋白基因的多个等位基因。例如，杂交瘤可含有 4 个拷贝的κ轻链基因，两个拷贝来自融合的配对细胞系，两个拷贝来自表达所需免疫球蛋白的源 B 细胞。这 4 个拷贝之中，只有一个编码所需的免疫球蛋白，尽管事实上，其中的一些可能被重排过。本实施例中所述的方法可以选择性地克隆κ轻链的表达拷贝。

A. 双链 cDNA

将来自杂交瘤或淋巴瘤的细胞或其它合成带κ轻链的 IgM 的细胞表面或分泌形式或两种形式的细胞系用于分离 polyA⁺ RNA。然后用反转录酶(有关常规方法参见 Goodspeed et al.,(1989) Gene 76:1; Dunn et al.,(1989) J. Biol. Chem. 264:13057)将该 RNA 用于合成寡核苷酸 dT 引发的 cDNA。然后分离单链 cDNA，用多核苷酸末端转移酶将 G 残基加到 3' 末端。然后纯化 G 结尾的单链 cDNA，并用作用下列寡核苷酸为引物的第二条链合成的模板(用 DNA 聚合酶催化的):

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

分离双链 cDNA，并用于确定 mRNA 5' 末端的核苷酸序列，所述 mRNA 编码所表达免疫球蛋白分子的重和轻链。然后分离这些表达基因的基因组克隆。在下文部分 B 中说明了克隆所表达轻链基因的方法。

B. 轻链

将部分 A 中所述的双链 cDNA 变性，并用作第三轮 DNA 合成的模板，该合成使用下列寡核苷酸引物：

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT
GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA - 3'

该引物含有κ轻链信使(TCA TCA GAT GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA)的恒定区部分以及特有序列特异性的序列, 该序列可作为 PCR 扩增新合成的 DNA 链(GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG)的模板。用下列两个寡核苷酸引物, 通过 PCR 扩增所述序列:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3'
5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG -3'

然后通过凝胶电泳纯化 PCR 扩增的序列, 并用作双脱氧测序反应的模板, 该反应用下列寡核苷酸作为引物:

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

然后将序列的前 42 个核苷酸用于合成特有的探针, 用该探针分离转录出免疫球蛋白信使的基因。下文将该 DNA 的合成的 42 个核苷酸的片段称为 o-κ。

进行 DNA Southern 印迹, 从表达 Ig 的细胞系中分离并用包括 SmaI 的数种限制核酸内切酶逐个并成对组合消化, 然后用 32-P 标记的特有寡核苷酸 o-κ 进行检测。在重排 V 片段的上游鉴定了一个特有的限制核酸内切酶位点。

然后用 SmaI 和第二种酶(如果在 V 片段内有 SmaI, 就用 BamHI 或 KpnI)切割来自 Ig-表达细胞系的 DNA。用 T4 DNA 聚合酶处理任何所得的非平整末端以得到有平整末端的 DNA 分子。然后加入编码接头的限制位点(根据片段中不存在的位点, 来选择 BamHI、EcoRI 或 XhoI), 并用相应的接头酶切割以得到带有 BamHI、EcoRI 或 XhoI 的末端。然后, 通过琼脂糖凝胶电泳将 DNA 进行大小分级分离, 接着将含有覆盖所表达 V 片段之 DNA 片段的馏份克隆到 λEMBL3 或 λFIX(Stratagene, La Jolla, California)中。用特有的探针 o-κ 分离含 V 片段的克隆。从阳性克隆中分离 DNA, 然后亚克隆到 pKap1 的多接头中。将所得克隆称为 pRKL。

实施例 7

分离对应于免疫球蛋白μ重链基因之重排的表达拷贝的基因组克隆

本实施例描述从表达所需免疫球蛋白的培养细胞中克隆免疫球蛋白

白 μ 重链基因。本实施例中所述的方法可以选择性地克隆 μ 重链基因的表达拷贝。

按本文前述制备并分离双链 cDNA。将双链 cDNA 变性并用作第三轮 DNA 合成的模板，该合成使用下列寡核苷酸引物：

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA GAC
GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC - 3'

该引物含有 μ 重链信使(ACA GGA GAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC)的恒定区部分以及特有序列特异性的序列，该序列可作为 PCR 扩增新合成的 DNA 链(GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG)的引物。用下列两个寡核苷酸引物，通过 PCR 扩增所述序列：

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'
5' - GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG - 3'

然后通过凝胶电泳纯化 PCR 扩增的序列，并用作双脱氧测序反应的模板，该反应用下列寡核苷酸作为引物：

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

然后将序列的前 42 个核苷酸用于合成特有的探针，用该探针分离转录出免疫球蛋白信使的基因。下文将该 DNA 的合成的 42 个核苷酸的片段称为 o-mu。

进行 DNA Southern 印迹，从表达 Ig 的细胞系中分离并用包括 MluI(MluI 是一种很稀少的切割酶，它在 J 片段和 mu CH1 之间裂解)的数种限制核酸内切酶逐个并成对组合消化，然后用 ^{32} -P 标记的特有寡核苷酸 o-mu 进行检测。在重排 V 片段的上游鉴定了一个特有限制核酸内切酶位点。

然后用 MluI 和第二种酶切割来自 Ig-表达细胞系的 DNA。然后将 MluI 或 SpeI 衔接子接头连接到末端上，并切割以便将上游位点转变成 MluI 或 SpeI。然后，通过琼脂糖凝胶电泳将 DNA 进行大小分级分离，接着将含有覆盖所表达 V 片段之 DNA 片段的馏份直接克隆到质粒 pGP1 中。用特有的探针 o-mu 分离含 V 片段的克隆，然后将插入片段亚克隆到 MluI 或 MluI/SpeI 切割的质粒 pCON2 中。将所得的质粒称为 pRMGH。

实施例 8

构建人 κ 小座位转基因

轻链小座位

用 κ 轻链特异性寡核苷酸探针筛选人基因组 DNA 噬菌体文库并分离覆盖 J_{κ} -C 区的克隆。将含 $J_{\kappa}1$ 的 5.7 kb ClaI/XhoI 片段和含 $J_{\kappa}2-5$ 和 C_{κ} 的 13 kb XhoI 片段克隆到 pGP1d 中, 然后用于产生质粒 pKcor。该质粒含 $J_{\kappa}1-5$, κ 内含子增强子和 C_{κ} 以及 4.5 kb 5' 和 9kb 3' 侧翼序列。它还含有一个特有的用于克隆 V_{κ} 片段的 5' XhoI 位点和用于插入其它顺式作用调节序列的特有 3' SalI 位点。

V_{κ} 基因

用 V_{κ} 轻链特异性的寡核苷酸探针筛选人基因组 DNA 噬菌体文库, 分离含人 V_{κ} 片段的克隆。用 DNA 序列分析确定功能性 V 片段。这些克隆含有 TATA 盒、编码前导和可变肽(包含 2 个半胱氨酸残基)的开放阅读框架、剪接序列和重组七聚体-12 bp 间隔区及九聚体序列。作出这三个克隆的图谱并测序。其中两个克隆, 65.5 和 65.8 似乎是有功能的, 它们含有 TATA 盒、编码前导和可变肽(包含 2 个半胱氨酸残基)的开放阅读框架、剪接序列和重组七聚体-12 bp 间隔区及九聚体序列。第三个克隆 65.4 可能编码 $V_{\kappa}I$ 假基因, 因为该克隆含有不标准的重组七聚体。

用有功能的克隆之一, $V_{\kappa}65-8$ (编码 $V_{\kappa}III$ 家族基因)构建轻链小座位构建体。

pKC1

通过将含 $V_{\kappa}65.8$ 的 7.5 kb XhoI/SalI 片段插入到 pKcor 的 5' XhoI 位点来产生 κ 轻链小座位转基因 pKC1(图 32)。在注射前通过用 NotI 消化来分离转基因插入片段。

将纯化的插入片段微注射到受精(C57BL/6 $\times$ CBA)F2 小鼠胚胎的前核中, 然后将活胚胎转移到 Hogan 等(in Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986, 冷泉港实验室, 纽约)所述的假孕雌性小鼠中。通过尾 DNA 的 Southern 印迹分析分析从注射胚胎发育的小鼠是否存在转基因序列。根据含已知数量的克隆 DNA 的对照标准, 通过带强度来估计转基因拷贝数。从这些动物中分离血清并按 Harlow and Lane(在抗

体：实验室手册，1988，冷泉港实验室(纽约)中所述的 ELISA，分析是否存在编码人 Ig κ 蛋白质的转基因。用人 Ig κ 特异性(克隆 6E1, #0173, AMAC, Inc., Westbrook ME)，人 IgM (克隆 AF6, #0285, AMAC, Inc., Westbrook, ME) 和人 IgG1(克隆 JL512, #0280, AMAC, Inc., Westbrook ME)的小鼠单克隆抗体包被微滴定板上的孔。将系列稀释的血清样品加到孔中，然后用亲合力分离的碱性磷酸酶结合的山羊抗人 Ig(多价)(已被预吸附以便使之与小鼠免疫球蛋白的交叉反应最小)检测是否存在特异性免疫球蛋白。

图 35 说明 8 个小鼠(I.D.#676, 674, 673, 670, 666, 665, 664, 和 496)血清的 ELISA 试验结果。前 7 个小鼠是从注射了 pKC1 转基因插入片段的胚胎发育的，第 8 个小鼠是从微注射了 pHCl 转基因(前述)的小鼠衍生的。从注射 KC1 胚胎发育的 7 只小鼠中，通过 DNA Southern 印迹分析，有两只(I.D.# 666 和 664)不含有转基因插入片段，其它 5 只(I.D.#676, 674, 673, 670 和 665)含有转基因。除一只外所有 KC1 转基因阳性动物均表达可检测水平的人 Ig κ 蛋白，根据 DNA Southern 印迹分析，未表达的那只动物可能是由于基因镶嵌物。pHCl 阳性的转基因小鼠表达人 Ig M 和 IgG1，但不表达 Ig κ ，这说明了试验中所用试剂的特异性。

pKC2

通过将含 V κ 65.5 的 8 kb XhoI/SalI 片段插入 pKC1 的 5' XhoI 位点产生 κ 轻链小座位转基因 pKC2。在微注射前，通过 NotI 消化来分离含两个 V κ 片段的所得转基因插入片段。

pKVe2

除该构建体包含 J κ 5' 的 1.2 kb 序列并丢失了 V κ 65.8 3' 的 4.5 kb 序列外，该构建体与 pKC1 相同。另外，它还含有 0.9 kb XbaI 片段，该片段含有小鼠重链 J- μ 内含子增强子(Banerji et al., Cell 33:729-740(1983))以及含插入在下游的人重链 J- μ 内含子增强子(Hayday et al., Nature 307:334-340(1984))的 1.4 kb MluI /HindIII 片段。用该构建体试验起始轻链小座位的早期重排以影响等位基因和同种型排斥的可行性。用不同的增强子，即小鼠或大鼠 3' κ 或重链增强子(Meyer and Neuberger, EMBO J. 8:1959-1964(1989); Petterson et al., Nature 344:165-168 (1990)，该文献引入本文作为参考)产生类似的构建体。

重排的轻链转基因

设计 κ 轻链表达盒以重建功能重排的轻链基因, 来自人 B 细胞 DNA 的该基因已用 PCR 扩增。在图 33 中描述了方法。将 PCR 扩增的轻链基因克隆到载体 pK5nx 中, pK5nx 含有从 κ 轻链基因 65.5 分离的 3.7 kb 5' 侧翼序列。然后将与 5' 转录序列融合的 VJ 片段克隆到载体 pK31s 的特定 XhoI 位点, pK31s 含有 J κ 2-4、J κ 内含子增强子、C κ 和 9 kb 的下游序列。所得的质粒含有重建的功能重排的 κ 轻链转基因, 可用 NotI 切割该转基因以便微注射到胚胎中。该质粒还在 3' 末端含有单一的 SalI 位点, 以用于插入其它的顺式作用调节序列。

用两个合成的寡核苷酸(o-130,o-131)从人脾基因组 DNA 扩增重排的 κ 轻链基因。寡核苷酸 o-131(gga ccc aga (g,c)gg aac cat gga a(g,a)(g,a,t,c))与 V κ III 家族轻链基因的 5' 区互补并覆盖前导序列的第一个 ATC。寡核苷酸 o-130(gtg caa tca att ctc gag ttt gac tac aga c)与 J κ 1 3' 的约 150 bp 序列互补并含有 XhoI 位点。这两个寡核苷酸扩增来自人脾 DNA 的 0.7 kb DNA 片段, 该片段对应于与 J κ 1 片段连接的重排的 V κ III 基因。用 NcoI 和 XhoI 消化 PCR 扩增的 DNA, 然后将单个 PCR 产物克隆到质粒 pNN03 中。确定了 5 个克隆的 DNA 序列, 并鉴定了其中两个含有功能性 VJ 连接(开放阅读框架)。收集其它功能重排的轻链克隆。逐个将功能重排的克隆克隆到上述轻链表达盒(图 33)中。可将用重排的轻链构建体产生的转基因小鼠与重链小座位转基因种交配, 以产生表达各种全人抗体的小鼠品系, 其中由重链提供初级库的多样性。轻链多样性的一个来源是体细胞突变。由于就轻链与不同重链、不同品系小鼠的结合能力而言, 并不是所有的轻链都是相同的, 因此可产生并检测含不同轻链构建体的轻链。与用未重排的轻链小座位相反, 该方案的优点是一发生重链 VDJ 连接, 就可以提高来自准备与重链配对之轻链的轻链等位基因和同种型排斥。该种组合会导致表达全人抗体的 B 细胞的频率增大, 由此可有利于表达人 Ig 的杂交瘤的分离。

通过琼脂糖凝胶电泳从载体序列中分离质粒 pIGM1、pHC1、pIGG1、pKC1 和 pKC2 的 NotI 插入片段。将纯化的插入片段微注射到受精(C57BL16xcBA)F2 小鼠胚胎的前核中, 然后将活胚胎转移到 Hogan 等(in Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986, 冷泉港实验室, 纽约)所述的假孕雌性小鼠中。

实施例 9

通过同源重组使小鼠 κ 轻链基因失活

本实施例描述通过在胚胎干(ES)细胞中的同源重组使小鼠内源 κ 基因座位失活, 然后通过将带失活 κ 等位基因的靶 ES 细胞注射到早期小鼠胚胎(胚泡)中而将突变的基因导入小鼠种系中。

该方法是用含 DNA 序列的载体, 通过同源重组来缺失 J_K 和 C_K , 所述 DNA 序列与小鼠 κ 基因座位同源, 其中 4.5 kb 的基因座位片段, 即覆盖 J_K 基因和 C_K 片段被缺失并用选择性标记 neo 取代该片段。

构建 κ 靶载体

质粒 pGEM7(KJ1) 含有新霉素抗性基因(neo), 在克隆载体 pGEM7Zf(+) 中小鼠磷酸甘油酸激酶(pgk)启动子(XbaI/TaqI 片段; Adra 等, (1987) 基因 60 : 65) 的转录控制下, 用于药物选择转染的 ES 细胞。该质粒还含有 neo 基因的异源聚腺苷酸化位点, 该位点衍生于小鼠 pgk 基因的 3' 区(PvuII/HindIII 片段; Boer 等, 生化遗传学, 28 : 299-308(1990))。将该质粒用作构建 κ 靶载体的起始材料。第一步是插入与 neo 表达盒 3' κ 基因座位同源的序列。

用 C_K 基因座位特异性:

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

和用 J_K5 基因片段特异性的寡核苷酸探针:

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

从肝 DNA 衍生的基因组噬菌体文库中分离小鼠 κ 链序列(图 20a)。

从阳性噬菌体克隆中分离延伸到小鼠 C_K 片段 3' 的 8 kb BglII/SacI 片段, 该片段分离在两个片段中, 一个是 1.2 kb BglII/SacI 片段, 一个是 6.8 kb SacI 片段, 然后将其亚克隆到 BglII/SacI 消化的 pGEM7(KJ1) 中以产生质粒 pNEO-K3' (图 20b)。

从阳性噬菌体克隆中也分离了延伸到 J_K 区 5' 的 1.2 kb EcoRI/SphI 片段。将 SphI/XbaI/ BglII/EcoRI 衔接子连接到该片段的 SphI 位点, 然后将所得 EcoRI 片段连接到 EcoRI 消化的 pNEO-K3' 中, 与 neo 基因和下游 3' κ 序列一样的 5' -3' 方向, 以产生 pNEO-K5' 3' (图 20c)。

然后按 Mansour 等,自然 336:348-352(1988)(该文献引入本文作为参考)所述,将单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因包含在构建体中以便富集带同源重组体的 ES 克隆。从质粒 pGEM7(TK)得到 HSV TK 盒,该盒含有由小鼠 pgk 启动子和上述用于 pGEM7(KJ1)的聚腺苷酸化序列夹在中间的 HSV TK 基因的结构序列。将 pGEM7(TK)的 EcoRI 位点修饰成 BamHI 位点,然后将 TK 盒切割为 BamHI/HindIII 片段并亚克隆到 pGP1b 中以产生 pGP1b-YK。在 XhoI 位点将该质粒线性化,然后将来自 pNEO-K5'3'的 XhoI 片段(该片段含有 neo 基因,该基因两侧翼为 J_κ的 5'和 C_κ的 3'基因组序列)插入到 pGP1b-TK 中以产生靶载体 J/C KI(图 20d)。与 J/C K1 同源重组后,基因组κ基因座的推测结构示于图 20e 中。

产生并分析含有靶失活的κ等位基因的 ES 细胞

所用的 ES 细胞是在基本上按 (Robertson, E.J. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell : A Practical Approach*. E.J. Robertson ,ed.(Oxford IRL Press),p.71-112) 所述的无有丝分裂活性的 SNL76/7 细胞饲养层(McMahon and Bradley, Cell 62:1073-1085(1990))上生长的 AB-1 系。其它适宜的 ES 细胞系包括但不限于 E14 细胞系(Hooper et al.,(1987) Nature 326:292-295)、D3 细胞系(Doetschman et al.,(1985) J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45)和 CCE 细胞系(Robertson et al.,(1986) Nature 323:445-448)。是否能够成功地产生带特异性靶突变的 ES 小鼠细胞系取决于 ES 细胞的多潜能(即在注射到宿主胚泡后,其参与胚胎形成并有助于所得动物生殖细胞的能力)。

任何给定 ES 细胞系的多潜能随培养时间和它所得到的管理而变化。多潜能的唯一确定性试验是确定用作靶的 ES 细胞的特异性种群是否可产生能够进行 ES 基因组种系转递的嵌合体。由于该原因,在基因导向前,将部分 AB-1 细胞的亲代种群注射到 C57B1/6J 胚泡中以确定所述细胞是否能够与广泛的 ES 细胞产生嵌合小鼠并是否大部分嵌合体可将 ES 基因组传递给子代。

用 NotI 消化κ链失活的载体 J/C K1, 然后按照所述方法(Hasty et al.,Nature 350:243-246(1991))电穿孔到 AB-1 细胞中。将电穿孔的细胞铺在 100 mm 平板上,密度为 $1-2 \times 10^6$ 细胞/平板。24 小时后,将 G418(200 μg/ml 活性组分)和 FIAU(0.5 μm)加到培养基中,使药物抗性克隆形成 10-11 天。将克隆检出、胰蛋白酶消化、分成两部分,再增殖。然后将

各克隆衍生出的一半细胞冷冻，另一半分析载体与靶序列之间的同源重组。

用 Southern 印迹杂交完成 DNA 分析。按所述(Laird et al., Nucl. Acids Res. 19:4293(1991))从克隆中分离 DNA，用 XbaI 消化并用图 20e 中报示的 800 bp EcoRI/XbaI 片段作为探针 A 检测。该探针检测野生型基因座位中的 3.7 kb XbaI 片段，和已与靶载体(图 20a 和 e)同源重组过的基因座位中的 1.8 kb 诊断带。用 Southern 印迹分析筛选的 901 个 G418 和 FIAU 抗性克隆中，7 个有 1.8 kb XbaI 带，该带是通常重组了一个 κ 基因的标志。再用 BglII、SacI 和 PstI 消化这 7 个克隆，以证实载体同源整合到一 κ 基因中。用诊断性 800 bp EcoRI/XbaI 片段(探针 A)检测时，野生型 DNA 的 BglII、SacI 和 PstI 消化产物分别产生 4.1、5.4 和 7 kb 片段，而 2.4、7.5 和 5.7 片段分别表示存在靶 κ 等位基因(参见图 20a 和 e)。用 XbaI 消化检测的所有 7 个阳性克隆有预期的 BglII、SacI 和 PstI 限制片段，表明在 κ 轻链进行了同源重组。另外，用 neo 特异性探针(探针 B，图 20e)对靶克隆的 NsiI 消化产物进行 Southern 印迹分析，只得到一个预测的 4.2 kb 片段，表明各克隆只含有一个拷贝的靶载体。

产生带失活 κ 链的小鼠

将前节中所述的 5 个靶 ES 克隆融解，然后注射到所述的 C57B1/6J 胚泡(Bradley, A. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell: A Practical Approach. E.J. Robertson, ed. (Oxford IRL Press), p.113-151) 中，然后转移到假孕雌性小鼠的子宫中以产生嵌合小鼠，所述嵌合小鼠产生于输入了 ES 细胞之细胞与宿主胚泡的混合物。ES 细胞对嵌合体的贡献程度可通过在黑色 C57B1/6J 背景下，衍生于 ES 细胞系的野灰色皮毛的量来肉眼评估。从注射靶克隆的胚泡产生的约一半的子代是嵌合的(即有野灰色和黑色)，其中大部分表明有大多数(70%或更多的)ES 细胞对皮毛着色起了作用。AB1 ES 细胞是 XY 细胞系，大部分嵌合体(高百分比)由于雄性 ES 细胞在雌性胚胎中集落化的性别转换而是雄性的。将衍生于 5 个靶克隆的 4 个雄性嵌合体与 C57B1/6J 雌性交配，监测子代是否存在显性野灰色皮毛，这种颜色是 ES 基因组种系传递的标志。从这些克隆中的 2 个嵌合体始终产生野灰色子代。由于在注射的 ES 克隆中，只靶向一个拷贝的 κ 基因座位，各野灰色子代有 50%的机会来遗传突变座位。用在鉴定靶 ES 克隆中所用的探针(探针 A，图 20e)，通过 Southern 印迹分析 BglII 消化来自尾活检的 DNA，来筛选靶基因。正如所预期的，约 50%的子代除 4.1 kb 的野生型带外，还有 2.4 kb 的杂文

BglIII 带，这证实了靶 κ 基因座位的种系传递。

为了产生突变纯合的小鼠，将杂合子一起交配，按上述确定子代的 κ 基因型。正如所预期的，从杂合子交配中产生了三种基因型：带2个拷贝正常 κ 座位的野生型小鼠，带一个靶拷贝 κ 基因和一个 NT κ 基因的杂合子，以及 κ 突变纯合的小鼠。通过将 Southern 印迹与 J κ 特异性探针(探针 C，图 20a)杂交，确定从后一种小鼠中缺失了 κ 序列。而观察到 J κ 探针与杂合子和野生型同胞 DNA 样品的杂交，在纯合子中没有杂交信号，证明产生了新的小鼠品系，在该品系中，通过靶突变的结果，通过缺失而已使2个拷贝的 κ 基因座位失活。

实施例 10

通过同源重组使小鼠重链基因失活

本实施例描述了通过在胚胎干(ES)细胞中进行同源重组，而使内源鼠免疫球蛋白重链失活。该方法是通过与含重链序列的载体进行同源重组而缺失内源重链 J 片段，所述重链序列来自已经缺失了的 J_H 区，并有选择性标记 neo 的基因取代。

构建重链靶载体

用下列 J_H4 特异性的寡核苷酸探针，从衍生于 D3 ES 细胞系(Gossler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9065-9069(1986))的基因组噬菌体文库中分离含 J_H 区的小鼠重链序列(图 21a):

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

从阳性噬菌体中克隆分离覆盖 J_H 区的 3.5 kb 基因组 SacI/StuI 片段，然后亚克隆到 SacI/SmaI 消化的 pUC18 中。将所得的质粒命名为 pUC18 J_H。用于转染 ES 细胞药物筛选的新霉素抗性基因(neo)衍生于修补过的质粒 pGEM7(KJ1)。文献中的报道(Yenofsky et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3435-3439)提供了数个常用于表达载体的 neo 编码序列的点突变的资料，所用的表达载体包括作为 pGEM7(KJ1)所用之 neo 基因源的构建体 pMC1neo(Thomas and Cappechi(1987) Cell 51:503-152)。所述突变降低了 neo 基因产物的活性，而且通过用来自野生型 neo 克隆的相应序列取代含突变的限制片段可进行修复。将制备的 pGEM7(KJ1)中的 HindIII 位点通过加入合成的衔接子转变成 SalI 位点，通过 XbaI/SalI 消化来切割 neo 表达盒。然后通过用 DNA polII 的 Klenow 形式

处理来补平 neo 片段末端，然后将 neo 片段亚克隆到 pUC18 J_H 的 NaeI 位点，产生质粒 pUC18 J_H-neo(图 21 b)。

用质粒 pGP1b 的衍生物再构建靶载体。用限制酶 NotI 消化 pGP1b，然后与作为衔接子的下列寡核苷酸相连：

```
5'- GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AAT
TCC AGC AAA GCT TTG GC -3'
```

用称为 pGMT 的所得质粒构建小鼠免疫球蛋白重链靶构建体。

然后按 Mansour et al., Nature 336:348-352(1988)所述，将单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因包含在构建体中以便富集带同源重组体的 ES 克隆。通过用 EcoRI 和 HindIII 消化，从质粒 pGEM7(TK)得到 HSV TK 基因。将 TK DNA 亚克隆在 pGMT 的 EcoRI 和 HindIII 位点之间，产生质粒 pGMT-TK。

为了得到与靶序列同源的更大的区域，通过 XhoI 对 DNA 的限制消化和，XbaI 的部分消化，从阳性基因组噬菌体克隆中得到位于 J_H 区 5' 的 5.9 kb 基因组 XbaI/ XhoI 片段。如图 21a 所述，该 XbaI 位点不在基因组 DNA 中，而是衍生于阳性噬菌体克隆中克隆的基因组重链插入片段侧翼的噬菌体序列。将该片段亚克隆到 XbaI/ XhoI 消化的质粒 pGMT-TK 中，以产生质粒 pGMT-TK-J_H5' (图 21d)。

构建的最后步骤是从 pUC18 J_H-neo 中切割 2.8 kb EcoRI 片段，该片段含有 neo 基因和 J_H 3' 侧翼的基因组序列。用 Klenow 聚合酶将该片段补平，然后亚克隆到 pGMT-TK-J_H5' 的相似补平的 XhoI 位点。所得的构建体，J_HKO1(图 21e)含有 J_H 基因座位侧翼的 6.9 kb 基因组序列，覆盖 J_H 区的 2.3 kb 缺失，在该区中插入了 neo 基因。图 21f 说明在与靶构建体同源重组后，内源重链基因的结构。

实施例 11

产生并分析靶 ES 细胞

在基本上按所述(Robertson, E.J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell : A Practical Approach. E.J. Robertson ,ed.(Oxford IRL Press),p.71-112) 的无有丝分裂活性的 SNL76/7 细胞饲养层上生长 AB-1 ES 细胞系(McMahon and Bradley, Cell 62:1073-1085(1990))。如

前实施例所述，在用靶构建体 J_HKO1 电穿孔 ES 细胞前，通过产生 AB-1 衍生的嵌合体来确定 ES 细胞的多潜能，AB-1 衍生的嵌合体的产生表明能够通过种系传递 ES 基因组。

用 NotI 消化重链失活的载体 J_HKO1，然后按所述方法(Hasty et al., Nature 350:243-246(1991))电穿孔到 AB-1 细胞中。将电穿孔的细胞铺在 100 mm 平板上，密度为 $1-2 \times 10^6$ 细胞/平板。24 小时后，将 G418(200 $\mu\text{g/ml}$ 活性组分)和 FIAU(0.5 μm)加到培养基中，使药物抗性克隆形成 8-10 天。将克隆检出、胰蛋白酶消化、分成两部分，再增殖。然后将各克隆衍生出的一半细胞冷冻，另一半分析载体与靶序列之间的同源重组。

用 Southern 印迹杂交完成 DNA 分析。按所述(Laird et al., Nucl. Acids Res. 19:4293(1991))从克隆中分离 DNA，用 StuI 消化并用图 21f 中的称为探针 A 的 500 bp EcoRI/StuI 片段检测。该探针检测野生型基因座位中的 4.7 kb StuI 片段，而 3 kb 带是内源序列与靶载体(图 21a 和 21f)同源重组过的诊断带。用 Southern 印迹杂交筛选的 525 个 G418 和 FIAU 双抗性克隆中，发现 12 个含有表示与靶载体重组过的 3 kb 带。这些克隆表示在 J_H 基因座位发生了预期的靶事件(如图 21f 所示)，再用 HindIII、SpeI 和 HpaI 消化来证实。探针 A(见图 21f)与 HindIII、SpeI 和 HpaI 消化的 DNA 的杂交分别产生了野生型基因座位的 2.3kb、大于 10kb 和大于 10kb 带(见图 21a)，而预期靶重链基因座位会分别产生 5.3kb、3.8kb 和 1.9kb 的带(见图 21f)。用 StuI 消化检测的所有 12 个阳性克隆显示出都有靶 J_H 基因的预期 HindIII、SpeI 和 HpaI 诊断带。另外，用 neo 特异性探针(探针 B，图 21f)经 Southern 印迹分析所有 12 个克隆的 StuI 消化产物只产生了一个预期的 3kb 片段，说明每个克隆只含有 1 个拷贝的靶载体。

产生带 JH 缺失的小鼠

将前节中所述的 3 个靶 ES 克隆融解，然后注射到所述的 C57B1/6J 胚胎(Bradley, A. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell: A Practical Approach. E.J. Robertson, ed. (Oxford IRL Press), p.113-151)中，然后转移到假孕雌性小鼠的子宫中。ES 细胞对嵌合体的贡献程度可通过在黑色 C57B1/6J 背景下，衍生于 ES 细胞系的野灰色皮毛的量来肉眼评估。从注射了两个靶克隆的胚胎产生的一半子代是嵌合的(即有野灰色和黑色)，第 3 个靶克隆没有产生任何嵌合动物。大部分嵌合体表

明有大量大约(50%或更多的)ES 细胞对皮毛颜色起了作用。由于 AB1 ES 细胞是 XY 细胞系,大部分嵌合体是雄性的,由于雄性 ES 细胞在雌性胚胎中的集落化而产生性别转换。将雄性嵌合体与 C57B1/6J 雌性小鼠交配,然后监测子代是否存在显性野灰色皮毛,这种颜色是 ES 基因组种系传递的标志。这两个克隆的嵌合体始终产生野灰色子代。由于在注射的 ES 克隆中,只靶向一个拷贝的重链座位,各野灰色子代有 50%的机会来遗传突变的座位。用在鉴定靶 ES 克隆中所用的探针(探针 A, 图 21f),通过 Southern 印迹分析 StuI 消化来自尾活检的 DNA,来筛选靶基因。正如所预期的,约 50%的野灰色子代除 4.7 kb 的野生型带外,还有大约 3kb 的杂文 StuI 带,这证实了靶 J_H座位的种系传递。

为了产生突变纯合的小鼠,将杂合子一起交配,按上述确定子代的重链基因型。正如所预期的,从杂合子交配中产生了三种基因型:带 2 个拷贝正常 J_H座位的野生型小鼠,带一个拷贝靶基因和一个正常基因的杂合子,以及 J_H突变纯合的小鼠。通过 StuI 消化的 DNA 的 Southern 印迹与 J_H特异性探针(探针 C, 图 21a)杂交,来确定后一种小鼠中是否缺失了 J_H序列。而观察到 J_H探针与杂合和野生型同胞的 DNA 样品中 4.7kb 片段杂交,在 J_H突变的纯合子中没有杂交信号,证明产生了新的小鼠品系,在该品系中,通过缺失 J_H序列而突变所有两个拷贝的重链基因。

实施例 12

重链小座位的转基因

A. 构建用于克隆大 DNA 序列的质粒载体

1. pGP1a

用 EcoRI 和 StyI 消化质粒 pBR322, 然后与下列寡核苷酸相连:

oligo-42 5'- caa gag ccc gcc taa tga gcg ggc ttt ttt ttg cat
act gcg gcc gct -3'

oligo-43 5'- aat tag cgg ccg cag tat gca aaa aaa agc ccg ctc
att agg cgg gct -3'

所得的质粒称为 pGP1a, 用于克隆很大的 DNA 构建体,可用稀少的限制酶 NotI 切割该构建体。该质粒在衍生于 trpA 基因(Christie 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180(1981))强转录终止信号下游含有一个 NotI 限制性位点(相当于氨苄青霉素抗性基因, AmpR)。该终止信号通过消除从 AmpR 基因的连读转录而降低了插入到 NotI 位点的编码序列的潜在毒性。另外,与 pUC 质粒相比,该质粒是低拷贝的,因为它含

有 pBR322 的拷贝数控制区。由于 DNA 复制低拷贝数还进一步降低了插入片段的潜在毒性并降低了对大插入片段的筛选。载体 pGP1b、pGP1c、pGP1d 和 pGP1f 衍生于 pGP1a，含有不同的多接头克隆位点。下面给出多接头序列：

pGP1a

NotI
GCGGCCGC

pGP1b

NotI XhoI ClaI BamHI HindIII NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC

pGP1c

NotI SmaI XhoI SalI HindIII BamHI SacII NotI
GCggccgcacatcccgggtctcgaggatcgacaagctttcgaggatccgcGGCCGC

pGP1d

NotI SalI HindIII ClaI BamHI XhoI NotI
GCggccgcgtgtcgacaagcttatcgatggatcctcgagtgcGGCCGC

pGP1f

NotI SalI HindIII EcoRI ClaI KpnI BamHI XhoI NotI
GCggccgcgtgtcgacaagcttcgaattcagatcgatgtggtacctggatcctcgagtgcGGCCGC

将所述各质粒用于构建可用 NotI 切割的大转基因插入片段，以便可在显微注射前，从载体序列中纯化出转基因 DNA。

2. pGP1b

用 NotI 消化 pGP1a，然后与下列寡核苷酸相连：

oligo-47 5'- ggc cgc aag ctt act gct gga tcc tta att aat cga
tag tga tct cga ggc -3'

oligo-48 5'- ggc cgc ctc gag atc act atc gat taa tta agg atc
cag cag taa gct tgc -3'

所得质粒 pGP1b 在 NotI 位点侧翼含有短多接头区。这有利于构建可用 NotI 消化的大插入片段。

3. pGPe

通过聚合酶链反应技术，用下列寡核苷酸从大鼠肝 DNA 中扩增免疫球蛋白重链 3' 增强子(S. Petterson ,et al., Nature 344:165-168(1990)):

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

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

用 BamHI 和 SphI 消化扩增的产物，然后克隆到 BamHI/SphI 消化的 pNN03(pNN03 是一个 pUC 衍生的质粒，该质粒含有多接头和下列限制位点，所述位点的顺序是：NotI、BamHI、NcoI、ClaI、EcoRV、XbaI、SacI、XhoI、SphI、PstI、BglII、EcoRI、SmaI、KpnI、HindIII 和 NotI)中。用 BamHI 和 HindIII 消化所得质粒 pRE3，将含大鼠 Ig 重链 3' 增强子的插入片段克隆到 BamHI/HindIII 消化的 pGP1b 中。所得的质粒 pGPe(图 22 和表 1)含有数个特有的限制位点，可向所述限制位点克隆序列，然后通过 NotI 消化所述序列与 3' 增强子一起切下。

B. 构建表达 IgM 的小座位转基因 pJGM1

1. J- μ 恒定区克隆的分离和 pJM1 的构建

用人重链 J 区特异性的下列寡核苷酸筛选克隆到噬菌体载体 λ EMBL/SP6/ T7(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中的人胎盘基因组 DNA 文库:

```
oligo-1    5'- gga ctg tgt ccc tgt gtg atg ctt ttg atg tct ggg
            gcc aag -3'
```

然后分离噬菌体克隆 λ 1.3。从该克隆中分离 6 kb HindIII/KpnI 片段, 该片段含有所有 6 个 J 片段以及 D 片段 DHQ52 和重链 J- μ 内含子序列。用下列人特异性 μ 寡核苷酸筛选相同的文库:

```
oligo-2    5'- cac caa gtt gac ctg cct ggt cac aga cct gac cac
            cta tga -3'
```

然后分离噬菌体克隆 λ 2.1。从该克隆中分离 10.5 kb HindIII/XhoI 片段, 该片段含有 μ 转换区和所有 μ 恒定区外显子。将这两个片段与 KpnI/XhoI 消化的 pNN03 相连以得到质粒 pJM1。

2. pJM2

从噬菌体克隆 λ 2.1 分离 4 kb XhoI 片段, 该片段含有 pJM1 下游的序列, 包括与表达某种 IgD 的 B 细胞中, μ 的 δ 相关缺失有关的所谓 $\Sigma\mu$ 元件(Yasui et al., Eur. J. Immunol. 19:1399(1989), 该文献引入本文作为参考)。用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段处理该片段, 然后与 XhoI 切割的、Klenow 处理的 pJM1 相连。由于 Klenow 酶的不完全消化, 所得的质粒 pJM2 (图 23) 丢失了内部的 XhoI 位点, 但保留了 3' XhoI 位点。pJM2 含有完整的人 J 区、重链 J- μ 内含子增强子、 μ 转换区和所有 μ 恒定区外显子以及两个与 δ 相关缺失有关的 4.0 kb 同向重复序列, $\sigma\mu$ 和 $\Sigma\mu$ 。

3. D 区克隆的分离和 pDH1 的构建

用下列人 D 区特异性寡核苷酸:

```
oligo-4    5'- tgg tat tac tat ggt tgc ggg agt tat tat aac cac
            agt gtc -3'
```

筛选人胚胎基因组文库的 D 区克隆。分离噬菌体克隆 λ 4.1 和 λ 4.3。从噬菌体克隆 λ 4.1 中分离 5.5 kb XhoI 片段, 该片段含有 D 元件 D_{K1} 、

D_{N1} · D_{M1} (Ichihara et al., EMBO J. 7:4141(1988))。从噬菌体克隆 λ 4.3 中分离相邻上游 5.2 kb XhoI 片段, 该片段含有 D 元件 D_{LR1} 、 D_{XP1} 和 $D_{XP'1}$ 和 D_{A1} 。将这些 D 区 XhoI 片段克隆到质粒载体 pSP72(Promega, Madison, WI)的 SalI 位点以便破坏连接这两个序列的 XhoI 位点。然后用 XhoI 和 SmaI 切割上游片段, 用 EcoRV 和 XhoI 切割下游片段。将所得的各分离的片段与 SalI 消化的 pSP72 连在一起以得到质粒 pDH1。pDH1 含有 10.6 kb 插入片段, 该片段含有至少 7 个 D 片段并可用 XhoI(15')和 EcoRV(3')切割。

4. pCOR1

用 Asp718(KpnI 的一种 isoschizomer)消化质粒 pJM2, 用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段补平悬垂端。用 ClaI 消化所得 DNA, 然后分离插入片段。将该插入片段与 pDH1 的 XhoI/EcoRV 插入片段和 XhoI/ ClaI 消化的 pGPe 相连以得到 pCOR1(图 24)。

5. pVH251

将含两个人重链可变区片段 V_H251 和 V_H105 (Humphries et al., Nature 331:446(1988), 该文献引入本文作为参考)的 10.3 kb 基因组 HindIII 片段亚克隆到 pSP72 中以得到质粒 pVH251。

6. pIGM1

用 XhoI 部分消化质粒 pCOR1, 然后将 pVH251 的分离的 XhoI/SalI 插入片段克隆到上游 XhoI 位点以得到质粒 pIGM1(图 25)。pIGM1 含有 2 个功能性人可变区、至少 8 个人 D 片段、所有 6 个人 J_H 片段、人 $J-\mu$ 增强子、人 $\sigma\mu$ 元件、人 μ 转换区、所有人 μ 编码外显子、和人 $\Sigma\mu$ 元件, 以及大鼠重链 3' 增强子, 以便可从载体中, 通过 XotI 消化将所有这些序列元件分离在一个片段上, 然后微注射到小鼠胚胎前核中以产生转基因动物。

C. 构建表达 IgM 和 IgG 的小座位转基因 pHC1

1. 分离 γ 恒定区克隆

用下列人 IgG 恒定区特异性的寡核苷酸筛选人基因组文库:

oligo-29 5'- cag cag gtg cac acc caa tgc cca tga gcc cag aca
ctg gac -3'

分离噬菌体克隆 λ 29.4 和 λ 29.5。用含 γ 转换区的噬菌体克隆 λ 29.4

的 4 kb HindIII 片段检测克隆到噬菌体载体 λ FIX™ II(Stratagene, La Jolla, CA) 中的人胚胎基因组 DNA 文库。分离噬菌体克隆 λ Sg1.13。为了确定不同 γ 克隆的亚型, 用这三个噬菌体克隆的亚克隆作为模板, 下列寡核苷酸作为引物, 完成双脱氧测序反应:

oligo-67 5'- tga gcc cag aca ctg gac -3'

确定噬菌体克隆 λ 29.5 和 λ Sg1.13 都是 γ 1 的亚型。

2. pye1

将含 γ 1 编码区的噬菌体克隆 λ 29.5 的 7.8 kb HindIII 片段克隆到 pUC18 中。用 XhoI 消化所得质粒 pLT1, 用 Klenow 处理, 然后再连接以破坏内部的 XhoI 位点。用 HindIII 消化所得的克隆 pLT1xk, 然后分离插入片段并克隆到 pSP72 中以产生质粒克隆 pLT1xks。在多接头的 XhoI 位点和人序列衍生的 BamHI 位点消化 pLT1xks 产生含 γ 1 恒定区编码外显子的 7.6 kb 片段。将该 7.6 kb XhoI/ BamHI 片段与来自噬菌体克隆 λ 29.5 的相邻下游 4.5 kb BamHI 片段一起克隆到 XhoI/ BamHI 消化的 pGPe 中以产生质粒克隆 pye1。pye1 含有所有 γ 1 恒定区编码外显子、以及与大鼠重链 3' 增强子相连的 5 kb 下游序列。

3. pye2

从噬菌体克隆 λ S γ 1.13 中分离含 γ 1 转换区和前转换无效转录物之第一外显子(P. Sideras et al., (1989) International Immunol. 1:631)的 5.3 kb HindIII 片段, 然后克隆到 pSP72 中以产生质粒克隆 λ S γ 1s, pSP72 含有与插入片段 5' 末端相邻的多接头 XhoI 位点。将 pS γ 1s 的 XhoI/SalI 插入片段克隆到 XhoI 消化的 pye1 中以产生质粒克隆 pye2(图 26)。pye2 含有 γ 1 恒定区的所有编码外显子和上游转换区、无效转录物外显子以及与大鼠重链 3' 增强子相连的 5 kb 上游序列。该克隆在插入片段的 5' 末端含有单一的 XhoI 位点。通过用 NotI 消化, 可从载体序列中切割出完整的插入片段以及 XhoI 位点和 3' 大鼠增强子。

4. pHC1

用 XhoI 消化质粒 pIGM1, 分离 43 kb 的插入片段, 并克隆到 XhoI 消化的 pge2 中以产生质粒 pHC1(图 25)。pHC1 含有 2 个功能性人可变区片段、至少 8 个人 D 片段、所有 6 个人 J_H 片段、人 J- μ 增强子、人 $\sigma\mu$ 元件、人 μ 转换区、所有人 μ 编码外显子、人 $\Sigma\mu$ 元件和人 γ 恒定区, 包括相关的转换区和无效转录物相关外显子以及大鼠重链 3' 增强子, 以便

通过 NotI 消化可从载体序列中所有这些序列元件均分离在一个片段上，然后微注射到小鼠胚胎前核中以产生转基因动物。

D. 构建表达 IgM 和 IgG 的小座位转基因 pHC2

1. 分离人重链 V 区基因 VH49.8

用下列人 VH1 家族特异性寡核苷酸筛选人胚胎基因组 DNA 文库
λFIXTM II (Stratagene, La Jolla, CA):

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

分离噬菌体克隆λ49.8，然后将含可变片段 VH49.8 的 6.1 kb XbaI 片段亚克隆到 pNN03 中(以便多接头 ClaI 位点在 VH49.8 的下游，多接头 XhoI 位点在上游)以产生质粒 p VH49.8。将该插入片段的 800 bp 区测序，发现 VH49.8 有一开放阅读框架和完整的剪接和重组信号，由此说明该基因是功能性的(表 2)。

表 2

人 V _H I 家族基因 V _H 49.8 的序列					
TTCCTCAGGC	AGGATTTAGG	GCTTGGTCTC	TCAGCATCCC	ACACTTGTAC	50
AGCTGATGTG	GCATCTGTGT	TTTCTTTCTC	ATCCTAGATC	AAGCTTTGAG	100
CTGTGAAATA	CCCTGCCTCA	TGAATATGCA	AATAATCTGA	GGTCTTCTGA	150
GATAAATATA	GATATATTGG	TGCCCTGAGA	GCATCACATA	ACAACCAGAT	200
TCCTCCTCTA	AAGAAGCCCC	TGGGAGCACA	GCTCATCACC	ATGGACTGGA	250
CCTGGAGGTT	CCTCTTTGTG	GTGGCAGCAG	CTACAGglaa	MetAspTrpT	300
hrTrpArgPh	lLeuPheVal	ValAlaAlaA	laThr	ggggcttcc	
agtctaagg	ctaggaagg	gacctgggt	tagnaaaga	ggartman	350
cacccctglg	tcctctccac	agGTGTCCAG	TCCCAGGTCC	AGCTGGTGCA	400
GTCTGGGGCT	GAGGTGAAGA	GlyValGln	SerGlnValG	lnLeuValGl	
nSerGlyAla	GluValLysL	AGCCTGGGTC	CTCGGTGAAG	GTCTCCTGCA	450
AGGCTTCTGG	AGGCACCTTC	ysProGlySe	rSerValLys	ValSeCysL	
ysAlaSerGl	yGlyThrPhe	AGCAGCTATG	CTATCAGCTG	GGTGCGACAG	500
GCCCCTGGAC	AAGGGCTTGA	SerSerTyrA	lalleSerTr	pValArgGln	
AlaProGlyG	lnGlyLeuGl	GTGGATGGGA	AGGATCATCC	CTATCCTGG	550
TATAGCAAC	TACGCACAGA	uTrpMetGly	ArglleP	rolleLeuGl	
ylleAlaAn	TyrAlaGlnL	AGTTCCAGGG	CAGAGTCACG	ATTACCGCGG	600
ACMAATCCAC	GAGC/CAGCC	ysPheGlnGl	yArgValThr	lleThrAlaA	
spLysSerTh	rSerThrAla	TACATGGAGC	TGAGCAGCCT	GAGATCTGAG	650
GACACGGCCG	TGTATTACTG	TyrMetGluL	euSerSerLe	uArgSerGlu	
AspThrAlaV	alTyrIyrCy	TGCGAGAGAC	ACAGTGTGAA	AAACCACATC	700
CTGAGAGTG	CAGAACCT	sAlaArg	GAGCTGTGC	CGGGCTGAGG	750
AGATGACAGG	GTTTATTAGG	GAGGGAGAAAG	TTTACAAAAT	GGGTTATATA	800
TTTGAGAAAA	AA				812

2. pV2

用 *Sma*I 和 *Hind*III 切割亚克隆到质粒 pUC12 中的、含人 V_HIV 家族基因 V_H4-21(Sanz et al., EMBO j. 8:3741(1989))的 4 kb *Xba*I 基因组片段, 然后用聚合酶 I 的 Klenow 片段处理。然后将该平整末端片段克隆到 *Cla*I 消化的 Klenow 处理的 pVH49.8 中。所得质粒 pV2 含有以相同方向与 V_H4-21 上游相连的人重链基因 V_H49.8, 在插入片段的 3' 有一 *Sal*I 位点, 在 5' 末端有一 *Xho*I 位点。

3. pSy1-5'

从噬菌体克隆 λ Sg1.13 中分离 0.7 kb *Xba*I/*Hind*III 片段(代表在含质粒 p γ e2 中片段的 5.3 kb γ 转换区上游并与之相邻的序列)和含上游 3.1 kb *Xba*I 片段的片段, 然后克隆到 *Hind*III/ *Xba*I 消化的 pUC18 载体中。所得质粒 pSy1-5' 含有代表无效转录物起始位点上游的 3.8 kb 插入序列, 所述无效转录物是在转换成 γ 1 同种型前的 B 细胞中发现的(P.sideras et al., International Immunol. 1:631(1989))。由于该转录物与同种型转换的启动有关, 而上游顺式作用序列对于转录调节通常很重要, 因此, 要将这些序列包含在转基因构建体中以有利于改正无效转录物的表达以及转换相关的重组。

4. pVGE1

用 *Sam*I 和 *Hind*III 切割 pSy1-5' 插入片段, 用 Klenow 酶处理, 并与下列寡核苷酸接头相连:

p139-序列

连接产物用 *Sal*I 消化然后与 *Sal*I 消化的 pV2 相连。所得质粒 pVP 含有 3.8 kb γ 1 转换 5' 侧翼序列, 该序列与两个人重链可变基因片段 V_H49.8 和 V_H4-21 的下游相连(见表 2)。通过用 *Sal*I 部分消化、然后用 *Xho*I 完全消化来分离 pVP 插入片段, 然后在琼脂糖凝胶上纯化 15 kb 片段。然后将插入片段克隆到 p γ e2 的 *Xho*I 位点以产生质粒克隆 pVGE1(图 27)。pVGE1 在人 γ 1 恒定基因和转换相关区上游含有两个人可变基因片段。可用位于可变和恒定区之间的单一 *Sal*I 位点来克隆 D、J 和 μ 基因片段。将大鼠重链 3' 增强子与 γ 1 基因的 3' 末端相连, *Not*I 位点在完整插入片段侧翼。

5. pHC2

用 *Sal*I 消化质粒克隆 pVGE1, 将 pIGM1 的 *Xho*I 插入片段克隆到

其中。所得克隆 pHC2(图 25)含有 4 个功能性人可变区片段、至少 8 个人 D 片段、所有 6 个人 J_H 片段、人 J- μ 增强子、人 $\sigma\mu$ 元件、人 μ 转换区、所有人 μ 编码外显子、人 $\Sigma\mu$ 元件和人 γ 恒定区, 包括相关的转换区和无效转录物相关外显子以及无效转录物起始位点上游的 4 kb 侧翼序列。将这些人序列与大鼠重链 3' 增强子相连以便通过 NotI 消化可从载体中所有这些序列均分离在一个片段上, 然后微注射到小鼠胚胎前核中以产生转基因动物。可用在插入片段 5' 末端的单一 XhoI 位点克隆其它的人可变基因片段以扩大该重链小座位的重组多样性。

E. 转基因小鼠

通过琼脂糖凝胶电泳从载体序列中分离质粒 pIGM1 和 pHC1 的 NotI 插入片段。将纯化的插入片段微注射到受精(C57BL/6 $\times$ CBA)F₂ 小鼠胚胎的前核中, 然后将活胚胎转移到 Hogan 等(in: *Methods of Manipulating the Mouse Embryo*, 1986, 冷泉港实验室, 纽约)所述的假孕雌性小鼠中。通过尾 DNA 的 Southern 印迹分析确定从注射胚胎发育的小鼠是否存在转基因序列。根据含已知数量克隆 DNA 的标准对照, 通过带强度估计转基因拷贝数。在 3-8 周龄, 从这些动物中分离血清, 然后按 Harlow and Lane(在抗体: 实验室手册, 1988, 冷泉港实验室(纽约)中)所述的 ELISA, 分析是否存在编码人 Ig M 和人 Ig G1 的转基因。用人 Ig M 特异性的(克隆 AF6, #0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME)和 Ig G1 特异性的(克隆 JL512, #0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME)小鼠单克隆抗体包被微滴定板孔。将系列稀释的血清样品加到各孔中, 存在特异性免疫球蛋白的条件下, 用分离的碱性磷酸酶结合的山羊抗人 Ig(多价的)的亲合力来检测, 所述性磷酸酶结合的山羊抗人 Ig 已被预吸附以使与小鼠免疫球蛋白的交叉反应最小。表 3 和图 28 表示用 ELISA 试验检测两种动物血清中是否存在人 Ig M 和 Ig G1 的结果, 所述动物是从用质粒 pHC1 的转基因插入片段注射的胚胎发育来的。通过该试验表明所有对照非转基因小鼠对人 Ig M 和 Ig G1 的表达结果均是阴性的。含 pIGM1 NotI 插入片段的两个品系的小鼠(品系#6 和 15)表达人 Ig M, 但不表达人 Ig G1。我们试验了 6 个品系的小鼠, 这些小鼠含有 pHC1 插入片段, 我们发现其中的 4 个品系(品系#26、38、57 和 122)表达人 Ig M 和人 Ig G1, 而另两个品系的小鼠(品系#19 和 21)不表达可检测水平的人免疫球蛋白。不表达人免疫球蛋白的 pHC1 转基因小鼠是所谓 G₀ 小鼠, 它们是直接从微注射的胚胎发育的, 而且可能存在转基因镶嵌。Southern 印迹分析表明这些小鼠中有许多每个细胞含有一个或数个拷贝的转基因。检测 pIGM1 转基因动物血清中的人 Ig M 和 pHC1 转基因中的人 Ig M

和 Ig G1，提供了在指导 VDJ 连接、转录和同种型转换中发挥正确功能的证据。Southern 印迹分析表明，其中一个动物(#18)是转基因阴性的这表明没有可检测水平的人 Ig M 和 Ig G1。如用 Southern 印迹分析确定的，第二种动物(#38)含有约 5 个拷贝的转基因，因此表明有可检测水平的人 Ig M 和 Ig G1。从转基因注射胚胎发育而来的 11 个动物的 ELISA 结果在下列表中作了总结(表 3)。

表 3

用 ELISA 检测转基因动物血清中的人 IgM 和 IgG1

动物 #	注射的转基因	转基因的大约 拷贝数/细胞	人 IgM	人 IgG1
6	pIGM1	1	++	-
7	pIGM1	0	-	-
9	pIGM1	0	-	-
10	pIGM1	0	-	-
12	pIGM1	0	-	-
15	pIGM1	10	++	-
18	pHC1	0	-	-
19	pHC1	1	-	-
21	pHC1	<1	-	-
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

表 3 表明了血清中存在整合转基因 DNA 和存在转基因编码的免疫球蛋白之间的关系。发现两个含 pHC1 转基因的动物不表达可检测水平的人免疫球蛋白。这些是很低拷贝的动物并可能不含有完整拷贝的转基因，或所述动物可能有遗传镶嵌(通过估测动物#21，每个细胞<1 拷贝而表明的)，而且含转基因的细胞可能还未在造血细胞谱系中形成种群。或者，可将转基因整合到无助于其表达的基因组位置。检测 pIGM1 转基因动物血清中的人 IgM 和 pHC1 转基因动物中的人 IgM 和 IgG，表明转基因序列在指导 VDJ 连接、转录和同种型转换中发挥了正确功能。

F. cDNA 克隆

为了评估 pHC1 转基因在 VDJ 连接和类型转换中的功能性以及在 B 细胞发育中转基因编码的人 B 细胞受体和等位排斥中的参与情况、检查了衍生于转基因小鼠脾 mRNA 的免疫球蛋白 cDNA 克隆的结构。检测转基因编码的重链的总多样性、集中于 D 和 J 片段的使用、N 区增加、CDR3 长度分布以及导致功能性 mRNA 分子的连接点的频率。检测编码掺入 VH105 和 VH251 的 IgM 和 IgG 的转录物。

从 11 周龄的雄性第二代谱系-57pHC1 转基因小鼠中分离聚腺苷酸化的 RNA。用该 RNA 合成 oligo-dT 引发的单链 cDNA。然后用所得的 cDNA 作为 4 个不同 PCR 扩增的模板, 所述 PCR 使用下列 4 种合成寡核苷酸为引物: VH251 特异性 oligo-149: cta gct cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg (g, a, t, c); VH105 特异性 o-150: gtt gct cga gtg aaa ggt gtc cag gtg gag gtg cag ctg (g, a, t, c); 人 γ 1 特异性 o-151: ggc gct cga gtt cca cga cac cgt cac cgg ttc 和人 μ 特异性 o-152: cct gct cga ggc agc caa cgg cca cgc tgc tcg。反应 1 使用引物 o-149 和 o-151 以扩增 VH251- γ 1 转录物, 反应 2 使用 o-149 和 o-152 可扩增 VH251- μ 转录物, 反应 3 使用 o-150 和 o-151 以扩增 VH105- γ 1 转录物, 反应 4 使用 o-150 和 o-152 以扩增 VH105- μ 转录物。从琼脂糖凝胶中分离所得的 0.5 kb PCR 产物; μ 转录物产物比 γ 转录物产物更丰富, 这与相应的 ELISA 数据一致(图 34)。用 XhoI 消化 PCR 产物, 然后克隆到质粒 pNN03 中。从 4 个 PCR 扩增的小量制品的 9 个克隆中分离双链质粒 DNA, 然后进行双脱氧测序反应。两个克隆产生出不含 D 或 J 片段的缺失产物。这些不可能衍生于正常 RNA 剪接产物, 可能是来源于 PCR 扩增过程中导入的缺失。一个 DNA 样品产生了两个不同克隆的混合物, 另 3 个克隆产生出不可读的 DNA 序列(可能是由于 DNA 样品不够干净)。在表 4 中列出了来自其它 30 个克隆的 VDJ 连接点的 DNA 序列。每个序列都是单一的, 这表明基因重排不是一个途径或表达转基因的 B 细胞的单个克隆是显性。不存在两个相似的序列这一事实还说明从一仅含 2 个 V 片段、10 个 D 片段和 6 个 J 片段紧密小座位中, 可表达出许多免疫球蛋白。在 VDJ 连接中使用了包含在转基因中的所有 2 个 V 片段、所有 6 个 J 片段和 10 个 D 片段中的 7 个。另外, 将两个恒定区基因(μ 和 γ)均插入转录物中。在所完成的反应中 VH105 引物不是 VH105 特异性的。因此从反应 3 和 4 中得到的许多克隆都含有 VH251 转录物。另外, 从连接的反应 3 PCR 产物分离的克隆编码 IgM 而不是 IgG; 然而这可能反映被来自反应 4 的

PCR 产物污染因为 DNA 分离在同一凝胶上。最近由 Yamada 等(J. Exp. Med. 173:395-407(1991), 该文献引入本文作为参考)报道了一个相似的试验, 其中从成人外周血淋巴细胞(PBL)扩增免疫球蛋白重链序列, 然后确定 VDJ 连接点的 DNA 序列。我们将来自人 PBL 的数据与来自 pHC1 转基因小鼠的数据进行了比较。

表 4

		V		n-D-n		J		C	
1	VH251	DH052	13	14	TACTGTGCGAGA	CGGCTAACCTGGGGTTGAT	GCCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
2	VH251	DNI	14	14	TACTGTGCGAGA	CACCGTATACACACAGCTGG	CTTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
3	VH251	DNI	16	14	TACTGTGCGAGA	T	ATATCTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
4	VH251	D7	16	14	TACTGTGCGAGA	CATPACGATATTTGACTGGTC	CTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
5	VH251	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	CGGAGGTACTATGATGTTCCGGGAGTTATTATAACGT	CTTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
6	VH251	D7	13	14	TACTGTGCGAGA	CGGGGGTGTCTGAT	GCCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
7	VH251	DH052	13	14	TACTGTGCGAGA	GCAACTGGC	GCCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
8	VH251	DH052	16	14	TACTGTGCGAGA	TCGGCTAACCTGGGGATC	CTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
9	VH251	--	11	14	TACTGTGCGAGA	CACGTAGCTAACTCT	TTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
10	VH251	D1R2	14	14	TACTGTGCGAGA	CAAATTAATCTATGTTCCGGGAGTTCC	CTTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
11	VH251	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	C	AATCTTCCAGACTGCGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
12	VH251	D7	11	14	TACTGTGCGAGA	CAAACCTGGGG	ACTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
13	VH251	DH052	16	14	TACTGTGCGAGA	CATTACTATGTTCCGGGAGTTATG	ACTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
14	VH251	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	CAGGGAG	1GGGGGCCAAGGGAACCCCTGTTTACAGTCTCTTCAG	CTTCCACCAAG	
15	VH251	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	TTCTGGGAG	ACTGGTTTCGACCCCTGCGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
16	VH105	DXP1	15	14	TACTGTGCGAGA	CGGAGGTACTATGTTTCCGGGAGTTATTATAACGT	CTTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
17	VH251	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	CAAACTGGGGAGGA	GACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
18	VH251	DH052	14	14	TACTGTGCGAGA	GGATATGTTGGTACGATA	ACTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
19	VH251	DK1	16	14	TACTGTGCGAGA	CAAACTGGGGAGG	ACTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
20	VH251	DH052	14	14	TACTGTGCGAGA	TATAGTGGCTACGATTAC	CTACTGTTGACTTCTGCGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
21	VH251	DK1	12	14	TACTGTGCGAGA	GCATCCCTCCCTCTCTTG	ACTACTACTACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
22	VH251	D1R2	16	14	TACTGTGCGAGA	CGGGGTGGGG	TTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
23	VH251	D1R2	14	14	TACTGTGCGAGA	CCGGTCCAAACT	TTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
24	VH105	D7	16	14	TACTGTGCGAGA	GATATTTGACTGGTTAACG	TGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
25	VH105	DXP1	14	14	TACTGTGCGAGA	CATGGTATAGCAGCAGCTGTGATC	TGCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
26	VH251	DNI	13	14	TACTGTGCGAGA	TCAACTGGGGTTG	ATGCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACATATGTCACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
27	VH105	DH052	13	14	TACTGTGCGAGA	GAATAGCAGCAGCTGTC	CTACTTTGACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
28	VH251	DNI	14	14	TACTGTGCGAGA	TGTATAGCAGCAGCTGTTAAAGGAACCGG	CTACTGCGGGCCAGGGAACCCCTGTTTACAGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
29	VH105	DNI	14	14	TACTGTGCGAGA	CAAACTGGGG	1GACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	
30	VH251	DH052	14	14	TACTGTGCGAGA		1GACTACTGATATGAGACCTGCTACCGTCTCTTCAG	GGATGTGATCC	

G. J 片段选择

表 5 比较了插入到 pHC1 转基因编码的转录物中的 J 片段与成人 PBL 免疫球蛋白转录物中 J 片段的分布情况。这两个分布图很相似，在这两个系统中，J4 片段最多，然后是 J6。J2 在人 PBL 和转基因小鼠中都是最少的片段。

J 片段	表 5 J 片段选择	
	使用百分比(±%)	
	HC1 转基因的	人 PBL
J1	7	1
J2	3	<1
J3	17	9
J4	44	53
J5	3	15
J6	<u>26</u>	<u>22</u>
	100%	100%

H. D 片段选择

Yamada 等分析的 49%(82 个中的 40 个)克隆插入了在 pHC1 转基因中包含的 D 片段。另 11 个克隆含有不是作者指定该任何已知 D 片段的序列。这 11 个未指定的克隆中，有 2 个克隆似乎衍生于 pHC1 构建体中的 DIR2 片段倒位。Yamada 等(J. Exp. Med. 173:395-407(1991))未考虑这种机制，这种机制是由 Ichihara 等(EMBO J. 7:4141(1988))预测的，由 Sanz(J. Immunol. 147:1720-1729(1991))观察到的。表 5 比较了 pHC1 转基因小鼠和 Yamada 等在人 PBL 转录物中观察到的 D 片段分布的情况。重编 Yamada 等的的数据以包含 DIR2 使用，并排除了在 pHC1 转基因中没有的 D 片段。表 6 说明在转基因小鼠和人 PBL 中，D 片段插入的分布情况非常相似。在转基因小鼠中还发现了高频率的两个显著人 D 片段，DXP'1 和 DN1。两种分布之间最不相似之处在于 DHQ52 在转基因小鼠中的频率比在人中的高。高频的 DHQ52 使人联想到在人胎儿肝中 D 片段的分布。Sanz 已观察到 14%的重链转录物含有 DHQ52 序列。如果从分析中除去未在 pHC1 中发现的 D 片段，Sanz 分析的胎儿肝转录物中，有 31%含有 DHQ52。这与我们在 pHC1 转基因小鼠中观察到的 27%非常相近。

表 6 D 片段选择
使用百分比($\pm 3\%$)

D 片段	HC1 转基因小鼠	人 PBL
DLR1	<1	<1
DXP1	3	6
DXP'1	25	19
DA1	<1	12
DK1	7	12
DN1	12	22
DIR2	7	4
DM2	<1	2
DLR2	3	4
DHQ52	26	2
?	<u>17</u>	<u>17</u>
	100%	100%

I. VDJ 连接点的功能性

表 7 说明来自 30 个克隆的 VDJ 区的预测氨基酸序列, 所述克隆是从 pHCI 转基因小鼠中分析的。翻译的序列表明就可变和 J 片段而言, 30 个 VDJ 中, 有 23 个(70%)在框架中。

表 7

V-D-J 连接点的功能性

					FR 3	CDR3	FR4
1	VH251	DHQ52	J3	γ	YCAR	RLTGVD AFDI	WGQGTMTVMSSASTK
2	VH251	DN1	J4	γ	YCAR	HRIAAAGFDY	WGQGTMTVTVSSASTK
3	VH251	D?	J6	γ	YCAR	YYYYYYGMDV	WGQGTMTVTVSSASTK
4	VH251	DXP'1	J6	γ	YCAR	HYDILTGPTTTTWTSGAKGPRSPSPQPPP	
5	VH251	DXP'1	J4	γ	YCAR	RRYYGSGSYYNVFDY	WGQGTMTVTVSSADTK
6	VH251	D?	J3	γ	YCAR	RGVSDAFDI	WGQGTMTVTVSSADTK
7	VH251	DHQ52	J3	μ	YCAR	ATGAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
8	VH251	DHQ52	J6	μ	YCAR	SANWGSYYYYGMDV	WGQGTMTVTVSSGSAS
9	VH251	—	J1	μ	YCAR	YFQH	WGQGTMTVTVSSGSAS
10	VH251	DLR2	J4	μ	YCAR	HVANSFDY	WGQGTMTVTVSSGSAS
11	VH251	DXP'1	J4	μ	YCAR	QITMVRGVFPDY	WGQGTMTVTVSSGSAS
12	VH251	D?	J1	μ	YCAR	QYFQH	WGQGTMTVTVSSGSAS
13	VH251	DHQ52	J6	μ	YCAR	QTGDYYYYYGMDV	WGQGTMTVTVSSGSAS
14	VH251	DXP'1	J6	μ	YCAR	HYYGSGSYDYYYYYGMDV	WGQGTMTVTVSSGSAS
15	VH251	DXP'1	J4	γ	YCAR	QGVGPGNPGHRLSLHQ	
16	VH105	DXP'1	J5	μ	YCVR	FWETGSTPGAREPWSPSPQGVH	
17	VH251	DXP'1	J4	γ	YCAR	RRYYGSGSYYNVFDY	WGQGTMTVTVSSGSTK
18	VH251	DHQ52	J4	γ	YCAR	QTWGGDY	WGQGTMTVTVSSGSTK
19	VH251	DK1	J6	γ	YCAR	GYSGYDNYYYGIHV	WGQGTMTVTVSSGSTK
20	VH251	DHQ52	J4	μ	YCAR	QTGEDYFDY	WGQGTMTVTVSSGSAS
21	VH251	DK1	J2	γ	YCAR	YSGYDYLLVLRSLGPWHPGHCLLSLHR	
22	VH251	DIR2	J6	γ	YCAR	ASLPSFDYYGMDV	WGQGTMTVTVSSGSTK
23	VH251	DIR2	J4	μ	YCAR	RGGGLTTGAREPWSPSPQGVH	
24	VH105	D?	J6	μ	YCVR	VETLLLLLRYGRLGPRDHGRLLRECI	
25	VH105	DXP1	J4	μ	YCVR	DILTGZRDY	WGQGTMTVTVSSGSAS
26	VH251	DM1	J3	μ	YCAR	HGIAAAGTAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
27	VH105	DHQ52	J3	μ	YCVR	STGVDAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
28	VH251	DN1	J4	μ	YCAE	IAAAALLZLLGPGNPGHRLRECI	
29	VH105	DN1	J4	μ	YCVR	IAAAGKNGY	WGQGTMTVTVSSGSAS
30	VH251	DHQ52	J4	μ	YCAR	QNWGDY	WGQGTMTVTVSSGSAS

J. CDR3 长度分布

表 8 比较了 pHC1 转基因小鼠和人 PBL 的来自框架 VDJ 连接点的转录物的 CDR3 肽的长度。此外，人 PBL 数据来自 Yamada 等。这些图与转基因小鼠的图很相似，只是与从人 PBL 观察到的相比，略微偏向向了较小的 CDR3 肽。CDR3 在转基因小鼠中的平均长度为 10.3 个氨基酸。这与 Sanz(J. Immunol. 147:1720-1729(1991))报道的真正人 CDR3 肽的平均大小基本相同。

表 8 CDR3 长度分布
发生率(±3%)

#CDR3 中的氨基酸	HC1 转基因小鼠	人 PBL
3-8	26	14
9-12	48	41
13-18	26	37
19-23	<1	7
>23	≤1	1
	100%	100%

实施例 13

重排的重链转基因

A. 分离重排的人重链 VDJ 片段

用λ1.3 的含人重链 J-μ 内含子增强子的 1 kb PacI/HindIII 片段筛选克隆到噬菌载体 λEMBL3/SP6/T7 (Clonetech Laboratories ,Inc.,Palo Alto, CA)中的 2 个人白细胞基因组 DNA 文库。检测阳性克隆与下列 V_H 特异性寡核苷酸的混合物的杂交情况：

oligo-7 5'-tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc
 ttc acc-3'

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

分离与 V 和 J-μ 探针均杂交的克隆并确定重排 VDJ 片段的 DNA 序列。

B. 构建重排的人重链转基因

将含功能性 VJ 片段(开放阅读框架和剪接信号)的片段亚克隆到质粒载体 pSP72 中以便质粒衍生的 XhoI 位点与插入序列的 5' 末端相邻。

用 XhoI 和 PacI (PacI, 一种稀少的切割酶, 识别靠近 J-m 内含子增强子的位点) 消化含功能性 VDJ 片段的亚克隆, 将插入片段克隆到 XhoI/PacI 消化的 pHC2 中以产生一转基因构建体, 该构建体含有功能性 VDJ 片段、J- μ 内含子增强子、 μ 转换元件、编码 μ 恒定区的外显子、 $\gamma 1$ 恒定区, 包含无效转录物相关的序列、 $\gamma 1$ 转换和编码外显子。用 NtoI 切割该转基因构建体, 然后微注射到小鼠胚胎前核中以产生上述转基因动物。

实施例 14

轻链转基因

A. 构建质粒载体

1. 质粒载体 pGP1c

用 NtoI 消化质粒载体 pGP1a, 然后连入下列寡核苷酸:

oligo-81 5'-ggc cgc atc ccg ggt ctc gag gtc gac aag ctt tcg
agg atc cgc-3'

oligo-82 5'-ggc cgc gga tcc tcg aaa gct tgt cga cct cga gac
ccg gga tgc-3'

所得质粒 pGP1c 含有带 XmaI、XhoI、SalI、HindIII 和 BamHI 限制位点的多接头, 多接头侧翼为 NotI 位点。

2. 质粒载体 pGP1d

用 NtoI 消化质粒载体 pGP1a, 然后连入下列寡核苷酸:

oligo-87 5'-ggc cgc tgt cga caa gct tat cga tgg atc ctc gag
tgc -3'

oligo-88 5'-ggc cgc act cga gga tcc atc gat aag ctt gtc gac
agc -3'

所得质粒 pGP1d 含有带 SalI、HindIII、ClaI、BamHI 和 XhoI 限制位点的多接头, 多接头侧翼为 NotI 位点。

B. 分离 J κ 和 C κ 克隆

用人 κ 轻链 J 区特异性的寡核苷酸筛选克隆到噬菌体载体 λ EMBL3/SP6/T7 (Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中的人胎盘基因组 DNA 文库:

oligo-36 5'- cac ctt cgg cca agg gac acg act gga gat taa acg
taa gca -3'

然后分离噬菌体克隆 136.2 和 136.5。从 136.2 中分离包含 J κ 1 片段的 7.4 kb XhoI 片段, 然后亚克隆到质粒 pNN03 中以产生质粒克隆 p36.2。从噬菌体克隆 136.5 中分离含 J κ 2-5 以及 C κ 基因片段的 13 kb XhoI 片段, 然后亚克隆到质粒 pNN03 中以产生质粒克隆 p36.5。这两个克隆覆盖了开始于 J κ 1 上游 7.2 kb、终止于 C κ 下游 9 kb 的区域。

C. 构建重排的轻链转基因

1. 用于表达重排的可变片段的 pCK1(一种 C κ 载体)

将含 C κ 基因的质粒克隆 p36.5 的 13 kb XhoI 插入片段, 和下游 9 kb 序列一起克隆到质粒载体 pGP1c 的 SalI 位点, 使插入片段的 5' 末端与质粒 XhoI 位点相邻。所得克隆 pCK1 可接受克隆的片段, 该片段在单一的 5' XhoI 位点含有重排的 VJ κ 片段。然后用 NotI 切割所述转基因, 然后用凝胶电泳从载体序列中纯化。所得的转基因构建体含有人 J- C κ 内含子增强子并可含有人 3' κ 增强子。

2. pCK2, 带重链增强子的用于表达重排的可变片段的 C κ 载体

将小鼠基因组 DNA 含小鼠重链 J- μ 内含子增强子的 0.9 kb XbaI 片段(J. Banerji et al., Cell 33:729-740(1983))亚克隆到 pUC18 中以产生质粒 pJH22.1。用 SphI 将该质粒线性化, 然后用 Klenow 酶补平末端。然后用 HindIII 消化 Klenow 处理的 DNA, 然后将噬菌体克隆 λ 1.3 的 1.4 kb MluI/HindIII 片段(前实施例)(含有人重链 J- μ 内含子增强子(Hayday et al. Nature 307:334-340(1984)))与其相连。所得的质粒 pMHE1 由共同连接到 pUC18 中的小鼠和人重链 J- μ 内含子增强子组成以便将其切割在一个 BamHI/HindIII 片段上。分离所述 2.3 kb 片段, 然后克隆到 pGP1c 中以产生 pMHE2。用 SalI 消化 pMHE2, 然后将 p36.5 的 13 kb 片段克隆在其中。所得质粒 pCK2 与 pCK1 相同, 不同之处在于小鼠和人重链 J- μ 内含子增强子与转基因插入片段的 3' 末端融合。为了调节最终转基因的表达, 用不同的增强子, 即小鼠或大鼠 3' κ 或重链增强子(Meyer and Neuberger, EMBO J. 8:1959-1964(1989); Petterson et al., Nature 344:165-168(1990))产生类似的构建体。

3. 分离重排的 κ 轻链可变片段

用含 p36.5 之 3.5 kb XhoI/SmaI 的人 κ 轻链 J 区筛选克隆到噬菌体载

体λEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中的两个人白细胞基因组 DNA 文库。检测阳性克隆与下列 V_κ 特异性寡核苷酸的杂交:

```
oligo-65  5'-agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act  
           ctc acc atc agc-3'
```

分离与 V 和 J 探针均杂交的克隆,然后确定重排的 VJ_κ 片段的 DNA 序列。

4. 产生含重排的人轻链构建体的转基因小鼠

将含功能 VJ 片段的片段(开放阅读框架和剪接信号)亚克隆到载体 pCK1 和 pCK2 的单一 XhoI 位点以产生重排的 κ 轻链转基因。通过用 NotI 消化从载体序列中分离转基因构建体。将琼脂糖凝胶纯化的插入片段微注射到小鼠胚胎前核中以产生转基因动物。将表达人 κ 链的动物与含重链小座位的转基因动物交配以产生表达所有人抗体的小鼠。

由于不是所有的 VJ_κ 组合均可与各种不同重链 VDJ 组合形成稳定的重-轻链复合物,所以产生数种不同的轻链转基因构建体,每个构建体使用不同重排的 VJ_κ 克隆,然后将得自这些构建体的转基因小鼠与表达重链小座位的转基因的小鼠交配。从双转基因(重链和轻链构建体)动物中分离外周血、脾和淋巴结淋巴细胞。用人和小鼠重链和轻链免疫球蛋白特异性的荧光抗体染色(Pharmingen, San Diego, CA),然后用 FACScan 分析仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)通过流式细胞计数分析,重排的轻链转基因构建体在最大数量的 B 细胞表面上产生最高水平的人重/轻链复合物,但对免疫细胞室没有不利影响(用 B 和 T 细胞亚组特异性抗体通过流式细胞计数检测的),就其产生人单克隆抗体的情况进行筛选。

D. 构建未重排的轻链小座位转基因

1. pJCK1, 用于构建小座位转基因的含 J_κ、C_κ 的载体

用 Klenow 酶处理含 p36.5 XhoI 插入片段的 13 kb C_κ, 然后克隆到 HindIII 消化、Klenow 处理的质粒 pGP1d 中。筛选质粒克隆以便使插入片段的 5' 末端与载体衍生的 ClaI 位点相邻。用 ClaI 消化所得质粒 p36.5-1d, 然后进行 Klenow 处理。然后用 Klenow 处理含 J_κ1 的 p36.2 的 7.4 kb XhoI 插入片段,然后克隆到 ClaI, Klenow 处理的 p36.5-1d 中。筛选其中 p36.2 插入片段与 p36.5 插入片段同方向的克隆。该克隆

pJCK1(图 34)含有完整的人 J κ 区和 C κ , 以及 7.2 kb 的上游序列和 9 kb 下游序列。该插入片段还含有人 J- C κ 内含子增强子并可含有人 3' κ 增强子。该插入片段侧翼为用于克隆其它 3' 侧翼序列(如重链或轻链增强子)的单一 3' SalI 位点。一个单一的 XhoI 位点位于该插入片段的 5' 末端以用于克隆未重排的 V κ 基因片段。单一的 SalI 和 XhoI 位点又在 NotI 位点侧翼, 所述 NotI 位点用于从载体序列中分离完整的转基因构建体。

2. 分离未重排的 V κ 基因片段并产生表达人 Ig 轻链蛋白质的转基因动物

用 V κ 特异性寡核苷酸 oligo-65(上述讨论的)检测克隆到噬菌体载体 λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中的人胎盘基因组 DNA 文库。测序来自所得克隆的可变基因片段, 筛选有功能的克隆。判断功能性的标准包括: 开放阅读框架、完整的剪接衔接子和供体序列以及完整的重组序列。将含有所选可变基因片段的 DNA 片段克隆到质粒 pJCK1 的单一 XhoI 位点以产生小座位构建体。用 NotI 消化所得的克隆, 分离插入片段, 然后注射到小鼠胚胎前核中以产生转基因动物。这些动物的转基因将在发育的 B 细胞中进行 V 到 J 连接。将表达人 κ 链的动物与含重链小座位的转基因动物交配以产生表达全长人抗体的小鼠。

实施例 15

基因组重链人 Ig 转基因

本实施例描述了人基因组重链免疫球蛋白转基因的克隆, 然后通过微注射到受精卵或整合在 ES 细胞中而将所述转基因导入鼠种系。

按 Marzluff, W. F. et al,(1985)(Transcription and Translation: A Practical Approach, B.D. Hammes and S. J. Higgins ,eds., pp.89-129, IRL Press ,Oxford)所述, 从新鲜人胚胎组织中分离核。将分离的核(或 PBS 洗涤的人精母细胞)植入 0.5%低熔点琼脂糖块中, 然后用 1 mg/ml 溶于 500 mM EDTA 中的蛋白酶 K 、 1% SDS 溶解核, 或用 1 mg/ml 溶于 500 mM EDTA 中的蛋白酶 K 、 1% SDS 、 10 mM DTT 在 50 °C 将精母细胞溶解 18 小时。通过在 50 °C, 将琼脂糖块保温在 40 μ g/ml PMSF 的 TE 中 30 分钟而使蛋白酶 K 失活然后用 TE 剧烈洗涤。然后按 M. Finney 在 Current Protocols in Molecular Biology(F. Ausubel et al., eds. John Wiley & Sons, Supp. 4, 1988, 如 2.5.1 节)所述用限制酶 NotI 消化在琼脂糖中的 DNA 。

然后按 Anand et al, Nuc. Acids Res.17:3425-3433(1989)所述通过脉冲场凝胶电泳分级分离 NotI 消化的 DNA。用 Southern 杂交检测富集 NotI 片段的馏分,以检测一个或多个由该片段编码的序列。所述序列包含重链 D 片段、J 片段和 $\gamma 1$ 恒定区以及所有 6 个 V_H 家族的代表(尽管 Berman et al., (1988),同上文从 Hela 细胞中将该片段鉴定为 670 kb,但我们从人胚胎和精子 DNA 中发现其为 830 kb)。将含该 NotI 片段的那些馏分连接到所述载体 pYACNN(McCormick et al., Technique 2:65-71(1990))的 NotI 克隆位点。通过用 EcoRI 消化 pYANneo,然后在存在寡核苷酸 5'-AAT TGC GGC CGC-3' 的条件下连接而制备质粒 pYACNN。

按 Traver 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5898-5902(1989))所述,分离含重链 NotI 片段的 YAC 克隆。按 M.Finney(出处同上)所述,通过脉冲场凝胶电泳从高分子量酵母 DNA 中分离克隆的 NotI 插入片段。通过加入 1 mM 精胺浓缩所述 DNA,然后按前述直接微注射到单细胞胚胎的核中。或者,通过脉冲场凝胶电泳分离 DNA,然后通过脂转染(gnirke et al. EMBO J. 10:1629-1634(1991))导入 ES 细胞,或将 YAC 通过原生质球融合导入 ES 细胞中。

实施例 16

不连续的基因组重链 Ig 转基因

基本按实施例 1 所述,通过 YAC 克隆分离人基因组 DNA 的 85 kb SpeI 片段,该片段含有 V_H6 、D 片段、J 片段、 μ 恒定区与部分 γ 恒定区。按所述分离携来自种系可变区片段(如上述 670-830 kb NotI 片段上游的 570 kb NotI 片段,该片段含有多拷贝的 V_1 - V_5)的 YAC。(Berman et al,(1988)同上文检测了两个 57 kb NotI 片段,每个片段均含有多拷贝 V 片段)。按实施例 1 所述将这两个片段共注射到小鼠单细胞胚胎的核中。

通常,两个不同 DNA 片段的共注射会导致这两个片段整合在染色体上的一个插入位点上。因此,约 50%含至少一个拷贝的两个片段之一的所得转基因动物将含有插入含恒定区之片段上游的 V 片段。在这些动物中,约 50%将会通过 DNA 倒位,约 50%通过缺失而进行 V 到 DJ 的连接,这取决于 570 kb NotI 片段相对于 85 kb SpeI 片段的方向。从所得转基因动物中分离 DNA,然后通过 Southern 印迹杂交发现含这两个转

基因的那些动物(具体地说, 含多个人 V 片段和人恒定区的那些动物), 再按标准技术检测这些动物表达人免疫球蛋白分子的能力。

实施例 17

鉴定转基因 B 细胞中功能性重排的可变区序列

用所需抗原免疫接种(参见 Harlow and Lane ,抗体: 实验室手册, 冷泉港, 纽约(1988))有下列遗传特征的小鼠: 在缺失 J_H 的内源重链座位(实施例 10)是纯合的; 单拷贝未重排的人重链小座位转基因是半合子的(实施例 5 和 14); 单拷贝重排的人κ 轻链转基因是半合子的(实施例 6 和 14)。

免疫接种后, 取出脾, 用脾细胞产生杂交瘤。用来自各个杂交瘤克隆的细胞制备基因组 DNA , 所述克隆分泌与所需抗原反应的抗体。用一些不同限制酶消化基因组 DNA 样品, 所述限制酶识别特有的 6 个碱基对序列, 然后在琼脂糖凝胶上分级分离。用 Southern 印迹杂交鉴定 2-10 kb 范围的两个 DNA 片段, 其中一个含有单拷贝重排的人重链 VDJ 序列, 另一个含有单拷贝重排的人轻链 VJ 序列。在琼脂糖凝胶上对这两个片段进行大小分级分离, 然后直接克隆到 pUC18 中。然后将克隆的插入片段分别亚克隆到含恒定区序列的重和轻链表达盒中。

用质粒克隆 p γ el(实施例 12)作为重链表达盒, 将重排的 VDJ 序列克隆到 XhoI 位点。用质粒克隆 pCK1 作为轻链表达盒将重排的 VJ 序列克隆到 XhoI 位点。用所得克隆一起转染 SP₀ 细胞以产生与所需抗原反应的抗体(Co. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869(1991), 该文献引入本文作为参考)。

或者, 从上述克隆的杂交瘤细胞中分离 mRNA , 然后用于合成 cDNA 。通过 PCR 扩增并克隆表达的人重和轻链 VDJ 和 VJ 序列(Larrick et al., Biol. Technology ,7:934-938(1989))。确定这些克隆的核苷酸序列后, 合成编码相同多肽的寡核苷酸, 按 Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci, USA84:5454-5458(1989)所述产生合成的表达载体。

用复合抗原免疫接种转基因动物

下列试验说明用复合抗原(如在人红细胞上的那些)可成功地免疫转基因动物, 并具有与正常动物中所观察到的反应动力学相似的反应动力学。

通常血细胞是适宜的免疫原,并在红和白细胞表面含有许多不同类型的抗原。

用人血免疫

收集来自单个供体的人血试管,然后用于免疫转基因动物,所述转基因动物含有功能性破坏的内源重链座位(J_HD)并含有人重链小基因构建体(HC1);将这些小鼠命名为品系 112。洗涤血并重悬在 50 ml Hanks 中并稀释到 1×10^8 个细胞/ml,用 28 号针头和 1cc 针管,将 0.2 ml(2×10^7 个细胞)进行腹膜内注射。每周用该免疫接种方法免疫,连续 6 周。从经过眼眶后取血,然后收集血清,随后检测特异性抗体来监测血清滴度。也在免疫前取血作为对照。在最后一次免疫后,在将这些动物杀死制备血清和杂交瘤前 3 天,通过尾静脉内进行一次 1×10^7 个细胞的免疫以提高杂交瘤的生产。

表 9

动物

	动物编号	品系	性别	HC1-112	JHD
1	2343	112	M	+	++
2	2344	112	M	-	+
3	2345	112	F	-	+
4	2346	112	F	-	++
5	2347	112	F	-	++
6	2348	112	F	+	++
7	2349	112	F	-	+

小鼠#2343 和 2348 具有所需的表型:在重链失效背景下,含有人重链小基因转基因。

杂交瘤的生产

通过将小鼠脾细胞与融合配对体融合来制备杂交瘤,所述小鼠脾细胞来自已按前述(上文)免疫的约 16 周龄转基因小鼠(表 9),所述融合配对体由不分泌 HAT 敏感性骨髓瘤细胞系 X63 Ag8.653 组成。培养杂交瘤克隆,然后鉴定含免疫球蛋白的杂交瘤上清液,所述免疫球蛋白具有血细胞抗原特异性结合亲和力。

流式细胞计数

用流式细胞计数检测血清和杂交瘤上清液。用 4 X Hanks' 平衡的盐

溶液洗涤来自供体的红细胞，然后将 50000 个细胞放在 1.1 ml 聚丙烯微试管中。在染色培养基(1x RPMI 1640 培养基，不含酚红或生物素(Irvine Scientific)3%新生牛血清，0.1%叠氮化钠)中，将细胞与抗血清或来自杂交瘤的上清液在冰上一起保温 30 分钟。对照由具有其它基因型的同窝小鼠组成。通过在 4 °C 用 Sorvall RT600B 以 1000 rpm 离心 5-10 分钟来洗涤细胞。将细胞洗涤两次，然后用荧光显色试剂检测细胞表面上的抗体。使用两种单克隆试剂进行检测。一种是 FITC-标记的小鼠抗人 μ 重链抗体(Pharmagen ,San Diego ,CA)，另一种是 PE-标记的大鼠抗小鼠 κ 轻链(Becton-Dickenson ,San Jose ,CA)。这两种试剂得到了相似的结果。全血(红细胞和白细胞)和白细胞只用作靶细胞。这两组都有阳性结果。

将转基因小鼠和同窝对照的血清与来自供体的红细胞或来自另一个体的白细胞一起保温，洗涤然后用抗人 IgM FITC 标记的抗体显色并用流式细胞计数分析。结果表明来自人小基因座位转基因之小鼠(小鼠 2343 和 2348)的血清有人 IgM 反应性，而所有同窝动物(2344、2345、2346、2347)均没有。将正常小鼠血清(NS)和磷酸盐缓冲液(PBS)用作阴性对照。红细胞不受闸门控制而白细胞受控制以便只包括淋巴细胞。在 x 和 y 轴上画出品系以提供参考。用来自融合 2348 的 100 份上清液完成流式细胞计数。4 个上清液与血细胞抗原阳性反应。

实施例 18

用反义 RNA 降低内源小鼠免疫球蛋白表达

A.用于表达反义 Ig 序列的载体

1. 构建克隆载体 pGP1h

用 XhoI 和 BamHI 消化载体 pGP1b(前述实施例中提到的)，然后与下列寡核苷酸相连：

5'- gat cct cga gac cag gta cca gat ctt gtg aat tcg -3'

5'- tcg acg aat tca caa gat ctg gta cct ggt ctc gag -3'

以产生质粒 pGP1h 。该质粒含有包含下列限制位点的多接头：NotI,EcoRI ,BglII, Asp718, XhoI, BamHI, HindIII, NotI 。

构建 pBCE1

将 pVH251(前述实施例中提到的)的 0.8 kb XbaI/BglII 片段插入 XbaI/BglII 消化的载体 pNN03 中以产生质粒 pVH251，该片段含有启动子前导序列外显子、第一内含子、和人 VH-V 家族免疫球蛋白可变基因片段的部分第二外显子。

将含人生长激素基因(hGH; Seeburg ,(1982) DNA 1:239-249)的编码外显子的 2.2 kb BamHI/EcoRI DNA 片段克隆到 BglII/EcoRI 消化的 pGP1h 中。用 BamHI 消化所得质粒, 将 pVH251N 的 BamHI/BglII 片段以与 hGH 基因相同的方向插入以产生质粒 pVhgh。

将含小鼠重链 J- μ 内含子增强子(Banerji et al., (1983) Cell 33:729-740)的小鼠基因组 DNA 的 0.9 kb XbaI 片段亚克隆到 pUC18 中以产生质粒 pJH22.1。用 SphI 将该质粒线性化, 然后用 Klenow 酶补平末端。用 HindIII 消化 Klenow 处理的 DNA, 然后将含人重链 J- μ 内含子增强子(Hayday et al., (1984) Nature 307:334-340)的噬菌体克隆 λ 1.3(前述实施例)的 1.4 kb MluI(Klenow)/ HindIII 片段克隆到其中。所得质粒 pMHE1 由一起连接到 pUC18 中的小鼠和人重链 J- μ 内含子增强子组成以便可将其切割在一个 BamHI/HindIII 片段上。

将 pMHE1 的 BamHI/HindIII 片段克隆到 BamHI/HindIII 切割的 pVhgh 中以产生 B 细胞表达载体 pBCE1。在图 36 中描述的该载体含有单一的 XhoI 和 Asp718 克隆位点, 以便将反义 DNA 片段克隆到其中。由上游重链启动子-增强子与下游 hGH 基因序列组合驱动这些反义序列的表达, 下游基因序列除提供促进转基因构建体表达的内含子序列外, 还提供聚腺苷酸化序列。可通过用 NotI 消化从载体序列中分离从 pBCE1 产生的反义转基因构建体。

B. IgM 反义转基因构建体。

用下列两个寡核苷酸作为引物:

```
5'- cgc ggt acc gag agt cag tcc ttc cca aat gtc -3'  
5'- cgc ctc gag aca gct gga atg ggc aca tgc aga -3'
```

通过用小鼠脾 cDNA 作为底物的聚合酶链反应(PCR)扩增小鼠 IgM 恒定区序列。用 Asp718 和 XhoI 消化所得的 0.3 kb PCR 产物, 然后将其克隆到 Asp718/XhoI 消化的 pBCE1 中以产生反义转基因构建体 pMAS1。纯化的 pMAS1 的 NotI 插入片段单独微注射到半天的小鼠胚胎前核中或与一种或多种其它转基因构建体一起微注射到所述前核中以产生转基因小鼠。该构建体在 B 细胞中表达 RNA 转录物, 所述转录物与小鼠 IgM mRNA 杂交, 由此下调小鼠 IgM 蛋白质的表达。含 pMAS1 和人重链转基因小座位如 pHCl(通过共注射这两种构建体或繁殖单转

基因小鼠产生的)的双转基因小鼠将在 B 细胞上表达人转基因编码的 Ig 受体, 其中所述 B 细胞的百分比高于只含人重链小座位的转基因小鼠的。表达人与小鼠 Ig 受体的细胞比率部分取决于两个种群对促进 B 细胞分化和增殖的各种因素和细胞的竞争。由于 Ig 受体在 B 细胞发育中起着关键的作用, 因此表达小鼠 Ig 受体的 B 细胞将无法与表达人受体的细胞竞争, 所述表达小鼠 Ig 受体的 B 细胞在 B 细胞发育过程中在其表面上表达降低水平的 IgM(由于小鼠 Ig 特异性反义下调)。

C. Ig κ 反义转基因构建体。

用下列两个寡核苷酸作为引物:

5'- cgc ggt acc gct gat gct gca cca act gta tcc -3'

5'- cgc ctc gag cta aca ctc att cct gtt gaa gct -3'

通过用小鼠脾 cDNA 作为底物的聚合酶链反应(PCR)扩增小鼠 Ig κ 恒定区序列。用 Asp718 和 XhoI 消化所得的 0.3 kb PCR 产物, 然后将其克隆到 Asp718/XhoI 消化的 pBCE1 中以产生反义转基因构建体 pKAS1。纯化的 pKAS1 的 NotI 插入片段单独微注射到半天的小鼠胚胎前核中或与一种或多种其它转基因构建体一起微注射到所述前核中以产生转基因小鼠。该构建体在 B 细胞中表达 RNA 转录物, 所述转录物与小鼠 Ig κ mRNA 杂交, 由此按与 pMAS1 所述下调小鼠 Ig κ 蛋白质的表达。

实施例 19

本实施例说明在本发明转基因小鼠中的成功的免疫和免疫反应。

小鼠的免疫

按以前公开的方法(Practical Immunology ,L. Hudson and F.C. Hay, Blackwell Scientific (Pubs.),p.0,1980), 将每分子结合有 400 以上二硝基苯基的匙孔蛾血蓝蛋白(Calbiochem,La Jolla,California)(KLH-DNP)进行铝沉淀。将在 100 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)中的 400 μ g 铝沉淀的 KLH-DNP 和 100 μ g 二甲基二十八烷基溴化铝腹膜内注射给各小鼠。6 天后通过眼眶后窦取血, 收集血清样品。

分析血清中的人抗体反应性

用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)评估抗体反应性和特异性。试验数种靶抗原以分析由免疫原诱导的抗体。用匙孔蛾血蓝蛋白

(Calbiochem)鉴定抗蛋白质组分的反应性、牛血清白蛋白-DNP 对半抗原和/或修饰的氨基的反应性以及 KLH-DNP 抗全免疫原的反应性。与抗原结合的人抗体通过与小鼠免疫球蛋白没有交叉反应性的 IgM 和 IgG 亚型特异性酶结合物来检测。简单地说,用抗原包被 PVC 微滴定板,然后 37 °C 与 5 ug/ml 蛋白质 PBS 溶液干燥过夜。在室温,将用 PBS、5%鸡血清、0.5%吐温 20 稀释的血清样品加到孔中保温 1 小时然后加入相同稀释度的抗人 IgG Fc 和 IgG F(ab')-辣根过氧化物酶或抗人 IgM Fc-辣根过氧化物酶。室温下 1 小时后,通过加入 ABTS 底物(Sigma, St. Louis, Missouri)来评估酶活性,然后 30 分钟后在 415-490 nm 读出数据。

在转基因小鼠中参与免疫反应的人重链

图 37A-37D 说明了 3 只同窝小鼠对用 KLH-DNP 免疫的反应。1296 号小鼠携带人 IgM 和 IgG 未重排的转基因并是小鼠 Ig 重链失效纯合的。1299 号小鼠携带未失效背景下的转基因,而小鼠 1301 不遗传这些基因中的任何一组。另一同窝 1297 小鼠携带人转基因并且是小鼠重链失效半合子的。包括了未免疫对照。

结果说明人 IgG 和 IgM 反应是针对与蛋白质结合的半抗原形成的。人 IgM 还对 KLH 分子有反应,但人 IgG 在此时的水平不显著。在来自相同小鼠的预免疫血清样品中,人抗体对相同靶抗原的滴度不显著。

实施例 20

本实施例说明用人抗原成功地进行了免疫并在本发明转基因小鼠中的免疫反应,还提供了数据以说明在人转基因可变区序列中发生了非随机突变。

说明抗人糖蛋白抗原的人免疫球蛋白重链的抗体反应

用于试验的转基因小鼠是功能性破坏鼠免疫球蛋白重链座位纯合的,通过在连接(J)区(同上文)导入转基因而使得不存在功能性内源(鼠)重链产生而得到了所述小鼠。转基因小鼠还含有至少一个完整的未重排的人重链小座位转基因(HC1, 同上文),包含一个功能 V_H 基因(V_H251)、人 μ 恒定区基因和人 γ 1 恒定区基因。对表达人免疫球蛋白转基因产物(同上文)的转基因小鼠进行筛选,用人抗原进行免疫以说明转基因小鼠产生抗人抗原免疫接种的免疫反应的能力。用人抗原注射 3 只 HC1-26 品系小鼠和 3 只 HC ! -57 品系小鼠(同上文)。

在 0 天,将在铝中不溶的 100 ug 纯化人癌胚抗原(CEA)与完全弗氏佐剂一起注射,然后在 7、14、21 和 28 天每周再注射在不完全弗氏佐剂中的铝沉淀的 CEA。在注射 CEA 前每天通过眼眶后取血收集血清样品。合并来自各组各 3 只小鼠的等体积血清用于分析。

通过 ELISA 检测确定与固定在微滴定孔中的人 CEA 结合的含人 μ 链免疫球蛋白和含人 γ 链免疫球蛋白的滴度。在图 38 和 39 中分别列出了含人 μ 链免疫球蛋白和含人 γ 链免疫球蛋白的 ELISA 结果。两个品系在 7 天末均检测到显著的人 μ 链 Ig 滴度并观察到直到 21 天仍在产生。对于人 γ 链 Ig,显著的滴度延迟,品系 HC1-57 首先在 14 天, HC1-26 品系在 21 天。在试验过程中,人 γ 链 Ig 滴度随时间提高。观察到的人 μ 链 Ig 反应,然后是一平台,以及随后继续产生的 γ 链反应是与亲和力成熟一起观察到图谱的特征。分析 21 天的样品表明没有与不相关抗原匙孔蛾血蓝蛋白(KLC)的反应,这表明抗体反应以特异性的方式针对 CEA。

这些数据表明人未重排免疫球蛋白基因座位的转基因动物:(1)可对人抗原(如人糖蛋白, CEA)产生反应,(2)可通过观察到的 μ 到 γ 类型转换而进行同种型转换(类型转换),以及(3)在其体液免疫反应中表现出亲和力成熟的特征。总之,这些数据表明:(1)人 Ig 转基因小鼠具有诱导异源抗体生产的能力以应答确定的抗原,(2)单个转基因重链可变区应答特定抗原的能力,(3)在初级和二级反应形成中的反应动力学在一段时期内是典型的,(4)从 IgM 到 IgG 的转基因类型转换,所述转基因编码体液免疫反应,和(5)转基因动物生产抗人抗原的人序列抗体的能力。

说明在人重链转基因小座位中的体细胞突变

将品系 HC1-57 转基因小鼠(含多拷贝的 HC1 转基因)与免疫球蛋白重链缺失小鼠进行交配以获得含 HC1 转基因并在内源小鼠重链的两个等位基因上(同上文)均发生破坏的小鼠。这些小鼠表达人 μ 和 $\gamma 1$ 重链以及小鼠 κ 和 λ 轻链(同上文)。通过在 1.5 个月的时间内,腹膜内重复注射,而使这些小鼠中的一只对人癌胚抗原超免疫。将该小鼠杀死,然后从脾、腹股沟和肠系膜淋巴结以及淋巴集结中分离淋巴细胞。合并细胞,然后分离总 RNA。从 RNA 合成第一条 cDNA 链,然后用其作为 PCR 扩增的模板,PCR 使用下列 2 个寡核苷酸引物:

149 5'-cta gct cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg
(g/a/t/c)-3'

151 5'-ggc gct cga gtt cca cga cac cgt cac cgg ttc-3'

这些引物特异性地扩增 VH251/γ1 cDNA 序列。用 XhoI 消化扩增的序列，然后克隆到载体 pNN03 中。图 40 中列出了来自 23 个随机克隆之插入片段的 DNA 序列；标明了来自种系序列的序列变异体，点表示与种系序列相同的序列。将 cDNA 序列与 VH251 转基因的种系序列进行比较，表明其中 3 个克隆完全未被突变，而其它 20 个克隆含有体细胞突变。3 个未突变序列之一衍生于框架外的 VDJ 连接。在特定位置观察到的体细胞突变的频率和分布方式与在人淋巴细胞中观察到的相似 (Cai et al., (1992) J. Exp. Med. 176:1073，该文献引入本文作为参考)。体细胞突变的总频率为约 1%；但是，在 CDR1 内，频率上升到约 5%，这表明对氨基酸改变的选择，它会影响抗原结合。这表明了抗原驱动的人重链序列的亲合力成熟。

实施例 21

本实施例描述了通过共导入两个不同的多核苷酸，而成功地形成转基因，所述两个不同的多核苷酸可重组形成完整的人轻链小座位转基因。

通过共注射两个重叠的 DNA 片段而产生未重排的轻链小座位转基因

1. 分离未重排的功能性 vk 基因片段 vk65.3、vk65.5、vk65.8 和 65.15

用 V_K 特异性寡核苷酸 oligo-65(5'-agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc-3') 检测克隆到噬菌体载体 λEMBL/SP6/T7(Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中的人胎盘基因组 DNA 文库。将含有来自阳性噬菌体克隆的 V_K 片段的 DNA 片段亚克隆到质粒载体中。测序来自所得克隆的可变基因的片段，筛选有功能的克隆。判断功能性的标准包括：开放阅读框架、完整的剪接受体和供体序列以及完整的重组序列。在图 41-44 中列出了用该方法从 4 个不同质粒克隆中分离的 4 个功能性 V_K 基因片段(vk65.3、vk65.5、vk65.8 和 65.15)的 PNA 序列。下面描述 4 个质粒克隆 p65.3f、p65.5g1、p65.8 和 p65.15f。

(1a) p65.3f

将噬菌体克隆 λ 65.3 的 3 kb XbaI 片段亚克隆到 pUC19 中以便载体衍生的 SalI 位点靠近插入片段的 3' 末端和载体衍生的 BamHI 位点 5'。将该克隆的 3 kb BamHI/SalI 插入片段亚克隆到 pGP1f 中以产生 p65.3f。

(1b) p65.5g1

将噬菌体克隆 λ 65.5 的 6.8 kb EcoRI 片段亚克隆到 pGP1f 中以便载体衍生的 XhoI 位点靠近插入片段的 5' 末端和载体衍生的 SalI 位点 3'。所得质粒命名为 p65.5g1。

(1c) p65.8

将噬菌体克隆 λ 65.8 的 6.5 kb HindIII 片段亚克隆到 pSP72 中以产生 p65.8。

(1d) p65.15f

将噬菌体克隆 λ 65.16 的 10 kb EcoRI 片段亚克隆到 pUC18 中以产生质粒 p65.15.3。将质粒插入片段内的 V_K 基因片段定位到 4.6 kb EcoRI/HindIII 亚片段上，然后将其克隆到 pGP1f 中。所得克隆 p65.15f 含有分别位于插入片段 5' 和 3' 末端的单一 XhoI 和 SalI 位点。

2. pKV4

将 p65.8 的 XhoI/SalI 插入片段克隆到 p65.15f 中的 XhoI 位点以得到质粒 pKV2。将 p65.5g1 的 XhoI/SalI 插入片段克隆到 pKV2 中的 XhoI 位点以得到质粒 pKV3。将 pKV3 的 XhoI/SalI 插入片段克隆到 p65.3f 中的 XhoI 位点以得到质粒 pKV4。该质粒含有一个 21 kb XhoI/SalI 插入片段，该片段含有 4 个功能性 V_K 基因片段。还可用 NotI 切割完整的插入片段。

3. pKC1B

(3a) pKcor

将衍生于人基因组 DNA 噬菌体 λ 克隆的两个 XhoI 片段亚克隆到质粒载体中。首先用 Klenow 酶处理含 13 kb J_K2 - J_K5/C_K 的片段，然后克隆到 HindIII 消化的 Klenow 处理的质粒 pGP1d 中。筛选一个质粒克隆 (pK-31) 以便插入片段的 5' 末端与载体衍生的 ClaI 位点相邻。将第二个 XhoI 片段 (含 J_K1 的 7.4 kb DNA) 克隆到 XhoI/SalI 消化的 pSP72 中，以便通过与载体 SalI 位点相连来破坏插入片段 3' 的 XhoI 位点。所得克隆 p36.2s 含有衍生于 J_K1 ClaI 位点上游的 4.5 kb 插入片段和一个衍生于

ClaI 位点下游的多接头，用该多接头代替 J_K1 和 J_K2 之间天然的 XhoI 位点。用 ClaI 消化该克隆以释放 4.7 kb 片段，然后以 5'-3' 的正确方向将其克隆到 ClaI 消化的 pK-31 中，以得到一质粒，该质粒含有所有 5 个人的 J_K 片段、人内含子增强子 C_K、4.5 kb 的 5' 侧翼序列和 9 kb 3' 侧翼序列。该质粒 pKcor 在插入片段的 5' 和 3' 侧翼分别包含单一的侧翼 XhoI 和 SalI 位点。

(3b) pKcorB

将含人 3' κ 增强子的 4 kb BamHI 片段(Judde, J-G 和 Max, E.E.(1992), 分子细胞生物学, 12:5206, 本文引用作为参考。)克隆到 pGP1f 中以便 5' 末端与载体 XhoI 位点相邻。用 XhoI 切割所得质粒 p24Bf, 然后将 pKcor 的 17.7 kb XhoI/SalI 片段以与增强子片段相同的方向克隆到其中。所得质粒 pKcorB 在插入片段的 5' 和 3' 末端分别含有单一的 XhoI 和 SalI 位点。

(3c) pKC1B

将 pKcorB 的 XhoI/SalI 插入片段克隆到 p65.3 的 SalI 位点以产生轻链小座位转基因质粒 pKC1B。该质粒包含一个功能性人 V_K 片段，所有 5 个人的 J_K 片段、人内含子增强子，人 C_K、和人 3' κ 增强子。通过 NotI 消化分离完整的 25 kb 插入片段。

4. Co4

将来自质粒 pKC4 和 pKC1B 的两个 NotI 插入片段以各在微注射缓冲液中 2.5 ug/ml 的浓度混合，然后共注射到前述实施例中半天小鼠胚胎的前核中。所得的转基因动物含有其中共整合了两个片段的转基因插入片段(命名为 Co4, 图 45 中所示的重组产物)。pKC4 插入片段的 3' 3kb 与 pKC1B 插入片段的 5' 3kb 相同。一些整合过程将代表在 3kb 共有序列上两个片段的同源重组。Co4 座位指导人序列轻链库在转基因小鼠中的表达。

实施例 22

本实施例说明成功地生产了分泌与特异性免疫原反应之单克隆抗体的鼠杂交瘤克隆，其中所述单克隆抗体含有由人 Ig 转基因编码的人免疫球蛋白链。

产生掺入人重链转基因产物的单克隆抗体

1. 免疫含人重链转基因的小鼠

用纯化的人 CEA 免疫含人重链编码转基因以及内源重链座位失效(即功能破坏)纯合(参见实施例 20 同上文)的小鼠,然后在适宜的免疫反应期后收集脾细胞。用常规技术(参见 Kohler and Milstein ,Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976); Harlow and Lane ,抗体:实验室手册,冷泉港,纽约(1988))将鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合以得到杂交瘤。用于免疫接种的小鼠含有人未重排的重链小座位转基因,该转基因含有一个功能性 V_H 基因(V_{H251})、人 D 和 J 片段、人 μ 恒定区和人 $\gamma 1$ 恒定区基因。将从其产生的转基因小鼠品系命名为 HC1-57(同上文)。

在 0 天,将在铝中不溶的 100 ug 纯化人癌胚抗原(CEA)(Cyrstal Chem, Chicago, IL or Scripps Labs, San Diego, CA)与完全弗氏佐剂一起注射,然后在 7、14、21 和 28 天每周再注射在不完全弗氏佐剂中的铝沉淀的 CEA。在 83 天,再经静脉内施用 20 ug 可溶的 CEA,然后在 92 天施用在不完全弗氏佐剂中的 50 ug 铝沉淀的 CEA。在将脾细胞与骨髓瘤细胞融合前,确定血清样品中对 CEA 的人重链反应。在 95 天杀死动物,取出脾并用聚乙二醇与 P3X63-Ag8.653 小鼠骨髓瘤细胞(ATCC CRL 1580, 美国典型培养物收集中心)融合。两周后,筛选来自融合孔的上清液是否存在与 CEA 特异性反应的抗体,并用 ELISA 确定是否含有人重链 μ 或 γ 恒定区表位。简单地说,将纯化的人 CEA 以 2.5 ug/ml 包被到 PVC 微滴定板上,与用 PBS、0.5%吐温 20、5%鸡血清以 1:4 或 1:5 稀释的培养物上清液保温。洗涤平板,然后加入人 Ig G Fc 特异性的辣根过氧化物酶-结合的山羊抗血清或人 IgM Fc5Mu 特异性的兔抗血清(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)。在进一步洗涤,并加入 ABTS 底物后,确定是否存在与捕获抗体结合的结合物。发现两个不同的融合孔含有基本上与 CEA 结合的抗体。克隆后,通过 ELISA 发现这两个杂交瘤均是人 μ 和鼠 κ 链阳性。用相似的试验未检测到小鼠 IgG 或 IgM。

亚克隆两个不同的亲本杂交瘤得到两个克隆,命名为 92-09A4F7-A5-2 和 92-09A-1D7-1-7-1。根据布达佩斯条约,将两个品系保存在 ATCC 专利保藏中心,保藏号分别为 HB11307 和 HB11308。通过用 ELISA 检测与数种纯化靶蛋白质 反应性来评估来自这些细胞系的培养物上清液的特异性。如图 46 所示,确定单克隆抗体与各种抗原的反应性的 ELISA 说明只有 CEA 和 CEA 相关抗原 NCA-2 有显著的反应性,这表明异种免疫球蛋白分子的可变区产生了有限的反应性。

实施例 23

本实施例描述了例如通过反式转换，可将由人 Ig 小座位转基因编码的重排的人 VDK 基因转录为包含内源 Ig 恒定区基因以编码嵌合人/小鼠 Ig 链的转录物。

鉴定编码嵌合人-小鼠重链的反式转换转录物

从内源重链 J 片段缺失纯合的超免疫 HC1 品系 57 转基因小鼠中分离 RNA(同上文)。按照 Taylor 等(1993)(Nucleic Acids Res. 20:6287, 该文献引入本文作为参考)所述合成 cDNA, 然后用下列两个引入通过 PCR 扩增:

o-149 (人 V_{H251}) :

5'-CTA GCT CGA GTC CAA GGA GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG (G,A,T,C)-3'

o-249 (小鼠 γ)

5'-GGC GCT CGA GCT GGA CAG GG(A/C) TCC A(G/T)A GTT CCA-3'

寡核苷酸-149 是 HC1-编码的可变基因片段 V_{H251} 特异性的, 而 o-249 以下列特异性顺序与小鼠和人 γ 序列均可杂交:

小鼠 γ 1 = 小鼠 γ 2b = 小鼠 γ 3 > 小鼠 γ 2a >> 人 γ 1。确定从 PCR 产物产生的 10 个随机所选克隆的 DNA 序列, 并在图 47 中列出。两个克隆含有人 VDJ 和小鼠 γ 1; 4 个克隆含有人 VDJ 和小鼠 γ 2b; 另 4 个克隆含有人 VDJ 和小鼠 γ 3。这些结果表明在转基因 B 细胞馏份中, 转基因编码的人 VDJ 通过类型转换或类似的重组方法重组到了内源鼠重链座位中。

实施例 24

本实施例描述了筛选杂交瘤库的方法, 以便将编码嵌合人/小鼠 Ig 链的克隆与编码并表达人 Ig 链的克隆区别开。例如, 在从转基因小鼠(含有人 Ig 重链转基因和 J 区破坏之内源重链座位纯合的)制备的杂交瘤克隆库中, 可鉴定编码反式转换的人 VDJ-鼠恒定区重链的杂交瘤克隆并将其与表达人 VDJ-人恒定区重链的杂交瘤克隆分开。

筛选除去嵌合 Ig 链的杂交瘤

筛选方法包括两个步骤, 所述步骤可单独或组合完成: (1)初步的

ELISA 为基础的筛选, 和(2)候选杂交瘤的第二分子特征。优选将初步的 ELISA 为基础的筛选用于初步鉴定表达人 VDJ 和人恒定区的候选杂交瘤。

用一组与小鼠 μ 、 γ 、 κ 和 λ 和人 μ 、 γ 和 κ 特异性反应的单克隆抗体检测与抗原(如用于在转基因小鼠中引发抗体反应的免疫原)有阳性反应的杂交瘤。只将人重和轻链阳性以及小鼠链阴性的杂交瘤鉴定为表达人免疫球蛋白链的候选杂交瘤。因此, 候选杂交瘤具有与特异性抗原反应性并具有人恒定区特征表位。

从候选杂交瘤中分离 RNA, 然后用于合成第一条 cDNA 链。然后用 RNA 连接酶(连接单链 DNA)将第一条 cDNA 链与预测序列(oligo-X)的独特单链寡核苷酸相连。然后用两组寡核苷酸引物, 通过 PCR 在两个反应中扩增连接的 cDNA。H 组(重链)包含与人 μ 或人 $\gamma 1$ (取决于 ELISA 的结果)特异性退火的寡核苷酸以及与 oligo-X 序列退火的寡核苷酸。这防止了检测特定 V 片段(包括小鼠 V 片段)的偏差, 所述 V 片段可能已被反式重排到人小座位中。第二组引物 L 组(轻链)包括与人 κ 特异性退火的寡核苷酸以及与 oligo-X 特异性退火的寡核苷酸。分子克隆 PCR 产物, 然后确定数个 DNA 序列以便在人和鼠 Ig 序列进行序列比较的基础上, 确定杂交瘤是否生产单一的人抗体。

实施例 25

本实施例描述了生产含人轻链(κ)小座位的转基因小鼠。

人 κ 小座位转基因小鼠

KC1

将 13 kb 含来自噬菌体克隆(通过与 κ 特异性寡核苷酸杂交而从人基因组 DNA 噬菌体文库中分离的, 如同上文)片段的 XhoI J $\kappa 2$ -K κ 片段用 Klenow 酶处理, 然后克隆到 Klenow 处理的 pGP1d 的 HindIII 位点以产生 pK-31。这样破坏了插入片段的 XhoI 位点并将单一多接头衍生的 XhoI 位点放在与 J $\kappa 2$ 相邻的 5' 末端。将单一多接头衍生的 ClaI 位点放在该 XhoI 位点和插入片段之间, 而单一多接头衍生的 SalI 位点被放在插入片段的 3' 末端。再从人基因组 DNA 噬菌体克隆(通过与 κ 特异性寡核苷酸杂交而从人基因组 DNA 噬菌体文库中分离的, 如同上文)中分离含 J $\kappa 1$ 和上游序列的 7.5 kb XhoI 片段。将所述 7.5 kb XhoI 片段克隆到 pSP72 (Promega Madison, Wisconsin) 的 SalI 位点, 由此破坏这两个 XhoI 位

点，并将多接头 ClaI 位点放在 J κ 1 3'。用 ClaI 消化所得克隆释放了含 J κ 1 和 4.5 kb 上游序列的 4.7 kb 片段。将所述 4.7 kb 片段克隆到 pK-31 的 ClaI 位点以产生 pKcor。其余的单一 5' XhoI 位点衍生于多接头序列。将含未重排的人 V κ III 基因片段 65.8(质粒 p65.8，实施例 21)的 6.5 kb XhoI/SalI DNA 片段克隆到 pKcor 的 XhoI 位点以产生质粒 pKC1。将 pKC1 的 NotI 插入片段微注射到 1/2 天小鼠胚胎中以产生转基因小鼠。建立两个不同的 pKC1 衍生的转基因小鼠品系，然后用其与含重和轻链小座位的小鼠交配。用 Southern 印迹杂交来评估这些品系，KC1-673 和 KC1-674，以确定是否分别含有约 1 和 10-20 拷贝转基因的整合物。

KC1e

用 BamHI 和 HindIII 消化质粒 pMHE1(实施例 13 和 18)以切割含小鼠和人重链 J- μ 内含子增强子的 2.3 kb 插入片段。将该片段用 Klenow 处理，与 SalI 接头(New England Biolabs,Beverly ,Massachusetts)相连，然后克隆到 pKC1 的 3' 单一的 SalI 位点以产生质粒 pKC1e。将 pKC1 的 NotI 插入片段微注射到 1/2 天小鼠胚胎中以产生转基因小鼠。建立 4 个不同 pKC1e 衍生的转基因小鼠品系，然后将其与含重和轻链小座位的小鼠交配。用 Southern 印迹杂交来评估这些品系，KC1e-1399、KC1e-1403、KC1e-1527 和 KC1e-1536，以确定是否分别含有约 20-50、5-10、1-5 和 3-5 拷贝转基因的整合物。

pKC2

将含未重排的人 V κ III 基因片段 65.5(质粒 p65.5g1，实施例 21)的 6.8 kb XhoI/ SalI DNA 片段克隆到 pKC15' 的单一 XhoI 位点以产生质粒 pKC2。该小座位转基因含有两个不同的功能 V κ III 基因片段。将 pKC2 的 NotI 插入片段微注射到 1/2 天小鼠胚胎中以产生转基因小鼠。建立 5 个不同的 pKC2 衍生的转基因小鼠品系，然后将其与含重和轻链小座位的小鼠交配。用 Southern 印迹杂交来评估这些品系，KC2-1573、KC2-1579、KC2-1588、KC2-1608 和 KC2-1610，以确定是否分别含有约 1-5、10-50、1-5、50-100 和 5-20 拷贝转基因的整合物。

实施例 26

本实施例说明携带人 κ 转基因的转基因小鼠可产生抗原诱导的抗体反应，形成含功能人 κ 链的抗体。

与人 Ig κ 轻链相关的抗体反应

将含 HC1-57 人重链和 KC1e 人 κ 转基因的转基因小鼠用纯化的人可溶性 CD4(一种人糖蛋白抗原)免疫。在 0 天, 将通过与聚苯乙烯乳胶颗粒 (Polysciences Warrington, PA) 结合而不溶的 20 ug 纯化的人 CD4(NEN Research 产品, Westwood, MA) 在盐水中与二甲基二十八烷基溴化铝 (Calbiochem, San Diego, CA) 一起腹膜内注射, 然后在 20 天和 34 天再注射。

在 25 天和 40 天眼眶后取血, 然后通过 ELISA 筛选是否存在含人 IgM 或人 IgG 重链的抗 CD4 抗体。简单地说, 将纯化的人 CD4 以 2.5 ug/ml 包被到 PVC 微滴定板上, 与用 PBS、0.5%吐温 20、5%鸡血清以 1:4 或 1:5 稀释的培养物上清液保温。洗涤平板, 然后加入人 Ig G Fc 特异性的辣根过氧化物酶-结合的山羊抗血清或人 IgM Fc5Mu 特异性的兔抗血清(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)。在进一步洗涤, 并加入 ABTS 底物后, 确定是否存在与捕获抗体结合的结合物。在两种血中均检测到与抗原反应的人 μ , 而基本上没有可检测的 γ 反应性。用相同的试验, 用山羊抗人 κ 过氧化物酶结合物(Sigma, St. Louis, MO)还检测了 40 天的样品的抗原-反应的人 κ 链。此时检测 CD4-结合的 κ 反应性。图 48 中列出了结果。

实施例 27

本实施例说明成功地产生了转基因小鼠, 所述小鼠是功能破坏的鼠重链和轻链座位(重链和 κ 链座位)纯合的, 并且同是含有人重链转基因和人轻链转基因, 所述转基因能够进行再现性重排以编码功能性人重链和功能性人轻链。将所述小鼠命名为“0011”小鼠, 前两个数字中的两个“0”表示小鼠没有功能性重和轻链座位, 后两个数字中的“1”表示小鼠是人重链转基因和人轻链转基因半合的。本实施例说明所述 0011 小鼠能够对预定抗原产生特异性抗体反应, 而且所述抗体反应可能涉及同种型转换。

0011/0012 小鼠: 内源性 Ig 失效+人 Ig 转基因

将功能破坏的内源重链座位(不含功能 J_H 区(命名为 JHD++或 JH Δ ++))并含有人类 HC1 转基因, 如上文所述的 HC1-26 转基因小鼠)纯合的小鼠与功能破坏的内源 κ 链座位(不含功能 J_H 区(命名为 JHD++或 JH Δ ++))见实施例 9)纯合小鼠进行品种间杂交以产生功能破坏的重链和 κ 链座位纯合的小鼠(重链/ κ 链失效), 将其命名为 JHD++/JKD++并含有一 HC1 转基因。通过品种间杂交产生所述小鼠并通过基因组 DNA 的

Southern 印迹评估的基因型来筛选。将命名为 HC1-26 / JKD++/JHD++小鼠的这些小鼠与含人 κ 链转基因的小鼠(品系 KC2-1610, KC1e-1399 和 KC1e-1527; 见实施例 25)进行品种间杂交, 用基因组 DNA 的 Southern 印迹分析来鉴定子代小鼠, 所述子代小鼠是功能破坏的重和轻链座位纯合的并是 HC1 转基因和 KC2 或 KC1e 转基因半合的。将所述小鼠用数字命名, 并鉴定其基因型, 使用下列缩写: HC1-26 表示 HC1-26 品系的人重链小座位转基因整合的半合性; JHD++表示 J_H 失效纯合性; JKD++表示 J_K 失效纯合性; KC2-1610 表示在品系 KC2-1610 中整合的 KC2 人 κ 转基因的半合性; KC1e-1527+表示在品系 KC1e-1527 中整合的 KC1e 人 κ 转基因的半合性; KC1e-1399+表示在品系 KC1e-1399 中整合的 KC1e 人 κ 转基因的半合性。

将所得个体子代用数字命名(如 6295、6907 等), 并评估每个子代是否存在 J_H 失效等位基因, J_K 失效等位基因、HC1-26 转基因和 κ 转基因(KC2 或 KC1e)并确定在各座位是半合(+)还是纯合(++). 表 10 列出了一些子代小鼠的数字命名、性别和基因型。

表 10

编号	性别	Ig 编号	基因型
6295	M	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610+
6907	M	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1527+
7086	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1399+
7088	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1399+
7397	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1527+
7494	F	0012	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610++
7497	M	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1399+
7648	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610+
7649	F	0012	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610++
7654	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610+
7655	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610+
7839	F	0011	HC1-26+; JHD++; JKD++; KC1e-1399+
7656	F	0001	HC1-26-; JHD++; JKD++; KC2-1610+
7777	F	1100	Co1-2141-; JHD+; JKD+

我们从 3 只 6 周龄雌性小鼠中取出脾。用 Southern 印迹杂交确定小鼠#7655 是 HC1(品系 26)和 KC2(品系 1610)基因整合半合的以及小鼠 μ 和 κ J 区 $J_H\Delta$ 和 $J_K\Delta$ 靶缺失纯合。用 Southern 印迹杂交确定小鼠#7656 是 KC2(品系 1610)转基因整合半合的以及小鼠 μ 和 κ J 区 $J_H\Delta$ 和 $J_K\Delta$ 靶缺失纯合。用 Southern 印迹杂交确定小鼠#7777 是小鼠 μ 和 κ J 区 $J_H\Delta$ 和 $J_K\Delta$

靶缺失半合。由于这些缺失的退化性质，该小鼠在表型上应是野生型。

在 0011 小鼠中表达内源 Ig 链

用 FACS 分析分类来自下列的淋巴细胞，所述 FACS 分析使用一组与人 μ 、小鼠 μ 、人 κ 、小鼠 κ 或小鼠 λ 有反应性的抗体：(1)野生型小鼠(7777)，(2)重链和 κ 失效等位基因纯合并含有人轻链转基因的 0001 小鼠(7656)，和(3)重链和 κ 失效等位基因纯合并含有人轻链转基因以及人重链转基因的 0011 小鼠(7655)。

我们按 Mishell 和 Shiigi 所述(Mishell ,B. B. & Shiigi ,S. M. (eds) *Selected Methods in Cellular Immunology* . W.H. Freeman & Co. New York,1980)从脾和溶解的红细胞用 NH_4Cl 制备单细胞悬浮液。用下列试剂将淋巴细胞染色：二碘化丙锭(Molecular Probes, Eugene ,OR)、FITC 结合的抗人 IgM(克隆 G20-127 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、FITC 结合的抗小鼠 IgM(克隆 R6-60.2 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、藻红蛋白结合的抗人 Ig κ (克隆 HP6062 ; CalTag, South San Francisco ,CA)、FITC 结合的抗小鼠 Ig λ (克隆 R26-46 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、FITC 结合的抗小鼠 B220(克隆 RA3-6B2 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、和 Cy-Chrome 结合的抗小鼠 B220(克隆 RA3-6B2 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)。用 FACScan 流式细胞计数器和 LYES II 软件(Becton Dickinson ,San Jose ,CA)分析染色的细胞。通过在前向和侧翼面扫描栅排除巨噬细胞和残留的红细胞。通过滤过二碘化丙锭阳性细胞来排除死细胞。图 49 和 50 中的流式细胞计数数据证明了 Southern 印迹杂交数据并说明小鼠#7655 表达人 μ 和人 κ ，如果有任何小鼠 μ 和小鼠 κ 的话也是极少的。然而，B 细胞的大部分馏份(约 70-80%)似乎表达由人重和小鼠 λ 轻链组成的杂种 Ig 受体。

图 49 表示在细胞表面上表达人 μ 或小鼠 μ 的 B 细胞的相对分布情况；0011 小鼠(7655)淋巴细胞是人 μ 阳性，但相对缺乏小鼠 μ ；0001 小鼠(7656)淋巴细胞不表达很多的人 μ 或小鼠 μ ；野生型小鼠(7777)淋巴细胞表达小鼠 μ 但不表达人 μ 。

图 50 表示在细胞表面上表达人 κ 或小鼠 κ 的 B 细胞的相对分布情况；0011 小鼠(7655)淋巴细胞是人 κ 阳性，但相对缺乏小鼠 κ ；0001 小鼠(7656)淋巴细胞不表达很多的人 κ 或小鼠 κ ；野生型小鼠(7777)淋巴细胞表达小鼠 κ 但不表达人 κ 。

图 51 表示在细胞表面上表达小鼠 λ 的 B 细胞的相对分布情况；0011 小鼠(7655)淋巴细胞是小鼠 λ 阳性；0001 小鼠(7656)淋巴细胞不表达明显的小鼠 λ ；野生型小鼠(7777)淋巴细胞表达小鼠 λ 但其水平与 0011 小鼠(7655)相比相当低。

图 52 表示与人 κ (转基因编码的)相比，内源小鼠 λ 阳性的 B 细胞的相对分布情况。顶上左边组表示来自野生型小鼠细胞的结果，所述小鼠表达功能性内源重和轻链等位基因，但不表达人转基因；所述细胞是小鼠 λ 阳性的。顶上右边组表示来自小鼠(#5822)细胞的结果，所述小鼠具有 κ 失效背景(JKD++)并含有 KC1e-1399 品系的人 κ 转基因整合；很多比例的所述细胞是人 κ 或小鼠 λ 阳性的。下面左边组表示来自小鼠(#7132)细胞的结果，所述小鼠具有 κ 失效背景(JKD++)并含有 KC2-1610 品系的人 κ 转基因整合；小鼠 λ 阳性的细胞多于人 κ 阳性的，可能说明 KC2-1610 转基因整合的效率比 KC1e-1399 转基因整合的效率低。下右组表示来自含人 κ 小座位转基因(KCo4)并不含功能性内源鼠 κ 等位基因的小鼠细胞。图 52 中所列的数据还说明转基因之间表型表达的可变性。所述可变性表示需要筛选表达一个或多个产生于整合的转基因(如同种型转换、高水平表达、低鼠 Ig 背景)的所需表型特征的个体转基因和/或转基因小鼠品系。通常分别使用一种或多种转基因(如 pKC1e、pKC2、KCo4)以形成通过下列特征区别的多个个体转基因品系：(1)转基因，(2)转基因整合的位点和/或(3)遗传背景。检测各个转基因品系的所需参数如：(1)对预定抗原产生免疫反应的能力，(2)在转基因编码的恒定区内进行同种型转换的频率和/或反式转换成内源(如鼠)Ig 恒定区基因的频率，(3)转基因编码的免疫球蛋白链和抗体的表达水平，(4)内源(如鼠)免疫球蛋白序列的表达水平，和(5)生产性 VDJ 和 VJ 重排的频率。通常，筛选生产最大浓度转基因编码(如人)免疫球蛋白链的转基因品系；优选所筛选的品系在转基因动物的血清中生产约至少 40 ug/ml 转基因编码的重链(如人 μ 或人 γ)和/或至少 100 ug/ml 转基因编码的轻链(如人 κ)。

检测在小鼠未免疫血清和用特异性抗原如人 CD4 免疫后其血清中，小鼠表达人和鼠免疫球蛋白链的情况。图 53 表示在 4 个各种基因型的未免疫接种的 0011 小鼠血清中，人 μ 、人 γ 、人 κ 、小鼠 μ 、小鼠 γ 、小鼠 κ 和小鼠 λ 链相对表达情况(nt = 未检测)；人 κ 是最多的轻链，人 μ 和鼠 γ (推测是反式转换的产物)是最多的重链，但品系之间有所变化，这说明用选择步骤来鉴定有利的基因型组合可使鼠链的表达最小，而表达

人链。小鼠#6907和7088表示人 μ 到人 γ 的同种型转换(在转基因内的顺式转换)。

图54表示各种0011基因型的小鼠中,人 μ 、人 γ 、人 κ 、小鼠 μ 、小鼠 γ 、小鼠 κ 和小鼠 λ 链的血清免疫球蛋白链水平。

在0011小鼠中的特异性抗体反应

按下列免疫方法,用致免疫剂量的人CD4免疫0011小鼠(#6295),0天,腹膜内注射100 μ l CD4小鼠免疫血清;1天,注射在乳胶珠上和100 μ l DDA中的20 μ g人CD4(American Bio-Tech);15天,注射在乳胶珠上和100 μ l DDA中的20 μ g人CD4(American Bio-Tech);29天,注射在乳胶珠上和100 μ l DDA中的20 μ g人CD4(American Bio-Tech);43天,注射在乳胶珠上和100 μ l DDA中的20 μ g人CD4(American Bio-Tech)。

图55表示在3星期或7星期对CD4免疫的有关抗体反应,说明抗CD4反应中,人 μ 、人 γ 或人 κ 链的存在。人 γ 链在7周血清中显著增加,说明在重链转基因内的顺式转换(同种型转换)以时间关系方式发生,这与在野生型动物中的同种型转换方式相似。

图56是人各种重链和轻链转基因的示意图。

实施例28

本实施例提供了鼠 λ 轻链座位的靶失效。

鼠 λ 轻链座位的靶失效

与Ig重和 κ 轻链座位不同,鼠V λ J λ 和C λ 基因片段不按照5'-3'排列分成3个家族,而是散布的。最多的5'部分由两个V片段(V λ 2和V λ X)组成,然后以3'方向为两个恒定区外显子,每个外显子都与其自己的J片段(J λ 2C λ 2和假基因J λ 4C λ 4)相连。接着是使用最广泛的V片段(V λ 1),其后为第二簇恒定区外显子(J λ 3C λ 3和J λ 1C λ 1)。整个座位跨约200kb,在两簇之间有~20-90kb的间隔序列。

λ 座位表达涉及V λ 2或V λ X大部分重排成J λ 2,而很少再在3'重排成J λ 3或J λ 1。V λ 1可与J λ 3和J λ 1重组。因此可突变 λ 座位以便完全消除该座位的重组和表达。

两个 λ 基因簇之间的距离使得很难通过产生一个致密的靶缺失而使该座位的表达失活，如在使鼠 Ig 重链和 κ 轻链座位失活时所用的。然而，可以使得不表达 λ 轻链的小的单缺失可跨约 120kb，从 J λ 2C λ 2 到 J λ 1C λ 1(图 57)。这样除去了所有的 λ 恒定区外显子以及 V λ 1 基因片段，从而确保使该座位失活。

构建取代型靶向载体(Thomas and Capecchi(1987)出处同上)，其中用选择性标记基因 neo 取代在 PGK 表达盒中的缺失的 120 kb。将该标记植入缺失侧翼的基因组 λ 序列内以提供与 λ 座位的同源性，而且还可能含有 HSV-tk 基因，该基因可在同源区的任一末端，以便富集具有同源整合的载体的细胞。通过筛选与待靶向的 ES 品系同基因的菌株 129/Sv 基因组噬菌体文库，可得到 λ 座位基因组克隆序列，因为已经报导，用与待靶向染色体 DNA 同基因的靶向载体可提高同源重组的效率。构建同源长度与 λ 座位不同的靶向载体。第一个载体(载体 1 图 58)含有标记基因，其侧翼为共约 8-12 kb 的 λ 座位序列。对于其中用取代载体介导几 kbDNA 增加或缺失的靶向过程，这已经表明高于同源性的充足程度(Hasty et al.(1991)出处同上； Thomas et al., (1992)出处同上)。构建含有另外约 40-60 kb 侧翼 λ 序列的载体(载体 2，图 58)。常规克隆至少 80kb 的人 Ig 小座位，然后在质粒载体 pGP1(Taylor et al., (1993)，出处同上)中繁殖。

使 λ 座位失活的另一种方法是使用两个独立的突变，例如在同一 ES 细胞中突变两个恒定区簇或两个 V 区座位。由于两个恒定区都被包含在约 6kb 的 DNA 内，而一个 V 座位跨约 19 kb，所以构建靶向载体以独立地缺失 J λ 2C λ 2/J λ 4C λ 4 和 J λ 3C λ 3/J λ 1C λ 1 座位。如图 58 所示，各载体均由 PGK 表达盒中的选择性标记(如 neo 或 pac)组成，该标记周围为消除了各缺失的约 8-12 kb λ 座位基因组 DNA。可将 HSV-tk 基因加到靶向载体中以便通过阳性-阴性筛选来富集同源重组事件。用这两个载体连续靶向 ES 细胞，以便产生携带缺失恒定区座位之一的克隆；然后用所述两个载体连续靶向这些克隆，以便产生携带缺失恒定区座位之一的克隆，然后靶向这些克隆以产生其余功能性恒定区簇的缺失。因此由于两个靶向事件均是针对同一细胞，所以优选两个靶向事件使用不同的选择性标记。在图 58 所示的方案实例中，载体之一含有 neo 基因，另一个含有 pac(嘌呤霉素 N 乙酰基转移酶)基因。第三种潜在的显性选择性标记是 hyg(潮霉素磷酸转移酶)基因。pac 和 hyg 基因均可被插入到 PGK

表达构建体中，成功地将 neo 基因靶向 Ig 重和 κ 轻链座位。由于两个 λ 恒定区簇紧紧相连，所以重要的是两个突变位于同一染色体上。优选两个独立的靶向事件有 50%的可能性突变同一等位基因，在从双靶 ES 细胞衍生的嵌合体繁殖过程中，通过其共分离而建立这两个突变的连锁。

实施例 29

本实施例提供了靶失效鼠重链座位。

靶失效鼠重链座位

用靶向具有图 59 所示之结构的转基因的同源重组基因以通过在 ES 细胞中靶向基因而缺失至少一个，但优选基本上所有鼠重链座位恒定区基因。图 59 说明靶向转基因的一般方法。片段(a)是位于待缺失的恒定区基因上游的克隆的基因组 DNA 序列（即，靠近 J_H 基因）；片段(b)含有阳性选择标记，如 pgk-neo；片段(c)是位于待缺失恒定区基因下游（即恒定区基因和 J_H 基因远端）的克隆的基因组 DNA 序列；而片段(d)(任选的)含有阴性选择标记基因(如 HSV-tk)。图 60 是从 Immunoglobulin Genes, Honjo, T, Alt, FW and Rabbits TH(eds) Academic Press, NY(1989) p.129 得到的鼠重链座位图谱。

具有图 59 所示结构的靶向转基因，其中(1)(a)片段是克隆 JH8.1(Chen et al., (1993) Int. Immunol. 5:647)的 11.5 kb 插入片段或含有约至少 1-4 kb 鼠 C_μ 基因上游的序列，(2)(b)片段是上文所述的 pgk-neo，(3)(c)片段含有图 61 所示的 1674 bp 序列或从小鼠 C_α 基因的噬菌体克隆中分离的 4-6 kb 插入片段，用末端标记的具有下列序列的核苷酸筛选小鼠基因组克隆文库而分离出所述 C_α 基因：5'-gtg ttg cgt gta tca gct gaa acc tgg aaa cag ggt gac cag-3' 和(4)(d)片段含有上文所述的 HSV-tk 表达盒。

或者，逐步缺失一个或多个重链恒定区基因，其中第一靶向转基因含有同源区，即片段(a)和(c)(所述同源区与恒定区基因侧翼的序列同源)、第一种阳性选择性标记基因(pgk-neo)和 HSV-tk 阴性选择性标记。因此，(a)片段含有至少约 1-4 kb 的序列，并与 $C_\gamma 3$ 上游区同源，(c)片段含有至少约 1-4kb 的序列，并与 $C_\gamma 2a$ 基因上游区同源。该靶向转基因缺失 $C_\gamma 3$ 、 $C_\gamma 1$ 、 $C_\gamma 2b$ 和 $C_\gamma 2a$ 基因。将所述第一靶向转基因导入 ES 细胞中筛选正确的靶向重组(如用 G418)，以产生正确靶向的 C 区缺失。然后阴性筛选 HSV-tk 表达盒的丢失(如用 9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤

呤或 FIAU。所得的正确靶向的第一轮 C 缺失重组体含有丢失了 C γ 3、C γ 1、C γ 2b 和 C γ 2a 基因的重链座位。

第二靶向转基因含有同源区，即片段(a)和(c)，与恒定区基因侧翼序列同源、与第一种(如 gpt 或 pac)不同的第二种阳性选择标记以及 HSV-tk 阴性选择标记。因此，(a)片段含有至少约 1-4 kb 的序列，并与 C ϵ 上游区同源，(c)片段含有至少约 1-4kb 的序列，并与 C α 上游区同源。该靶向转基因缺失了 C ϵ 和 C α 基因。

将所述第二靶向转基因导入从第一靶向事件得到的正确靶向 C 区的重组体 ES 细胞中。用选择性药物筛选正确靶向第二失效事件(即与第二靶向转基因通过同源重组)的细胞，所述选择性药物是第二种阳性选择标记基因(如酶酚酸以选择 gpt；嘌呤霉素以筛选 pac)特异性的。然后阴性筛选 HSV-tk 表达盒的丢失(例如，用 9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤或 FIAU)。所得的正确靶向的第二轮 C 区重组体含有丢失了 C γ 3、C γ 1、C γ 2b、C γ 2a、C ϵ 和 C α 基因的重链座位。

将不含一个或多个 C 区基因的正确靶向的第一轮或第二轮重组体 ES 细胞按上述(见上文)用于胚细胞注射并产生嵌合小鼠。建立靶向重链等位基因的种系传递，繁殖所得的建立者小鼠以产生 C 区失效纯合的小鼠。与 J_H 失效小鼠相比，所述 C 区失效小鼠有数种优点；例如 C 区失效小鼠在人重链转基因和内源重链座位恒定区之间进行反式转换的能力降低(或完全失去该能力)或，由此降低了转基因小鼠中嵌合人/小鼠重链的频率。鼠 γ 基因失效是优选的，尽管通过同源靶向也经常缺失 μ 和 δ 。可将 C 区失效与在内源鼠重链座位中的其它靶向损伤同时进行；将 C 区缺失与 J_H 失效组合以消除鼠重链座位的生产性 VDJ 重排并防止或降低人重链转基因与鼠重链座位等之间的反式转换。对于某些实施方案，需要生产特异性丢失一个或多个内源重链座位 C 区基因，但保留某种其它 C 区基因的小鼠；例如如果所述 IgA 赋予一种有利的表型并基本上不会干扰小鼠的所需实用性的话，优选保留鼠 C α 基因以便通过反式转换生产嵌合人/小鼠 IgA。

实施例 30

本实施例描述了从含人转基因的转基因小鼠中得到的淋巴细胞样品中，来自体内的淋巴细胞耗尽，所述淋巴细胞表达内源(鼠)免疫球蛋白。通过与抗鼠免疫球蛋白抗体的特异性结合来选择性地耗尽表达鼠 Ig

的淋巴细胞,所述抗鼠免疫球蛋白抗体基本上不与由所述转基因编码的人免疫球蛋白结合。

来自体内的表达鼠 Ig 的 B 细胞的耗尽

将人重链小座位转基因(HC2)和人轻链小座位转基因(Kco4)纯合的小鼠与 C57BL./6(B6)自交系小鼠交配以得到 2211 小鼠(即小鼠是功能性内源鼠重链座位纯合的,是功能性内源鼠轻链座位纯合的,而且还含有一个拷贝的人重链转基因和一个拷贝的人轻链转基因)。所述 2211 小鼠还表达 B6 主要的和少量的组织相容性抗原。将这些小鼠用致免疫剂量的抗原免疫,约 1 周后分离脾细胞。按标准方法(Wysocki et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2844; MACS 磁珠细胞分类, Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA)通过固相结合的抗体依赖性细胞分离法,除去鼠 Ig 阳性的 B 细胞,然后通过抗体依赖性补体介导的细胞溶解(Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell BB and Shiigi SM (eds), W. H. Freeman and Company, New York, 1980, pp.211-212)以基本上除去鼠 Ig 阳性的残留 B 细胞。将耗尽样品中的剩余细胞(如 T 细胞、人 Ig 阳性 B 细胞)优选与其它抗鼠 Ig 抗体一起静脉内注射到 SCID/B6 或 RAG/B6 小鼠中,以耗尽产生的 B 细胞。然后用抗原进一步免疫重建的小鼠以得到抗体以及用于生产杂交瘤克隆的亲和力成熟的细胞。

实施例 31

在体细胞嵌合体中生产全部人抗体

描述了在体细胞嵌合小鼠中用于生产全部人抗体的方法。通过将胚胎干(ES)细胞导入 RAG-1 或 RAG-2 缺陷型小鼠的胚细胞中来生产这些小鼠,所述胚胎干细胞携带人免疫球蛋白(Ig)重和轻链转基因,但没有功能性鼠 Ig 重和 κ 轻链基因。

RAG-1 或 RAG-2 缺陷型小鼠(Mombaerts et al., (1992) Cell, 68:869; shinkai et al., (1992) Cell 68:855)由于不能启动 VDJ 重排并组装编码 Igs 和 T 细胞受体(TCR)的基因片段而不含有鼠 B 和 T 细胞。通过将野生型 ES 细胞注射到从 RAG-2 缺陷型小鼠产生的胚细胞中而在 B 和 T 细胞生产中产生所述缺陷。所得的嵌合小鼠生产完全衍生于注射的 ES 细胞的成熟 B 和 T 细胞(Chen et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528)。

将注射的 ES 细胞的遗传操作用于将特定的突变和/或内源 DNA 构

建体导入嵌合体的所有 B 和/或 T 细胞中。Chen 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4528-4532 得到了携带纯合 Ig 重链座位失活的 ES 细胞, 然后将所述细胞注射到 RAG 胚细胞中, 产生可生产 T 细胞但不产生 B 细胞的嵌合体。将重排的鼠重链转染到突变 ES 细胞中, 使 B 细胞发育获救并在嵌合体中同时生产 B 和 T 细胞。

可产生不合成鼠 Ig 重链或 κ 轻链的、表达全部人抗体的嵌合体小鼠。将人 Ig 重和轻链构建体导入 ES 细胞中, 所述 ES 细胞是鼠 Ig 重链或 κ 轻链基因均失活的纯合细胞。然后将 ES 细胞注射到来自 RAG 缺陷型小鼠的胚细胞中。所得的嵌合体含有只衍生于注射的 ES 细胞的 B 细胞, 所述注射的 ES 细胞不能表达鼠 Ig 重链或 κ 轻链基因, 但表达人 Ig 基因。

产生免疫球蛋白重和 κ 轻链基因失活的纯合的 ES 细胞

分别按照已知的方法(Chen et al., (1993) *EMBO J.* 12:821; and Chen et al., (1993) *Int.Immunol.* 出处同上), 在 ES 细胞中通过靶向缺失 Ig J_H 和 J_K/C_K 序列而产生携带失活 Ig 重和 κ 轻链座位的小鼠。将两个突变品种的小鼠交配在一起以产生两个 Ig 座位失活的纯合的品种。将该双突变品种用于衍生 ES 细胞。所用的方法基本上是 Robertson 所述的方法 (1987, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell: A Practical Approach*, p.71-112, edited By E.J. Robertson, IRL Press)。简单地说, 通过纯合双突变小鼠的自然交配产生胚细胞。在怀孕 2.5 天, 对怀孕雌性小鼠进行卵巢切割, 在怀孕 7 天从子宫中取出“延迟的”胚细胞, 在饲养细胞上培养以有助于使其保持未分化状态。通过形态学鉴定从胚细胞的内细胞群中检出干细胞, 解离, 然后在饲养细胞上传代。鉴定有正常核形的细胞, 检测雄性细胞系产生嵌合体的能力, 然后提供小鼠生殖细胞。雄性 ES 细胞对于雌性品种是优选的, 因为雄性嵌合体可产生更显著的子代。

将人 Ig 基因导入小鼠 Ig 重和 κ 轻链缺陷型 ES 细胞

将人免疫球蛋白重和轻链基因以小座位构建体, 如 HC2 和 KC-C04 或 YCA 克隆如 J1.3P 导入突变 ES 细胞。通过如电穿孔或用阳离子脂质转染的技术来用人 Ig DNA 转染 ES 细胞。为了选择已掺入人 DNA 的 ES 细胞, 将选择性标记与构建体相连或将其与构建体一起共转染到 ES 细胞中。由于产生 Ig 基因失活的基因靶向事件, 突变 ES 细胞含有新霉素磷酸转移酶(neo)基因, 因此, 可用不同的选择性标记如潮霉素磷酸转移

酶(hyg)或嘌呤霉素 N 乙酰基转移酶(pac)以便将人 Ig 基因导入 ES 细胞。

用不同的选择性标记, 可将人 Ig 重和轻链基因同时或依次导入突变的 ES 细胞。转染后, 用适宜的选择性标记筛选细胞, 扩增药物抗性菌落用于冷冻和 DNA 分析以确定并分析人基因序列的整合。

生产嵌合体

按所述(Bradley,A. (1987), In Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell :A Practical Approach,P. 113-151,edited by E. J. robertson ,IRL Press)将含人 Ig 重和轻链基因的 ES 克隆注射到 RAG-2 胚细胞中并转换进假孕雌性小鼠子宫中。通过血清样品的 ELISA 试验筛选存在人抗体的子代。将阳性动物用于免疫并生产人单克隆抗体。

实施例 32

本实施例描述了通过 ES 细胞中的同源重组, 将靶向移码突变导入鼠重链座位, 从而经转换重组缺失 B 细胞。移码小鼠是含非鼠(如人)转基因的适宜宿主, 所述转基因编码人序列免疫球蛋白。

可用新移码的小鼠表达由重链转基因和/或轻链转基因编码的非鼠(如人)序列免疫球蛋白, 并用于分离从导入的转基因表达类型转换的、亲和力成熟的人序列抗体的杂交瘤, 以及其它用途。将一个移码导入到 4 个小鼠 JH 基因片段中的一个并导入到小鼠 μ 基因的第一外显子中。两个所导入的移码突变彼此补偿, 由此当 B 细胞将移码的 JH 用于功能性 VDJ 连接时, 表达全功能的鼠 μ 重链。未将另 3 个 JH 片段中的任何一个用于功能性 VDJ 连接, 因为在 μ 中的移码, 在其余的 JH 基因中不能得到补偿。或者可将补偿移码改造成多个鼠 JH 基因。

补偿的、移码的免疫球蛋白重链等位基因纯合的小鼠含有接近生理水平的外周 B 细胞, 以及接近生理水平的含鼠和人 μ 的血清 IgM。但是恢复成生发中心的 B 细胞经常经类型转换而转换成非 μ 同种型。在表达内源鼠 μ 链的 B 细胞中所进行的所述类型转换会导致表达未补偿的移码 mRNA, 因为其余的非 μ C_H基因没有补偿的移码。所得的 B 细胞不表达 B 细胞受体并被缺失。因此, 在其到达发生同种型转换的分化阶段后, 缺失了表达鼠重链的 B 细胞。但是, 表达非鼠(如人)转基因编码之重链的 B 细胞能够再进一步发育, 包括进行同种型转换和/或亲和力成熟等, 所述转基因能够进行同种型转换, 但不含有所述同种型限制移码。

因此, 移码的小鼠就鼠重链(μ)而言, 具有受损伤的二级反应, 但与转基因编码的重链有显著的二级反应。如果将能够进行类型转换的重链转基因导入该突变背景, 通过表达转基因的 B 细胞就能突出非 IgM 二级反应。因此可以从这些移码小鼠中分离亲和力成熟的表达人序列免疫球蛋白的杂交瘤。此外, 移码小鼠一般具有免疫保护水平的鼠 IgM, 在人重链转基因仅编码有限的可变区库的情况下, 这是有利的。

为了制备分泌人序列单克隆抗体的杂交瘤, 免疫转基因突变小鼠; 将其脾细胞与骨髓瘤细胞系融合; 然后筛选表达转基因编码的人非 μ 同种型的杂交瘤。此外, 移码小鼠比 JH 缺失小鼠优越, 因为它含有与转录的 VDJ 相邻的功能性 μ 转换序列, 所述转录的 VDJ 可作为顺式转换的活性底物(Gu et al. (19993) Cell 73:1155); 从而降低表达嵌合人/小鼠抗体的反式转换的 B 细胞的水平。

构建移码载体

构建两个不同的移码载体。用其中一个载体在小鼠 J4 基因片段的 3' 末端导入 2 个核苷酸, 用另一载体从小鼠 μ 基因外显子 1 的 5' 末端缺失相同的 2 个核苷酸。

1. JH 载体

将覆盖小鼠重链 J 区和 μ 内含子增强子的 3.4 kb XhoI/EcoRI 片段亚克隆到质粒载体中, 所述质粒载体含有在磷酸甘油酸酯激酶启动子控制下的新霉素抗性基因以及疱疹胸苷激酶基因(tk/neo 盒; Hasty et al., (1991) Nature 350:243)。然后用该克隆作为产生 2 个不同 PCR 片段的底物, 所述 PCR 使用下列寡核苷酸引物:

```
o-A1      5'- cca cac tct gca tgc tgc aga agc ttt tct gta -3'
o-A2      5'- ggt gac tga ggt acc ttg acc cca gta gtc cag -3'
o-A3      5'- ggt tac ctc agt cac cgt ctc ctc aga ggt aag aat
ggc ctc -3'
o-A4      5'- agg ctc cac cag acc tct cta gac agc aac tac -3'
```

用寡核苷酸 o-A1 和 o-A2 扩增 SphI 和 KpnI 消化的 1.2 kb 片段。用寡核苷酸 o-A3 和 o-A4 扩增 KpnI 和 XbaI 消化的 0.6 kb 片段。然后将这两个消化的片段克隆到 SphI/XbaI 消化的质粒 A 中以产生质粒 B。

质粒 B 在 J4 的末端含有 2 个核苷酸的插入，另外，在插入片段上游含有一新 KpnI 位点。用 KpnI 位点作为插入的诊断性标记。

可将其它侧翼序列克隆到质粒 B 的 5' XhoI 位点和 3' EcoRI 位点以提高其同源重组的效率。然后用 SphI 或另一种在插入片段内有一个位点的限制酶消化所得质粒，然后电穿孔到胚胎干细胞中，接着按 Hasty 等(1991)所述(出处同上)用 G418 筛选。以 Southern 印迹杂交鉴定同源重组体，然后按 Hasty 等所述用 FIAU 选择以获得缺失的亚克隆，所述亚克隆在 JH4 中仅含与 2 个碱基对的插入以及一个新 KpnI 位点。用 KpnI 消化的 DNA 的 Southern 印迹杂交鉴定这些克隆并用 PCR 扩增的 JH4 DNA 的 DNA 序列分析证实。

所得小鼠含有已从未突变序列

```
...TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG__gtaagaatggcctctcc...
TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGlu
```

转换成突变序列的 JH4 片段：

```
...TGGGGTCAAGGTACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGgtaagaatggcctctcc...
TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGlu
```

μ 外显子 1 载体

用与上述相似的体外诱变方法，将 2 个碱基对插入到 JH4 基因片段中，组装 PCR 产物和基因组亚克隆以产生在第一 μ 外显子 5' 末端含 2 个碱基对缺失的载体。另外，为了标记该突变，通过将 A 变成 G 而将一个新 XmnI 位点导入下游。

未突变的 μ 基因序列是：

```
...ctggctcctcagAGAGTCAGTCCTTCCCAAATGTCTTCCCCCTCGTC...
GluSerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal
```

突变的 μ 基因序列是：

XmnI

```
...ctggctcctcag__AGTCAGTCCTTCCCGAATGTCTTCCCCCTCGTC...
SerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal
```

将含突变序列的同源重组载体线性化并电穿孔到含 JH4 插入的 ES 细胞系中。从新霉素抗性克隆中鉴定同源重组体。通过 KpnI/BamHI 消

化的 DNA 的 Southern 印迹杂交, 鉴定那些同源重组体, 所述重组体含有与 JH4 插入在同一染色体上的移码插入。JH4 插入与新 KpnI 位点有关, 该位点将 KpnI/BamHI 片段 J- μ 内含子的大小从来自野生型的 11.3 kb 减小到突变的 9kb。然后用 FIAU 筛选缺失了插入的 tk/neo 盒的所得克隆。通过 XmnI 消化 DNA 的 Southern 印迹杂交来鉴定含突变 μ 外显子的克隆。通过 PCR 扩增的 μ 外显子 1 DNA 的 DNA 序列分析证实所述突变。

产生移码小鼠

将含有 JH4 的 2 碱基对插入并在 μ 外显子 1 中含 2 个碱基对缺失的 ES 细胞导入胚胎细胞阶段的胚胎中, 将所述胚胎插入假孕雌性小鼠中以产生嵌合体。繁殖嵌合动物以获得种系传递并繁殖所得的动物达到纯合以获得突变动物, 所述突变动物是补偿移码重链座位纯合的, 并在表达鼠重链的 B 细胞中有损伤的二级体液免疫反应。

可将人重链转基因, 如 pHC1 或 pHC2 等通过将含所述人转基因的小鼠杂交育种成含移码鼠 IgH 座位的小鼠交配到鼠重链移码背景中。通过杂种繁殖和反交, 在鼠 IgH 座位产生 μ 补偿的移码鼠 IgH 等位基因(即仅能够补偿鼠 μ 的框架中表达, 但对鼠非 μ 链则不行)纯合的, 并含有至少一整合拷贝的功能性人重链转基因(如 pHC1 或 pHC2)小鼠。所述小鼠还可含有如上文所述的内源鼠 κ 和/或 λ 座位失效, 并还可含有人或其它非鼠轻链转基因(如 pKC1e, pKC2 等)。

或者人转基因(重和/或轻链)可含有补偿的移码, 以便转基因 J 基因含有由转基因恒定区基因中的移码补偿的移码。对内源恒定区基因的反式转换得不到补偿, 并产生一截短的或无意义产物; 筛选表达所述未补偿反式转换的免疫球蛋白的 B 细胞并进行耗尽。

实施例 33

通过 D 区消除使内源重链失活

本实施例描述了阳性-阴性筛选同源重组载体, 将该载体用于用非功能重排的 VDJ 片段取代小鼠种系免疫球蛋白重链 D 区。所得等位基因在 B 细胞内作为正常非生产性等位基因发挥作用, 并含有经等位基因内重链类型转换的等位基因, 由此降低反式转换成活性转基因座位的水平。

D 区靶向构建体

分离位于鼠 D 区上游的 8-15 kb DNA 片段，然后用寡核苷酸探针从小鼠菌株 129 噬菌体文库进行亚克隆，所述探针含有 GenBank 所列 DFL16.1 片段的约 50 个连续核苷酸的公开序列。DFL16.1 是上游 D 片段(即 V 区基因簇的近端，恒定区基因簇的远端)。

同样，分离含 JH3、JH4、E μ 、S μ 和 μ 恒定区前两个编码外显子的 9.5 kb BamHI 片段，然后从小鼠品种 129 基因组噬菌体文库中亚克隆。

然后从小鼠杂交瘤(任何菌株)分离 5-10kb 重排的 VDJ，将合成的含终止密码子的接头插入到 J 片段中。J 内的终止接头对于框架外的 VDJ 连接是优选的，这可能是由于 V 取代重排的可能性。

将这 3 个片段与 pGKneo 阳性选择盒和 PGKHSVtk 阴性选择盒组装在一起以形成阳性-阴性选择载体，用于通过同源重组消除 129-衍生的 ES 细胞中的小鼠 D 区(如 AB1)。通过将 8-15kb DNA 片段与阳性选择盒(如 pGKneo)相连形成靶向载体，选择盒本身与重排的 5-10 kb 重排的 VDJ 相连，重排的 VDJ 本身与 9.5 kb BamHI 片段相连；然后将阴性选择盒(如 PGKHSVtk)连在靶向构建体的任一末端。图 63 中图示说明了所述 D 区靶向构建体的构建。

将 D 区靶向构建体转移到 AB1 ES 细胞中，按上述进行阳性和阴性选择，克隆正确靶向的 ES 细胞。将正确靶向的 ES 细胞克隆用于胚细胞注射，然后产生嵌合小鼠。繁殖嵌合小鼠以产生含 D 区失活的重链等位基因的建立者小鼠。将子代进行杂种繁殖以产生没有功能内源重链座位的纯合体。用所述纯合体近交含人 Ig 转基因(如 pHCl, pHCl2, pKC2, pKC1e, Kco4)的小鼠以产生(通过与不含功能 D 区的纯合体进一步回交)不含功能内源重链座位，但含有人重链转基因(也优选人轻链转基因)的小鼠。在保留某些功能性内源轻链座位(如 λ 座位)的实施方案中，一般优选转基因含有转录控制序列，所述控制序列指导高水平表达人轻链(如 κ)多肽，并因此使转基因座位与保留的内源轻链(如 λ)座位进行有效的竞争。例如与 pKC1 在转基因动物中内源 λ 座位进行有效竞争的能力相比，一般优选 Co4 κ 轻链转基因。

实施例 34

本实施例描述通过共注射人 κ 轻链小座位和含部分人 V κ 座位的酵

母人工染色体，来扩展人轻链转基因 V 基因库。

通过共注射含 V κ 的 YAC DNA 和 κ 小座位而导入功能性人轻链 V 片段

从公开可得到的 ICRF YAC 文库的克隆 4x17E1(Larin et al.,(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)88:4123; Genome Analysis Laboratory ,Imperial Cancer Research Fund, London ,UK)中，得到作为未扩增 YAC DNA 的约 450 kb YAC 克隆，该克隆含部分人 V κ 座位。按制造商的说明 (CHEF DR-II 电泳细胞，Bio-Rad Laboratories ,Richmond ,CA)，用标准脉冲场凝胶电泳不用预先扩增就可分离 450 kb YAC 克隆。用溴化乙锭将 6 个脉冲场凝胶染色，从凝胶上切下含 YAC 克隆 DNA 的凝胶物质，然后包埋在三角形凝胶托盘中的新凝胶(在标准凝胶缓冲液中的低熔点琼脂糖)模中。将所得的三角形凝胶(含 6 个切割的含 YAC 的凝胶块)在窄琼脂糖凝胶的顶点展开，所述凝胶含 2 M 醋酸钠和标准电泳缓冲液。然后将凝胶放在浸入到标准凝胶缓冲液中的电泳槽中。在缓冲液表面上形成 Y 形凝胶形成物，以便电流仅流过窄的高盐凝胶部分。将聚异丁烯酸树脂块放在高盐凝胶片上以防止醋酸钠扩散到缓冲液中。然后将 YAC DNA 电泳出原切割的凝胶片(包埋的)，而电泳入窄高盐凝胶部分。在从低盐凝胶到高盐凝胶过渡的时候，有一个电阻压降，可有效地防止 DNA 在三角形凝胶顶点的迁移。

电泳并用溴化乙锭染色后，从凝胶的其余部分切出浓缩的 YAC DNA，然后用 GELase(EpiCentre Technologies ,Madison ,Wisconsin)消化琼脂糖。然后将氯化铯加到所得的含 YAC 的液体中以得到 1.68 g/ml 的密度。将该溶液以 37000rpm 离心 36 小时，以便将 YAC DNA 与任何污染物分开。分离 0.5 ml 所得密度梯度的馏份，将峰 DNA 馏份用 5 mM Tris (pH7.4), 5 mM NaCl, 0.1 M EDTA 透析。透析后，发现所得的 0.65ml YAC DNA 溶液的浓度为含 2 μ g/ml DNA，将所述 YAC DNA 与来自质粒 pKC1B 和 pKV4 之插入片段的纯化 DNA 混合，比例为 20 : 1 : 1(微克 YAC4x17E1:KC1B:KV4)。将所得 2 μ g/ml 溶液注射到半天的 B6CBF2 胚胎前核中，将 95 个存活的微注射胚胎转移到假孕雌性小鼠的输卵管中。生出 12 个从微注射胚胎发育的小鼠

实施例 35

本实施例描述在免疫的转基因小鼠中的类型转换、体细胞突变和 B 细胞发育，所述转基因小鼠是失活内源免疫球蛋白座位纯合的，并含有 HC1 或 HC2 重链转基因。

为了说明人序列种系构型小座位可在功能上取代真正的座位,我们将不含内源 IgH 的小鼠品种与含人种系构建 IgH 转基因的小鼠品种交配。两个转基因小座位 HC1 和 HC2 分别包括 1 和 4 个功能可变(V)片段、分别 10 和 16 多样性(D)片段、所有 6 个连接(JH)片段和 μ 和 $\gamma 1$ 两个恒定区片段。小座位包括人顺式作用调节序列-如 JH- μ 内含子增强子和 μ 和 $\gamma 1$ 转换序列-与编码片段紧紧相连。它们还包括衍生于大鼠 IgH 座位 3' 末端的另一增强子元件。我们将 HC1 和 HC2 转基因小鼠与干细胞衍生的突变小鼠杂交,所述干细胞衍生的突变小鼠没有所述(见上文)的 JH 片段(JHD 小鼠)并因此不能进行功能重链重排。所得的转基因 JHD 小鼠含有依赖于所导入的重链序列的 B 细胞。

免疫和杂交瘤

我们通过腹膜内注射 50-100 ug 抗原来免疫小鼠。抗原包括人癌胚抗原 (CEA ; Crystal Chem, Chicago ,IL)、鸡卵白溶菌酶 (HEL;Pierce ,Rockford ,IL)和匙孔藤蓝蛋白(KLH ; Pierce ,Rockford ,IL)。为了进行第一次注射我们将抗原与完全弗氏佐剂混合,对于随后的注射,我们使用不完全弗氏佐剂(Gibco BRL, Gaithersburg , MD)。我们将脾细胞与非分泌的小鼠骨髓瘤 P3X62-Ag8.653(ATCC CRL1580)融合。我们用 ELISA 检测血清样品和杂交瘤上清液,以确定是否存在特异性和非特异性的含人重链序列的抗体。为了检测非特异性抗体,我们用人重链同种型特异性抗体(小鼠单克隆抗体 α 人 IgG1, 克隆 HP6069, Calbiochem, La Jolla ,CA ; 小鼠单克隆抗体 α 人 IgM, 克隆 CH6,The Binding Site, Birmingham ,UK)包被微滴定孔,然后用过氧化物酶结合的抗血清(从多克隆山羊 α 人 IgG(fc)辣根过氧化物酶结合的亲和力纯化的 fab 片段, cat #109-036-098 ; 亲和力纯化的辣根过氧化物酶结合的多克隆兔 α 人 IgM(fc), cat # 309-035-095, Jackson Immuno Research ,West Grove, PA) 显色。为了检测抗原特异性抗体,我们用抗原包被微滴定孔,用过氧化物酶结合的人重链同种型特异性抗血清显色。我们通过与过氧化氢和 2,2'-连氨基-二-(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)一起保温来检测结合的过氧化物酶。通过在 415 nm 的吸收值来测量反应产物,然后校正成 490nm 的吸收值。

流式细胞计数

我们从脾、骨髓和腹腔中制备单细胞悬浮液,然后按 Mishell and Shiigi 所述用 NH_4Cl 溶解红细胞。用下列试剂将淋巴细胞染色:藻红蛋

白结合的抗小鼠 Ig κ (克隆 X36; Becton Dickinson, San Jose, CA)、FITC 结合的抗小鼠 IgD(克隆 SBA 1; Southern Biotech, AL)、FITC 结合的抗小鼠 CD5(克隆 53-7.3; Becton Dickinson, San Jose, CA)、FITC 结合的抗小鼠 Ig λ (克隆 R26-46; Pharmingen, San Diego, CA)、和 Cy-Chrome 结合的抗小鼠 B220(克隆 RA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA)。用 FACScan 流式细胞计数器和 LYES II 软件(Becton Dickinson, San Jose, CA)分析染色的细胞。通过在前向和侧翼面扫描栅排除大多数巨噬细胞、嗜中性白细胞和残留的红细胞。

B 细胞区室获救

在 HC1 转基因-JHD 动物的腹腔中,我们发现了正常水平的 CD5⁺B 细胞和约 1/4 正常水平的常规 CD5⁻B 细胞。转基因腹膜 CD5⁺B 细胞与正常动物中所述的所谓 B-1 细胞相似:它们大于常规 B 和 T 淋巴细胞,它们表达 B22 的水平比在脾中发现的常规 B 细胞的低,它们包括较高比例的表达 λ 轻链的细胞。90%以上的脾 B 细胞表达 κ , 而 50%以上的腹膜 B 细胞表达 λ 。因此,当常规 B 细胞的水平在所有组织中均匀减少时, B-1 的水平(报导说有更大的自我更新能力)在 HC1 转基因 JHD 动物中似乎是正常的。

类型转换

在转基因 JHD 小鼠中,与抗原重复接触会导致生产人 γ 1 抗体和 μ 抗体。我们将人 CEA 以每周的间隔注射给转基因 JHD 小鼠,在 4 周的时间内监测抗原特异性 IgM 和 IgG1 血清水平(图 63)。在第一周有可检测的 IgM 反应,但没有 IgG1 反应。但是,在 2 周后, IgG1 反应比 IgM 反应大,而且会继续增加,而 IgM 反应保持相对稳定。这中模式-开始是 IgM 反应,然后是 IgG 反应,-是典型的二级免疫反应;表明在转基因中所包含的顺式作用序列可应答指导类型转换的细胞因子。我们认为表达非 μ 同种型有 3 种可能的机制,每种机制均已在文献中讨论过。这些机制是:改变的剪接,不包括 μ 基因缺失;“ δ 型”转换,通过侧翼重复序列之间的同源重组而涉及 μ 基因缺失;转换区之间的非同源重组。下面描述的我们试验的结果是转换区重组模式的标志。

两种非缺失选择剪接机制可有助于解释同种型转换。首先,可能是从转基因表达了覆盖 μ 和 γ 1 的单个转录物;可将所述转录物进行不同的剪接以应答通过与抗原接触而诱导的细胞因子。或者可将开始于 γ 1 上游的细胞因子诱导的无效转录物进行反式剪接以形成 μ 转录物。如果这两

种机制中的任何一种均不足以解释人 $\gamma 1$ 序列的表达, 则我们预期可分离表达 μ 和 $\gamma 1$ 的杂交瘤。但是, 尽管我们筛选了数百个表达人 μ 或人 $\gamma 1$ 的杂交瘤, 但我们未发现任何所述双生产者(μ^+ 和 $\gamma 1^+$)杂交瘤。这表明 $\gamma 1$ 的表达需伴有 μ 基因的缺失。

通过 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间的非同源重组或通过两个侧翼 400 bp 同向重复序列($\sigma\mu$ 和 $\Sigma\mu$)之间的同源重组来介导 μ 基因的缺失, 所述同向重复序列包含在 HC1 和 HC2 转基因中。已经报导认为 $\sigma\mu$ 和 $\Sigma\mu$ 之间的缺失重组是产生某些人 B 细胞 IgD⁺、IgM⁺表型的原因。第一种机制, 非体液转换重组应产生不同长度的转换产物, 而第二种机制 $\sigma\mu/\Sigma\mu$ 重组应总是产生相同的产物。我们用 Southern 印迹分析了从 3 个杂交瘤分离的基因组 DNA(图 64), 一个表达 μ , 两个表达 $\gamma 1$ 。我们发现转基因 $\gamma 1$ 上游的基因组重排只在两个 $\gamma 1$ 转换区(图 64B)。此外, 所观察到的任何一个结构均不与 $\sigma\mu$ 和 $\Sigma\mu$ 之间的同源重组相符。因此我们的结论与 $\gamma 1$ 同种型表达的模型一致, 所述 $\gamma 1$ 同种型表达是由编码 μ 和 $\gamma 1$ 转换区的转基因之间的缺失非同源重组介导的。

反式转换

除人 $\gamma 1$ 外, 我们在 HC1 和 HC2 转基因 JHD 小鼠血清中发现了小鼠 γ 。我们还从这些动物得到了表达小鼠 γ 的杂交瘤。由于非转基因纯合 JHD 动物不表达可检测水平的小鼠免疫球蛋白, 因此我们将 HC1 和 HC2 转基因 JHD 小鼠中, 小鼠 γ 的表达归因于反式转换现象。我们分析的所有转基因杂交瘤均表达小鼠或人恒定区序列中的任一种, 但不会同时表达两者。因此涉及反式剪接机制是不可能的。我们用 PCR 扩增法分离反式转换产物的 cDNA 克隆, 确定所得 10 个克隆的核苷酸序列(图 65)。在 PCR 扩增中的 5' 寡核苷酸是转基因编码 VH251 特异性的, 3' 寡核苷酸是小鼠 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2b$ 和 $\gamma 3$ 序列特异性的。我们发现了反式转换产物的实例, 在所述反式转换产物中掺入了所有这 3 个小鼠恒定区。

体细胞突变

图 7 中所示的反式转换产物可变区内的约 1% 的核苷酸不是由种系编码的。这可能是由于体细胞突变而产生的。由于已将突变的序列转座到内源座位, 因此指导这些突变的顺式作用序列可能在小鼠 γ 转换区 3' 的任何位置。但是, 正如我们下文所讨论的, 我们还发现在 VDJ 片段中的体细胞突变, 所述突变未经过所述转座; 该结果说明在转基因中包含了重链体细胞突变所需的序列。

为了确定 HC1 和 HC2 构建体是否包含足以使转基因 JHD 小鼠中发生体细胞突变的顺式作用序列, 我们分离并部分测序了衍生于两个独立 HC1 转基因品系和一个 HC2 品系的 cDNA 克隆。我们发现来自转基因 JHD 小鼠的某些 γ 1 转录物含有带广泛体细胞突变的 V 区。这些突变转录物的频率似乎随重复的免疫接种而增加。图 66A 和 66B 列出了两组 cDNA 序列: 一组衍生于 HC1(品系 26)转基因 JHD 小鼠, 在分离 RNA 前 5 天, 我们通过注射一次抗原而免疫了所述小鼠; 第二组衍生于 HC1(品系 26)转基因 JHD 小鼠, 我们在分离 RNA 前 5 个月, 开始每隔 3 天通过注射抗原而使所述小鼠超免疫; 第二组衍生于 HC1(品系 26)转基因 JHD 小鼠, 我们在分离 RNA 前 5 个月, 开始每隔 3 天通过注射抗原而使所述小鼠超免疫。接触 5 天后的小鼠的 13 个 V 区中, 只有 2 个含有任何非种系编码的核苷酸。这些 V 中的每个均只含有一个核苷酸改变, 该样品产生总体细胞突变的频率不到 0.1%。相反, 来自超免疫动物的 13 个 V 序列没有一个完全是种系的, 总的体细胞突变频率为 1.6%。

比较从一个组织样品中分离的 μ 和 γ 1 转录物表明, 体细胞突变的频率在经过类型转换的转基因拷贝中更高。我们从超免疫 HC1 品系 57 转基因 JHD 小鼠中分离并部分测序了 47 个独立的 μ 和 γ 1 cDNA 克隆(图 67A 和 67B)。就种系序列而言, 大部分 μ cDNA 克隆是未修饰的, 而一半以上的 γ 1 克隆含有多个非种系编码的核苷酸。表达 γ 1 的细胞不同于表达 μ 的细胞, 而两种方法不是必需相连的, 类型转换和体细胞突变发生在同一 B 细胞亚种群中。

尽管我们在未超免疫的 CH1 转基因小鼠中未广泛地发现 VH251 基因的体细胞突变, 但我们在自然 HC2 转基因小鼠的 VH56p1 和 VH51p1 基因中发现了相当多的体细胞突变。我们从未免疫的 9 周龄雌性 HC2 转基因动物中分离了脾和淋巴结 RNA。我们用 V 和 γ 1 特异性引物, 逐个扩增 γ 1 转录物, 在所述转录物中在 HC2 转基因中掺入了 4 个 V 区中的一个。特异性 PCR 产物的相对产率是 VH56p1>VH51p1>VH4.21>VH251。尽管该技术未严格定量, 但可以说明在 HC2 小鼠偏向使用 V 片段。图 68 表示 23 个随机检出的 γ ' cDNA 序列, 所述序列衍生于使用等摩尔混合的所有 4 种 V 特异性引物所进行 PCR 扩增。我们再次观察到偏向 VH56p1(19/23 克隆)。此外, VH56p1 序列有相当的体细胞突变, 在 V 基因片段内的总频率为 2.1%。检测 CDR3 序列表明, 尽管 19 个

VH56p1 克隆中的 17 个是单一的,但它们只衍生于 7 种不同的 VDJ 重排事件。因此在自然动物中可能是通过内源病原体或自身抗原筛选了表达 VH56p1 的 B 细胞。可能相关的是所述同一基因在人胎儿库中是过度表现的(over-represented)。

总结

上游顺式作用序列限定了各个转换区的功能,而且对于类型转换是必需的。我们的观察结果-在 HC1 转基因中的类型转换主要限于与二级反应有关的细胞,而且在整个 B 细胞种群中不是随机发生-这说明转基因内所含的最小序列就足够了。由于在该构建体中所含的 γ 序列仅开始于 γ 无效转录物起始位点上游的 116 个核苷酸,因此转换调节区是致密的。

我们的结果表明这些重要的顺式作用调节元件要么与各个 γ 基因紧密相连,要么与 HC1 和 HC2 转基因中所含的 3' 重链增强子相连。由于 HC1 和 HC2 插入片段进行转基因自体类型转换-这可作为已经进行了体细胞突变的序列的标记-我们能够很容易地发现超突变转录物,所述转录物不是来源于向内源座位的转座。我们在 3 个独立的转基因品系(两个 HC1 品系和一个 HC2 品系)中发现了体细胞突变的 γ 转录物。因此转基因整合位点侧翼的序列不可能影响该过程;相反,转基因序列足以指导体细胞突变。

实施例 36

本实施例描述从小鼠产生杂交瘤,所述小鼠是失活内源免疫球蛋白座位纯合的并含有编码人序列重链和轻链的转基因序列。所述杂交瘤分泌单克隆抗体,所述单克隆抗体含有人序列重链和人序列轻链并与在 T 淋巴细胞上表达的预定抗原结合。本实施例还说明小鼠产生人序列抗体以应答人衍生的免疫原(人 CD4)的能力,以及所述小鼠作为制备杂交瘤的来源的适宜性,所述杂交瘤分泌与人抗原反应的人序列单克隆抗体。

A. 产生从用人 CD4 抗原免疫的 HC1 转基因小鼠中衍生的人 Ig 单克隆抗体

免疫转基因小鼠,所述小鼠是功能破坏的 J_H 座位纯合的并含有能够进行重排以编码人序列重链的转基因和能够进行重排以编码人序列轻链的转基因。所述小鼠的表型是 $HC1\text{-}26^+KC1e\text{-}1536^+J_HD^+/J_KD^-$,说明是鼠重链失活纯合的并存在种系拷贝的 HC1 人序列重链转基因和 KC1e

人序列轻链转基因。

用表达小鼠-人杂种 CD4 分子(该分子由稳定转染的多核苷酸编码)的 EL4 细胞系(ATCC)变异体免疫小鼠。表达的 CD4 分子含有基本上类似人的 CD4 序列。在 0 天,将在 100 ul PBS 与 100 ul 完全弗氏佐剂中的 5×10^6 个细胞经腹膜内注射导入小鼠。在 7、14、21、28、60 和 77 天重复接种,在 18、35 和 67 天检测血样。在 81 天取出脾,然后将约 7.2×10^7 个脾细胞与约 1.2×10^7 个融合配对细胞(P3x63Ag8.653 细胞系; ATCC)通过标准方法(PEG 融合法)融合,然后在 RPMI 1640 15% FCS、4mM 谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠加 HAT 和 PSN 培养基中培养。进行多融合。

使杂交瘤生长并用 ELISA 检测上清液与市售的、在 CHO 细胞中表达的纯化重组可溶人序列 CD4(American Bio-Technologies ,Inc. (ABT), Cambridge, MA)和/或得自 NEN-DuPont 的 CD4 的结合情况。ABT 样品含纯化的 55 kD 人 CD4 分子,该分子含有人 CD4 的 V_1 - V_3 结构域。将重组的人序列 CD4(在 CHO-K1 细胞中生产的)吸附到检测板上,然后用于捕获来自杂交瘤上清液的抗体,然后评估捕获的抗体与一组抗体(所述抗体结合人 μ 、人 κ 、人 γ 、鼠 μ 或鼠 κ)的结合情况。

将一个杂交瘤亚克隆到其培养板孔中,命名为 1F2、与 ABT CD4 制剂结合的 1F2 抗体是人 μ 和人 κ 阳性的,但是人 γ 、小鼠 γ 和小鼠 κ 阴性的。

B. 产生从用人 CD4 和人 IgE 免疫的 HC2 转基因小鼠中衍生的人 Ig 单克隆抗体

图 56 中列出了重链转基因,并已在上文作了描述(参见实施例 34)。

通过将两个克隆的 DNA 片段共整合在小鼠基因组的一个位点中而产生图 56 中所述的人轻链转基因 Kco4。该片段含有 4 个功能 V_K 片段、5 个 J 片段、 C_K 外显子和所有两个内含子和下游增强子元件(参见实施例 21)(Meyer and Neuberger (1989) EMBO J. 8:1959-1964; Judde and Max (1992) ,Mol. Cell Biol. 12:5206-5216)。由于这两个片段享有共同的 3 kb 序列(见图 56),所以它们可以有效整合到基因组 DNA 中作为一个连续的 43 kb 转基因,然后在重叠序列之间进行同源重组。已经表明所述重组事件经常发生在微注射重叠的 DNA 片段后(Pieper et al.,(1992) Nucleic

Acids Res. 20:1259-1264)。共注射的 DNA 还倾向于共整合在受精卵中，各克隆片段中所含的序列随后在 B 细胞发育过程中通过 DNA 重排而被连接。表 12 表明，来自至少 2 个转基因品系的转基因插入片段是有功能的。在该组 36 个克隆中代表了 VJ 连接的实例，所述 VJ 连接掺入了 4 个转基因编码的 V 片段中的一个和 5 个 J 片段中的一个。

表 12

品系	V _{K65.5}	V _{K65.8}	V _{K65.15}	V _{K65.3}	J _{K1}	J _{K2}	J _{K3}	J _{K4}	J _{K5}
#4436	0	11	4	3	14	1	0	2	1
#4437	1	3	7	7	5	2	1	7	3

在 KCo4 转基因小鼠中人轻链 V 和 J 片段的使用。该表列出了从两个转基因品系的 cDNA 扩增的 PCR 克隆的数量，所述品系含有所示人 κ 序列。用从 w 各个 KCo4 转基因小鼠(小鼠#8490,3 mo., 雄性, KCo4 系 4437; 小鼠#8867.2.5mo., 雌性 KCo4 系 4436)分离的脾 RNA 合成 cDNA。用下列 C_K 特异性寡核苷酸: 5' TAG AAG GAA TTC AGC AGG CAC AACA ACA GAG GCA GTT CCA 3' 和下列 2 个 V_K 特异性寡核苷酸的 1:3 混合物: 5' AGC TTC TCG AGC TCC TGC TGC TCT GTT TCC CAG GTG CC3' 和 5' CAG CTT CTC GAG CTC CTG CTA CTC TGG CTC (C, A)CA GAT ACC 3' 通过 PCR 扩增 cDNA。用 XhoI 和 EcoRI 消化 PCR 产物，然后克隆到质粒载体中。通过双脱氧链终止法，确定从各动物中随机检出的 18 个克隆的部分核苷酸序列。将各克隆的序列与未重排转基因的种系序列进行比较。

从注射的胚胎发育出了 23 个轻链小座位阳性和 18 个重链阳性小鼠。将这些小鼠和其子代与在内源小鼠重链(品种 JHD)和 κ 轻链座位(品种 JCKD)含靶向突变的小鼠交配以得到含人重和 κ 轻链，不含功能性小鼠重和 κ 轻链座位的小鼠。在这些小鼠中，如果有的话，仅小鼠轻链来自小鼠 λ 座位。

表 13 说明体细胞突变发生于转基因小鼠的转基因编码的人重链转录物可变区中。将来自 HC2 转基因小鼠的 23 个 cDNA 克隆部分测序以确定在可变区内非种系编码的寡核苷酸的频率。数据仅包括各克隆 V 片段密码子 17-94 的序列，不包括 N 区。从小鼠 5250(HC2 品系 2550 半合的, JHD 纯合的)的脾和淋巴结中分离 RNA。按所述(参考文献)合成单链 cDNA，并用 PCR 扩增 γ 转录物。将扩增的 DNA 克隆到质粒载体中，然后通过双脱氧链终止法将 23 个随机检出的克隆部分测序。从恒定区

序列估测 PCR 导入核苷酸改变的频率<0.2%。

表 13：在 HC2 转基因小鼠人 γ 转录物的
可变区含有非种系编码的核苷酸

VH 片段	克隆数	非种系编码 的核苷酸数	非种系编码的 核苷酸频率(%)
VH251	0		-
VH56P1	10	100	2.1
VH51P1	1	5	2.0
VH4.21	3	0	0.0

流式细胞计数

我们用 FACSscan 流式细胞计数器和 LYSSES II 软件(Becton Dickinson ,San Jose ,CA)分析染色的细胞。用下列试剂将脾细胞染色：二碘化丙锭(Molecular Probes, Eugene ,OR)、藻红蛋白结合的 α 人 Ig κ (克隆 HP6062 ; CalTag, South San Francisco ,CA)、藻红蛋白结合的 α 小鼠 Ig κ (克隆 X36 ; Becton Dickinson ,San Jose , CA)、FITC 结合的 α 小鼠 Ig μ (克隆 R6-60.2 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、FITC 结合的抗小鼠 Ig λ (克隆 R26-46 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、FITC 结合的 α 人 Ig μ (克隆 G20-127 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)、和 Cy-Chrome 结合的 α 小鼠 B220(克隆 RA3-6B2 ; Pharmingen ,San Diego ,CA)。

人 Ig 转基因的表达

图 69 说明用流式细胞计数分析来自 KCo4 和 HC2 小鼠的脾细胞，所述两种小鼠是 JHD 和 JCKD 突变纯合的。人序列 HC2 转基因获救了 JHD 突变背景中的 B 细胞发育，将脾中 B220⁺细胞的相对数量恢复到野生型动物的大约一半。这些 B 细胞表达细胞表面免疫球蛋白受体，所述受体使用转基因编码的重链。人 Kco4 转基因也是有功能的，并成功地与完整内源 λ 轻链座位进行竞争。在 JHD/JCKD 纯合突变小鼠中，近 95%的脾 B 细胞表达完整的人细胞表面 IgM κ ，所述小鼠含有重和轻链人转基因(双转基因)。

按如下通过 ELISA 确定血清 Ig 水平：人 μ ：用小鼠单克隆抗体 α 人 IgM(克隆 CH6 , The bingding Site ,Birmingham ,UK)包被微滴定孔，用过氧化物酶结合的山羊 α 人 IgM(fc)(cat #309-035-095, Jackson Immuno Research,West Grove ,PA)显色。人 γ ：用小鼠单克隆抗体 α 人 IgG1(克隆

HP6069, Calbiochem, La Jolla, CA)包被微滴定孔, 用过氧化物酶结合的兔 α 人IgG(fc)(cat #109-036-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA)显色。人 κ : 用小鼠单克隆抗体 α 人Ig κ (cat #0173, AMAC, Inc.)和Ig κ (cat #A7164, Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)包被微滴定孔。小鼠 γ : 用山羊 α 小鼠IgG(cat #115-006-071, Jackson Immuno Research, West Grove, PA)包被微滴定孔。小鼠 λ : 用大鼠单克隆抗体 α 小鼠Ig λ (cat #02171D, Pharmingen, San Diego, CA)包被微滴定孔, 然后用过氧化物酶结合的兔 α 小鼠IgM(fc)(cat #309-035-095, Jackson Immuno Research, West Grove, PA)显色。通过与过氧化氢和2,2'-连氨基-二-(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)一起保温来检测结合的过氧化物酶。通过在415 nm的吸收值来测量反应产物。

双转基因小鼠还在血清中表达全部人抗体。图70说明18个双转基因小鼠免疫球蛋白的测量的血清水平, 所述小鼠是内源重链和 κ 轻链失活纯合的, 衍生于数个不同的转基因建立者动物。我们发现了可检测水平的人 μ 、 $\gamma 1$ 和 κ 。我们在上文已经说明人 $\gamma 1$ 的表达是通过转基因 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间的基因组重组, 从真正的类型转换产生的。此外, 我们还发现转基因内类型转换总是伴随着重链可变区的体细胞突变。除人免疫球蛋白外, 我们还在血清中发现了小鼠 γ 和 λ 。小鼠 λ 蛋白质的存在是预期的, 因为内源性座位完全完整。另外我们还显示了小鼠 γ 的表达是转基因VDJ片段反式转换重组到内源重链座位中的结果。该反式转换现象(最初认为是野生型重链等位基因和重排的VDJ转基因的现象, (Durdik et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2346-2350; Gerstein et al., (1990), Cell, 63:537-548))发生于突变JHD背景中, 原因在于下游重链恒定区和其相应的转换元件仍是完整的。

人IgM κ 在双转基因小鼠中的血清浓度是约0.1 mg/ml, 在动物或品系之间几乎没有偏差。但是人 $\gamma 1$ 、小鼠 γ 和小鼠 λ 水平的范围从0.1-10 mg/ml。个体动物之间观察到的 γ 水平的偏差可能是 γ 是可诱导恒定区这一事实的结果。表达可能取决于许多因素如动物的健康状态、与抗原的接触以及可能的MHC型。小鼠 λ 血清水平仅仅是与各转基因品系相关的参数。每整合有最少拷贝鼠转基因的KCo4系4436小鼠(约1-2拷贝)有最高的内源 λ 水平, 而KCo4系4437小鼠(每整合约10个拷贝)有最低的 λ 水平。这与内源 λ 随后重排成 κ 转基因的模型一致, 而且在所述模型中, 不筛选血清 λ 水平, 但却反映了前体B细胞库的相对大小。含多个轻链插入片段的转基因座位有机会进行一次以上的V到J重排事

件，随着可能性的提高，它们之中的一个将是功能性的。因此，高拷贝品系潜在的 λ 细胞库较小。

用人 CD4 和 IgE 免疫

为了检测转基因 B 细胞参与免疫反应的能力，我们用人蛋白质抗原免疫双转基因小鼠，然后用 ELISA 测量抗原特异性免疫球蛋白的血清水平，用在完全弗氏佐剂中的 50 μg 与聚苯乙烯珠 (cat# 08226, Polysciences Inc. Warrington, PA) 共价相连的重组 sCD4 (cat# 013101, American Bio-Technologies Inc., Cambridge, MA) 经腹膜内注射免疫小鼠。各小鼠是内源 μ 和 κ 座位破坏纯合的，人重链转基因 HC2 系 2500 和人 κ 轻链转基因 Kco4 系 4437 是半合的。

方法

将稀释的血清样品加到用重组 sCD4 包被的微滴定孔中。用过氧化物酶结合的兔 α 人 IgM(fc) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) 或过氧化物酶结合的山羊抗人 Ig κ (Sigma, St. Louis, MO) 检测人抗体。

图 71A 说明用重组人可溶性 CD4 免疫的转基因小鼠的初级反应。所有 4 个免疫的动物在一周时均有抗原特异性人 IgM 反应。CD4 特异性血清抗体含有人 μ 重链和人 κ 轻链。

为了评估 HC2 转基因参与二级反应的能力，我们用抗原重复注射来超免疫转基因小鼠，并监测诱导抗体的重链同种型。在 0 天，将人重链转基因 HC2 和人 κ 轻链转基因 Kco4 纯合的小鼠用在完全弗氏佐剂中的 25 μg 人 IgE κ (The Binding Site, Birmingham, UK) 免疫。此后，约每隔一周，用不完全弗氏佐剂中的 IgE κ 注射动物。将血清样品以 1:10 稀释，在人 IgE、 λ 包被的平板上进行抗原特异性 ELISA。

图 71B 说明这些动物免疫反应的典型时间过程：我们用在完全弗氏佐剂中的人 IgE 注射双转基因小鼠，然后每周用不完全弗氏佐剂中的 IgE 加强。开始的人抗体反应是 IgM κ ，然后出现抗原特异性人 IgG κ 。在这些小鼠中，诱导的血清抗体与人 IgM 或 BSA 没有交叉反应。在此过程中，人 IgG 产生。

我们还监测了重链转基因在体外进行类型转换的能力：存在 LPS 和重组小鼠 IL-4 的条件下，将从相同重链构建体半合动物 (HC2, 系 2500)

纯化的脾 B 细胞从人 IgM 转换成人 IgG1。但是，存在 LPS 和重组小鼠 IL-4，或仅 LPS 的条件下，未发生体外转换。

我们发现在双转基因/双失效(0011)小鼠的脾、淋巴结、腹膜和骨髓中有表达人 IgM 的细胞。尽管腹腔含有正常数量的 B 细胞，但在骨髓和脾中绝对数量的转基因 B 细胞为正常细胞的约 10-50%。这种减少可能产生于转基因依赖性 B 细胞发育的延迟。双转基因/双失效(0011)小鼠还在血清中表达全部人抗体，在这些小鼠中有显著水平的人 μ 、 $\gamma 1$ 和 κ 。表达的人 $\gamma 1$ 产生于转基因 μ 和 $\gamma 1$ 转换区之间通过基因组重组而进行的真正类型转换。此外，转基因内的类型转换总是伴有转基因所编码的重链可变区的体细胞突变。除人免疫球蛋白外，我们在这些小鼠中还发现了小鼠 μ 和 λ 。小鼠 μ 的表达可能是反式转换重组的结果，其中转基因 VDJ 被重组到内源小鼠重链座位。反式转换(最初在野生型重链等位基因和重排的 VDJ 转基因中观察到的)发生于我们的 J_H^- 背景，因为小鼠下游重链恒定区和其相应的转换元件仍是完整的。

为了说明转基因 B 细胞参与免疫反应的能力，我们用人蛋白质抗原免疫 0011 小鼠，然后监测抗原特异性免疫球蛋白的血清水平。最初的人抗体反应是 IgM，然后表达抗原特异性人 IgG(图 71B 和图 73)。出现人 IgG 抗体的延迟现象与类型转换和对抗原的二级反应之间的关系一致。

在用人 CD4 免疫的转基因小鼠中，在血清浓度为 2×10^{-2} - 1.6×10^{-4} 小范围内可检测到人 IgG 对 CD4 抗原的反应性。

鉴定抗人 CD4 杂交瘤

在 0 天，用在完全弗氏佐剂中的 20 μ g 重组人 CD4 免疫人重链转基因 HC2 和人 κ 轻链转基因 KCo4 纯合的转基因小鼠。此后，以约每周的间隔用在不完全弗氏佐剂中的 CD4 注射动物。图 73 表示在转基因小鼠血清中，对人 CD4 的人抗体反应。将血清样品以 1: 50 稀释，然后在人 CD4 包被的平板上进行抗原特异性 ELISA。各线代表单个样品的测定值。实心圈代表 IgM，空心方块代表 IgG。

我们还从应答人 CD4 免疫的一只小鼠中分离了杂交瘤细胞系。克隆的 5 个杂交瘤分泌人 IgG κ (人 $\gamma 1$ /人 κ)抗体，所述抗体结合重组人 CD4 但与一组其它糖蛋白抗原没有交叉反应(用 ELISA 测量的)。确定免疫用

人 CD4 抗原与单克隆抗体的结合和解离速率, 所述抗体是由两个 IgG κ 杂交瘤, 4E4.2 和 2C5.1 分泌的。抗体 4E4.2 和 2C5.1 的实验产生的结合常数(K_a)分别为约 $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 和 $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 。这些 K_a 值落在其他人 (Chen et al., (1993) Int. Immuno. 6:647) 已用于临床试验的鼠 IgG 抗人 CD4 抗体的范围内。

在 0、13、20、28、33 和 47 天, 用人 CD4 免疫小鼠品系 #7497 (0012; HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610++), 产生的抗人 CD4 抗体含有人 κ 和人 μ 或 γ 。

28 天末, 在血清中发现了人 μ 和人 κ 。在 47 天末, 抗人 CD4 的血清反应包括了人 μ 和 γ , 以及人 κ 。在 50 天, 将脾细胞与 P3X63-Ag8.653 小鼠骨髓瘤细胞融合并培养。700 个孔中的 44 个 (6.3%) 含有人 γ 和/或 κ 抗人 CD4 单克隆抗体。证实这些孔中有 3 个含有人 γ 抗 CD4 单克隆抗体, 但没有 κ 链 (可能是表达了小鼠 λ)。初级孔中的 9 个含有完整的人 IgM κ 抗 CD4 单克隆抗体, 筛选后进一步表征。将表达完全的人 IgM κ 抗 CD4 单克隆抗体的一个所述杂交瘤命名为 2C11-8。

通过有限的稀释克隆初级杂交瘤, 然后评估分泌与 CD4 反应的人 μ 和人 κ 单克隆抗体。9 个杂交瘤中有 5 个在 CD4 ELISA 中仍是阳性。通过其与其他抗原 (包括卵清蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白和癌胚抗原) 没有反应性来说明人 CD4 的这些 IgM κ 单克隆抗体特异性。为了确定这些单克隆抗体是否识别细胞表面上的 CD4 (即天然 CD4), 检测来自这 5 个克隆的上清液与 CF4+ T 细胞系, Sup Y1 的反应性。5 个人 IgM κ 单克隆抗体中, 有 4 个与这些 CD4+ 细胞反应。为了进一步确定这些 IgM κ 单克隆抗体特异性, 用这些抗原将新鲜分离的人外周血淋巴细胞 (PBL) 染色。衍生于 5 个初级杂种中的 4 个克隆仅与 CD4+ 淋巴细胞结合, 而不与 CD8+ 淋巴细胞结合 (图 72)。

图 72 说明 IgM κ 抗 CD4 单克隆抗体与人 PBL 的反应性。将人 PBL 与来自各克隆的上清液或同种型匹配的阴性对照单克隆抗体, 然后是与 PE 结合的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体 (顶行) 或与 FITC 结合的小鼠抗人 CD8 抗体 (底行) 一起保温。用与 FITC 或 PE 结合的小鼠抗人 μ 分别检测结合的人 IgM κ 。给出了克隆之一 2C11-8 (右侧翼) 和对照 IgM κ (左侧翼) 的代表性结果。如所预期的, 阴性对照 IgM κ 不与 T 细胞反应, 而山羊抗人 μ 与约 10% 的 PBL 反应, 这可能是人 B 细胞。

在选择用于发育的单克隆杂交瘤细胞系时,良好的生长和高水平的IgM κ 抗CD4单克隆抗体生产是重要的因素。来自杂交瘤2C11-8的数据表明,可产生高达5 pg/细胞/d(图74)。用第二个克隆可得到相似的结果。正如通常所观察到的,细胞进入静止生长期后,生产显著增加。图74表示在小规模培养中细胞生长和人IgM κ 抗-CD4单克隆抗体的分泌。用 2×10^5 个细胞/ml的2 ml总体积接种重复培养物。此后连续4天,每隔24小时收集培养物。通过计数活细胞确定细胞生长,通过总的人 μ 的ELISA确定IgM κ 的生产量(顶行)每细胞每天的产量计算为IgM κ 的量除以细胞数(底行)。

图75表示人IgM κ 抗CD4单克隆抗体的表位图谱。用竞争结合的流式细胞计数试验定位由IgM κ 抗CD4单克隆抗体,2C11-8识别的表位。为了这些研究,使用小鼠抗CD4单克隆抗体,Leu3a和RPA-T4,所述抗体与CD4上特有非重叠表位结合。用PE结合的山羊抗人IgM检测CD4⁺细胞的PE荧光,所述CD4⁺细胞与依次降低浓度的RPA-T4或Leu3a预保温。Leu3a有人IgM κ 抗CD4单克隆抗体2C11-8的浓度依赖性竞争结合,而RPA-T4没有(图75)。因此,由2C11-8识别的表位相似于或相同于由单克隆抗体Leu3a识别的表位,但不同于由RPA-T4识别的表位。

总之,我们生产了数种分泌人IgM κ 单克隆抗体的杂交瘤克隆,所述单克隆抗体与天然人CD4特异性反应并可用于分辨人PBL的CD4⁺和CD4⁻亚种群。这些抗体中至少一种结合或接近由单克隆抗体Leu3a识别的表位。已经表明针对该表位的单克隆抗体可抑制混合的白细胞反应(Engleman et al., J. Exp. Med.(1981),153:193)。已表明单克隆抗体Leu3a的嵌合体对蕈样霉菌病有一些临床效果(Knox et al., (1991)Blood,77:20)。

我们从3个不同的杂交瘤细胞系(2C11.8, 2C5.1和4E4.2)中分离了cDNA,并确定了各个细胞系中所表达的免疫球蛋白基因的部分核苷酸序列。为了进行序列分析,从约 5×10^6 个杂交瘤细胞中分离总RNA。用oligo dT通过引发反转录来合成双链cDNA。将部分该双链cDNA用于由具有下列特异性的oligo库引发的两个PCR反应(i)HC1或HC2转基因所含的重链可变框架区和恒定人 γ 序列特异性的一个下游寡核苷酸,或(ii)KC2或KCo4转基因中所含的轻链可变框架区和恒定人 κ 序列特异

性的一个下游寡核苷酸。用适宜的限制酶消化来自这些 PCR 反应的产物，凝胶纯化，然后分别克隆到 pNN03 载体中。分离 DNA 并对单链 DNA 进行人工双脱氧和/或自动荧光测序反应。

下列表 11 中列出了 3 个杂交瘤 2C11.8、2C5.1 和 4E4.2 的特征。

表 11 杂交瘤中所用的人可变区

亚克隆	特异性	同种型	Vh	Dh	Jh	Vκ	Jκ
2C11.8	nCD4	IgMκ	251	nd.*	nd.	nd.	nd.
2C5.1	rCD4	IgGκ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4
4E4.2	rCD4	IgGκ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4

n.d., 未检测

对来自两个 IgGκ 杂交瘤 2C5.1 和 4E4.2 所表达的重和轻链序列进行核苷酸序列分析表明它们是衍生于同一祖先 B 细胞的姊妹克隆。这两个克隆的重和轻链 V(D)J 连接是相同的，尽管推测的体细胞突变所确定的精确核苷酸序列有区别。重链 VDJ 连接序列是：

VH251					N	DHQ52				JH5			
TAT	TAC	TGT	GCG	AG	(g gct cc)	A	ACT	GGG	GA	C	TGG	TTC	GAC
Y	Y	C	A	R	A	P	T	G	D	W	F	D	

轻链 VJ 连接是：

Vk65.15						N	Jk4		
TAT	AAT	AGT	TAC	CCT	CC	(t)	ACT	TTC	GGC
Y	N	S	Y	P	P		T	F	G

鉴定了下列非种系编码的密码子(推测的体细胞突变)：

2CS.1	重链	AGC->AGG	S28R	(置换)
	轻链	CCG->ACG	P119T	(置换)
4E4.2	重链	AGC->AGG	S28R	(置换)
		CTG->CTA	L80L	(沉默)
	轻链	GAG->GAC	E41D	(置换)
		AGG->AAG	R61K	(置换)
		CCG->ACG	P119T	(置换)

我们得出结论这两个 γ 杂交瘤衍生于经过了有限体细胞突变的B细胞。该数据表明 HC2 转基因动物使用 VH5-51(aka VH251)片段。我们以前已表明 VH4-34, VH1-69 和 VH3-30.3 由这些小鼠表达。这些结果结合起来说明 HC2 转基因小鼠表达所有 4 种转基因编码的人 VH 基因。

我们得出结论表达人免疫球蛋白的 B 细胞进行了发育并应答在小鼠免疫系统中的抗原。抗原反应性导致了免疫球蛋白重链同种型转换和可变区体细胞突变。我们还表明可用常规杂交瘤技术从这些小鼠中得到单克隆人序列抗体。因此, 这些转基因小鼠可作为抗人靶抗原之人抗体的来源。

实施例 37

本实施例描述了转基因小鼠的产生, 所述转基因小鼠是失活内源重链和 κ 链座位纯合的并含有能够同种型转换成多个下游人 C_H 基因的转基因。本实施例还说明了通过共微注射含重叠同源序列连接点(见图 76)的多个 DNA 片段, 组装大转基因(如 160 kb)的克隆方法, 这样在体内(如在微注射的 ES 细胞或其克隆子代中)待组装的一组片段的远末端通过多个同源区的同源重组而从两个以上的重叠片段构建大转基因。本实施例还表明, 连同其它事情, 例如用 IL-4 和 LPS 体外可诱导来自转基因动物的分离的淋巴细胞进行同种型转换。

构建一组 5 个不同的质粒克隆以便可分离基本上不含其它载体序列的质粒插入片段; 并以便使插入片段一起形成一个叠盖组的、约 150 kb 长的重叠序列。该组包括人 V、D、J、 μ 、 $\gamma 3$ 和 $\gamma 1$ 编码序列, 以及小鼠重链 3' 增强子序列。5 个克隆以 5'-3' 的顺序依次是: pH3V4D、pCOR1xa、p11-14、pP1-570 和 pHP-3a(图 76)。用一些不同的克隆载体产生该组克隆。设计一些载体以具体地用于构建大转基因的目的。这些载体(pGP1a、pGP1b、pGP1c、pGP1d、pGP1f、pGP2a 和 pGP2b)是以 PBR322 为基础的质粒, 这些质粒在每个细胞中的拷贝数低于 pUC 载体(Yanisch-Perron et al., (1985) Gene 33:103-119)。所述载体还包括在多接头和质粒 β -内酰胺酶基因 3' 端之间的 trpA 转录终止信号。多接头侧翼为稀有切割酶 NotI 的限制位点; 因此可以在胚胎注射前, 从载体序列中分离出插入片段。NotI 位点内, 多接头在两末端之一还包括单一的 XhoI 和 SalI 位点。在 Taylor 等(1992) Nucleic Acids Res. 23:6287 中描述了 pGP1 载体。为了产生 pGP2 载体, 首先用 AlwNI 消化 pGP1f, 然后与合成的寡核苷酸 o-236 和 o-237(o-236: 5'-ggc gcg cct tgg cct aag agg

cca -3' ; o-237 : 5' -cct ctt agg cca agg cgc gcc tgg-3')相连。将所得的质粒命名为 pGP2a 。然后用 KpnI 和 EcoRI 消化质粒 pGP2a , 然后与寡核苷酸 o-288 和 o-289 相连(o-288 : 5' -aat tca gta tcg atg tgg tac-3' ; o-289 : 5' -cac atc gat act g-3')以得到 pGP2b(图 7A 和图 77B)。

在图 78 中描述了用 pGP 质粒进行转基因构建的一般方法(途径 A 和 B)。以相同的 5' 到 3' 的方向, 将所有的成分 DNA 片段首先逐个克隆在 pGP 载体中。通过寡核苷酸诱变或如果可能通过部分小鼠、聚合酶补平以及平整末端连接来破坏插入片段的 NotI、XhoI 和 SalI 位点。这样只在各插入片段 5' 和 3' 末端有多接头衍生的 XhoI 和 SalI 位点。然后通过从一个克隆中分离 XhoI/SalI 片段, 然后将分离的片段插入另一克隆的 5' XhoI 或 3' SalI 位点而逐步组合各插入片段(图 78, 途径 A)。通过与一个或多个插入片段过滤杂交来筛选转化体以得到组装的克隆。由于 XhoI/SalI 连接不能由两种酶中的任一种裂解, 因此所得产物保持单个 5' XhoI 和 3' SalI 位点, 然后可在构建步骤中使用。另一种方法是用载体 pGP2 和 pGP2b 完成(图 78, 途径 B)。这些质粒在氨苄青霉素抗性序列和质粒复制原点之间包含一 SfiI 位点。通过用 SfiI 和 XhoI 或 SalI 切割, 可将插入片段与药物抗性基因或复制原点一起分离。在各合成步骤中, 将一个 SfiI/XhoI 片段与另一 SfiI/XhoI 片段相连。用该方法有 3 个优点: (i)在存在氨苄青霉素的条件下, 来自这两个片段的序列是质粒复制所需的, 因此降低了背景转化体; (ii)可以仅以 5' 到 3' 的方向进行连接; 和(iii) SfiI 末端不是自我相容的, 而且不与 XhoI 或 SalI 相容, 因此降低了非生产性连接的水平。这种方法的缺点是必须除去插入片段的 SfiI 位点以及 NotI、XhoI 或 SalI 位点。这些媒介拷贝载体比常用的 pUC 衍生克隆载体有改进。为了比较这些载体保持大 DNA 插入片段的能力, 将含人 JH/C μ 区的 43 kb XhoI 片段连接到 pSP72(Promega, Madison, WI), pUC19(BRL, Grand Island, NY)和 pGP1f 的 SalI 位点。将转化体菌落转移到硝酸纤维素上, 通过与放射性探针的杂交来筛选含插入片段的克隆。使阳性克隆在 3 ml 培养基中生长过夜, 然后分离 DNA: 所得 DNA 的 EcoRI 消化片段表明 pSP72 和 pUC19 衍生的所有克隆均缺失了插入片段(图 79); 但是 18 个 pGP1f 衍生的克隆中有 12 个包含了完整的插入片段。在这 12 个克隆中两个方向都有。

下面描述构建和分离用于产生 HCo7 转基因的 5 个克隆(pH3V4D、pCOR1xa、p11-14 pP1-570 和 pHP-3a)。

pH3V4D

使用用于 VH1 和 VH3 型的合成寡核苷酸探针，从噬菌体 1 基因组 DNA 文库中分离种系构型的重链可变基因片段。VH1 型探针是 o-49：

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

VH3 型探针是 o-184：

5'- gtt tgc agg tgt cca gtg t(c,g)a ggt gca gct g(g,t)t gga gtc
(t,c)(g,c)g -3'

分离阳性杂交克隆，作部分限制图谱、亚克隆然后部分测序。从核苷酸序列中，确定用 o-49 探针分离的一个 VH1 克隆编码 VH 基因片段，49.8，含有与公开的 hv1263 基因序列(Chen et al., (1989) Arthritis Rheum. 32:72)中所含相同的氨基酸序列。用 o-184 探针分离的 3 个 VH3 基因 184.3、184.14 和 184.17，含有与 VH 基因公开序列 DP-50、DP-54 和 DP-45(Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776)所含相同的氨基酸序列。将这 4 个 VH 基因用于构建 pH3V4D 质粒。

发现 184.3 基因包含在一 3 kb BamHI 片段内。将该片段亚克隆到质粒载体 pGP1f 中以便多接头的 XhoI 位点在该基因的 5'，SalI 在 3'。将所得质粒称为 p184.3.36f。发现 184.14 基因包含在 4.8 kb HindIII 片段内。将该片段以通过 XhoI/SalI 消化可进一步将该基因分离为 3.5 kb 片段的方向亚克隆到质粒载体 pUC19 中，所述基因组 XhoI 位点在在该基因上游 0.7 kb，多接头衍生的 SalI 位点在该基因的 3'。将所得质粒命名为 p184.14.1。发现 184.17 基因包含在 5.7 kb HindIII 片段内。将该片段以多接头衍生的 XhoI 和 SalI 位点分别在在该基因 5' 和 3' 的方向亚克隆到质粒载体 pSP72(Promega, Madison, WI)中。该质粒的插入片段含有在该基因 3' 的 XhoI 位点，通过用 XhoI 部分消化、Klenow 补平然后再连接可除去该位点。将该片段亚克隆质粒载体 pNN03，以便多接头衍生的 XhoI 和 ClaI 位点分别在所得的质粒称为 p184.12SK。发现 49.8 基因包含于 6.3 kb × baI 片段内。该基因的 5' 和 3' 以产生质粒 pVH49.8(Taylor et al., (1994) International Immunol 6:579)。然后将 pVH49.8 的 XhoI/ClaI 插入片段亚克隆到 pGP1f 中以产生质粒 pVH49.8f，该质粒在 49.8 基因的 5' 和 3' 末端分别包含单一的 XhoI 和 SalI 位点。

将 p184.14.1 的 3.5 kb XhoI/SalI 片段克隆到 p184.3.36f 的 XhoI 位点

以产生质粒 pRMVH1, 该质粒以相同的方向包含 184.14 和 184.3 基因。用 XhoI 消化该质粒, 插入 p184.17SK 的 5.7kb XhoI/SalI 片段以产生质粒 pRMVH2, 该质粒从 5' 到 3' 的方向含 3 个 VH 基因, 184.17、184.14 和 184.3, 均以相同的方向。然后用 XhoI 切割质粒 pRMVH2, 插入 pVH49.8f 的 6.3 kb XhoI/SalI 插入片段以产生质粒 pH3VH4, 该质粒从 5' 到 3' 的方向含 4 个 VH 基因, 49.8、184.17、184.14 和 184.3, 均以相同的方向。

将人 D 区克隆 pDH1(上文所述; 例如在实施例 12 中)的 10.6 kb XhoI/EcoRV 插入片段克隆到 XhoI/EcoRV 消化的 pGPe 质粒载体以产生新质粒 pDH1e。然后用 EcoRV 消化该质粒, 然后与含 SalI 位点(5'-ccg gtc gac ccg-3')的合成接头片段相连。所得质粒 pDH1es 包含在插入片段内的大部分人 D1 簇, 可用 XhoI 和 SalI 消化所述插入片段, 以便 XhoI 位点在 5' 末端, SalI 位点在 3' 末端。分离该插入片段, 然后克隆到 pH3VH4 的 SalI 位点以产生质粒 pH3VH4D, 该质粒含有 4 个种系构型的人 VH 基因片段和 8 个种系构型的人 D 片段, 所有均以 5'-3' 的相同方向。通过用 NotI 消化分离出基本上不含载体序列的该克隆的插入片段。

pCOR1xa

将含有 32 kb XhoI 插入片段的质粒 pCOR1(上文所述)用 XhoI 部分消化、Klenow 处理, 然后与合成的 SalI 接头相连以产生新质粒 pCOR1xa, 所述插入片段含有 9 个人 D 片段、6 个人 J 片段、J μ 内含子重链增强子、 μ 转换区和 C μ 编码外显子, 质粒 pCOR1xa 在 5' 末端含有单一的 XhoI 位点, 在 3' 末端含单一的 SalI 位点。pCOR1 和 pCOR1xa 均在 3' 末端含有 0.6 kb 大鼠重链 3' 增强子片段, 如果用 NotI 代替 XhoI 或 XhoI/SalI 消化该质粒, 则所述 0.6 kb 大鼠重链 3' 增强子片段被包含在插入片段内。

用寡核苷酸引物对, 通过 PCR 筛选噬菌体 P1 文库(Genome Systems Inc., St.Louis, Missouri):

5'- tca caa gcc cag caa cac caa g -3'
5'- aaa agc cag aag acc ctc tcc ctg -3'

设计该引物对以用人 γ 基因模板产生 216 bpPCR 产物。发现鉴定的一个 P1 克隆在 80 kb 的插入片段内含有人 γ 3 和 γ 1 基因。通过 NotI 和 SalI

消化可分离出基本上不含载体序列的该克隆的插入片段(在图 80 中描述了)。

p11-14

人 $\gamma 3/\gamma 1$ 克隆 P1-570 的限制性图谱表明 14 kb BamHI 片段靠近插入片段的 5' 末端。将该 14 kb 片段亚克隆到质粒载体 pGP1f 中, 以便多接头衍生的 Sall 位点与插入片段的 5' 末端相邻。将所得的质粒命名为 pB14。另外, 用合成的寡核苷酸衔接子, 将衍生于质粒克隆 pJ1NA(Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117)的 11 kb NdeI/SpeI 基因组 DNA 片段(覆盖了人 μ 基因的 3' 末端和人 δ 基因的 5' 末端)亚克隆到 pBluescript(Stratagene, LaJolla, CA)的 Sall 位点。然后分离所得的 Sall 插入片段, 然后克隆到 pB14 的 Sall 位点以便 pJ1NA 的 μ 片段的 5' 到 3' 方向与 P1-570 的 γ 片段的方向相同。将所得克隆命名为 p11-14。通过 NotI 消化分离出基本上不含载体序列的该克隆的插入片段。

pHP-3a

从 balb/c 小鼠基因组 DNA 噬菌体 λ 文库克隆小鼠重链 3' 增强子 (Dariavach et al. (1991) Eur. J. Immuno. 21:1499; Lieberson et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:933)。为了得到探针, 用总 balb/c 小鼠胸腺 DNA 作为模板用于 PCR 扩增, 用下列两种寡核苷酸:

cck76: 5'- caa tag ggg tca tgg acc c -3'
cck77: 5'- tca ttc tgt gca gag ttg gc -3'

用 TA Cloning™试剂盒(Invitrogen, San Diego, CA)克隆所得的 220 bp 扩增产物, 然后用插入片段筛选小鼠噬菌体文库。将来自所得噬菌体克隆之一的阳性杂交 5.8 kb HindIII 片段亚克隆到 pGP1f 中。该亚克隆 pHC3' ENfa 的插入片段以多接头 XhoI 位点与插入片段 5' 末端相邻、Sall 位点与 3' 末端相邻的方向插入。对部分该 HindIII 片段进行核苷酸序列分析, 证明该片段含有 3' 重链增强子。pHC3' ENfa 的插入片段在增强子序列核心的 EcoRI 位点上游约 1.9 kb 处含有一个 XhoI 位点。通过部分消化, Klenow 补平和再连接除去该 XhoI 位点以产生克隆 pHC3' ENfx, 该质粒在插入片段 5' 和 3' 分别含有单一的 XhoI 和 Sall 位点。

按如下亚克隆人 $\gamma 3/\gamma 1$ 克隆 P1-570 的 3' 末端: 用 NotI 消化 P1-570 DNA、Klenow 处理、然后用 XhoI 消化; 分离 13 kb 末端片段然后与用

BamHI 消化、Klenow 处理的质粒载体 pGP2b 连接，然后用 XhoI 消化。所得质粒 pPX-3 丢失了多接头 NotI 位点，该位点与插入片段 5' 末端的多接头 XhoI 位点相连；但是，XhoI 位点保持完整，通过用 NotI 和 XhoI、或 SalI 和 XhoI 消化可分离插入片段。分离含 3' 增强子的 pH3V4D 的 XhoI/ SalI 插入片段，然后连接到 pPX-3 的 3' SalI 位点以产生质粒 pHP-3a。将 pHP-3a 插入片段内所含的增强子以与 P1-570 克隆 3' 相反的方向连接。因此，pHP-3a 含有一内部 SalI 位点，通过用 XhoI 和 NotI 消化分离所述插入片段。由于这是增强子元件，5' 到 3' 的方向通常对功能不重要。

HCo7

为了制备用于前核微注射的 HCo7DNA 混合物，用限制酶消化上述 5 个质粒的 DNA，然后在琼脂糖凝胶上分离。用 NotI 切割克隆 pH3V4D；用 NotI 切割克隆 pCOR1xa；用 NotI 切割克隆 p11-14；用 NotI 和 SalI 切割克隆 pP1-570；用 NotI 和 XhoI 切割克隆 pHP-3a。电泳洗脱 DNA 插入片段，然后再在不含 EtBr 的平衡 CsCl 梯度上纯化。将插入片段透析到注射缓冲液中，并按如下混合：50 μ l 的 pH3V4D 插入片段@20.4 ng/ μ l；50 μ l 的 pCOR1xa 插入片段@20.48 ng/ μ l；50 μ l 的 p11-14 插入片段@15.6ng/ μ l；300 μ l 的 pP1-570 插入片段@8.8 ng/ μ l；60 μ l 的 pHP-3a 插入片段@10.8ng/ μ l 和 1.49 ml 注射缓冲液。

HCo7 转基因动物

按 Hogan 等所述(Manipulating the mouse embryo, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor NY)将 Hco7 DNA 混合物微注射到半天龄的胚胎前核中，然后将胚胎转移到假孕雌性小鼠的输卵管中。

从由微注射胚胎发育的 202 个动物中分离尾尖 DNA。用含人 μ 和 DH 序列的探针对该 DNA 进行 Southern 印迹分析，表明 22 个建立者动物掺入了至少部分 HCo7 转基因。图 81 说明了在 6 个 G0 动物血清中，人 μ 和 γ 1 表达的分析，所述 G0 动物是从用 Hco7 DNA 微注射的胚胎发育的。按 Lonberg 等(1994)Nature 368:856 所述用 ELISA 测量人免疫球蛋白蛋白质的血清水平。Southern 印迹分析表明，6 个小鼠中有 4 个掺入了转基因，这些小鼠中有 3 个在其血清中表达人 μ 和 γ 1 蛋白质。用 Southern 印迹分析确定不表达人免疫球蛋白的那个转基因小鼠仅含低拷贝数的转基因，这可能是未掺入完整的转基因或该小鼠是基因镶嵌的。将两个建立者 Hco7 小鼠 #11952 和 #11959 与人 κ 小座位(Kco4，品系 4436)

转基因小鼠交配以产生两个内源座位破坏纯合和两个导入人小座位 Kco4 和 HCo7 半合的小鼠, 所述人 κ 小座位(Kco4)转基因小鼠是内源重链和 κ 轻链座位破坏纯合的(Lonberg et al., 出处同上)。分析 5 个所谓双转基因/双缺失小鼠表达人 IgM、人 IgG1 和人 IgG3 的情况。作为对照, 分析中包括 3 个 HC2/KCo4 双转基因/双缺失小鼠。在图 82 中列出了该试验。在该图中按 Lonberg 等(出处同上)收集 ELISA 数据, 除人 IgG3 的检测外, 包被抗体是抗人 IgG3 特异性的单克隆抗体(cat.#08041, Pharningen, La Jolla, CA); IgG3 试验的另一详细内容与公开的人 IgG1 的相同。HC2/KCo4 小鼠仅表达人 IgM 和人 IgG1, 而 HCo7/KCo4 小鼠除表达这两种同种型外, 还表达人 IgG3。通过 PCR 扩增从转基因小鼠脾分离的 RNA 合成的 cDNA 来检测人 γ 3 和 γ 1 在 HCo7 小鼠中的表达。图 83 描述了用来自 3 个不同转基因小鼠的脾 cDNA 合成的 PCR 扩增产物: 品系 2550 是 HC2 转基因品系, 而品系 11959 和 11952 是 HCo7 转基因品系。按 Taylor 等(1992)Nucleic Acid Res.20:6287 所述从脾 RAN 合成单链 cDNA。然后用下列寡核苷酸 PCR 扩增 cDNA:

o-382: 5'- gtc cag aat tcg gt(c,g,t) cag ctg gtg (c,g)ag tct gg -3'

o-383: 5'- ggt ttc tcg agg aag agg aag act gac ggt cc -3'

该引物对指导 PCR 产物的合成, 所述 PCR 产物跨人 γ 转录物的铰链区。由于人 γ 1 和 γ 3 铰链区结构上的差异, PCR 扩增区别了这两种转录物。人 γ 1 模板将指导 752bp PCR 产物的合成, 而人 γ 3 将指导 893 bp 产物的合成。尽管在 HC2 品系 2550 和 HCo7 品系 11959 的脾中, 只有人 γ 1 模板是可检测的, 而在 HCo7 品系 11952 脾中, γ 1 和 γ 3 转录物均是可检测的。由于该检测具有不定量的性质, 而且由于个体动物之间 γ 3 表达的差异(如图 82ELISA 所示), 在图 83 HCo7 品系 11959 的脾中不能观察到 γ 3 并不能说明 γ 3 在该品系中不表达。通过用 LPS 和 IL4 体外刺激, 还可诱导从 HCo7/KCo4 小鼠分离的脾细胞表达 IgG1 和 IgG3。图 84 中列出了该试验。检测来自 7 周龄雄性 HCo7/KCo4 双转基因/双缺失小鼠(#12496; 品系 11959/4436)脾细胞的免疫球蛋白分泌情况, 所述分泌情况是应答单独的胸腺独立的 B 细胞促分裂素、LPS、以及与各种细胞因子的组合。通过细胞毒消除 T 细胞来富集 B 细胞的脾细胞。将 B-富集的细胞以 2×10^6 个细胞/孔的密度, 用 2 ml 10% FCS 的 RPMI-1640 铺在 24 孔平板中。以 10 μ g/ml 将 LPS 加到所有孔中。以 50 单位/ml 加入 IL-2, 以 15 ng/ml 加入 IL-4, 以 15 ng/ml 加入 IL-6, 以 100 单位/ml 加入 γ IFN。将培养物在 37 °C、5%CO₂ 中培养 10 天, 然后用 ELISA 分析

上清液中人 IgG1 和 IgG3 的表达。除捕获抗人 IgM(来自 The Binding Site (Birmingham,UK)的单克隆抗体)外,用于 ELISA 的所有试剂均来自 Jackson Immunologicals(West Grove ,PA)的多克隆抗血清。

实施例 38

本实施例说明通过共注射人 κ 轻链小座位和含多个人 V_{κ} 片段的 YAC 克隆,成功地将功能性人轻链 V 片段导入小鼠基因组中。本实施例表明 YAC 上所含的 V_{κ} 片段基因有助于在所得小鼠中表达人 κ 链库。本实施例描述了转基因编码的人免疫球蛋白库扩展的方法,具体地描述了如何通过共导入未连接的多核苷酸来扩展人 κ 链可变区库,所述多核苷酸含有人免疫球蛋白可变区片段。

通过共导入含酵母人工染色体克隆 DNA 和 κ 轻链小座位克隆 DNA 而导入功能性人轻链 V 片段

I. 分析含克隆的人 V_{κ} 基因片段的酵母菌株

从含 450 kb 酵母人工染色体(YAC)的酵母菌株中分离总基因组 DNA,所述 YAC 含有部分人 V_{κ} 座位(ICRF YAC 文库命名 4x17E1)。为了确定在该 YAC 克隆中所含某些 V_{κ} 基因片段的一致性,用基因组 DNA 作为底物用于一系列 V_{κ} 家族特异性 PCR 扩增反应。在 4 组扩增中,一个共同的 3' 引物与 4 种不同的 5' 引物配对。5' 引物是 o-270(5'-gac atc cag ctg acc cag tct cc-3'), o-271(5'-gat att cag ctg act cag tct cc-3'), o-272(5'-gaa att cag ctg acg cag tct cc-3')和 o-273(5'-gaa acg cag ctg acg cag tct cc-3')。Mark 等(Eur. J. Immunol.1991.21,985)将这些引物用作 V_{κ} 家族特异性引物。3' 引物 o-274(5'-gca acg ttc tgt ccc aga ccc act gcc act gaa cc-)是以 FR3 的共有序列为基础的。4 组引物各指导预期 0.2 kb 片段的扩增,该片段来自含有酵母基因组 DNA 的 YAC 克隆 4x17E1。然后凝胶纯化 4 组不同的扩增产物,然后克隆到质粒载体 pSP72(Promega)的 PvuII/HindIII 位点。对 11 个所得克隆进行核苷酸序列分析,鉴定了 7 个不同的 V 基因。下面表 14 中列出了这些结果。

表 14 鉴定在 YAC 4x17E1 上的人 V_K 片段
PCR 引物 克隆编号 鉴定的基因 V_K 家族

o-270/o-274	1	L22*	I
- "-	4	L22*	I
- "-	7	O2* or O12	I
o-271/o-274	11	A10*	VI
- "-	15	A10*	VI
o-272/o-274	20	A4* or A20	I
- "-	21	A11*	III
- "-	22	A11*	III
- "-	23	A11*	III
- "-	25	O4* or O14	I
o-273/o-274	36	L16* or L2	III

*定位在远端 V_K 簇内的基因片段(Cox et al. Eur. J. Immunol. 1994.24,827; Pargent et al., Eur. J. Immunol. 1991.21,1829; Schable and Zachau Bio. Chem. Hoppe-Seyler 1993.374,1001)

将从 YAC 克隆扩增的所有序列清楚地指定到定位于远端簇的 V_K 基因内, 或它们与远端基因序列相容。由于没有一个序列可以被清楚地指定到近端 V 基因上, 因此似乎 YAC 4x17E1 含有来自远端 V_K 区的序列。此外, 所鉴定的一个序列, 克隆#7(Vk02)定位于接近远端簇末端的 J 的附近, 而另一序列, 克隆#1 和 4(VkL22)定位于接近远端簇末端的 J 的附近, 300 kb 上游。因此, 如果 450kb YAC 克隆 4x17E1 代表未缺失的相应人基因组片段拷贝, 则它至少含有 32 个不同的 V_K 片段。但是, 其中一些是无功能的假基因。

2. 产生含 YAC 衍生的 V_K 基因片段的转基因小鼠

为了得到用于微注射到胚胎前核中的纯化的 YAC DNA, 在琼脂糖凝胶上将总基因组 DNA 进行大小分级分离。溶解前, 将含 YAC 4x17E1 的酵母细胞包埋入琼脂糖, 然后通过标准脉冲场凝胶电泳(每个制造商说明: CHEF DR-II 电泳池, BIO-RAD Laboratories, Richmond CA)从酵母染色体 DNA 中分离 YAC DNA。用溴化乙锭将 6 个脉冲场凝胶染色, 从其余的凝胶上切下含 YAC 克隆的凝胶物质。然后将含 YAC 的凝胶片包埋入在三角形凝胶盘中的新(低熔点)琼脂糖凝胶模中。用含 2 mol/l 醋酸钠和标准凝胶缓冲液的窄凝胶, 在顶点扩展所得的三角形凝胶(图 85)。

然后将凝胶放在浸入标准凝胶缓冲液的电泳槽中。在缓冲液表面产生“Y”形凝胶以便电流仅能通过窄高盐凝胶片。将 Plexiglas 块放在高盐凝胶片上，以防止醋酸钠扩散到凝胶缓冲液中。然后将 YAC DNA 电泳出原凝胶片段，并进入窄高盐块。在从低盐凝胶向高盐凝胶过渡的时候，有一个电阻压降，可以有效地防止 YAC DNA 迁移过凝胶。这样可以在三角形凝胶的顶点浓缩 YAC DNA。电泳并染色后，将浓缩的 YAC DNA 从其余的 DNA 中切开，用 GELase(EPOCENTRE Technologies) 消化琼脂糖。然后将溴化乙锭加到含 YAC DNA 的液体中以得到 1.68 g/ml 的密度。将该溶液以 37000rpm 离心 36 小时，以便将 YAC DNA 与任何污染物分开。分离 0.5 ml 所得密度梯度的馏份，将峰 DNA 馏份用 5 mM Tris (pH7.4)/5 mM NaCl/0.1 M EDTA 透析。透析后，发现所得的 0.65 ml YAC DNA 溶液的浓度是 2 ug/ml。将所述 YAC DNA 与来自质粒 pKC1B 和 pKC4(Lonberg 等, 1994, 自然, 368,856)之插入片段的纯化 DNA 混合，比例为 20 : 1 : 1(微克 YAC4x17E1: KC1B:KV4)。将所得 2 ug/ml 溶液注射到半天的小鼠胚胎前核中，将 95 个存活的微注射胚胎转移到假孕雌性小鼠的输卵管中。生出 39 个从微注射胚胎发育的小鼠。用这些小鼠中的 2 个#9269 和#9272 建立转基因品系。将所述品系命名为 KCo5-9269 和 KCo5-9272。

对来自 KCo5-9269 和 KCo5-9272 品系小鼠的基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析以确定 YAC 4x17E1 衍生的 V κ 片段是否已插入其基因组中。将来自远端 V κ 簇中间的 V κ 基因片段，VkA10(登记号 #:x12683; Straubinger et al., 1988,Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369,601-607) 用作 Southern 印迹分析的探针。为了得到克隆的探针，先用 PCR 扩增 VkA10 基因。用下列两个寡核苷酸作为引物，扩增来自 YAC 4x17E1 的 1 kb 片段：o-337(5'-ggg tta act cat tgc ctc caa agc ac-3')和 o-338(5'-ggg tta act cat tgc ctc caa agc ac-3')。将扩增的产物进行凝胶纯化，用 HincII 消化，然后克隆到 pUC18 中以得到质粒 p17E1A10。然后用该质粒的插入片段检测 KCo5-9269 和 KCo5-9272 DNA 的 Southern 印迹。印迹表明仅在 KCo5-9272 小鼠 DNA 中探针与预期的限制片段杂交。这表明 VkA10 基因插入到了 KCo5-9272 小鼠的基因组中，但未插入 KCo5-9269 小鼠的基因组中。然后将品系 KCo5-9272 小鼠与 HC2-2550/JHD/JKD 小鼠交配以得到内源重和 κ 轻链座位破坏纯合的，而人重和 κ 轻链转基因半合或纯合的小鼠。将内源重和 κ 轻链座位破坏纯合的，而 HC2 和 KCo5 转基因半合或纯合的小鼠命名为双转基因/双缺失小鼠。

完成 cDNA 克隆试验以确定在品系 KCo5-9272 小鼠中是否表达了 YAC 衍生的 V κ 基因。将双转基因/双缺失小鼠 #12648(HC2-2550/KCo5-9272 /JHD/JKD) 杀死, 然后从脾中分离总 RNA。从 RNA 合成单链 cDNA, 然后在 4 种不同的 PCR 反应中作为模板, 所述 PCR 使用 o-270、o-271、o-272 和 o-273 为 5' 引物, 用 Ck 特异性寡核苷酸 o-186(5'-tag aag gaa ttc agc agg cac aca aca gag gca gtt cca-3') 为 3' 引物。将扩增产物克隆到 pCRII TA 克隆载体(Invitrogen)中。确定 19 个插入片段的核苷酸序列。下列表 15 中列出了序列分析结果。

表 15 鉴定在小鼠品系 KCo5-9272 中表达的人 V κ 基因

PCR 引物	克隆编号	鉴定的基因	V κ 家族
o-270/o-186	1	L15*	I
- "-	3	L18**	I
- "-	7	L24**	I
- "-	9	L15*	I
- "-	10	L15*	I
o-271/o-186	15	A10**	VI
- "-	17	A10**	VI
- "-	18	A10**	VI
- "-	19	A10**	VI
- "-	21	A10**	VI
o-272/o-186	101	A27*	III
- "-	102	L15*	I
- "-	103	A27*	III
- "-	104	A27*	III
o-273/o-186	35	A27*	III
- "-	38	A27*	III
- "-	44	A27*	III
- "-	45	A27*	III
- "-	48	A27*	III

*由转基因质粒序列编码的 V κ 基因

**唯一由 YAC 衍生的转基因序列编码的 V κ 基因

这些结果表明至少 3 个 YAC 衍生的 V κ 基因片段, A10、L18 和 L24 有助于在品系 KCo5-9272 小鼠中表达的人库。

为了确定所述增加的库对骨髓和脾中不同 B220⁺细胞种群大小的影响,对品系 KCo5-9272 小鼠进行流式细胞计数分析。在图 86 和 87 中列出了所述分析的一部分内容。在该试验中,比较两个双转基因/双缺失小鼠,一个含 KCo5 转基因,另一个含 KCo4 转基因。这两个转基因有相同的连接和恒定区序列,以及相同的内含子和 3' 增强子序列。它们还共有 4 个不同的克隆 V 基因片段;但是 KCo5 转基因包含在 KCo4 转基因中不含的、衍生于 YAC 4x17E1 的其它 V 片段。从小鼠#13534(HC2-2550/KCo5-9272/JHD/JKD)和小鼠#13449(HC2-2550/KCo4-4436/JHD/JKD)中分离细胞。用抗小鼠 B220(Caltag, South San Francisco, CA)抗小鼠 CD43(PharMingen, La Jolla, CA)和抗人 IgM(Jacks on ImmunoLogic, West Grove, PA)将骨髓细胞染色。用抗小鼠 B220 和抗人 IgM 将脾细胞染色。

图 86 表示比较了 KCo5 和 KCo4 小鼠骨髓中的 B 细胞、B 细胞祖先种群。KCo5 小鼠(6%)骨髓中的 B 细胞馏分(B220⁺, IgM⁺)是 KCo4 小鼠(2%)的 3 倍。KCo5 小鼠中的前 B 细胞种群(B220⁺, CD43⁻, IgM⁻)也更高(9%,与 KCo4 的 5%相比)。此外,在这些小鼠中,原 B 区室(B220⁺, CD43⁺)也增加(KCo5, 11%; KCo4, 5%)。尽管 KCo5 小鼠中的这 3 个区室中的每个都比 KCo4 小鼠的大,但水平仍是野生型小鼠的近一半。骨髓 B 细胞数量的增加可能是增加的库大小的直接结果。这些小鼠较大的初级库提供了与内源抗原具有某些最小阈亲合力的膜 Ig。然后受体连接使得可以增殖表达反应性 Ig 的那些 B 细胞。但是,由于前 B 和原 B 细胞不表达轻链基因,因此,有关 KCo5 小鼠这两个区室大小增加的解释不是很显而易见的。在 KCo5 小鼠中 B 细胞祖先区较大,因为 B 细胞数量的增加产生了更有利于这些种群扩展的骨髓环境。这种影响是通过分泌的因素或 B 细胞与祖先细胞之间的细胞-细胞接触而直接介导的,或通过抑制祖先细胞存活或增殖的因素或细胞的滴定而间接介导的。

图 87 说明比较了 KCo5 和 KCo4 小鼠中的脾 B 细胞(B220⁺, IgM⁺)种群。这两种小鼠之间的主要差异是 B220^{dim} B 细胞种群的相对大小(在 KCo5 小鼠中为 6%,在 KCo4 小鼠中为 13%)。B220^{dim}细胞比 B220^{ss} B 细胞大,而且其大部分馏分表达 1 轻链。这些是所谓 B1 种群的特征,所述 B1 种群通常在野生型小鼠的腹膜 B 细胞种群中是主要的。KCo4 小鼠的脾含有不规则的高馏分 B220^{dim}细胞,而 KCo5 小鼠中这些细胞的分布更正常。但是这两个品种均含有为正常脾 B 细胞数量 1/2 到 1/3 的所述细胞。

实施例 39

本实施例说明将实施例 38 的 KCo5 转基因小鼠成功地用于分离杂交瘤克隆, 所述杂交瘤克隆分泌高亲合力、抗原特异性的人 IgG 单克隆抗体。

免疫.

每隔一周, 用 $4-10 \times 10^6$ 个照射的 T4D3 细胞, 表达人 CD4 的鼠 T 细胞系(Dr. Jane Parnes, Stanford, Stanford University)将双缺失/双转基因小鼠(KCo5-9272/HC2-2550/JHD/JKD, #12657)腹膜内免疫 8 周, 两周后腹膜内注射 20 mg 在不完全弗氏佐剂(Sigma)中的可溶性重组人 CD4(sCD4; Intracell)。在用 20 mg sCD4 静脉内输注前 3 天, 给小鼠加强免疫一次。

杂交瘤融合. 将来自免疫小鼠脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与 1/6 量的 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤细胞(ATCC CRL 1580)和 50%PEG(Sigma)融合。将约 2×10^5 个细胞铺在平底微滴定板上, 然后在选择性培养基中培养 2 周, 所述培养基含有 20%胎克隆血清(HyClone)、18% “653” 条件培养基、5%Origen(IGEN)、4 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、5 mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇、50 单位/ml mM 青霉素、50 mg/ml mM 链霉素、50 mg/ml mM 庆大霉素和 1X HAT(Sigma; HAT 在融合 24 小时后加入)。2 周后, 将细胞在用 HT 取代 HAT 的培养基中培养。在观察到广泛的杂交瘤生长或耗尽培养基后, 用 ELISA 和流式细胞计数筛选孔。

ELISA 筛选杂交瘤. 为了检测抗 CD4 单克隆抗体, 4 °C, 用 50 ml 2.5 mg/ml PBS 中的 sCD4 将微滴定板(Falcon)包被过夜, 在 RT 用 100 ml PBS 中的 5%鸡血清阻断 1 小时, 然后然后与 1 : 4 稀释的杂交瘤上清液、1 : 1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRPO)结合的山羊抗人 IgG(Jackson)的 F(ab')₂ 片段或 1 : 250 稀释的 HRPO 结合的山羊抗人 Igk 抗体(Singma)加 1%正常小鼠血清, 最后与在 0.1 M 柠檬酸磷酸盐缓冲液中的 0.22 mg/ml ABTS, pH4 和 0.0024% H₂O₂ 在 RT 顺序保温 1 小时。除第一次外, 在所有保温之间用洗涤缓冲液(0.5%吐温 20 的 PBS 溶液)将平板洗涤 3-6 次。用稀释剂(洗涤缓冲液加 5%鸡血清)稀释上清液和 HRPO 结合物。用双波长测量吸收值(490 nm 参考波长的 OD 减去 415 nm 的 OD)。

为了检测含小鼠 λ 的单克隆抗体,除下列改变外,使用上述 ELISA 方法。将微滴定板的孔用 100 μ l 1)1.25 mg/ml 山羊抗小鼠 λ (Pierce), 2)1.25 mg/ml 山羊抗人 Fc γ (Jackson), 或 3)2.5 mg/ml sCD4(ABT)包被。对于检测步骤,使用与生物素结合的 100 μ l 1:5000 山羊抗小鼠 λ (SBA),然后用 100 μ l 与 HRPO(Jackson)结合的 1:1000 链霉抗生物素蛋白。在所示浓度下使用鼠和人单克隆抗体标准。为了寻找与无关抗原的交叉反应,用 CEA(Crystal Chem)、KLH(CalBiochem)、HSA(Sigma)、BSA (Sigma)或 OVA(Sigma; 除 CEA 是 2.5 mg/ml 外,均是 2 mg/ml)包被孔。滴定适宜的抗体,然后用作阳性对照(人 IgM 抗 CEA(GenPharm)、兔抗-KLH(Sigma)、羊抗-HSA (The Binding Site)、羊抗-BSA(The Binding Site)和羊抗-OVA(The Binding Site))。用山羊抗人 IgM、驴抗兔 IgG 或驴抗羊 IgG(均以 1:1000 稀释并得自 Jackson)的 HRPO 结合物检测任何结合的抗体。另外,然后进行标准 ELISA 方法。

用流式细胞计数筛选杂交瘤。为了进一步筛选与天然细胞表面 CD4 有反应的单克隆抗体,在冰上将 5×10^5 个 SupT1 细胞(ATCC CRL 1942)与 1:2 稀释的来自融合平板的消耗上清液保温 30 分钟用冷染色缓冲液(0.1 % BSA ,0.02% NaN₃ 的 PBS 溶液)洗涤两次,与 1.5 mg/ml FITC 结合的山羊抗人 Fc γ 的 F(ab')₂ 片段(FITC-GaHu IgG₁ Jackson)保温 15 分钟,洗涤一次然后立即用 FACSscan(Becton-Dickinson)分析。

CD4 反应性杂交瘤。用上述 ELISA 和流式细胞计数技术,鉴定 12 个杂交瘤克隆,所述克隆分泌与天然人 CD4 特异性反应的人 IgG。进一步亚克隆 12 个克隆中的 10 个。鉴定这些亚克隆中的 8 个为分泌人 IgG1 κ 的杂交瘤。另两个表达小鼠 λ 轻链。8 个全人克隆的亲本孔是: 1E11、2E4、4D1、6C1、6G5、7G2、10C5 和 1G1。图 88 中说明 3 个全人 IgG κ 亚克隆(4D1.4、6G5.1 和 10C5.6)结合的流式细胞计数。

图 88 说明 IgG κ 抗-nCD4 单克隆抗体与 CD4⁺ SupT1 细胞的结合。洗涤来自对数生长期的培养物的细胞,然后不用单克隆抗体、4E4.2(作为阴性对照)、嵌合 Leu3a(作为阳性对照)或 10 个人 IgG 抗-nCD4 单克隆抗体之一染色。用 FITC 结合的山羊抗人 Fc γ 检测任何结合的单克隆抗体。所有 10 个单克隆抗体均与 SupT1 细胞结合,尽管在本文只给出了 3 个数据。

用克隆的杂交瘤分析人抗体分泌。 为了比较单克隆抗体的生长和分泌，将亚克隆放在 24 孔平板上的 HT 培养基中复制培养，开始的密度为 2×10^5 个细胞/ml。每天收集各克隆的复制培养物，连续收集 7 天，然后测定细胞数、细胞存活力(用苔盼蓝排除法)和上清液中的单克隆抗体量(用定量 ELISA 确定总的人 γ)。表 16 列出了 7 天末杂交瘤亚克隆的抗体分泌。

表 16 人 IgGk 抗 nCD4 单克隆抗体的分泌水平

亚克隆	pg/细胞	pg/细胞/d
1E11.15	3.9	0.56
1G1.9	11	1.5
4D1.4	1.4	0.91
6C1.10	3.3	0.48
6G5.1	7.8	1.1
7G2.2	4.4	0.63
10C5.6	8.0	1.1

*pg/细胞=(最大量单克隆抗体)/(最大存活细胞数) pg/细胞/d = (pg/细胞)/7 天

人单克隆抗体的纯化。 使各个杂交瘤克隆生长在不含 HT 和 Origen 和培养基中，逐渐减少 FCS，使在最后 1 升培养物中含约 2-3%。在杂交瘤的存活力降到约 30%以下时，收集上清液。为了纯化 IgGk 单克隆抗体，将消耗的上清液离心以除去细胞，然后经超滤浓缩至约 50-100 ml，用 PBS，pH7.4 稀释，然后上样到 5ml Protein A(Pharmacia)柱。用 3-5 倍柱体积的 PBS 洗涤后，用 0.1 HCl、150mM NaCl，pH2.8 洗脱人 IgGk 单克隆抗体，然后立即用 1 M Tris 碱中和。将 OD₂₈₀>0.2 的含柱馏分的物质合并，然后在 PBS 中透析。然后测定 OD₂₈₀，用 1.4 吸收常数计算人 IgG 的蛋白质浓度。在流出物中未检测到单克隆抗体，回收率为 93-100%。获得 3-6 mg 各纯化的单克隆抗体，纯度>90%。

分析来自克隆杂交瘤的单克隆抗体。 为了研究单克隆抗体的结合特异性，在 Ficoll 上分离人 PBMC 并按如下染色。将在染色缓冲液中的人 PBMC(10^6)在冰上保温 30 分钟，在不同的反应中，分别与等体积来自 3 个亚克隆杂交瘤(4D1.4、6G5.1 和 10C5.6)之一的上清液或与同种型匹配的阴性对照单克隆抗体保温，洗涤两次，然后在冰上与 1 mg/ml

FITC-GaHuIgG 以及 10 ml 与藻红蛋白(PE)结合的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体(Leu3a; Becton-Dickinson)、10 ml 与 PE 结合的小鼠抗人 CD8 单克隆抗体(Leu2a; Becton-Dickinson)或 5 ml 与 PE 结合的小鼠抗人 CD19 单克隆抗体(SJ25-C1; Caltag)保温 20 分钟。然后用 FACScan 流式细胞计数器(Becton-Dickinson San Jose, CA)分析关注的淋巴细胞。发现所有 3 种抗体均与人 PBMC 中的 CD4 馏分特异性结合。

为了接近由这 3 种单克隆抗体识别表位的位置,在冰上将 5×10^5 个 SupT1 细胞与在染色缓冲液中的 2.5 mg/ml RPA-T4 或 2.5 mg/ml Leu3a 预保温 20 分钟,然后与 10 种人 IgG 单克隆抗体之一保温 30 分钟(1:2 稀释的上清液),最后与 0.5 mg/ml FITC 结合的山羊抗人 Fc γ 保温以检测任何结合的人 IgG。在最后的步骤前用染色缓冲液将细胞洗涤两次,在最后步骤后洗涤 1 次。在图 89 中列出了该阻断试验的结果。这 3 种抗体没有一个与 RPA-T4 有共同的表位,而 6G5.1 和 10C5.6 所识别的表位与 Leu3a 所识别的相同。

速率和平衡常数测定

按制造商的说明,通过氨基将人 sCD4(2500-4200RU)固定于传感芯片表面。使抗体稀释物流过抗原结合的传感芯片直到平衡,然后仅使缓冲液流过。对于反应的各时期,结合和解离,画出结合的抗体馏份随时间的曲线。计算结合曲线的导数并画出对各浓度下的反应图。为了计算结合速率常数($K_{\text{结合}}$),将这些线的斜率对单克隆抗体浓度作出图。该图上曲线的斜率对应于 $K_{\text{结合}}$ 。从对时间间隔的反应(在缓冲液流动相过程中)中下降的对数计算出解离速率常数($K_{\text{解离}}$)。以 $K_{\text{解离}}$ 除以 $K_{\text{结合}}$ 得到 K_a 。在表 17 中列出了产生于 KCo5/HC2 双转基因/双缺失小鼠的 5 种不同纯化单克隆抗体、以及一种市售纯化抗体的测量的速率和亲合力常数数据。

表 17 与人 CD4 结合的单克隆抗体的速率和亲合力常数

杂交瘤	抗体	来源	$K_{\text{结合}}(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$K_{\text{解离}}(\text{S}^{-1})$	$K_a(\text{M}^{-1})$
1E11.15	人 IgG1k	HC2/KCo5 转基因	2.7×10^5	4.6×10^{-5}	5.8×10^9
1G1.9	人 IgG1k	HC2/KCo5 转基因	9.1×10^4	2.2×10^{-5}	4.2×10^9
4D1.4	人 IgG1k	HC2/KCo5 转基因	9.8×10^4	4.2×10^{-5}	2.3×10^9
6G5.1	人 IgG1k	HC2/KCo5 转基因	1.1×10^5	1.0×10^{-5}	1.1×10^9
10C5.6	人 IgG1k	HC2/KCo5 转基因	7.4×10^4	1.6×10^{-5}	4.5×10^9
Leu3a	人 IgG1k	Becton Dickinson	1.5×10^4	4.2×10^{-6}	3.7×10^9

混合的淋巴细胞反应(MLR)。为了将生于 KCo5 转基因小鼠的人单克隆抗体 10C5.6 的体外效力与小鼠抗体 Leu3a 进行比较,进行了 MLR 试验。在 Ficoll 上分离来自 2 个不相关供体的人 PBMC,然后按制造商的说明用 CD4 柱(Human CD4 Collect, Biotex Laboratories, Inc. Canada)纯化来自各供体的 CD4+PBL。用培养基(RPMI 1640, 含 10%热失活的人 AB 血清(来自 NABI)、Hepes、丙酮酸钠、谷胺酰胺、青霉素/链霉素和 β 巯基乙醇(均以制造商推荐的浓度使用))中的 100 mg/ml Mitomycin C(Aldrich) 在 37 °C 处理来自这两个供体的 PBMC30 分钟,然后用培养基洗涤 3 次而得到失活的刺激者细胞。将用培养基稀释的不同浓度的单克隆抗体或仅有培养基过滤灭菌,然后在 96 孔圆底平板中一式三份,每孔加 100 μ l。然后将来自一个供体的 50 μ l 含 10^5 CD4+ PBL 的培养基和来自另一供体的含 10^5 mitomycinC 处理的 PBMC 的 50 μ l 培养基加到各孔中。用对照平板作为单克隆抗体任何毒性或促分裂素作用的对照,所述对照平板含有单独的 CD4+ PBL 反应者加单克隆抗体。还包括仅有刺激者的对照和培养基背景对照。37 °C、5%CO₂ 湿保温箱中 7 天后,从各孔中取出 100 μ l 上清液,然后加入 20 μ l 比色剂(Cell Titer 96AQ 试剂盒, Promega Corporation, Madison, WI)。显色 4-6 小时,然后在 490 nm 读平板。图 90 中描述了该试验的结果,表明在该试验中,在阻断人 PBMC CD4 细胞的功能中,人 IgG1k 抗体 10C5.6 至少与 Leu3a 一样有效。

实施例 40

人 IgG κ 抗-CD4 单克隆抗体的结合特征

本实施例描述了人 IgG κ 单克隆抗体的结合特征,所述单克隆抗体产生于得自用人 CD4 免疫的 HC2/KCo5/JHD/JCKD 转基因小鼠的杂交瘤。表明单克隆抗体与重组和天然人 CD4 有高亲合力和亲和性。

来自 10 个分泌与人 CD4 反应的人 IgG κ 单克隆抗体(mAB)的杂交瘤细胞系(1E11、1G2、6G5、10C5、1G1、6C1、2E4、7G2、1F8 和 4D1)的细胞衍生于 JHD/JCKD/ HC2/KCo5 转基因小鼠。使细胞系在培养基中生长,从上清液中分离抗体蛋白(Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14,845-851,该文献引入本文作为参考)。将用 Protein A 亲和色谱纯化的抗体用于测量结合常数。表 18 和 19 中列出了结果。

通过使用与传感芯片结合的山羊抗人 IgG(Fc-特异性的)以及使饱和浓度的单克隆抗体流过，然后流过各种浓度的抗原(rCD4)用 BIAcore(Pharmacia Biosensor)测定在表 18 中所列的速率和平衡常数。这些常数衍生于 3 个使用纯化单克隆抗体的实验。

表 18 亲合力和速率常数
速率常数(平均值 $\pm$ SD)

人单克隆抗体	k_{assoc} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{dissoc} (s^{-1})	K_{a} (M^{-1})
1E11.15	$1.7 (\pm 0.15) \times 10^5$	$3.5 (\pm 0.09) \times 10^{-3}$	5.0×10^7
6C1.10	$1.8 (\pm 0.44) \times 10^5$	$3.3 (\pm 0.04) \times 10^{-3}$	5.4×10^7
1G1.9	$1.2 (\pm 0.18) \times 10^5$	$9.4 (\pm 0.22) \times 10^{-4}$	1.3×10^8
6G5.1	$9.3 (\pm 1.1) \times 10^4$	$6.9 (\pm 0.36) \times 10^{-4}$	1.4×10^8
10C5.6	$9.4 (\pm 0.98) \times 10^4$	$7.1 (\pm 0.36) \times 10^{-4}$	1.3×10^8
2E4.2	$1.8 (\pm 0.10) \times 10^5$	$2.5 (\pm 0.05) \times 10^{-3}$	7.1×10^7
4D1.4	$2.5 (\pm 0.55) \times 10^5$	$3.4 (\pm 0.15) \times 10^{-3}$	7.3×10^7
7G2.2	$2.4 (\pm 0.31) \times 10^5$	$3.3 (\pm 0.07) \times 10^{-3}$	7.3×10^7
1F8.3	$1.8 (\pm 0.24) \times 10^5$	$4.3 (\pm 0.14) \times 10^{-3}$	4.3×10^7
1G2.10	$2.2 (\pm 0.26) \times 10^5$	$2.3 (\pm 0.03) \times 10^{-3}$	9.8×10^7
chi Leu3a	$1.5 (\pm 0.35) \times 10^5$	$2.3 (\pm 0.12) \times 10^{-4}$	6.6×10^8

通过使用与传感芯片结合的抗原并流过 mAb，用 BIAcore 测定在表 19 中所列的速率和平衡常数。这些常数产生于 3 个独立使用纯化单克隆抗体的实验。

表 19 亲合力和速率常数

速率常数(平均值±SD)			
人单克隆抗体	k_{assoc} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{dissoc} (s^{-1})	K_{a} (M^{-1})
1E11.15	$2.8 (\pm 0.22) \times 10^5$	$4.5 (\pm 0.43) \times 10^{-5}$	6.2×10^9
6C1.10	$2.0 (\pm 0.25) \times 10^5$	$4.0 (\pm 0.63) \times 10^{-5}$	5.1×10^9
1G1.9	$9.1 (\pm 0.95) \times 10^4$	$2.2 (\pm 0.71) \times 10^{-5}$	4.2×10^9
6G5.1	$1.1 (\pm 0.41) \times 10^5$	$1.0 (\pm 0.34) \times 10^{-5}$	1.1×10^{10}
10C5.6	$7.4 (\pm 1.5) \times 10^4$	$1.6 (\pm 0.57) \times 10^{-5}$	4.5×10^9
2E4.2	$1.4 (\pm 0.15) \times 10^5$	$2.2 (\pm 0.25) \times 10^{-5}$	6.3×10^9
4D1.4	$9.8 (\pm 0.69) \times 10^4$	$4.2 (\pm 1.3) \times 10^{-5}$	2.3×10^9
7G2.2	$1.7 (\pm 0.20) \times 10^5$	$5.0 (\pm 0.42) \times 10^{-5}$	3.4×10^9
1F8.2	$1.7 (\pm 0.13) \times 10^5$	$9.7 (\pm 1.2) \times 10^{-5}$	1.7×10^9
1G2.10	$1.7 (\pm 0.04) \times 10^5$	$6.3 (\pm 0.49) \times 10^{-5}$	2.7×10^9
chi Leu3a	$4.0 (\pm 0.45) \times 10^5$	$1.2 (\pm 0.25) \times 10^{-5}$	3.4×10^{10}
Leu3a	$1.5 (\pm 0.30) \times 10^5$	$4.2 (\pm 0.49) \times 10^{-6}$	3.7×10^{10}

表 20 提供了科学文献中抗 CD4 单克隆抗体的平衡常数。

表 20 抗 CD4 单克隆抗体的亲合力和速率常数

速率常数(平均值±SD)			
人单克隆抗体	k_{assoc} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{dissoc} (s^{-1})	K_{a} (M^{-1})
CE9.1 ⁽⁴⁾	NR*	NR	3.1×10^{10}
cMT412 ⁽¹⁾	NR	NR	5.0×10^9
chi Leu3a ⁽²⁾	NR	NR	1.0×10^{11}
BL4 ⁽³⁾	NR	NR	5.5×10^7
BB14 ⁽³⁾	NR	NR	3.3×10^8
CA2 ⁽⁵⁾	NR	NR	1.8×10^9
CDP571 ⁽⁶⁾	NR	NR	7.1×10^9

* NR = 未报告

(1) J. Cell. Biol. 15E:A179.

(2) J. Immunol. 145:2839.

(3) Clin. Immunol. Immunopath. 64:248.

(4) Biotechnology. 10:1455.

(5) Mol. Immunol. 30:1443.

(6) European Patent Appl. #0626389A1.

用重组 CD4(rCD4)完成上述亲合力和亲和性测定。确定人单克隆抗体与天然 CD4(nCD4)的亲合力。用另一结合试验,该试验不需要待修饰的抗体。具体地说,将抗体的系列稀释物与 SupT1 细胞在冰上保温 6 小时,洗涤然后用 FITC-山羊抗-人 Fc γ 检测任何结合的抗体。从产生 1 半最大荧光(使用四参数合适 four parameter fit))的抗体浓度确定 K_a 。结果表明所有 10 个人单克隆抗体均与 nCD4 有很好的结合, K_a 值 $>10^9 M^{-1}$ (表 21)。包括嵌合 Leu3a 的大部分抗体与 nCD4 的结合不如与 rCD4。这可能是由抗原密度的差异以两种抗原之间的差异。

表 21 通过流式细胞计数确定的亲合力常数

人单克隆抗体	Ka 值(M^{-1})		Ka 比率 (rCD4/nCD4)
	rCD4	nCD4*	
1E11.15	6.2×10^9	3.3×10^9	1.9
6C1.10	5.1×10^9	3.1×10^9	1.6
1G1.9	4.2×10^9	2.3×10^9	1.9
6G5.1	1.1×10^{10}	1.9×10^9	5.9
10C5.6	4.5×10^9	1.8×10^9	2.5
2E4.2	6.3×10^9	1.1×10^9	5.8
4D1.4	2.3×10^9	2.0×10^9	1.2
7G2.2	3.4×10^9	3.3×10^9	1.0
1F8.2	1.7×10^9	3.2×10^9	0.5
1G2.10	2.7×10^9	1.9×10^9	1.4
chi Leu3a	3.4×10^{10}	5.6×10^9	6.1

*将人单克隆抗体与 SupT1 细胞的系列稀释物保温 6 小时,洗涤两次,然后与 FITC-连接的山羊抗-人 Fc γ 抗血清保温,洗涤并固定。用四参数合适确定产生一半最大荧光的抗体浓度来计算 K_a 。

实施例 41

鉴定编码人 IgG κ 抗-CD4 抗体的核苷酸序列

本实施例描述试验的各杂交瘤仅产生功能性重或轻链 RNA 转录物,与适当功能化等位排斥一致。另外,重和轻链 CDR 片段的序列分析表明发生了免疫球蛋白转基因的体细胞突变。

将来自 5 个杂交瘤细胞系(1E11、1G2、6G5、10C5 和 4D1)的细

胞用于分离编码各抗体的 RNA(Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14, 845-851), 所述杂交瘤分泌与人 CD4 反应的人 IgG κ 单克隆抗体并来自 JHD/JCKD/HC2/KCo5 转基因小鼠。用 RNA 作为底物合成 cDNA, 然后用所述 cDNA 通过 PCR 扩增人 Ig γ 和 κ 转录物序列, PCR 使用人 VH、V κ 、C γ 和 C κ 特异性引物(Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20,6287-6295; Larrick, J.W., et al., (1989), Bio/Technology. 7.934-938; Mark, J.D., et al., (1991). Eur. J. Immunol. 21.985-991; Taylor et al., 1994, Int. Immunol. 6, 579-591)。将扩增的 Ig 重和 κ 轻链序列克隆到细菌质粒中, 然后测定核苷酸序列。分析跨重链 VDJ 和轻链 VJ 连接的序列表明了 5 个克隆各自的阅读框内重和轻链转录物, 在某些情况下, 还有表现非功能性等位基因的框架外无效转录物。与适当的功能化等位排斥一致, 各克隆没有一个有多于一个的单一重或轻链转录物。将 10 个功能性转录物的部分核苷酸序列指定为下列序列鉴定号: 1E11 γ [Seq ID No.1]; 1E11 κ [Seq ID No.2]; 1G2 γ [Seq ID No.3]; 1G2 κ [Seq ID No.4]; 6G5 γ [Seq ID No.5]; 6G5 κ [Seq ID No.6]; 10C5 γ [Seq ID No.7]; 10C5 κ [Seq ID No.8]; 4D1 γ [Seq ID No.9]; 4D1 κ [Seq ID No.10]; 并列在表 22 中。以 5' 到 3' 的方向列出了所有序列。

表 22 有功能转录物的部分核苷酸序列

1E11 gamma [Seq. I.D. No. 1]

TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTTCATCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTTCTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCCATCATC
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCGAGAGTCGAGTCACCCTATCAGTAGACA
CGTCCAAAAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGACATTACTATGGTTCGGGGAGTACCTCACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACC

1E11 kappa [Seq. I.D. No. 2]

GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCGGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

1G2 gamma [Seq. I.D. No. 3]

TCCACCATCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGA
GTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTTACTGGATCGCC
TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCGATCCTGCT
GACTCTGATACCAGATACAACCCGTCCCTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGAC
AAGTCCATCAGTACCGCCTATTTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC
ATGTATTACTGTGCGAGACCAGCGAACTGGAAGTGGTACTTCGTTCTCTGGGGCCGT
GGCACCCCTGGTCACT

1G2 kappa [Seq. I.D. No. 4]

GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA
CTGTCAACAGTTTATTAGTTACCCTCAGCTCACTTTCGGCGGAGGGACAGGGTGGA
GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

6G5 gamma [Seq. I.D. No. 5]

TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGTAAGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATA
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACA
CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACC

6G5 kappa [Seq. I.D. No. 6]

GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTA
TTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

10C5 gamma [Seq. I.D. No. 7]

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCC
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACC
AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAG

10C5 kappa [Seq. I.D. No. 8]

ATGGACATGATGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTCCCAGGT
TCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
TATCAGCATAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG
CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCTGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAT
AGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

4D1 gamma [Seq. I.D. No. 9]

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCC
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAG
ATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCGGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGC
CAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGA CTCTGAT
ACCACATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATC
AGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTAC
TGTGCGAGAGACCAACTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AAGCTT

4D1 kappa [Seq. I.D. No. 10]

ATGGACATGGAGTTCCCCGTTTCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
TATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTG
CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCTGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATGAT
AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAAGCTT

分析这些 DNA 序列表明 5 个杂交瘤克隆代表 4 个初级 B 细胞的子代。表 23 列出衍生于 10 个 CF3 区的氨基酸序列和种系基因片段的用途, 所述种系基因片段插入到编码这些转录物的各基因中。种系用途是以从 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md 得到的公开序列为基础的。还参见: Cook et al., 1994, Nature Genet. 7,162-168; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227,776-798; Matsuda et al., 1993, Nature Genet. 3,88-94; Schable and Zachau, 1993, Biol.Chem. Hoppe-Seyler 374, 1001-1022; Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24,827-836; Ravetch et al., 1981, Cell 27,583-591; Ichihara et al., 1988, EMBO J. 7,4141-4150; Yamada et al., 1991, J. Exp. Med. 173, 395-407; Sanz, 1991, J. Immunol. 147,1720-1729。

表 23 种系 V(D)J 片段在杂交瘤转录物中的使用

·克隆	h.c. CDR3	VH	DH	JH	l.c. CDR3	Vk	Jk
1E11	DITMVRGVPH (Seq. I.D. No. 63)	VH4-34	DXP'1	JH4	QQYGSSPLT (Seq. I.D. No. 67)	VkA27/A11	Jk4
1G2	PANWNWYFVL (Seq. I.D. No. 64)	VH5-51	DHQ52	JH2	QQFISYPQLT (Seq. I.D. No. 68)	VkL18	Jk4
6G5	VINWFDP (Seq. I.D. No. 65)	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT (Seq. I.D. No. 69)	VkL19	Jk2
10C5	VINWFDP	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT	VkL19	Jk2
4D1	DQLGLFDY (Seq. I.D. No. 66)	VH5-51	DHQ52	JH4	QQYDSYPYT (Seq. I.D. No. 70)	VkL15	Jk2

n.d. 从核苷酸序列不能确定。

实施例 42

构建用于在转染的细胞系中表达人 IgGκ 抗 CD4 抗体的小基因

本实施例描述了制备全人工基因的方法, 所述基因编码免疫球蛋白多肽(即免疫球蛋白重或轻链)。构建质粒以便可用 PCR 扩增的 V 重和 V

轻链 cDNA 序列重建完整的重和轻链小基因。

κ 轻链质粒 pCK7-96 包含 κ 恒定区和聚腺苷酸化位点[Seq. ID No.11], 以便可将 5' 引物(含有起始甲硫氨酸上游的 HindIII 位点)扩增的 κ 序列用 HindIII 和 BbsI 消化, 然后克隆到用 HindIII 和 BbsI 消化的 pCK7-96 中以重建完整的轻链编码序列和聚腺苷酸化位点。可将该盒分离为 HindIII/NotI 片段, 然后与转录启动子序列连接以产生用于转染到细胞中的功能小基因。

γ 重链质粒 pCG7-96 包含人 γ 恒定区和聚腺苷酸化位点[Seq. ID No.12], 以便可将 5' 引物(含有起始甲硫氨酸上游的 HindIII 位点)扩增的 γ 序列用 HindIII 和 AgeI 消化, 然后克隆到用 HindIII 和 AgeI 消化的 pCG7-96 中以重建完整的 γ 重链编码序列和聚腺苷酸化位点。可将该盒分离为 HindIII/SalI 片段, 然后与转录启动子序列连接以产生用于转染到细胞中的功能小基因。

下列实施例描述了来自杂交瘤的核苷酸序列如何用于重建功能 Ig 重和轻链小基因。用来自杂交瘤 6G5 和 10C5 之重和轻链转录物的核苷酸序列设计合成寡核苷酸的重叠组以产生与天然序列有相同氨基酸编码能力的合成 V 序列。合成的重和 κ 轻链序列(命名为 HC6G5[Seq ID No.61]和 LC6G5[Seq ID No.62])在 3 个方面不同于天然序列: 打断数列重复的核苷酸碱基以有利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增; 按照 Kozak 原则(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266,19867-19870)插入最佳翻译起始位点; 以及将 HindIII 位点加工到翻译起始位点的上游。

A. 合成 κ 轻链

轻链 PCR 反应 1

合并下列寡核苷酸: o-548 [Seq.ID NO.13], o-549 [Seq.ID NO.14], o-550 [Seq.ID NO.15], o-551 [Seq.ID NO.16], o-552 [Seq.ID NO.17], o-563 [Seq.ID NO.18], o-564 [Seq.ID NO.19], o-565 [Seq.ID NO.20], o-566 [Seq.ID NO.21], o-567 [Seq.ID NO.22], 然后用下列 2 个引物扩增: o-527 [Seq.ID NO.23]和 o-562[Seq.ID NO.24]。

轻链 PCR 反应 2

合并下列寡核苷酸: o-553 [Seq.ID NO.25], o-554 [Seq.ID

NO.26], o-555 [Seq.ID NO.27], o-556 [Seq.ID NO.28], o-557 [Seq.ID NO.29], o-558 [Seq.ID NO.30], o-559 [Seq.ID NO.31], o-560 [Seq.ID NO.32], o-561 [Seq.ID NO.33], o-562 [Seq.ID NO.34], 然后用下列 2 个引物扩增: o-552 [Seq.ID NO.17]和 o-493[Seq.ID NO.34]。

轻链 PCR 反应 3

然后将轻链 PCR 反应 1 和 2 的产物组合起来, 用下列 2 个引物扩增: o-493[Seq.ID NO.34]和 o-527[Seq.ID NO.23]。

用 HindIII 和 BbsI 消化轻链 PCR 反应的产物, 然后克隆到 HindIII/BbsI 消化的 pCK7-96[Seq.ID NO.11]中以产生 pLC6G5[Seq.ID NO.35]。

B. 合成 γ 重链

重链 PCR 反应 1

合并下列寡核苷酸: o-528 [Seq.ID NO.36], o-529 [Seq.ID NO.37], o-530 [Seq.ID NO.38], o-531 [Seq.ID NO.39], o-532 [Seq.ID NO.40], o-543 [Seq.ID NO.41], o-544 [Seq.ID NO.42], o-545 [Seq.ID NO.43], o-546 [Seq.ID NO.44], o-547 [Seq.ID NO.45], 然后用下列 2 个引物扩增: o-496 [Seq.ID NO.46]和 o-542[Seq.ID NO.47]。

重链 PCR 反应 2

将下列寡核苷酸: o-533 [Seq.ID NO.48], o-534 [Seq.ID NO.49], o-535 [Seq.ID NO.50], o-536 [Seq.ID NO.51], o-537 [Seq.ID NO.52], o-538 [Seq.ID NO.56], o-539 [Seq.ID NO.53], o-540 [Seq.ID NO.54], o-541 [Seq.ID NO.55], o-542 [Seq.ID NO.47], 以及分离的 pCG7-96[Seq.ID NO.12]的 439 bp BbsI 片段, 然后用下列 2 个引物扩增: o-490 [Seq.ID NO.57]和 o-520[Seq.ID NO.58]。

重链 PCR 反应 3

然后将重链反应 1 和 2 的产物组合起来, 用下列 2 个引物扩增: o-520[Seq.ID NO.58]和 o-521[Seq.ID NO.59]。

用 HindIII 和 AgeI 消化重链反应 3 的产物, 然后克隆到 HindIII/AgeI 消化的 pCG7-96[Seq.ID NO.12]中以产生 pHCG6G5[Seq.ID NO.60]。

表 24 在小基因构建中所用的引物、载体和产物

p260-273 序列

pCK7-96 [Seq. I.D. No. 11]

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAG

CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCC
GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCC
TTTCGTCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCC
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
AAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCC
AGTGCCAAGCTAGCGGCCGCGGTCCAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAG
CCTGTTATCCCAGCACAGTCCTGGAAGAGGCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGG
CTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTCAGACCTGTTCTGAATTCTAAACT
CTGAGGGGGTTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAG
GTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATT
TAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAACATCAAGATTT
TAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTCT
GTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACACCCCAAGGGCAGAACT
TTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCAT

CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCC
TGACCCCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTAT
TGCGGTCCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTTGGCTTTAATTA
TGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTC
TCTTTCCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTA
TAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCT
TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGC
CTTCTGTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCA
ATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTC
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTG
GGCGC

pCG7-96 [Seq. I.D. No. 12]

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGC
AGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCAT
GAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGC
GCCCTGGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTTGCAGC
CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGC
TCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGG
CAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGG
AGAGGGTCTTCTGGCTTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTA
ACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATA
TCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCC
CTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTG
CAGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGGTAAGCCAG
CCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCC

AGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTG
CGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGC
TGTAACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGAT
GCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCAC
CCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAGGCCG
AGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTG
GCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGC
CCTCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTG
GGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCTGCCTC
TGTAGGAGACTGTCTGTCTGTGAGCGCCCTGTCTCTCCGACCTCCATGCCCACT
CGGGGGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCA
TCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGC
CAGGTTAACTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT
GGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCGTTCGGCTGCGG
CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGG
TATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
GTTACAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC

AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCT
ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA
TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTC
GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGA
AGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAT
TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT
GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGC
TCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTA
CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCA
TCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA
AAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACG
AGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG
CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCA
GAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTAC
AATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA

O-548 [Seq. I.D. No. 13]

ATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTCCC

O-549 [Seq. I.D. No. 14]

AGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCG

O-550 [Seq. I.D. No. 15]

TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG

O-551 [Seq. I.D. No. 16]

AGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAACC

O-552 [Seq. I.D. No. 17]

AGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC

O-563 [Seq. I.D. No. 18]

AGGAGCTTAGGTGCTTTACCTGGTTTATGCTGATACCAGGCTAA

O-564 [Seq. I.D. No. 19]

CCAGCTGCTAATATCCTGACTCGCCCGACAAGTGATGGTGACTC

O-565 [Seq. I.D. No. 20]

TGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATGGAGACTGGGTCATC

O-566 [Seq. I.D. No. 21]

TGGATGTCGCATCTGGAACCTGGGAACCAGAGCAGCAGGAGACC

O-567 [Seq. I.D. No. 22]

GAGGAGCTGAGCTGGGACCATCATGGTGGCAAGCTTAGAGTC

O-527 [Seq. I.D. No. 23]

GACTCTAAGCTTGCCACCATGATGGTCC

O-562 [Seq. I.D. No. 24]

ACCTTGATGGGACACCACTTTGCAAACCTGGATGCAGCATAGATC

O-553 [Seq. I.D. No. 25]

AAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAAGTGGATCTGGGACA

O-554 [Seq. I.D. No. 26]

GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGC

O-555 [Seq. I.D. No. 27]

AACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTG

O-556 [Seq. I.D. No. 28]

GTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA

O-557 [Seq. I.D. No. 29]

TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA

O-558 [Seq. I.D. No. 30]

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGA

O-559 [Seq. I.D. No. 31]

TCTCCAGCTTGGTTCCTGACCAAAAGTGTACGGGAAACTATTA

O-560 [Seq. I.D. No. 32]

GCCTGTTGACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCT

O-561 [Seq. I.D. No. 33]

GCTGATGGTGAGAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTTCCGCTGA

O-493 [Seq. I.D. No. 34]

TCAACTGCTCATCAGATGGC

pLC6G5 [Seq. I.D. No. 35]

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCAC'TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAG
CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA

GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCC
GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAA
GTGCTCATCATTGAAAAAGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCC
TTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
AAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
CGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCC
AGTGCCAAGCTAGCGGCGCGGTCCAACCACCAATCTCAAAGCTTGCCACCATGATG
GTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGCGAC
ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAA
CCAGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGTGTG
CCATCAAGGTTGAGCGGAAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTAC
ACTTTTGGTTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACC
CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGG

TCCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTGGCTTTAATTATGCTA
ATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTT
CCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGG
GACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCTTCATT
CTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCT
GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCTG
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC

O-528 [Seq. I.D. No. 36]

TTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGATGGGTCCTGTCTC

O-529 [Seq. I.D. No. 37]

AGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC

O-530 [Seq. I.D. No. 38]

GGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTC

O-531 [Seq. I.D. No. 39]

AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGG

O-532 [Seq. I.D. No. 40]

GTCTGGAGTGGATTGGTGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAA

O-543 [Seq. I.D. No. 41]

TTCACCAATCCACTCCAGACCCTTACCTGGTGGCTGGCGGATC

O-544 [Seq. I.D. No. 42]

CAGCTCCAGTAGTAACCACTGAAGGAACCACCATAGACAGCGC

O-545 [Seq. I.D. No. 43]

AGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAGTCCTGCGCC

O-546 [Seq. I.D. No. 44]

CCACTGCTGTAGCTGCACCTGAGACAGGACCCATCTAGGAGCT

O-547 [Seq. I.D. No. 45]

GCCACCAGGAGGAGGAAGAACCACAGGTGTTTCATGGTGGCAAGCTTG

O-496 [Seq. I.D. No. 46]

CATGAAACACCTGTGGTTCTTCC

O-542 [Seq. I.D. No. 47]

TCTTGAGAGACGGGTGTAGTTGGTGCTTCCACTATGATTGAT

O-533 [Seq. I.D. No. 48]

CTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC

O-534 [Seq. I.D. No. 49]

ACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCG

O-535 [Seq. I.D. No. 50]

CTGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTG

O-536 [Seq. I.D. No. 51]

GTTTCGACCCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

O-537 [Seq. I.D. No. 52]

GCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC

O-539 [Seq. I.D. No. 53]

CCTGGCCCCAAGGGTCGAACCAATTAATTACTCTCGCACAGTA

O-540 [Seq. I.D. No. 54]

ATACACAGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGTTTCAGA

O-541 [Seq. I.D. No. 55]

GAGAACTGGTTCTTGGACGTGTCTACTGATATGGTGACTCGAC

O-538 [Seq. I.D. No. 56]

CGATGGGCCCTTGGTTGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

O-490 [Seq. I.D. No. 57]

GAAGCACCAACTACAACCCG

O-520 [Seq. I.D. No. 58]

GAGTTCCACGACACCGTCACC

O-521 [Seq. I.D. No. 59]

GACCTCAAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGG

pHC6G5 [Seq. I.D. No. 60]

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTG
GTGGCAGCTCCTAGATGGGTCCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGA
CTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTC
AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATT
GGTGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTC
ACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACC
GCTGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCTTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAG
GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGG
CTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTCACCCGGAG
GCCTCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGC
TCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCCTGACCTAAG
CCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCA
GATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA
CACATGCCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCG
GGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACA
CGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTC
GGCCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC

CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGC
TCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTT
CCCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGAC
TGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAG
GCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCC
CCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTGCCAGCG
TGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCC
CCTGGGGACAGACACAGCCCCTGCCCTCTGTAGGAGACTGTCCTGTTCTGTGAGCG
CCCCTGTCCTCCCGACCTCCATGCCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG
AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCC
TATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTAAACCTGCATTAATGAATCGGCC
AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTCTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG
TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
CTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCG
GTAATATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC
TTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGT
CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAA
CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
CGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTAC

GCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTG
TCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
CTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA
AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAC
GGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAC
CCACTCGTGACCCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGT
GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCT
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGA
CATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATA
TGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAC
ACATACGATTTAGGTGACACTATA

HC6G5 [Seq. I.D. No. 61]

AAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGA
TGGGTCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTCAGTGGTACTACTGG
AGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATTGGTGAAATCAATCAT
AGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC
ACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCTTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGT

LC6G5 [Seq. I.D. No. 62]

AAGCTTGCCACCATGATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTC
CCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTA
GCCTGGTATCAGCATAAACCAGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC
AGTTTGCAAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTAGCGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTC
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAG

实施例 43

人抗 CD4 单克隆抗体与非人灵长类淋巴细胞的结合

要求人抗 CD4 单克隆抗体在动物模型中能够完成临床前毒性和药物动力学研究。还要求可用于非人灵长类动物,所述动物表达含具有人 CD4 交叉反应性表位的 CD4 以便可被单克隆抗体识别。用 5 种不同人抗 CD4 单克隆抗体检测 3 种不同非人灵长类猩猩、恒河猴和猕猴的交叉反应性 CD4 表位,所述单克隆抗体来自杂交瘤 1E11、1G2、6G5、10G5 和 4D1。从猩猩、恒河猴和猕猴的全血中分离外周血淋巴细胞。将分离的细胞用这 5 种杂交瘤(用 FITC-抗-人 IgG 检测)和 PE-抗-CD8 或 PE-抗-CD4 双染色。然后用流式细胞计数分析染色的细胞以确定各个人单克隆抗体是否与这 3 种非人灵长类淋巴细胞表面上的内源 CD4 结合。发现 5 种抗体中有 4 种 1E11、6G5、10G5 和 4D1 结合猩猩 CD4 细胞。另外发现 5 种抗体中有 4 种 6G5、1G2、10G5 和 4D1 结合恒河猴和猕猴 CD4 细胞。因此,5 种抗体中有 3 种 6G5、10G5 和 4D1 与所检测的 3 种非人灵长类中的各 CD4 细胞结合。

实施例 44

没有已知的体外试验可以很容易地预测单克隆抗体在患者体内是非耗尽的(nondepleting)还是免疫抑制的。但是在人和非人灵长类如猩猩和猕猴中已经观察到 3 种不同单克隆抗体耗尽(或不耗尽)的能力间的关系(参见如 M. Jonker et al., Clin. Exp. Immunol. 93:301-307(1993); and J. A. Powelson et al., Transplantation, 57,788-793(1994))。因此在非人灵长类中用人单克隆抗体完成研究。

在该研究中使用猩猩,因为抗-CD4 单克隆抗体之一 1E11 仅在猩猩中识别 CD-4,而在恒河猴或猕猴中均不识别。第二种单克隆抗体 6G5 识别猩猩、恒河猴和猕猴中的 CD4。第三种单克隆抗体 1G2 在猩猩中不识别 CD4,但在恒河猴和猕猴中识别 CD4。已表明在猕猴中该单克隆抗体在体内是非耗尽的。

除检测人单克隆抗体对外周血 CD4+T 细胞数的作用外,还评估施用单克隆抗体对体内 T 细胞功能的影响。完成这项任务最可接受的方法是使用已经对抗原如结核菌素或破伤风类毒素预先致敏并在皮肤上超

敏感性反应增加的动物。

在该研究中使用 3 只雄性猩猩。在-7、-3 和 1 天, 得到基线全血样品。在 1 天取血后, 用两种人单克隆抗体之一(1E11 或 6G5)以 2 mg/ml 静脉内输注一只猩猩。第三只猩猩只接受等体积/kg 的缓冲液。在输注后 30 分钟、2 小时、8 小时、24 小时和 48 小时取血。在 2 天, 检测皮肤反应性。

表 25 中所列的结果清楚地表明 1E11 引起外周血淋巴细胞的短暂耗尽, 而大部分 CD4+T 细胞被耗尽。虽然 6G5 不引起淋巴细胞或 CD4+T 细胞耗尽, 但与对照猩猩相比, 两种单克隆抗体均能抑制对破伤风类毒素的超敏反应。因此两种人单克隆抗体在体内是免疫抑制的, 而这种免疫抑制不需要 T 细胞耗尽。

表 25 人单克隆抗体对外周血猩猩淋巴细胞的作用
外周血淋巴细胞(百万个/ml)

研究天数	1E11	6G5	对照
-7	4.2	6.4	4.2
-4	4.0	9.9	4.4
1, 融合前	4.8	5.7	5.8
1, 30 分钟后	1.6	6.0	4.0
1, 2 小时后	1.0	6.7	5.2
1, 6 小时后	1.5	8.0	4.2
2	3.5	9.6	5.7
3	3.9	9.7	5.9

为了说明和描述, 已经给出了本发明优选实施方案的前述描述。它们不是打算穷举或将本发明限制到所公开的确切形式, 在上述教导下, 许多修饰和改变都是可能的。在权利要求范围内, 可以实施的某种改变和修饰是显而易见的。

本文所有文献和专利申请均以相同的程度引入本文作为参考, 如同具体并分别说明各文献或专利申请引入本文作为参考。普通转让的 1995 年 10 月 10 日申请的美国系列申请号为 08/544,404, 1994 年 12 月 7 日

申请的美国系列申请号为 08/352,322 , 1994 年 3 月 9 日申请的美国系列申请号为 08/209,741 , 1993 年 12 月 10 日申请的美国系列申请号为 08/165,699 和 1993 年 12 月 3 日申请的美国系列申请号为 08/161,739 (08/161,739 是 1993 年 11 月 18 日申请的美国系列申请号为 08/155,301 的部分延续申请), WO 92/03918, 1991 年 12 月 17 日申请的 USSN 07/810,279, 1992 年 3 月 18 日申请的 USSN 07/853,408, 1992 年 6 月 23 日申请的 USSN 07/904,068, 1992 年 12 月 16 日申请的 USSN 07/990,860, WO 93/12227, 1993 年 4 月 26 日申请的美国系列申请号为 08/053,131 , 各申请引入本文作为参考。

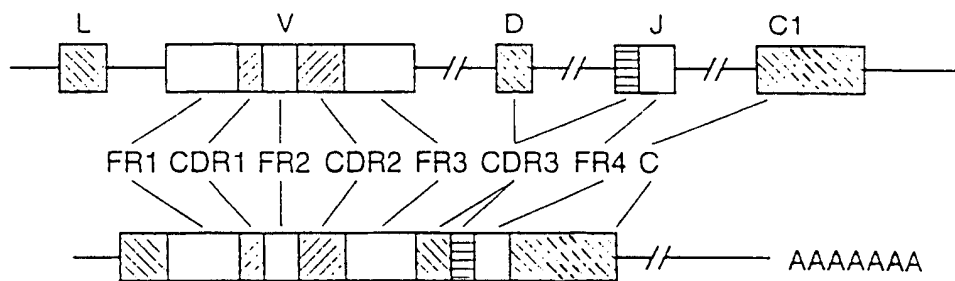


图 1

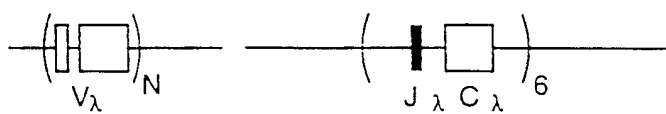


图 2

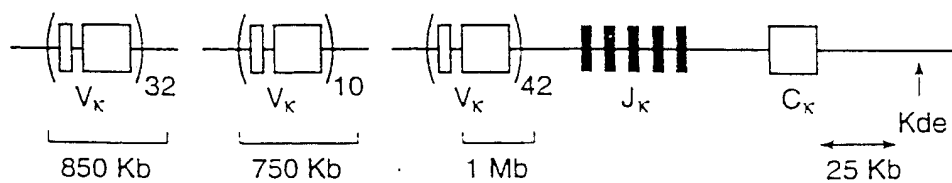
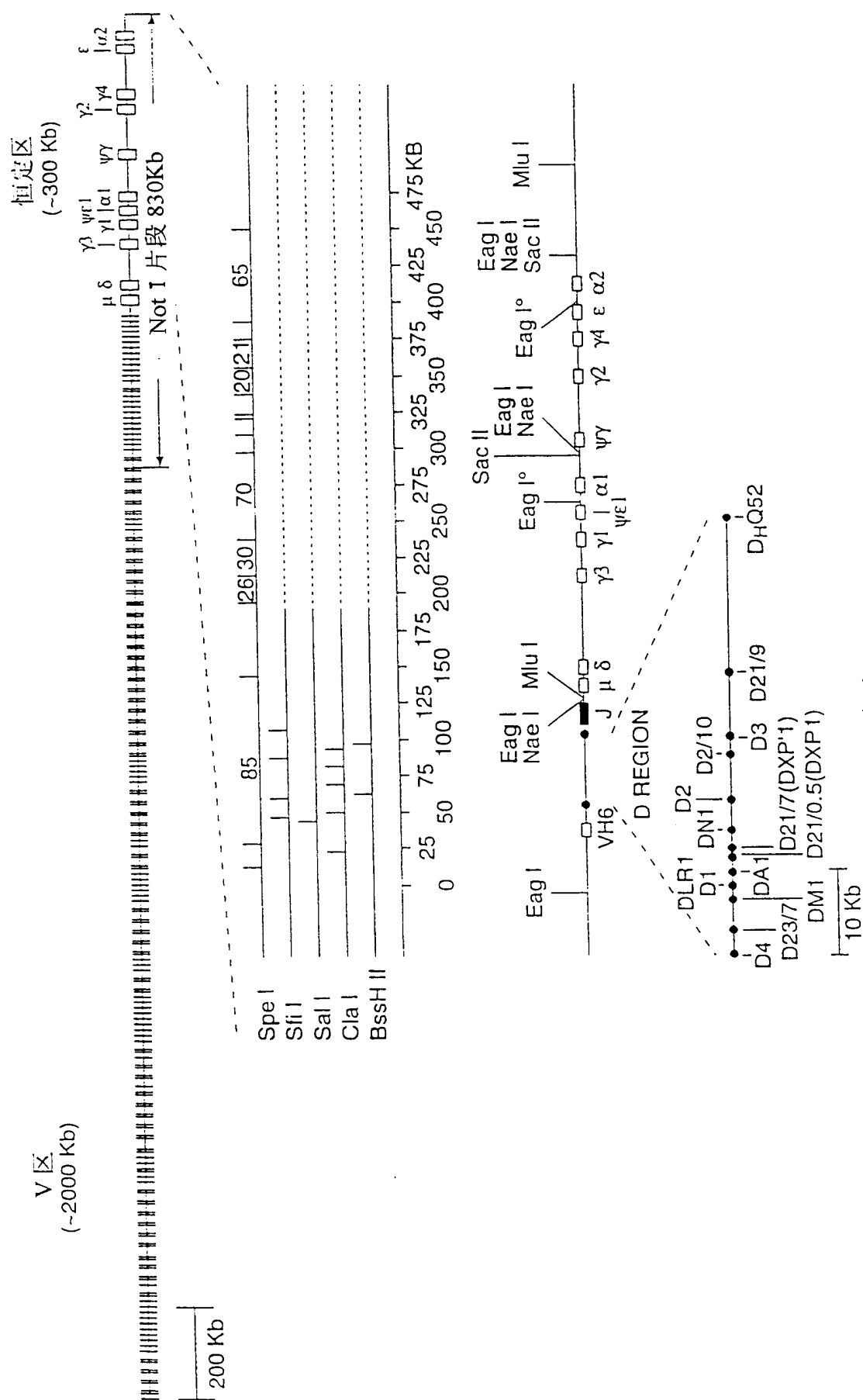


图 3



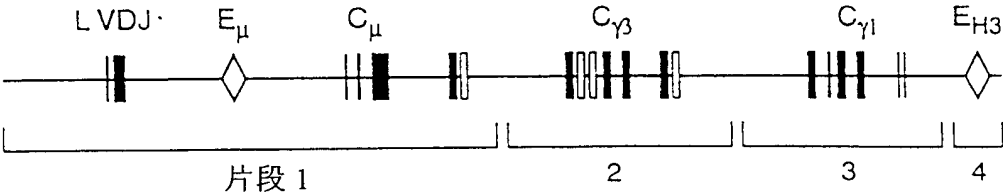


图 5

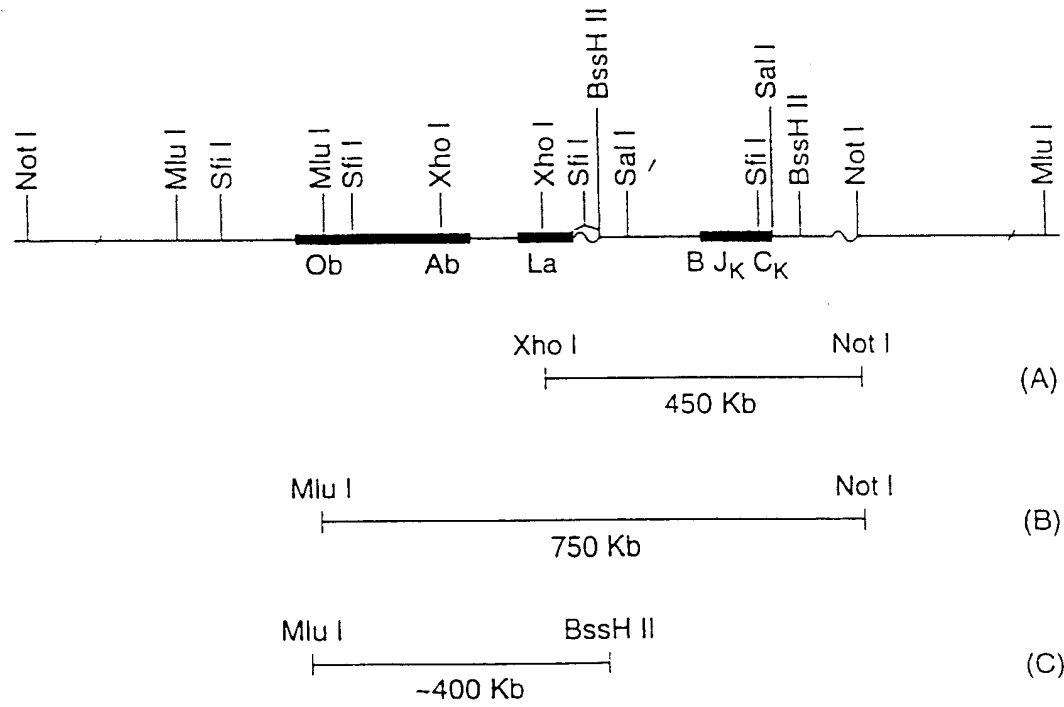


图 6

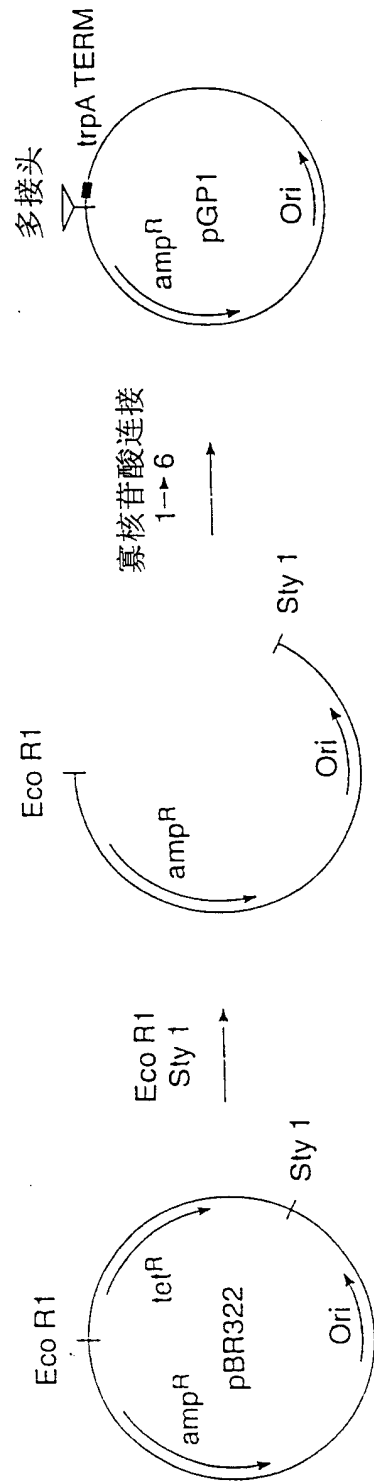


图 7

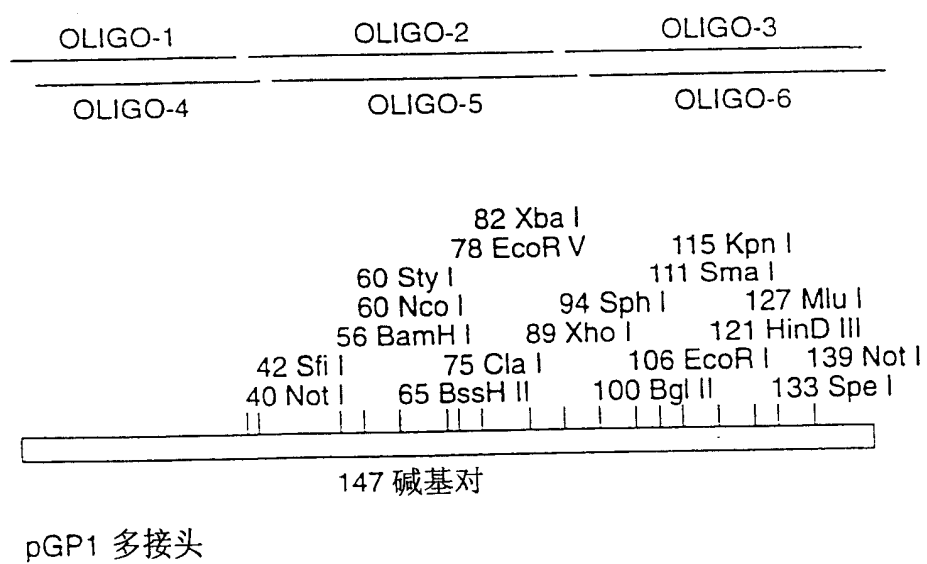
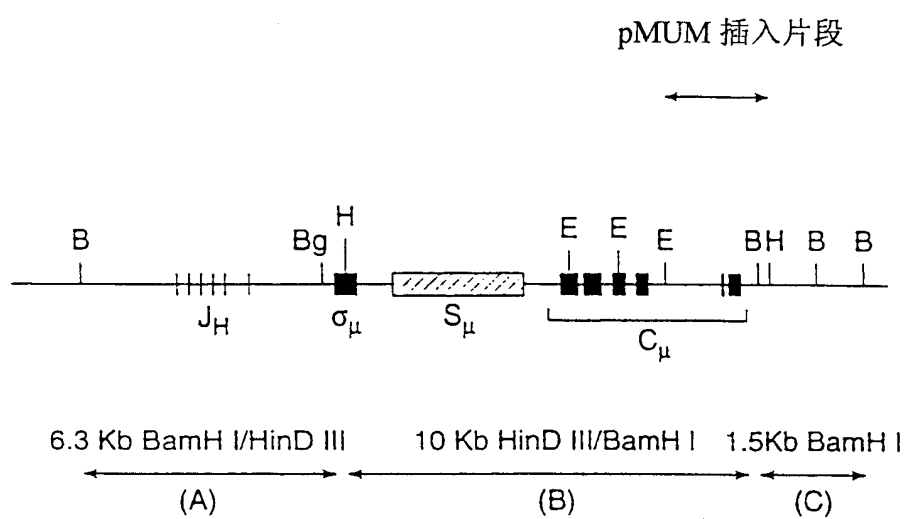


图 8



人 μ 座位

图 9

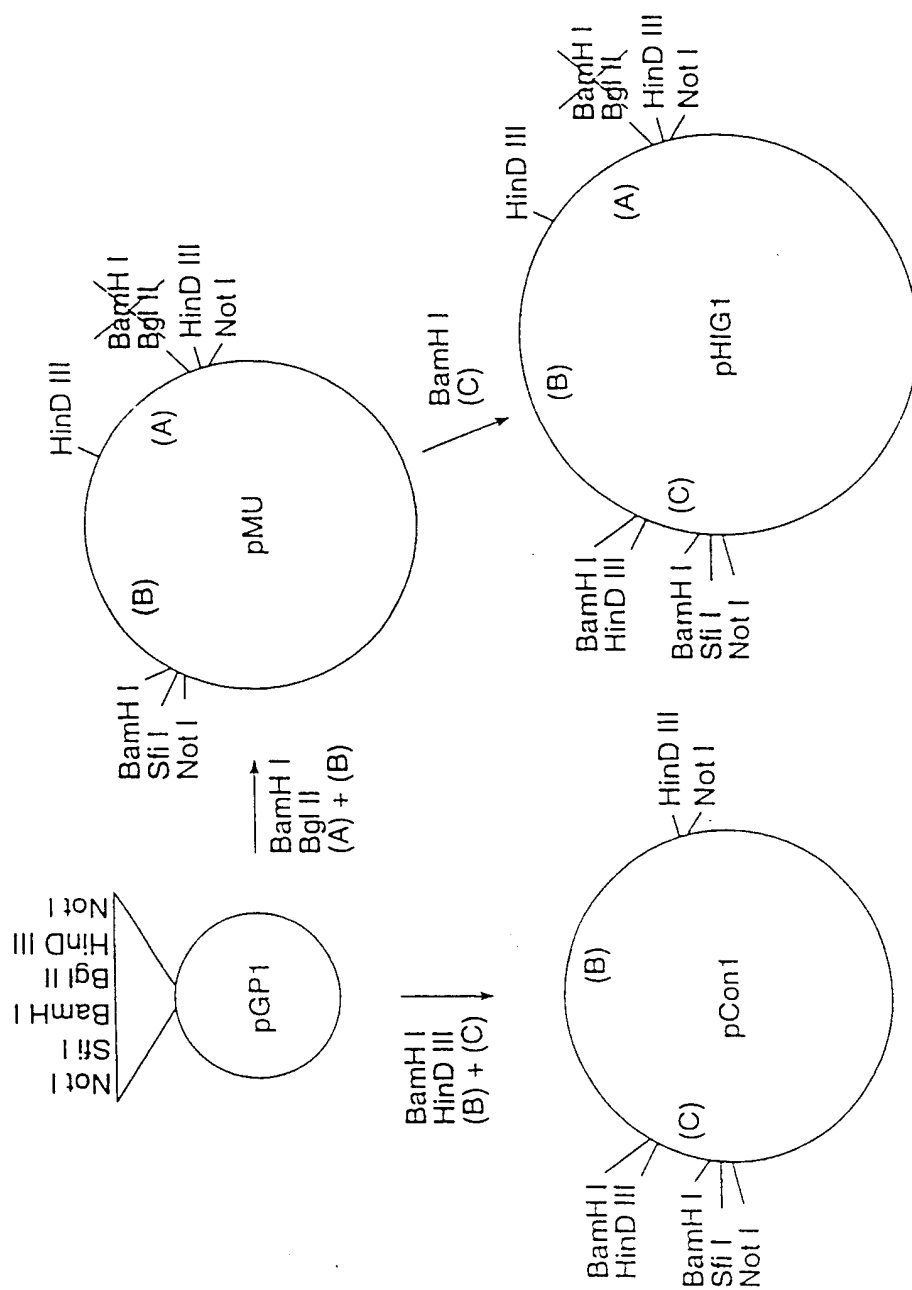


图 10

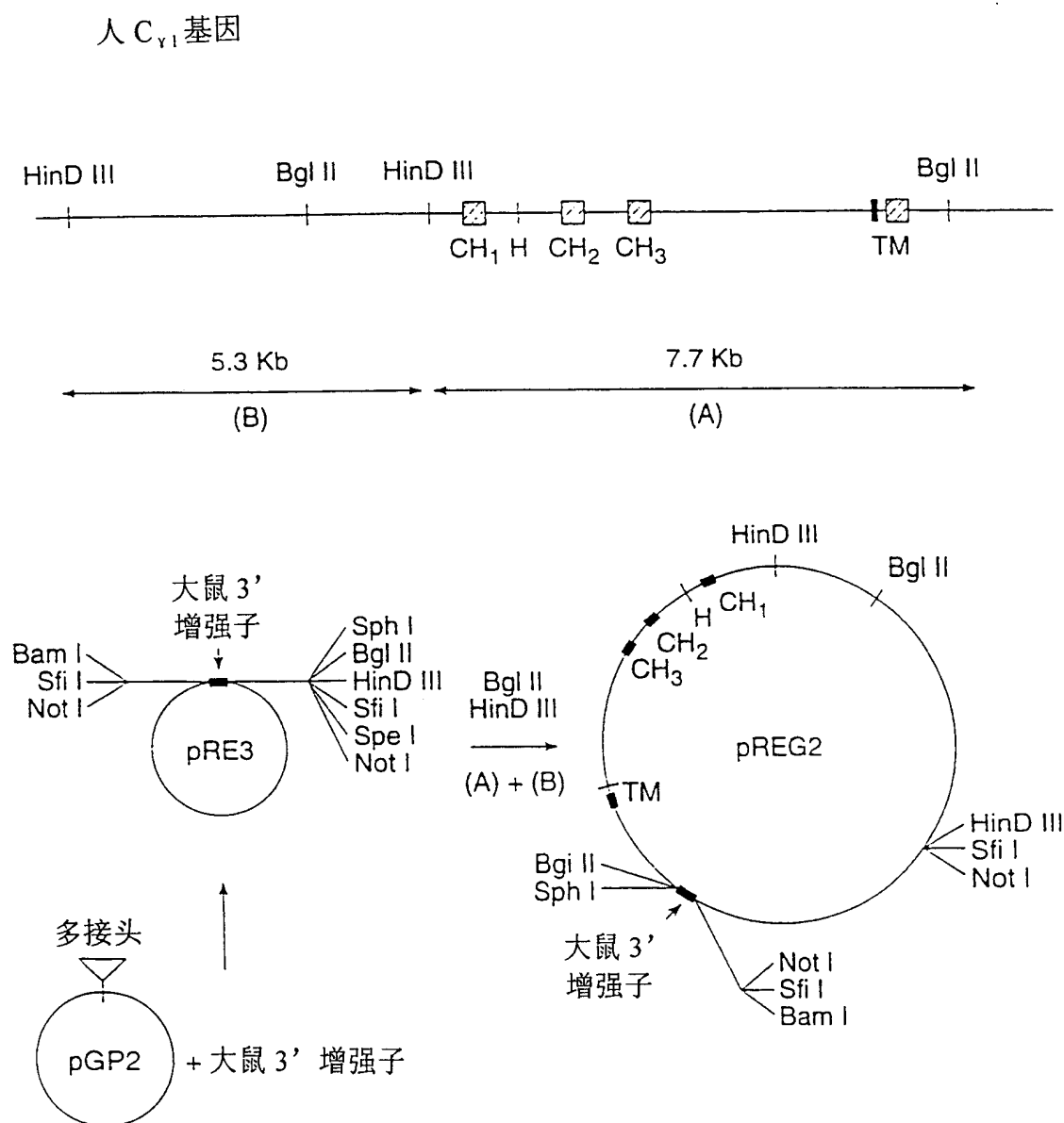


图 11

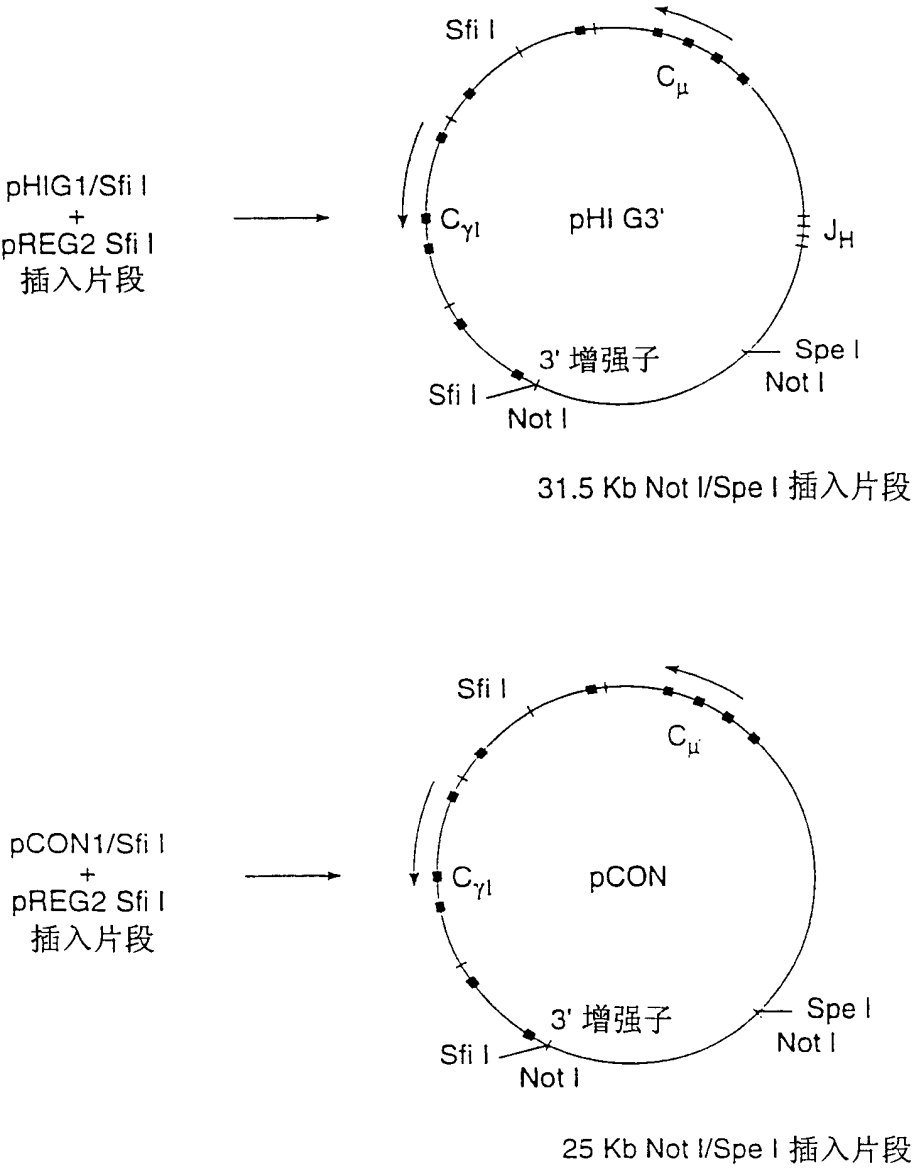


图 12

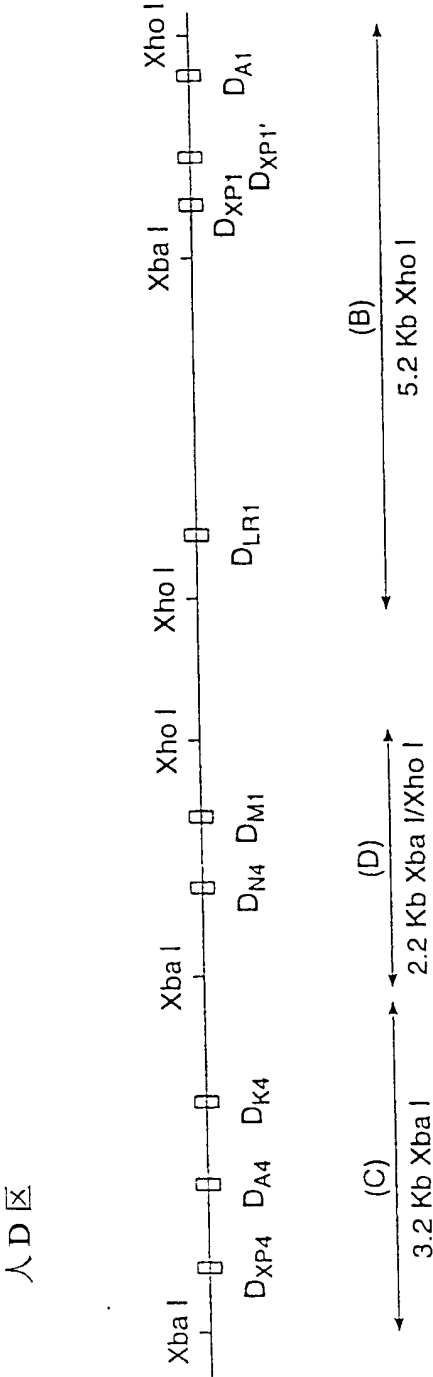


图 13

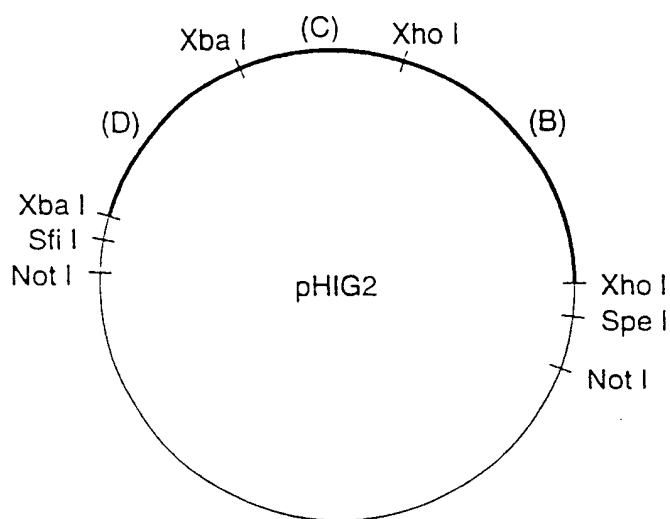


图 14

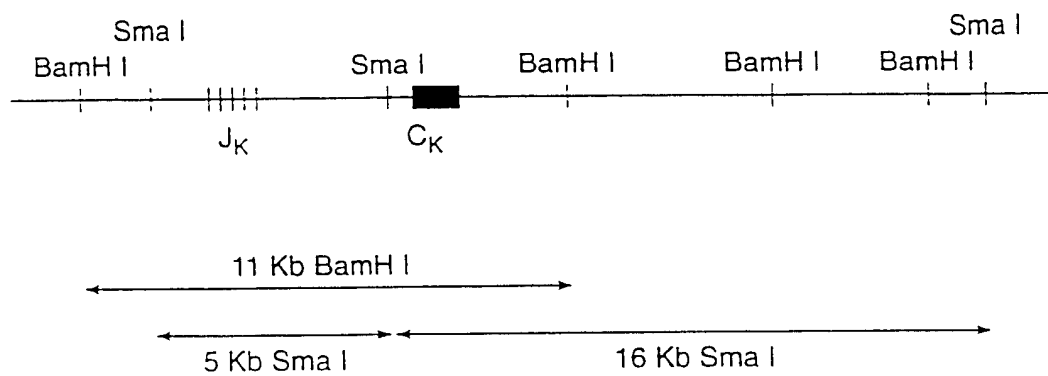


图 15

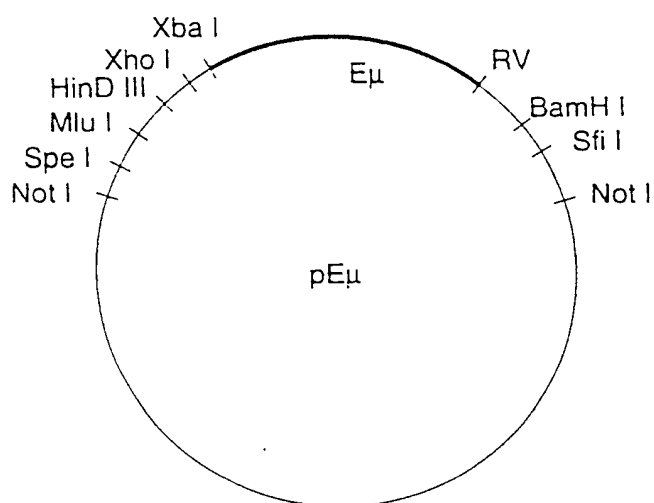


图 16

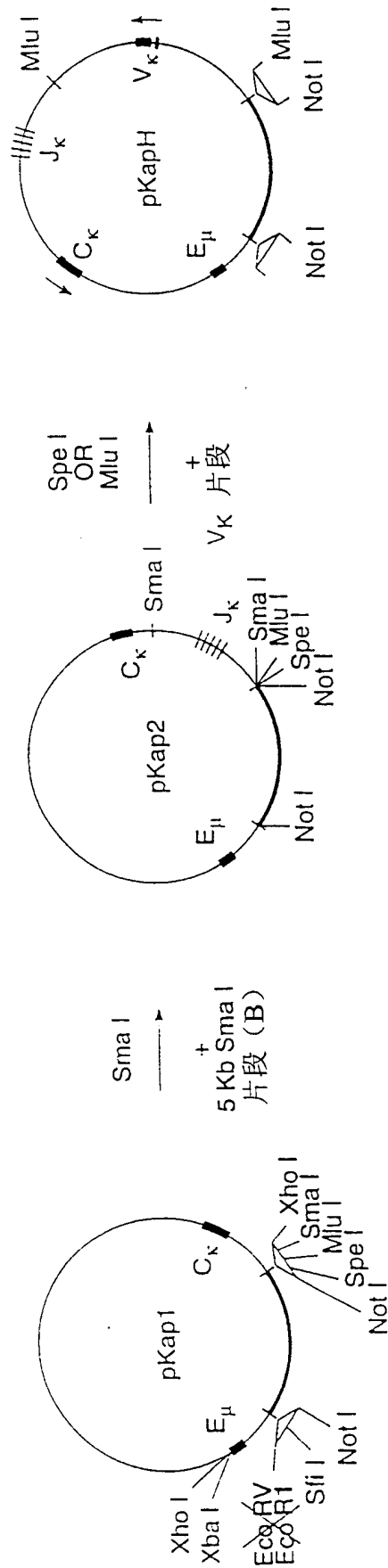


图 17

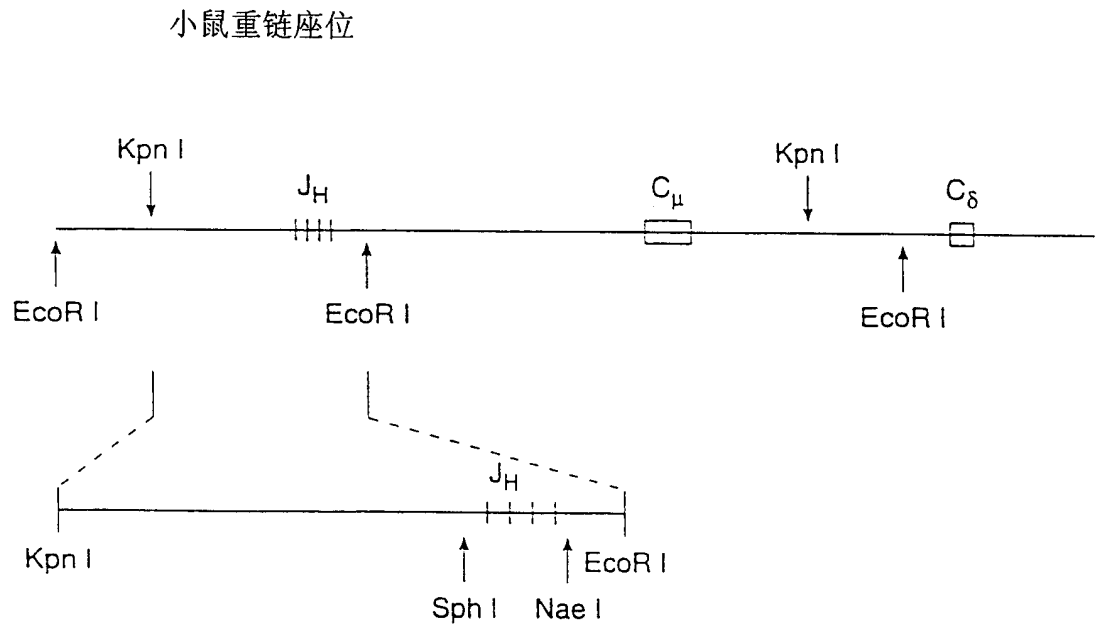


图 18a

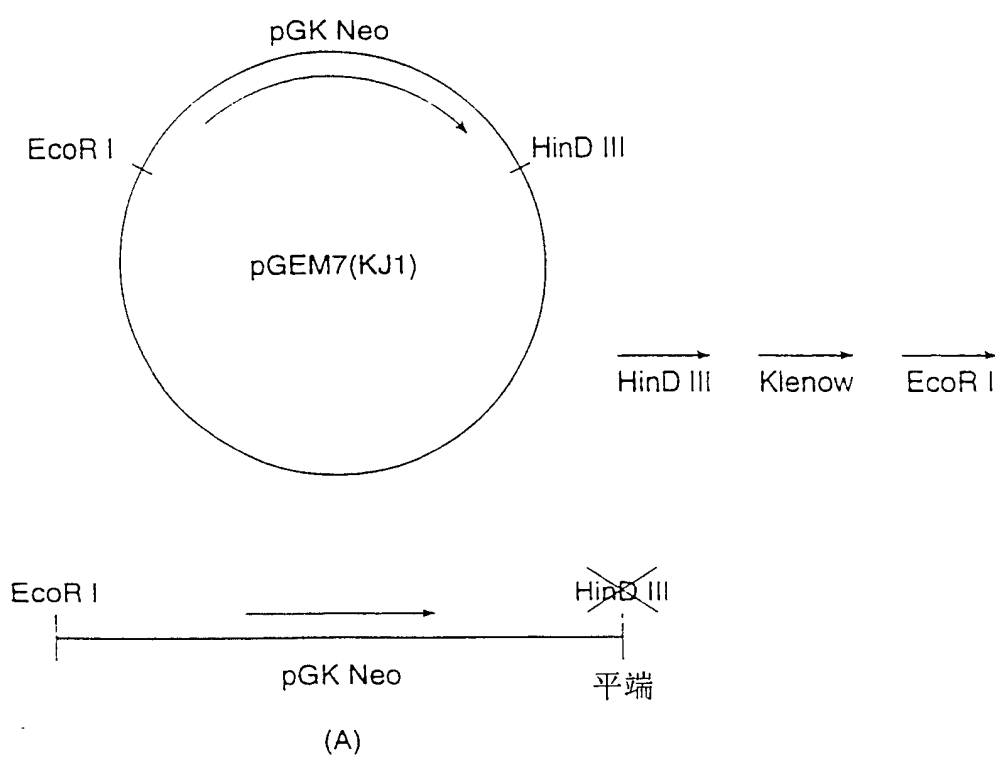


图 18b

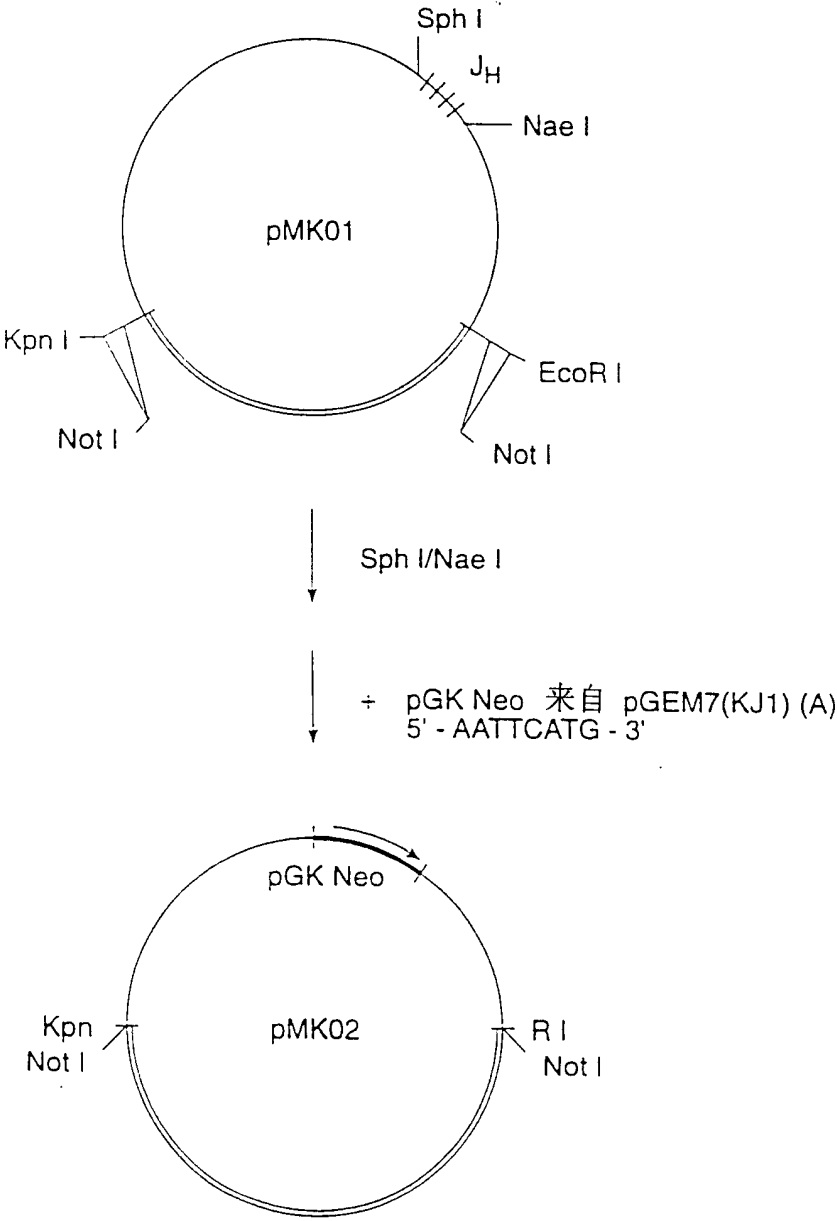


图 18c

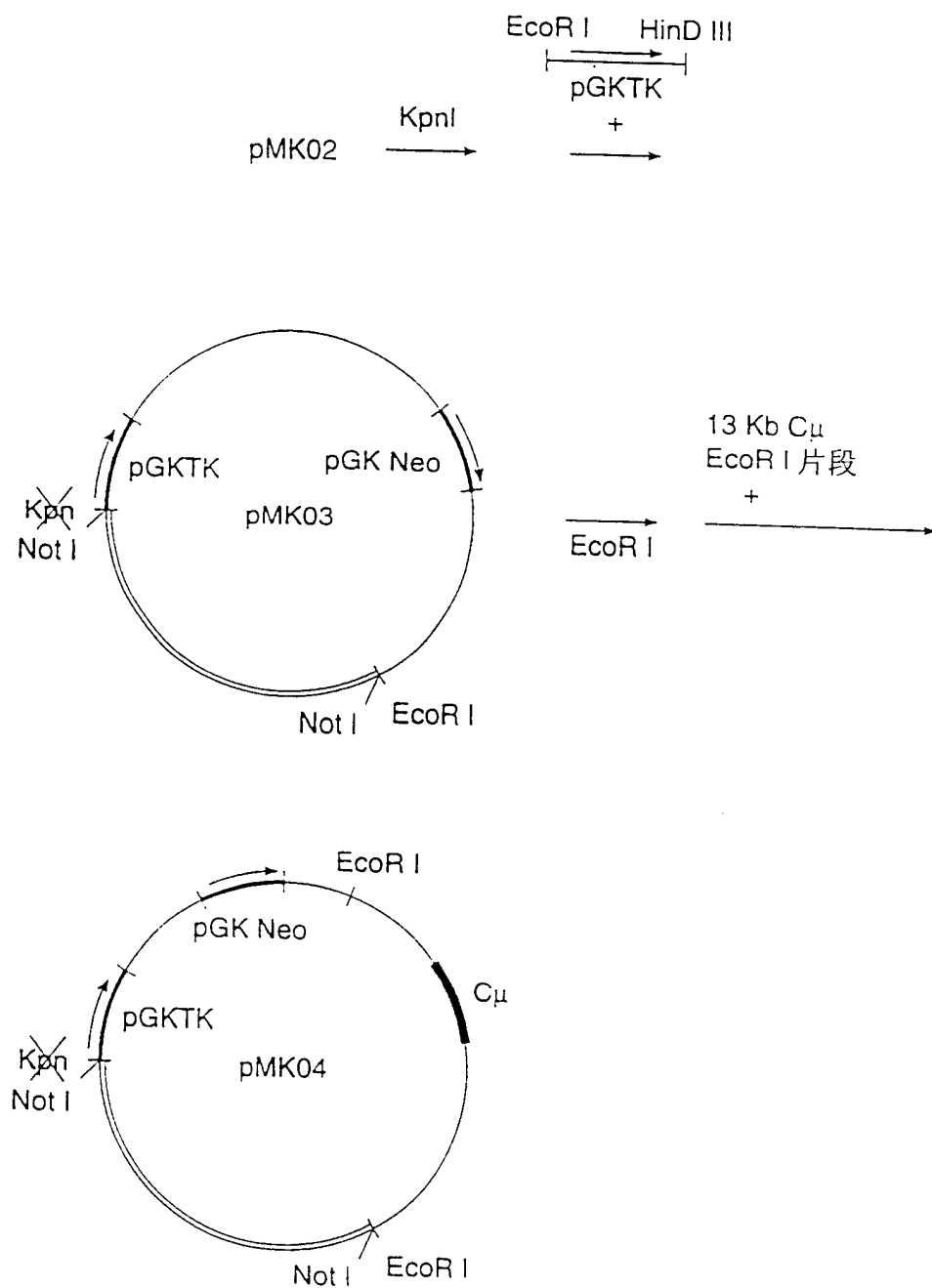


图 18d

小鼠 K 基因

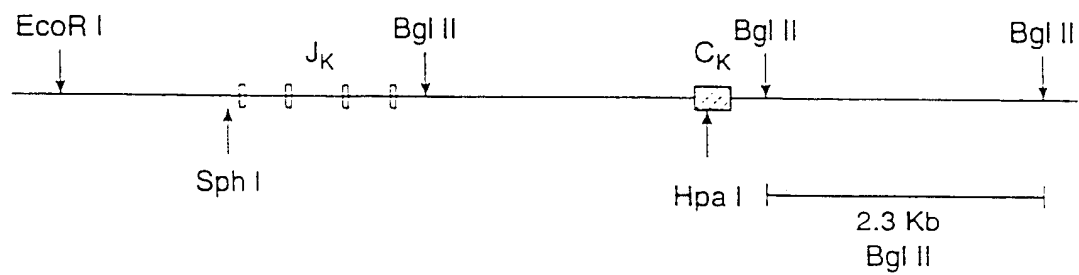


图 19a

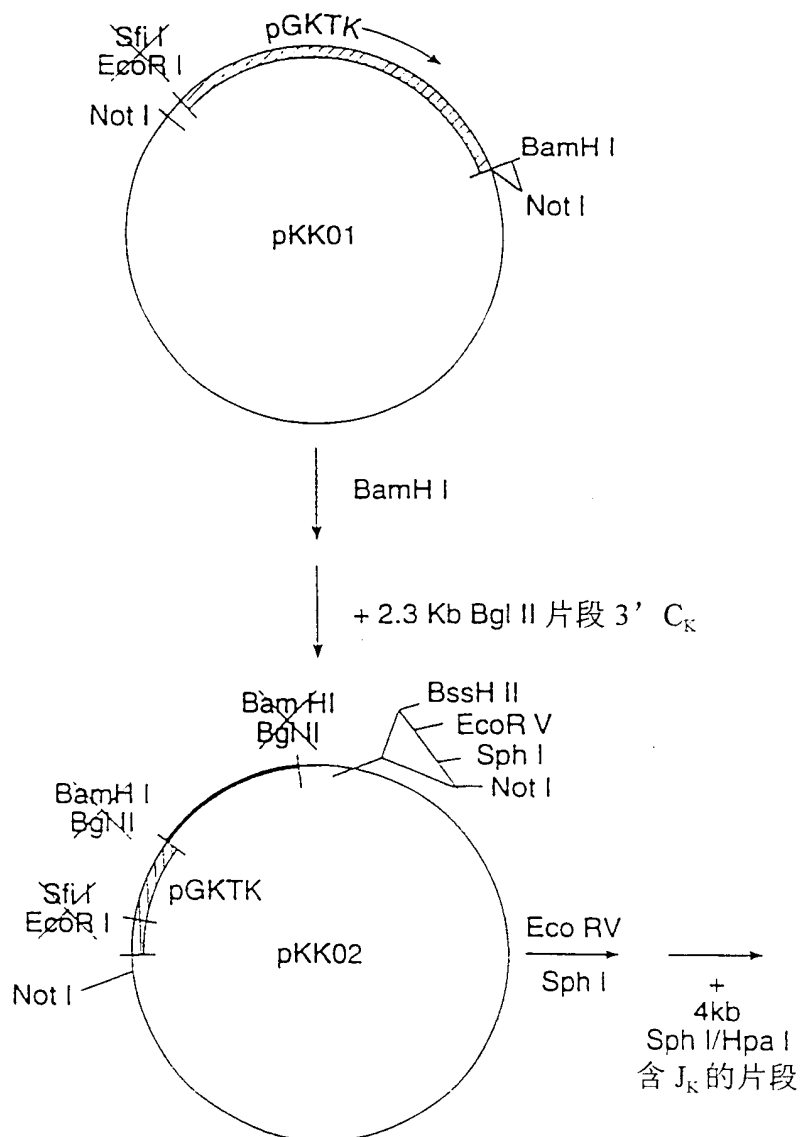


图 19b

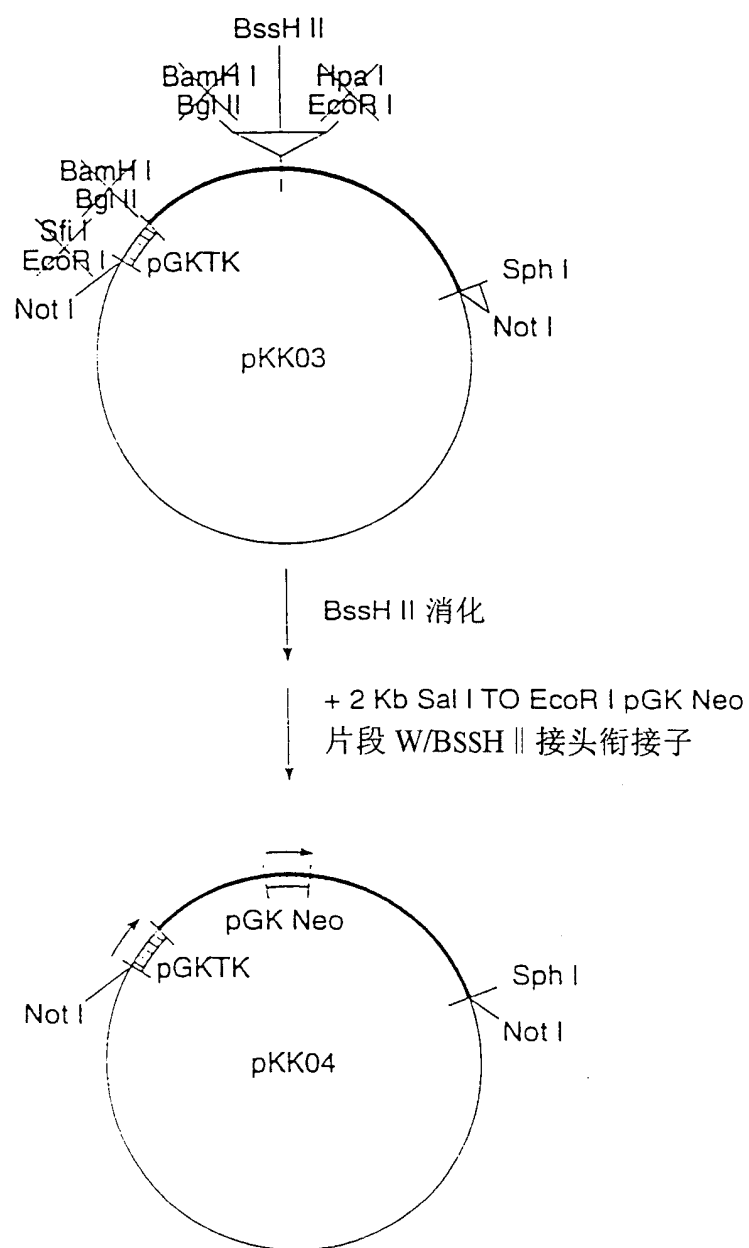


图 19c

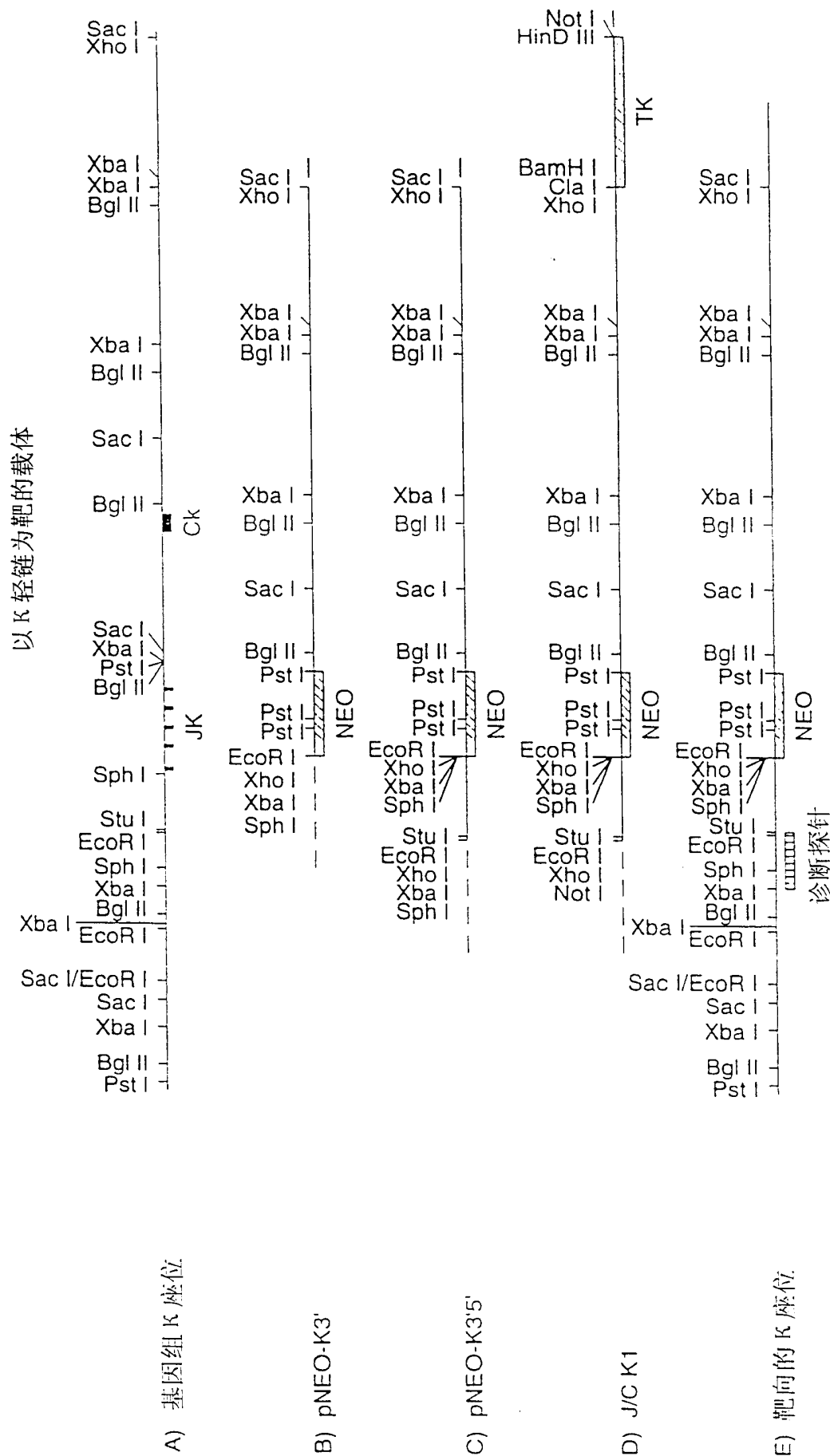
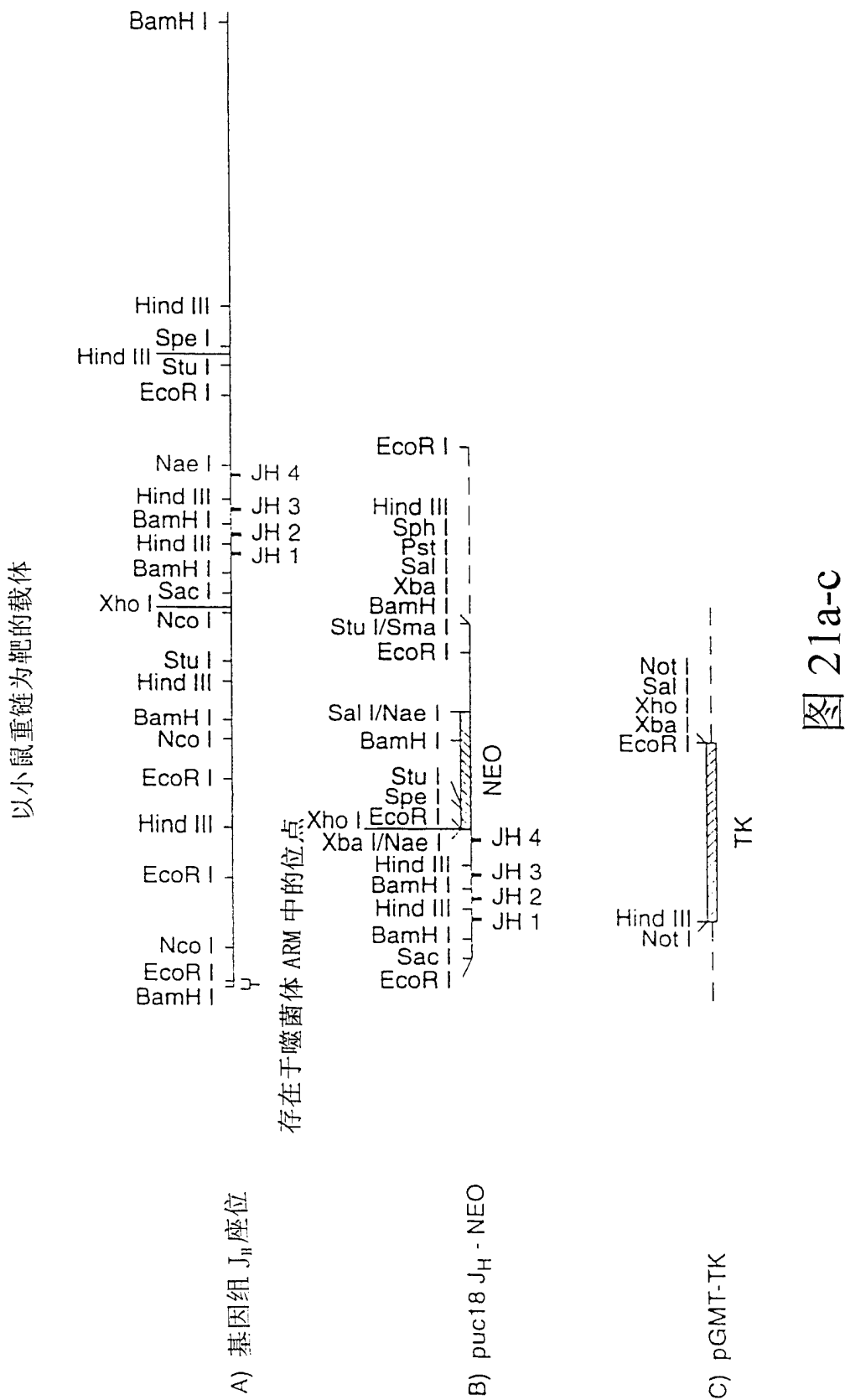


图 20



以小鼠重链为靶的载体

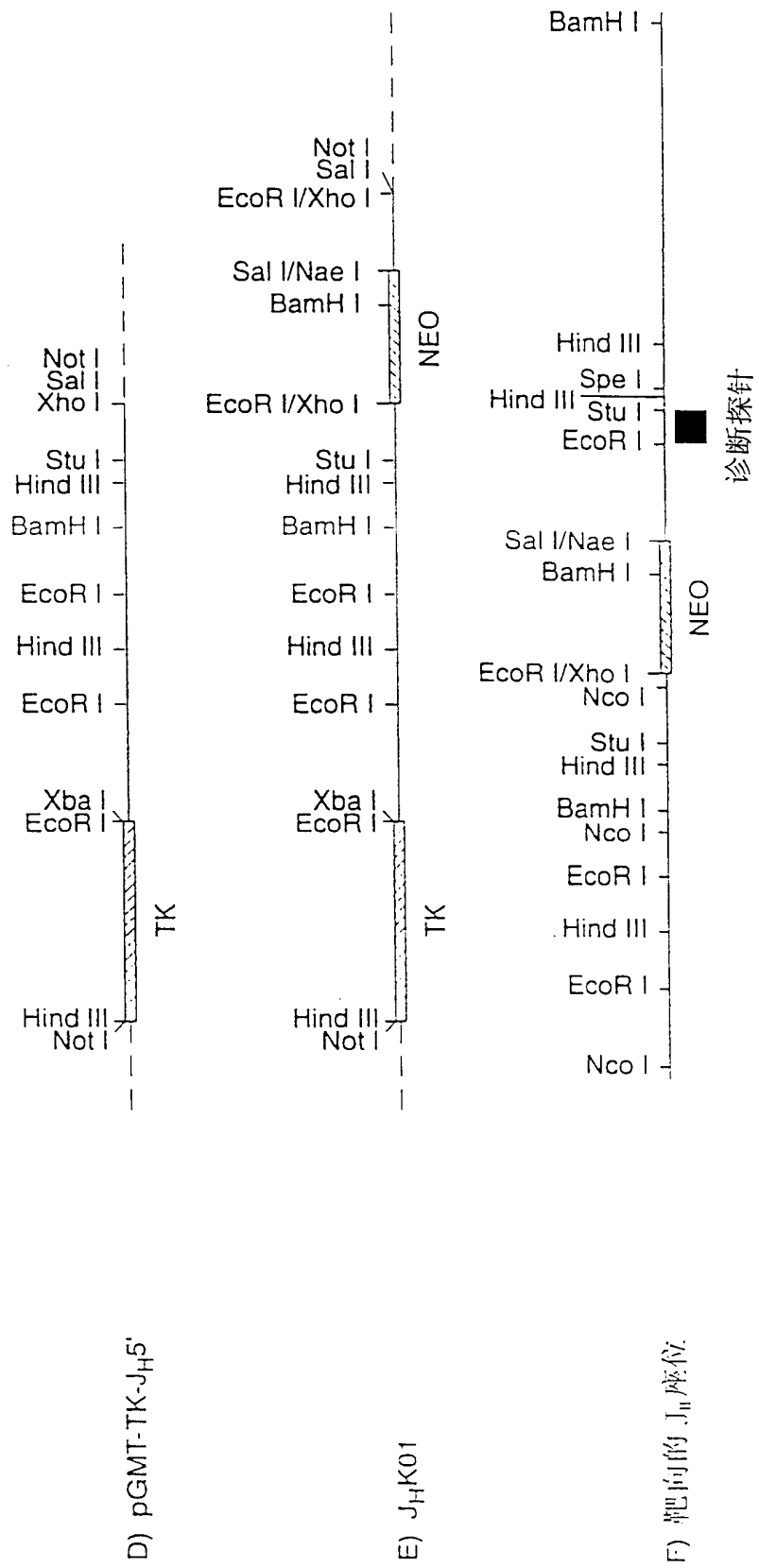


图 21d-f

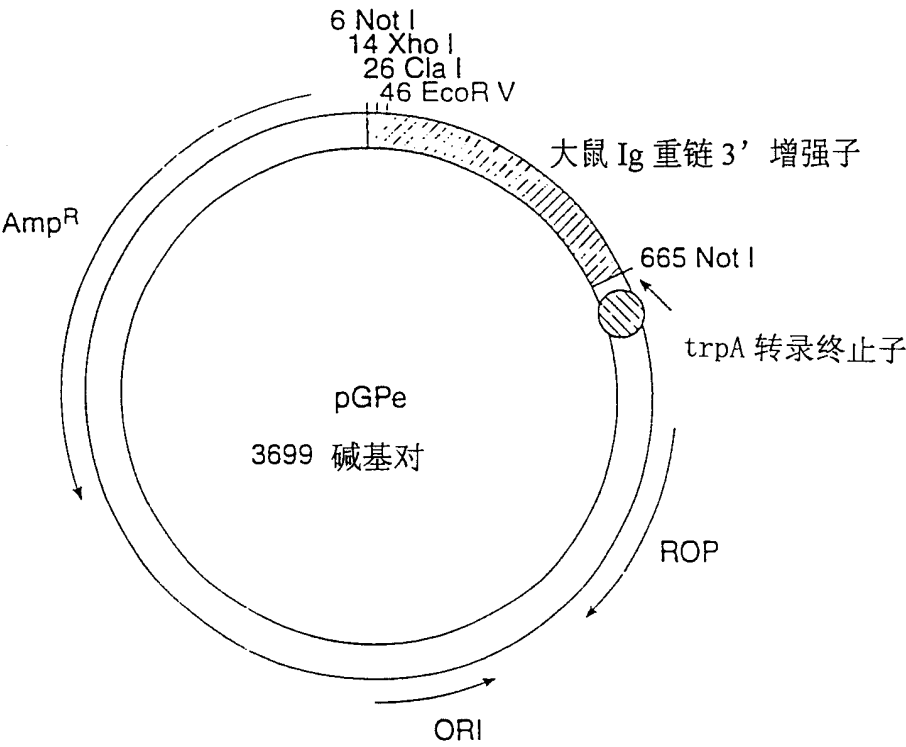


图 22

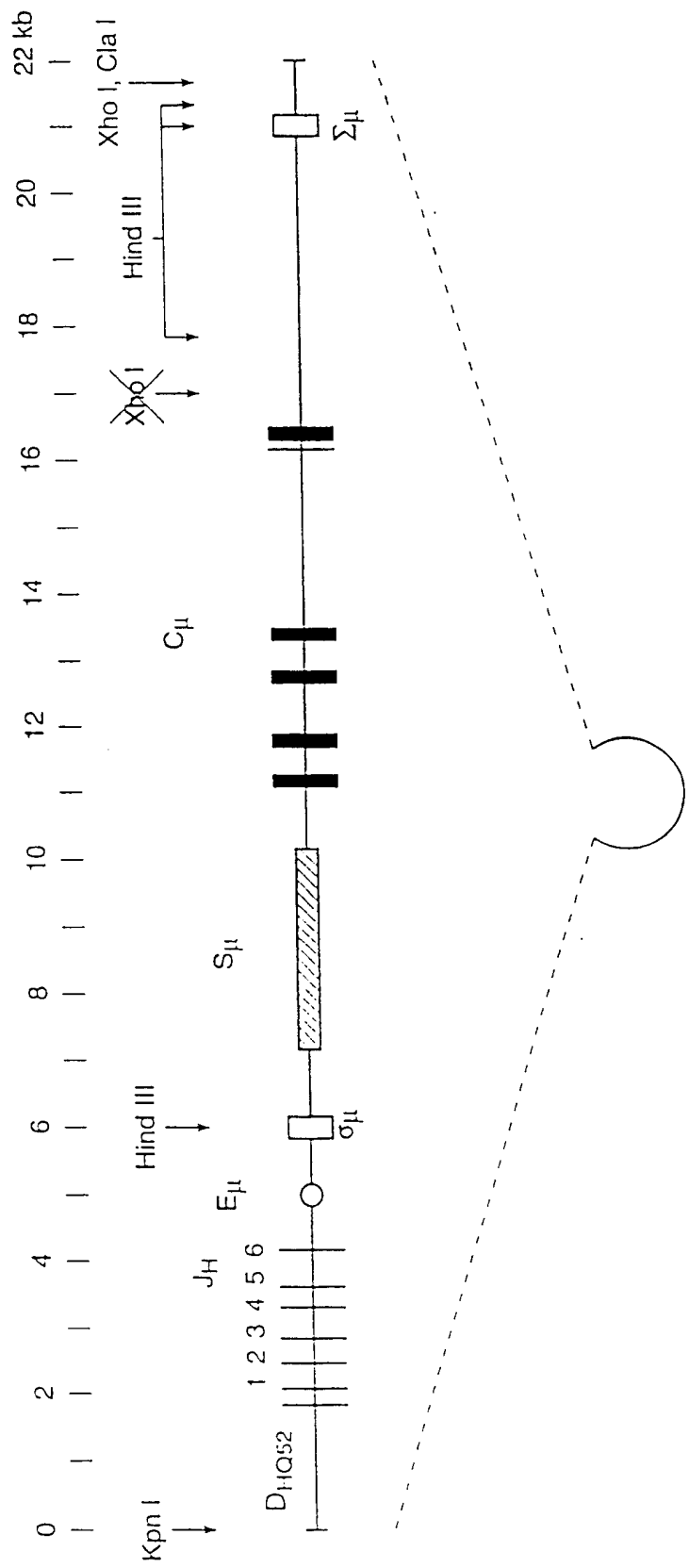


图 23

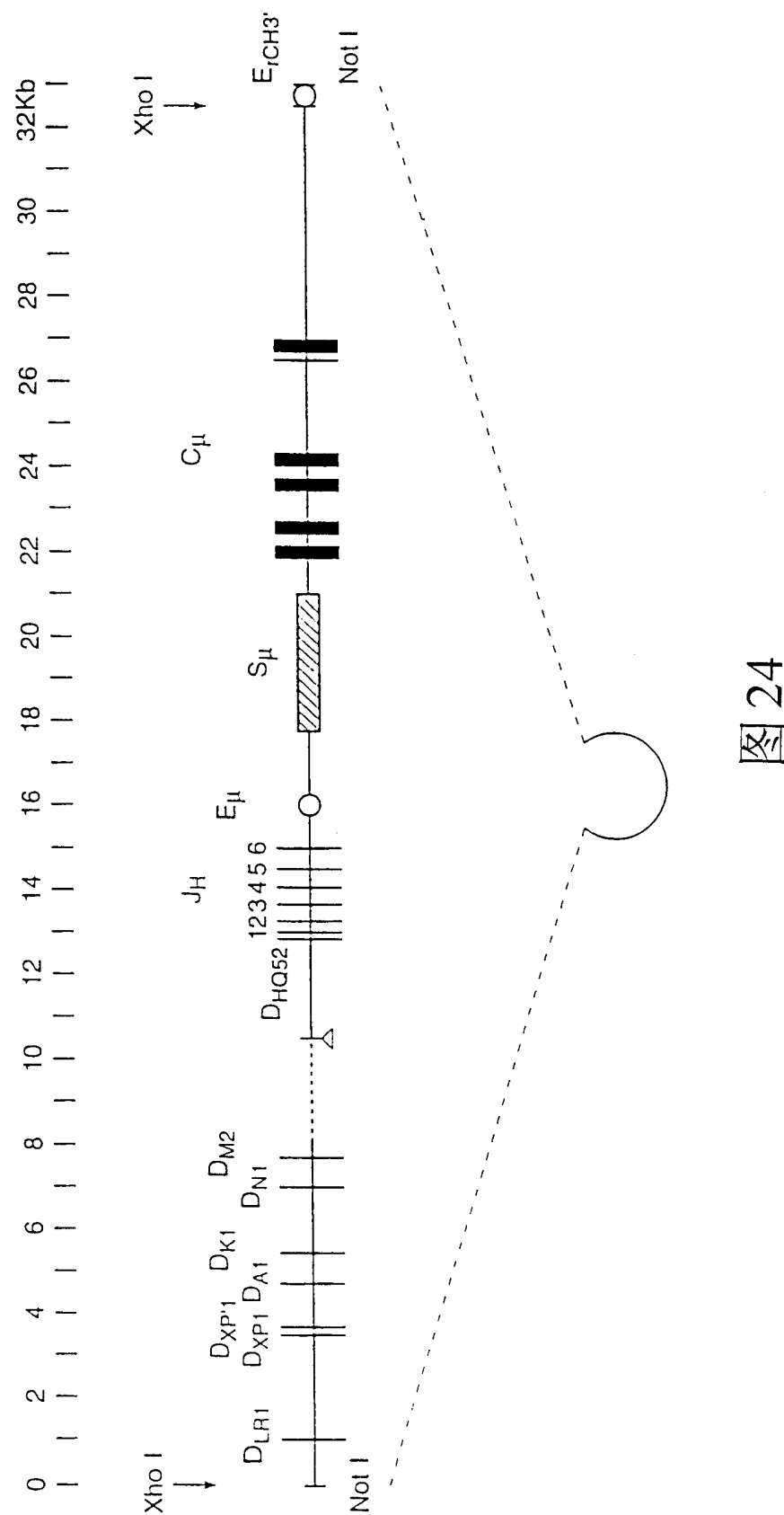


图 24

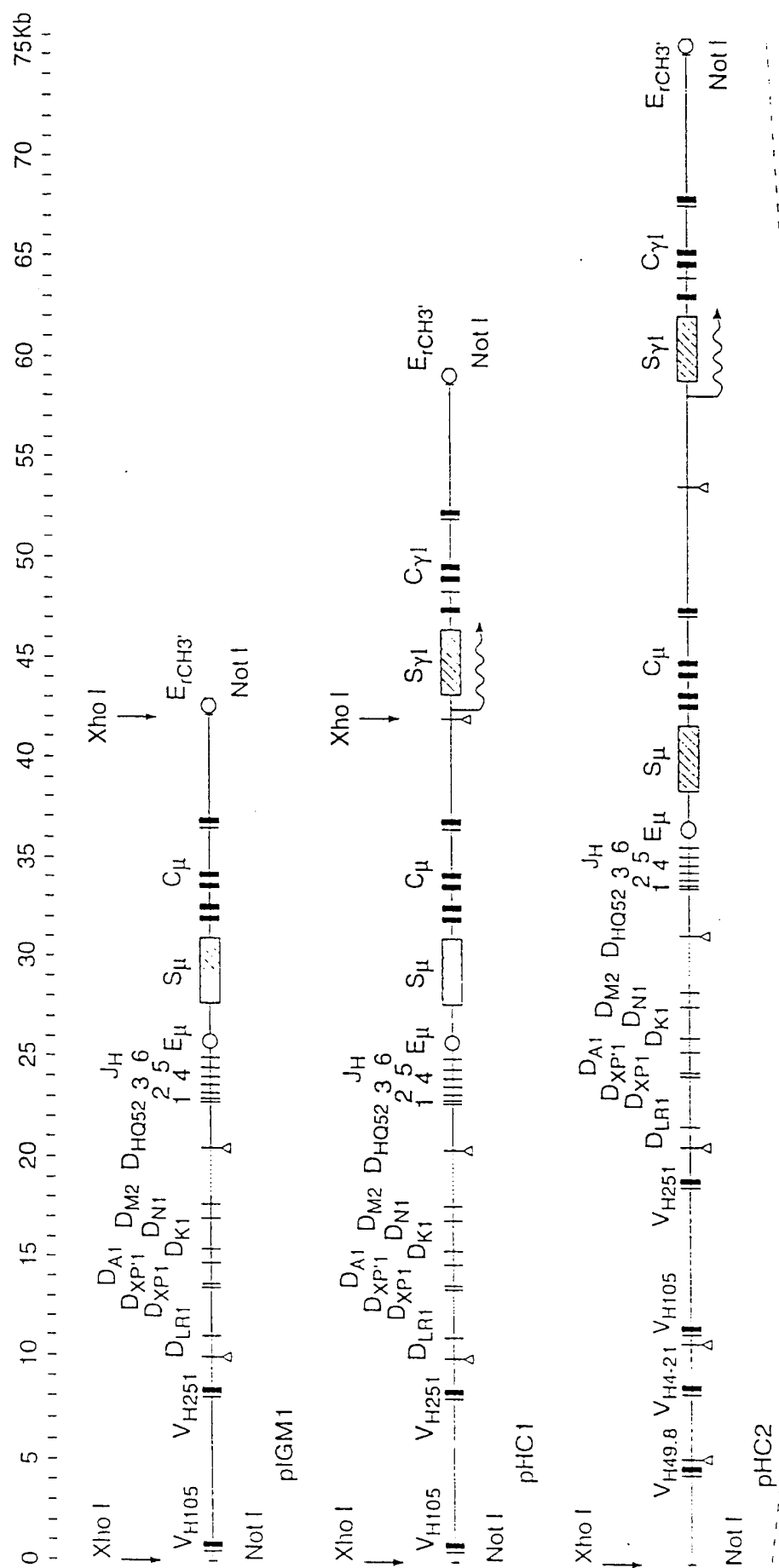


图 25

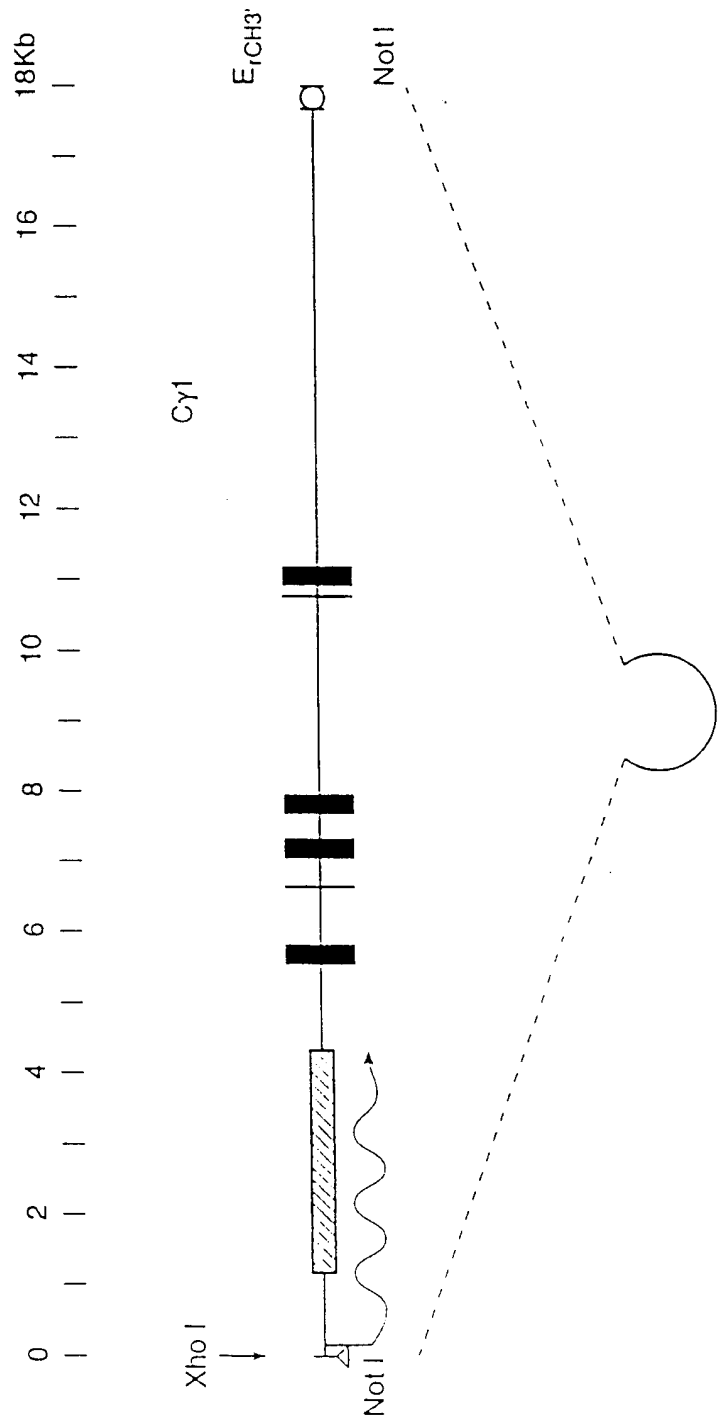


图 26

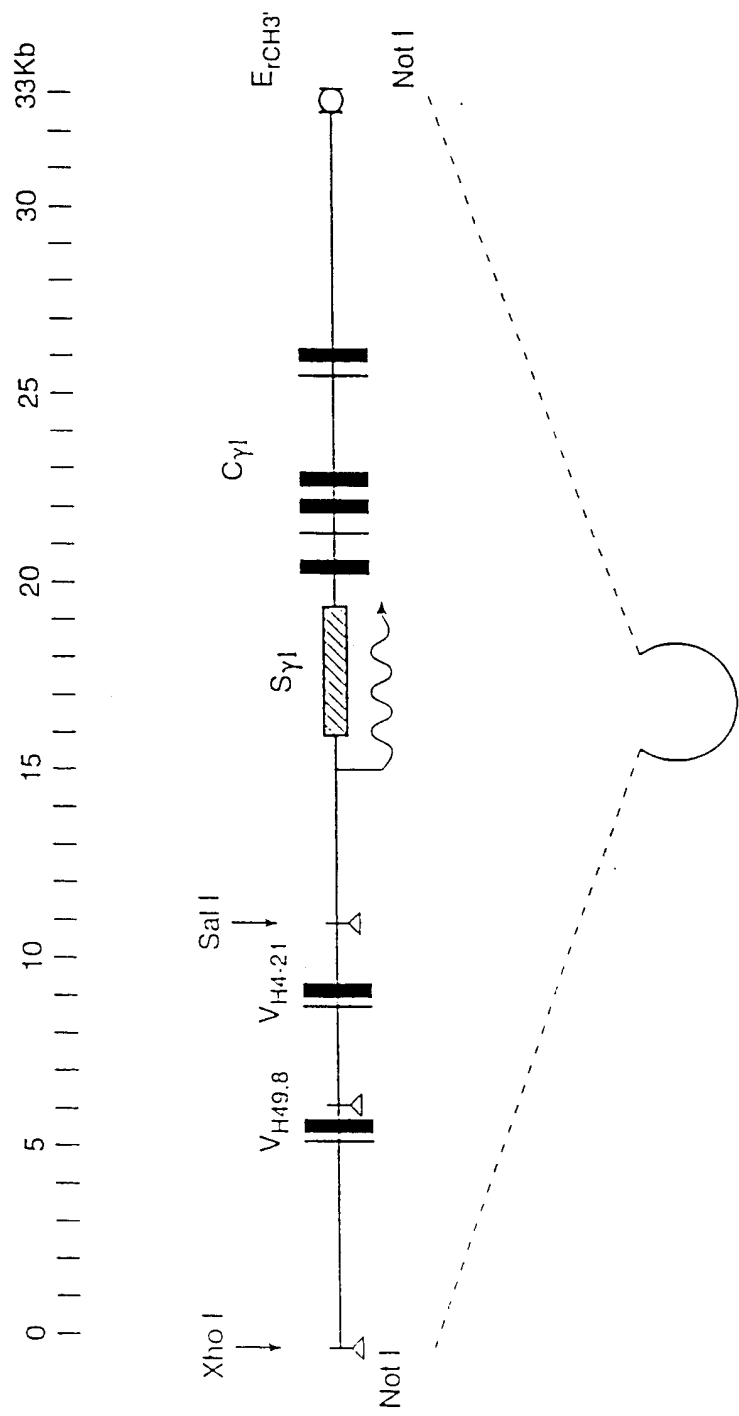


图 27

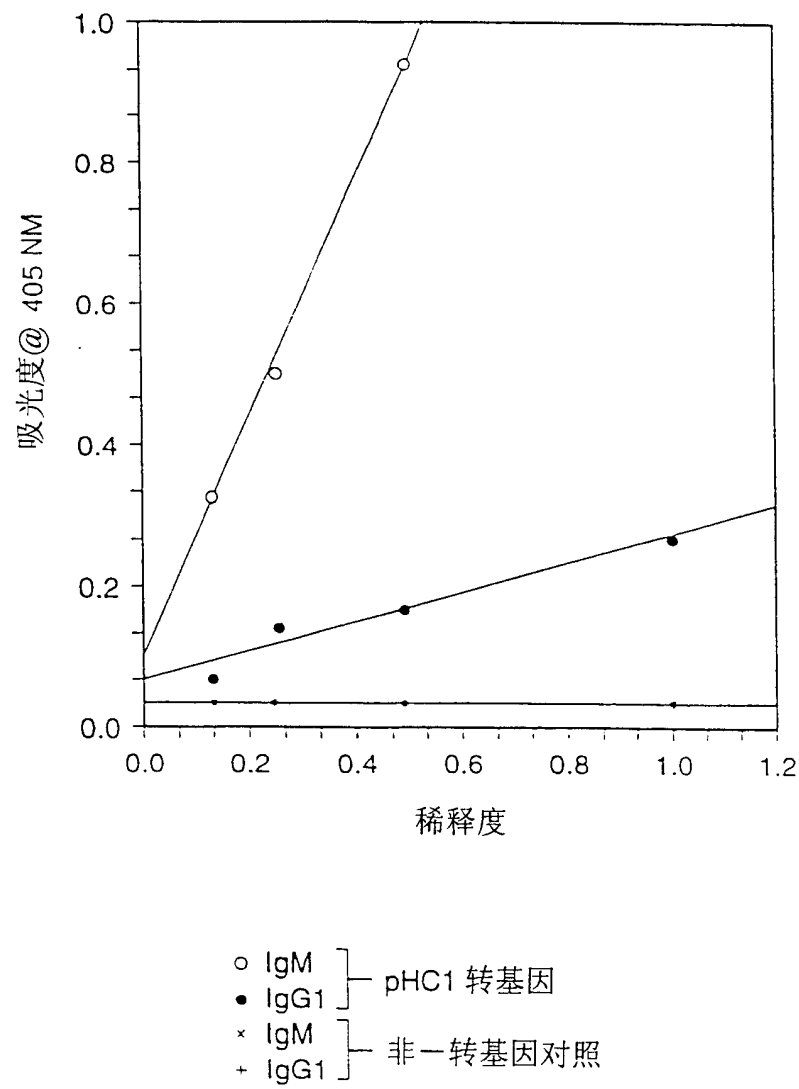


图 28

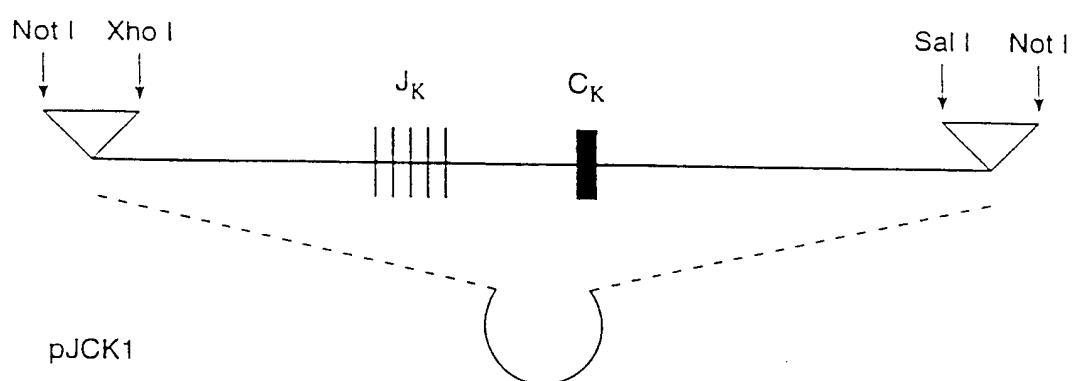


图 29

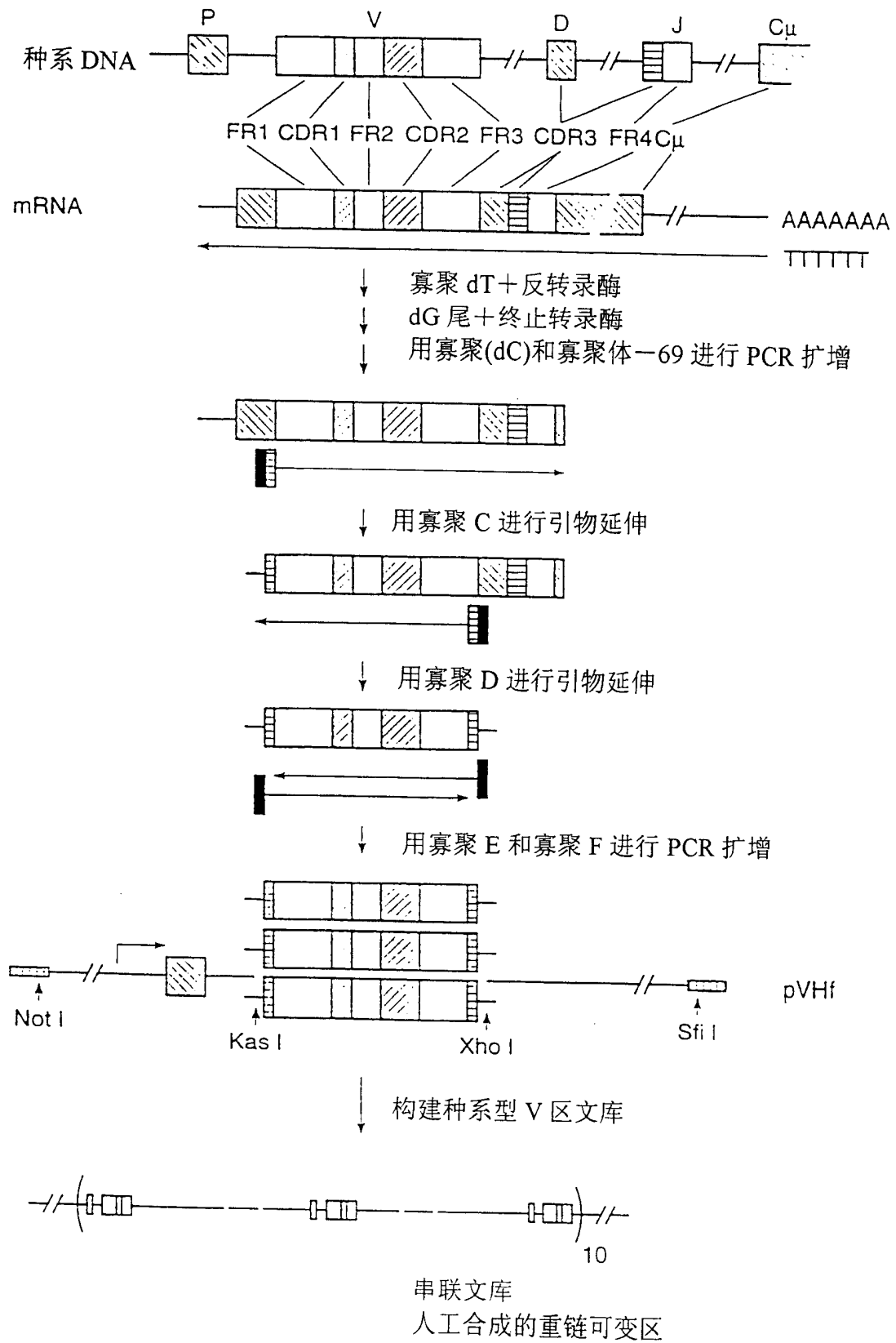


图 30

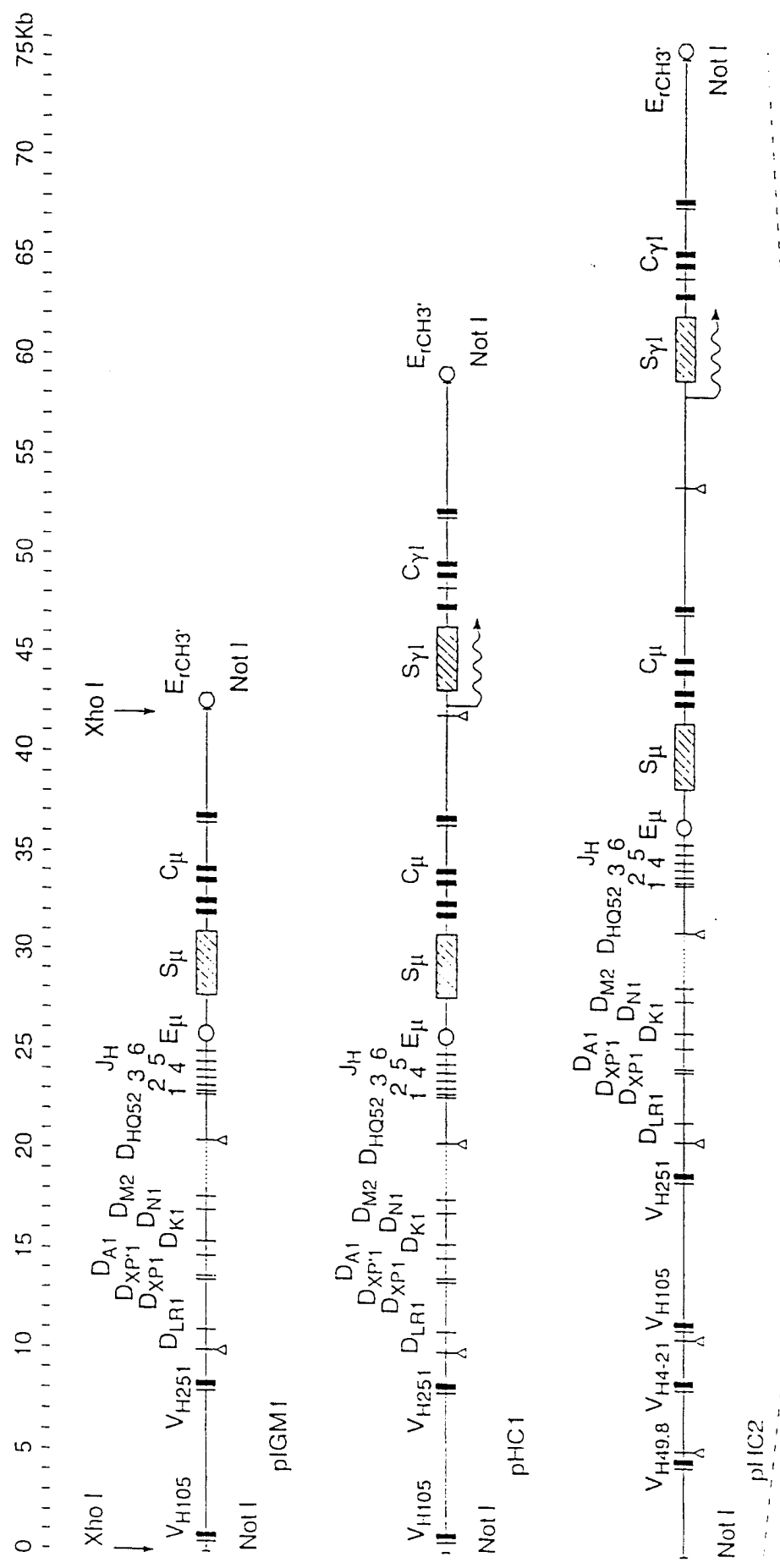


图 31

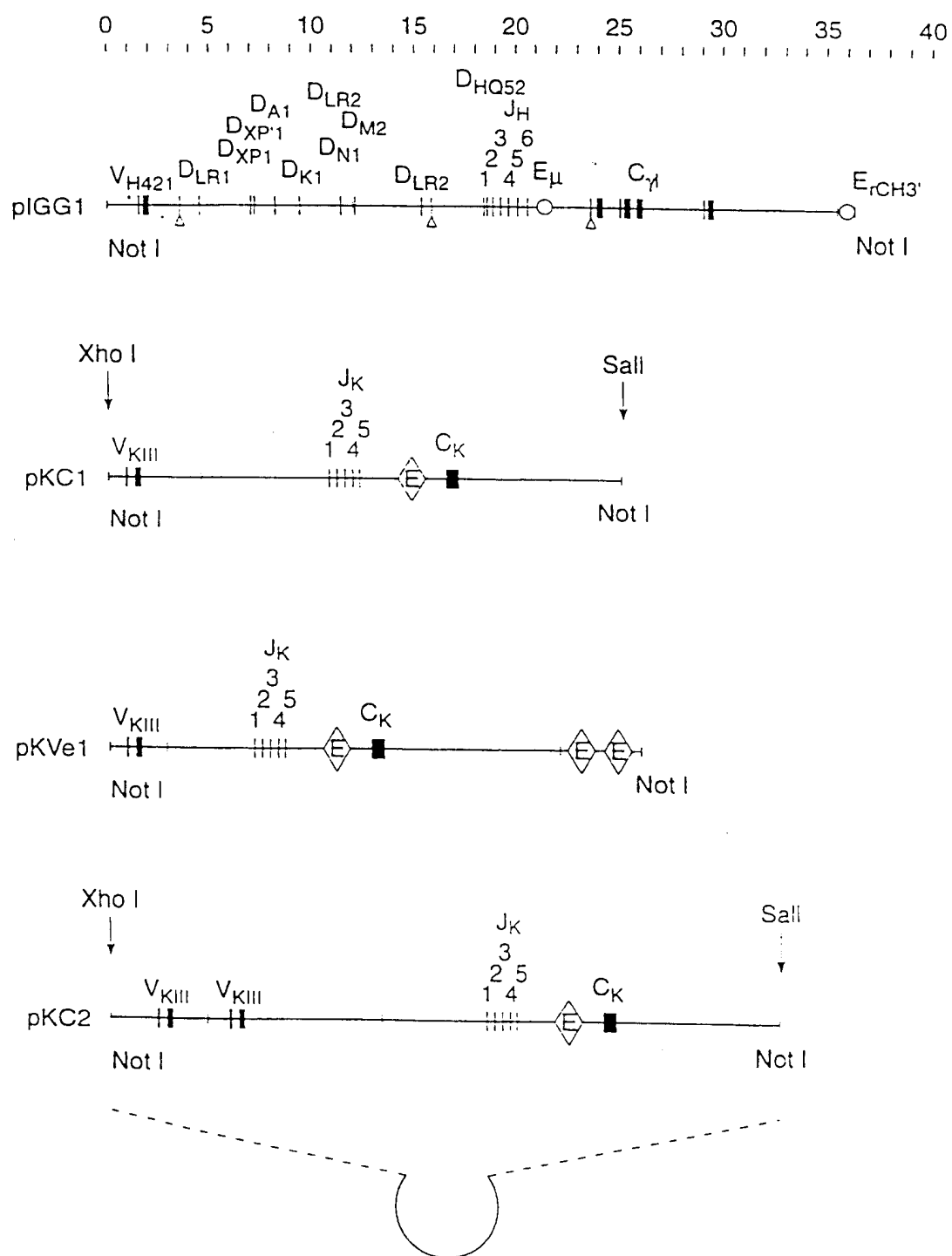


图 32

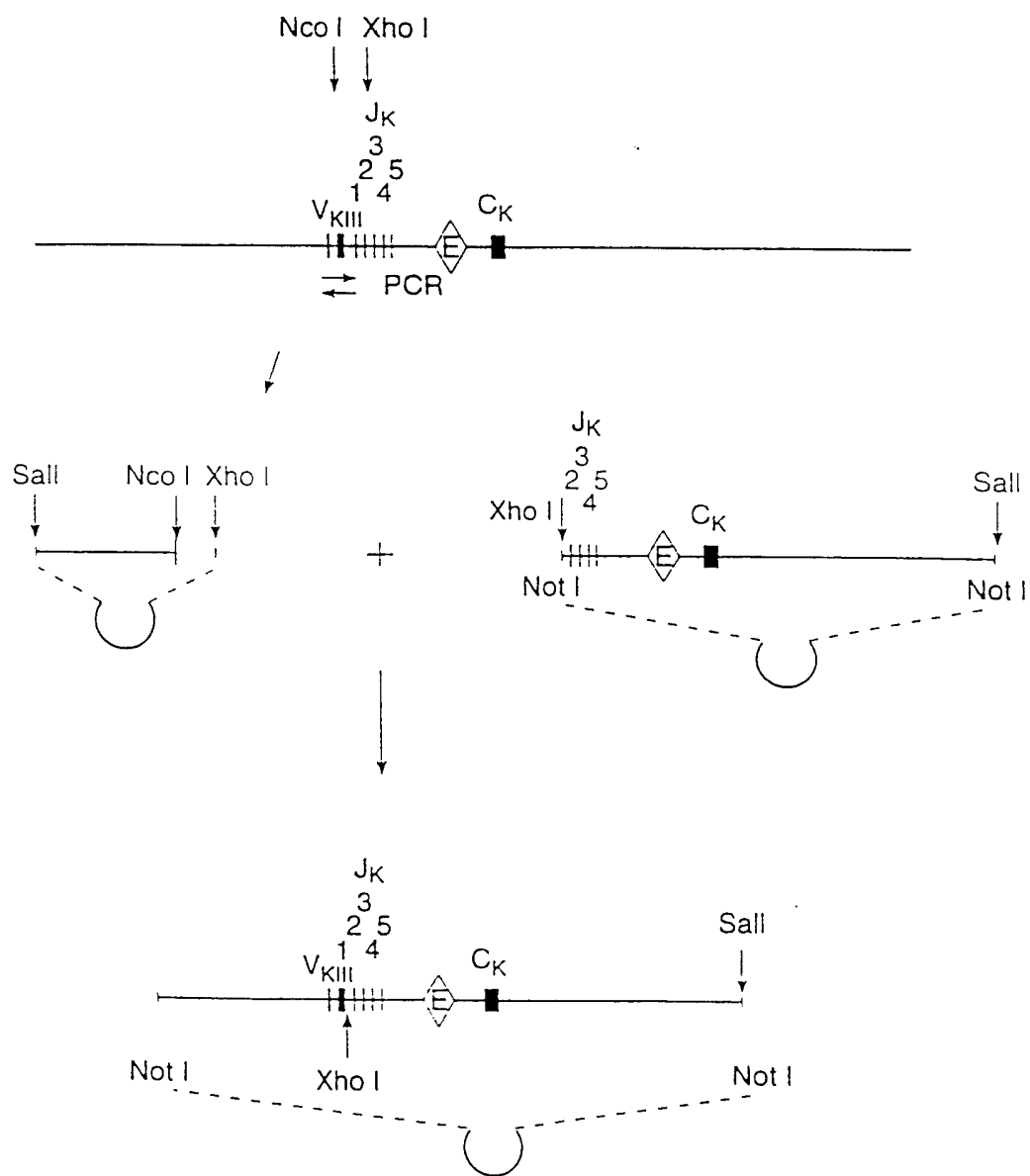


图 33

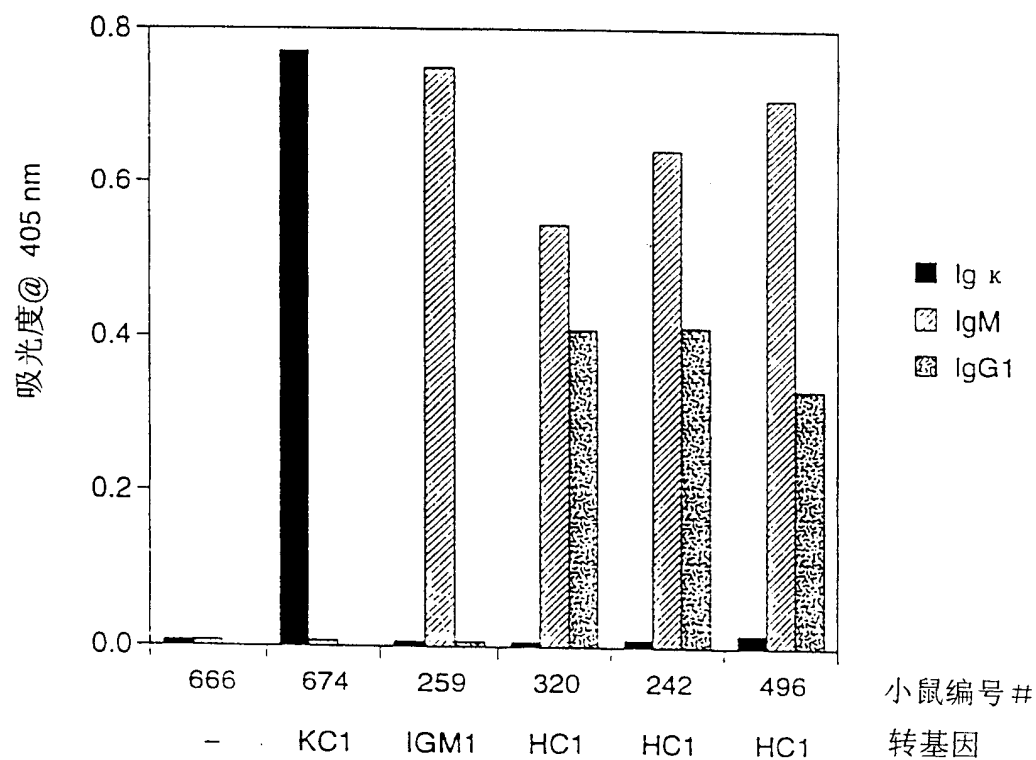


图 34

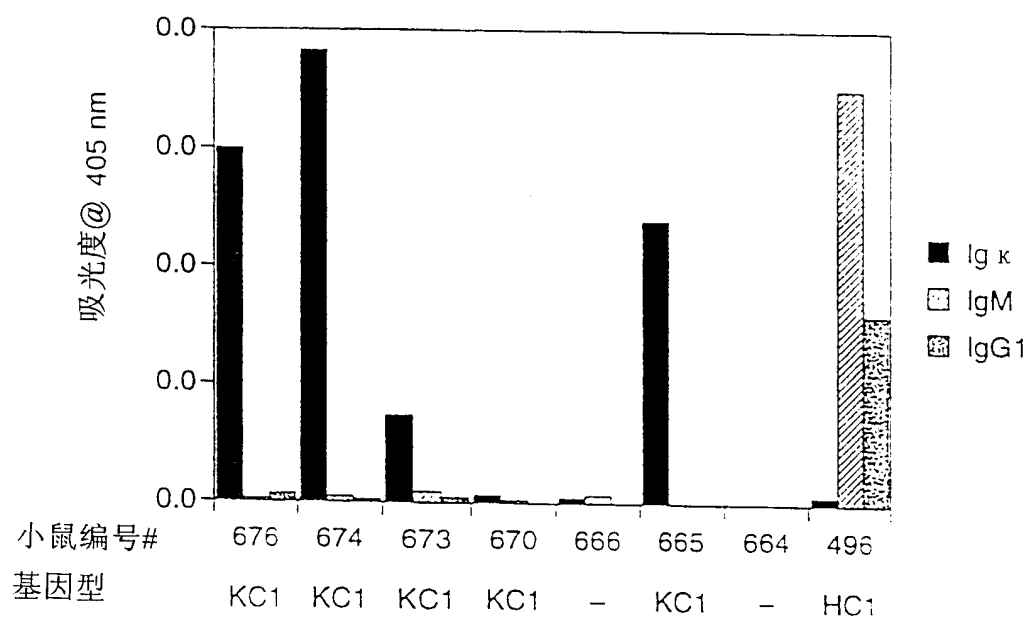


图 35

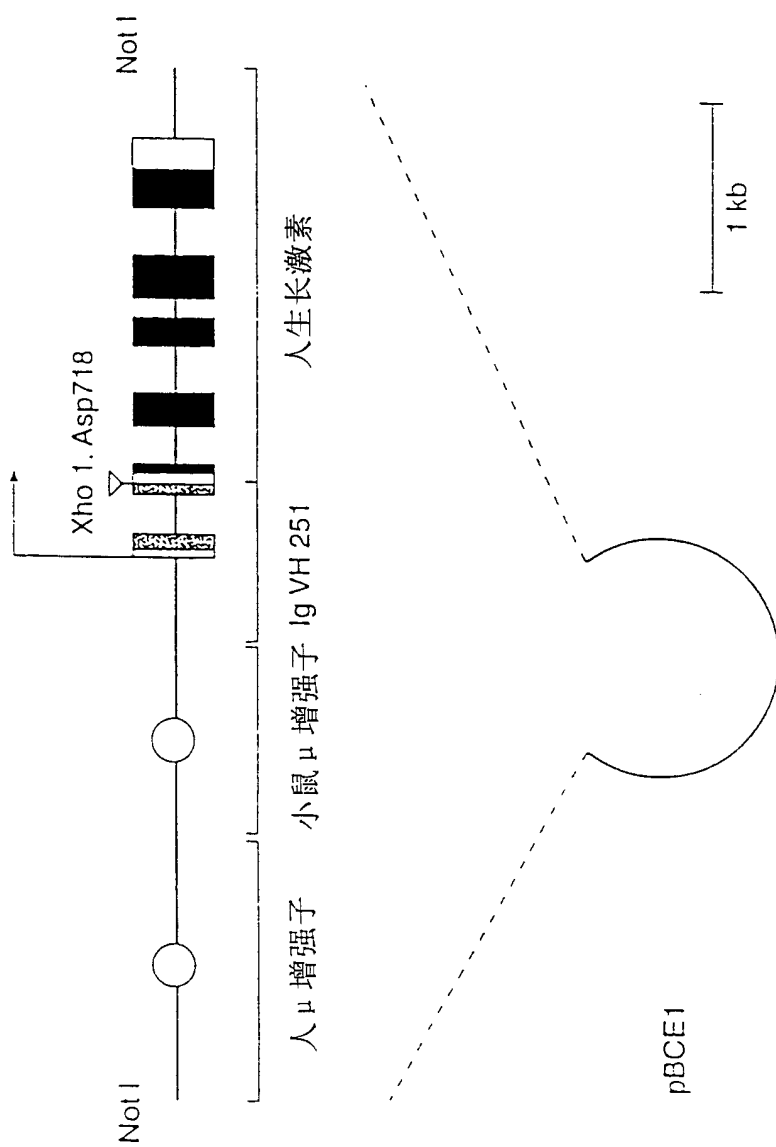
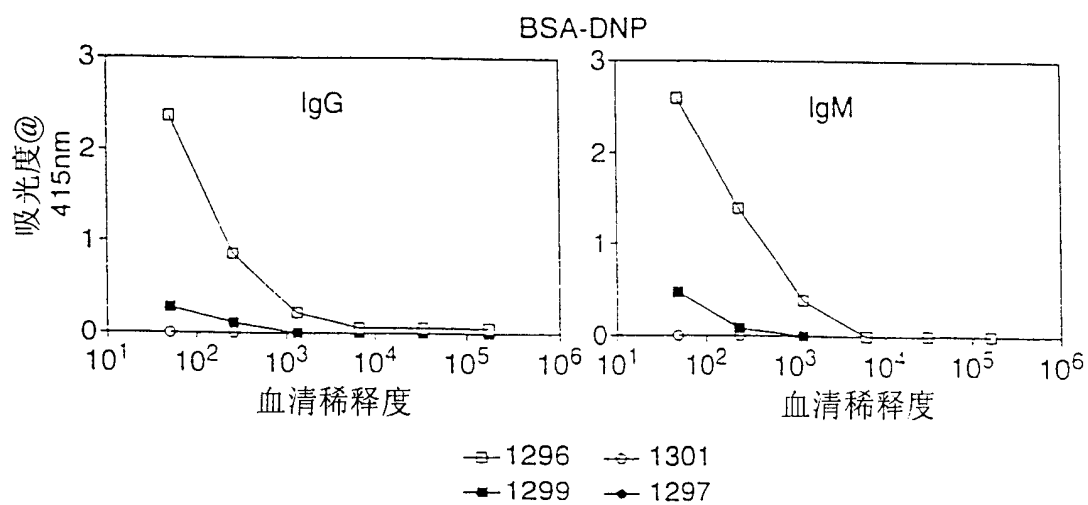
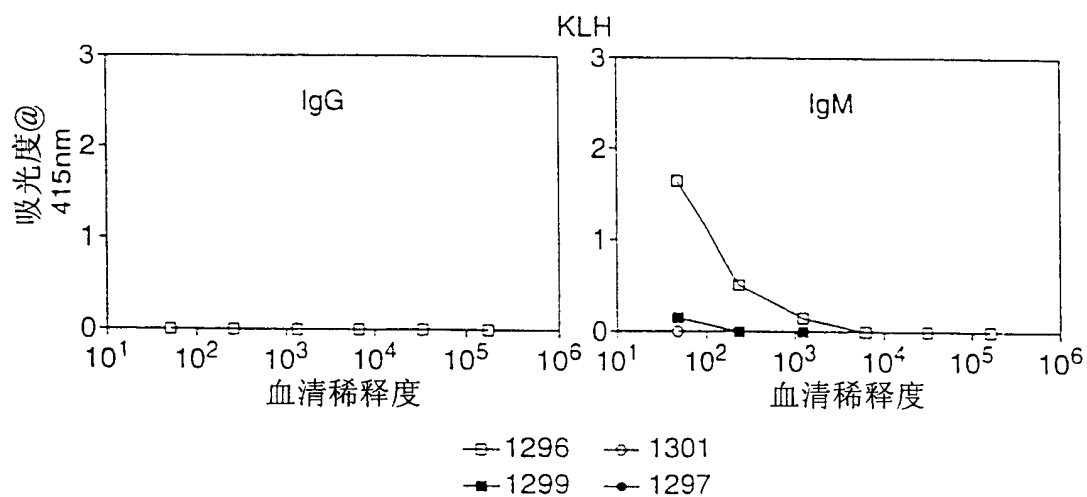
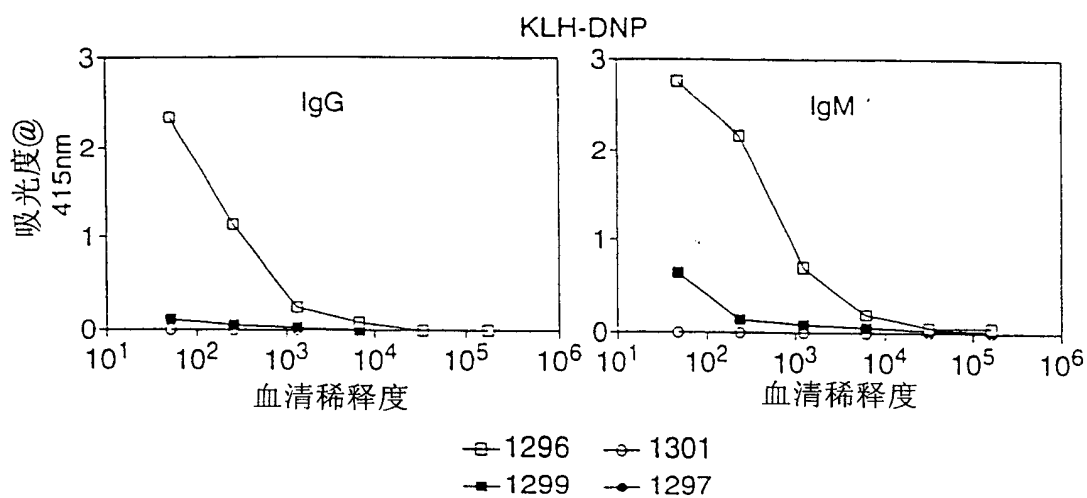


图 36



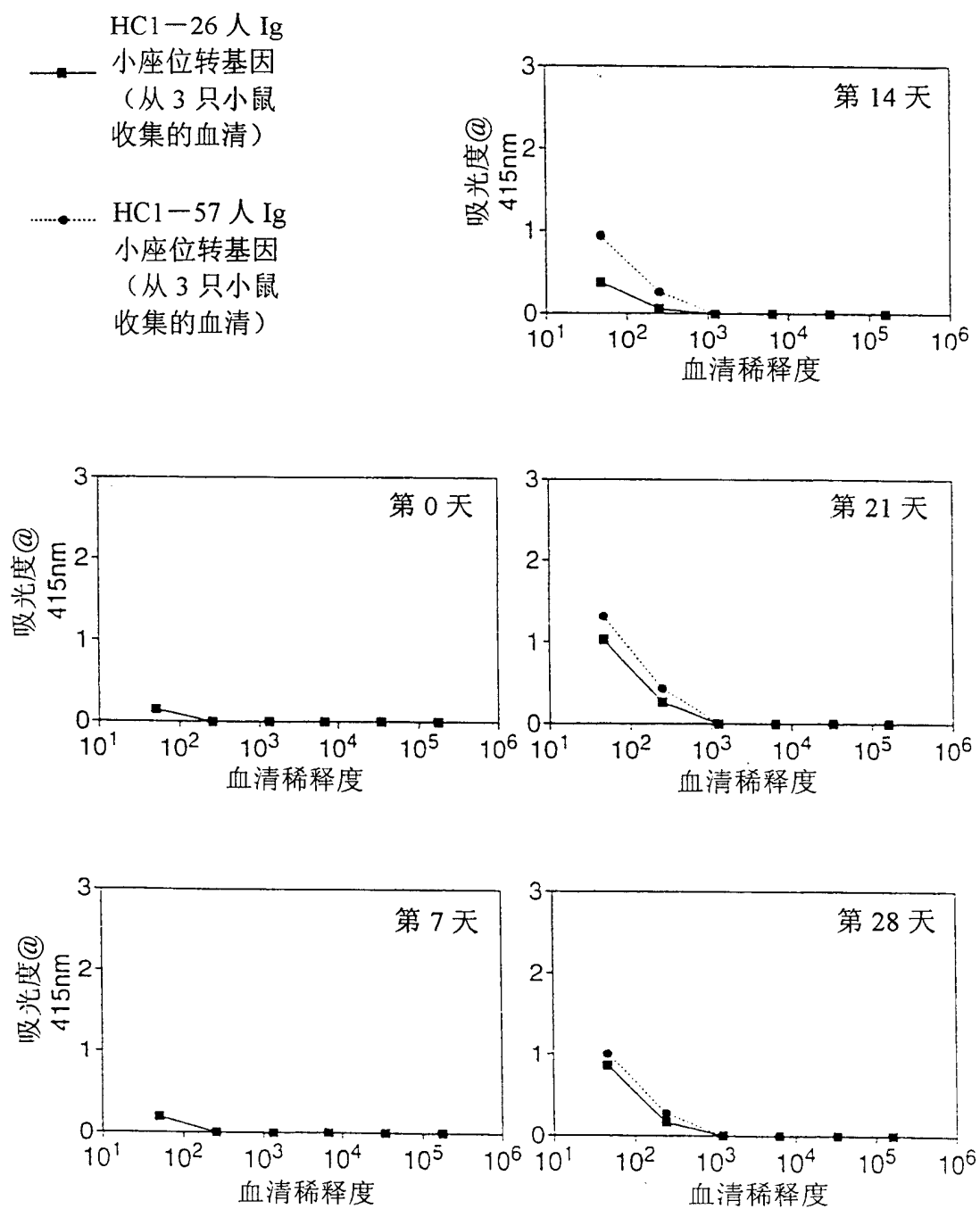


图 38

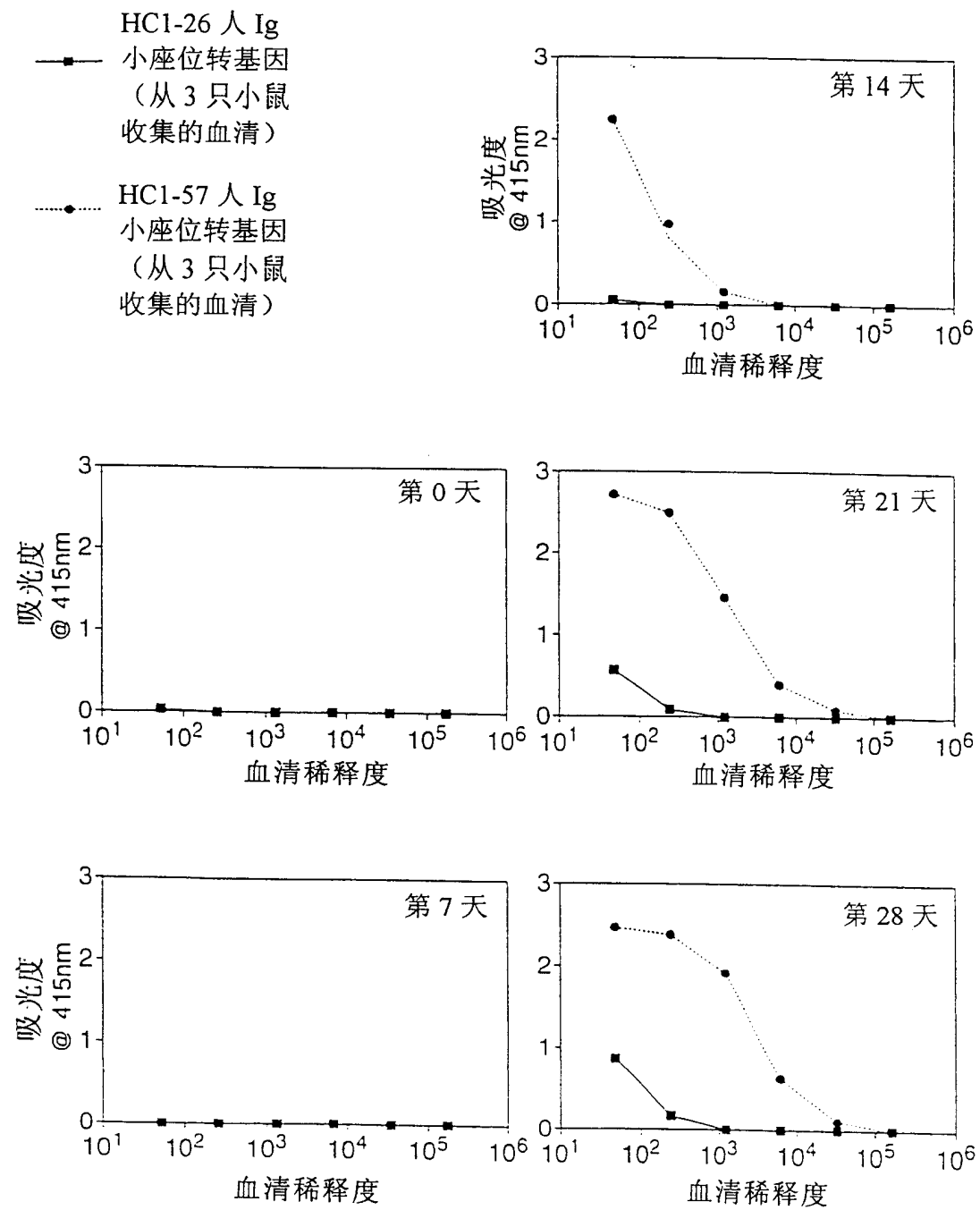


图 39

[illegible]

40

```

TTTTCTGGCC TGACAACCAG GGTGGCGCAG GATGCTCAGT GCAGAGAGGA 50
AGAAGCAGGT GGTCTCTGCA GCTGGAAGCT CAGCTCCCAC CCAGCTGCTT 100
TGCATGTCCC TCCCAGCTGC CCTACCTTCC AGAGCCATA TCAATGCCTG 150
TGTCAGAGCC CTGGGGAGGA ACTGCTCAGT TAGGACCCAG AGGGAACCAT 200
GGAAGCCCCA GCTCAGCTTC TCTTCCTCCT GCTACTCTGG CTCCCAGgtg 250
tGluAlaPro AlaGlnLeuL euPheLeuLe uLeuLeuTrp LeuPro
agggggaacc atgaggtggt tttgcacatt agtgaaaact cttgccacct 300
ctgctcagca agaaatataa ttaaaattca aagtatatca acaatttttg 350
ctctactcaa agacagttgg tttgatcttg attacatgag tgcatttctg 400
ttttattttcc aatttcagAT ACCACCGGAG AAATTGTGTT GACACAGTCT 450
Asp ThrThrGlyG luIleValLe uThrGlnSer
CCAGCCACCC TGTCTTTGTC TCCAGGGGAA AGAGCCACCC TCTCCTGCAG 500
ProAlaThrL euSerLeuSe rProGlyGlu ArgAlaThrL euSerCysAr
GGCCAGTCAG AGTGTTAGCA GCTACTTAGC CTGGTACCAA CAGAAACCTG 550
gAlaSerGln SerValSerS erTyrLeuAl aTrpTyrGln GlnLysProG
GCCAGGCTCC CAGGCTCCTC ATCTATGATG CATCCAACAG GGCCACTGGC 600
lyGlnAlaPr oArgLeuLeu IleTyrAspA laSerAsnAr gAlaThrGly
ATCCCAGCCA GGTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACAGACT TCACTCTCAC 650
IleProAlaA rgPheSerGl ySerGlySer GlyThrAspP heThrLeuTh
CATCAGCAGC CTAGAGCCTG AAGATTTTGC AGTTTATTAC TGTCAGCAGC 700
rIleSerSer LeuGluProG luAspPheAl aValTyrTyr CysGlnGlnA
GTAGCAACTG GCCTCCCACA GTGATTCCAC ATGAAACAAA AACCCCAACA 750
rgSerAsnTr pPro
AGACCATCAG TGTTTACTAG ATTATTATAC CAGCTGCTTC CTTTACAGAC 800
AGCTAGTGGG GT 812

```

图 41

AGGGCGGCGC AGATGCTCAG TGCAGAGAGA AGAAACAGGT GGTCTCTGCA 50
 GCTGGAAGCT CAGCTCCCAC CCCAGCTGCT TTGCATGTCC CTCCCAGCTG 100
 CCCTACCTTC CAGAGCCCAT ATCAATGCCT GGGTCAGAGC TCTGGGGAGG 150
 AACTGCTCAG TTAGGACCCA GACGGAACCA TGAAGCCCC AGCGCAGCTT 200
 M etGluAlaPr oAlaGlnLeu
 CTCTTCCTCC TGCTACTCTG GCTCACAGgt gaggggaata tgaggtgtct 250
 LeuPheLeuL euLeuLeuTr pLeuThr
 ttgcacatca gtgaaaactc ctgccacctc tgctcagcaa gaaatataat 300
 taaaattcaa aatagatcaa caattttggc tctactcaa gacagtgggt 350
 ttgattttga ttacatgagt gcattttctgt tttattttcca atttcagATA 400
 AspT
 CCACCGGAGA AATTGTGTTG ACACAGTCTC CAGCCACCCT GTCTTTGTCT 450
 hrThrGlyGl uIleValLeu ThrGlnSerP roAlaThrLe uSerLeuSer
 CCAGGGGAAA GAGCCACCCT CTCCTGCAGG GCCAGTCAGG GTGTTAGCAG 500
 ProGlyGluA rgAlaThrLe uSerCysArg AlaSerGlnG lyValSerSe
 CTACTTAGCC TGGTACCAGC AGAAACCTGG CCAGGCTCCC AGGCTCCTCA 550
 rTyrLeuAla TrpTyrGlnG lnLysProGl yGlnAlaPro ArgLeuLeuI
 TCTATGATGC ATCCAACAGG GCCACTGGCA TCCCAGCCAG GTTCAGTGGC 600
 leTyrAspAl aSerAsnArg AlaThrGlyI leProAlaAr gPheSerGly
 AGTGGGCCTG GGACAGACTT CACTCTCACC ATCAGCAGCC TAGAGCCTGA 650
 SerGlyProG lyThrAspPh eThrLeuThr IleSerSerL euGluProGl
 AGATTTTGCA GTTTATTACT GTCAGCAGCG TAGCAACTGG CATCCCACAG 700
 uAspPheAla ValTyrTyrC ysGlnGlnAr gSerAsnTrp His
TGATTCCACA TGAAACAAAA ACCCCAACAA GACCATCAGT GTTTACTAGA 750
 TTATTATACC AGCTGCTTCC TTTACAGACA GCTAGTGGGG TGGCCACTCA 800
 GTGTTAGCAT CTCAGCTCTA TTTGGCCATT TTGGAGTTCA AGTTGTCAAG 850
 TCCAAAATTA CTTATGTTAG TCCATTGCAT CATACCATTT CAGTGTGGCT 900

图 42

CCGCCCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCCGCCCTGC AGTCCAGAGC 50
 CCATATCAAT GCCTGGGTCA GAGCTCTGGA GAAGAGCTGC TCAGTTAGGA 100
 ACCCCAGAGG GAACCATGGA AACCCAGCG CAGCTTCTCT TCCTCCTGCT 150
 MetGl uThrProAla GlnLeuLeuP heLeuLeuLe
 ACTCTGGCTC CCAGgtgagg ggaacatggg atggttttgc atgtcagtga 200
 uLeuTrpLeu Pro
 aaaccctctc aagtcctgtt acctggcaac tctgctcagt caatacaata 250
 attaaagctc aatataaagc aataattctg gctcttctgg gaagacaatg 300
 ggtttgattht agattacatg ggtgacttht ctgtthttatt tccaatctca 350
 gATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACGCAG TCTCCAGGCA CCCTGTCTTT 400
 AspThrThrG lyGluIleVa lLeuThrGln SerProGlyT hrLeuSerLe
 GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA 450
 uSerProGly GluArgAlaT hrLeuSerCy sArgAlaSer GlnSerValS
 GCAGCAGCTA CTTAGCCTGG TACCAGCAGA AACCTGGCCA GGCTCCCAGG 500
 erSerSerTy rLeuAlaTrp TyrGlnGlnL ysProGlyGl nAlaProArg
 CTCCTCATCT ATGGTGCATC CAGCAGGGCC ACTGGCATCC CAGACAGGTT 550
 LeuLeuIleT yrGlyAlaSe rSerArgAla ThrGlyIleP roAspArgPh
 CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC TCTCACCATC AGCAGACTGG 600
 eSerGlySer GlySerGlyT hrAspPheTh rLeuThrIle SerArgLeuG
 AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AGCAGTATGG TAGCTCACCT 650
 luProGluAs pPheAlaVal TyrTyrCysG lnGlnTyrGl ySerSerPro
 CQCACAGTGA TTCAGCTTGA AACAAAAACC TCTGCAAGAC CTTCAATTGTT 700
 TACTAGATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GATAGCTGCT GCAATGACAA 750
 CTCAATTTAG CATCTCTCTC TGCTTGGGCA TTTTGGGGAT CTAAAAAAG 800
 TAATCCCTTG ATATATTTTT GACTCTGATT CCTGCATTTT TCCTCAGACC 850
 AAGATGGACA GCCAGGTTTA AGCACAGTTT CACAGTAATG GCCACTGGAT 900

图 43

```

AAACACATTC TCTGCAGACA AATTTGAGCT ACCTTGATCT TACCTGGACA    50
GGTGGGGACA CTGAGCTGGT GCTGAGTTAC TCAGATGCGC CAGCTCTGCA    100
GCTGTGCCCCA GCCTGCCCCA TCCCCTGCTC ATTTGCATGT TCCCAGAGCA    150
CAACCTCCTG CCCTGAAGCC TTATTAATAG GCTGGTCAGA CTTTGTGCAG    200
GAATCAGACC CAGTCAGGAC ACAGCATGGA CATGAGGGTC CTCGCTCAGC    250
                                MetAs pMetArgVal LeuAlaGlnL
TCCTGGGGCT CCTGCTGCTC TGTTTCCCAG gtaaggatgg agaacactag    300
euLeuGlyLe uLeuLeuLeu CysPhePro
cagtttactc agcccagggt gctcagtact gctttactat tcagggaaat    350
tctcttaciaa catgattaat tgtgtggaca tttgttttta tgtttccaat    400

ctcagGTGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT    450
    GlyAla ArgCysAspI leGlnMetTh rGlnSerPro SerSerLeuS
CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGTCGGGC GAGTCAGGGT    500
erAlaSerVa lGlyAspArg ValThrIleT hrCysArgAl aSerGlnGly
ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG AAACCAGAGA AAGCCCCTAA    550
IleSerSerT rpLeuAlaTr pTyrGlnGln LysProGluL ysAlaProLy
GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT    600
sSerLeuIle TyrAlaAlaS erSerLeuGl nSerGlyVal ProSerArgP
TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGCAGCCTG    650
heSerGlySe rGlySerGly ThrAspPheT hrLeuThrIl eSerSerLeu
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC    700
GlnProGluA spPheAlaTh rTyrTyrCys GlnGlnTyrA snSerTyrPr
ACCCACAGTG TTACACACCC AAACATAAAC CCCCAGGGAA GCAGATGTGT    750
o
GAGGCTGGGC TGCCCCAGCT GCTTCTCCTG ATGCCTCCAT CAGCTGAGAG    800
TGTTCTCAG ATGCAGCCAC ACTCTGATGG TGTTGGTAGA TGGGGAC    847

```

图 44

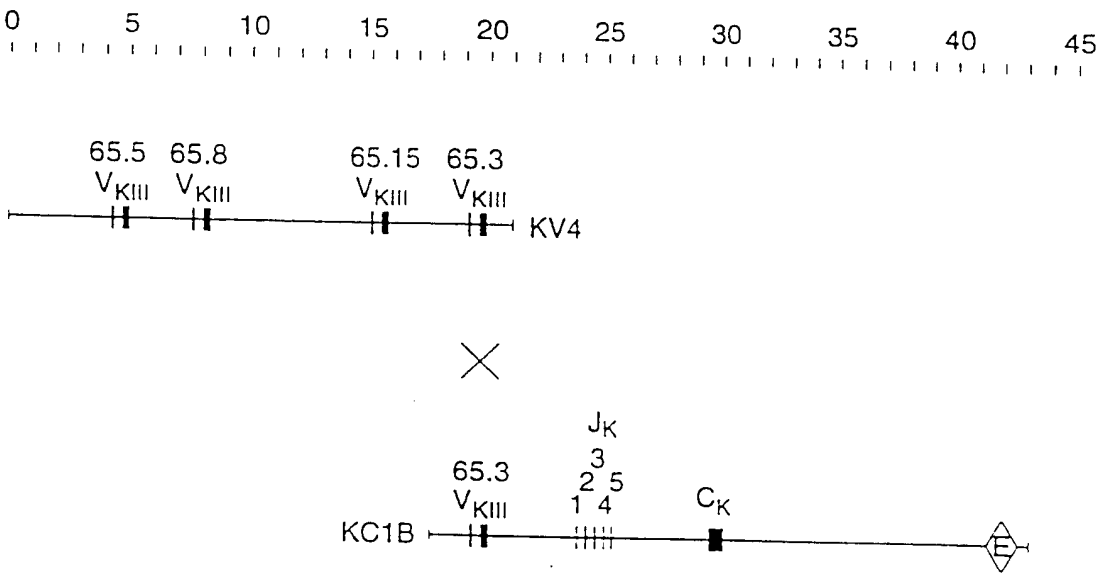


图 45

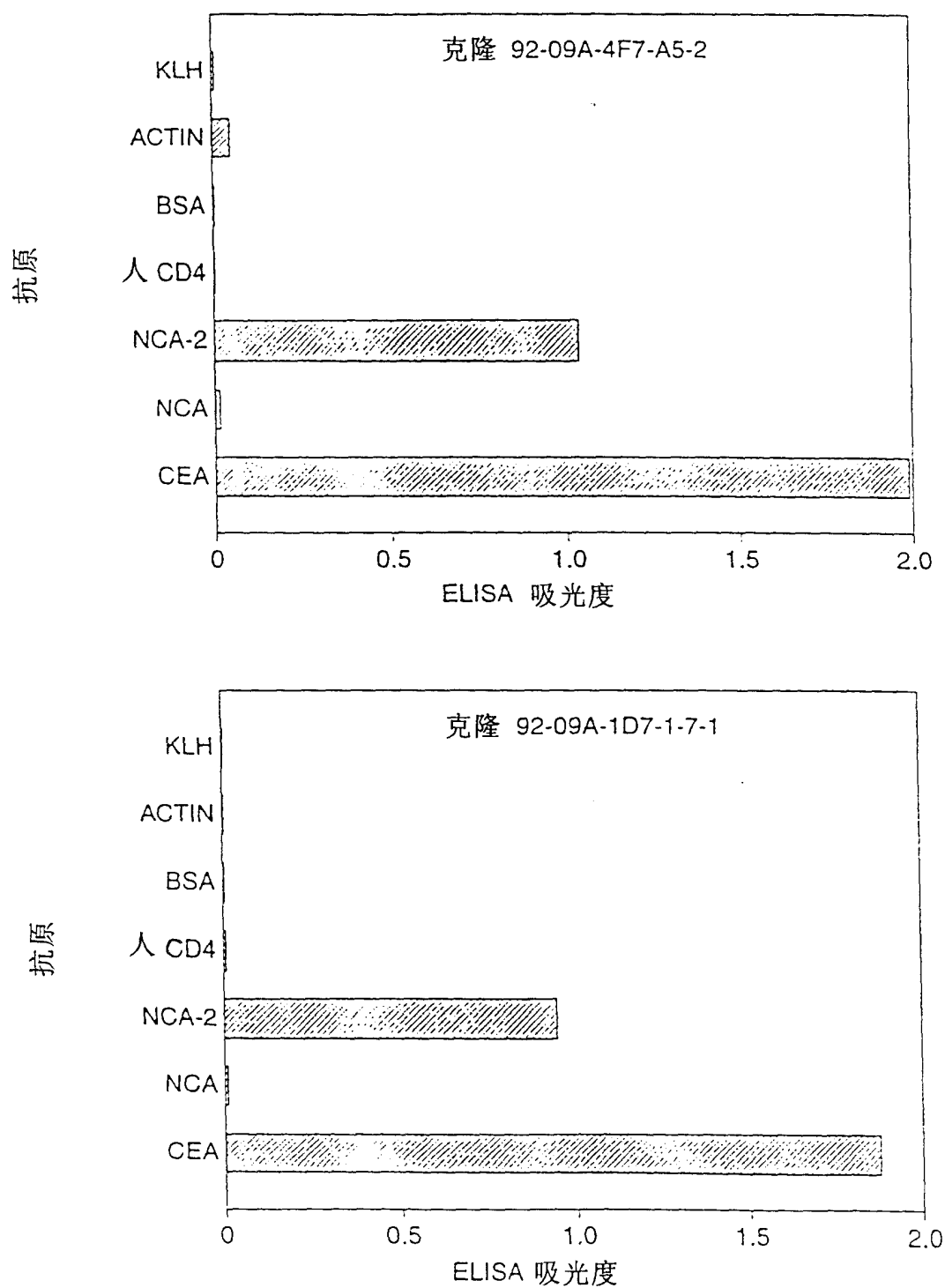


图 46

	人	小鼠
	n D n	Cy
5 DXP'1 J6 G1	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
7 DHQ52 J3 G1	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
2 DHQ52 J3 G2b	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
3 D? J3 G2b	GaCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
4 DXP'1 J4 G2b	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
10 DHQ52 J3 G2b	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CCAAAACGACACCCCCCATCTGTCTATCCACT
1 D? J3 G3	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CTACAACACAGCCCCCATCTGTCTATCCCTT
6 DHQ52 J4 G3	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CTACAACACAGCCCCCATCTGTCTATCCCTT
8 DIR2 J3 G3	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CTACAACACAGCCCCCATCTGTCTATCCCTT
9 DIR2r J6 G3	GGCTGGGACACCGCCATGTATTACTGTGTGAGA	CTACAACACAGCCCCCATCTGTCTATCCCTT

图 47

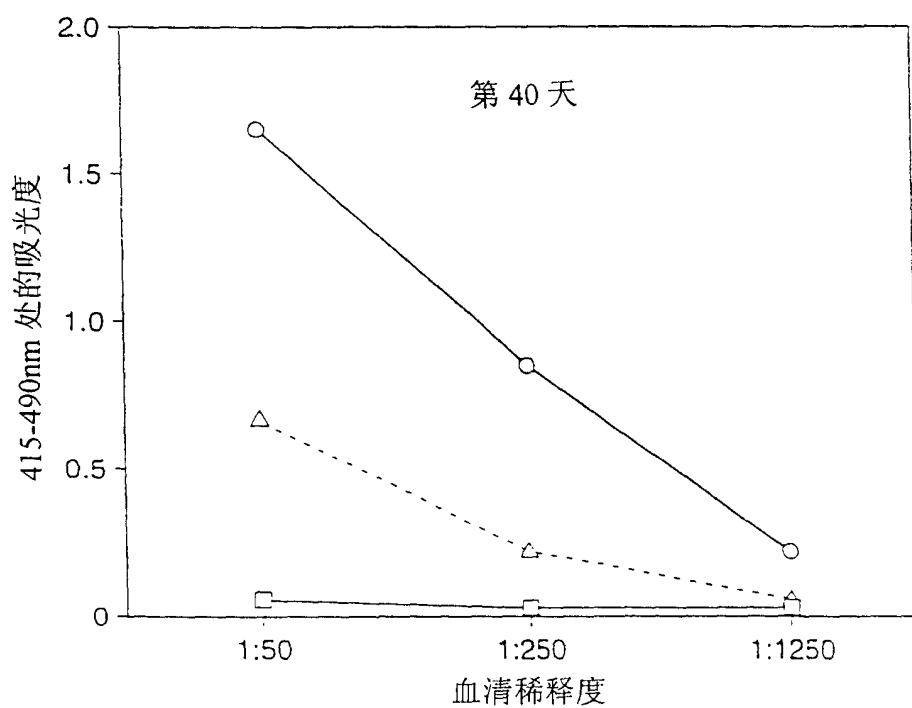
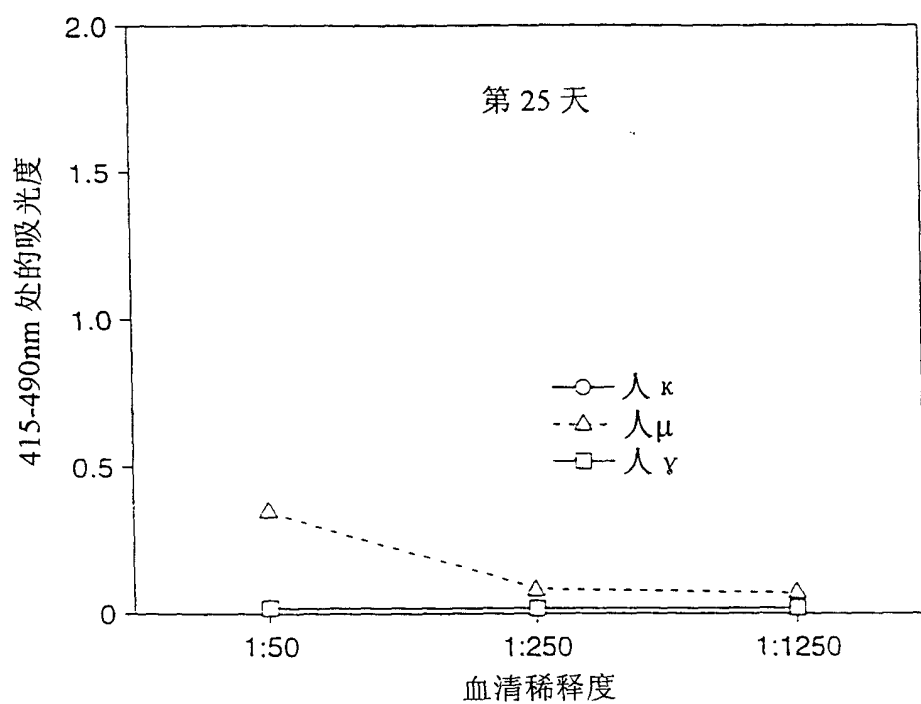


图 48

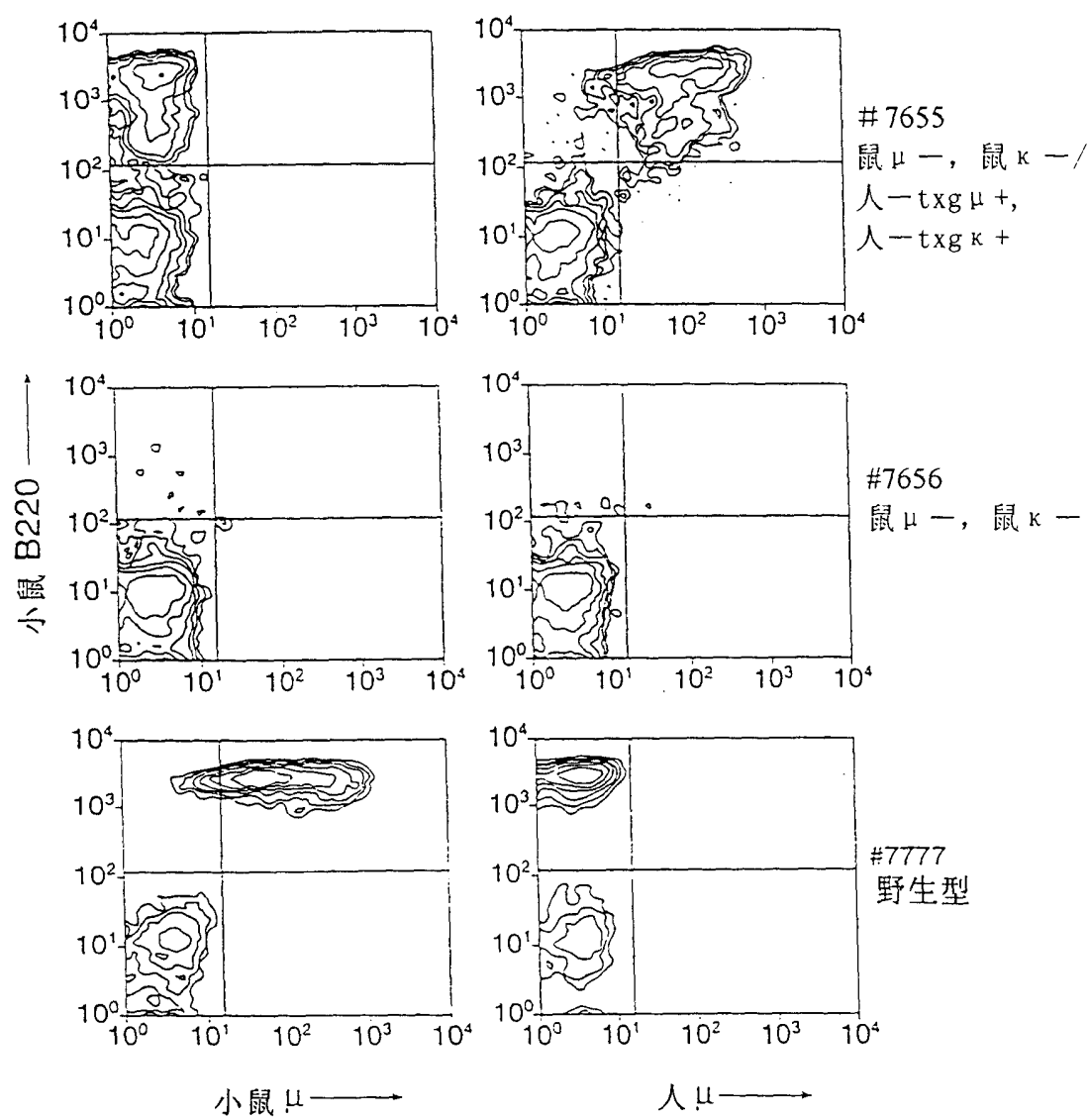


图 49

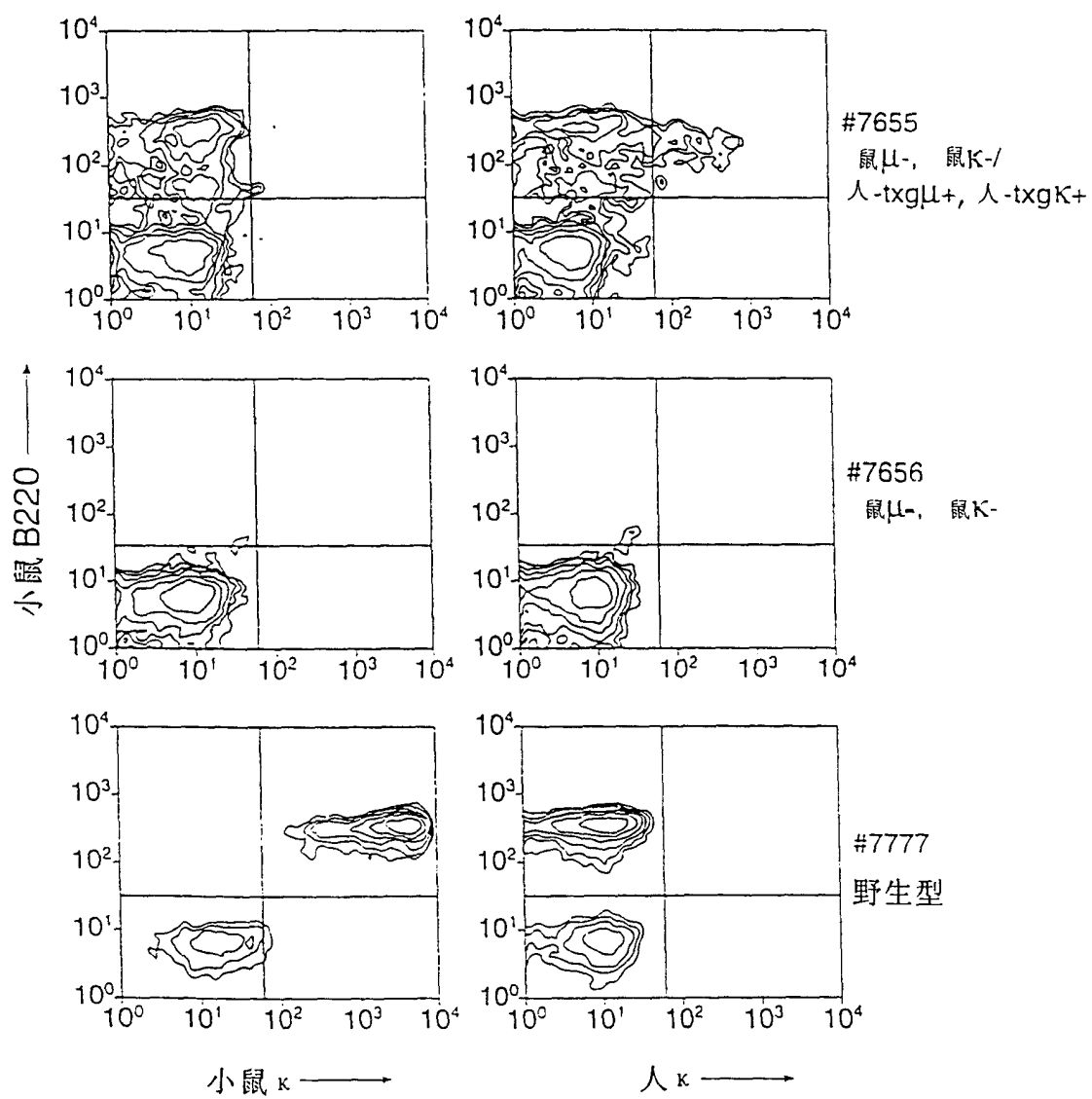


图 50

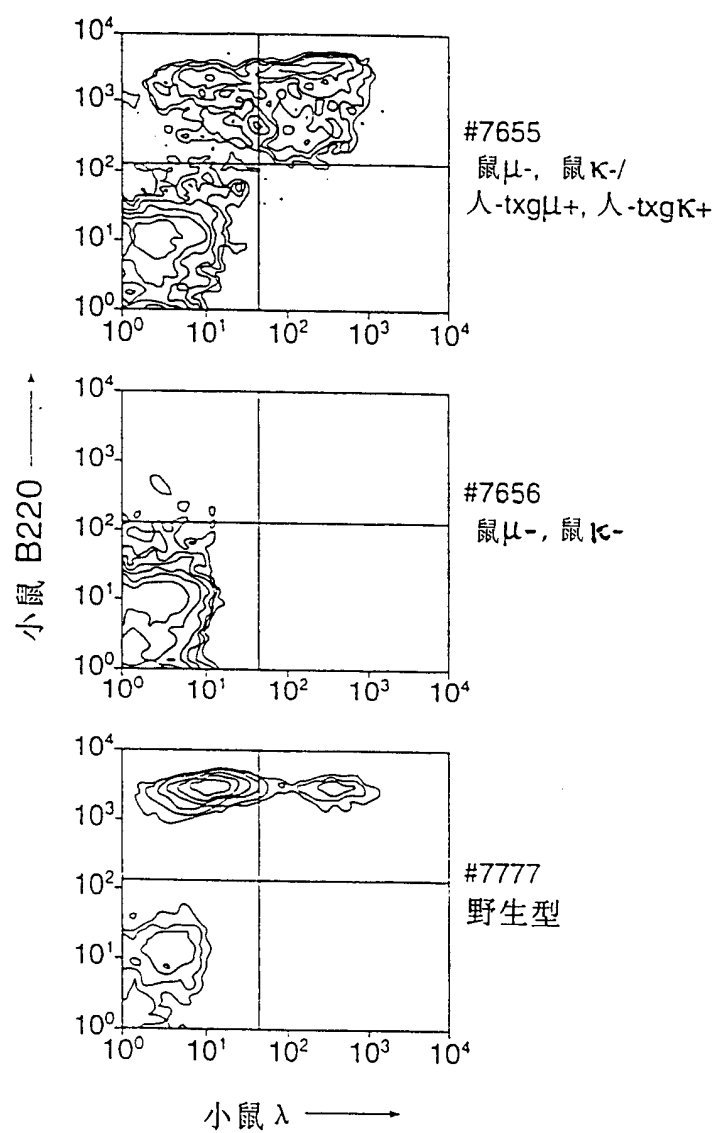


图 51

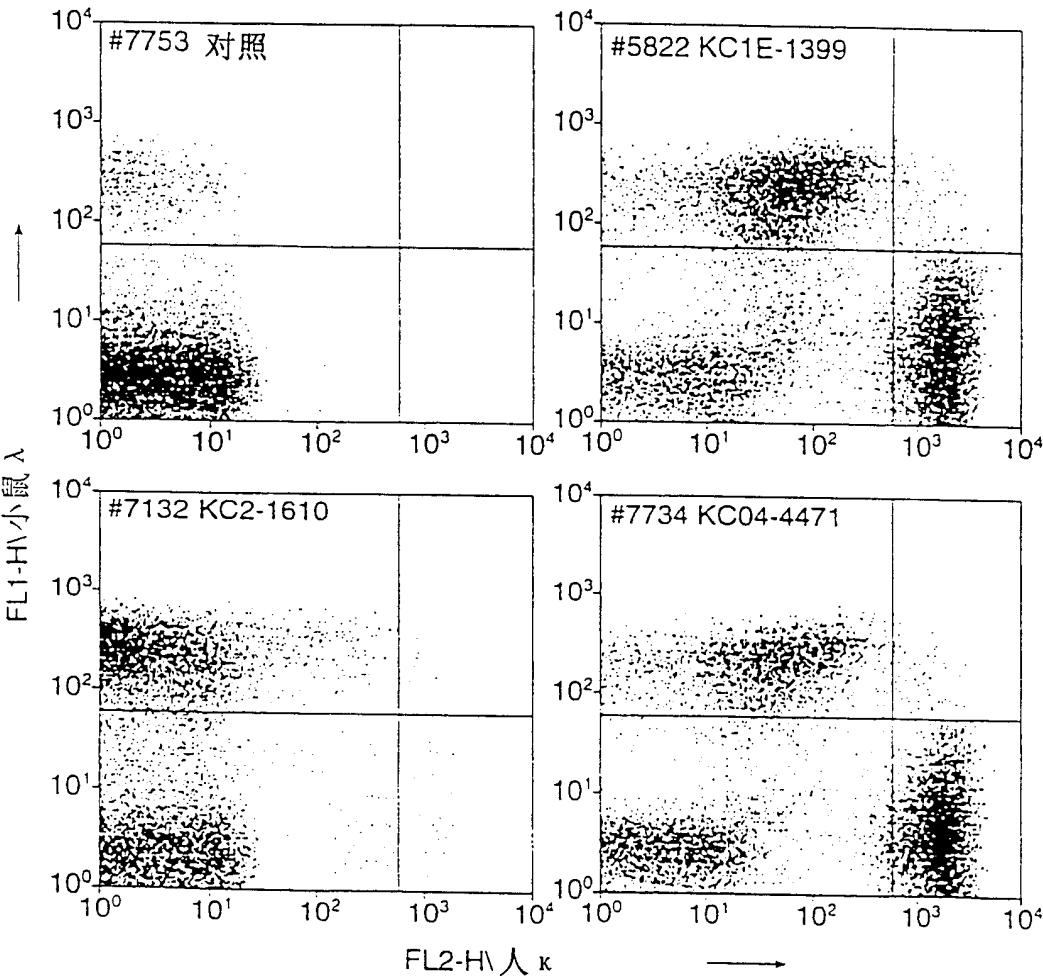


图 52

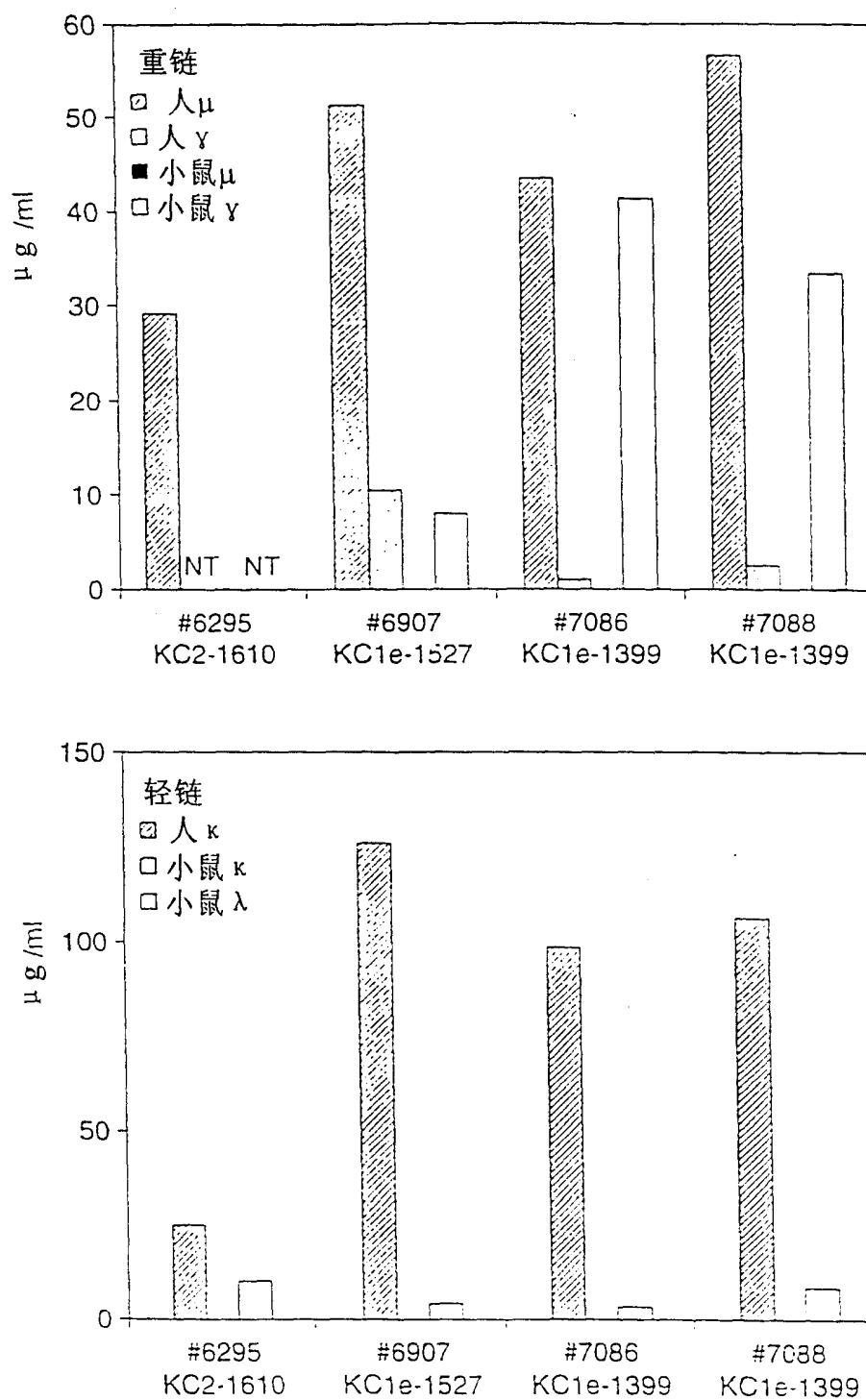


图 53

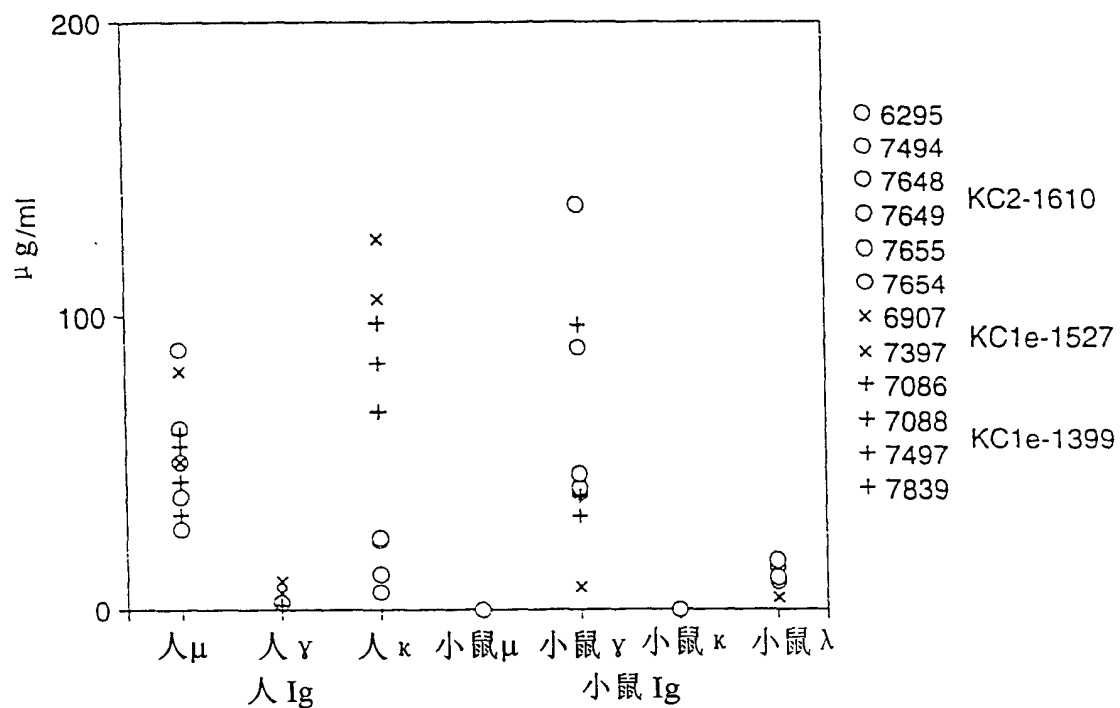


图 54

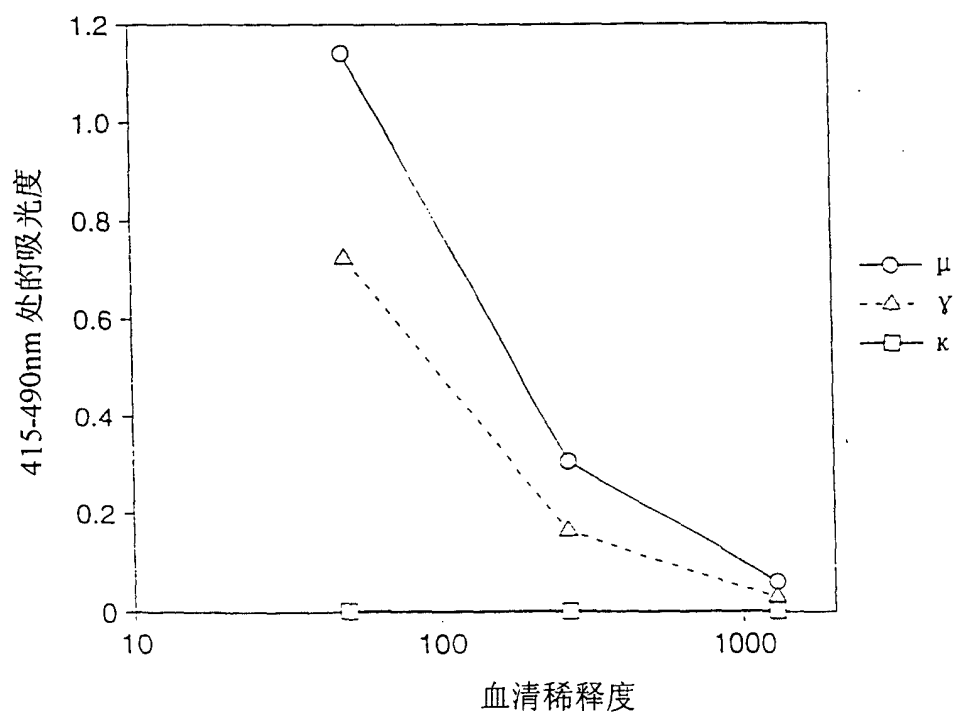


图 55

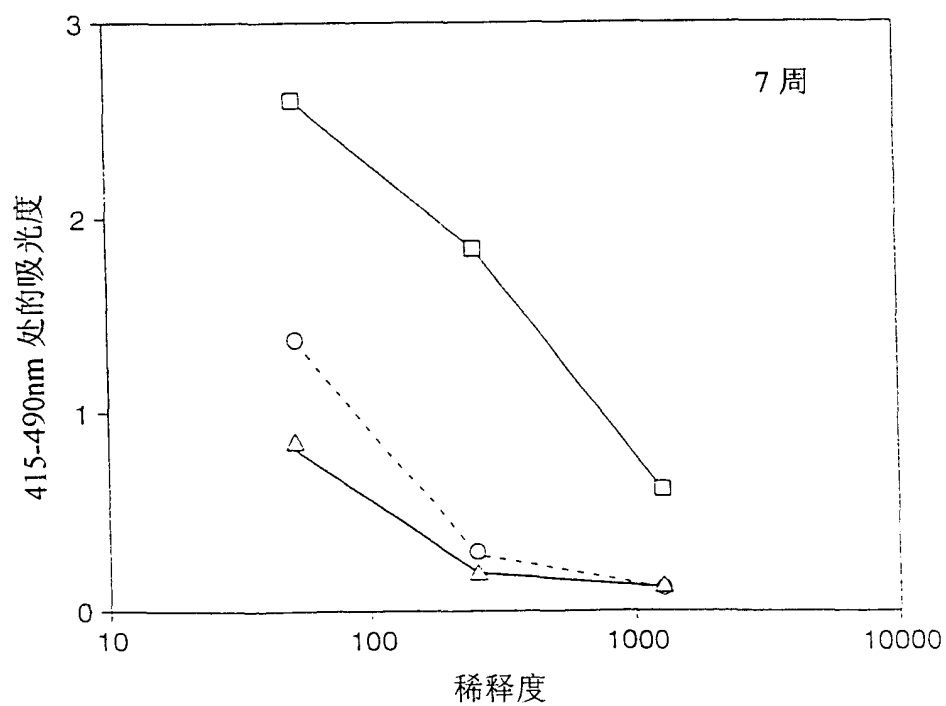
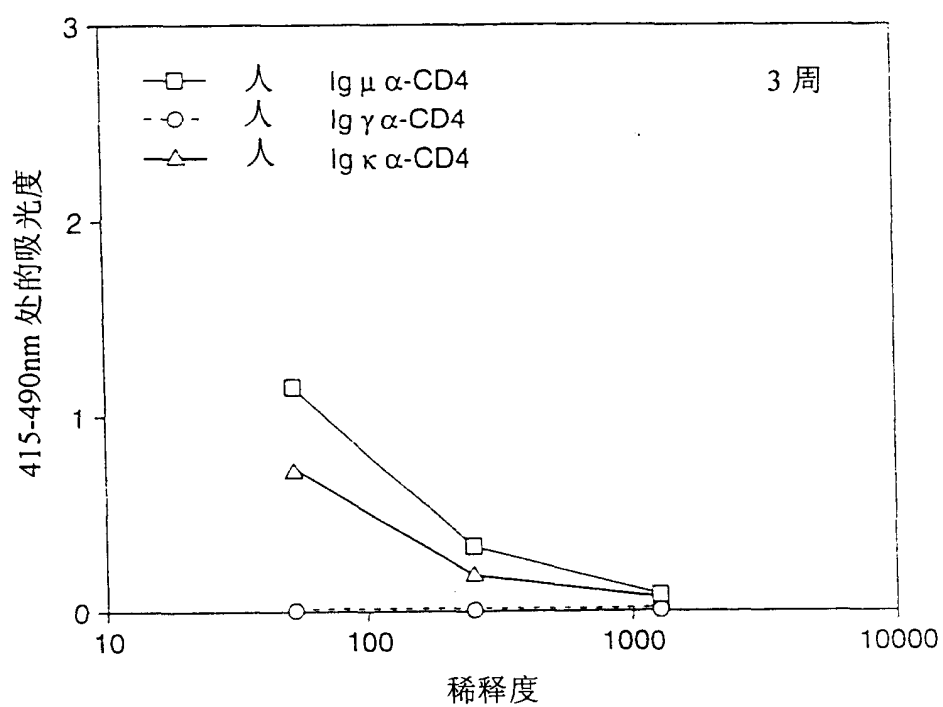


图 56

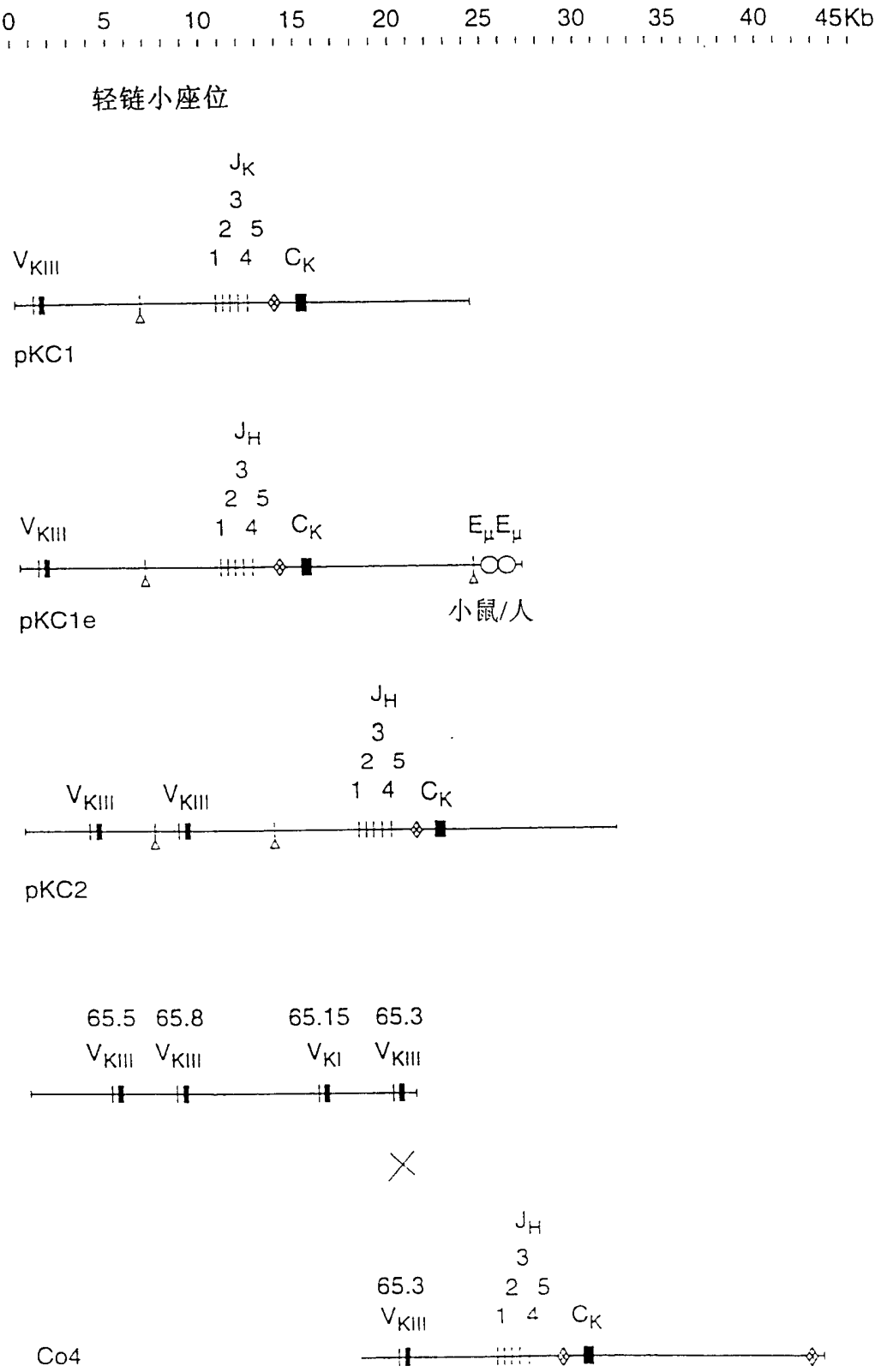


图 57A

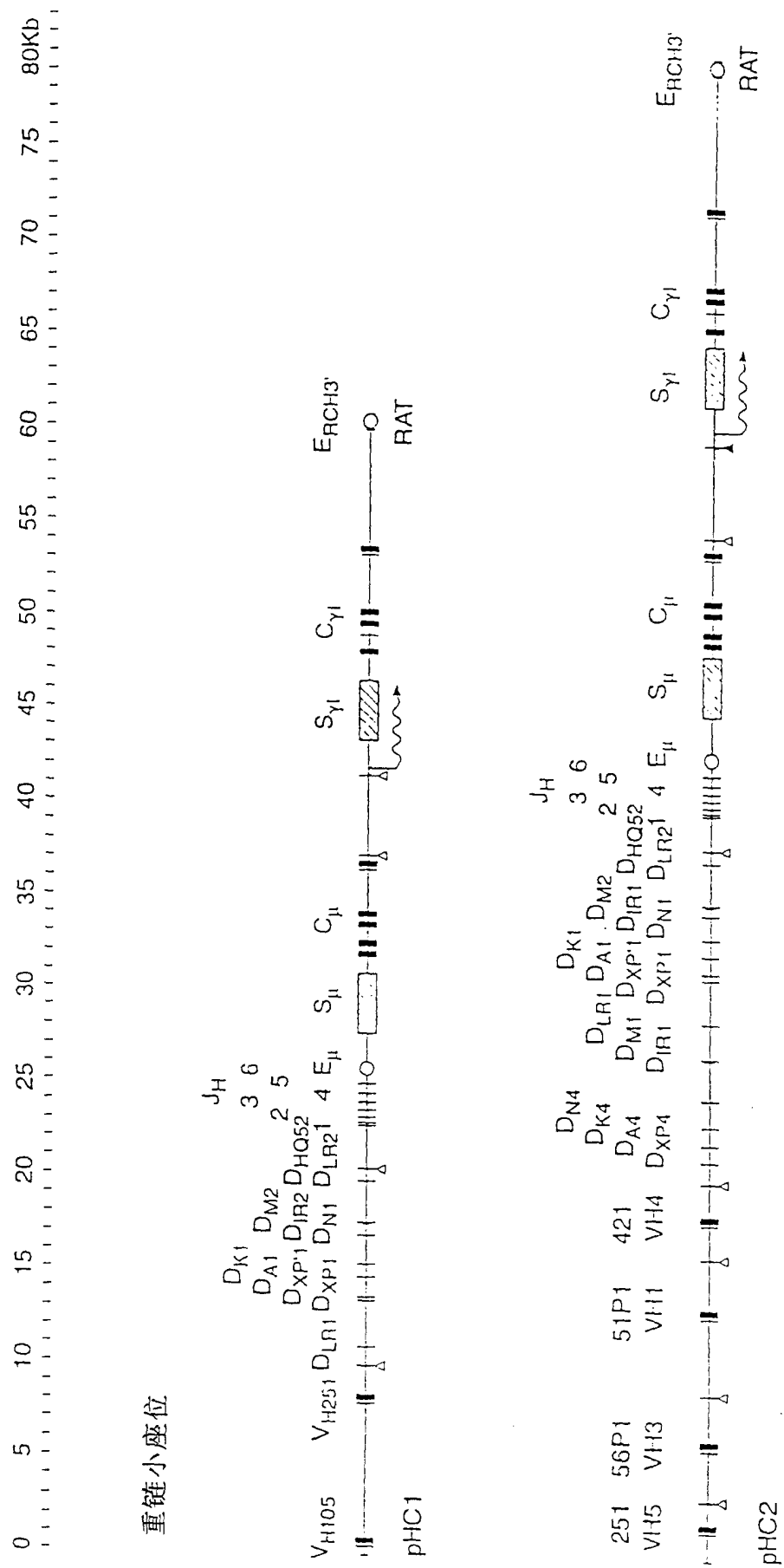


图 57B

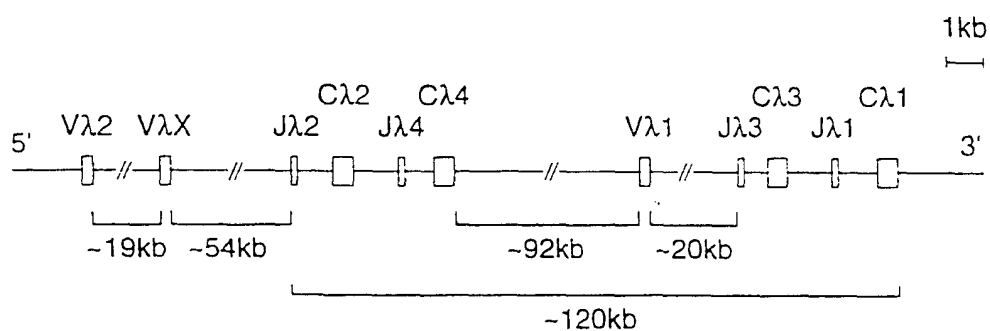


图 58

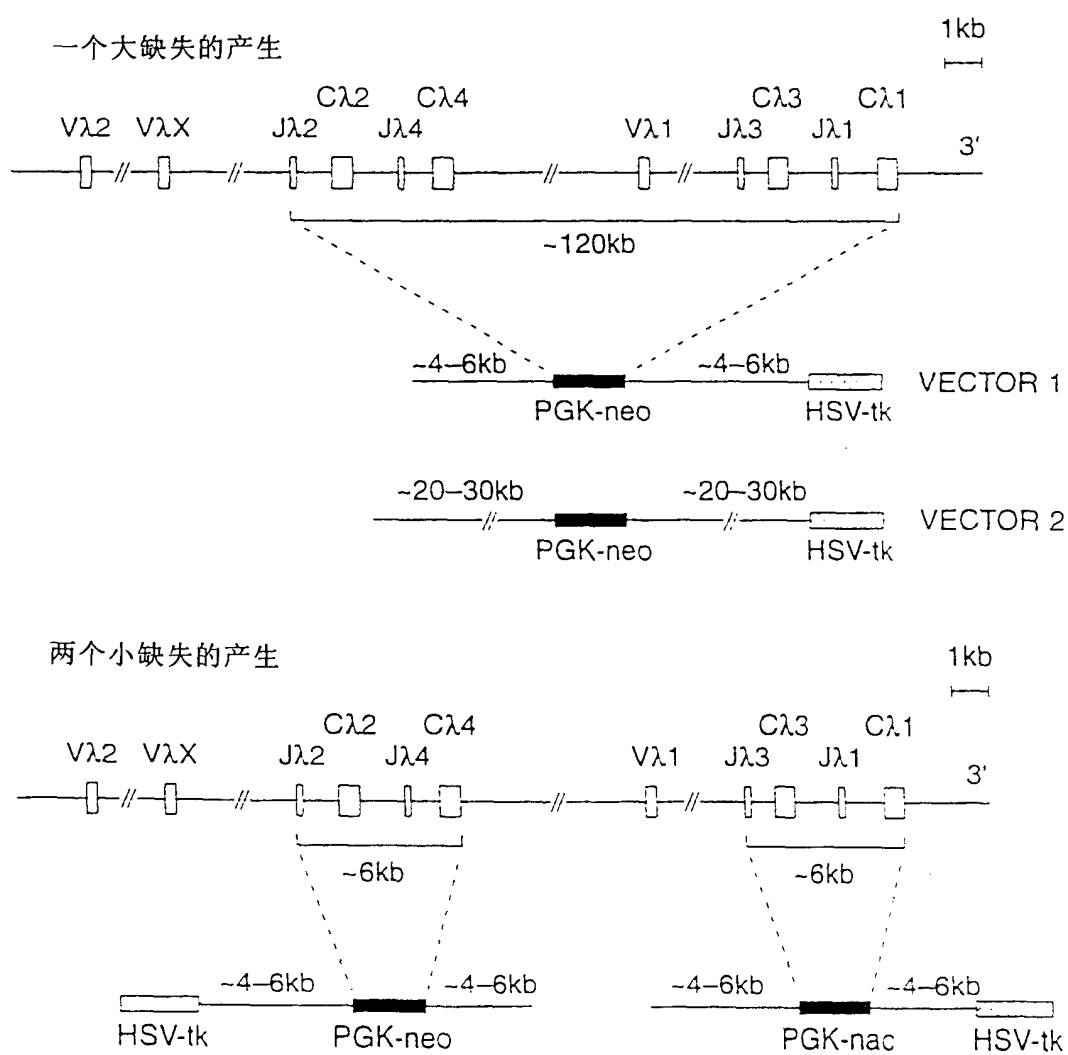


图 59

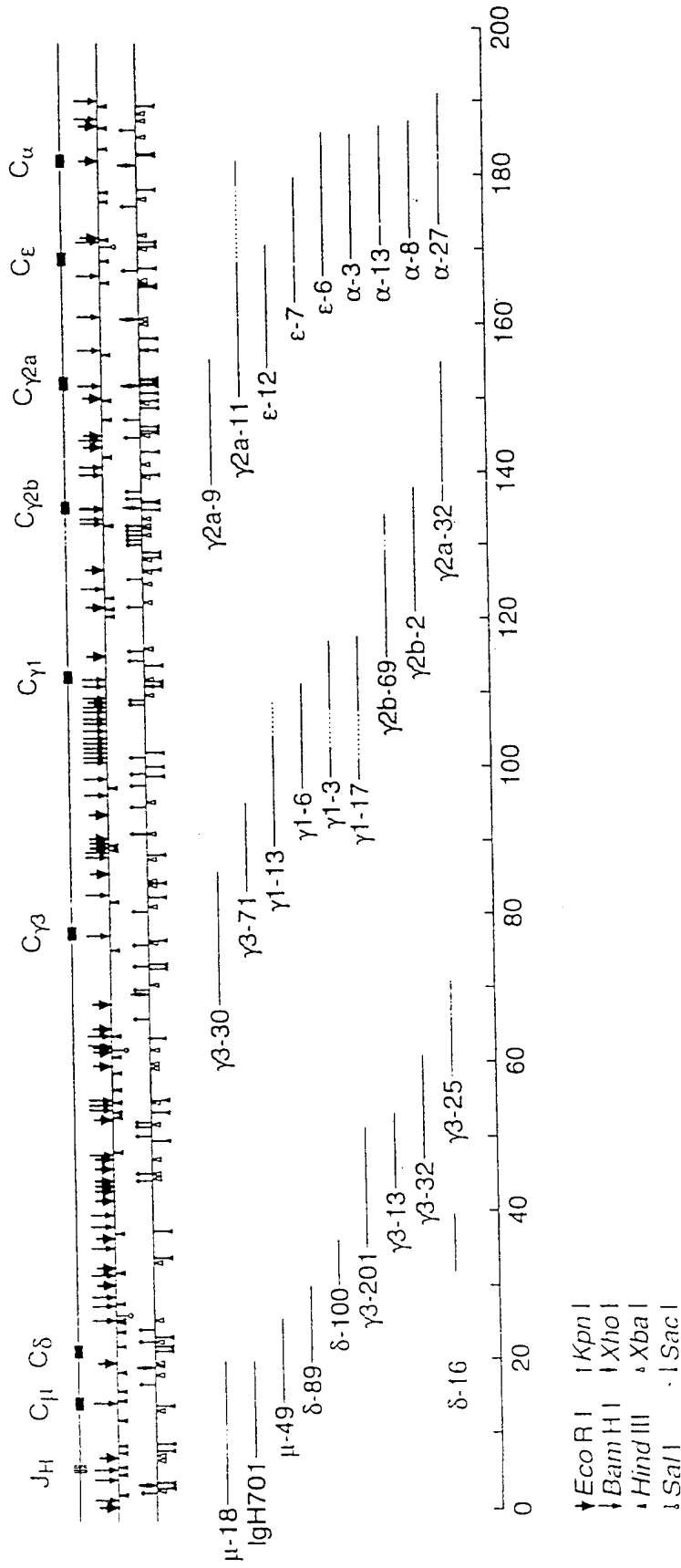


图 60

CGAGAGGGGCGGGGGAAGACTACTATCCCAGGCAGGTTTTAGGTTCCAGAGTCTGCGAG
AAATCCCACCATCTACCCACTGACACTCCCACCAGTCCTGTGCAGTGATCCCGTGATAAT
CGGCTGCCTGATTACGATTACTTCCCTTTCGGCACGATGAATGTGACCTGGGGAAAGAG
TGGGAAGGATATAACCACCGTGAACTTTCCACCTGCCCTCGCCTCTGGGGGACGGTACAC
CATGAGCAGCCAGTTAACCTGCCAGCTGTGAGTGCCGAGAAGGAGAGTCCGTGAAATG
TTCCGTGCAACATGACTCTAACCCCGTCCAAGAATTGGATGTGAATTGCTCTGGTAAAGA
ACGTTAGGGGGTCAGCTAGGGGTGGGATAAGTCCTACCTTATCTAGATCCATATATCCCT
CTGATGCACACCCTCACAGGAATCCCTCAGAAACCTCCACTATGGGGATTGGGGGAAGGA
AGCGTAAACAGGTCTAGAAGGAGCTGGAGGCCTCAGAACATCCAGAAACGGGGACAGCAA
AGGAGACAAGGAGAATATACTGATTTGCTAGGACATCTTCTGTTACAGGTCCTACTCCTC
CTCCTCCTATTACTATTCTTCCTGCCAGCCAGCCTGTCACTGCAGCGGCCAGCTCTTG
AGGACCTGCTCCTGGGTTTCAGATGCCAGCATCACATGTACTCTGAATGGCCTGAGAAATC
CTGAGGGAGCTGCTTTCACCTGGGAGCCCTCCACTGGGAAGGATGCAGTGCAGAAGAAAG
CTGCGCAGAATTCCTGCGGCTGCTACAGTGTGTCCAGCGTCCTGCCTGGCTGTGCTGAGC
GCTGGAACAGTGGCGCATCATTCAAGTGCACAGTTACCCATCCTGAGTCTGGCACCTTAA
CTGGCACAATTGCCAAAGTCACAGGTGAGCTCAGATGCATACCAGGACATTGTATGACGT
TCCCTGCTCACATGCCTGCTTTCTTCCTATAATACAGATGCTCAACTAACTGCTCATGTC
CTTATATCACAGAGGGAAATTGGAGCTATCTGAGGAACTGCCCAGAAGGGAAGGGCAGAG
GGGTCTTGCTCTCCTTGCTGAGCCATAACTCTTCTTTCTACCTTCCAGTGAACACCTTC
CCACCCCAGGTCCACCTGCTACCGCCGCCGTGGAGGAGCTGGCCCTGAATGAGCTCTTG
TCCCTGACATGCCTGGTGCGAGCTTTC AACCTAAAGAAGTGCTGGTGCGATGGCTGCAT
GGAAATGAGGAGCTGTCCCCAGAAAGCTACCTAGTGTTTGAGCCCCTAAAGGAGCCAGGC
GAGGGAGCCACCACCTACCTGGTGACAAGCGTGTTGCGTGTATCAGCTGAAACCTGGAAA
CAGGGTGACCAGTACTCCTGCATGGTGGGCCACGAGGCCTTGCCCATGAACTTCACCCAG
AAGACCATCGACCGTCTGTGGGTAAACCCACCAATGTCAGCGTGTCTGTGATCATGTCA
GAGGGAGATGGCATCTGCTACTGAGCCACCCTGCCTGTCCCTACTCCTAGAATAAACTCT
GTGCTCATCCAAAGTATCCCTGCACTTCCACCCAGTGCCTGTCCACCACCCTGGGGTCTA
CGAAACACAGGGAGGGGTGAGGGCCCAGGGAGGGAGAAATACCACCACCTAAGC

图 61

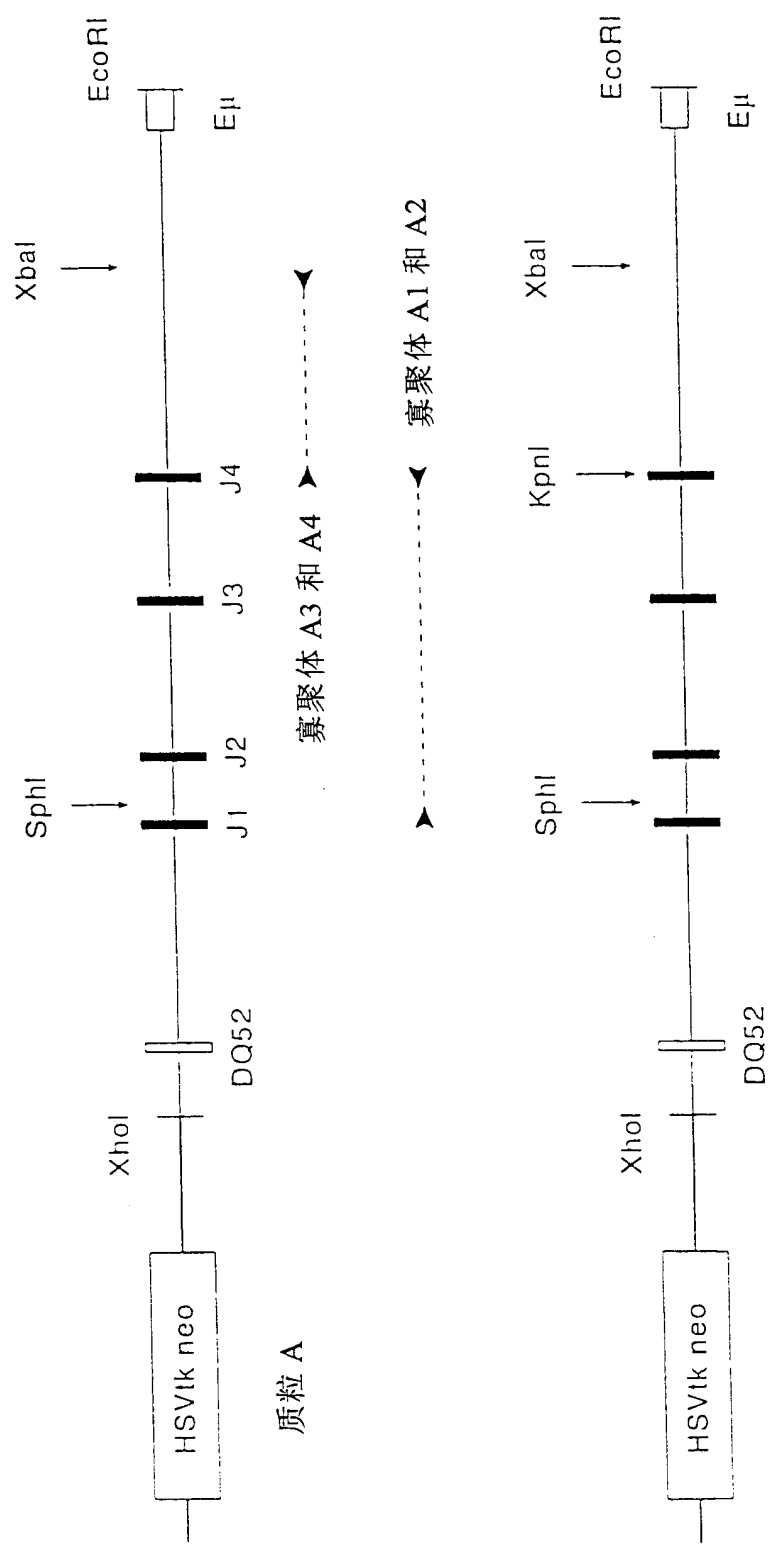


图 62

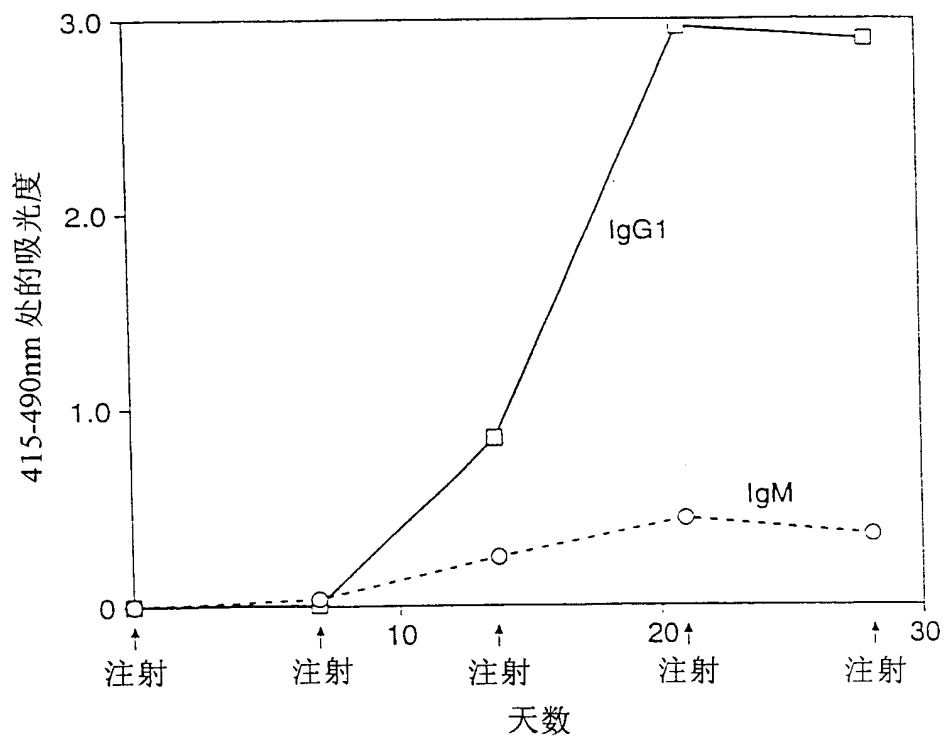


图 63

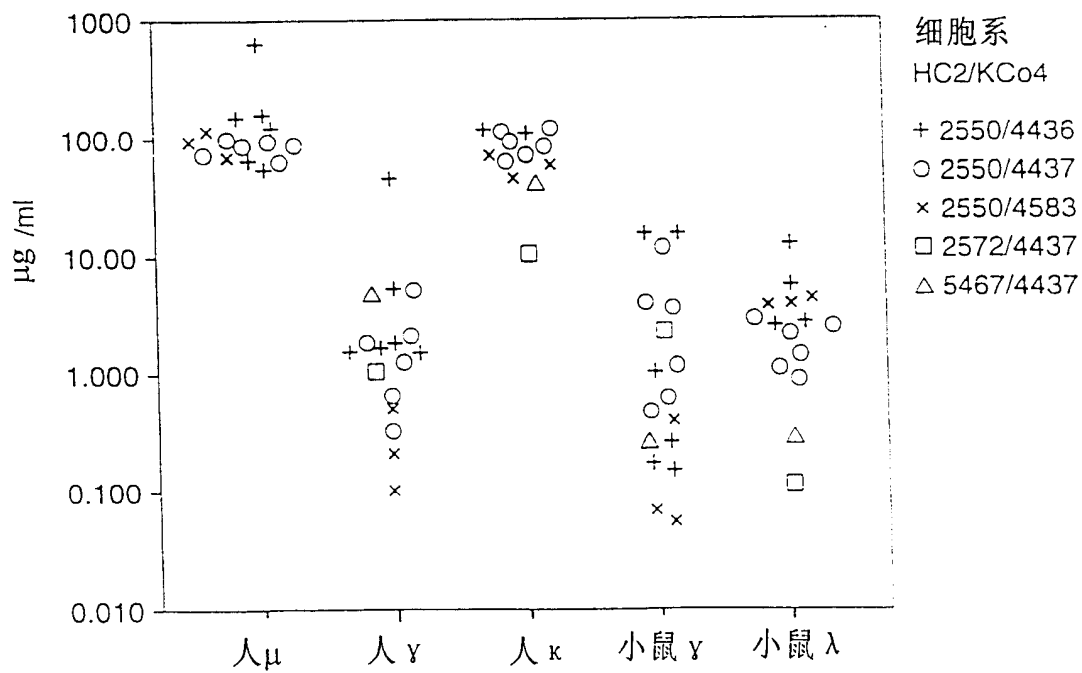


图 70

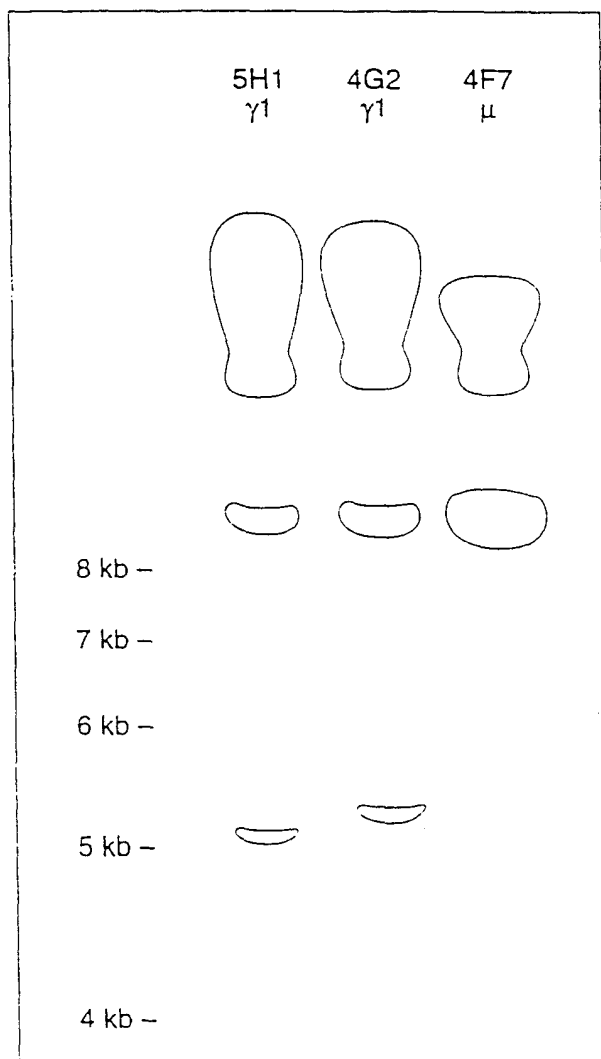


图 64A

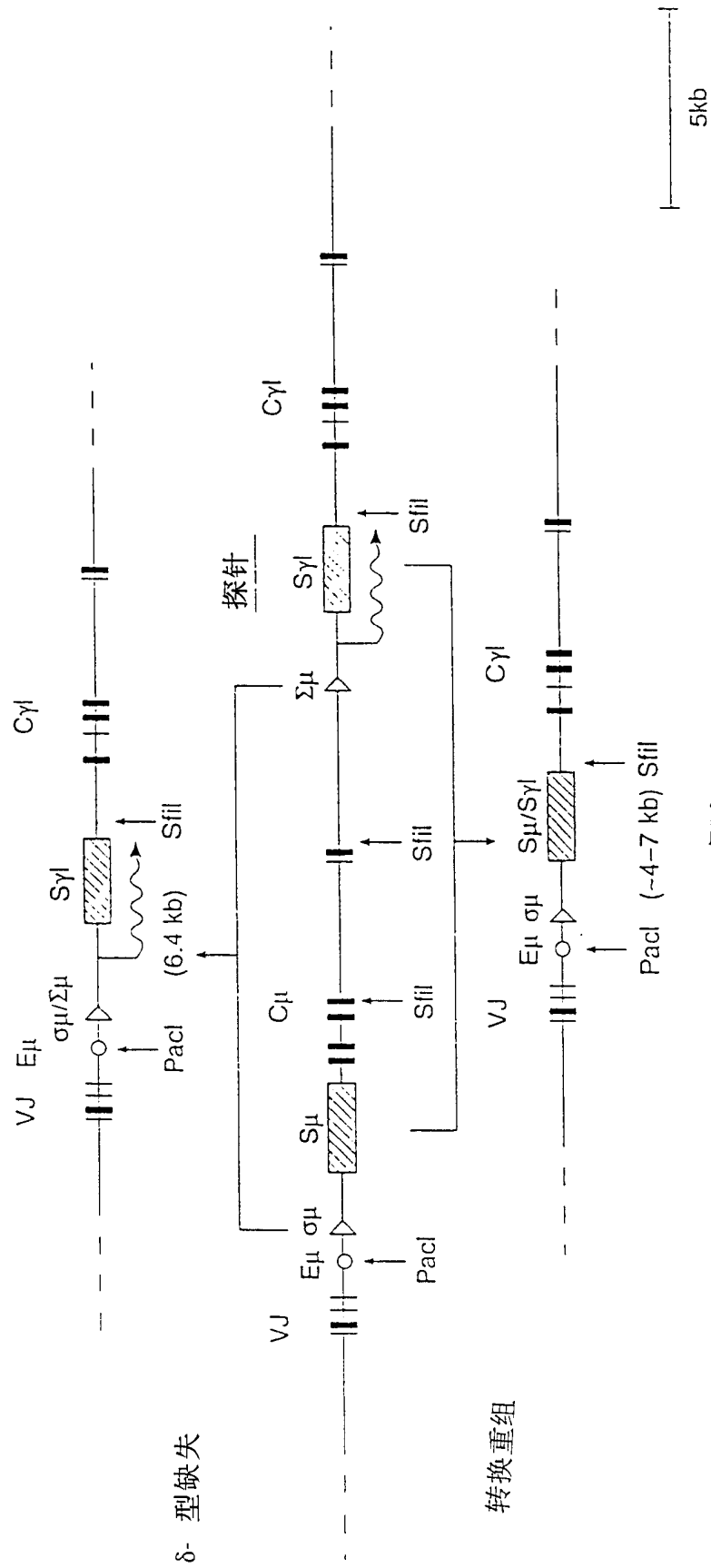


图 64B

V _H 251		N D N		J		C _Y		小鼠 γ 1
2357.t5 DXP'1 J6	gccctcggaacacgccatgtattactgtgTgaga	CATTtatggttcggggagttaCG		cggTgTgAcgTctggggccaagggaaccacggtcaccgTctctctcag		ccaaacgacacaccccccatctgtctatccac		
2357.t7 DHQ52 J3	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	CactgggCATTTGGAT		gctCttgatGtctggggccaagggaacaaTgCtaccgTctcttcag		ccaaacgacacaccccccatctgtctatccac	mouse γ2b	
2357.t2 DHQ52 J3	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	actggggatTGAT		gcttttgatatctggggccaagggaacaaTggtcacgTctcttcag		ccaaacacacaccccccatcagTctatccac		
2357.t3 D? J3	gAcTcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	CAGGGAGAGAT		gcttttagatatctggggccaagggaacaaTggtcacgTctcttcag		ccaaacacacaccccccatcagTctatccac		
2357.t4 DXP'1 J4	gccctcggaacacgccatgtattatTgtgTgaga	CATAGGactatATtccggggagtattTTCC		TgactactggggccaagggaacccctggTcacgTctcttcag		ccaaacacacaccccccatcagTctatccac		
2357.t10 DHQ52 J3	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	actggggatTGAT		gcttttgatatctggggccaagggaacaaTggtcacgTctcttcag		ccaaacacacaccccccatcagTctatccac	mouse γ3	
2357.t1 D? J3	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	CATGGGTCTATG		gatatactggggccaagggaacaaTggtcacgTctcttcag		ctacaacacacgcccccatctgtctatccct		
2357.t6 DHQ52 J4	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	GAGAGCGGTcactggggatTCG		tttgactaTtggggccaagggaacccctggTcacgTctcttcag		ctacaacacacgcccccatctgtctatccct		
2357.t8 DIR2 J3	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	AGGgaacccccCTGAT		gcttttgatatctggggccaagggaacaaTggtcacgTctcttcag		ctacaacacacgcccccatctgtctatccct		
2357.t9 DIR2R J6	gccctcggaacacgccatgtattactgtgcgaga	CGggggcct		tactactactacggtatggacgtctggggccaagggaacacggtcacgTctcttcag		ctacaacacacgcccccatctgtctatccct		

人

小鼠

小鼠

人

图 65

20 30 40 50 52 a 53 60
VH251.G1 TCCTGAAGATCTCTGTAAAGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCCCCAGATGCCCGGAAGGCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCTCTGGTGACTCTGTATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTC
J2
2599.7
2599.9
2599.11
2599.14
J3
2599.25
J4
2599.2
2599.5
2599.8
2599.23
2599.24
2599.28
J6
2599.10
2599.13
COR I
COR II

图 66A1

70	80	82	a	b	c	83	90	
ACCATCTCAGCCGACCAAGTCCATCAGCACCGCCCTACCTGGCAGTGGAGCAGCTGAGGGCTCGGACACCCGCCATGTATTACTGTGCGAGA								
.....								CAAGGgactgggggGg
.....								CAGAAggGGGGAAGGG
.....								CAGAAggGGGGAAGGG
.....								actgggTgg
.....								CATGAaactgggggTCCGGGg
.....								ACGgattacgatattttgacctgggtattataaacCT
.....								tatagcagcagc(CCTT
.....								TCTtactatgttcgggggag
.....								CTCgattacgatattttgacctgggtattataaacCC
.....								CTCgattacgatattttgacctgggtattataaacCC
.....								CCGtatagcagcagctggtacAGg
.....								TACTACTACTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGGAC
.....								GAGGGGGGGTTtattactatggttcggggggttatta
.....								GAGGGaactgggggCAT
.....								G

CDR III

图 66A2

	20	30	40	50	52 a	53	60
VH251. GL	1CTCTGAAGATCTCCTCTGAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACACGTACTGGATCGGCTGGGTGGCCACAGATCCCCGGGAAGGCCCTGGAGTGGATGGGATCATCTATCCTGGTGA	CTCTGACTCTGATACAGATACAGCCCGTCTTCC	AGGCCAGGTC				
J2		CGT.....					
3204. sp28							
J3							
3204. ln10		G.....					
J4							
3204. ln3		G.....	A.....				
3204. ln7		A.C.G.....	A.....				
3204. ln8		G.....	A.....				
3204. ln14		G.....	A.....				
3204. ln15		T.....	C.....	G.....			
3204. sp22		G.....	A.....				
3204. sp26		T.....	A.....				
3204. sp27		G.....	A.....				
3204. sp30		A.....					
J5		I.....	A...G.....	CA.....			
3204. sp19							
J6		T.I.G.A...G.....		C.G.T.....			
3204. sp20							
		----- CDR I		----- CDR II			

图 66B1

[illegible]

66B2

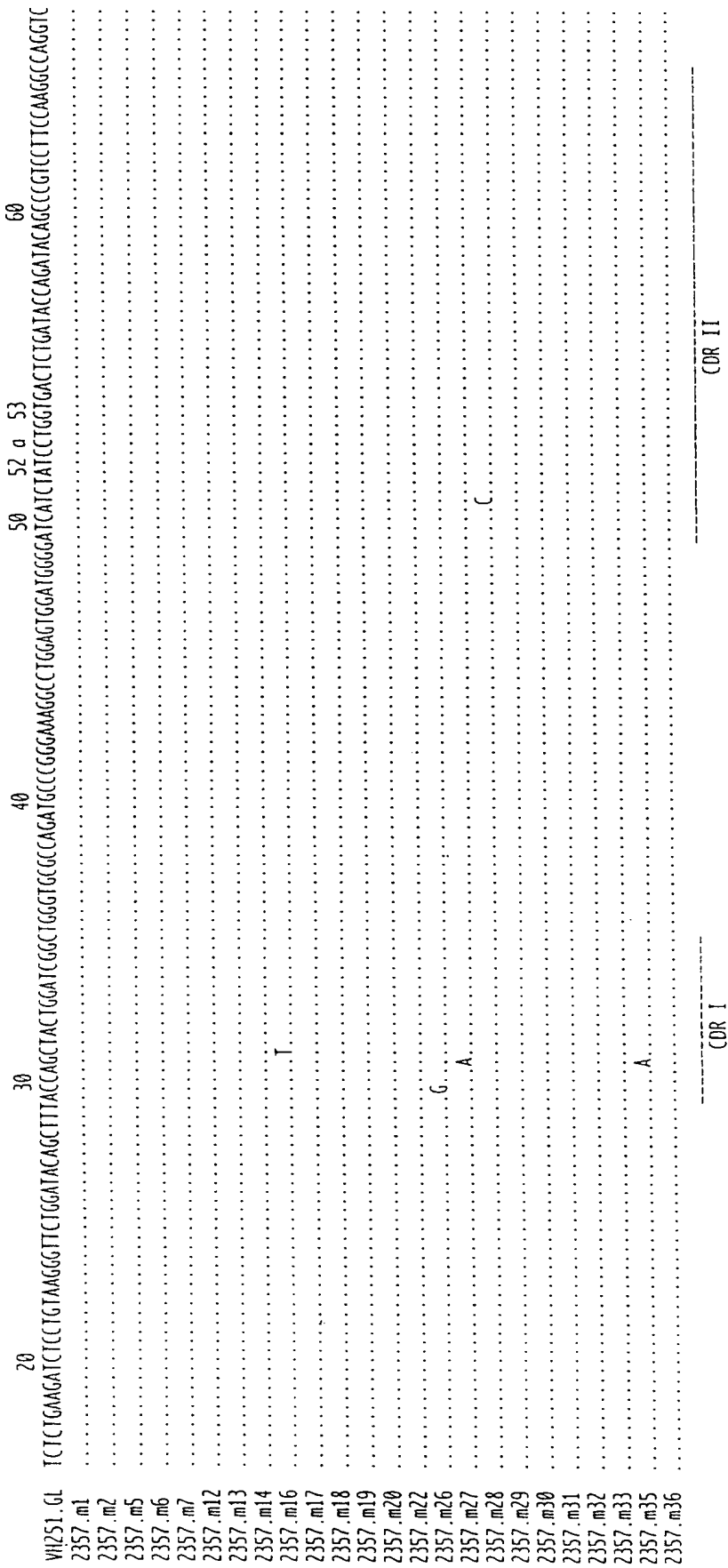


图 67A

	20	30	40	50	52 a	53	60
WI251.G1	TCCTGAAGATCTCTCTGAAGGTTCTGGATACAGCTTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGGCCACAGATGCCCGGGAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCTCTGGTACTCTGTATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTC						
J2	C.....						G.....
2357.g5							
J3							
2357.g10							
2357.g24							
J4							
2357.g1		T..T..GA.....					C.....
2357.g2							
2357.g3							
2357.g4						GG.....	
2357.g6		T...G.....					
2357.g11		A.....					
2357.g17							
2357.g19	G.....	T...T...T...C.....				A.....	T.....
2357.g23							
2357.g27							
2357.g30							
2357.g32			C..T.....				
2357.g34	T.....	A...T..T.....					
2357.g36							
J5							
2357.g25		A.....C.....					
2357.g35							
J6							
2357.g18		A...T..C.....	A.....				
2357.g22		C.....T...C.....					
2357.g28		G...A.....				T.....	
2357.g33						T.....	C.....
		-----CDR I-----				-----CDR II-----	

图 67B1

[illegible]

67B2

	20	30	40	50	52 a	53	60
VH50P1.GL	TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACCTGGGTC	CCGAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAGCAATAAATACTACG	CAGACTCCG	TGAAGGGCCGATTTC			
J2							
5250.ln4							
5250.ln5							
5250.ln8		A A G A . A .					
5250.ln10		A A G A . A .					
5250.ln12							
5250.ln27		A A G A . C A .					
5250.ln115							
5250.ln118		A . A .					
5250.ln202		A A G A . A .					
J4							
5250.ln16							
5250.ln19							
5250.ln22							
5250.sp26							
5250.sp27							
J6							
5250.ln3							
5250.ln24							
5250.sp19							
5250.sp22							
5250.sp28							
VH51P1.GL	TCGGTAAGGTCCTCTGCAAGGCTTCGGAGGACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGG	CCCCCTGGACAAAGGGCTTCAGTGGATGGGAAGGATATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTACG	CACAGAACTACG	CAGAACTCCAGGGCAGAGTC			
J3							
5250.sp33							
VH4.21.GL	ACCTGTCCCTCACCCTGGGCTGCTATGGTGGTCTTCAGTGGTTACTTGGAGCTGGATCCGCCAGC	CCCCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGGATGGGGAATCAATCAT	AGTGAAGCACCAACTACAACTCCGTC	CCCTCAAGAGTCGAGTC			
J4							
5250.ln2							
5250.sp30							
5250.sp32							
	-----	CDR I		-----	CDR II		

图 68A

[illegible]

68B

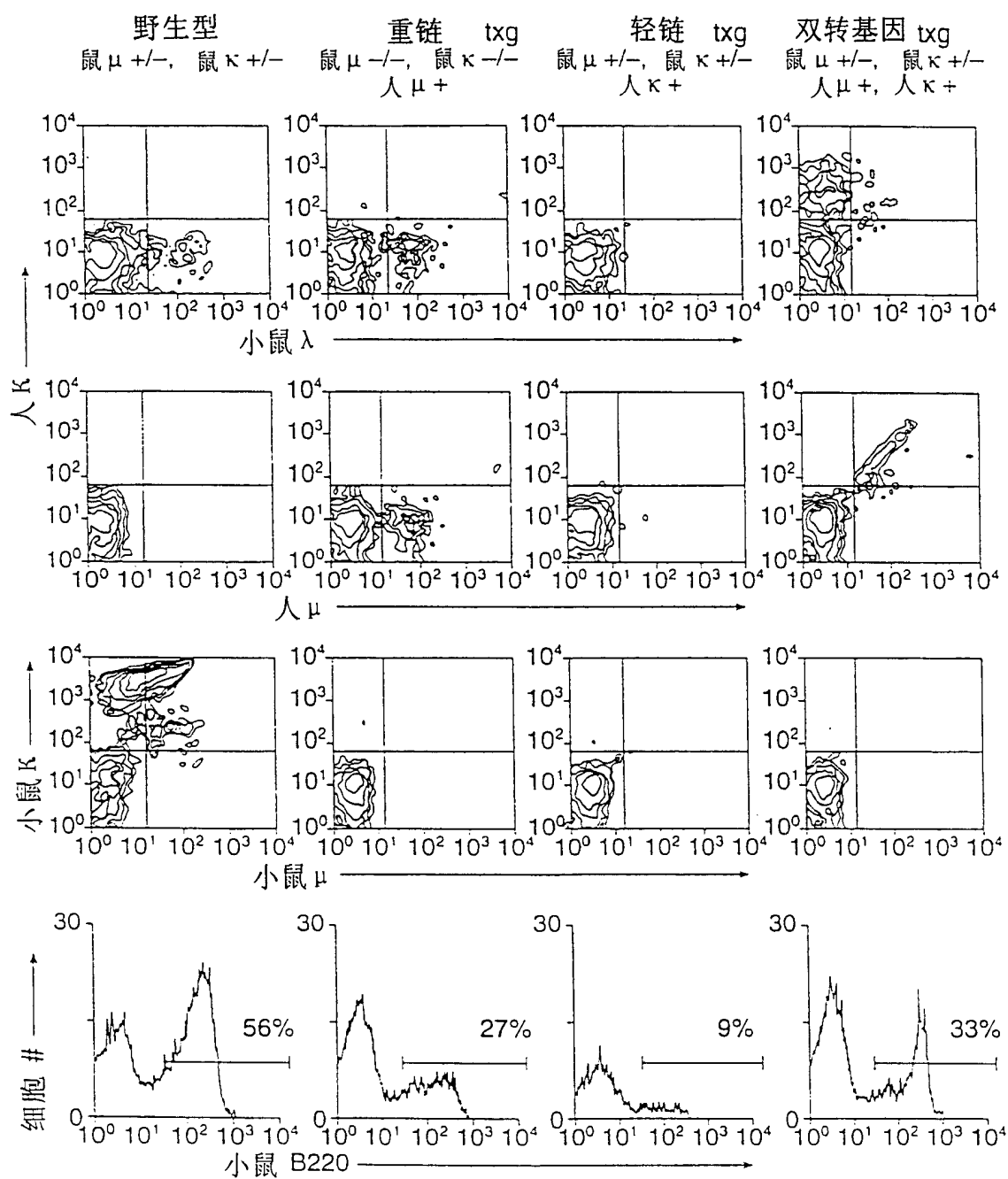


图 69

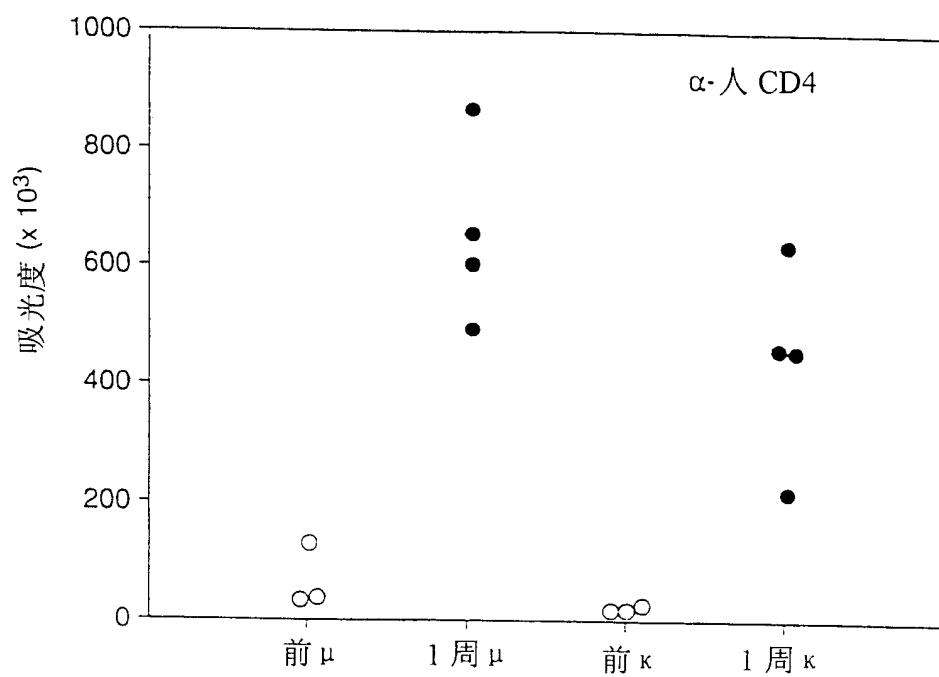


图 71A

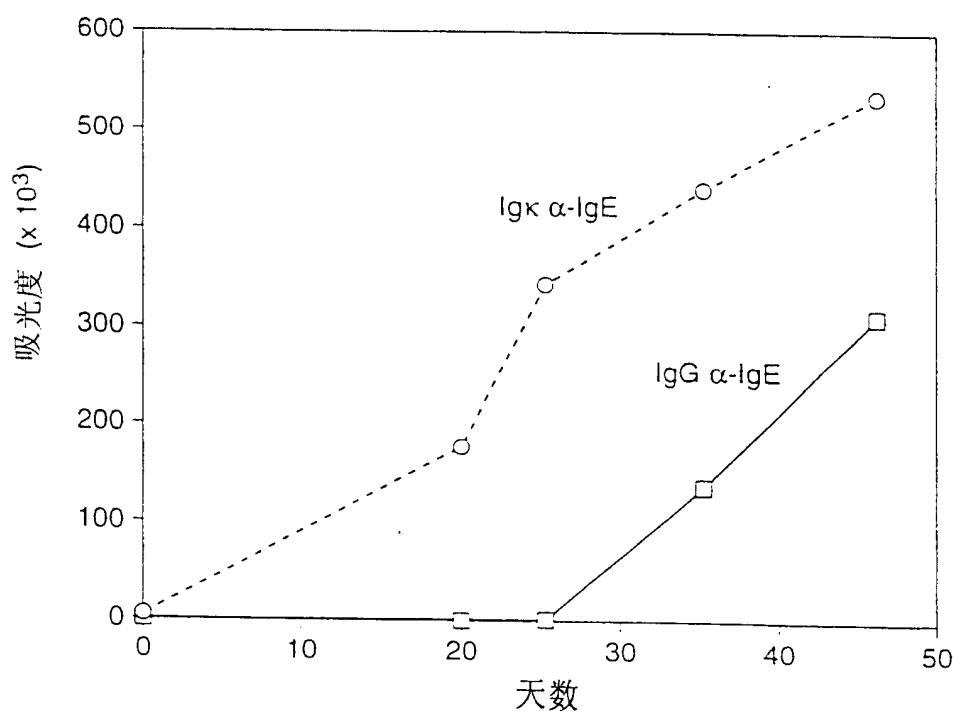


图 71B

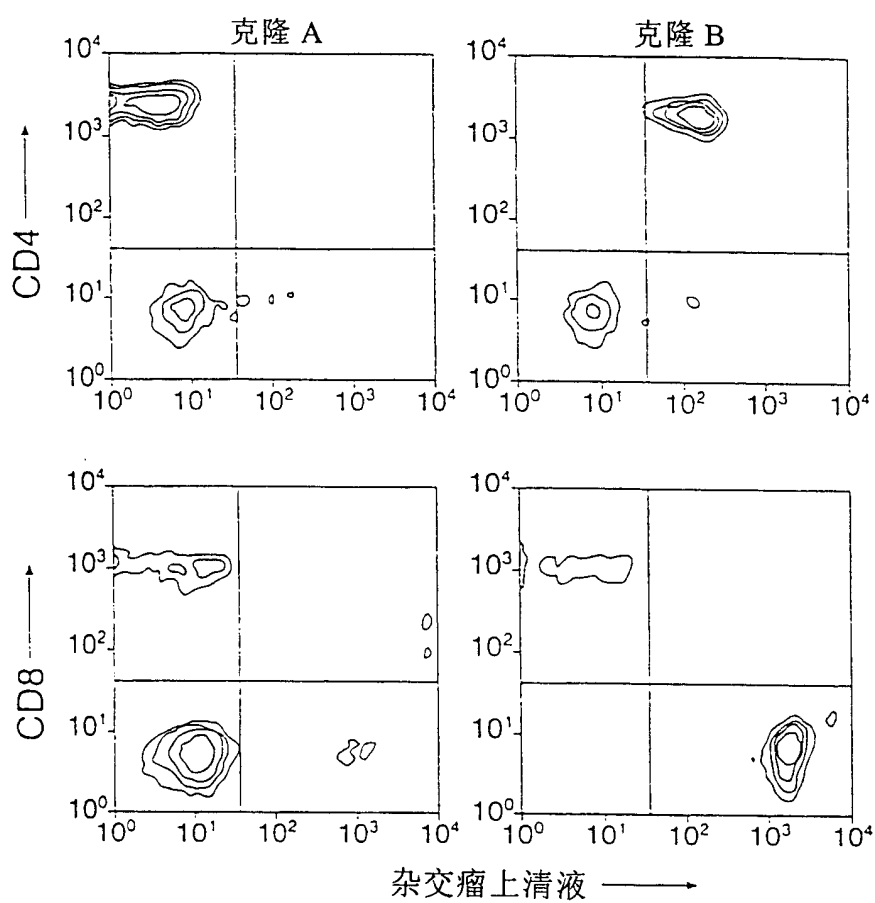


图 72

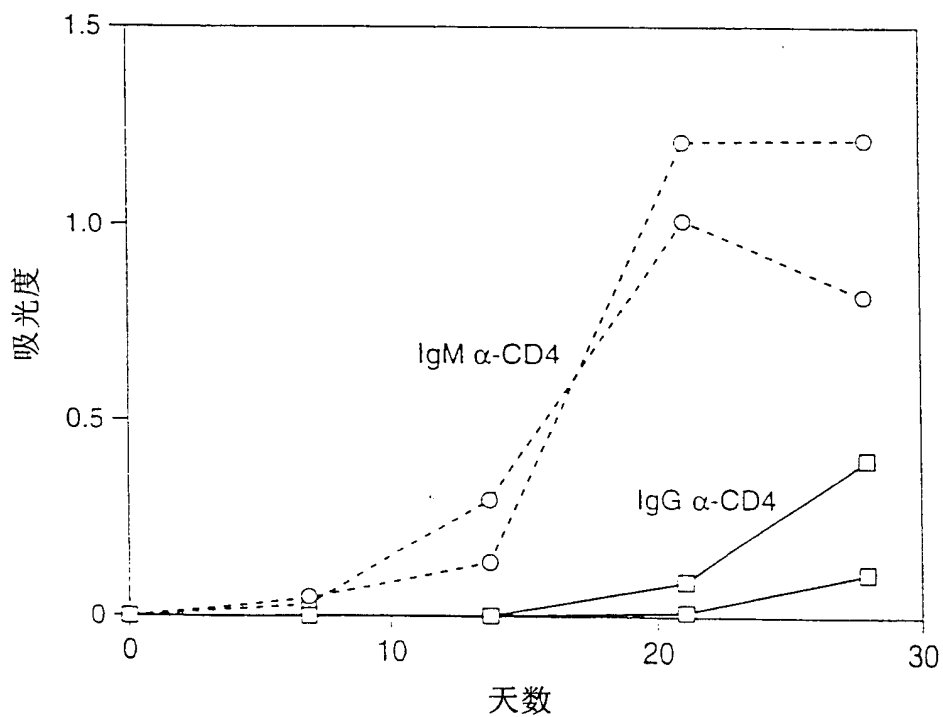


图 73

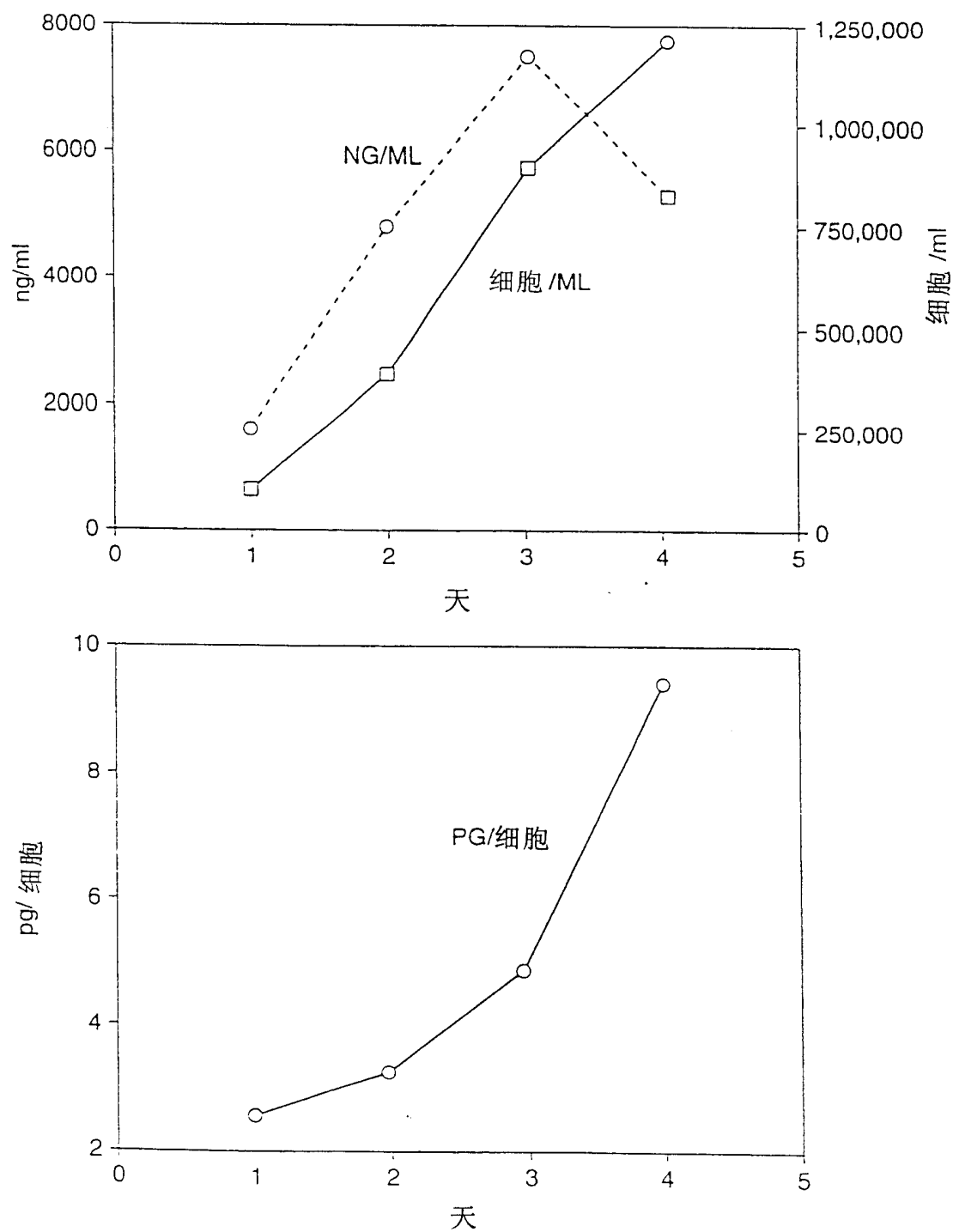


图 74

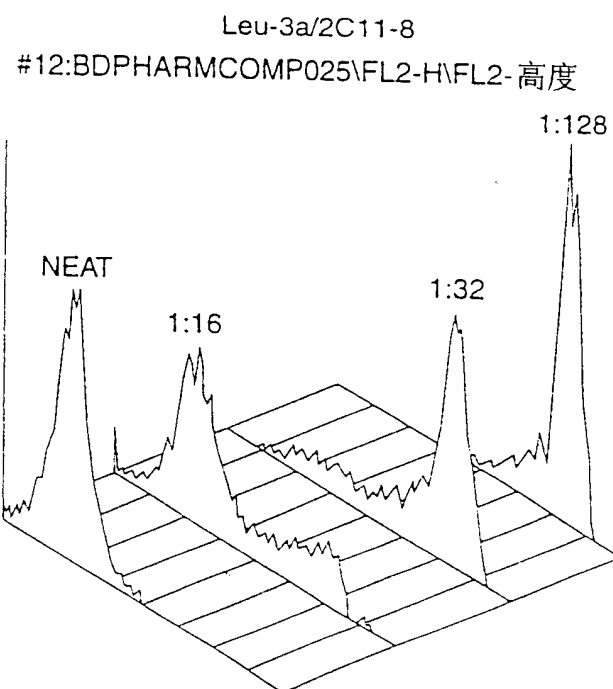
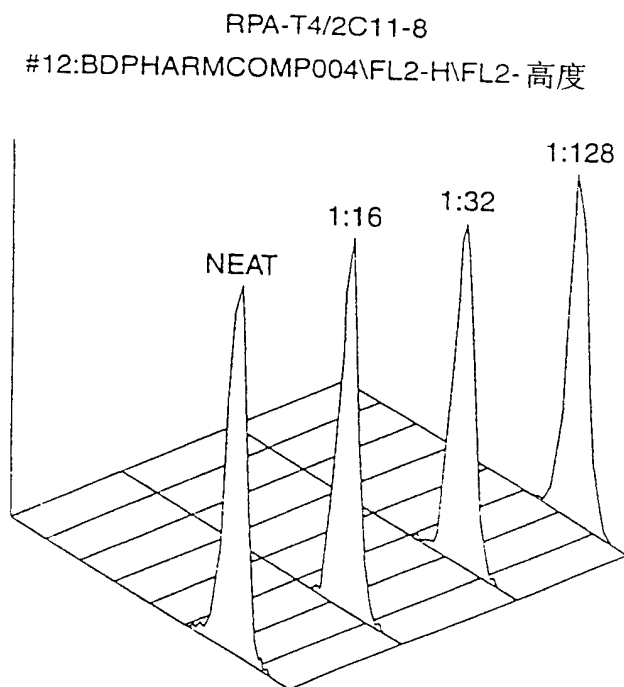


图 75

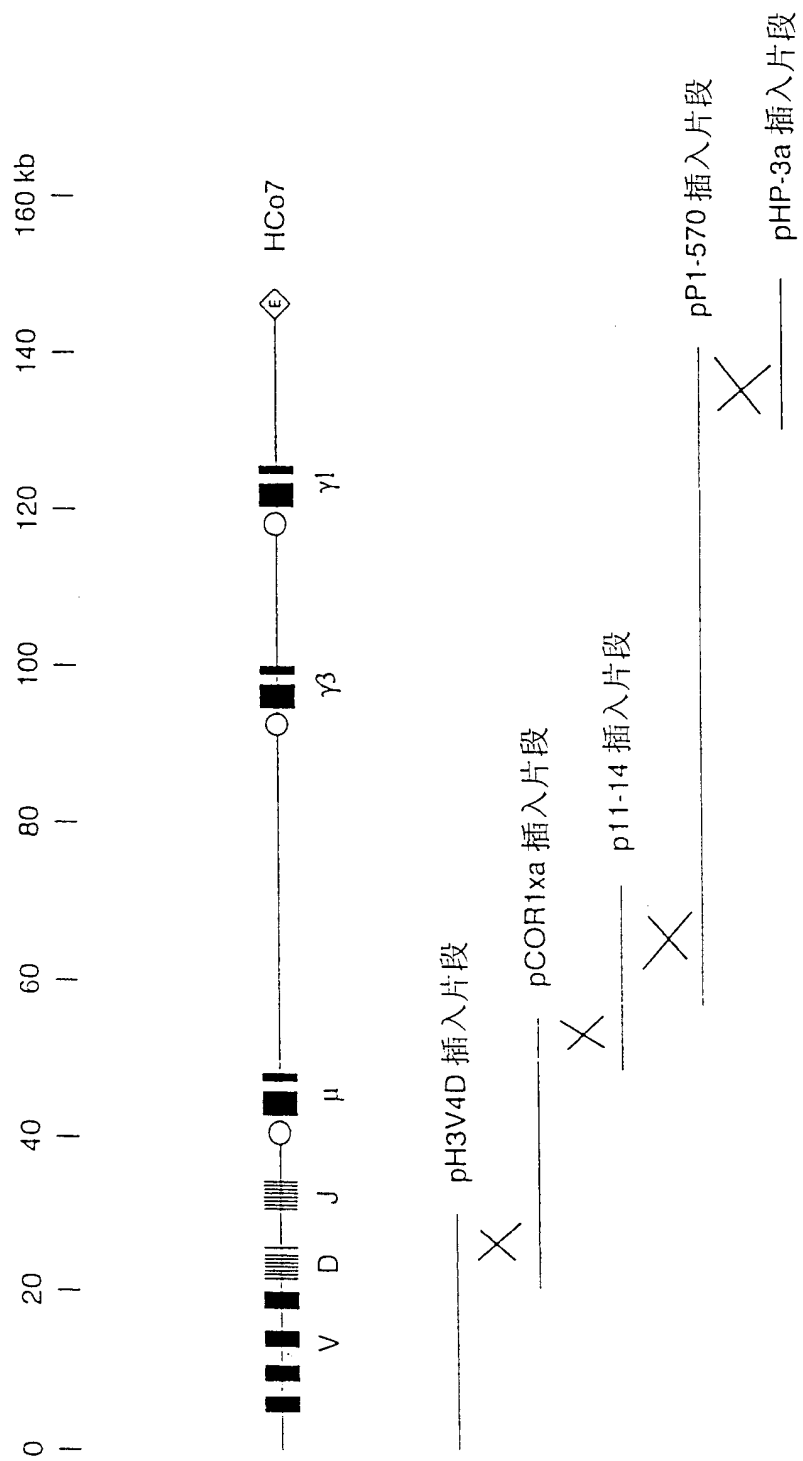


图 76

pGP2b 序列

AATTAGCggccgctgtcgacaagcttcgaattcagtatcgatgtggtaccctggatcctcgagtgcGGCCGCAGTATGCAA
 AAAAAAGCCCGCTCATTAGCGGGCTCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCA
 TCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTCGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGT
 TGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCAGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTG
 AGCAACAACATGAATGGTCTTCCGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGT
 TCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAAACGAAGCGCTGGCATTGACCC
 TGAGTGATTTTCTCTGGTCCCGCCGATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCAGTAACCGGGCATGTTT
 ATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATTCCCCCCTAC
 ACGGAGGCATCAAGTGACCAAACAGGAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTC
 TGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTAC
 CGCAGCTGCCTCGCGGTTTCCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTCT
 GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGAGCCATGACCC
 AGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACATATCGGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGC
 GGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTG
 CGCTCGGTCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
 CGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCTATA
 GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
 CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCT
 CCGTTCCGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCCTCCAAGCTGG
 GCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAggcgcgcccttgccctaagaggccaCTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
 TGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
 TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
 TTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGC
 TCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
 AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
 CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATACTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
 CTTACCATCTGCCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
 AGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTT
 TGCTATGGCTTATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA
 GTTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
 TCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTAT
 GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCA
 TTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAAACCCACTCGTGCA
 CCCAAGTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA
 GGGAAATAAGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT
 GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTG
 CCACCTGACGCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCAGGAGGCCCTTTCGTCTTCA
 AG

图 77A

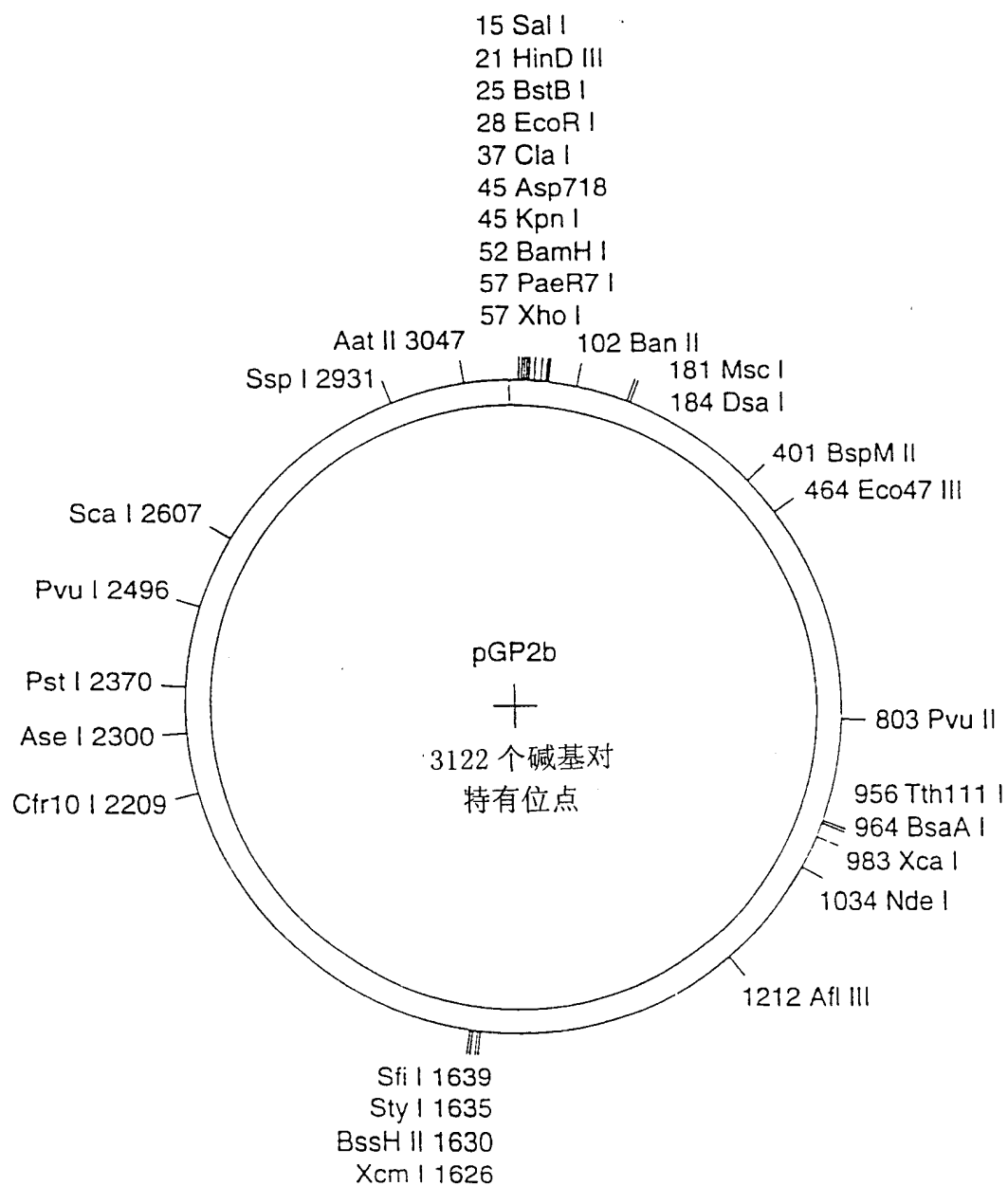


图 77B

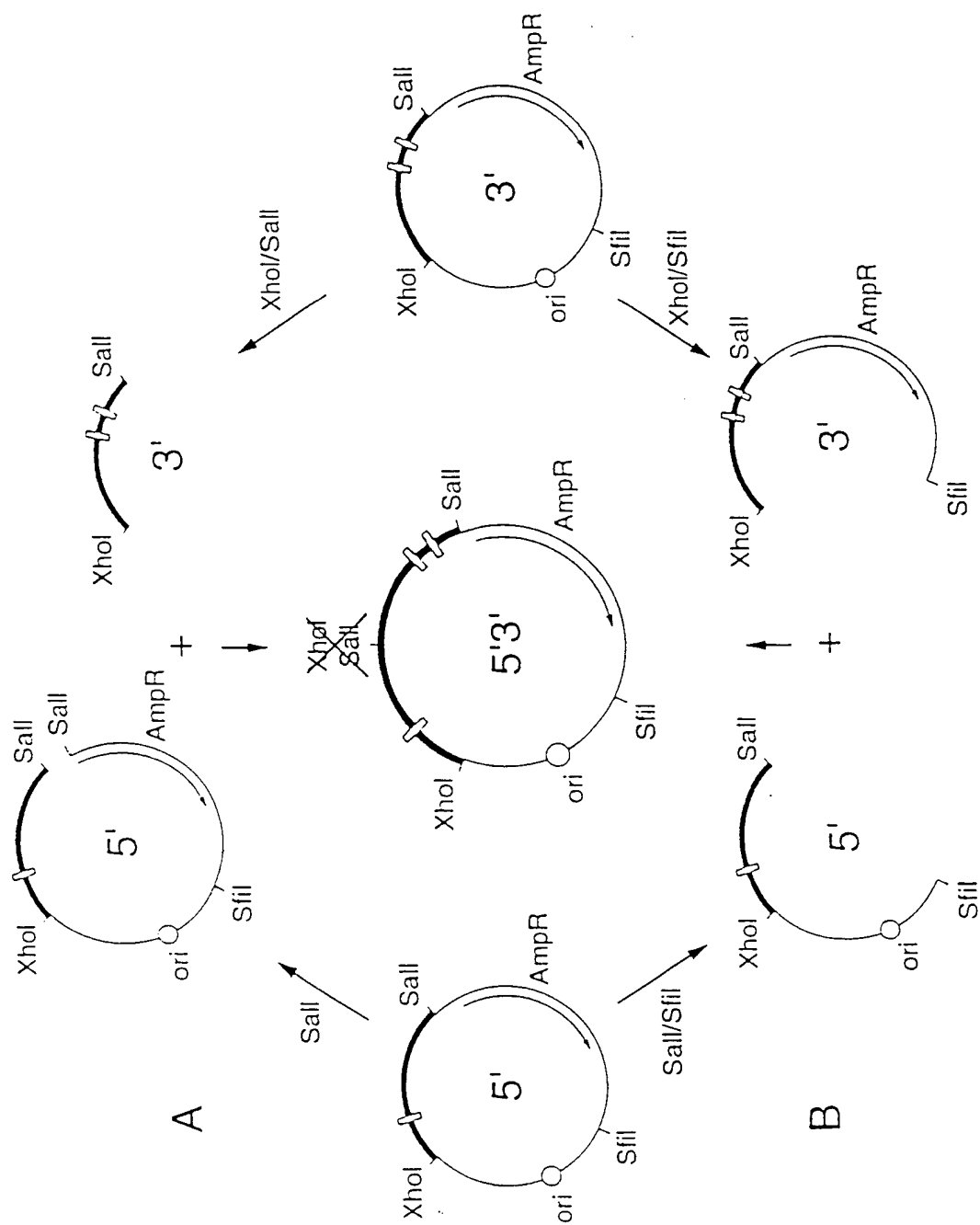


图 78

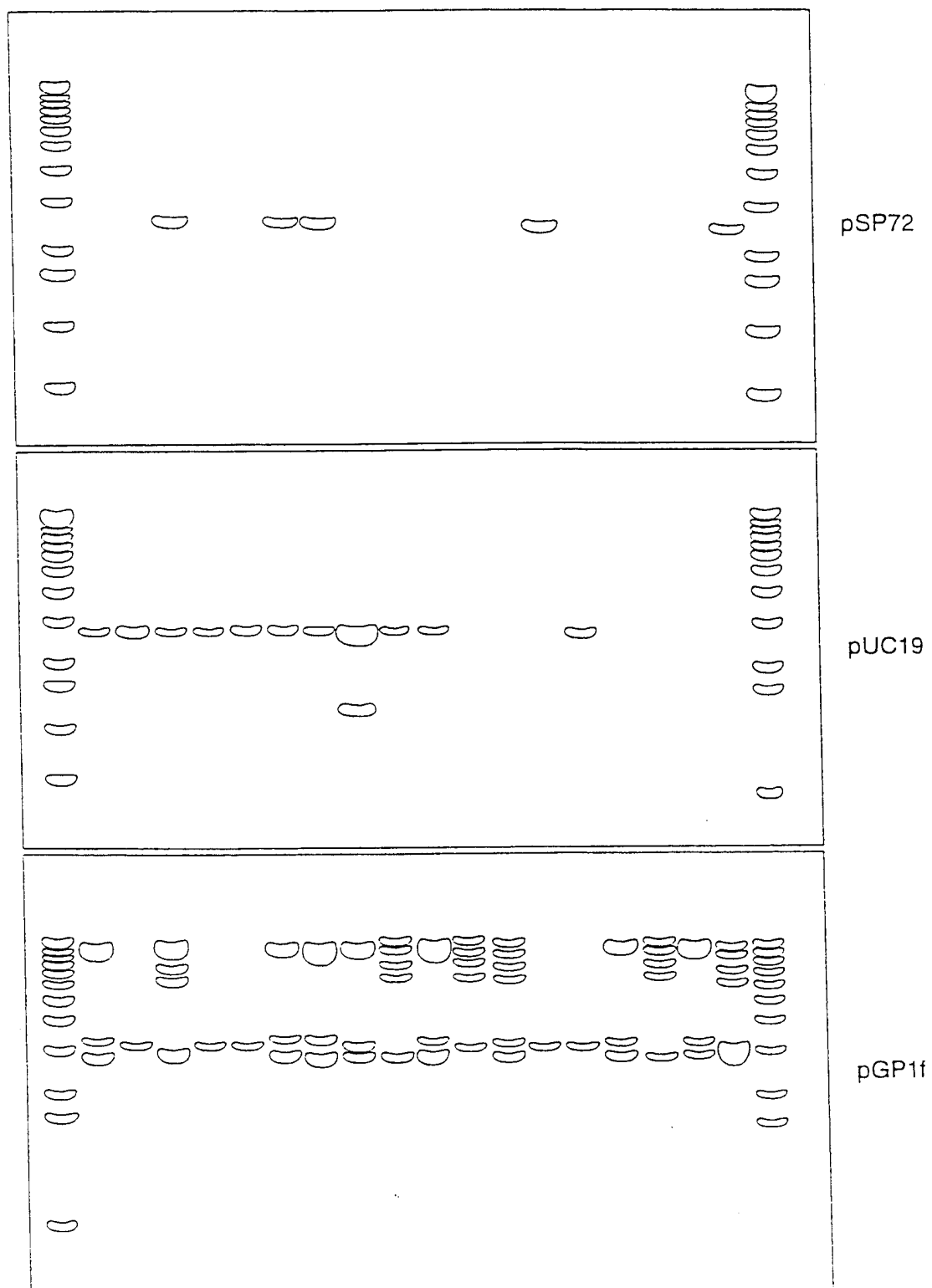


图 79

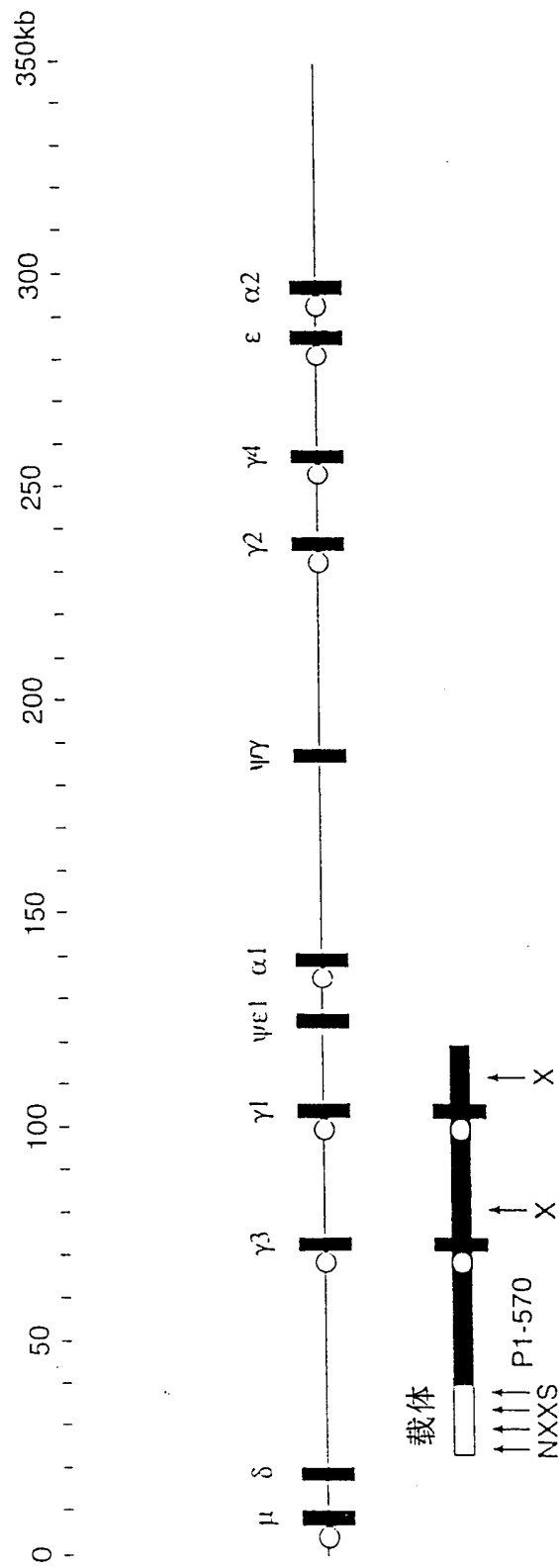


图 80

87/93

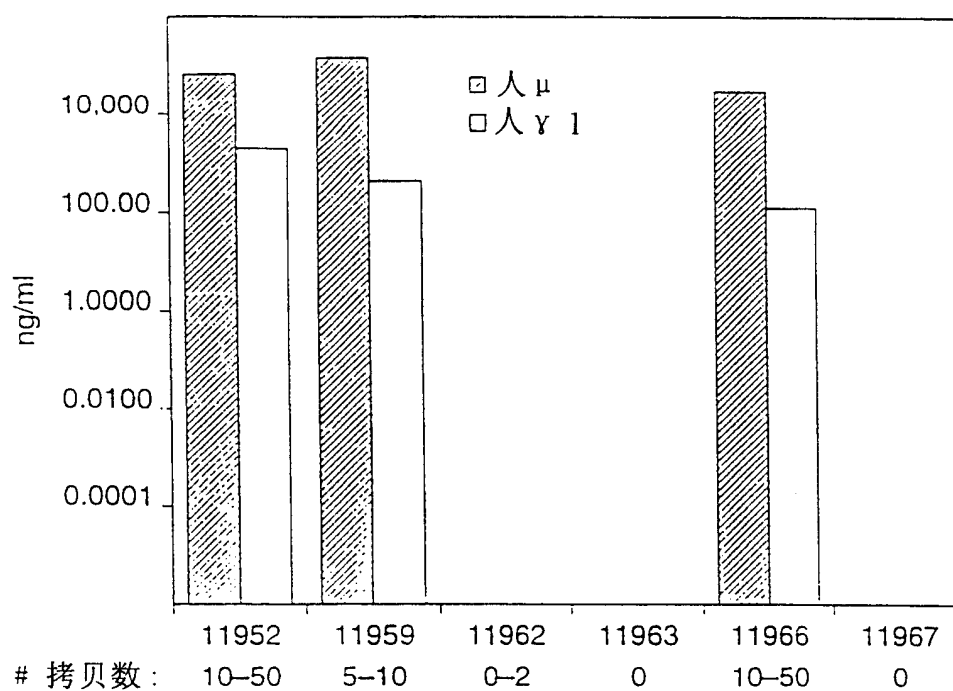


图 81

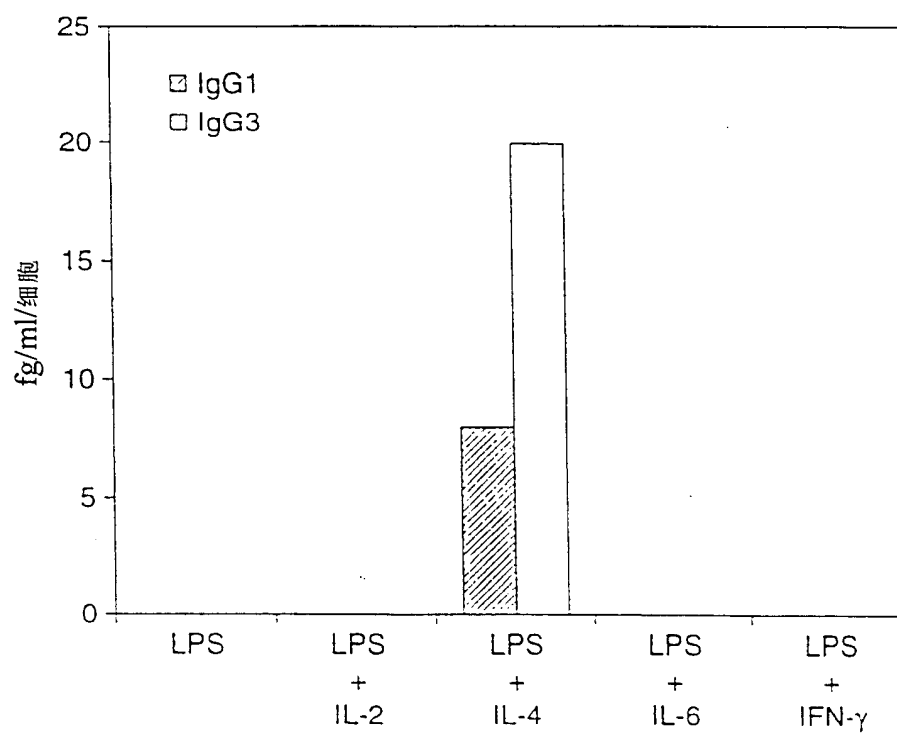


图 84

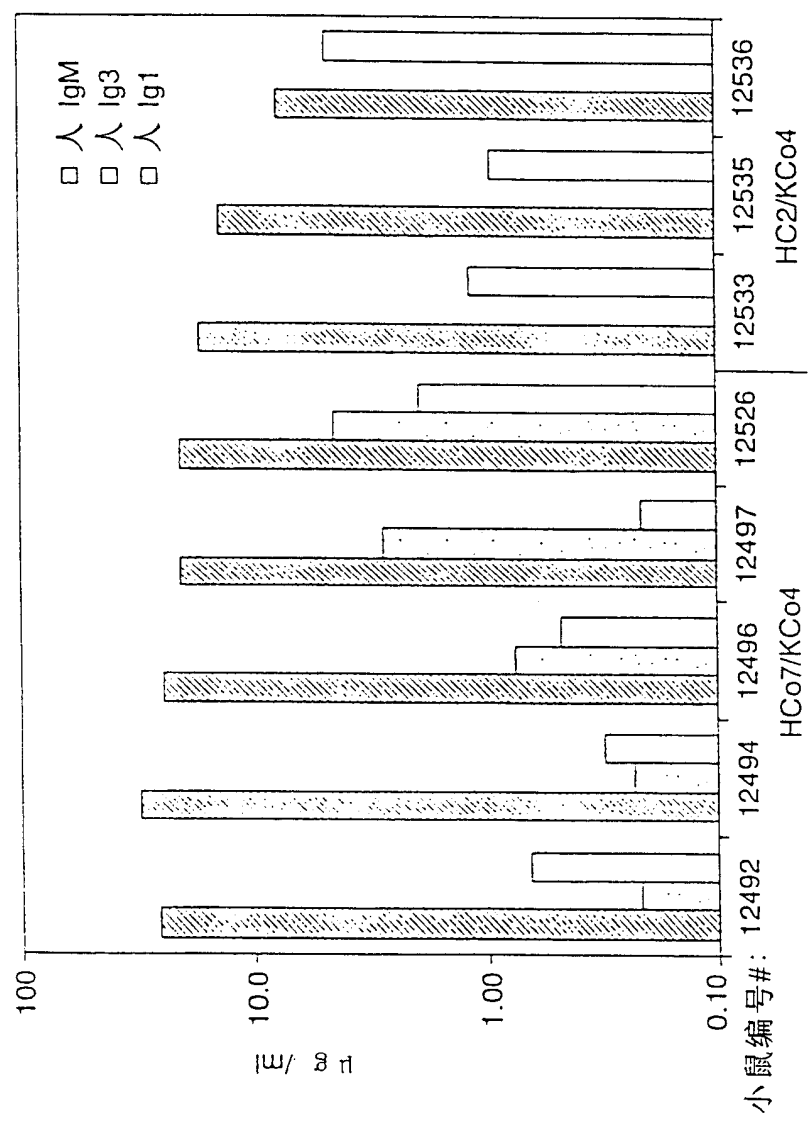


图 82

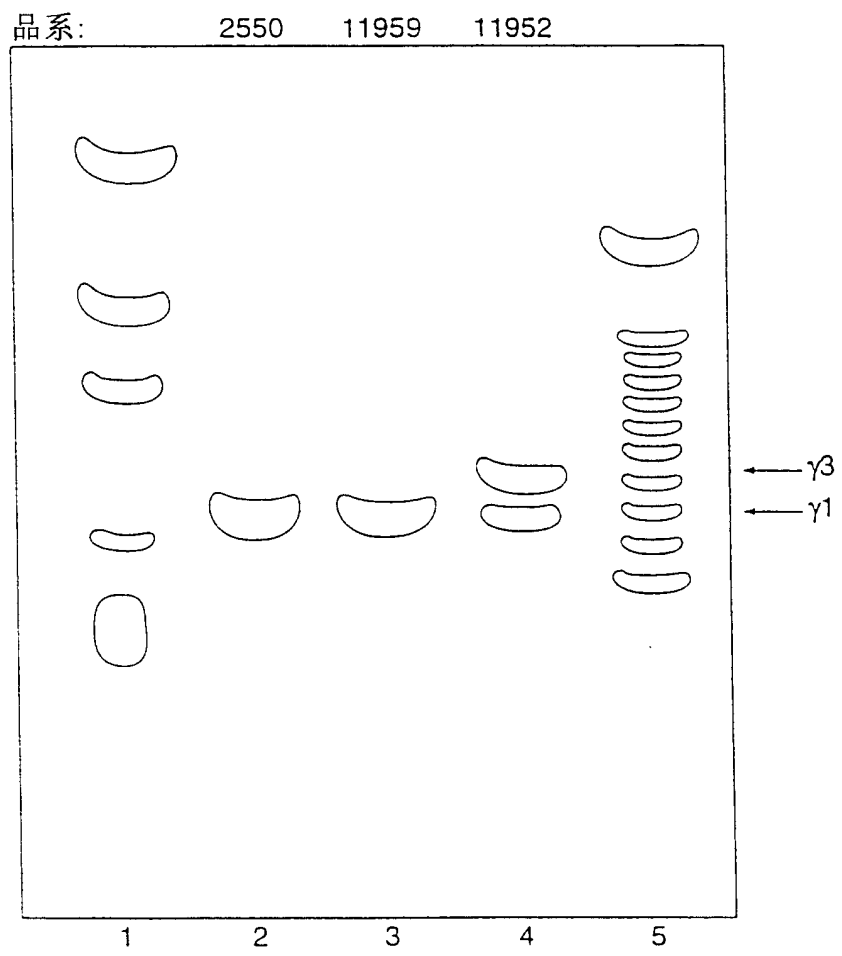


图 83

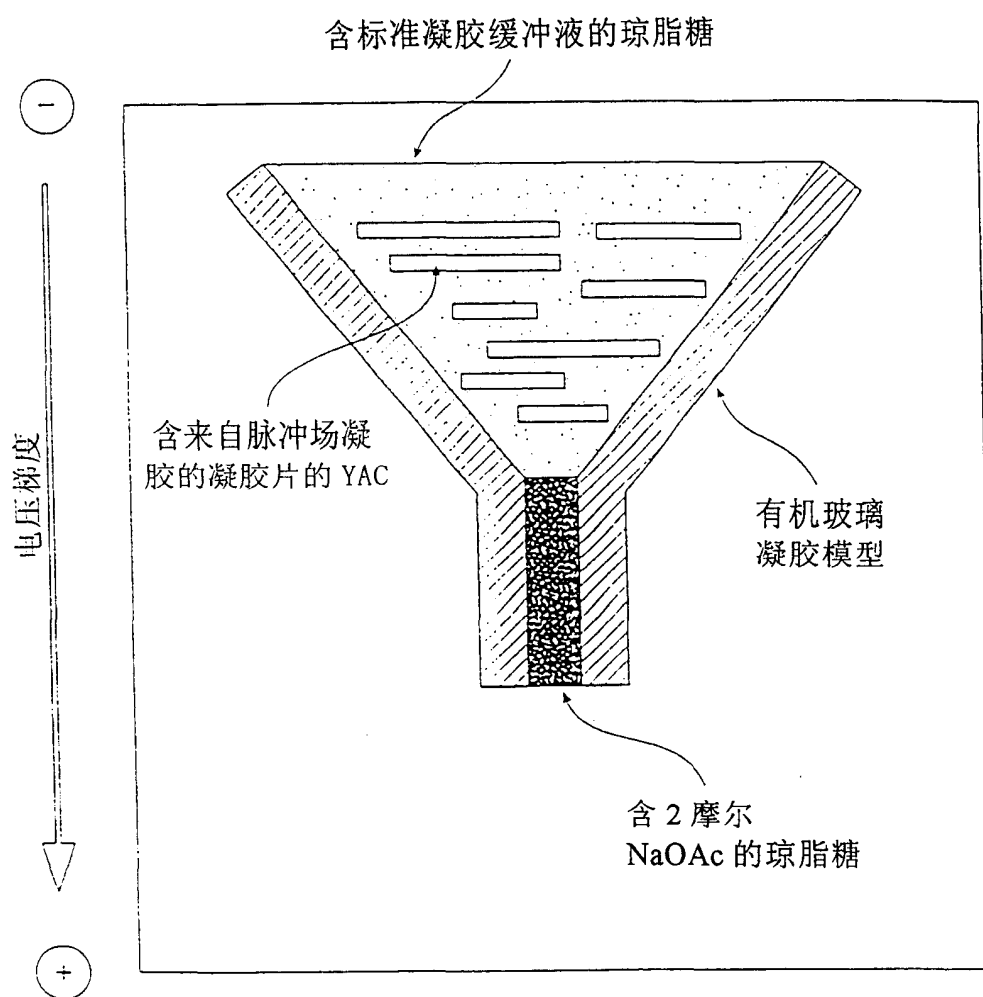


图 85

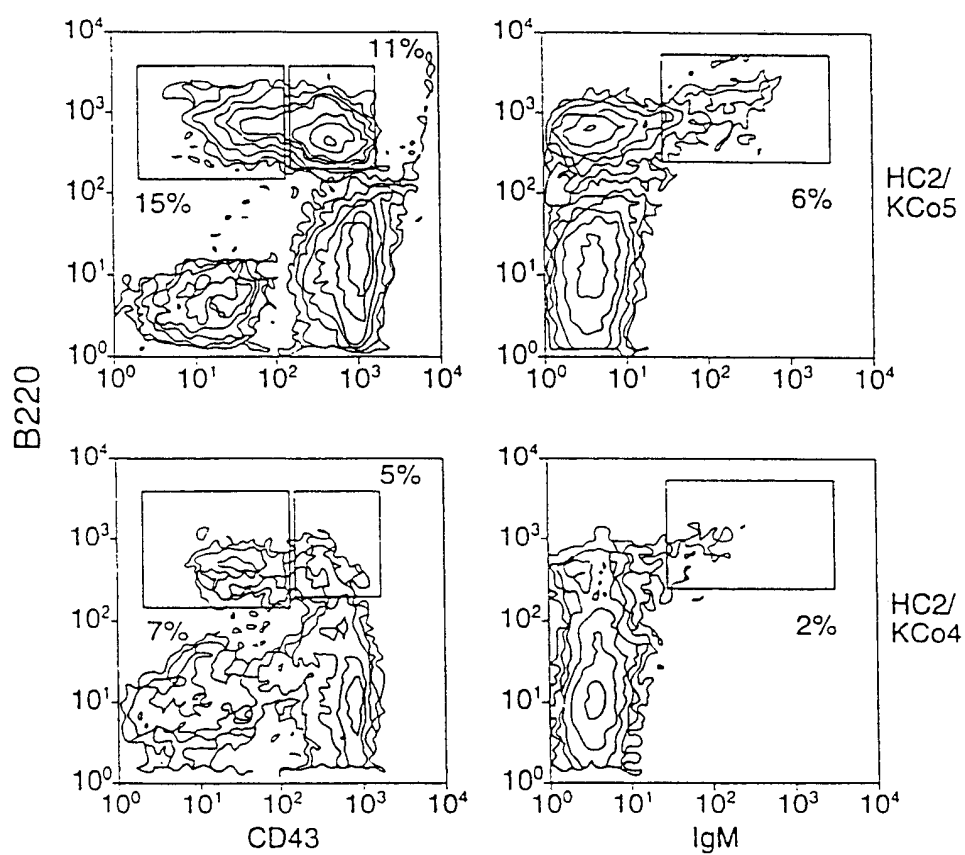


图 86

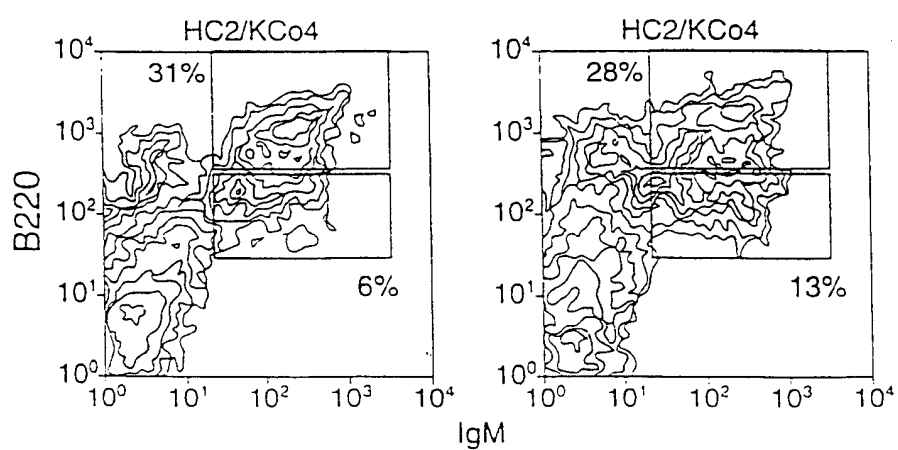


图 87

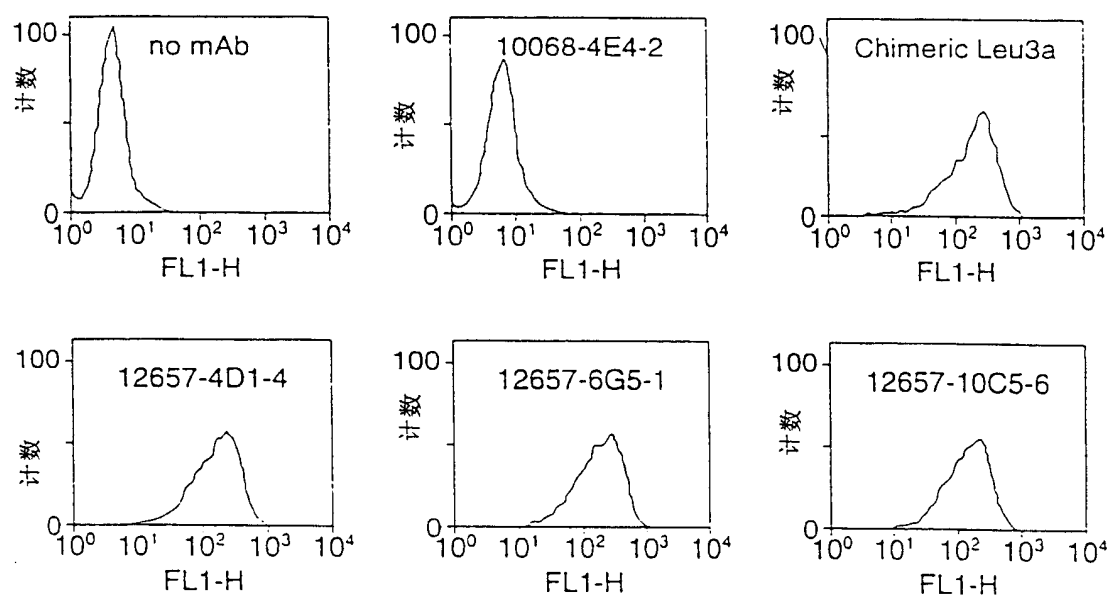


图 88

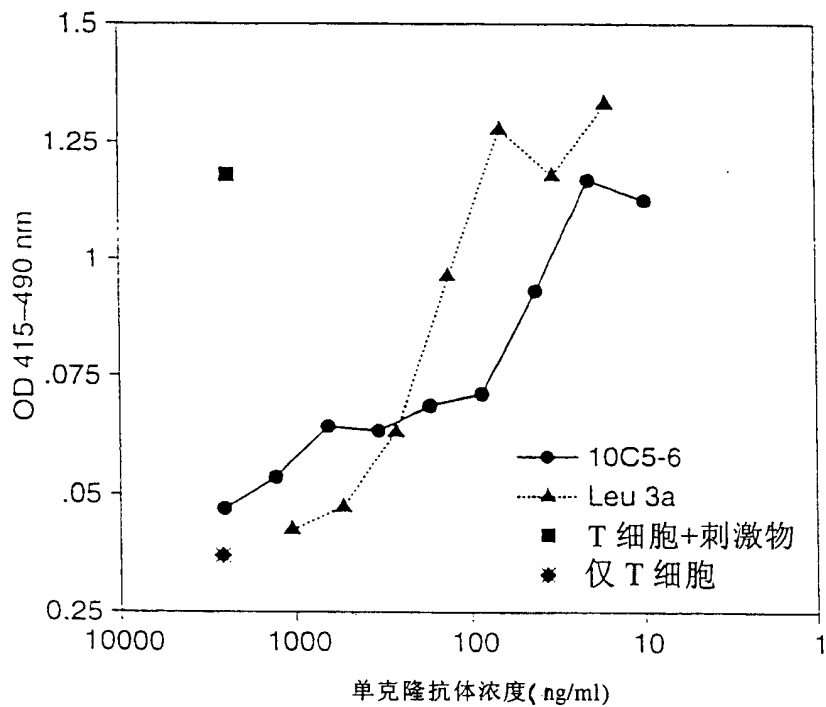


图 90

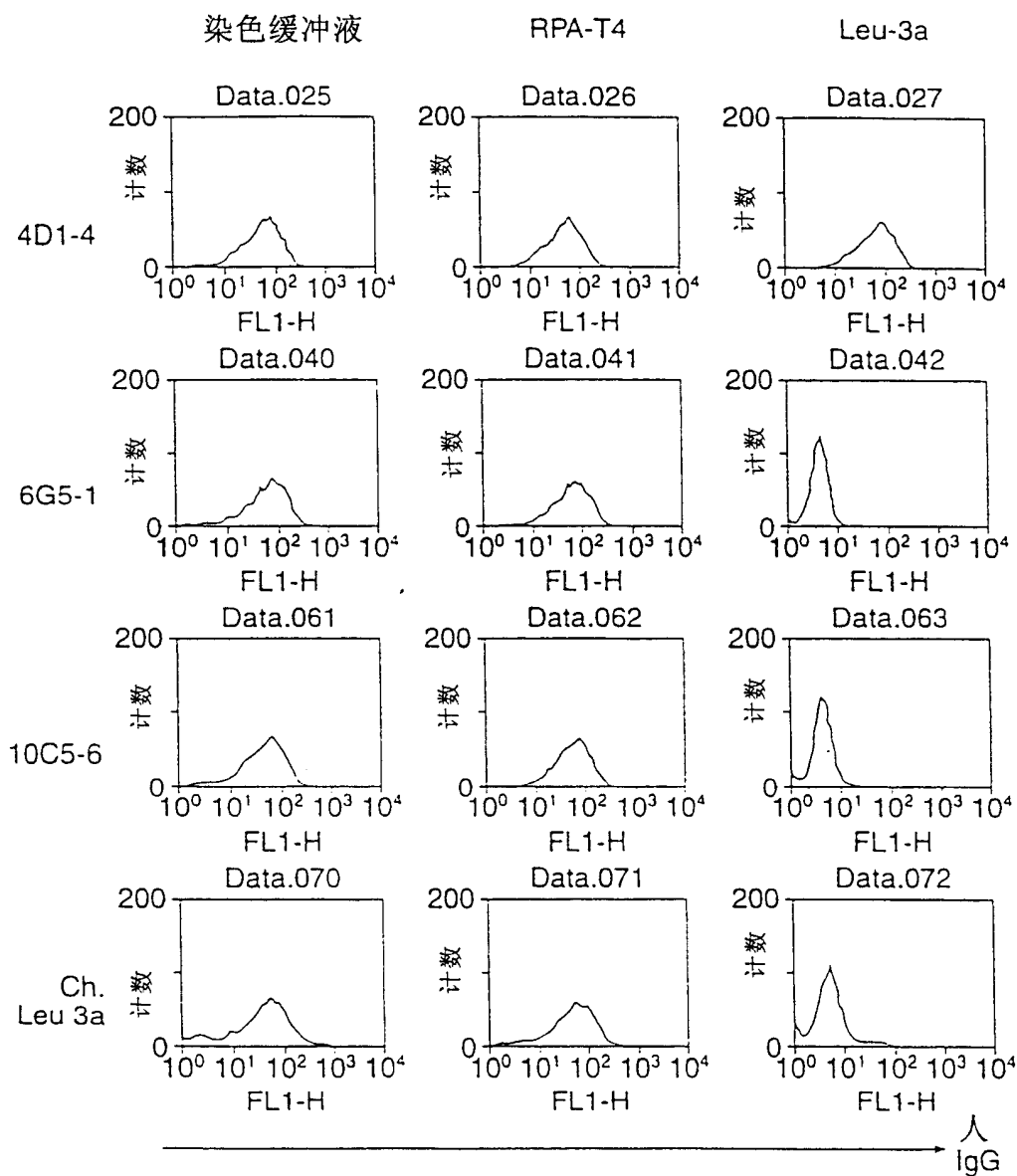


图 89