(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年5 月30 日 (30.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/41922 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 48/00, 38/17, 39/395, 31/711, C12N 15/85, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08575

(22) 国際出願日: 2001 年9 月28 日 (28.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-358389
2000 年11 月24 日 (24.11.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 丸山弘樹 (MARUYAMA, Hiroki) [JP/JP]; 〒951-8124 新潟県新潟市医学町通2番町10番地1 ダイアパレス医学町706号 Niigata (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮崎純一 (MIYAZAKI, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府吹田市上山田6-8-810 Osaka (JP). 須川 誠 (SUGAWA, Makoto) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 樋口正人 (HIGUCHI, Masato) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF REGULATING THE ACTIVITY OF EXPRESSION PRODUCT OF GENE TRANSFERRED INTO LIVING BODY

(54) 発明の名称: 生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御する方法

(57) Abstract: The activity of an expression product of a gene which has been transferred into a living body can be regulated by the coexistence of a protein (interference substance) interfering the activity of the expression product. As the interference substance, use is made of a receptor for the expression product, etc. Thus, the excessive activity of an expression product of a gene which has been transferred by gene therapy can be regulated. The interference substance can be administered by expressing its gene in the living body.

(57) 要約:

生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質（干渉物質）を共存させることによって、当該発現産物の活性が制御される。干渉物質には、当該発現産物に対する受容体等が用いられる。遺伝子治療によって導入された遺伝子の過剰な発現産物の活性を制御することができる。干渉物質は、その遺伝子を生体内で発現させることによって投与することができる。

WO 02/41922 A1

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明細書

生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御する方法

技術分野

本発明は、生体に人為的に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御するための方法に関する。

背景技術

1990 年に米国で試みられたヒトを対象とする遺伝子治療は、その後、多くの国で幅広く行われるようになってきた。遺伝子レベルで疾患の背景が理解することができるようになると、遺伝子治療を利用して疾患の原因となる遺伝子の発現を制御することにより、多くの疾患の治療が可能となるのではないかと期待されている。現在最も広く行われている遺伝子治療は、遺伝子の異常によって不足している蛋白質の活性を、正常な遺伝子の導入によって補充するタイプのものである。このタイプの遺伝子治療の代表的なものが、ADA(Adenosine deaminase)欠損症に対する ADA 発現ベクターの導入による治療方法である。同様の遺伝子治療に、癌細胞における正常な p53 の導入が挙げられる。p53 遺伝子に生じた変異のためにがん化の抑制が不能になった細胞を、正常な p53 の作用によって治療しようとする試みである。

初期の遺伝子治療において人為的に導入された遺伝子の発現レベルは、期待される水準よりも低いことが多かった。そのため、遺伝子の導入方法やベクターの改良によって、導入遺伝子をより強力に発現させることが遺伝子治療の新しい研究テーマとして注目されている。ところが、これらの研究の進展により、導入した遺伝子の発現が生理的濃度をはるかに越えて長期的な上昇がみられるといった新しい問題の発生が心配される。人為的に導入された遺伝子の発現機構には、過

剰な発現を抑制するフィードバック機構が伴っていない。そのため、強力な発現システムには発現過剰の問題が常に存在する。人為的に導入した遺伝子の発現の持続は、治療に伴う副作用をもたらす恐れがある。

例えば、造血ホルモンの一種であるエリスロポエチン（以下、EPO と省略する）は、貧血の治療に有効である。しかし EPO が過剰な場合には、逆に多血症を引き起こす原因となってしまう。その他、歩行時疼痛（間歇性破行）、下肢の組織障害を示す閉塞性動脈硬化症、慢性心不全を含む虚血性心疾患や再狭窄等に対して、血管内皮成長因子(VEGF)を用いた遺伝子治療が試みられている。VEGF による血管新生の遺伝子治療では、過剰の VEGF は目的部位以外にも多くの血管新生を引き起こしてしまう恐れがある。血管新生の亢進にともない、組織を異常に発達させてしまう可能性や、担癌患者における悪性腫瘍の増大の危険性等が考えられる。したがって、今後の遺伝子治療では、導入遺伝子の発現レベルや発現生成物の活性を制御可能であることが望まれる。

このような導入遺伝子の発現量を制御する方法として、導入するベクターに薬物に反応する制御領域を組み込み、薬物投与により発現を制御する方法が報告されている（Ye et al., Science, 1999, 283, 88-91）。しかしながら、この方法では投与する薬物による副作用等の問題も生じる。そのため、より安全で確実な発現遺伝子の制御方法が必要とされる。

一方、近年、様々なサイトカインが疾患に関与することが明らかとなり、これらサイトカインに対する可溶性キメラ受容体投与や、抗体投与等の anticytokine therapy の臨床応用が進み、成果を上げつつある（Feldman AM et al., The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure, J. American College of Cardioloy, 2000, 35, 537-544; Boehme MW & Gao IK, Present importance of direct immunologically based intervention strategies using anticytokines in rheumatoid arthritis, Zeitschrift fur Rheumatologie, 1999,58, 251-166; Choy EH et al., Monoclonal antibody therapy in r

heumatoid arthritis, British J. Rheumatology, 1998, 37, 484-490)。

例えば、心臓疾患 (Feldman AM et al., The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure, J. American College of Cardiol oy, 2000, 35, 537-544) やリウマチ(Ohshima S et al., Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors, and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (R A) after monoclonal anti-TNF alfa antibody therapy, J. Clin. Immunology., 1999, 19, 305-313; Choy EH et al., Monoclonal antibody therapy in rheum atoid arthritis, British J. Rheumatology, 1998, 37, 484-490)、クローン病の関与が指摘されている TNF に対して、TNF-αのキメラ受容体投与や TNF-αに対する抗体投与がなされ、臨床においても有効な成績が得られている。また、Ch ronic injury での fibrosis への関与が指摘されている TGF-βの type II 受容体の細胞外部分を含むキメラ IgG 可溶性受容体の投与では、動物モデルで hepatic fibrosis の抑制効果が得られている (George J et al., In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor be ta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis, Proc. Nat. Acad. Sci., 1999, 96, 12719-12724)。これらの報告では、疾患の原因であるサイトカインの活性を制御するために、サイトカインの活性に干渉する成分が投与されている。

またアデノウイルス vector を投与する遺伝子治療の際、ウイルスに対する免疫反応を抑える目的で、抗-CD4 モノクローナル投与が動物で試みられた。その結果、導入遺伝子の reporter 発現の持続や、ウイルスに対する抗体価の減少、I FN-γの上昇の抑制等の効果が得られており (Schroeder G et al., Immune resp onse after adenoviral gene transfer in syngeneic heart transplants:effec ts of anti-CD-4 monoclonal antibody therapy, Transplantation, 2000, 70, 191-198)、抗-CD4 抗体療法は臓器移植等でも有効な手法であることを示唆して

いる。

さらに、Lymphocyte の活性化に関与する CD45 に対する抗体投与は、実験的アレルギー脳炎である EAE の発症を抑制し、T-cell の増殖を押さえ、TNF-αのみならず Th-1 サイトカインである IFN-γ、IL-2 の産生を有意に抑制することが報告されている (Schiffenbauer J et al., Prevention oe experimental allegic encephalomyelitis by an antibody to CD45RB, Cellular Immunology, 1998, 190, 173-182)。しかし、こういった、標的サイトカインの抗体や可溶性受容体の組み換え型蛋白を投与する方法は、それらに対する抗体が産生され、繰り返し投与では効果が減弱してくるといった問題や、組み換え型蛋白のコストの問題が依然として解決すべき課題として考えられる。

発明の開示

本発明は、生体に人為的に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御する方法の提供を課題とする。

生体に人為的に導入された遺伝子には、本来生体が備えているフィードバック機構が作用しない。そこで本発明者らは、人為的に導入された蛋白質の活性を制御することができる化合物を生体に投与することにより、ある種のフィードバック機構を実現できるのではないかと考えた。

そして本発明者らは、生体に人為的に導入した遺伝子に対して、その発現産物の活性に干渉する物質を生体中で共存させることによって、当該活性を制御することができることを明らかにし本発明を完成した。すなわち本発明は、以下に述べる生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御する方法、並びにそのためのベクターに関する。

〔1〕生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を共存させることによって、当該発現産物の活性を制御する方法。

〔2〕発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子を同じ生体内で発現

させることによって共存させる〔１〕に記載の方法。

〔３〕 発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子が、ネーキッドＤＮＡからなる発現ベクターによって生体に導入される〔２〕に記載の方法。

〔４〕発現ベクターが、エレクトロポレーション法により生体に導入される〔３〕に記載の方法。

〔５〕発現産物の活性に干渉する蛋白質が、この発現産物の受容体、この発現産物の活性中和抗体、およびそれらの活性部位を含む蛋白質からなる群から選択される蛋白質である〔１〕に記載の方法。

〔６〕発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子が、誘導型のプロモーターの制御下で発現するものである〔２〕に記載の方法。

〔７〕〔１〕に記載の方法によって、遺伝子治療において導入された遺伝子発現産物の活性を制御する方法。

〔８〕導入された遺伝子が、血液蛋白質、サイトカイン、およびホルモンから選択されるいずれかの群に属する蛋白質の遺伝子である〔７〕に記載の方法。

〔９〕血液蛋白質、サイトカイン、およびホルモンから選択されるいずれかの群に属する蛋白質が、下記の群より選択されたいずれかの蛋白質である〔８〕に記載の方法。

エリスロポエチン	顆粒球－コロニー刺激因子
顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子	ステムセルファクター
スロンボポエチン	腫瘍壊死因子α
トランスフォーミング成長因子β	ＣＤ４
ＣＤ４５	骨形成因子
インターフェロン－α	インターフェロン－γ
インターロイキン－１	インターロイキン－２
インターロイキン－６	インターロイキン－１１
インターロイキン－１２	表皮細胞成長因子

酸性線維芽細胞成長因子　塩基性線維芽細胞成長因子
線維芽細胞成長因子－Ｉ　血小板由来成長因子
血管内皮成長因子　神経成長因子
脳由来神経栄養因子　インシュリン様成長因子－Ｉ
インシュリン様成長因子－ＩＩ　ヒト成長ホルモン
パラサイロイドホルモン　血管新生阻害因子、
色素上皮由来因子、　および肝細胞成長因子

〔１０〕蛋白質が、エリスロポエチンである〔９〕に記載の方法。

〔１１〕発現産物の活性に干渉する蛋白質が、可溶化したエリスロポエチン受容体である〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕発現物質の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である〔１〕に記載の方法。

〔１３〕生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を同じ生体内において発現することができる、当該発現産物の活性を制御するための発現ベクター。

〔１４〕発現産物の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である〔１３〕に記載の発現ベクター。

〔１５〕〔１３〕に記載の発現ベクターを有効成分として含む、生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御するための組成物。

〔１６〕生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を同じ生体内において発現することができる発現ベクターの、生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御するための組成物の製造における使用。

〔１７〕発現産物の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である、〔１６〕に記載の発現ベクターの使用。

本発明において、生体に導入された遺伝子とは、その目的に関わらず、人為的に生体に導入されたあらゆる遺伝子を言う。たとえば、遺伝子治療を目的として

人為的に導入された遺伝子は、その代表的なものである。治療以外の目的でも、その生物が本来備えていない形質を導入するために、しばしば外来遺伝子の導入が試みられる。たとえば、動物に有用蛋白質を生産させるために導入される遺伝子なども、本発明における人為的に生体に導入された遺伝子に含まれる。

本発明は、動物の血中に遺伝子産物を発現させることにより、導入した遺伝子の目的を達成するものにおいて、特に有用である。発現産物の過剰発現が局所に限定される場合に比べ、血中に存在する発現産物は全身的な影響を与える。したがって、人為的に生体に導入される遺伝子の中でも、動物において血中に遺伝子発現産物を産生させる場合に、特にその蛋白質の活性の制御が重要になる。本発明において、発現産物の血液への供給を目的として導入される遺伝子として、血液蛋白質、サイトカイン、およびホルモンのいずれかに属する蛋白質をコードする遺伝子を示すことができる。血液蛋白質とは、アルブミン、グロブリン、フェリチン、あるいは各種酵素などの、血液中に含まれる各種の蛋白質を含む用語である。一方、サイトカイン、およびホルモンとしては、より具体的には、たとえば以下の蛋白質の遺伝子を例示することができる。

エリスロポエチン(erythropoietin;EPO)

顆粒球ーコロニー刺激因子(granulocyte colony stimulating factor; G-CSF)

顆粒球マクロファージーコロニー刺激因子(granulocyte macropharge colony stimulating factor; GM-CSF)

ステムセルファクター (stem cell factor;SCF)

スロンボポエチン (thrombopoietin;TPO)

腫瘍壊死因子α(tumor necrosis factor; TNF-α)

トランスフォーミング成長因子β(transforming growth factor; TGF-β)

ＣＤ４

ＣＤ４５

骨形成因子(bone morphogenetic protein; BMP)

インターフェロンーα(interferon-α;IFN-α)

インターフェロンーγ(interferon-γ;IFN-γ)

インターロイキンー1(interleukin; IL-1)

インターロイキンー2(interleukin; IL-2)

インターロイキンー6(interleukin; IL-6)

インターロイキンー11 (interleukin; IL-11)

インターロイキンー12 (interleukin; IL-12)

表皮細胞成長因子(epidermal growth factor; EGF)

酸性線維芽細胞成長因子 (acidic fibroblast growth factor;aFGF)

塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor;bFGF)

線維芽細胞成長因子ーI (fibroblast growth factor I;FGF-I)

血小板由来成長因子(platelet derived growth factor; PDGF)

血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor;VEGF)

神経成長因子(nerve growth factor; NGF)

脳由来神経栄養因子(brain derived neurotrophic factor; BDNF)

インシュリン様成長因子-I (insulin like growth factor-I;IGF-I)

インシュリン様成長因子-II (insulin like growth factor-II;IGF-II)

ヒト成長ホルモン (human growth hormone; hGH)

パラサイロイドホルモン(parathyroid hormone; PTH)

血管新生阻害因子(angiostatin)

色素上皮由来因子 (pigment epithelial cell derived facctor;PEDF)

肝細胞成長因子(hepatocyte growth factor; HGF)

本発明において、前記遺伝子発現産物の活性に干渉する蛋白質とは、何らかの機序により、前記遺伝子発現産物の活性を修飾することができる蛋白質を言う。本発明において、前記活性に干渉する蛋白質を干渉物質と記載する。また本発明

において、前記遺伝子発現産物の活性を干渉物質の量によって変化させ、目的とするレベルに近づけることを制御と言う。本発明において制御とは、前記活性を抑制する場合のみならず、上昇させる場合も含まれる。干渉物質には、具体的には、結合、分解、あるいは競合等によって、前記活性に干渉する蛋白質を示すことができる。具体的には、前記遺伝子発現産物の受容体、前記遺伝子発現産物の受容体結合部分をブロックして両者の結合を阻害しうる抗体、あるいは前記遺伝子発現産物のアンタゴニストとして作用する蛋白質などを示すことができる。

たとえばEPOに対しては、EPOの受容体や、EPOの受容体結合部分をブロックして両者の結合を阻害しうる抗体、あるいはEPOのアンタゴニストとして作用する蛋白質等を、本発明の干渉物質として示すことができる。またVEGF等の他のサイトカインについても同様に、そのサイトカインをリガンドとする受容体や、抗体を干渉物質として利用することができる。

これらの蛋白質は、前記活性に干渉することができる限り、その活性断片や、活性断片と他の分子との融合体であることができる。たとえば受容体は、リガンド結合領域や、結合領域を含む融合蛋白質を干渉物質として用いることができる。また抗体であれば、その抗原結合領域を含む断片、あるいは１本鎖抗体であることができる。融合体としては、たとえば受容体と抗体のFc部の融合体を示すことができる。抗体のFc部との融合体とすることにより、次のような効果を期待できる。

１）分子量を大きくすることによって分解を防ぎ血中の滞留性が高まる

２）干渉物質の２量体化によって、標的分子への親和性が高まる

更に受容体が宿主にとって異種の蛋白質であるときには、宿主の蛋白質とのキメラ化によって、生体における安定性の向上が期待できる。融合体は、融合体をコードするキメラ遺伝子の発現によって生体内に導入することができる。

干渉物質は、投与の対象となる生体に由来するものであることが望ましい。したがって、たとえばヒトに対して本発明の方法を適用する場合には、ヒトに由来

する蛋白質を利用するのが望ましい。同じ生体に由来する蛋白質を用いることにより、免疫機構の攻撃を誘導することのない、より安全な製剤とすることができる。また免疫機構によって干渉物質が排除されることがないので、効果的な投与が期待できる。

干渉物質として抗体やその断片を用いるときには、その一部をヒトのイムノグロブリンの構造に置換することにより、安全性を高めることができる。すなわち、キメラ抗体や、CDR グラフトなどの技術により、ヒト以外の種に由来するイムノグロブリンの一部をヒト化することができる。このようにして得ることができるヒト化蛋白質は、本発明をヒトに適用する場合の干渉物質として好ましい。

本発明の干渉物質は、前記遺伝子産物の過剰な発現が見られたときに、当該遺伝子産物が存在する場所に投与される。たとえば血中において前記遺伝子産物の過剰な発現が見られるときには、血中において干渉物質が活性の制御に有効な量で存在できるように、経口的に、あるいは非経口的に投与される。投与方法は特に限定されない。また本発明の干渉物質を、高分子化合物との結合物として投与することによって、血中滞留性の向上を期待することもできる。高分子化合物としては、ヒアルロン酸、ポリエチレングリコール、あるいはアルブミンなどを示すことができる。

本発明において、蛋白質からなる干渉物質の投与の方法として遺伝子治療を応用することができる。すなわち、干渉物質をコードするDNAを公知のベクターに組み込んで生体に投与することができる。遺伝子として投与し、当該生体の体内で発現される干渉物質は、その蛋白質が同じ生体に由来するものである場合には、免疫機構を刺激することが無いので安全である。また、生体内で産生が継続するうえに、免疫機構の攻撃を受けないことから、その効果を確実にかつ持続的に得ることができる。更に、蛋白質を工業的に生産し、精製するのに比べて、遺伝子治療用の製剤は、はるかに小規模な生産設備で安全な製剤を安価に製造することができる。

干渉物質をコードするDNAの投与とその発現によって、生体中で干渉物質を共存させるとき、干渉物質は活性を制御すべき蛋白質が存在している場所に供給できるように発現させるのが望ましい。たとえば、血液中に存在する蛋白質の活性を制御するときには、干渉物質を分泌蛋白質として発現させることができる。本発明においては、このように分泌蛋白質として発現された干渉物質を、可溶性の蛋白質と言う。

たとえば受容体のような膜蛋白質を干渉物質として用いるときには、そのリガンド結合領域を分泌蛋白質として発現させることができる。更に具体的な例を示せば、EPOに対してEPO受容体を用いる場合には、EPO受容体のN末端側1～222位のアミノ酸残基を含み、かつ膜貫通領域を含まないアミノ酸配列をコードするDNAを利用することができる。このようなアミノ酸配列からなる蛋白質を分泌蛋白として発現させるには、さらにそのN末端に分泌シグナルを付加する。たとえば、ヒトEPO受容体のcDNAによってコードされる前駆体蛋白質においては、その1～246位が分泌シグナルとリガンド結合領域を含む。分泌シグナルは、EPO受容体に由来するアミノ酸配列であることもできるし、生体の細胞で機能することができる他の種に由来する分泌シグナルであってもよい。本発明においては、このようにして分泌蛋白として発現されたEPO受容体を、可溶性のEPO受容体という。

干渉物質をコードするDNAは、ウイルスベクターや、DNAの直接投与によって生体に導入することができる。ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)等を利用した多くのベクターが開発されている。またDNAの直接投与とは、ウイルス構造を持たない真核細胞用の発現ベクターを *in vivo*、*in situ*、あるいは *ex vivo* で生体に投与する方法である。生体に外来遺伝子を人為的に導入する方法は、既に多くの方法が試みられている。本発明は、公知の遺伝子導入方法によって人的に導入されたあらゆる遺伝子の発現産物に適用することができる。

より具体的には、たとえば次に示すようなベクターが生体への遺伝子導入の目的で使用されている。これらのベクターは、いずれも本発明における干渉物質をコードするDNAの導入のために用いうる。

プラスミド発現ベクター(plasmid expression vector)

：pVR、pCMV、pCAGGS、

複製能欠損アデノウイルスベクター(deplication defective adenovirus)

：AdEF1、AdMLP、

レトロウイルスベクター(retrovirus vector)：LrEPSN、

アデノ随伴ウイルスベクター(Adeno associated vector)

：rAAV-ET、AdCMV

これらの各種のベクターの中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクターでは、導入したベクターが他の細胞に感染していく現象が起きる可能性がある。この現象はバイスタンダー効果と呼ばれ、導入した遺伝子の持続的な発現をもたらすため、発現強度を期待するときには有効である。ところが本発明における干渉物質は、もともと治療のために導入された遺伝子の発現産物の活性を制御することが目的であるから、予想を越える持続的な発現は治療効果に対して競合的に作用する恐れがある。

ただし、ウイルスベクターを用いる方法であっても、干渉物質の発現を制御するプロモーターを誘導型のプロモーターとすることにより、本発明に利用することができる。具体的には、たとえば特定の薬剤によって発現を誘導できるプロモーターを利用すれば、薬剤の投与によって干渉物質の発現を制御することができる。このようなウイルスベクターでは、ベクターの持続感染が生じたとしても、干渉物質で制御すべき遺伝子発現産物の活性に対する必要以上の抑制を避けることができる。

したがって本発明においては、発現制御領域と、導入すべき遺伝子とを含む最低限の要素のみからなる発現ベクターを用いた遺伝子治療が、干渉物質をコード

するDNAの望ましい導入方法として挙げられる。

一般的な発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化配列等の発現制御領域、そして発現させるための外来遺伝子等から構成される。ウイルスベクターではなく、このような発現ベクターを利用する方法は、ネーキッドDNA法と呼ばれている。本発明において、ネーキッドDNAとは、DNAのみからなる発現ベクターと定義される。

したがってネーキッドDNAは、ウイルスベクターに見られるような蛋白質や糖等の生物学的な構造は持たない。ネーキッドDNA法では、遺伝子の発現が一過性で、かつ細胞から細胞へのベクターの自発的な感染（バイスタンダー効果）が起きず、ホストの染色体に組み込まれる危険性もないことから、本発明における望ましい遺伝子導入方法である。またウイルスベクターと比較して、安価に多量のベクターを調製できる点でも、ネーキッドDNAは有利である。これらの遺伝子導入方法は、いずれも本発明の干渉物質をコードするDNAの導入方法として応用することができる。

ネーキッドDNA法を本発明における干渉物質の発現に利用するには、たとえば以下のような発現ベクターを構築する。すなわち発現ベクターは、干渉物質をコードするDNA、プロモーター領域、転写終了シグナルを特定する3'に位置する領域、およびポリアデニル化部位等で構成される。このプロモーター領域は、干渉物質をコードするDNAを発現するために当該細胞中または生体内で機能しうるものとする。

プロモーター領域は、干渉物質をコードするDNAを発現させることができれば、たとえば他の生物や、他の遺伝子に由来するものであることもできる。たとえば、他の真核細胞遺伝子やウイルス遺伝子に由来するプロモーターを用いることもできる。プロモーターの特異性は、干渉物質をコードするDNAを発現することができれば、必ずしも特異的である必要はない。プロモーターとして、誘導型のプロモーターを用いれば、その発現を誘導条件によって制御することもできる。

あるいはプロモーターとして組織特異性を有するものを用いれば、臓器特異的に干渉物質を発現させることもできる。したがって、遺伝子発現産物の過剰発現が実際に障害を与える組織において、干渉物質を発現させるといった応用も可能である。更に、例えばEPO過剰発現で組織の酸素供給が飽和している場合は、逆に高酸素に応答するプロモーター領域を、導入する干渉物質をコードする遺伝子の上流に組み込んでおくことによって人工的なフィードバックループを構成することができる。具体的には、たとえば以下のような遺伝子のプロモーターを用いることができる。

非特異的プロモーター

ニワトリのβアクチン、平滑筋のαアクチン、 チミジンキナーゼ、

メタロチオネイン、 インターフェロン、 免疫グロブリン

誘導型のプロモーター

ステロイドホルモンのレセプター

ウイルス由来のプロモーター

SV40、 B型肝炎ウイルス、

アデノウイルス主要後期遺伝子

プロモーターは、他の発現制御領域を構成する塩基配列の導入によって改変されたものであっても良い。たとえばニワトリβアクチンプロモーターでは、その一部をウサギのβ－グロビン遺伝子由来のスプラインシングアクセプターに改変することにより、遺伝子の転写効率が向上することが知られている（特許第2824434号,1998年）。

発現ベクターは、プロモーター以外にもターミネーターやエンハンサーを含むことができる。これらの発現制御領域についても、プロモーターと同様に、導入すべき遺伝子のもののみならず、他の遺伝子や、他の種に由来する発現制御領域を用いることもできる。

干渉物質をコードするDNAを発現することができるネーキッドDNAは、公知の

方法により生体に導入することができる。たとえば、発現ベクターを導入した皮膚細胞や血液細胞を生体に移植することにより、*ex vivo* での DNA の導入が行われる。皮膚細胞を利用した場合には、これを取り除くことで容易に干渉物質の発現レベルを調整することができる。細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法等を利用することができる。生体へのエレクトロポレーションによるネーキッド DNA の導入は、例えば以下のようにして行われる。すなわち、DNA を脚部の筋肉に注射後、その注入部位を挟むように電極をセットし、エレクトロポレーション法でパルスで電圧を与える。また、移植臓器に導入する場合は、DNA 注入した臓器を生理食塩水等の溶液中で浸した状態で、電極を臓器に直接当てず溶液液全体をパルス刺激するエレクトロポレーション法を用いた組織の損傷を抑えた方法で、効率のよい導入が可能となる。あるいはハイドロゲル法によって、静脈内投与法により、肝臓・腎臓等の臓器で干渉物質をコードする DNA を発現させることもできる。TransIT In Vivo Gene Delivery System(Mirus 社)等を用いた静脈内投与による遺伝子導入を応用することもできる。

更に、干渉物質をコードする DNA の導入にあたり、取り扱いの容易なリポゾーム法と、効率の高いウイルスベクターの特徴をあわせもつ HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan) -リポゾーム法を利用することもできる。この手法は、非分裂細胞にも効率よく DNA を導入・発現可能であり、発現期間は一過性であるが、ホストのゲノムには挿入されない特徴を有する。したがって、本発明における干渉物質をコードする DNA の発現系として、ネーキッド DNA と同様に望ましい発現系であると言うことができる。

このようにして導入された干渉物質をコードする DNA は、導入された細胞で発現し、生体内において干渉物質を産生する。産生された干渉物質は、人為的に導入された遺伝子の発現産物の活性を抑制する。干渉物質の発現は、形質転換された細胞の寿命とともに弱まり、やがて消失するので、人為的に導入された遺伝子の発現産物の活性を必要以上に弱める作用は無い。

図面の簡単な説明

図１は、発現ベクターの構造を模式的に示した図である。

図２は、pCAGGS-EPO 及び pCAGGS を導入したラットの血液におけるヘマトクリット値の変化を示したグラフである。縦軸はヘマトクリット値（%）を、横軸は pCAGGS-EPO 後の経過時間（週）を示す。図中、*:p＜0.05、**:p＜0.01、***:p＜0.001、****:p＜0.0001

図３は、血中ヘマトクリットレベルの変化を示したグラフである。縦軸はヘマトクリット値（%）を、横軸は経過時間（週）を示す。各群ともに n=9。図中、*:p＜0.05、***:p＜0.001、****:p＜0.0001、#:p＜0.05、##:p＜0.01、###:p＜0.0001、####:p＜0.0001、&:p＜0.05、&&:p＜0.001

図４は、血中網状赤血球数の変化を示したグラフである。縦軸は網状赤血球数（$\times 10^4/\mu l$）を、横軸は経過時間（週）を示す。各群ともに n=9。図中、*:p＜0.05、**:p＜0.01、***:p＜0.001、****:p＜0.0001、#:p＜0.05、###:p＜0.0001、####:p＜0.0001、&&&:p＜0.001

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。本実施例で用いた動物は、8 週齢の雄性ラット(SD, Charles River Inc 東京)を実験開始前に pathogen-free の条件下 12 時間の明暗サイクルで一週間以上飼育した。全ての動物は水と標準食（23.8% protein; 0.24% sodium; 0.0154% iron 含有、MF, Oriental Yeast, 東京）を自由に摂取させた。

[実施例１] プラスミドベクターの調製

プラスミド pCAGGS-Epo はラット EPO cDNA を発現ベクターである pCAGGS (Niwa H et al., Gene, 1991, 108, 193-199) の XhoI site に挿入することで構築し

た。またプラスミド pCAGGS-hSEPOR2 は、ヒト可溶性 EPO 受容体（特許公開番号：WO 99-53313、hSEPOR2）の cDNA を、同じく発現ベクターである pCAGGS の XhoI site に挿入することで構築した。各プラスミドは、Qiagen EndoFree plasmid Giga kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて精製した（Maruyama H et al., Human Gene Therapy, 2000,11,429-437）。本実施例で構築した発現ベクターの構造を図１に示した。その塩基配列は、ヒト可溶性 EPO 受容体をコードする場合の塩基配列は配列番号：１に示した。またラット EPO をコードする場合の塩基配列は配列番号：２に示した。

対照として pCAGGS plasmid を用いた。得られた DNA は滅菌した phosphate-buffered saline(PBS)で溶解し、注入時の濃度が２μg/μl となるように調製した。

[実施例２] pCAGGS-Epo 及び pCAGGS の導入

エレクトロポレーション(Electroporation)法による筋肉内への plasmid DNA の注入は以前報告した方法（Maruyama H et al., Human Gene Therapy, 2000,11, 429-437）に準じて行った。pCAGGS-Epo 及び pCAGGS の、50μg plasmid DNA を左右の下肢の内側（medial）及び外側部分（lateral site）に注入した（total 200μg）。次に pair になった幅 10mm、長さ５mm の２本の stainless steel 電極を DNA 注入部位が中心となるよう設置し、electric pulse generator (Electro Seequre Porator T820; BTX)を用いて、電気 pulse (duration 50 msec, 100V, 1 pulse/s で 8 pulses）を与えた。

遺伝子導入後、動物をジエチルエーテルで軽く麻酔し、Ohwada らの方法（Ohwada K., Exp. Anim., 1986, 35, 353-355）で心臓から 2ml 採血し、血清中の EPO レベルを Recombigen EPO kit(Nippon DPC,千葉)を用いて測定した。赤血球、ヘマトクリット、ヘモグロビン、白血球、血小板は Sysmex SE-900(Sysmex 兵庫)で、網状赤血球（Reticulocytes）は Sysmex R-3500 で測定した。

結果を図２に示す。実験結果は平均値±標準誤差で表示し、統計的有意差は対

応のないｔ検定で検定し、$p<0.05$ を有意とした。EPO を遺伝子導入すると、その後ヘマトクリット値が上昇し、3 週間後でほぼピークとなった（図２）。一方、対照 plasmid DNA 導入群は導入前と比べ４週間後にヘマトクリット値の上昇が見られたが、EPO 遺伝子導入群と比べるとその程度は僅かなものであった。

［実施例３］ pCAGGS-hSEPOR2 の導入

実施例２でヘマトクリットの上昇を確認できた個体に、４週間目にヒト EPO 可溶性受容体発現ベクター（pCAGGS-hSEPOR2）を遺伝子導入した。pCAGGS-hSEPOR2 は左右の大腿部筋肉内に、実施例２と同様に計８００μg となるよう注入した。エレクトロポレーションおよび血液採取も実施例２と同様にして行った。

ヒト EPO 可溶性受容体発現ベクターを導入した群のヘマトクリット値は、非導入群と比べ減少傾向を示し、5 週間目及び 13 週目には有意なヘマトクリットの減少が確認された。対照群に４週間後 EPO 可溶性受容体を導入した場合はその後ヘマトクリット値は変化せず、更に低下して貧血症状を呈することは無かった。

以上の結果から、可溶性受容体を生体内に導入することで、治療目的で導入した遺伝子による過剰な作用を確実に制御できることが明らかとなった。また、導入遺伝子の発現レベルが減少している時期（本実験では 15 週以降）や、対照群のような外部由来の導入遺伝子の発現レベルがゼロである正常な condition に対して、さらにそのレベルを低下させるような強い副作用は確認されず、安全性の高い制御法と考えられる。

［実施例４］ ヒト EPO 受容体-IgG Fc キメラ遺伝子導入によるラット EPO レベルの制御

先の実施例では、ラット EPO の作用をヒト可溶性 EPO 受容体で抑制した。本実施例においては、ヒト可溶性受容体を、ラットの IgGFc とのキメラ蛋白質とすることによって、その作用がどのように変化するかを確かめた。

IgG1Fc の cDNA を、市販のラット脾臓のライブラリー（Quick Clone、クローンテック社）から PCR 法によりクローニングした。IgG1Fc の cDNA を実施例 1 と同様にして発現ベクターpCAGGS に挿入して、ラット IgGFc 発現プラスミド pCAGGS-IgG1Fc を構築した。更に、IgG1Fc の cDNA と hEPOR を連結したキメラの cDNA を実施例 1 記載の方法と同様の方法で発現ベクターpCAGGS の XhoI site に挿入してキメラ蛋白質発現プラスミド pCAGGS-hSEPOR2-IgG1Fc を構築した。キメラ蛋白質発現プラスミド pCAGGS-hSEPOR2-IgG1Fc のインサートの塩基配列を配列番号：3 に示す。各プラスミドは、実施例 1 と同様に精製し、以下の実験に用いた。

エレクトロポレーション法により動物（ラット）の筋肉内に pCAGGS-Epo 100 μg を左右下肢の内側、外側部に注入した（total 400μg）。pCAGGS-Epo は、ラットの Epo を発現するプラスミドである。遺伝子導入 1 週間後、および 2 週間後に血中 EPO レベルの上昇を確認後、3 週間後に pCAGGS-IgG1Fc、pCAGGS-hSEPOR2、及び pCAGGS-hSEPOR2-IgG1Fc プラスミドのそれぞれ 800μg を *Trans*IT® *In Vivo* Gene Delivery System (Mirus, MIR5125)を用いてラット尾静脈より導入した（Liu F, Song YK, Liu D, Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, Gene Therapy, 1999, 6, 1258-1266）。

その後、経時的に採血を行い、血中 EPO レベル、ヘマトクリット値、網状赤血球数（reticulocyte）を 24 週間後まで計測した。統計的な有意差検定は対応の無い t 検定を行い、5%以下の危険率を有意とみなした。

pCAGGS-hEPO プラスミッドを導入後 EPO の上昇した動物について、上昇の程度が各群同程度となるよう群分けし、尾静脈から各可溶性ヒト EPO 受容体を導入した。その結果、導入 EPO により血清 EPO レベルは 1 週間後にピークとなり、その後徐々に減少した（データ示さず）。一方、ヘマトクリット値は導入後より上昇し、4 週間後にピークとなりその後ほぼ一定値を保った。その後は、初めのピーク値に対して有意ではないものの、16 週間後に再び上昇し 24 週間後もこのレベ

ルを維持した（図3）。

これに対して、hSEPOR2-IgG1Fc キメラ蛋白質発現プラスミド導入群では、4週間後から24週間後にわたって、EPO 導入群に比べ有意にヘマトクリット値を低下させた（図3）。IgG1Fc や可溶性ヒト EPO 受容体を導入した群では、EPO 単独導入群と比べてヘマトクリット値を下げる傾向は見られるものの、両者の差は有意ではなかった。hSEPOR2-IgG1Fc キメラ蛋白質の作用は、IgG1Fc 導入群と比較しても有意であり、可溶性ヒト EPO 受容体導入群に比べても、4週～12週間後にわたって有意に強い効果を示した（図3）。

網状赤血球数は、ラット EPO 導入1週間後にピークを示し、その後急速に低下する。IgG1Fc や EPO 受容体導入によって、EPO 遺伝子単独導入群と比べて網状赤血球数のレベルに変化は見られない。しかし hSEPOR2-IgG1Fc キメラ蛋白質の導入により、4週間後から24週間後にわたって網状赤血球数は有意な減少を示す。その作用は IgG1Fc 及び EPO 受容体導入群と比べても有意に強かった（図4）。

以上の結果より、EPO 受容体を単独で発現するのに比べ、ラット IgG1Fc とのキメラ受容体(hSEPOR2-IgG1Fc)の形で導入した方が、上昇した血中の EPO レベルをより強く低下させる作用があることが確認された。

なお実施例2（図2）では EPO 受容体の導入で、上昇したヘマトクリットを有意に低下したのに対して、実施例4（図3）では同じ傾向が見られたものの有意な差ではなかった。この EPO 受容体の効果の違いは、導入したラット Epo(pCAGGS-EPO)の量の違いに起因するものと思われた。pCAGGS-EPO の導入量が、実施例2（図2）の200μg に対して、実施例4（図3）では400μg となっている。つまり実施例4におけるラットの方がより多くの EPO を発現しているために、同量の EPO 受容体では十分に中和できなかった可能性が考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明は、従来の遺伝子治療法では考慮されていなかった導入遺伝子の発現産

物の生体内での活性の制御方法を実現する。生体に人為的に導入した遺伝子の発現レベルが、生理的な濃度を越えて恒常的に発現されれば、生体に対して副作用を示す恐れがある。たとえばEPOの場合には、多血症といった副作用を生じる。

本発明では、干渉物質の投与により、過剰発現に起因する副作用を軽減することができる。実施例では可溶性受容体の遺伝子の導入することによる干渉物質の投与例を示した。この他にも受容体のみならず、中和抗体や、それをコードする遺伝子の導入によっても受容体の同様の効果を得ることができる。

この目的のためにリコンビナントの可溶性受容体蛋白や、抗体蛋白を投与する方法では、抑制作用を得るのに大量の精製蛋白と繰り返し投与を必要とし、そのコストや、通院等の患者の物理的負担も大きくなる。発明者が示した遺伝子導入による方法は、患者自身の組織の細胞で蛋白が作られることから、糖鎖修飾等の点からも抗原性は少なく、効果の持続や、安全性にも優れていると考えられる。また、皮膚に遺伝子導入した場合は、皮膚移植により遺伝子導入のswitchのon/offを簡便に行うことも可能となる。

請求の範囲

1. 生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を共存させることによって、当該発現産物の活性を制御する方法。
2. 発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子を同じ生体内で発現させることによって共存させる請求項1に記載の方法。
3. 発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子が、ネーキッド DNA からなる発現ベクターによって生体に導入される請求項2に記載の方法。
4. 発現ベクターが、エレクトロポレーション法により生体に導入される請求項3に記載の方法。
5. 発現産物の活性に干渉する蛋白質が、この発現産物の受容体、この発現産物の活性中和抗体、およびそれらの活性部位を含む蛋白質からなる群から選択される蛋白質である請求項1に記載の方法。
6. 発現産物の活性に干渉する蛋白質をコードする遺伝子が、誘導型のプロモーターの制御下で発現するものである請求項2に記載の方法。
7. 請求項1に記載の方法によって、遺伝子治療において導入された遺伝子発現産物の活性を制御する方法。
8. 導入された遺伝子が、血液蛋白質、サイトカイン、およびホルモンから選択されるいずれかの群に属する蛋白質の遺伝子である請求項7に記載の方法。
9. 血液蛋白質、サイトカイン、およびホルモンから選択されるいずれかの群に属する蛋白質が、下記の群より選択されたいずれかの蛋白質である請求項8に記載の方法。

エリスロポエチン、　顆粒球－コロニー刺激因子、
顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子、
ステムセルファクター、　スロンボポエチン、

腫瘍壊死因子α、

トランスフォーミング成長因子β、　　ＣＤ４、

ＣＤ４５、　　骨形成因子、

インターフェロンーα、　　インターフェロンーγ、

インターロイキンー１、　　インターロイキンー２、

インターロイキンー６、　　インターロイキンー１１、

インターロイキンー１２、　　表皮細胞成長因子、

酸性線維芽細胞成長因子、　　塩基性線維芽細胞成長因子、

線維芽細胞成長因子－Ｉ、　　血小板由来成長因子、

血管内皮成長因子、　　神経成長因子、

脳由来神経栄養因子、　　インシュリン様成長因子－Ｉ、

インシュリン様成長因子－ＩＩ、　　ヒト成長ホルモン、

パラサイロイドホルモン、　　血管新生阻害因子、

色素上皮由来因子、　　および肝細胞成長因子

１０．蛋白質が、エリスロポエチンである請求項９に記載の方法。

１１．発現産物の活性に干渉する蛋白質が、可溶化したエリスロポエチン受容体である請求項１０に記載の方法。

１２．発現物質の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である請求項１に記載の方法。

１３．生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を同じ生体内において発現することができる、当該発現産物の活性を制御するための発現ベクター。

１４．発現産物の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である請求項１３に記載の発現ベクター。

１５．請求項１３に記載の発現ベクターを有効成分として含む、生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御するための組成物。

16．生体に導入された遺伝子の発現産物の活性に干渉する蛋白質を同じ生体内において発現することができる発現ベクターの、生体に導入された遺伝子の発現産物の活性を制御するための組成物の製造における使用。

17．発現産物の活性に干渉する蛋白質が、他の蛋白質との融合蛋白質である、請求項16に記載の発現ベクターの使用。

図1

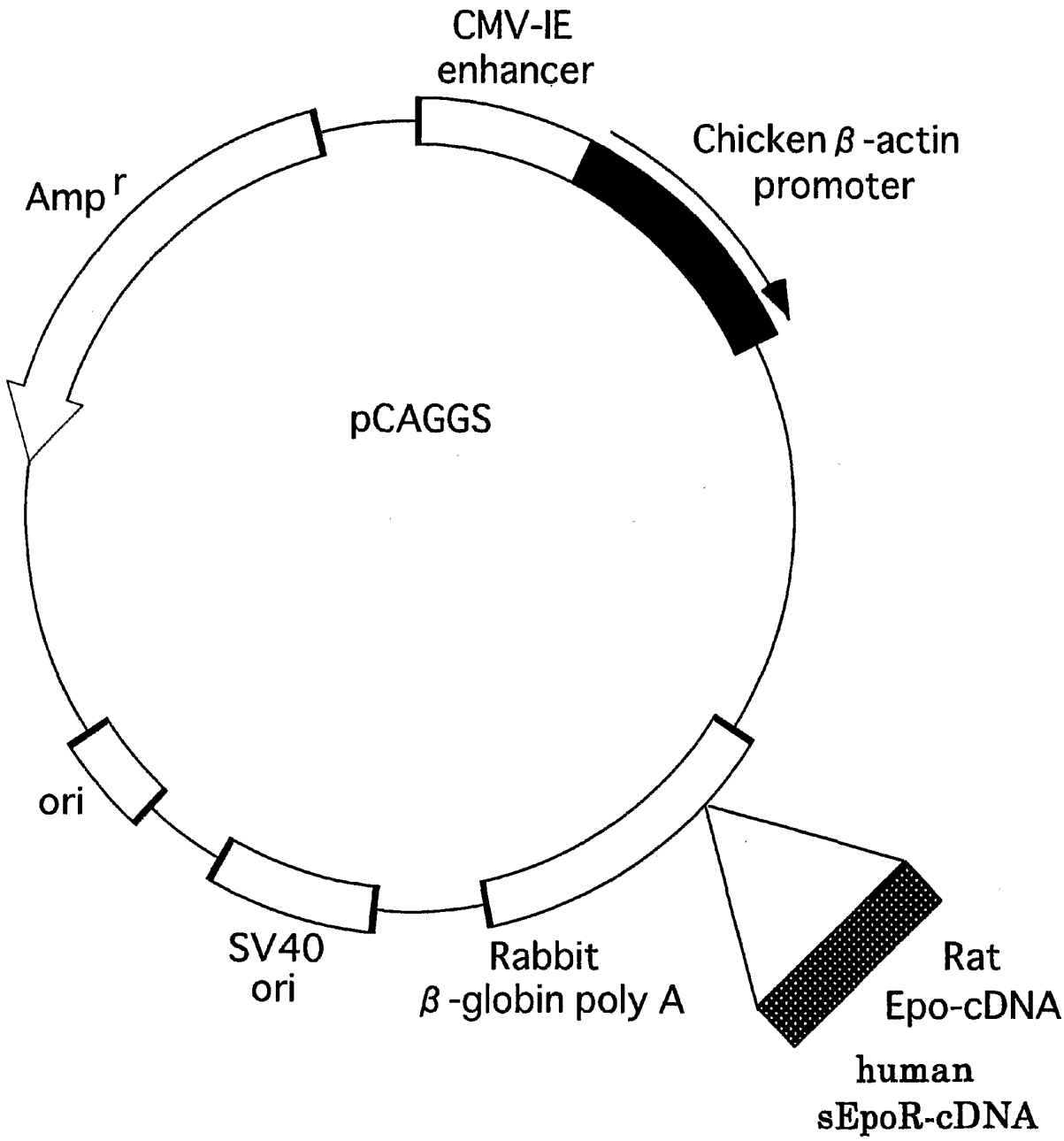

CMV-IE
enhancer
Chicken β-actin
promoter
Amp r
pCAGGS
ori
SV40
ori
Rabbit
β-globin poly A
Rat
Epo-cDNA
human
sEpoR-cDNA

図2

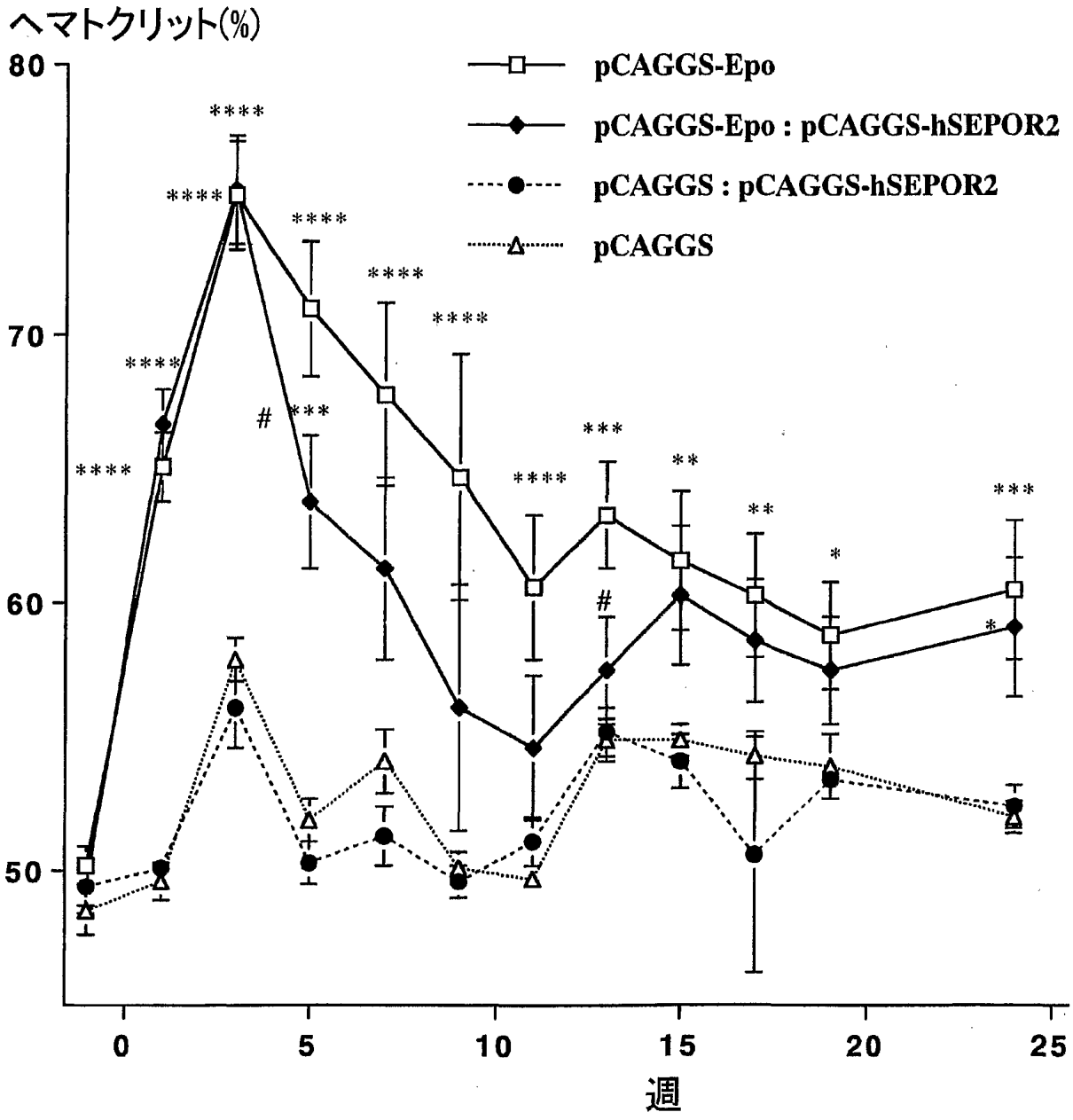

ヘマトクリット(%)
80
70
60
50
0
5
10
15
20
25
週
pCAGGS-Epo
pCAGGS-Epo : pCAGGS-hSEPOR2
pCAGGS : pCAGGS-hSEPOR2
pCAGGS
****
***
**
*
#

図3

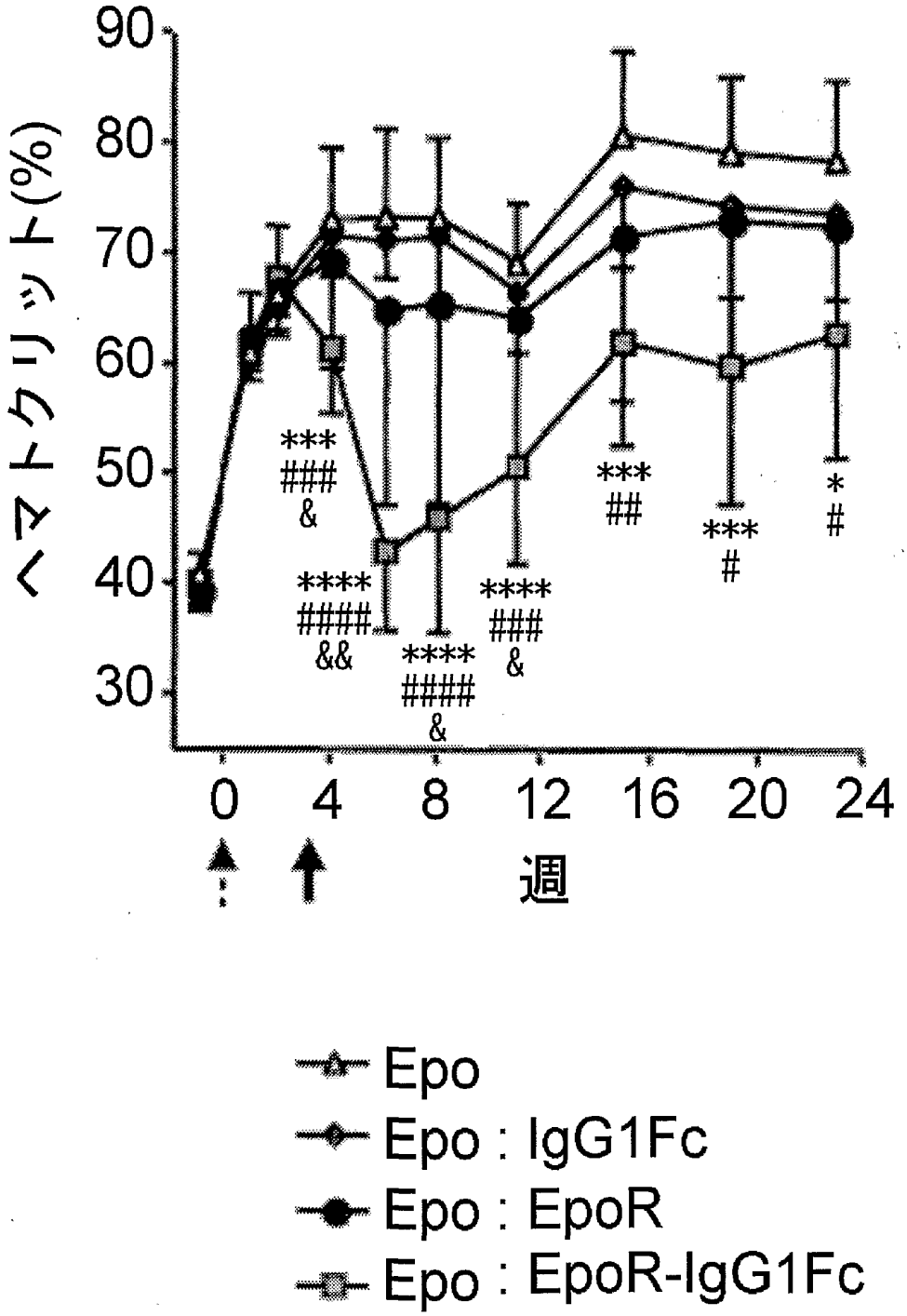
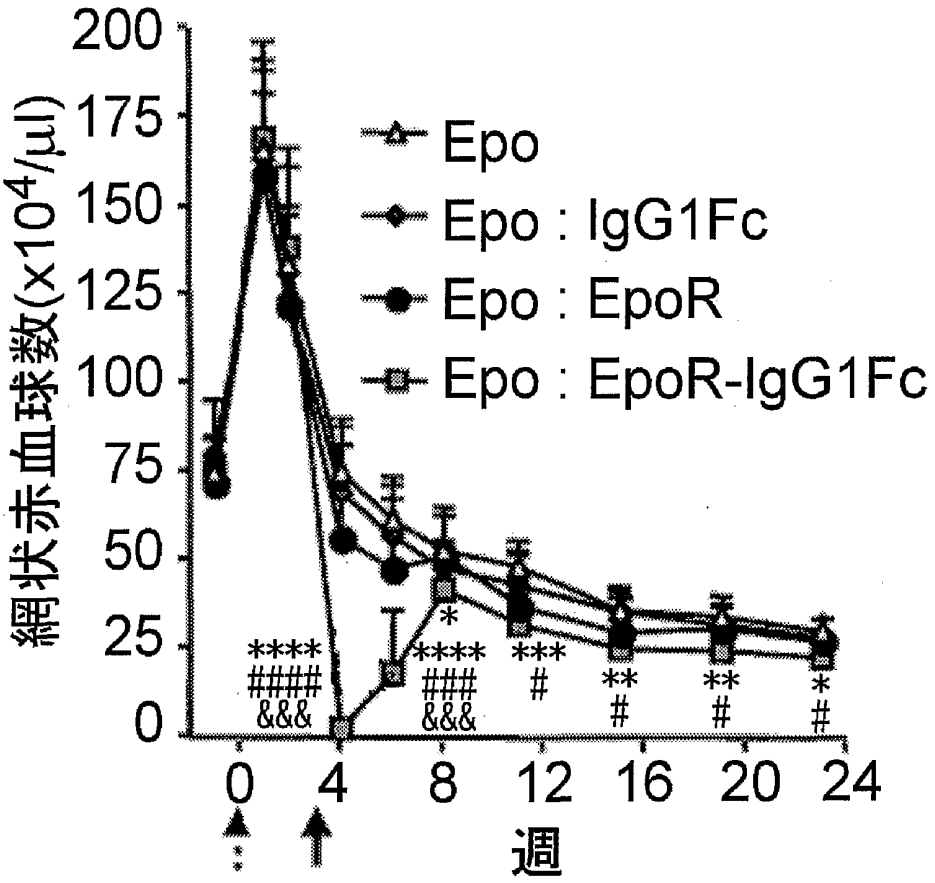

ヘマトクリット(%)
90
80
70
60
50
40
30
0
4
8
12
16
20
24
週
***
###
&
****
####
&&
****
####
&
****
###
&
***
##
***
#
*
#
Epo
Epo : IgG1Fc
Epo : EpoR
Epo : EpoR-IgG1Fc

図4


網状赤血球数(x10^4/μl)
200
175
150
125
100
75
50
25
0
Epo
Epo : IgG1Fc
Epo : EpoR
Epo : EpoR-IgG1Fc
0
4
8
12
16
20
24
週
****
####
&&&
*
****
###
&&&
***
#
**
#
**
#
*
#

SEQUENCE LISTING

<110> MARUYAMA Hiroki

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Method for regulation of activity of

expression product of gene introduced into living body

<130> C1-A0015P

<140>

<141>

<150> JP 2000-358389

<151> 2000-11-24

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5565

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca 480
gcgatggggg cgggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 540
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt 600
tcctttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720
ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc 780
gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggg ctccgggagg gcccttttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg 960
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc 1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080
tgggggggtg agcaggggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaacccccc cctgcacccc 1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc 1200
gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg 1260
ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct 1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccttt gtcccaaatc tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcacccccctc 1440
tagcgggcgc gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500
cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc catctccagc ctcggggctg ccgcaggggg 1560

acggctgcct tcgggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca 1680
acgtgctggt tgttgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attccaattc caccatggac 1740
cacctcgggg cgtccctctg gccccaggtc ggctcccttt gtctcctgct cgctggggcc 1800
gcctgggcgc ccccgcctaa cctcccggac cccaagttcg agagcaaagc ggccttgctg 1860
gcggcccggg ggcccgaaga gcttctgtgc ttcaccgagc ggttggagga cttggtgtgt 1920
ttctgggagg aagcggcgag cgctggggtg ggcccgggca actacagctt ctcctaccag 1980
ctcgaggatg agccatggaa gctgtgtcgc ctgcaccagg ctcccacggc tcgtggtgcg 2040
gtgcgcttct ggtgttcgct gcctacagcc gacacgtcga gcttcgtgcc cctagagttg 2100
cgcgtcacag cagcctccgg cgctccgcga tatcaccgtg tcatccacat caatgaagta 2160
gtgctcctag acgcccccgt ggggctggtg gcgcggttgg ctgacgagag cggccacgta 2220
gtgttgcgct ggctcccgcc gcctgagaca cccatgacgt ctcacatccg ctacgaggtg 2280
gacgtctcgg ccggcaacgg cgcagggagc gtacagaggg tggagatcct ggagggccgc 2340
accgagtgtg tgctgagcaa cctgcggggc cggacgcgct acaccttcgc cgtccgcgcg 2400
cgtatggctg agccgagctt cggcggcttc tggagcgcct ggtcggagcc tgtgtcgctg 2460
ctgacgccta gcgactacaa agacgatgac gataaataag tcgaggaatt cactcctcag 2520
gtgcaggctg cctatcagaa ggtggtggct ggtgtggcca atgccctggc tcacaaatac 2580
cactgagatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 2640
ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaatttttg 2700
tgtctctcac tcggaaggac atatgggagg gcaaatcatt taaaacatca gaatgagtat 2760
ttggtttaga gtttggcaac atatgccata tgctggctgc catgaacaaa ggtggctata 2820
aagaggtcat cagtatatga aacagccccc tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc 2880
cttgacttga ggttagattt tttttatatt ttgttttgtg ttatttttt ctttaacatc 2940
cctaaaattt tccttacatg ttttactagc cagatttttc ctcctctcct gactactccc 3000
agtcatagct gtccctcttc tcttatgaag atccctcgac ctgcagccca agcttggcgt 3060
aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca 3120

tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 3180
taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagcggatcc 3240
gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac 3300
tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccca tggctgacta atttttttta tttatgcaga 3360
ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg 3420
cctaggcttt tgcaaaaagc taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc 3480
aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttttcac tgcattctag ttgtggtttg 3540
tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tggatccgct gcattaatga atcggccaac 3600
gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc 3660
tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt 3720
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 3780
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 3840
agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 3900
accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 3960
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct 4020
gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 4080
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa 4140
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 4200
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaaggacag 4260
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt 4320
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 4380
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 4440
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca 4500
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa 4560
cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat 4620
ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct 4680

taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt 4740
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat 4800
ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta 4860
atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg 4920
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt 4980
tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 5040
cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 5100
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 5160
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa 5220
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac 5280
cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt 5340
ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 5400
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa 5460
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 5520
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctg 5565

<210> 2

<211> 5504

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180

ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca 480
gcgatggggg cgggggggcg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 540
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt 600
tcctttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720
ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc 780
gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg 960
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc 1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaacccccc cctgcacccc 1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc 1200
gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg 1260
ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct 1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccttt gtcccaaatc tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcacccccctc 1440
tagcgggcgc gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500
cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc catctccagc ctcggggctg ccgcaggggg 1560
acggctgcct tcgggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca 1680
acgtgctggt tgttgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcctcgaa tcggagatgg 1740

gggtgcccga acgtcccacc ctgctgcttt tactatcctt gctactgatt cctctgggcc 1800

tcccagtcct ctgcgctccc ccacgcctca tttgcgacag tcgcgttctg gagaggtaca 1860

tcttggaggc caaggaggca gaaaatgtca caatgggctg tgcagaaggt cccagactga 1920

gtgagaatat taccgtccca gataccaaag tcaacttcta cgcttggaaa agaatgaagg 1980

tggaagaaca ggctgtagaa gtttggcaag gcctgtctct gctctcagaa gccatcctgc 2040

aggcccaggc tctgcaggcc aattcctccc agccaccaga gagtcttcag cttcatatag 2100

acaaagccat cagtgggcta cgtagcctca cttcactgct tcgggtgctg ggagctcaga 2160

aggaattgat gtcgcctcca gacgccaccc aagccgctcc actccgaaca ctcacagcgg 2220

atactttctg caagctcttc cgggtctact ccaacttcct ccgggggaaa ctgaagctgt 2280

acacggggga ggcctgcagg agaggggaca ggtgacctgc cactgccgtg tacccgccaa 2340

ctcgctcacc gtcactgtgt cacgccaacc ctccaccact cccaaccctc atcaaacggg 2400

gttgtttgtt accttcttac cggcctgtcc tacgcggcct cgaggaattc actcctcagg 2460

tgcaggctgc ctatcagaag gtggtggctg gtgtggccaa tgccctggct cacaaatacc 2520

actgagatct ttttccctct gccaaaaatt atggggacat catgaagccc cttgagcatc 2580

tgacttctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg aatttttttgt 2640

gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt aaaacatcag aatgagtatt 2700

tggtttagag tttggcaaca tatgccatat gctggctgcc atgaacaaag gtggctataa 2760

agaggtcatc agtatatgaa acagcccccct gctgtccatt ccttattcca tagaaaagcc 2820

ttgacttgag gttagatttt ttttatattt tgttttgtgt tatttttttc tttaacatcc 2880

ctaaaatttt ccttacatgt tttactagcc agatttttcc tcctctcctg actactccca 2940

gtcatagctg tccctcttct cttatgaaga tccctcgacc tgcagcccaa gcttggcgta 3000

atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat 3060

acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt 3120

aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agcggatccg 3180

catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc gcccctaact 3240

ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag 3300

gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc 3360
ctaggctttt gcaaaaagct aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 3420
atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt 3480
ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatccgctg cattaatgaa tcggccaacg 3540
cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct 3600
gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt 3660
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 3720
caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga 3780
gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 3840
ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac 3900
cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg 3960
taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 4020
cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag 4080
acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt 4140
aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 4200
atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg 4260
atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac 4320
gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca 4380
gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 4440
ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 4500
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt 4560
tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 4620
accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt 4680
atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc 4740
cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa 4800
tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg 4860

tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt 4920
gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 4980
agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 5040
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 5100
gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac 5160
tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc 5220
gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt 5280
tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg 5340
aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 5400
catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 5460
acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctg 5504

<210> 3

<211> 6256

<212> DNA

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism:Chimeric gene

<220>

<223> pCAGGS-hSEPOR2 rat IgG1 Fc cDNA

<400> 3

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60

gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca 480
gcgatggggg cgggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 540
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt 600
tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720
ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc 780
gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggg ctccgggagg gcccttttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg 960
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc 1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080
tgggggggtg agcaggggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaacccccc cctgcacccc 1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc 1200
gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg 1260
ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct 1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccttt gtcccaaatc tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcacccccctc 1440
tagcgggcgc gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500
cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc catctccagc ctcggggctg ccgcaggggg 1560
acggctgcct tcgggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620

gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca 1680
acgtgctggt tgttgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcatttaa ataattccac 1740
catggaccac ctcggggcgt ccctctggcc ccaggtcggc tccctttgtc tcctgctcgc 1800
tggggccgcc tgggcgcccc cgcctaacct cccggacccc aagttcgaga gcaaagcggc 1860
cttgctggcg gcccgggggc ccgaagagct tctgtgcttc accgagcggt tggaggactt 1920
ggtgtgtttc tgggaggaag cggcgagcgc tggggtgggc ccgggcaact acagcttctc 1980
ctaccagctc gaggatgagc catggaagct gtgtcgcctg caccaggctc ccacggctcg 2040
tggtgcggtg cgcttctggt gttcgctgcc tacagccgac acgtcgagct tcgtgcccct 2100
agagttgcgc gtcacagcag cctccggcgc tccgcgatat caccgtgtca tccacatcaa 2160
tgaagtagtg ctcctagacg cccccgtggg gctggtggcg cggttggctg acgagagcgg 2220
ccacgtagtg ttgcgctggc tcccgccgcc tgagacaccc atgacgtctc acatccgcta 2280
cgaggtggac gtctcggccg gcaacggcgc agggagcgta cagagggtgg agatcctgga 2340
gggccgcacc gagtgtgtgc tgagcaacct gcggggccgg acgcgctaca ccttcgccgt 2400
ccgcgcgcgt atggctgagc cgagcttcgg cggcttctgg agcgcctggt cggagcctgt 2460
gtcgctgctg acgcctagcg acctggacgc ggccgccgtg cccagaaact gtggaggtga 2520
ttgcaagcct tgtatatgta caggctcaga agtatcatct gtcttcatct tccccccaaa 2580
gcccaaagat gtgctcacca tcactctgac tcctaaggtc acgtgtgttg tggtagacat 2640
tagccaggac gatcccgagg tccatttcag ctggtttgta gatgacgtgg aagtccacac 2700
agctcagact cgaccaccag aggagcagtt caacagcact ttccgctcag tcagtgaact 2760
ccccatcctg caccaggact ggctcaatgg caggacgttc agatgcaagg tcaccagtgc 2820
agctttccca tcccccatcg agaaaaccat ctccaaaccc gaaggcagaa cacaagttcc 2880
gcatgtatac accatgtcac ctaccaagga agagatgatc cagaatgaag tcagtatcac 2940
ctgcatggta aaaggcttct atcccccaga catttatgtg gagtggcaga tgaacgggca 3000
gccacaggaa aactacaaga acactccacc tacgatggac acagatggga gttacttcct 3060
ctacagcaag ctcaatgtga agaaggaaaa atggcagcag ggaaacacgt tcacgtgttc 3120
tgtgctgcat gaaggcctgc acaaccacca tactgagaag agtctctccc actctccggg 3180

taaatgaccc cagagtgaat tcactcctca ggtgcaggct gcctatcaga aggtggtggc 3240
tggtgtggcc aatgccctgg ctcacaaata ccactgagat ctttttccct ctgccaaaaa 3300
ttatggggac atcatgaagc cccttgagca tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat 3360
tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag 3420
ggcaaatcat ttaaaacatc agaatgagta tttggtttag agtttggcaa catatgccat 3480
atgctggctg ccatgaacaa aggtggctat aaagaggtca tcagtatatg aaacagcccc 3540
ctgctgtcca ttccttattc catagaaaag ccttgacttg aggttagatt ttttttatat 3600
tttgttttgt gttatttttt tctttaacat ccctaaaatt ttccttacat gttttactag 3660
ccagattttt cctcctctcc tgactactcc cagtcatagc tgtccctctt ctcttatgaa 3720
gatccctcga cctgcagccc aagcttggcg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga 3780
aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc 3840
tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc 3900
cagtcgggaa acctgtcgtg ccagcggatc cgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc 3960
cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc 4020
atggctgact aatttttttt atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat 4080
tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag ctaacttgtt 4140
tattgcagct tataatggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 4200
atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 4260
ctggatccgc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg 4320
cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg 4380
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga 4440
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg 4500
gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag 4560
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc 4620
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg 4680
ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt 4740

cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc 4800
ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc 4860
actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg 4920
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca 4980
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc 5040
ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 5100
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt 5160
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 5220
tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc 5280
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 5340
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata 5400
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg 5460
gccgagcgca gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc 5520
cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 5580
acaggcatcg tggtgtcacg ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 5640
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccttcggt 5700
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 5760
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac 5820
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca 5880
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 5940
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc 6000
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 6060
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata 6120
ctcatactct tccttttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 6180
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 6240
cgaaaagtgc cacctg 6256

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/08575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K48/00, A61K38/17, A61K39/395, A61K31/711, C12N15/85, A61P43/00

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)
Int.Cl[7] A61K48/00, A61K38/17, A61K39/395, A61K31/711, C12N15/85, A61P43/00

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 practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/12970 A1 (Cancer Research Campaign Technology, Limited), 10 April, 1997 (10.04.1997), Claims & GB 2305920 A1 & EP 870018 A1 & AU 9671386 A1 & JP 11-513251 A	13-17
X	WO 95/09655 A1 (United States Department of Health and Human Services), 13 April, 1995 (13.04.1995), Claims & EP 722343 A1 & CA 2173495 A & JP 9-504518 A	13-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 principle 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 December, 2001 (18.12.01)	25 December, 2001 (25.12.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/08575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/22617 A1 (Universite Pierre et Marie Curie (Paris VI)), 24 August, 1995 (24.08.1995), Claims & EP 738327 A1 & EP 855185 A2 & FR 2716461 A1 & FR 2716459 A1 & CA 2183151 A & AU 9518518 A1 & ZA 9501451 A & JP 9-509060 A & NO 9603358 A & FI 9603246 A & US 5948675 A	13-17
X	WO 96/40955 A1 (Graham, Frank L.), 19 December, 1996 (19.12.1996), Claims & EP 832267 A1 & US 5919676 A & US 6140087 A & CA 2220997 A & AU 9658897 A1 & JP 11-506334 A & US 6080569 A	13-17
X	WO 95/24485 A2 (Merck and Co., Inc.), 14 September, 1995 (14.09.1995), Claims & EP 749484 A1 & CA 2184345 A & AU 9519385 A1 & CN 1147834 A & HU 75549 A2 & JP 9-510097 A & ZA 9501826 A & FI 9603513 A & NO 9603738 A & AU 9895193 A1	13-17
X	WO 98/35028 A2 (Baxter International, Inc.), 13 August, 1998 (13.08.1998), Claims & EP 968281 A2 & JP 2001-511012 A	13-17
X A	MARUYAMA, Hiroki et al., "Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation", Hum. Gene Ther., (2000), 11(3), pages 429 to 437	13-14 15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/08575

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject as set forth in each of the above claims pertains to "methods for treatment of the human body by therapy" (Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The expression vectors relating to the inventions as set forth in claims 13 and 14 are substantially undistinguishable from publicly known ones as the substances per se.

Such being the case, it cannot be recognized that the inventions as set forth in the above claims contribute to the prior art. Therefore, it does not appear that there is a technical relationship between the above inventions and the inventions as set forth in claims 1 to 12 and 15 to 17 involving special technical features clearly indicating the contribution to the prior art, namely, the requirement for the unity of inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０８５７５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl.[7] A61K48/00, A61K38/17, A61K39/395, A61K31/711, C12N15/85, A61P43/00

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl.[7] A61K48/00, A61K38/17, A61K39/395, A61K31/711, C12N15/85, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CAPLUS(STN), MEDLINE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 97/12970 A1 (Cancer Research Campaign Technology Limited) 10.4月.1997 (10.04.97)　特許請求の範囲を参照 &GB 2305920 A1　&EP 870018 A1　&AU 9671386 A1 &JP 11-513251 A	13-17
X	WO 95/09655 A1 (United States Dept. of Health and Human Services) 13.4月.1995 (13.04.95)　特許請求の範囲を参照 &EP 722343 A1　&CA 2173495 A　&JP 9-504518 A	13-17

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１８．１２．０１	25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｐ	９７３７
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	高岡　裕美		
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２		

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 95/22617 A1 (Universite Pierre et Marie Curie (Paris VI)) 24.8月.1995 (24.08.95)　特許請求の範囲を参照 &EP 738327 A1　&EP 855185 A2　&FR 2716461 A1 &FR 2716459 A1　&CA 2183151 A　&AU 9518518 A1 &ZA 9501451 A　&JP 9-509060 A　&NO 9603358 A &FI 9603246 A　&US 5948675 A	13-17
X	WO 96/40955 A1 (Graham, Frank L.) 19.12月.1996 (19.12.96)　特許請求の範囲を参照 &EP 832267 A1　&US 5919676 A　&US 6140087 A &CA 2220997 A　&AU 9658897 A1　&JP 11-506334 A &US 6080569 A	13-17
X	WO 95/24485 A2 (Merck and Co., Inc.) 14.9月.1995 (14.09.95)　特許請求の範囲を参照 &EP 749484 A1　&CA 2184345 A　&AU 9519385 A1 &CN 1147834 A　&HU 75549 A2　&JP 9-510097 A &ZA 9501826 A　&FI 9603513 A　&NO 9603738 A &AU 9895193 A1	13-17
X	WO 98/35028 A2 (Baxter International Inc.) 13.8月.1998 (13.08.98)　特許請求の範囲を参照 &EP 968281 A2　&JP 2001-511012 A	13-17
X A	MARUYAMA Hiroki et al.,"Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation", Hum. Gene Ther. (2000), 11(3), 429-437	13-14 15-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０８５７５

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 １－１２ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記各請求の範囲に記載されているものは、「治療による人体の処置方法」に該当する。（特許協力条約に基づく規則３９．１（ｉｖ））

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項１３－１４に係る発明に記載の発現ベクターは、物質自体において公知のものと実質的な区別をすることができない。
そうすると上記請求項に係る発明には、先行技術に対して行う貢献があるものとは認められないため、上記発明と請求項１－１２，１５－１７に係る発明との間には、単一性の要件であるところの、先行技術に対して行う貢献を明示する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるものとは認められない。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。