

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-501303

(P2008-501303A)

(43) 公表日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 H O 4 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-536126 (P2006-536126)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月21日 (2004.10.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年5月25日 (2006.5.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2004/002701
 (87) 国際公開番号 W02005/047333
 (87) 国際公開日 平成17年5月26日 (2005.5.26)
 (31) 優先権主張番号 0312502
 (32) 優先日 平成15年10月24日 (2003.10.24)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 502205846
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィク
 フランス国 エフー75016 パリ リ
 ユ ミシエール-アンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クラスAヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域についての非ヒトトランスジェニック哺乳動物及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むクラスAヒト免疫グロブリンのC 遺伝子を含むトランスジーン全体の全体又は一部分でスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座を有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物、及びヒト化クラスIgA抗体の作製のためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC 遺伝子からなるトランスジーンの全体又は一部分でスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座を含むことを特徴とする非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 2】

前記改変されたIgH遺伝子座についてホモ接合であることを特徴とする請求項1に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 3】

前記IgH遺伝子座が、スイッチ配列S μ をC 遺伝子全体で置き換えることにより改変されたことを特徴とする請求項1又は2に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 4】

前記IgH遺伝子座が、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを含むC 遺伝子のセグメントでスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたことを特徴とする請求項1又は2に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 5】

前記C 遺伝子がC 1であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 6】

ヒト免疫グロブリン軽鎖をコードする別のトランスジーンを含むことを特徴とする請求項1~5のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 7】

前記軽鎖がカッパ鎖であることを特徴とする請求項6に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 8】

前記トランスジーンが、上流にイントロンアクチベータE μ と下流にパンドロームhs3a/hs1,2/hs3bとを含むことを特徴とする請求項7に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 9】

前記トランスジーンが、ヒト免疫グロブリン重鎖のプロモーターの制御下にあることを特徴とする請求項8に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 10】

前記トランスジーンについて二接合であることを特徴とする請求項6~9のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 11】

不活性化されたカッパ鎖の内在性遺伝子座を有することを特徴とする請求項6~10のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 12】

不活性化されたカッパ鎖の前記内在性遺伝子座についてホモ接合であることを特徴とする請求項11に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 13】

不活性化されたJ鎖をコードする遺伝子を有することを特徴とする請求項1~12のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 14】

不活性化されたJ鎖をコードする前記遺伝子についてホモ接合であることを特徴とする請求項13に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 15】

ヒト免疫グロブリンJ鎖をコードする別のトランスジーンを含むことを特徴とする請求項13又は14に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

トランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項1~15のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 17】

- ヒトクラスA免疫グロブリンのC₁遺伝子全体でスイッチ配列S_μを置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座と、
- ヒト重鎖のプロモータ(pVH)の転写制御下でのJ₅遺伝子で再配列されたV_{H1}遺伝子、J₁-C₁イントロン及びC₁遺伝子と、上流にイントロンアクチベータE_μと下流にパリンドロームhs3a/hs1,2/hs3bとを含む完全V_H遺伝子とを含むことを特徴とする請求項16に記載のトランスジェニックマウス。

10

【請求項 18】

S_μ配列に接する非ヒト哺乳動物からのIgH遺伝子座の配列の断片で挟まれた、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC₁遺伝子又は該遺伝子のセグメントを含むことを特徴とする相同的組換えターゲティングベクター。

【請求項 19】

前記C₁遺伝子又は該遺伝子のセグメントに接する適切な選択マーカーの発現のためのカセットを含むことを特徴とする請求項18に記載のターゲティングベクター。

【請求項 20】

前記発現カセットが、部位特異的組換え配列で挟まれていることを特徴とする請求項19に記載のターゲティングベクター。

20

【請求項 21】

前記配列が、CreリコンビナーゼのLoxP配列であることを特徴とする請求項19に記載のターゲティングベクター。

【請求項 22】

S_μ配列に接する前記配列の断片がマウス起源であることを特徴とする請求項18~21のいずれか1つに記載のターゲティングベクター。

【請求項 23】

C₁遺伝子又は該遺伝子のセグメントが、5'及び3'でそれぞれ、マウス染色体12 (EMBL/Genbankデータベースでアクセッション番号AC073553)の配列の位置131281~136441及び140101~145032に相当する断片で挟まれていることを特徴とする請求項22に記載のターゲティングベクター。

30

【請求項 24】

請求項18~23のいずれか1つに記載のターゲティングベクターで改変された非ヒト哺乳動物の胚細胞。

【請求項 25】

請求項1~16のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物又は請求項17に記載のトランスジェニックマウスの、ヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片の作製のための使用。

【請求項 26】

少なくとも次の工程：
- 請求項1~16のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物又は請求項17に記載のトランスジェニックマウスの免疫化、及び
- 予め犠牲にした前記非ヒトトランスジェニック哺乳動物の血清、分泌物又はBリンパ球からのヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片のいずれの適切な手段による作製を含むことを特徴とする、ヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片を作製する方法。

40

【請求項 27】

定常ドメインがヒト起源であるキメラ重鎖と可変ドメインがV_{H1}-J₅によりコードされるヒト軽鎖とを含むことを特徴とする、請求項26に記載の方法により得ることができるヒト化クラスIgA抗体。

50

【請求項28】

前記重鎖及び軽鎖の断片を含むことを特徴とする請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体の断片。

【請求項29】

Fab、Fab'2及びFc断片からなる群より選択されることを特徴とする請求項28に記載のヒト化クラスIgA抗体の断片。

【請求項30】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする医薬。

【請求項31】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする診断試薬。

【請求項32】

抗原との組み合わせで少なくとも1つの請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする免疫原性組成物又はワクチン組成物。

【請求項33】

いずれの適切な手段により有効成分と組み合わせた少なくとも1つの請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項34】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片の、感染症及び癌の予防及び治療を意図する医薬の製造のための使用。

【請求項35】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片の、感染症及び癌の診断を意図する試薬の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クラスAヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域についての非ヒトトランスジェニック哺乳動物及びヒト化クラスIgA抗体の作製のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

クラスA免疫グロブリン(IgA)は、ヒトにおいて、イソタイプカッパ()又はラムダ()の2種の同一の軽鎖とジスルフィドブリッジを介して結合しているイソタイプ 1 (サブクラスIgA1)又は 2 (サブクラスIgA2)の2種の同一の重鎖を含む。

【0003】

このクラスの免疫グロブリンに特異的な重鎖は、膜型及び分泌型で存在する。分泌型は、約110アミノ酸の4つのドメイン：可変ドメインVH及び3つの定常ドメインCH1、CH2及びCH3と、CH2とCH3の間のヒンジ(H)領域と、C-末端のオクタペプチドとを含む。このオクタペプチドの後ろから2番目のシステインは、2つのIgA重鎖を連結して二量体IgAをつくるJ鎖(又は結合部分(joining piece))と共有結合をつくることができる。膜型は、膜にタンパク質をつなぐことを可能にする疎水性ドメインと細胞質内ドメインとをさらに含む。C-末端オクタペプチド(分泌型)又は疎水性の細胞質内ドメイン(膜型)のいずれかと結合するCH1、CH2、H及びCH3ドメインに相当する重鎖の領域は、定常領域とよばれる。これに対して、可変ドメインVHに相当する領域は可変領域とよばれる。

【0004】

免疫グロブリンの全てのクラス及びサブクラスに共通である 及び の軽鎖は、2つのドメイン：可変ドメイン(VL)及び定常ドメイン(CL)を含む。ヒトでは 及び 鎖の発現は等しいが、マウスでは 遺伝子座の発現が非常に低く、軽鎖の95%が 型である。CLドメ

10

20

30

40

50

インに相当する軽鎖の領域は定常領域とよばれるが、これに対して可変ドメインVLに相当する領域は可変領域とよばれる。

【0005】

免疫グロブリン遺伝子は遺伝子座に編成され、ひとつの遺伝子座は重鎖のため(IgH遺伝子座)であり、一つの遺伝子座はそれぞれの軽鎖のため(ラムダ遺伝子座及びカッパ遺伝子座)である。

【0006】

軽鎖のための遺伝子座のそれぞれは、可変ドメインをコードするV及びJ遺伝子と定常ドメインをコードするC遺伝子とを含む。Bリンパ球の分化の間に、V遺伝子はJ遺伝子及びC遺伝子と再配列され、V領域はさらに体細胞変異に付され、これらのことにより抗原に対する高い親和性を有する抗体を産生することが可能になる。

10

【0007】

重鎖の遺伝子座は、可変ドメインをコードするV、D及びJ遺伝子と、免疫グロブリンの異なるクラスのイソタイプの定常ドメインをコードするC(C μ 、C δ 、C γ 、C α 及びC ϵ)遺伝子とを含む。C μ 以外の各C遺伝子に先行して、スイッチ(S)配列がある。C μ (ヒトでのC μ 1及びC μ 2)遺伝子は、定常ドメインCH1、CH2及びCH3をコードするエキソンと膜(mb)エキソンを分離しているイントロンを有する。ヒンジ領域をコードする配列は、エキソンCH2に含まれる。Bリンパ球の分化の間に、V遺伝子はD遺伝子及びJ遺伝子と再配列され、V領域は体細胞変異にも付され、これらのことにより抗原に対する高い親和性を有する抗体を産生することが可能になる。さらに、抗原に対する一次応答は主にIgMからなるが、二次応答はクラススイッチ機構に関係し、この機構の間にC μ の上流に位置するスイッチ配列S μ が別のスイッチ配列と組換えを起こし、別のクラスの免疫グロブリン(IgG、IgE又はIgA)の産生を導く。

20

【0008】

抗原による刺激に応答して産生される抗体の多様性は、いくつかの機構の組み合わせに起因する。V遺伝子の多重性(multiplicity)、これらのV遺伝子の体細胞変異、V遺伝子の体細胞組換え及びスイッチ配列の体細胞組換えである。

【0009】

IgAは、体内で2つの異なる形で存在する。血清IgA及び分泌IgA(s-IgA)である。

血清IgAは、血清免疫グロブリンの15~20%に相当する。ヒト血清IgAの80%より多くが一量体形であるが、他の哺乳類のほとんどの種においては本質的に二量体形である。

30

【0010】

分泌IgAは、分泌物(眼、唾液、乳房、気管気管支及び尿生殖器の分泌物)中の主要な免疫グロブリンを構成し、ここで分泌IgAは他のタンパク質、分泌成分(secretory component)と結合したIgA二量体の形で存在する。この分泌成分はおそらくIgA二量体のまわりに巻きつき、各IgA単量体のCH2ドメインにジスルフィドブリッジにより結合している。J鎖とは違って、分泌部分(secretory piece)は形質細胞ではなく上皮細胞により合成される。上皮形質細胞により分泌された二量体IgAは、上皮細胞の基底極(basal pole)に存在するポリ-Ig受容体に結合する。次いで、s-IgA/受容体複合体は、エンドサイトーシスされ、細胞内を輸送されるが、輸送小胞の膜に結合したままである。輸送小胞は、管腔表面で原形質膜と融合し、受容体の開裂に起因して、分泌部分と結合した二量体IgAを放出する。よって、分泌部分は、分泌物中のIgAの輸送を促進し、タンパク質分解からそれらを保護する。

40

【0011】

粘膜の上皮を横断し、病原体、例えばウイルス、細菌、寄生体及びトキシンの侵入を防ぐその能力のために、IgAは局所免疫：眼、呼吸、消化及び尿生殖器の免疫において主要な役割を演じる。IgAの作用の形態は、能動機構(補体活性、Fc受容体への結合)及び受動機構(病原体(ウイルス)に対する受容体のブロック及び細菌の運動性の阻害)を含む。特異的IgA応答と感染に対する防御との間の密接な関係は、特にウイルス(ロタウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、サイトメガロウイルス、呼吸系発疹ウイルス、エ

50

プスタイン - バーウイルス)について示されている。多数のヒト病原体(HIV、インフルエンザウイルス、細菌、トキシン、寄生体)に指向されたクラスIgA保護抗体が単離されている。

【0012】

この特別の性質のために、IgAは、感染症及び癌の診断及び治療に特定の用途を有する。IgAは、病原体を中和する受動免疫療法(血清療法)に用いることができるであろう。これらは、腫瘍抗原又は粘膜中の病原性微生物の抗原を標的するベクターとして能動免疫療法(ワクチン接種)にも用いることができ、これらの抗原に対する局所免疫を誘導することができるであろう。さらにこれらは、患者から得られたIgA(抗トランスグルタミナーゼ、抗筋肉膜(antiendomysium)又は抗グリアジンIgA)(これらにより、技術者がヒト病原体(ウイルス、プリオン)の感染の危険に曝される)の代替物として、セリアック病のような疾患の診断用の有用で信頼性が高く安全で安定でかつ明確な試薬である。

【0013】

しかし、これらの用途の開発は、組換えヒトクラスIgA抗体又はヒト化クラスIgA抗体を作製する効果的な方法がないことから、制限されている。

「ヒト化抗体」の表現は、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の定常ドメインと非ヒト哺乳動物からの抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインとの融合により非ヒト哺乳動物に由来する抗体を意味すると理解される。

【0014】

実際に、現在利用できる組換えヒト抗体又はヒト化抗体の製造方法は、以下の問題点を有する。

* インビトロ法は、1又はそれより多い組換えベクターからの抗体の重鎖及び軽鎖とJ鎖と任意に分泌部分との同時発現(simultaneous expression)に基づく。重鎖及び軽鎖は、重鎖の定常ドメインであるCH1、CH2及びCH3とそれぞれ融合された興味対象のヒト又はマウスのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(VH及びVL)、並びにヒト軽鎖のC又はCを含むか、又はVH及びVLドメインがC-末端オクタペプチドを含むCH3ドメインと融合されている(国際出願PCT WO 98/30577及びPCT WO 99/54484)。例えば、国際出願PCT WO 98/30577は、1又はそれより多い組換えバキュロウイルスを用いて、J鎖により結合されたC-末端オクタペプチドを含むCH3ドメインとそれぞれ融合されたマウス又はヒトのモノクローナル抗体のVH及びVLドメインを含む組換えヒト二量体ミニ-IgA(IgA-J)をインビトロで製造することを記載している。クラスIgG1中和ヒトモノクローナル抗体(S1-1抗体)から得られた、HIV gp120を指向する組換えミニIgA一つだけが記載されている

【0015】

IgAに特異的なこれらの方法は、マウス抗体及びいくつかの希少なヒト抗体に限定されており、これらに対するハイブリドーマは単離されている。

【0016】

* インビボ法は、
 - その胚形態における完全IgH遺伝子座及びカッパ軽鎖内の遺伝子座(PCT出願WO 02/059154、Mendez et al., Nature Genetics, 1997, 15, 146-156; Green and Jakobovits, J. Exp. Med., 1998, 188, 483-495及び米国特許出願US No. 08/759,620)、
 - 1又はそれより多いVH、DH及びJH遺伝子、C μ 遺伝子及び定常領域、好ましくはC領域のための第二遺伝子を含むミニ-IgH遺伝子座とカッパ軽鎖の遺伝子座(PCT出願WO 02/059154、米国特許US 5,545,807)、並びに
 - 完全IgH遺伝子座とその胚形態でのラムダ鎖の遺伝子座(米国特許出願US No. 09/734,613)からなるトランスジーンを有する遺伝改変マウスからのヒトモノクローナル免疫グロブリンの作製に基づく。該マウスは、内在性カッパ遺伝子座について任意に遺伝的に不能であり(-/-マウス)、内在性IgH遺伝子座を不活性化する変異を任意に有する(μ MT -/-変異)。

【0017】

これらの方法により、ヒトクラスIgA免疫グロブリンを大量に作製することはできない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

驚くべきことに、本発明者らは、ヒト化クラスIgA免疫グロブリンを大量に産生する(マウスにおいてリットルあたりのグラムの範囲で)トランスジェニックマウス系統を構築した。これらの動物により産生される抗体は、主にヒト化IgAであり、IgMを含有せず、他のクラスの免疫グロブリン(IgG及びIgE)の少量のみを含む。

【課題を解決するための手段】

【0019】

よって、本発明の主題は、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC₁遺伝子からなるトランスジーン全体又は一部分でスイッチ配列S_μを置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座を含むことを特徴とする非ヒトトランスジェニック哺乳動物である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

したがって、本発明によると、スイッチ配列S_μの位置に挿入される、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むC₁トランスジーン又はこのトランスジーンの一部は、5'でイントロンアクチベータE_μと3'でC_μ遺伝子との間に位置する(図1)。

【0021】

この構築物において、スイッチ配列S_μの配列の位置へのC₁トランスジーン挿入に係るスイッチ配列S_μの抑制は、重鎖IgMの合成に必要な内在性μ遺伝子の発現を破壊する。さらに、免疫グロブリン重鎖についての他の遺伝子の発現は大きく低減される。なぜなら、内在性IgH遺伝子座上のC_μの下流に位置する免疫グロブリン定常遺伝子に対するクラススイッチをブロックするからである。よって、得られるトランスジェニック動物は、重鎖の定常ドメインがヒト化されかつ可変ドメインがマウス起源であるキメラIgAを大量に産生する。

【0022】

ヒトトランスジェニック重鎖は、完全に多様化したレパートリーから恩恵を受ける。なぜなら、それはマウスIgH遺伝子座のVH、D及びJHセグメントの再配列により生じた典型的な(normal)レパートリーに対応するからである。さらに、トランスジェニック動物は、抗原に対する二次応答として高い親和性を有する抗体を産生することができる。なぜなら、それらのBリンパ球は体細胞過剰変異現象(somatic hypermutation phenomenon)を入れる(recruit)ことができるからである。

【0023】

本発明の有利な実施形態によると、上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、上記の改変されたIgH遺伝子座についてホモ接合である。

【0024】

本発明の別の有利な実施形態によると、上記のIgH遺伝子座は、対応するイントロンで分離されているCH1、CH2、CH3及びmbエキソンを含むC₁遺伝子全体でスイッチ配列S_μを置き換えることにより改変される。

本発明の別の有利な実施形態によると、上記のIgH遺伝子座は、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを含むC₁遺伝子のセグメントでスイッチ配列S_μを置き換えることにより改変される。

【0025】

本発明の別の有利な実施形態によると、上記のC₁遺伝子はC₁である。

【0026】

本発明の別の有利な実施形態によると、上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、

10

20

30

40

50

ヒト免疫グロブリン軽鎖をコードする別のトランスジーンを含む。

この実施形態の有利な特徴によると、上記の軽鎖はカップ鎖である。

好ましくは、上記のトランスジーンは、上流にイントロンアクチベータ $E\mu$ と下流にパ
リンドローム $hs3a/hs1,2/hs3b$ とを含むヒトカップ遺伝子である。Chauveauら, Gene, 199
8, 222, 279~285に記載されるこれらの配列は、B細胞でヒトカップ鎖の高発現を得るこ
ととヒトカップトランスジーンの体細胞過剰変異を誘導することとを可能にする。好まし
くは、該トランスジーンは、ヒト重鎖のプロモータ(pVH)の制御下にある。

【0027】

この実施形態の別の有利な特徴によると、上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物は
、上記のトランスジーンについて二接合(dizygous)である。

10

【0028】

本発明の上記の実施形態の有利な特徴によると、ヒトカップ軽鎖をコードする別のト
ランスジーンを含む上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、特に相同的組み換えによ
り不活性化(欠失又は変異)された免疫グロブリンカップ軽鎖の内在性遺伝子座を有する。
好ましくは、該非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、上記の不活性化についてホモ接合
である。好ましくは、これらはトランスジェニックマウスである。相同的組換えにより免
疫グロブリンカップ軽鎖の内在性遺伝子座が不活性化された非ヒトトランスジェニック哺
乳動物のうち、Zouら, EMBO J., 1993, 12, 811~820に記載されたマウス系統を特に挙げ
ることができる。

このような非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ほとんど全ての軽鎖がヒト起源であ
るヒト化IgAを産生する。

20

【0029】

本発明の上記の実施形態の別の有利な特徴によると、1重鎖と任意にヒトカップ軽鎖
とについてトランスジェニックな上記の非ヒト哺乳動物は、特に相同的組換えにより不活
性化(欠失又は変異)されたJ鎖の内在性遺伝子座を有する。好ましくは、該非ヒトト
ランスジェニック哺乳動物は、該不活性化についてホモ接合である。好ましくは、これらはヒ
トJ鎖をコードする別のトランスジーンを含む。より好ましくは、これらはトランスジェ
ニックマウスである。このような非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、IgAの産生とIgA
と結合するタンパク質であるJ鎖との両方についてヒト化される。

【0030】

本発明は、いずれの哺乳動物種から得られるトランスジェニック動物をも包含する。

30

【0031】

本発明の別の有利な実施形態によると、上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、
トランスジェニックマウスである。

【0032】

本発明は、「モノクローナル免疫グロブリンAからなるヒト化抗体」(Humanized Antibo
dies Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A)としてHAMIGA系統とよばれる二重ト
ランスジェニックマウス系統(double-transgenic mouse line)を特に含む。この系統は、
- ヒトクラスA免疫グロブリンのC₁遺伝子でスイッチ配列 $S\mu$ を置き換えることにより改
変されたIgH遺伝子座と、
- ヒト重鎖のプロモータ(pVH)の転写制御下でのJ₅遺伝子で再配列されたV_{H1}遺伝子、J
₅-C₁イントロン及びC₁遺伝子と、上流にイントロンアクチベータ $E\mu$ と下流にパ
リンドローム $hs3a/hs1,2/hs3b$ とを含む完全V_H遺伝子
とを含む。

40

【0033】

この二重トランスジェニック系統の動物は、重鎖については部分的にヒト化されかつ軽
鎖については完全にヒト化されたIgAを産生する。

実際に、この系統でのトランスジェニックカップ鎖の発現は、対立遺伝子排除を引き起
こすこと、すなわち、ほとんどのトランスジェニックB細胞において、マウス免疫グロ
ブリン軽鎖についての内因性遺伝子の発現を阻害することができる。

50

【0034】

このマウス系統の抗原に应答するレパートリーは、それが主に抗体部位の形成に寄与する重鎖のVHドメインである場合に、典型的である。今回、ヒトトランスジェニック重鎖は、完全に多様化したレパートリーから恩恵を受ける。なぜなら、上述したように、これはマウスIgH遺伝子座のVH、D及びJHセグメントの再配列により生じる典型的なレパートリーに対応するからである。

【0035】

さらに、このトランスジェニック系統のマウスは、抗原に対する二次応答として、高親和性を有する抗体を産生することができる。なぜなら、それらのBリンパ球は体細胞過剰変異現象を、重鎖についての遺伝子のレベル及びカッパ軽鎖についてのトランスジーンの両方に入れることができるからである。

10

【0036】

本発明によるトランスジェニック動物は、Transgenic Mouse: Methods and Protocols; Methods in Molecular Biology, Clifton, N.J., Volume 209, October 2002, Marten H. Hofker, Jan Van Deursen, Marten H. Hofker及びJan Van Deursen編, Holly T. Sklar: Humana Pressに記載されるような標準的なプロトコルに従って、動物トランスジェネシスの通常の方法により得られる。

【0037】

本発明によるトランスジェニック動物の構築に役立つ免疫グロブリンのヒト及びマウスの遺伝子の配列は、既知であり、データベースでアクセス可能である。例えば、ヒトC 1 1 20 遺伝子のCH1、CH2及びCH3エキソンの配列及び膜エキソンの配列は、Genbank/EMBLデータベースのアクセッション番号J00220及びM60326にそれぞれ相当する。

20

【0038】

V 1 遺伝子の構築は、Chauveauら, Gene, 1998, 222, 279~285に記載されたとおりである。J 5 1 5 遺伝子及びC 1 1 5 遺伝子で再配列されたV 1 1 5 遺伝子の配列は、EMBL/Genbankデータベースでアクセッション番号X64133を有する配列に相当し、これはEMBLデータベースでアクセッション番号CAA45494に相当する配列を有するヒト軽鎖をコードする。

【0039】

非ヒト哺乳動物のゲノムへの遺伝子断片の挿入は、ランダム様式で行なわれてよく、好ましくは、CreリコンビナーゼのLoxP部位のような部位特異的リコンビナーゼの組換え配列を任意に含んでもよい適切なターゲティングベクターを用いる相同的組換えによる標的された様式で行なわれる。非ヒト哺乳動物のゲノムの遺伝子断片の不活性化又は欠失は、リコンビナーゼのLoxP部位のような部位特異的リコンビナーゼの組換え配列を任意に含んでもよい適切なターゲティングベクターを用いる相同的組換えにより行なわれる。二重トランスジェニック動物は、上記のように、アルファ重鎖についてトランスジェニックな動物を、軽鎖についてトランスジェニックな動物と交差させることにより得られる。二重トランスジェニック動物は、免疫グロブリンカッパ軽鎖の内在性遺伝子座が相同的組換えにより不活性化されたトランスジェニック動物及び/又は上記のように、免疫グロブリンJ鎖の内在性遺伝子座が不活性化されかつヒトJトランスジーンをさらに有する動物と任意に交差させてもよい。

30

40

【0040】

本発明の主題は、S μ 配列に接する非ヒト哺乳動物からのIgH遺伝子座配列の断片で挟まれた、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC 1 1 20 遺伝子又はこの遺伝子のセグメントを含むことを特徴とする相同的組換えターゲティングベクターでもある。

【0041】

上記のターゲティングベクターの有利な実施形態によると、これは、上記のように、該C 1 1 20 遺伝子又は該遺伝子のセグメントに接する(adjacent to)適切な選択マーカを発現するためのカセットを含む。

この実施形態の有利な特徴によると、該発現カセットは、部位特異的組換え配列で挟ま

50

れる。好ましくは、該配列はCreリコンビナーゼのLoxP配列である。この特徴は、該発現カセットを切り出すことを任意に可能にする。

【0042】

上記のターゲティングベクターの別の実施形態によると、S μ 配列に接する配列の上記の断片は、マウス起源である。

【0043】

上記のターゲティングベクターの別の実施形態によると、C 遺伝子又は該遺伝子のセグメントは、5'でJH/E μ 領域に相当する約5 kbの断片及び3'でC μ 領域に相当する約5 kbの断片に挟まれており、これらの断片は、マウス染色体12の配列(EMBL/Genbank データベースでアクセッション番号AC073553)における位置131281~136441及び140101~145032にそれぞれ対応する。

10

【0044】

本発明の主題は、上記で規定されるターゲティングベクターで改変された非ヒト哺乳動物の胚細胞でもある。

該改変された胚細胞(全能性幹細胞)は、上記で規定するようなトランスジェニック哺乳動物の作製に有用である。これらは、通常の動物トランスジェネシス技術に従って哺乳動物の胚盤胞に注入される。

【0045】

本発明の主題は、上記で規定される非ヒトトランスジェニック哺乳動物の、ヒト化クラスIgA抗体又はこれらの抗体の断片の産生のための使用でもある。

20

【0046】

本発明の主題は、少なくとも次の工程：

- 上記で規定される非ヒトトランスジェニック動物の、興味対象の抗原での免疫化、
- 予め犠牲にした上記の非ヒトトランスジェニック哺乳動物の血清、分泌物又はBリンパ球からのヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片のいずれの適切な手段による作製を含むことを特徴とする、ヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片を作製する方法でもある。

【0047】

本発明による非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、直ちにヒト化クラスIgAキメラ抗体であるクラスIgAモノクローナル抗体の産生を可能にするという利点を有する。本発明によるヒト化クラスIgAモノクローナル抗体の作製方法は、該抗体についての遺伝子のクローニング及び該抗体の可変ドメインのヒト免疫グロブリンの定常ドメインとの融合の付加的な工程を必要としないので、従来技術の方法よりもより単純でより迅速でより経済的である。

30

【0048】

本発明は、単量体又は二量体のIgA及びs-IgAからなるポリクローナル又はモノクローナル抗体及びそれらの断片、特にFab、Fab'2及びFc断片の作製を含む。

上記で規定するようなヒト化クラスIgA抗体及びそれらの断片は、当業者に知られた通常の技術、例えばAntibodies: A Laboratory Manual, E. Howell and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されたものにより作製される。

40

【0049】

より具体的には：

- ポリクローナル抗体は、上記で規定する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を、KLH若しくはアルブミンと結合させたか及び/又はフロイントの(完全又は不完全)アジュバント若しくは水酸化アルミニウムのような適切なアジュバントと任意に組み合わせていてもよい興味対象の抗原で免疫することにより作製される。十分な抗体力価が得られた後に、免疫した動物から血清を採取することにより抗体を回収し、通常の方法に従って沈殿によりIgAを濃縮し、次いで特異的IgAを、上記で規定するように抗原が結合している適切なカラムでのアフィニティクロマトグラフィにより任意に精製して単一特異性IgA調製物を得る。

50

【0050】

- モノクローナル抗体は、Kohler及びMilsteinの方法(Nature, 1975, 256, 495~497)に従って、上記で規定する非ヒトトランスジェニック哺乳動物からのBリンパ球のミエローマとの融合により得られるハイブリドーマから産生される。ハイブリドーマは、インピトロで特に発酵槽で培養されるか、又はインピボで腹水の形で産生される。あるいは、上記のモノクローナル抗体は、米国特許US 4,816,567号に記載されるような遺伝子工学により産生される。例えば、上記で規定する非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、フロイントの完全アジュバントの等容量中の抗原の腹腔内注入による第一の免疫化、次いで同じ条件であるがこの回はフロイントの不完全アジュバントを用いる15日後の第二の免疫化(ブースター)を含む標準的プロトコルに従って、選択された抗原(細菌、ウイルス又は真菌の抗原、癌胚抗原などのような腫瘍特異的抗原)で強くかつ繰返し免疫される。モノクローナル抗体は、最後のブースターから2週間後に動物を犠牲にし、脾臓を回収し、脾リンパ球を懸濁し、これらのリンパ球をSP2/0細胞系統(このマウス系統は、いずれのマウス抗体も産生せず、不死化されかつ免疫グロブリンの分泌に必要な完全な分泌機構を有する)と融合させることを含む標準的なプロトコルに従って作製される。

10

【0051】

- 抗体断片は、ハイブリドーマの又は本発明による免疫された非ヒトトランスジェニック哺乳動物の脾リンパ球のmRNAからのクローニングされたVH及びVL領域から産生される。例えば、Fv及びFab断片は、Winter及びMilsteinの方法(Nature, 1991, 349, 293~299)に従って、繊維状ファージの表面で発現される。いくつかの選択工程の後に、抗原に特異的な抗体断片は、組換えDNAのクローニング及び発現のための通常の方法により、適切な発現系で単離され発現される。

20

【0052】

上記で規定する抗体又はその断片は、アフィニティクロマトグラフィのような当業者に知られた通常の方法により精製される。

【0053】

本発明の主題は、定常ドメインがヒト起源であるキメラ重鎖と可変ドメインがV_H 1-J_H 5によりコードされるヒト軽鎖とを含むことを特徴とする、上記で規定する方法により得ることができるヒト化クラスIgA抗体でもある。

【0054】

本発明は、特に、抗原の存在下でのBリンパ球の活性化後に、軽鎖が、EMBL/Genbankの配列X64133又はこの配列の過剰変異により得られる配列を有するV_H 1-J_H 5遺伝子によりコードされるヒト化クラスIgA抗体を含む。

30

【0055】

本発明の主題は、上記で規定する重鎖及び軽鎖の断片を含むことを特徴とする、上記で規定される方法により得ることができるヒト化クラスIgA抗体の断片でもある。

本発明は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及びそれらの断片(Fab、Fc、Fab²)を含む。

【0056】

上記で規定する本発明によるヒト化抗体及びその断片は、これらの抗体の重鎖の定常領域と軽鎖全体とがヒト起源である場合は、ヒトにおいてよく許容され(well tolerated) (種間免疫化によるアレルギー反応の危険性が最小限である)かつヒトにおいて半減期が延長される。

40

【0057】

本発明の主題は、上記で規定するヒト化クラスIgA抗体またはこの抗体の断片を含む医薬でもある。このような抗体又はその断片は、感染症又は癌の予防及び治療のための受動免疫療法(血清療法)において特に用いられる。

【0058】

本発明の主題は、上記で規定する少なくとも1つのヒト化クラスIgA抗体及びこの抗体の断片を、抗原と組み合わせて、好ましくは該抗原を指向するヒト化クラスIgA抗体又はこ

50

の抗体の断片を含む抗原-抗体複合体の形で含むことを特徴とする免疫原性組成物又はワクチン組成物でもある。このような組成物は、抗原を粘膜の上皮に標的させることかつそれをタンパク質分解から保護することの両方を可能にする。

【0059】

本発明の主題は、いずれの適切な手段により有効成分と組み合わせた上記で規定する少なくとも1つのヒト化クラスIgA抗体又はこの抗体の断片を含むことを特徴とする医薬組成物でもある。このような組成物は、有効成分を粘膜の上皮に標的させることとそれをタンパク質分解から保護することの両方を可能にする。

【0060】

本発明による組成物の有利な実施形態によると、該組成物は、少なくとも1種の医薬的に許容される賦形剤(vehicle)と任意に担体物質及び/又はアジュバントとをさらに含む

10

。医薬的に許容される賦形剤、担体物質及びアジュバントは、通常用いられるものである。

【0061】

アジュバントは、油性エマルション、サポニン、無機物質、細菌抽出物、水酸化アルミニウム及びスクアレンからなる群より好適に選択される。

担体物質は、単一膜リポソーム、多重膜リポソーム、サポニンのミセル又は糖若しくは金含有の種類固形マイクロスフェアからなる群より好適に選択される。

【0062】

本発明による組成物は、全身経路(経口、筋肉内、皮下、腹腔内又は静脈内)又は局所経路(眼、鼻、膺、直腸)により投与される。投与の用量及び割合(rate)は、種(ヒト又は動物)及び処置される疾患により変動する。

20

【0063】

本発明の主題は、上記で規定するヒト化クラスIgA抗体又はこの抗体の断片を含む診断試薬でもある。

【0064】

本発明の主題は、上記で規定するヒト化クラスIgA抗体又はこの抗体の断片の、感染症及び癌の予防及び治療を意図する医薬の製造のための使用でもある。

【0065】

本発明の主題は、上記で規定するヒト化クラスIgA抗体又はこの抗体の断片の、感染症及び癌の診断を意図する試薬の製造のための使用でもある。

30

【0066】

上記の特徴に加えて、本発明は、本発明による非ヒトトランスジェニック哺乳動物の作製及び使用の実施例、並びに添付の図面に言及する以下の記載から明らかになるその他の特徴をも含む。添付の図において、

- 図1は、マウスIgH遺伝子座とp-アルファ1KIとよばれるターゲティングベクターとの間の相同的組換えにより得られる改変されたIgH遺伝子座の構造を示す。該改変された遺伝子座は、上流でJH-E μ 領域に相当する約5 kbの断片(DQ 52/JH断片)及び下流でC μ 遺伝子に相当する約5 kbの別の断片(C μ 断片)により挟まれた、定常ドメインCH1、CH2及びCH3をコードする3つのエキソンと膜(mb)エキソンとを含むヒトアルファ1遺伝子の5.5 kbの断片と、LoxP部位が境界をなすneoカセット(1.6 kb断片)とを含む。

40

【0067】

- 図2は、p-アルファ1KIとよばれるターゲティングベクターの詳細な構造を示す。該ベクターは、上流でJH-E μ 領域に相当する約5 kbの断片(DQ 52/JH断片)及び下流でC μ 遺伝子に相当する約5 kbの別の断片(C μ 断片)により挟まれた、定常ドメインCH1、CH2及びCH3をコードする3つのエキソンと膜(mb)エキソンとを含むヒト 1遺伝子の5.5 kbの断片と、LoxP部位が境界をなすneoカセット(1.6 kb断片)とを含む。

【0068】

- 図3は、XhoIでの酵素制限によるターゲティングベクターp-アルファ1KIの配列の確認を

50

示す。 H3：分子量マーカー。 レーン3及び4：正しい方向に挿入されたneoカセットを含むクローン；5つの断片が検出される。そのうち2つはともに泳動される(co-migrate) (5 kb及び5.3 kb)。6.4 kb (1-neoカセットのCH2+CH3断片)、5 kb (C μ 断片)、5.3 kb (JH断片+1のCH1断片)及び3.7 kb (プラスミド断片+5' DQ52断片)。 レーン5：逆方向に挿入されたneoカセットを含むクローン。4つの断片が検出される。9.5 kb (JH断片-1-neoカセットのCH2+CH3断片)、5 kb (C μ 断片)、3.7 kb (プラスミド断片+5' DQ52断片)及び2.4 kb (1のCH1断片+neoカセット)。

【0069】

- 図4は、野生型対立遺伝子と比較した組換え対立遺伝子のサザンプロットプロフィールを示す。EcoRIで消化したゲノムDNAは、遺伝子の5'に位置するプローブとハイブリダイズする。 10

【0070】

- 図5は、ターゲティングベクターp-アルファ1KIでトランスフェクションしたESクローンのゲノムDNAのサザンプロット解析を示す。EcoRIで消化したゲノムDNAは、遺伝子の5'領域に対応するプローブとハイブリダイズする。矢印は、相同的組換えによりヒト1トランスジーンに組み込まれたクローンを示す(組換え対立遺伝子に対応する7.5 kbの断片及び野生型対立遺伝子に対応する12 kbの断片)。

【0071】

- 図6は、トランスジェニック系統アルファ1KIのホモ接合の動物の末梢リンパ球表面でのヒトIgAクラスに対する膜受容体の発現のフローサイトメトリー解析を示す。x軸は、フルオレセインで標識した抗ヒト1抗体での標識を表し、y軸は、フィコエリトリンで標識した抗マウスCD19抗体での標識を表す。点線の矩形は、CD19 (B細胞)及びヒト1重鎖の両方を発現する細胞を示す。 20

【0072】

- 図7は、非トランスジェニックマウス(コントロール)と比較した、カッパRNA系統のマウスの末梢Bリンパ球表面でのヒトカッパ軽鎖の発現のフローサイトメトリー解析を示す。x軸は、フルオレセインで標識した抗ヒトカッパ抗体での標識を表し、y軸は、フィコエリトリンで標識した抗マウスカッパ抗体での標識を表す。

【0073】

- 図8は、トランスジェニックマウス系統 RNAでのヒトカッパトランスジーンの体細胞過剰変異を示す。PNAで活性化したB細胞から単離した40クローンのヒトカッパ軽鎖についての変異の分布を分析した。アミノ酸置換を生じる変異、サイレント変異及び停止コドンを生じる変異は、及び 30

【化1】



でそれぞれ示す。過剰変異の部位に相当するアミノ酸を、それらの性質及びそれらの位置により、並びにコドンでの変異の位置(括弧内にローマ数字として)により示す。

【0074】

- 図9は、オボアルブミン抗原で免疫したHAMIGA系統の二重トランスジェニックマウスでの特異的ヒトキメラIgA1抗体応答のELISA解析を示す。結果は、抗オボアルブミンIgAの任意の単位で表される。 40

【実施例】

【0075】

実施例1：キメラヒト免疫グロブリンアルファ1重鎖を発現するトランスジェニック系統アルファ1KI (alpha1 Knock-In)の作製及び特徴付け

定常ドメインCH1、CH2及びCH3をコードする3つのエキソンと膜(mb)エキソンとを含むヒト1遺伝子を、相同的組換えにより、マウス重鎖のスイッチ領域S μ (S μ)の位置に挿入して、内在性遺伝子座のC μ の下流に位置する免疫グロブリンの定常因子へのクラススイッチをブロックした(マウスIgH遺伝子座、図1)。標的領域は、IgM重鎖の合成を担う内在 50

性 μ 遺伝子の発現を廃止し、免疫グロブリン重鎖の他の遺伝子の発現を大きく減少させる。結果として、得られるトランスジェニック系統は、ヒト化定常ドメインがIgA1イソ型に対応するキメラIgAを大量に産生する。

【0076】

1) 相同的組換えターゲティングベクターの構築

プラスミド構築物は、プラスミドbluescript SK (pSK) (STRATAGENE)及び細菌株E.coli TG1(STRATAGENE)から、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc, Library of Congress, USA)に記載されるようなDNAの調製、クローニング及び分析の通常のプロトコルを用いて作製した。

【0077】

p-アルファ1KI (図2)とよばれるpSK由来の相同的組換えベクター又はターゲティングベクターは、上流でJH-E μ 領域に相当する約5 kbの断片(DQ 52/JH断片)及び下流でC μ 遺伝子に相当する約5 kbの別の断片(C μ 断片)により挟まれた、定常ドメインCH1、CH2及びCH3をコードする3つのエキソンと膜(mb)エキソンとを含むヒトアルファ1遺伝子の5.5 kbの断片とneoカセット(1.6 kb断片)を含む。

【0078】

より具体的には、次の工程に従って、プラスミドbluescript SKに種々の断片を挿入した。

第一工程において、マウス染色体12の位置140101~145032 (Genbank/EMBL AC073553)に相当するC μ 断片を、適切な特異的プライマを用いてPCRにより増幅し、pSKのXhoI部位にクローニングしてプラスミドpAを得た。

【0079】

第二工程において、マウス染色体12の位置131281~136441 (Genbank/EMBL AC073553)に相当するDQ 52/JH断片を、適切な特異的プライマを用いてPCRにより増幅し、プラスミドpAのEcoRV部位とClaI部位の間のC μ 断片の5'にクローニングして、プラスミドpBを得た。

第三工程において、Pinaudら, Immunity, 2001, 15, 187~199に記載されるneoカセットを、DQ52/JHとC μ の間のSalI部位に挿入してプラスミドpCを得た。

【0080】

エキソン配列CH1、CH2及びCH3 (Genbank/EMBL J00220)と膜エキソン (Genbank/EMBL X64133)とを含むヒトアルファ1遺伝子全体を含む組換えプラスミドの5.5 kbのSacI-BamHI断片を、各末端でClaIアダプタにライゲーションした。

最後に、最終工程において、得られたClaIアダプタで挟まれた5.5 kb断片を、プラスミドpCのClaI部位でJH断片とneoカセットとの間に挿入して、p-アルファ1KIとよばれるターゲティングベクターを得た。

p-アルファ1KIの配列は、自動化配列決定及び酵素ClaI及びXhoIを用いる制限分析(図3)により確認した。

【0081】

2) ES細胞のトランスフェクション及び未分化胚芽細胞への注入

129/SJ系統由来のES細胞のクローンを単離し、分析し、次いでトランスジェネシス及びゲノムDNA分析における通常の方法、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc, Library of Congress, USA)に記載されるものを用いてC57/Black 6マウスの未分化胚芽細胞に注入した。

【0082】

より具体的には、ES細胞を、NotI部位で直線化したp-アルファ1KI DNAのエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。ゲネチシン(geneticin)の存在下で選択したクローンを回収し、EcoRIで消化したゲノムDNAを、定常デルタ()遺伝子とそのEcoRI部位の5'で相同的組換えの部位の外側にハイブリダイズする放射活性プローブを用いてサザンブロッティングにより分析した(図4)。適切な特異的プライマを用いてPCRにより増幅したこのプローブは、マウス染色体12の配列の位置140101~145032 (EMBL/Genbank AC073553)に相当する。

10

20

30

40

50

【0083】

組換え対立遺伝子の存在は、約7.5 kbの断片(マウス μ 断片及びneoカセットを表す)により視覚化され、一方、野生型の対立遺伝子は12 kbの断片に相当する(図5)。これらの条件下で、分析した303クローンのうち4つが陽性であることが証明された。

これらの4つの組換えクローンの2つの核型の検証は、染色体異常(異数性)を示さなかった。

【0084】

これらのクローンは、通常のトランスジェネシスのプロトコル、例えば上記のTransgenic Mouse: Methods and Protocolsに記載されるものを用いて、C57/Black 6マウスの未分化胚芽細胞に注入した。得られたマウスのうち、最も高いキメラ現象の程度を示すものを、PCRとELISAにより分析した。組換えIgH遺伝子座についてホモ接合のマウス系統(以下、alpha 1 knock-in又はアルファ1KI系統という)を、次いで、最も高いキメラ現象の程度を示すヘテロ接合の動物との交差により得た。

【0085】

3) ヒトC₁遺伝子を有する組み換えIgH遺伝子座(alpha 1 knock-in又はアルファ1KI対立遺伝子)、及び野生型IgH遺伝子座(野生型 μ 対立遺伝子)のPCRによる検出

上記のようにして得られたホモ接合の動物からの尾(tail)試料のゲノムDNAを、次の2対のプライマを用いるPCRにより分析した。

- 変異していないマウスIgH遺伝子座(野生型 μ 対立遺伝子)に特異的な対
- 上流Spe I Smuプライマ: 5' GAG TAC CGT TGT CTG GGT CAC 3' (配列番号1)
- SacI-3'Imuプライマ: 5' GAG CTC TAT GAT TAT TGG TTA AC 3' (配列番号2)。

【0086】

増幅反応を、61 のハイブリダイゼーション温度で行った。このPCRは、変異していないマウスIgH遺伝子座に特異的なSpeI部位に限定された(delimiting) 91塩基対の断片を、30サイクルで増幅する。

【0087】

- ヒトC₁遺伝子を有する組換えIgH遺伝子座に特異的な対(alpha 1 knock-in又はアルファ1KI対立遺伝子):

- Neo1プライマ: 5' GCA TGA TCT GGA CGA AGA GCA T 3' (配列番号3)
- Neo2プライマ; 5' TCC CCT CAG AAG AAC TCG TCA A 3' (配列番号4)

増幅反応は、55 のハイブリダイゼーション温度で行った。このPCRは、ヒトC₁遺伝子を有する組換えIgH遺伝子座(alpha 1 knock-in又はアルファ1KI変異)に特異的な120塩基対の断片を30サイクルで増幅する。

【0088】

以下においてalpha 1 knock-in又はアルファ1KI系統とよばれるアルファ1KI変異についてホモ接合のマウス系統を確立した。この系統の動物は、系統的かつ同時に、野生型 μ 対立遺伝子について特異的なプライマでのPCRにおいて陰性であり、alpha 1 knock-in対立遺伝子に特異的なプライマを用いるPCRにおいて陽性である。

【0089】

4) ネフェロメトリー及びELISAによる全血清IgAの分析

a) ネフェロメトリー

血清IgAを、IgAアッセイキット(BEHRING)を供給者の推奨に従って用いて、自動化機械B NII (登録商標) (BEHRING)でのネフェロメトリーにより分析した。

【0090】

血清IgAの分析は、PCRにより行なわれた遺伝子型決定の結果とよく相関した結果を与えた。

- 変異していないコントロール動物は、ゼロレベルのヒトクラスIgA免疫グロブリンを有する。
- ヘテロ接合動物 1-KIも、検出不可能なレベルのヒトIgA及び正常なレベルのマウスIgMを有する。

10

20

30

40

50

- ホモ接合動物 1-KIは、かなりのレベルのヒトIgAを有し、このレベルは、血清中に0.4 ~ 0.6 g/lの間で変動する。一方、マウスIgMは、これらの動物の血清で検出不可能であった。

【0091】

b) ELISA

ネフェロメトリーにより得られた結果を、次の工程に従ってELISAで確認した。96ウェルプレート (Maxisorb (登録商標), NUNC)を、0.1 M炭酸バッファー、pH 8.3中で1/500希釈した非標識抗ヒトIgA抗体又は非標識抗マウスIgM抗体のいずれか(100 µl/ウェル)で、+4 で一晩、ヤギFab'2抗ヒトIgA又は抗マウスIgM (Southern Biotechnologies Associates)の存在下でインキュベートすることによりコートした。0.1% Tween含有PBSバッファー (PBS-Tween 0.1%)で3回の洗浄の後、プレートを10%胎児ウシ血清含有PBS (100 µl/ウェル)の存在下に飽和させた。PBS-Tween 0.1%バッファーでの3回の洗浄の後、10%胎児ウシ血清含有PBSバッファーで1/100及び1/500に希釈した試験される血清を加え(100 µl/ウェル)、プレートを37 で3時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーでの3回の洗浄の後、PBS-Tween 0.1%で1/1000に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgA抗血清又はアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgM血清(Biosys) (100 µl/ウェル)を加え、プレートを37 で1時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回の洗浄の後、結合したIgA及びIgMを、0.2M Trisバッファー、pH 7.0中の1 mg/mlのアルカリホスファターゼの基質(p-ニトロフェニルホスフェート、SIGMA)を加えることにより視覚化した。反応を、0.5N水酸化ナトリウム(50 µl/ウェル)を加えることによりブロックし、吸収を405 nmの波長で測定した。

【0092】

定量データは、ヒトIgAのアッセイについて一連の標準血清(BEHRING)を、またマウスIgMのアッセイについて一連のマウスモノクローナルIgM (SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES ASSOCIATES)を用いて、補外法により得る。

【0093】

ELISAによる血清IgAの分析は、ホモ接合体及びヘテロ接合体の間にかかなりの差異を示す。ホモ接合体の血清は0.4~0.6 g/lのIgA1を含有するが、最低希釈(1/100)であってもヘテロ接合体の血清についてはゼロ又は非常に低い吸収の値が観察される。これに対して、マウスIgMをELISAでアッセイしたとき、「変異していない」コントロールマウス及び 1-KI変異についてヘテロ接合の動物において、正常のマウスIgMレベルが観察される(ほぼ1 g/l程度)。一方、マウスIgMレベルは、1-KI変異についてホモ接合の動物においてゼロである。

【0094】

5) 変異動物の末梢リンパ球の表面でのヒトIgAクラスへの膜受容体の発現の研究

1-KI変異を有するホモ接合動物を、フルオレセインで標識したヒトIgA1又はマウスIgMに特異的な抗体とフィコエリトリンで標識したB細胞に特異的な抗体(抗CD19抗体)とを用いる二重標識により、フローサイトメトリーで表現型決定した。より具体的には、

- リンパ細胞の調製: 2つの末梢リンパ器官である脾臓及びパイエル板を、ホモ接合変異動物 1KIから別々に回収し、パーゼン液(Invitrogen)中でばらばらにし、ふるい(40 ミクロン)上でろ過して、細胞凝集塊からはずれた個別の細胞の懸濁物を得た。次いで、脾臓細胞を遠心分離し、細胞ペレットを1 mlの蒸留水に再懸濁することにより、赤血球細胞を溶解するための浸透圧ショックのさらなる工程に付した。試料の細胞を、完全培地(RPMI + 10%胎児ウシ血清)に直ちに再懸濁し、計数して氷上に保存した。

【0095】

- 蛍光抗体を用いる標識化: 各試料からの 10^5 細胞を、フルオレセインイソチオシアネートで標識した抗マウスIgM抗体(Southern Biotechnologies)又はフルオレセインイソチオシアネートで標識した抗ヒトIgA抗体又は前記の抗体の1つとフィコエリトリンで標識したB細胞に特異的な抗体(抗CD19抗体)との組み合わせ(二重標識)のいずれかの1/100希釈と4 で30分間インキュベートした。次いで、細胞を5 mlのPBSで洗浄し、デカンテーショ

ンの後に上清を分離し、細胞を100 μ lのPBS、0.5% BSA、0.1 mM EDTAに再懸濁した。

【0096】

- 細胞蛍光測定分析：標識した細胞をフローサイトメトリー(COULTER XL (登録商標))により分析した。

フローサイトメトリーの結果は、血清免疫グロブリンのアッセイの結果と一致する。アルファ1-KI系統のホモ接合の動物では、脾臓及びパイエル板のいずれにおいてもマウスIgMの発現が検出されなかった。

【0097】

IgMの発現がないことに加えて、CD19+末梢B細胞の区画(compartment)は、これらの動物において分化し始めることが可能でありかつ脾臓リンパ球の10~12%又はパイエル板のリンパ球の40~60%を占める。この区画は、膜IgAを発現し、ここでヒト化重鎖がIgA1に特異的にかつフルオレセインで標識された抗体により認識される(図6)。

10

【0098】

実施例2：ヒト免疫グロブリンカッパ軽鎖を発現するトランスジェニック系統 RNAの作製及び特徴付け

全てのB細胞が可変領域V I-J 5及びC 領域(カッパRNA鎖、EMBL/Genbank X64133)によりコードされるヒトカッパ軽鎖を発現するトランスジェニック動物系統を、Chauveauら, Gene, 1998, 222, 279~285で記載される発現ベクターからのダイレクトトランスジェネシスにより得た。

【0099】

20

1) トランスジェネシスベクターの構築

トランスジェネシスベクターは、Chauveauら, Gene, 1998, 222, 279~285に記載されるプラスミドpALIE μ である。これは、カッパRNA鎖をコードするカセットの5'にVHプロモーター及びE μ エンハンサーの両方を、及びこのカセットの3'に、3'のIgH遺伝子座の3'に位置する3つのエンハンサーhs3a、hs12及びhs3bを含む。コーディング配列は、V I-J 5-C 鎖(Genbank/EMBL X64133)に相当する。プラスミドpALIE μ は、制限酵素NotI及びPvuIを用いて直線化し、これらはプラスミド配列の内部で切断し、NotIはクローニングされたV セグメントに先行するプロモーターの上流に位置し、PvuIは、プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子の中に位置する。発現用の全てのプロモーター及び調節要素で挟まれたカッパ発現カセット全体を含む断片を、上記のTransgenic Mouse: Methods and Protocolsに記載されるもののような通常の直接トランスジェネシスプロトコルを用いてマウスの未分化胚芽細胞にランダムに挿入した。

30

【0100】

2) RNA系統の初代動物の同定及びその子孫のタイピング

RNAトランスジーンを有するトランスジェニックマウス系統は、発現ベクターの注入の後に得られた。このヒトトランスジーンが存在は、ヒトC 領域(ヒトC エキソン全体を含む2.5 kbのEcoRI-EcoRI断片)に特異的なプローブを用いるサザンブロッティングにより、マウスDNAについて確認した。挿入部位の2つの対立遺伝子上にトランスジーンを挿入断片を有する動物(ホモ接合動物)は、2倍の量のトランスジーンを有しかつトランスジーンを単一コピーを有する動物(ヘテロ接合動物)からサザンブロッティングにより区別することができる。代わりに、トランスジーンが存在は、ヒト配列V I-J 5-C (Genbank/EMBL X64133)を特異的に増幅することを可能にするプライマを用いてPCRにより検出された。

40

【0101】

3) カッパRNA系統のマウスの末梢リンパ球の表面でのヒトカッパ軽鎖の発現の研究

【0102】

カッパRNAトランスジーンを有する二接合性動物を、実施例1で記載したプロトコルに従って、抗ヒト 抗体(フルオレセインイソチオシアネートで標識)と組み合わせた抗マウス抗体(フィコエリトリンで標識)を用いる二重標識により、フローサイトメーターで表現型を決定した。

50

【0103】

これらの動物は、B細胞の大多数においてヒト トランスジーンを発現を示す(図7)。さらに、トランスジーンは、ヒト トランスジーンを発現するB細胞がマウス軽鎖についての内在性遺伝子を発現しないように対立遺伝子排除の現象を誘導する。サイトメトリーにより、これらの細胞は、抗ヒト 鎖抗血清での標識の間は陽性であり、抗マウス 鎖抗血清での標識は陰性である(図7)。

【0104】

4) カッパRNA系統のマウスにおける トランスジーンの体細胞過剰変異の分析

このヒト 軽鎖が重鎖と結合し、体細胞過剰変異の現象により分化し始める(抗原に対する応答により引き起こされる)ことが示されている。V_H J とC の間のJ_H-C_H イントロンの存在とともに 遺伝子の内在性の構成を保存するこのトランスジーンは、P_{VH}プロモーター/E μ エンハンサー+調節性パリンドローム3'IgH (hs3a, hs1,2, hs3b)の組み合わせにより提供される高い発現の利益をさらに受ける。これら全ての調節要素の蓄積作用により、トランスジーンレベルで体細胞過剰変異の機構を入れることを可能にする。より具体的には、トランスジェニックマウスのパイエル板を腸の切開により取り出す。パイエル板をナイロンメンブレンを通して粉碎することにより、細胞懸濁物を調製する。細胞を、10%胎児ウシ血清含有DMEM中に+4 で3回洗浄する。各洗浄の後に死滅した細胞を除去し、細胞懸濁物を10⁶細胞/mlに合わせた。

【0105】

細胞を、ビオチン化抗B220抗体の存在下に+4 で30分間インキュベートした。5%胎児ウシ血清含有DMEMで2回洗浄した後に、細胞を、フィコエリトリンに結合したストレプトアビジンの存在下に+4 で30分間インキュベートし、次いで洗浄し、5%ウシ胎児血清含有PBSに懸濁した。FITCと結合した、活性化されたB細胞に特異的なレクチン(ピーナッツ凝集素のPNA)を加えた後、細胞懸濁物を+4 で30分間インキュベートした。DMEMで2回洗浄した後に、細胞をDMEMに再懸濁し、次いで、これらをフローサイトメトリーにより2つの個体群に分類した: B220+PNA^{hi}g^h (活性化B)及びB220+PNA^{lo}w (休止B)。

【0106】

キットQIAamp Tissue (QIAGEN)により分類された2つの細胞個体群からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNA 2 μ lについて、ヒトV_H 1のシグナル領域に対応するプライマ(5'-AAGTCGACATGGACATGAGGGTGCC-3') (配列番号5)と、ヒトJ_H 5領域の最初に対応するプライマ(5'-TTCTCGAGACTTAGGTTTAATCTCCAG-3') (配列番号6)とを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅を行なった。増幅プログラムは、94 で5分間の変性の最初の工程; 続いて94 で30秒間の変性工程、52 で30秒間のハイブリダイゼーション工程及び72 で30秒間の伸長工程からなる35サイクル; 次いで72 で7分間の最後の伸長工程からなった。

【0107】

増幅産物は、1.2%アガロースゲル上で精製し、溶出し(kitQIAquick Gel Extractionキット, QIAGEN)、次いでベクター-pCRII-TOPO (INVITROGEN)にクローニングした。組換えクローンを酵素制限により試験し、次いで精製し(Flexiprepキット, PHARMACIA)、サンガー法により配列決定した。配列決定反応は、プライマとしてM13リバースとM13(-20)、及び蛍光ジデオキシヌクレオチドを用いるPCRにより行い、次いで自動化シーケンサー(ABI-PRISM 310, PERKIN-ELMER)でのキャピラリー電気泳動により分析した。活性化されたB細胞から得られた配列を、変異していないトランスジーンの元来の配列(Genbank/EMBL X64133)と整列させた。変異の数及び位置を分析した(図8)。

【0108】

トランスジーンは、内在性免疫グロブリン遺伝子(1000塩基当たり40変異の割合で変異する)と実質的に同様に高い(1000塩基当たり17変異)割合で、この体細胞過剰変異をうける。この単一のトランスジーンは、ある多様性を有するカッパ「レパートリー」を生じることができる。

【0109】

実施例3: ヒト免疫グロブリンのキメラアルファ1重鎖及びカッパ軽鎖を発現する二重トラ

10

20

30

40

50

ンスジェニックHAMIGA系統の作製及び特徴付け

先行する実施例に記載の RNA系統とアルファ1-KI系統との交差により、二重トランスジェニック RNA/アルファ1-KIマウスが生じる。

【0110】

これを行うために、アルファ1-KI変異についてホモ接合でかつ RNAトランスジーンについてホモ接合である動物を互いに交差させた。この交差後の第一世代(F1)において、得られた全ての動物は、アルファ1-KI変異についてヘテロ接合でかつ RNAトランスジーンについてヘテロ接合である。よって、これらのF1動物を再び交差させた。次の世代(F2)において、メンデルの遺伝学の法則により、4匹のうち1匹のアルファ1-KI変異についてホモ接合の動物、及び4匹のうち1匹の RNAトランスジーンについてホモ接合の動物を得ることが可能である。これらのF2動物のうち、16匹のうち1匹を、ホモ接合状態のアルファ1-KI変異とホモ接合状態の RNAトランスジーンの両方を有するとして選択することができた。これらの動物は、HAMIGA系統の初代(founder)であり、これらは、マウスIgMの作製並びにヒト鎖の過剰変異の作製及びそれによる多様化の代わりにヒト化アルファ1重鎖の産生を同時に許容する遺伝子をそれらの子孫に安定して伝える。

【0111】

この二重トランスジェニックマウス系統は、「モノクローナル免疫グロブリンAからなるヒト化抗体」(Humanized Antibodies Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A)としてHAMIGA系統とよばれる。

【0112】

1) 二重トランスジェニックHAMIGA系統の作製

a) トランスジーンの存在

トランスジェニック動物の交差の間の RNAトランスジーンの伝達は、ヒトC領域(ヒトCエキソン全体を含む2.5 kbのEcoRI-EcoRI断片)に特異的なプローブを用いるサザンプロットングによりモニターした。

【0113】

変異動物での トランスジーンの発現は、動物の尿で排泄される遊離のヒトカップ鎖のELISAアッセイにより検出した。より具体的には、96ウェルプレート(Maxisorb (商標), NUNC)を、0.1Mカーボネートバッファー、pH 8.3中で1/1000希釈した非標識抗ヒト抗体(Kallestad) (100 µl/ウェル)の存在下に+4で一晩インキュベートした。0.1% Tween含有PBSバッファー(PBS-Tween 0.1%)で3回洗浄した後、プレートを、10%胎児ウシ血清含有PBSの存在下に(100 µl/ウェル)飽和させた。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後、10%胎児ウシ血清含有PBSバッファーで1/100及び1/500に希釈した、試験される尿試料を加え(100 µl/ウェル)、プレートを37で3時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後に、PBS-Tween 0.1%で1/1000希釈したアルカリホスファターゼ(SIGMA)で標識した抗ヒト抗血清(100 µl/ウェル)を加え、37で1時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後に、結合したヒトカップ鎖を、0.2 M Trisバッファー、pH 7.0中で1 mg/mlのアルカリホスファターゼ基質(p-ニトロフェニルホスファターゼ, SIGMA)を加えることにより視覚化した。反応は、0.5N水酸化ナトリウム(50 µl/ウェル)を加えることによりブロックし、次いで吸収を405 nmの波長で測定した。

【0114】

あるいは、ヒトカップトランスジーン発現は、実施例2に記載されるようなフローサイトメトリーにより分析される。結果は、RNAトランスジーン存在が、末梢リンパ球のうちの50%を超えるものがヒト軽鎖を発現し、よってマウス軽鎖を発現するためにマウス軽鎖の遺伝子の再配列を行わないというような対立遺伝子排除の重要な現象を引き起こすことを示す。

【0115】

b) 1-KI変異についてのホモ接合性

1-KIホモ接合性を示す第一の単独要素は、動物の血清中の高レベルのヒトIgA1の存在である。さらに、ホモ接合性は、「1-KI PCR」の陽性と「野生型 µ 対立遺伝子PCR」の

10

20

30

40

50

陰性との組み合わせによりPCRで確認された。最後に、動物を犠牲にした後にフローサイトメトリーにより、脾臓及びパイエル板のリンパ球について、全Bリンパ球(CD19+)が膜ヒトIgA1を発現するが、同時に、いずれのB細胞もマウスIgMを発現しないことを示すことができた。

【0116】

c) HAMIGA動物及びその子孫におけるアルファ1-KI変異及び RNAトランスジーンの同時の存在の証明

二重トランスジェニックHAMIGA動物は、上記の2つの特異性：ホモ接合状態での RNAトランスジーンの存在及びアルファ1-KI変異についてのホモ接合性に同時に対応するという特徴を有した。さらに、これらの動物は、これらの2つの特異性を保持しながら繁殖し、
10

それらの子孫の表現型は同時にかつ安定的な様式で次の特性を有する。
- かなり大きいレベルでのヒト化IgA1の産生(眼窩後洞(retro-orbital sinus)のレベルで生体動物から採取した単純な血液試料についてのELISA又はネフェロメトリーにより容易に検証できる)

- ヒト 軽鎖の産生(生体動物から採取した単純な尿試料についてのELISAにより容易に検証できる)。

【0117】

2) 動物の免疫化

動物は、生理食塩水100 μ lで希釈し、フロイントの完全アジュバント(SIGMA) 200 μ lと乳化された10 μ gのオボアルブミン(SIGMA)の腹腔内注射により1回免疫にされた。
20

4週間後、動物を生理食塩水100 μ lで希釈し、フロイントの不完全アジュバント(SIGMA) 200 μ lと乳化された10 μ gのオボアルブミン(SIGMA)の腹腔内注射によるワクチンブースターに付した。

【0118】

3) ワクチン抗原(オボアルブミン)に特異的な抗体のアッセイ

ワクチン抗原、オボアルブミンに特異的な抗体の存在を、次の方法により、抗原の2回目の注射の4週間及び7週間後にELISAにより分析した。96ウェルプレート(Maxisorb(商標)、NUNC)を、0.1Mカーボネートバッファー、pH 8.3中に10 μ g/mlの濃度のオボアルブミン(100 μ l/ウェル)の存在下に+4 で一晩インキュベートした。0.1% Tween含有PBSバッファー(PBS-Tween 0.1%)で3回洗浄した後、プレートを10%胎児ウシ血清含有PBS(100 μ l/ウェル)の存在下に飽和させた。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後に、10%胎児ウシ血清含有PBS中で1/20及び1/100希釈された、試験される血清試料を加え(100 μ l/ウェル)、プレートを37 で3時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後に、PBS/Tween 0.1%中で1/1000希釈したアルカリホスファターゼ(BIOSYS)で標識した抗ヒトIgA抗血清(100 μ l/ウェル)を加え、プレートを37 で1時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%バッファーで3回洗浄した後に、結合したヒトカップ軽鎖を、0.2 M Trisバッファー、pH 7.0中で1 mg/mlのアルカリホスファターゼ基質(p-ニトロフェニルホスファターゼ、SIGMA)を加えることにより視覚化した。反応は、0.5N水酸化ナトリウム(50 μ l/ウェル)を加えることによりブロックし、次いで吸収を405 nmの波長で測定した。抗オボアルブミンIgA抗体のレベルは、試験した血清の吸光度/コントロール血清の吸光度の比の
40
関数として、1/100希釈された血清について確立された任意の単位として表した。

【0119】

図9に示す結果は、ワクチン抗原オボアルブミンに特異的な抗体が、抗原の2回目の注射の4週間後(388ユニットのヒト抗オボアルブミンIgA1抗体のレベル)及び7週間後(162ユニットの抗オボアルブミンIgA抗体のレベル)に存在することを示す。同時に、動物の免疫化なしでは、検出された抗オボアルブミンIgA抗体のレベルが30ユニット未満のままであったことも確認された。

【0120】

これらのマウスの抗原に対する応答のレパートリーは、(ヒトトランスジェニック 1重鎖が、マウスIgH遺伝子座のVH、D及びJHセグメントの再配列により生じる正常なレパート
50

リーに対応するので、完全に多様化したレパートリーから恩恵を受けるが)抗体部位の形成に寄与する重鎖の実質的なVHドメインであることが知られているので、正常以下であることが予想される。これらのマウスは、二次応答として高い親和性の抗体を産生することができ、このことは、それらのBリンパ球が重鎖遺伝子のレベル及び RNA軽鎖トランスジーンレベルの両方で体細胞過剰変異の現象を入れることができるという事実起因する。

【0121】

上記から明らかのように、本発明は、ここでより詳細に記載したその実施形態、実施及び適用に限定されない。これに対して本発明は、本発明の枠組み又は範囲を逸脱せずに当該分野の専門家が想到し得る全ての変形を包含する。

10

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】マウスIgH遺伝子座とp-アルファ1KIとよばれるターゲティングベクターとの間の相同的組換えにより得られる改変されたIgH遺伝子座の構造を示す。

【図2】p-アルファ1KIとよばれるターゲティングベクターの詳細な構造を示す。

【図3】XhoIでの酵素制限によるターゲティングベクターp-アルファ1KIの配列の確認を示す。

【図4】野生型対立遺伝子と比較した組換え対立遺伝子のサザンプロットプロフィールを示す。

【図5】ターゲティングベクターp-アルファ1KIでトランスフェクションしたESクローンのゲノムDNAのサザンプロット解析を示す。

20

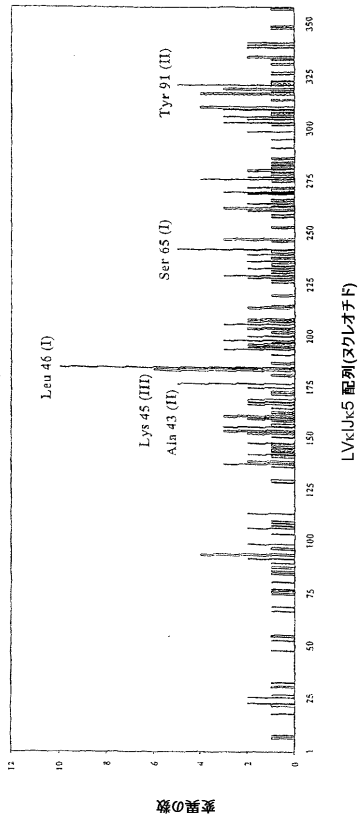
【図6】トランスジェニック系統アルファ1KIのホモ接合の動物の末梢リンパ球表面でのヒトIgAクラスに対する膜受容体の発現のフローサイトメトリー解析を示す。

【図7】非トランスジェニックマウス(コントロール)と比較した、カッパRNA系統のマウスの末梢Bリンパ球表面でのヒトカッパ軽鎖の発現のフローサイトメトリー解析を示す。

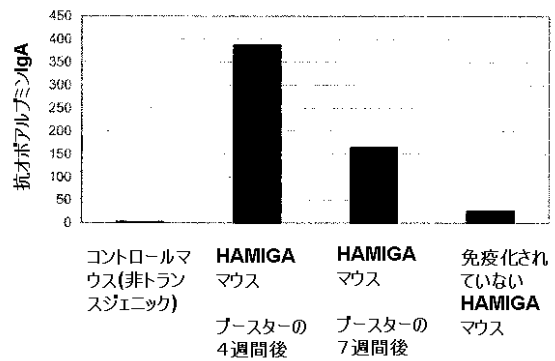
【図8】トランスジェニックマウス系統 RNAでのヒトカッパトランスジーンレベルの体細胞過剰変異を示す。

【図9】オボアルブミン抗原で免疫したHAMIGA系統の二重トランスジェニックマウスでの特異的ヒトキメラIgA1抗体応答のELISA解析を示す。

【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2008501303000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年10月3日 (2007.10.3)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC 遺伝子からなるトランスジェンの全体又は一部分でスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座を含むことを特徴とする非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【 請求項 2 】

前記改変されたIgH遺伝子座についてホモ接合であることを特徴とする請求項1に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【 請求項 3 】

前記IgH遺伝子座が、スイッチ配列S μ をC 遺伝子全体で置き換えることにより改変されたことを特徴とする請求項1又は2に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【 請求項 4 】

前記IgH遺伝子座が、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを含むC 遺伝子のセグメントでスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたことを特徴とする請求項1又は2に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 5】

前記C 遺伝子がC 1であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 6】

ヒト免疫グロブリン軽鎖をコードする別のトランスジーンを含むことを特徴とする請求項1~5のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 7】

前記軽鎖がカッパ鎖であることを特徴とする請求項6に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 8】

前記トランスジーンが、上流にイントロンアクチベータE μ と下流にパンドロームhs3a/hs1,2/hs3bとを含むことを特徴とする請求項7に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 9】

前記トランスジーンが、ヒト免疫グロブリン重鎖のプロモーターの制御下にあることを特徴とする請求項8に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 10】

前記トランスジーンについて二接合であることを特徴とする請求項6~9のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 11】

不活性化されたカッパ鎖の内在性遺伝子座を有することを特徴とする請求項6~10のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 12】

不活性化されたカッパ鎖の前記内在性遺伝子座についてホモ接合であることを特徴とする請求項11に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 13】

不活性化されたJ鎖をコードする遺伝子を有することを特徴とする請求項1~12のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 14】

不活性化されたJ鎖をコードする前記遺伝子についてホモ接合であることを特徴とする請求項13に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 15】

ヒト免疫グロブリンJ鎖をコードする別のトランスジーンを含むことを特徴とする請求項13又は14に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 16】

トランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項1~15のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 17】

- ヒトクラスA免疫グロブリンのC 1遺伝子全体でスイッチ配列S μ を置き換えることにより改変されたIgH遺伝子座と、
- ヒト重鎖のプロモータ(pVH)の転写制御下でのJ 5遺伝子で再配列されたV 1遺伝子、J -C イントロン及びC 遺伝子と、上流にイントロンアクチベータE μ と下流にパンドロームhs3a/hs1,2/hs3bとを含む完全V 遺伝子とを含むことを特徴とする請求項16に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 18】

S μ 配列に接する非ヒト哺乳動物からのIgH遺伝子座の配列の断片で挟まれた、CH3ドメインをコードするエキソンと膜エキソンとを少なくとも含むヒトクラスA免疫グロブリンのC 遺伝子又は該遺伝子のセグメントを含むことを特徴とする相同的組換えターゲット。

【請求項 19】

前記C 遺伝子又は該遺伝子のセグメントに接する適切な選択マーカの発現のためのカセットを含むことを特徴とする請求項18に記載のターゲティングベクター。

【請求項20】

前記発現カセットが、部位特異的組換え配列で挟まれていることを特徴とする請求項19に記載のターゲティングベクター。

【請求項21】

前記配列が、CreリコンビナーゼのLoxP配列であることを特徴とする請求項20に記載のターゲティングベクター。

【請求項22】

S μ 配列に接する前記配列の断片がマウス起源であることを特徴とする請求項18～21のいずれか1つに記載のターゲティングベクター。

【請求項23】

C 遺伝子又は該遺伝子のセグメントが、5'及び3'でそれぞれ、マウス染色体12 (EMBL/Genbankデータベースでアクセッション番号AC073553)の配列の位置131281～136441及び140101～145032に相当する断片で挟まれていることを特徴とする請求項22に記載のターゲティングベクター。

【請求項24】

請求項18～23のいずれか1つに記載のターゲティングベクターで改変された非ヒト哺乳動物の胚細胞。

【請求項25】

請求項1～16のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物又は請求項17に記載のトランスジェニックマウスの、ヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片の作製のための使用。

【請求項26】

少なくとも次の工程：

- 請求項1～16のいずれか1つに記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物又は請求項17に記載のトランスジェニックマウスの免疫化、及び
- 予め犠牲にした前記非ヒトトランスジェニック哺乳動物の血清、分泌物又はBリンパ球からのヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片のいずれの適切な手段による作製を含むことを特徴とする、ヒト化クラスIgA抗体又は該抗体の断片を作製する方法。

【請求項27】

定常ドメインがヒト起源であるキメラ重鎖と可変ドメインがV_H1-J_H5によりコードされるヒト軽鎖とを含むことを特徴とする、請求項26に記載の方法により得ることができるヒト化クラスIgA抗体。

【請求項28】

前記重鎖及び軽鎖の断片を含むことを特徴とする請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体の断片。

【請求項29】

Fab、Fab'2及びFc断片からなる群より選択されることを特徴とする請求項28に記載のヒト化クラスIgA抗体の断片。

【請求項30】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする医薬。

【請求項31】

感染症及び癌の予防及び治療を意図する請求項30に記載の医薬。

【請求項32】

請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする診断試薬。

【請求項33】

感染症及び癌の診断を意図する請求項32に記載の診断試薬。

【請求項 3 4】

抗原との組み合わせで少なくとも1つの請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする免疫原性組成物又はワクチン組成物。

【請求項 3 5】

いずれの適切な手段により有効成分と組み合わせた少なくとも1つの請求項27に記載のヒト化クラスIgA抗体又は請求項28若しくは29に記載の該抗体の断片を含むことを特徴とする医薬組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/46 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PINAUD, ERIC ET AL: "Localization of the 3' Igh locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination" IMMUNITY, 15(2), 187-199 CODEN: IUNIEH; ISSN: 1074-7613, 2001, XP011182522	
A	MAGADAN S ET AL: "Production of antigen-specific human monoclonal antibodies: comparison of mice carrying Igh/kappa or Igh/kappa/lambda transloci." BIOTECHNIQUES, 33 (3) 680, 682, 684 PASSIM. JOURNAL CODE: 8306785. ISSN: 0736-6205., September 2002 (2002-09), XP001182373	
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 2 March 2005		Date of mailing of the international search report 17/03/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Espen, J

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR2004/002701

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 545 807 A (BRUGGEMANN MARIANNE ET AL) 13 August 1996 (1996-08-13) cited in the application	
A	WO 02/059154 A (ABGENIX INC ; HE YUXIAN (US); CORVALAN JOSE R (US); PINTER ABRAHAM (US) 1 August 2002 (2002-08-01) cited in the application	
A	CHAUVEAU C ET AL: "Insertion of the Igh locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 222, no. 2, November 1998 (1998-11), pages 279-285, XP004150057 ISSN: 0378-1119	
A	RONAI D ET AL: "Use of a simple, general targeting vector for replacing the DNA of the heavy chain constant region in mouse hybridoma cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 275, no. 1-2, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 191-202, XP004416768 ISSN: 0022-1759	
P, X	KHAMLICHI AHMED AMINE ET AL: "Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any Smu tandem repeat" BLOOD, vol. 103, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 3828-3836, XP002319762 ISSN: 0006-4971 figure 1	18-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5545807	A	13-08-1996	AT 138104 T 15-06-1996
			AU 4417389 A 01-05-1990
			DE 68926508 D1 20-06-1996
			DE 68926508 T2 31-10-1996
			EP 0438474 A1 31-07-1991
			WO 9004036 A1 19-04-1990
			JP 4500911 T 20-02-1992
			JP 3484442 B2 06-01-2004
			JP 2003192699 A 09-07-2003
			KR 164608 B1 15-01-1999
			WO 02059154
			EP 1373318 A2 02-01-2004
			WO 02059154 A2 01-08-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR2004/002701

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K16/46 A01K67/027		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A01K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PINAUD, ERIC ET AL: "Localization of the 3' Igh locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination" IMMUNITY, 15(2), 187-199 CODEN: IUNIEH; ISSN: 1074-7613, 2001, XP01182522	
A	MAGADAN S ET AL: "Production of antigen-specific human monoclonal antibodies: comparison of mice carrying Igh/kappa or Igh/kappa/lambda transloci." BIOTECHNIQUES, 33 (3) 680, 682, 684 PASSIM. JOURNAL CODE: 8306785. ISSN: 0736-6205., septembre 2002 (2002-09), XP001182373	
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 mars 2005		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 17/03/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/002701

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 545 807 A (BRUGGEMANN MARIANNE ET AL) 13 août 1996 (1996-08-13) cité dans la demande	
A	WO 02/059154 A (ABGENIX INC ; HE YUXIAN (US); CORVALAN JOSE R (US); PINTER ABRAHAM (US) 1 août 2002 (2002-08-01) cité dans la demande	
A	CHAUVEAU C ET AL: "Insertion of the Igh locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 222, no. 2, novembre 1998 (1998-11), pages 279-285, XP004150057 ISSN: 0378-1119	
A	RONAI D ET AL: "Use of a simple, general targeting vector for replacing the DNA of the heavy chain constant region in mouse hybridoma cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 275, no. 1-2, 1 avril 2003 (2003-04-01), pages 191-202, XP004416768 ISSN: 0022-1759	
P,X	KHAMLICHI AHMED AMINE ET AL: "Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any Smu tandem repeat" BLOOD, vol. 103, no. 10, 15 mai 2004 (2004-05-15), pages 3828-3836, XP002319762 ISSN: 0006-4971 figure 1	18-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR2004/002701

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5545807	A	13-08-1996	AT 138104 T	15-06-1996
			AU 4417389 A	01-05-1990
			DE 68926508 D1	20-06-1996
			DE 68926508 T2	31-10-1996
			EP 0438474 A1	31-07-1991
			WO 9004036 A1	19-04-1990
			JP 4500911 T	20-02-1992
			JP 3484442 B2	06-01-2004
			JP 2003192699 A	09-07-2003
			KR 164608 B1	15-01-1999
			WO 02059154	A
EP 1373318 A2	02-01-2004			
WO 02059154 A2	01-08-2002			

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 506140387
 ユニベルシテ デ リモージュ
 UNIVERSITE DE LIMOGES
 フランス、エフ - 8 7 0 3 2 リモージュ セデックス 01、リュ フランソワ ミッテルラン
 ド - ビーピー 2 3 2 0 4、3 3、ホテル デ ルユニベルシテ
 Hotel de l'Universite, 33, rue Francois Mitter
 rand - BP 2 3 2 0 4, F - 8 7 0 3 2 Limoges Cedex 01

(74) 代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72) 発明者 コーニュ, ミシェル
 フランス、エフ - 8 7 1 7 0 イスレ、アレ デ チャーム (番地なし)

(72) 発明者 シラク, クリストフ
 フランス、エフ - 8 7 0 0 0 リモージュ、リュ デ ラ コーティン 7

(72) 発明者 バーデル, ミカエル
 フランス、エフ - 8 7 2 7 0 コウゼイクス、ル ランドウ (番地なし)

(72) 発明者 デコート, カトリーヌ
 フランス、エフ - 8 7 5 7 0 リルハク - ランコン、ラ カンヌ (番地なし)

(72) 発明者 ル モーヴァン, キャロリーヌ
 フランス、エフ - 8 7 2 6 0 ヴィック - シュル - プリュール、ローレリー (番地なし)

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA01 DA02 EA10 GA11 HA01 HA20
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CD20 DA01
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA13 AA14 AA33 BB33 CC02 CC22 EE01
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	用于A类人免疫球蛋白重链恒定区的非人转基因哺乳动物及其用途		
公开(公告)号	JP2008501303A	公开(公告)日	2008-01-24
申请号	JP2006536126	申请日	2004-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 利摩日大学		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家Shiantifiku Yuniberushite德利摩日		
[标]发明人	コーニエミシエル シラククリストフ バーデルミカエル デコートカトリーヌ ルモーヴァンキャロリーヌ		
发明人	コーニエ,ミシエル シラク,クリストフ バーデル,ミカエル デコート,カトリーヌ ルモーヴァン,キャロリーヌ		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00 G01N33/53 C07K16/18 C12N15/85		
CPC分类号	C07K16/18 A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2227/105 A01K2267/01 C07K2317/21 C07K2317/24 C12N15/8509 C12N2800/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/00.B A61K39/395.V A61P35/00 A61P31/00 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA10 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CD20 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085/BB33 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	2003012502 2003-10-24 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，具有非IgH基因座通过全部或转基因的含有部分替换切换序列S_μ修饰至少包括外显子和外显子膜编码CH3结构域之间的一类人免疫球蛋白基因Ca人转基因哺乳动物，以及它们用于产生人源化IgA类抗体的用途。

		(43) 公表日 平成20年1月24日 (2008)	
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)	
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024	
A01K 67/027 (2006.01)	A01K 67/027	4B064	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065	
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085	
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4H045	
		審査請求 有	予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2006-536126 (P2006-536126)	(71) 出願人	502205846
(86) (22) 出願日	平成18年10月21日 (2004.10.21)		サントル ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月25日 (2006.5.25)		ルシュ シアンティフィック
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/002701		フランス国 エフー75016 パ
(87) 国際公開番号	WO2005/047333		ユ ミシエル-アンジュ 3
(87) 国際公開日	平成17年5月26日 (2005.5.26)		
(31) 優先権主張番号	0312502		
(32) 優先日	平成15年10月24日 (2003.10.24)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		