(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2006-500937
(P2006-500937A)
(43)公表日　平成18年1月12日(2006.1.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	ZNAB	4B024
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 52 頁）

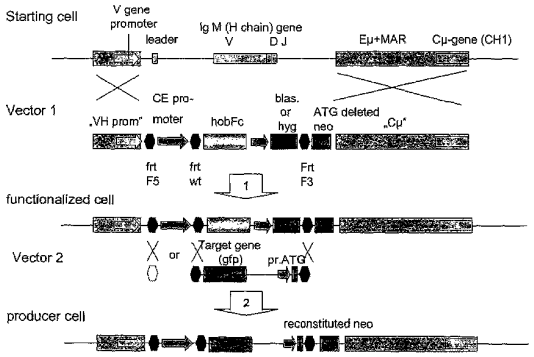
(21)出願番号　特願2004-540785 (P2004-540785)
(86)(22)出願日　平成15年10月6日 (2003.10.6)
(85)翻訳文提出日　平成17年6月3日 (2005.6.3)
(86)国際出願番号　PCT/EP2003/011027
(87)国際公開番号　WO2004/031383
(87)国際公開日　平成16年4月15日 (2004.4.15)
(31)優先権主張番号　02022194.1
(32)優先日　平成14年10月4日 (2002.10.4)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　505123882
プロバイオゲン　アーゲー
ドイツ連邦共和国，１３０８６　ベルリン，ゴエセシュトラーセ　５４
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林　純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトの糖鎖付加パターンを有する遺伝子産物の発現のための高収量異種発現細胞系

(57)【要約】
本発明は、ヒトの糖鎖付加パターンを有する組換え遺伝子を安定的に、高収量で発現できる細胞を確立し、任意の標的遺伝子を挿入できる安定普遍前駆細胞を確立するための偏在／普遍的な方法に関する。本発明はさらに、前記方法により得られうる細胞に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトの糖鎖付加パターンを本質的に有する標的遺伝子産物を安定的に高収量で発現できる細胞を調製する方法で、その方法が
（ａ）ヒト細胞またはヒトの雑種細胞（元の細胞）には必須ではない、元の遺伝子産物を安定的に高収量で発現できる元の細胞を選択すること；
（ｂ）元の細胞ゲノム内の元の遺伝子産物の座をスクリーニングすること；
（ｃ１）元の遺伝子産物をコードする遺伝子を、機能化前駆細胞を得るために、一つ以上のリコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）を含む第一の機能ＤＮＡ配列に置き換えること；および
（ｄ）標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む第二の機能ＤＮＡ配列を、ステップ（ｃ１）で得られた機能化前駆細胞に、第一の機能配列で取り込まれたＲＲＳを認識するリコンビナーゼを用いて挿入すること、または
（ｃ２）元の遺伝子産物をコードする遺伝子を、標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む機能ＤＮＡ配列に直接置き換えること、
を含む方法。
【請求項２】
請求項１記載の方法であって、
（ｉ）元の細胞が元の遺伝子産物を、好ましくは少なくとも0.3 fmol/細胞/日のポリペプチド量、および、より好ましくは1 fmol/細胞/日以上の量分泌し；および／または
（ｉｉ）元の細胞が初代不死化または融合細胞、またはその遺伝的改変細胞であり；および／または
（ｉｉｉ）元の細胞がヒトの雑種細胞であるならば、元の遺伝子産物はヒト遺伝子であり；および／または
（ｉｖ）元の遺伝子産物が分泌タンパク質、例えば抗体、サイトカイン、ホルモン、酵素、移送タンパク質等から選択される、
方法。
【請求項３】
請求項２記載の方法であって、元の細胞がＢリンパ球、好ましくはヒトミエローマまたはハイブリドーマ、またはヒトのヘテロハイブリドーマ、および、より好ましくはヒト－マウスのヘテロハイブリドーマＨ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ　２１０４）である方法。
【請求項４】
請求項３記載の方法であって、機能ＤＮＡ配列の挿入が前記元の細胞の再編成Ｉｇ座で、好ましくは再編成免疫グロブリンＨ座またはλ座で行われる方法。
【請求項５】
請求項１から４のいずれか一つに記載の方法であって、元の遺伝子産物の座が
（ｉ）既知である、またはマイクロアレイ発現解析、２Ｄタンパク質ゲル電気泳動、定量的ＰＣＲ、ＲＮＡｓｅ保護、ノーザンブロット、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロットおよびそれらの組み合わせを含むスクリーニング手順により決定される；および／または
（ｉｉ）本質的にヒトの糖鎖付加パターンを与えるように選択される、
方法。
【請求項６】
請求項１から５のいずれか一つに記載の方法であって、元の遺伝子の置換が
（ｉ）ワンステップ置換法により行われる、ここで元の細胞は第一の機能配列を含むベクター構築物に接触し、前記第一の機能配列が元の遺伝子産物をコードする遺伝子を置換する；または
（ｉｉ）２または複数ステップ法により行われる、ここで第一の遺伝子産物をコードする遺伝子が削除または不活化され、および続いて第一の機能配列を含むベクター構築物に接触し、前記第一の機能配列が削除または不活化された元の遺伝子産物の部位で取り込まれ

る、
方法。
【請求項７】
請求項１から６のいずれか一つに記載の方法であって、第一の機能配列が
（ｉ）ｌｏｘＰ、ｆｒｔ、ラムダ様ファージのａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位、およびレソルバーゼまたはファージＣ３１インテグラーゼの認識部位から選択される一つ以上のＲＲＳ、好ましくは一方向の挿入ができるＲＲＳ、例えば改良ｌｏｘＰ部位、ｆｒｔ部位等を含み；および／または
（ｉｉ）さらに、マーカー配列、分泌タンパク質、プロモーター、エンハンサー、スプライスシグナル、ポリアデニル化シグナルおよびＩＲＥＳ因子から選択される機能配列を含み；および／または
（ｉｉｉ）標的遺伝子または隣接する配列に相同な配列でベクターにつながっている、
方法。
【請求項８】
請求項１から７のいずれか一つに記載の方法であって、
（ｉ）第二の機能ＤＮＡ配列の挿入が、第二の機能配列の送達とともに、その直前、もしくはその直後に、第一の機能配列中に存在するＲＲＳを認識するリコンビナーゼを送達することにより行われ；
（ｉｉ）インテグラーゼがＣｒｅ、Ｆｌｐ、ΦＣ３１インテグラーゼ、レソルバーゼ等から選択され；
（ｉｉｉ）標的遺伝子産物が酵素、ホルモン、サイトカイン、受容体、抗体、抗体ドメイン、前記遺伝子産物を含む融合タンパク質等から選択され；
（ｉｖ）第二の機能ＤＮＡ配列がさらに、プロモーター配列、マーカー配列、スプライスドナーおよびアクセプター配列、第一の機能配列のＲＲＳとは異なるリコンビナーゼ認識配列等から選択される機能配列を含む、
方法。
【請求項９】
請求項１から６のいずれか一つに記載の方法であって、元の遺伝子産物をコードする遺伝子が直接、標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む機能ＤＮＡ配列と置き換えられる、方法。
【請求項１０】
請求項１から６記載のステップ（ａ）から（ｃ１）を含む機能化細胞の調製方法。
【請求項１１】
請求項１０記載の機能化細胞。
【請求項１２】
請求項１から９記載の方法により得られうる標的遺伝子産物を高収量発現できる細胞。
【請求項１３】
標的遺伝子産物が抗体、好ましくは細胞がＰＢＧ０４（ＤＭＳ　ＡＣＣ２５７７）である、請求項１２記載の細胞。
【請求項１４】
Ｈ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ２１０４）に由来する、請求項１１、１２もしくは１３記載の細胞。
【請求項１５】
さらに不活化された、または同一標的遺伝子産物または異種標的遺伝子産物をコードする遺伝子で置換されたその軽鎖を有する、請求項１３または１４記載の細胞。
【請求項１６】
請求項１２から１５のいずれか一つに記載の細胞を培養することを特徴とする標的遺伝子産物の高収量発現方法。
【請求項１７】
請求項１４または１５記載の細胞を培養することにより得られうる標的遺伝子産物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒトの糖鎖付加パターンを有する組換え遺伝子を安定的に、高収量で発現できる細胞を確立し、任意の標的遺伝子を挿入できる安定普遍前駆細胞を確立するための偏在／普遍的な方法に関する。本発明はさらに、前記方法により得られうる細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
組換えタンパク質の生産は異なる用途にとって重要である。タンパク質の構造研究（合理的な薬剤の設計および薬剤の最適化はそれらに基づくものである（Ａｎｔｉｖｉｒ．Ｃｈｅｍ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，１２　Ｓｕｐｐｌ．，４３－４９（２００１））、タンパク質（酵素）の工業用途および組換えタンパク質の臨床用途は、その効果的な生産の必要性を増加させる。２０００年２月現在で、米国製薬工業協会の調べによれば、２０個のモノクローナル抗体を含む１２２個の生物製剤が第三相試験またはＦＤＡ認可待ちのいずれかの状態にあった（Ｋ．Ｇａｒｂｅｒ，２００１，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９，１８４－１８５）。
【０００３】
用途に応じて、組換えタンパク質の未変性構造および翻訳後修飾（例、グリコシル化）が必須である。バイオテクノロジーの「ペット」生物である大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のような原核生物は、翻訳後修飾を導入する能力を欠いている。真核細胞のみが、機能的に活性のあるタンパク質を生産するためにしばしば必要とされる、翻訳と同時に、および翻訳後に必要な細胞の機構を有している。各種の異種タンパク質の生産のための各種の真核生物によるシステムが存在する。例えば、サッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）属、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）属、ハンセヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、またはクリベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）属由来の真菌の発現システムが確立している（ＨｏｌｌｅｎｂｅｒｇとＧｅｌｉｓｓｅｎ（１９９７）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８，５５４－５６０）。時折、真菌で遭遇するプラスミドの不安定性の問題を回避するために、異種タンパク質をコードする配列が、相同組換えにより、真菌の染色体に理想的に組み込まれる。さらに、真菌の発現システムで遭遇する問題は、異種タンパク質の過剰グリコシル化と、不正なオリゴマー化および不十分なリガンドの取り込みのような不正なフォールディングである。昆虫細胞における異種タンパク質の発現－異種タンパク質をコードするＤＮＡはまた、組換えにより染色体に取り込まれるが－は、これらの問題を回避する。しかし、昆虫細胞はシアル酸とシアルグリカンを生産する能力を欠いている。末端のシアル酸残基は、多くの複合糖質において様々な生物学的役割を果たしている。植物はまた、組換えタンパク質の生産に用いることができる。しかし、これらの異種発現システムでは、抽出と精製が困難であることが現実に障害となっている。
【０００４】
哺乳動物発現システム、培養細胞、ならびにトランスジェニック動物にはこれらの不都合はない。組換えタンパク質を培養哺乳動物細胞で一過的に、あるいは構成的（安定的）に生産できる。組換え体の一過性発現では、組換えタンパク質をコードするベクターＤＮＡを細胞に導入し、一般的には細胞ＤＮＡに組み込まない。組換えタンパク質の発現力価は初期では高い。しかし、ベクターＤＮＡが複製されないので、ベクターＤＮＡはそれぞれの細胞増殖で希釈され、それゆえ、発現力価は低下する。ベクターＤＮＡまたはベクターＤＮＡの一部だけが非正統的に細胞のゲノムＤＮＡと組み換わることは殆ど無く、組換えタンパク質をコードする遺伝子は安定的にゲノムに組み込まれる。組換えタンパク質をコードする遺伝子が選択マーカーと結合している場合、このカセットをもつ細胞を安定形質転換細胞として同定、単離することができる。安定形質転換体は、異種タンパク質が連続的に生産される利点を有する。発現力価は主として、プロモーターコンストラクトの強

さ、染色体中の組み込み部位、コピー数および問題の組換えタンパク質の型により決定される。多くの強力なプロモーターが市販されているが、それらの転写活性は関連する転写因子の細胞レベルと組み込まれる部位のクロマチン構造に依存して変化する。例えば、染色体ＤＮＡのスキャフォールドー、またはマトリックス接着領域（Ｓ／ＭＡＲエレメント）内での組み込みにより、プロモーター活性－それにより異種遺伝子の発現－が増大し、隣接するクロマチンによる不活性化から保護されることになる。それゆえ、特異的な細胞において高活性のプロモーターを選択し、染色体の活性部分へ組み込むことが非常に望ましい。好ましくは、低コピー数の異種遺伝子が一般に、多コピー遺伝子よりも安定に発現するので、単一の組み込みが望ましい。

【０００５】

単一の、予め選択された高活性の座における組み込みは相同組換えにより達成できる。この方法は、典型的にはマウス胚性幹細胞に適用されるのだが、ヒト起源の体細胞では極めて効率が悪く、大規模のスクリーニングの努力が必要である。その上、殆どのヒト永久細胞系は、これらの細胞系が通常は倍数体であり、２個所以上の同一座を標的とすることが困難となるので、完全に所与の標的遺伝子の発現が止まることが望まれる場合、適用できない。リコンビナーゼ、例えばＣｒｅ、ｆｌｐ、Ｃ１３、とそれぞれの標的部位（ＲＲＳ）を用いた部位特異的組換えが実行可能な代替案である（Ｆｅｎｇ，Ｙ．Ｑ．ｅｔａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２９２（４），ｐ．７７９－７８５（１９９９）；Ｓｃｈｌａｋｅ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，ｖｏｌ．２４４（１－２），ｐ．１８５－１９３（Ｏｃｔｏｂｅｒ ２０００）；Ｆｕｓｓｅｎｅｇｇｅｒ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１７（１），ｐ．３５－４２（Ｊａｎｕａｒｙ １９９９）；Ｇｒｏｔｈ，Ａ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ＵＳＡ，ｖｏｌ．９７（１１），ｐ．５９９５－６０００（Ｍａｙ ２０００））。このアプローチでは、単一のＲＲＳをもつプラスミドを染色体に単一のＲＲＳをターゲットするために用いることができる。この方法には、しかし、ある限定がある：すなわち、逆反応、プラスミドの切り出しが分子間の組換えで、組み込みよりも高速に起きるので、全く効率が悪い。第二に、細菌の遺伝子を含む全プラスミドが組み込まれる。第一の問題を解決するために、例えば、ｆｌｐとｃｒｅの両者に対する異種特異的な標的部位を用いて、一方向性を確立した。これらのＲＲＳをそれぞれのリコンビナーゼは認識するが、組換えを成功させるためには同一部位が必要であり、切り出し反応は排除される（Ｋａｒｒｅｍａｎ Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．２４（９），ｐ．１６１６－１６２４（１９９６）；Ｔｒｉｎｈ，Ｋ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，ｖｏｌ．２４４，ｐ．１８５－１９３（２０００））。しかし、ターゲティングプラスミドはそれでも染色体の単一の好ましい位置に組み込まれなければならない。そのようなまれな組み込みを見出すための大規模なスクリーニングの努力が必要である。これらのクローンはしばしば二つ以上のコピーのプラスミドを含み、不完全なコピーを含み、細菌の配列を組み込みから排除することができない。これらの細菌の配列は、標的領域をしばしば不活性化する哺乳動物細胞により認識される。それとは別に、ターゲティングカセットをレトロウイルスベクターにより組み込むことができる（Ｋａｒｒｅｍａｎ Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．２４（９），ｐ．１６１６－１６２４（１９９６））。これらのベクターは染色体内の活性部位を標的とし、完全長のカセットのみが組み込まれ、単一の組み込み部位を作出するように感染量が調節される。しかし、ＩＴＲｓに隣接する発現ユニットはまた、非活性化される。さらに、このシステムの使用は、発現するタンパク質の治療用途を排除するように政府発表機関に制限される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

上記を考慮すると、組換えヒト糖タンパク質を高収量で産生する細胞を得るための対象の産物をコードする任意の遺伝子をもつ細胞系の形質転換／変換の方法、特に厄介なスクリーニング操作を必要としないか、ほとんど必要としない方法が望まれている。驚いたことに、高収量でヒト翻訳後修飾の特性を有する組換え糖タンパク質を発現する細胞が、ヒトまたは基本的にヒト雑種細胞（以下、単に「元の細胞（starting cell）」と称する）で非必須の高発現する細胞遺伝子（以下、単に「元の遺伝子（starting gene）」と称する）を最初に同定し；第二に、元の遺伝子を、部位特異的組み込みのためのリコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳｓ）と随意に各種の機能配列を含有する「代替」遺伝子を含む第一のＤＮＡ配列と（例えば、適当なターゲティングカセットを用いることにより）、相同組換えにより直接的に置換し、この前駆発現細胞（機能化細胞）の安定クローンを選択／単離し；第三に、標的遺伝子産物（タンパク質）をコードする対象遺伝子（これ以後、「標的遺伝子」と称する）を、第一のターゲティングカセットに含まれるＲＲＳｓを認識するリコンビナーゼを用いた部位特異的組み込みにより導入し；最後に、大量の組換えタンパク質を産生できる安定発現細胞を選択／単離することにより取得し得ることを見出した。元の遺伝子を標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む機能ＤＮＡ配列と直接的に置換することもできる。

【０００７】

上記方法に適した元の細胞が、ヒトミエローマおよびハイブリドーマ細胞、およびヒトのヘテロハイブリドーマ細胞（Ｈ－ＣＢ－Ｐ１のようなヒト－マウスのヘテロハイブリドーマ細胞を含む）のような特定の哺乳動物細胞であり、基本的にヒトのグリコシル化パターンを有するタンパク質を生産することをさらに見出した。

【０００８】

本発明を用いると、対象の組換えタンパク質をコードするいかなる遺伝子も前記の特定の哺乳動物細胞に安定的に導入することが可能である。本発明を用いると、組換えタンパク質をコードする対象の遺伝子は、高発現する細胞遺伝子座に、好ましくは染色体の活性部分の高活性細胞プロモーターに近接して組み込まれる。本発明を用いると、ＲＲＳｓで囲まれた代替遺伝子を有する各種起源の前駆細胞系を作製することができる。本発明を用いると、代替遺伝子を、適当なリコンビナーゼにより触媒されるＲＲＳｓでの部位特異的組換えにより、組換えタンパク質をコードする対象遺伝子と交換でき、結果として最終の高収量発現細胞を生ずる。

【０００９】

最後に、ヒト－マウスのヘテロハイブリドーマが非常に明確なヒトのグリコシル化パターンを提供することを見出した。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

より具体的には、本発明は、

（１）ヒトの糖鎖付加パターンを本質的に有する標的遺伝子産物を安定的に高収量で発現できる細胞を調製する方法で、その方法が

（ａ）ヒト細胞またはヒトの雑種細胞（元の細胞；starting cell）には必須ではない、元の遺伝子産物（starting gene product）を安定的に高収量で発現できる元の細胞を選択すること；

（ｂ）元の細胞ゲノム内の元の遺伝子産物の座をスクリーニングすること；

（ｃ１）元の遺伝子産物をコードする遺伝子を、機能化前駆細胞を得るために、一つ以上のリコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）を含む第一の機能ＤＮＡ配列に置き換えること；および

（ｄ）標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む第二の機能ＤＮＡ配列を、ステップ（ｃ１）で得られた機能化前駆細胞に、第一の機能配列で取り込まれたＲＲＳを認識するリコンビナーゼを用いて挿入すること、または

（ｃ２）元の遺伝子産物をコードする遺伝子を、標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む機能ＤＮＡ配列に直接置き換えること、

を含む方法；
（２）（１）の方法の好ましい実施態様であって、上記の元の細胞がＢリンパ球由来の不死化細胞である（好ましくは、ヘテロハイブリドーマＨ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ２１０４）のようなヒト－マウスのヘテロハイブリドーマであって、機能ＤＮＡ配列の組み込みがＩｇ座（好ましくは、前記細胞の再編成されたヒトＩｇ座）で行われる）；
（３）上記（１）または（２）の方法により得られうる標的遺伝子産物を高収量発現できる細胞；
（４）上記（１）または（２）で定義される、工程（ａ）から（ｃ１）を含有する機能化細胞を調製する方法；
（５）上記（４）に定義される前駆細胞；
（６）上記（３）に定義される細胞を培養することを含有する、標的遺伝子産物を高収量発現する方法；
（７）Ｈ－ＣＢ－Ｐ１由来の細胞を培養することにより得られうる標的遺伝子産物、
を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

本発明は元の哺乳動物細胞、特にヒト細胞またはヒト雑種細胞を安定高収量発現細胞に形質転換する方法を提供する。連続的な組換え体の発現を達成するために、組換え産物をコードする遺伝子を細胞のゲノムＤＮＡに組み込む。細胞ＤＮＡへの組換え遺伝子の組み込み部位により発現レベルを高度に決定する。それゆえ、ここで表される方法は組換え遺伝子の細胞中のゲノムの高度に転写活性を有する部分への組み込みを含む。組換えタンパク質をコードする対象遺伝子を非常に強力な組換えプロモーターの支配下に置くか、または高活性の細胞プロモーターの下流に該遺伝子を組み込むことにより、高活性の細胞プロモーターの支配下に置くことができる。

【００１２】

本発明の方法（１）の好ましい実施態様において、元の細胞は元の遺伝子産物を、好ましくは、少なくとも０．３ｆｍｏｌ／細胞／日の量のポリペプチド鎖（約９０ｋｄのタンパク質に関して３０ｐｇ／細胞／日に等しい）で、より好ましくは、１ｆｍｏｌ／細胞／日以上の量（約９０ｋｄのタンパク質に関して１００ｐｇ／細胞／日に等しい）で分泌する。そうでなければ、元の細胞が元の遺伝子産物を分泌しない場合では、高発現する、好ましくは非必須の細胞内または膜タンパク質、または高発現する非コードＲＮＡをコードする遺伝子を選択する。

【００１３】

別の好ましい実施態様では、元の細胞は初期の、不死化または融合細胞、もしくはその遺伝的に修飾された細胞である。それゆえ、元の細胞は初期細胞、不死化細胞（例えば、Ｂリンパ球由来の不死化細胞）または腫瘍細胞、もしくはその遺伝的に修飾された細胞、雑種細胞、一般的にタンパク質製造に用いられる、ＨＥＫ２９３、遺伝的不死化または不死化細胞系との融合により初期細胞から作製されるＰＥＲ．Ｃ６ヒト細胞系のような細胞系から選択され、好ましくはヒトのハイブリドーマまたはヘテロハイブリドーマ細胞（例えば、ヒト－マウス、ヒト－ラットなど）であり、もっとも好ましくは、ヒト－マウスのヘテロハイブリドーマＨ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ　２１０４；ＺＩＭ５１７として以前に引用した）である。

【００１４】

元の細胞がヒト細胞またはヒトのヘテロハイブリドーマ（例えば、上記定義のような細胞）であるなら、前記雑種細胞またはヘテロハイブリドーマは少なくとも一つのヒト染色体を含有し、および／または、ヒトの翻訳後修飾ができることが好ましい。元の遺伝子産物がヒト遺伝子であることが特に好ましい。

【００１５】

元の遺伝子産物は好ましくは、抗体、サイトカイン、ホルモン、酵素、移送タンパク質、貯蔵タンパク質、構造タンパク質などのような分泌タンパク質から選択される。元の遺

伝子産物はあるいは、選択された元の細胞の主要産物である。非常に安定なＩｇＭの発現がＨ－ＣＢ－Ｐ１で観察され、あるいはスクリーニング法で選択される。スクリーニングは、マイクロアレイ発現分析、２Ｄタンパク質ゲル電気泳動、定量的ＰＣＲ、ＲＮＡｓｅ保護、ノーザンブロット、ＥＬＩＳＡおよびウェスタンブロットを含む個々の、または複合の方法に基づくものである。これらの個々の方法の能力と感度は当業者には既知である。

【００１６】

本発明の方法により任意の組換えタンパク質を産生することができる。好ましい標的遺伝子産物として、酵素、特にプロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤、ホルモン、サイトカイン、レセプターまたはその可溶型（例えば、膜透過ドメインまたは細胞内ドメインを欠くレセプター）、全長の抗体または抗体ドメイン、およびこれらのタンパク質群のドメインを合わせた融合タンパク質があげられるが、これに限定されない。

【００１７】

工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ１）および（ｄ）を含む実施態様（１）の最初の選択肢において、元の遺伝子の置き換えはワンステップ置き換え法により行われ、ここで元の細胞は第一の機能配列を含むベクター構築物と接触し、前記第一の機能配列は不活性化し、部分的または完全に元の遺伝子産物をコードする遺伝子と置き換わる。あるいは、置き換えは二工程または複数工程法により行われ、元の遺伝子産物をコードする遺伝子は削除、または不活性化され、続いて第一の機能配列を含むベクターと接触する。前記第一の機能配列は削除された／不活性化された元の遺伝子産物の部位に組み込まれる。

【００１８】

元の遺伝子の場所への第一の機能配列の特異的組み込みは、標的配列または近接する配列に相同な、ベクター中の第一の機能配列に隣接する配列により促進される。これらの隣接配列は、元の細胞のラムダ、コスミド、ｐａｃまたはｂａｃライブラリーから得られるか、元の細胞のＤＮＡを鋳型として用いたＰＣＲにより生成される。標的遺伝子の場所への第一の機能配列の特異的組み込みから得られる細胞クローンの割合（パーセンテージ）は、二重選択法を用いることによりさらに増加する。ここで、陽性選択マーカーとして第一の機能配列の一部を含み、陰性選択マーカーは相同隣接配列により第一の機能配列から分離される。相同交換により、陰性選択マーカーなしで、陽性選択マーカーを組み込むことができる。要請選択マーカーの例としては、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、ネオマイシン、あるいはグルタミン合成酵素遺伝子があげられ、ＨＳＶ　ｔｋまたはシトシンデアミナーゼが陰性選択マーカーである。マーカーおよびこれらの適用方法は当業者に既知である。

【００１９】

相同交換から得られた細胞クローンを、第一の機能配列から発現される遺伝子産物の要素の存在と元の遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子不活性化により同定した。これらの細胞クローンは機能化前駆細胞を表す。

【００２０】

第一の機能配列は、ｌｏｘＰ、ｆｒｔ、ラムダ様ファージのａｔｔ　Ｌとａｔｔ　Ｒ、レソルバーゼまたはファージＣ３１インテグラーゼの認識部位から選択される一つ以上のＲＲＳ（ｓ）を含有する。前記認識部位により、例えば修飾されたｌｏｘＰおよびｆｒｔ部位だけでなく、ΦＣ３１インテグラーゼの（野生型の）認識部位により得られる、一方向の組み込みが提供されることが好ましい。第一の機能配列はさらに、マーカー配列、分泌タンパク質遺伝子、プロモーター、エンハンサー、スプライスシグナル、ポリアデニル化シグナル、ＩＲＥＳエレメント等から選択される配列を含むことができる。

【００２１】

標的遺伝子産物の産生細胞を作製するために、機能化前駆細胞（実施態様（１）の第二の選択肢の工程（ｃ２）で得られるような産生細胞がまだない場合は、以下を参照せよ）、例えば、ＰＢＧ０３クローンＤ３（ＤＳＭ　ＡＣＣ２５７７）を次いで、第二の機能配列を含む第二のベクターと接触させる。第二の機能配列は、第一の機能配列中に存在する

標的遺伝子および前記リコンビナーゼのＲＲＳ（ｓ）を含有する。第二の機能配列はさらに、プロモーター配列、マーカー配列、第一の機能配列のＲＲＳとは異なるリコンビナーゼ認識配列等を含有する。

【００２２】

第二の機能ＤＮＡ配列の組み込みを、アクセサリータンパク質（例えば、Ｃｒｅ、Ｆｌｐ、ΦＣ３１インテグラーゼ、レソルバーゼ等）の存在、または非存在下でのリコンビナーゼのＲＲＳの認識により、行った。これらのリコンビナーゼとアクセサリータンパク質、これらのタンパク質をコードするｍＲＮＡ、もしくは、一過性発現をするためのウイルスまたは非ウイルスベクターが、第二の機能配列の供給とともに、その直前に、もしくは、その直後に供給される。

【００２３】

元の遺伝子の場所に第二の機能配列を含むクローンの純粋な集団を、再構築機能選択マーカー遺伝子を用いた選択により得ることができる。例として、第一の機能配列を用いて導入した不活性化ＡＴＧ欠失選択マーカー遺伝子を、活性プロモーターと第二の機能配列をもつインフレーム－ＡＴＧコドンの供給により再構築できる。

【００２４】

本発明の実施態様（１）の第二の選択肢（工程（ａ）、（ｂ）および（ｃ２）を含有する）において、元の遺伝子産物をコードする遺伝子を直接（すなわち、前駆細胞の供給なしに）、標的遺伝子産物をコードするＤＮＡ配列を含む機能ＤＮＡ配列（以降、簡単に「第三のＤＮＡ配列」と称する）と置き換えることができる。前記第三のＤＮＡ配列を前述のように、一工程または複数工程の方法で取り込むことができる。第三のＤＮＡ配列はさらに、前述の第一および第二のＤＮＡ配列と同様の（プロモーター、マーカー等のような）機能配列を含む。本発明の実施態様（１）の第二の選択肢は、たった一つの標的遺伝子産物が産生され、その結果、前駆細胞の産生が必要ないならば、特に好ましい。

【００２５】

本発明の好ましい実施態様（２）において、元の細胞は好ましくは、ヒト－マウスのヘテロハイブリドーマ細胞、好ましくはヘテロハイブリドーマ細胞Ｈ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ２１０４）である。機能ＤＮＡ配列の組み込みを、Ｉｇ座で、好ましくはハイブリドーマ細胞のヒト再編成Ｉｇ座（例えば、重鎖または軽鎖（λまたはκ））の一つで行うことができる。再編成免疫グロブリン座は、ハイブリドーマを生じるＢリンパ球の成熟過程で生殖系列の染色体構造から修飾された機能Ｉｇ遺伝子（重鎖λまたはκ）周辺のゲノム配列である。ＩｇＨ座は染色体１４ｑ３２．３３に位置する。Ｈ－ＣＢ－Ｐ１において、この場所は、μイントロンを介してＣμ配列（ＤＤ　２９６　１０２　Ｂ３）に隣接した、Ｄ遺伝子を介して$Ｊ_{Ｈ}$６遺伝子に隣接した、再編成され、アフィニティ成熟したＶＨ１－２遺伝子により形成される。Ｈ－ＣＢ－Ｐ１－ＩｇＨ座の再編成ＶＤＪ領域の配列を配列番号：１２に規定する。

【００２６】

本発明の実施態様（３）および（５）の細胞はＨ－ＣＢ－Ｐ１（ＤＳＭ　ＡＣＣ２１０４）に由来することが好ましい。さらに、本発明の実施態様（３）において、標的遺伝子産物は抗体であることが好ましい。そのような場合、細胞は好ましくはＰＢＧ０４（ＤＭＳ　ＡＣＣ２５７７）である。特に、抗体の発現に用いられる上記細胞において、軽鎖が不活性化され、同一の、または異なる標的遺伝子産物をコードする遺伝子で置き換えられていることが適している。

【００２７】

その上、前記のように、Ｈ－ＣＢ－Ｐ１由来の細胞系の発現により得られうる標的遺伝子産物は、独特の、基本的なヒトグリコシル化パターンを有している。

【００２８】

治療用途のための糖タンパク質、特に抗体は、Ｎ結合グリカンのような翻訳後修飾は哺乳動物のみで生じ、それらはこれらのタンパク質の薬学的特性に実質的な影響をもつので、典型的には哺乳動物細胞で製造される。完全に処理されたＮグリカンは、コアとしてフ

コースを、末端にシアル酸をもつ二触角（バイアンテナリー; biantennary）構造を形成する（図１５）。生理的条件下で、大部分のタンパク質は、完全な構造の先が切り取られた形をしている。グリコシル化が完了する程度は、細胞型だけでなく、培養条件にも依存する。

【００２９】

シアル化、末端シアル酸のグリカンへの付加の程度は変化し、ヒト血液中の抗体で、３０－４０％である。しかし、シアル化されたタンパク質が高いパーセンテージであると、血液中で治療タンパク質の半減期は増加する。Ｈ－ＣＢ－Ｐ１由来の細胞系、例えばＰＢＧ０４は、実施例５に見られるように、糖タンパク質の製造に広く用いられているＣＨＯ細胞およびＮＳ０細胞に比べ、高度にシアル化された糖タンパク質を産生する。治療用糖タンパク質について、ガラクトース添加前の末端のグリカン（Ｇ０構造）が低含量であることが好都合である。そのため、Ｇ０糖タンパク質は二量体化しやすく、補体に依存した細胞毒性を調節する抗体の能力が減退する。ＰＢＧ０４の遺伝的組成により、Ｇ０構造が低いもの（ローラーボトル工程でレプチン－Ｆｃの４．３％）を用いて、より完全なプロセシングが起きる。

【００３０】

一般的なバイアンテナリー構造は全ての哺乳動物で形成される一方、いくつかの特異的な構造（個々の糖の間の結合）はヒトに特異的、あるいはヒトが完全に除外される。これらの構造は同様に生物学的特性に影響する。それゆえ、ヒト特異的な修飾を生成するために必要な酵素を供給し、特殊な結合の原因であるヒト細胞には存在しない酵素を欠損する、治療用途の糖タンパク質を製造するために、細胞を用いることは好適である。そのような細胞は全くヒト由来であるか、またはヒト染色体の一部を含んでいる。後者の細胞において、ヒト特異的なグリコシル化酵素がヒトに存在しない細胞を支配することが重要である。

【００３１】

ノイラミン酸がＮ-アセチルノイラミン酸またはＮ-グリコリルノイラミン酸として付加されると、後者はマウス細胞の主たる構造となる。Ｎ-グリコリルノイラミン酸は旧世界猿とヒトのグリカンには存在しない。それらは免疫原性であり、治療用タンパク質に対する抗体の形成をもたらす。

【００３２】

さらに、マウス細胞はもう一つのグリコシル化酵素であるアルファ１，３ガラクトシルトランスフェラーゼを含んでいる。これはｇａｌ残基をグリカンの露出したｇａｌ残基に転移する反応を仲介する。そのような結合はまた、酵母に見出され、防御として、ヒトはこの構造に対する抗体を予め有している。認識により、免疫複合体が形成され、その結果、腎障害を起こす。レプチン－Ｆｃ由来のＰＢＧ０４の１．３％だけがアルファ１，３ｇａｌを含んでいる。

【００３３】

ほんの一握りのヒトタンパク質が分岐したＮ－アセチルグルコサミンを含んでいる。それ自体、生物学的特性に影響はしないが、酵素複合体がコアのフコシル化を仲介する別の酵素を阻害する。しばしば、分岐したＮ－アセチルグルコサミンをもつタンパク質において、コアのフコースがなくなり、より効果的なＦｃ－ガンマ受容体の結合と、抗体に依存した細胞性細胞毒性（ＡＤＣＣ）の促進をもたらす。それゆえ細胞は、コアでないフコシル化タンパク質の割合を増加するための（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼＩＩＩを発現するように操作された。（米国特許第６，６０２，６８４号）

【００３４】

コアのフコースのない高含量の糖タンパク質はまた、マウス細胞で得られる。しかし、これらのタンパク質はマウスタンパク質に特徴的な、不利な特性を含む。ヒトと、正しい染色体組成細胞をもつマウスの特異的な雑種細胞は両者の有利な特性を合わせることが可能である。ＰＢＧ０４のようなＨ－ＣＢ－Ｐ１由来の細胞系はそのような細胞系である。

【００３５】

本発明はさらに、以下の実施例により説明されるが、これらは発明を限定するものではない。

【００３６】

細胞系Ｈ－ＣＢ－Ｐ１は、ベルリン・ブーフ（Ｂｅｒｌｉｎ　Ｂｕｃｈ）、ロベルト－レスル通（Ｒｏｂｅｒｔｏ－Ｒｏｓｓｌｅ－Ｓｔｒ．）　１０（ＤＤＲ－１１１５）の「ドイツ民主共和国自然科学アカデミー微生物学中央研究所（Ｚｅｎｔｒａｌｉｎｓｔｉｔｕｔ　ｆｕｒ　Ｍｏｌｅｋｕｌａｒｂｉｏｌｏｇｉｅ，　Ａｋａｄｅｍｉｅ　ｄｅｒ　Ｗｉｓｓｅｎｓｃｈａｆｔｅｅｎ　ｄｅｒ　ＤＤＲ）」に、１９９０年3月１６日に、ＺＩＭ－０５１７として寄託され、ドイツ、ブラウンシュバイク（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ）　３８１２４、マシュローダー・ヴェーク（Ｍａｓｃｈｒｏｄｅｒ　Ｗｅｇ）　１３のＤＳＭＺ（ドイツ微生物細胞培養コレクション（Ｄｅｕｔｓｃｈ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ））に、２０００年１２月１２日に移管され、受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２１０４を付与された。ＰＢＧ０３クローンＤ３（ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ）をＰＢＧ０４とリネームし、ＤＭＳＺに２００２年9月１８日に、ＤＳＭ　ＡＣＣ２５７７として寄託した。

【実施例】

【００３７】

材料と方法

材料：

ＤＮＡクローニング法

ゲノムＤＮＡの単離：　Ｔ２５　ｃｍ^2　フラスコの細胞をトリプシン処理し（下記「トリプシン処理」の章を参照せよ）再懸濁した細胞ペレットを１．５　ｍｌエッペンドルフチューブに移し、２００　μｌのＰＢＳを添加した。チューブを5分間、１３，２００　ｒｐｍで遠心し、上清を捨て、ペレットを２　ｍｌの溶液Ａに再懸濁した。懸濁液をファルコンチューブ（１５　ｍｌ）に移した後、１３３　μｌの１０％　ＳＤＳと３３３　μｌのプロテアーゼＫを添加した。５５℃で3時間のインキュベーション、または室温で一晩のインキュベーションを続けて行った。懸濁液を６０７　μｌの６　Ｍ　ＮａＣｌと混合し、遠心（４３００　ｒｐｍ、４℃、２０分）前に１５秒間ボルテックスで撹拌した。上清をファルコンチューブ（１５　ｍｌ）に移し、２．５　ｍｌの１００％　エタノールと混合した。界面に形成された糸状のＤＮＡの沈殿をピペットチップで取り、１／２　ＴＥ緩衝液に再懸濁した。ＤＮＡを４℃で保存する前に、５６℃で完全に溶解した。

【００３８】

ＰＣＲ：　ＰＣＲ法をゲノムＤＮＡ配列の単離（調製用ＰＣＲ）、またはあるＤＮＡ配列の検出（分析ＰＣＲ）のために用いた。

【００３９】

調製用ＰＣＲ：　調製用ＰＣＲ反応（５０　μｌ）をＥｘｐａｎｄ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＰＣＲキット（ロッシュ（Ｒｏｃｈｅ））を用いて、製造者の指示に従って準備した（２０－３０　ｎｇの鋳型、５　μｌの１５　ｍＭ　$MgCl_2$ 緩衝液（１０×）、５　μｌのｄＮＴＰミックス、０．５　μｌのそれぞれのプライマー（３０　ｎＭ）、０．５　μｌのポリメラーゼを水で５０　μｌにした）。ＰＣＲ産物をＱＩＡｑｕｉｃｋ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン（ＱＩＡＧＥＮ））を用いて精製した。

【００４０】

分析ＰＣＲ：　分析ＰＣＲ反応（１０　μｌ）をＴａｑポリメラーゼキット（キアゲン）を用いて、製造者の指示に従って準備した（１０　ｎｇの鋳型、１　μｌの１０×緩衝液、０．５　μｌのｄＮＴＰミックス、０．１　μｌのそれぞれのプライマー（３０　ｐＭ）、０．１　μｌのＴａｑポリメラーゼを水で１０　μｌにした）。

【００４１】

ＰＣＲサイクルのプログラムは、プライマーのアニーリング温度（表２を参照せよ）と予想されるＰＣＲ産物の長さ（伸長時間と温度が決定される；表１を参照せよ）により、

それぞれの産物により変化する。

【表１】

表１：増幅断片の長さが伸長時間を決定する

パラメーター	長さ、時間 温度	長さ、時間 温度	長さ、時間 温度	長さ、時間 温度	長さ、時間 温度
断片の長さ	< 750 bp	1.5 kb	<3 kb	> 3 kb	6 kb
伸長時間	45秒	1 分	2 分	3 分 + 15 秒 (各ステップ後)	4 分 + 15 秒 (各ステップ後)
温度	72°C	72°C	72°C	68°C	68°C

【表２】

表２：プライマーのアニーリング温度

プライマー/配列番号：	配列 (アニーリング温度 [°C])	製造元
VHpromF/1	**ATACTAGTCGGCCG**CAGGCACATCCACAGTCAC (55)	GIBCO BRL
VHpromR/2	**TCCCGGGTATCGA**TGGAGCTCTCAGGGGATTC (55)	GIBCO BRL
CμintV/3	**CATCGA**TCCGCTACTACTACTACATGG (55)	GIBCO BRL
CμintR/4	CGGCCACGCTGCTCGTAT (55)	GIBCO BRL
CμMitteR/5	AGCTCACCTGGTGCAACT (54)	GIBCO BRL
CμMitteF/6	GACCTAAGCTGACCTAGAC (54)	GIBCO BRL
V5/7	TCCCTC-CAAAAGCTGTAG (52)	TIB
V6/8	ATGGCGGTAATGTTGGAC (52)	TIB
V7/9	CACAAGAATCCGCACAGG (54)	TIB
EBVtestR/10	CCTGATATTGCAGGTAGG (52)	GIBCO BRL
EBVtestF/11	TACCGACGAAGGAACTTG (52)	GIBCO BRL

太字：制限部位

【００４２】

プラスミドＤＮＡの増幅、単離および定量： 大腸菌形質転換体を１ ｍｌ、３０ ｍｌ、または１００ ｍｌ培養で生育させ、プラスミドＤＮＡをそれぞれＭｉｎｉ－、Ｍｉｄｉ－、またはＭａｘｉ－プラスミド精製キット（キアゲン）を用いて単離した。製造者の指示に従った。ＤＮＡ濃度を分光光度計で、２６０ ｎｍと２８０ ｎｍの吸収を測定することにより定量した。

【００４３】

制限酵素による消化： プラスミドＤＮＡを、１ μｇのＤＮＡあたり１単位の適当な制限酵素で、業者の推奨する緩衝液と温度を用いて消化した（表３を参照せよ）。分析に二つ以上の制限酵素が必要ならば、可能ならば、反応を同時消化で行った。さもなければ、反応液のカラム精製工程（キアゲン）を介在させて、経時的に単一の消化を行った。

【表３】

表３：使用した制限酵素

酵素	濃度	温度	緩衝液	不活性化	製造元	製品番号
BamHI	20 U/μl	37°C	2[a]	65°C	BioLabs	R0136L
BglII	40 U/μl	37°C	M	65°C	Boehringer	1175068
BsaBI	10 //μl	60°C	2	80°C	BioLabs	R0556S
BsiWI	10 U/μl	55°C	3	80°C	BioLabs	R0136L
Bst11071	5 U/μl	37°C	3 + BSA	80°C	BioLabs	R0553S
BstBI	20 U/μl	65°C	4 + BSA	80°C	BioLabs	R0519S
ClaI	10 U/μl	37°C	H	65°C	Roche	404217
DraIII	20 U/μl	37°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0510L
EagI	10 U/μl	37°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0505S
EcoRI	40 U/μl	37 °C	H	65°C	Roche	200310
HincII	10 U/μl	37°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0103S
HindIII	40 U/μl	37°C	B	5°C	Roche	798983
KpnI	10 U/μl	37°C	L	65°C	Roche	899186
MfeI	10 U/μl	37°C	4	65°C	BioLabs	R0589S
NotI	10 U/μl	37°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0189L
PmeI	10 U/μl	37°C	4 + BSA	65°C	BioLabs	R0560L
PstI	10 U/μl	37°C	H	80°C	Roche	621633
PvuII	5 U/μl	37°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0150S
SacII	20 U/μl	37°C	4 + BSA	65°C	BioLabs	R0157S
SalI	10 U/μl	37°C	H	65°C	Boehringer	567663
ScaI	10 U/μl	37°C	H	80°C	Roche	775266
SmaI	20 U/μl	37°C	4 + BSA	65°C	BioLabs	R0141S
SpeI	10 U/μl	37°C	2 + BSA	65°C	BioLabs	R0133L
SspI	5 U/μl	37°C	2 + BSA	65	BioLabs	R0182L
StyI	10 U/μl	37°C	H	65°C	Roche	85111023
SwaI	10 U/μl	25°C	3 + BSA	65°C	BioLabs	R0604L
XbaI	10 U/μl	37°C	H	65°C	Boehringer	674265

a. 特別な緩衝液

【００４４】

５’突出末端をもつＤＮＡの末端修復：　ＥｃｏＲＩで作られるような５’突出を「平滑」にするために、消化したＤＮＡを製造者の指示に従って、クレノウ（Ｋｌｅｎｏｗ）断片（ロッシュ）で処理した。末端を埋める反応を熱不活性化工程（６５℃、２０分）により停止し、ＤＮＡをエタノール沈殿するか、または直接ゲル精製にかけた。

【００４５】

ベクターＤＮＡの脱リン酸化：　直鎖化したベクターＤＮＡが適合する末端と自己ライゲーションすることを防ぐために（下記の「ライゲーション」を参照せよ）、ＤＮＡを製造者の指示に従い、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）（ロッシュ）を用いて脱リン酸化した。ＡＰを熱により不活性化し（６５℃、１５分）、ライゲーション反応に用いる前に、ＤＮＡをゲル精製した（電気泳動については、下記の「アガロースゲル電気泳動」を参照せよ）。

【００４６】

ＴＯＰＯクローニング：　ＰＣＲ増幅産物をインビトロジェンのＴＯＰＯベクターにクローニングした。ＴＯＰＯクローニングキットの指示に従い、精製されたＰＣＲ産物（０．

２５－２　μｌ）を塩溶液（０．５　μｌ）と混合し、水を加えて容量を２．５　μｌとした後、ＴＯＰＯベクター（０．５　μｌ）を添加した。室温で３０分間のインキュベーションの後、反応チューブを氷上に移し、反応液の２　μｌを「ワンショット化学的コンピテント大腸菌（ｏｎｅ　ｓｈｏｔ　ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｅ．ｃｏｌｉ）」に添加し、細胞を氷上で３０分間インキュベートした。細胞に熱ショック（４２℃、３０秒）を与え、直ちに氷上に戻し、室温のＳＯＣ培地を２５０　μｌ添加した。混合液をカナマイシンまたはアンピシリンのいずれかを含むＬＢプレートに播く前に、形質転換反応液を３７℃で１時間、振盪（３００　ｒｐｍ）しながらインキュベートした。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。

【００４７】

ライゲーション：　全てのライゲーション反応を、０．１－１　μｇの脱リン酸化ベクターと過剰量のインサートを用いて、１０　μｌの容量で行った。反応液は２　μｌのＴ４ライゲーション緩衝液（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）と１　μｌのＴ４リガーゼ（ロッシュ）を含み、１６℃で２時間、または４℃で一晩インキュベートした。ライゲーション反応液を細菌に形質転換した。

【００４８】

不要な非組換え体のレベルを下げるために、自己ライゲーションしたベクターに唯一の制限部位があるならば、ライゲーション反応液を適切な制限酵素で反応後消化した。消化後、ライゲーション反応液を、再溶解したＤＮＡを再び形質転換反応に用いる前に、アクリルアミド存在下で、エタノール沈殿した（４℃、１４，０００　ｒｐｍ、１５分の遠心）。

【００４９】

コンピテント細菌の形質転換：　コンピテント大腸菌ＸＬ２（－７０℃で保存）を氷上で融解し、ライゲーション反応液（氷上保存、上記「ライゲーション」を参照せよ）または１－１００　ｎｇのプラスミドＤＮＡ（再形質転換）のいずれかと混合し、氷上で２０分間インキュベートした。続いて、形質転換反応液を熱ショック（３０－６０秒、４２℃）に付し、チューブを氷上に戻した。２０５　μｌのＳＯＣ培地（抗生物質なし）を添加し、反応液を３７℃で４５分間、振盪（３００　ｒｐｍ）しながらインキュベートした。形質転換反応液を抗生物質（カナマイシン（４０－６０　μｇ／ｍｌ）またはアンピシリン（５０－１００　μｇ／ｍｌ）のいずれか）を含むＬＢプレートに播き、３７℃で一晩インキュベートした。細菌のコロニーをカウントし、形質転換反応の効率を計算した。

【００５０】

アガロースゲル電気泳動：　ＤＮＡ断片をその長さに従って、０．７－１．５％　アガロースゲルで分離した。アガロースを１×ＴＡＥ緩衝液に溶解し、２　μｌの臭化エチジウム／１００　ｍｌのアガロースを添加した。アガロースを溶解し、トレイに注いでセットした。ＤＮＡ試料をローディング緩衝液オレンジＧ（Ｏｒａｎｇｅ　Ｇ）と混合し、水平ゲルにのせ、ランニング緩衝液として１×ＴＡＥを用いて、４０－９０　Ｖで泳動した。ＤＮＡ／臭化エチジウム複合体をＵＶ光で可視化した。

【００５１】

ＤＮＡ断片のゲル精製：　ＤＮＡをアガロースゲルで分離し（４０－８０　Ｖ）、対象のＤＮＡバンドをメスで切り出した。ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（キアゲン）を用いて、製造者の指示に従って、ＤＮＡをアガロースブロックから抽出した。

【００５２】

細胞培養

トリプシン処理：　接着細胞をトリプシンを用いて回収した。まず培地を除去し、細胞単層をクエン酸緩衝液（予め３７℃に暖めておく）で洗浄した。少量のトリプシンを直接細胞単層に添加し、３７℃で３－５分間インキュベートした。５％　ＦＣＳを添加したＰＢＧ　１．０　培地を添加することにより、トリプシン処理を停止させた（表４を参照せよ）。細胞懸濁液をファルコンチューブ（５０　ｍｌ）に移し、１０分間遠心した（８００　ｒｐｍ、３０℃）。細胞ペレットを新鮮な培地に再懸濁し、該細胞を電気穿孔法または

さらなる実験に用いた。

【表４】

表４：異なるフラスコで生育した細胞のトリプシン処理に用いたクエン酸、トリプシン、及び5% FCSを添加したPBG 1.0の量

組織培養フラスコ	クエン酸緩衝液（ml）	トリプシン（ml）	PBG 1.0/5%FCS (ml)
T25	1.0	0.5	4.5
T85	2.0	1.0	9.0
T180	5.0	2.0	8.0

【００５３】

細胞のカウンティング

細胞をトリプシン処理した後、ノイバウワーチャンバー（ヘマトサイトメーター）でカウントした。少量の細胞懸濁液をチャンバーに入れ、該チャンバーを顕微鏡下に置いた。チャンバーの四つの四角のうちの一つの中の細胞だけをカウントし、ｍｌあたりの細胞数を得るために、細胞数を10^4倍した。生細胞と死細胞を区別するために、カウント前に細胞をトリパンブルーで染色した。死細胞は青くなり、一方生細胞は色素を取り込まなかった。

【００５４】

形質転換

Ｈ－ＣＢ－Ｐ１細胞の電気穿孔法：　標準的な電気穿孔法の反応では、１０　μｇの直鎖化したプラスミドＤＮＡを用いた。培養培地を除去し、Ｈ－ＣＢ－Ｐ１単層をクエン酸緩衝液で洗浄し、トリプシン処理した（上記「トリプシン処理」を参照せよ）。細胞ペレットをＯｐｔｉ－ＭＥＭ（予め３７℃に暖めておく）に再懸濁し、ｍｌあたり3×10^6細胞とした。７００　μｌの細胞懸濁液を電気穿孔法用キュベット（ｐｅｑＬａｂ；ＥＱＵＢＩＯ　４ｍｍ）に移し、直鎖化したＤＮＡ（１０　μｇ）を添加した。細胞を２５０Ｖ、１５００　μＦで電気穿孔し、直ちに予め暖めた、５％　ＦＣＳを添加したＰＢＧ１．０　培地を入れたＴ７５ボトルに移し、３７℃、５％　CO_2でインキュベートした。

【００５５】

選択

Ｈ－ＣＢ－Ｐ１細胞の選択：　電気穿孔したＨ－ＣＢ－Ｐ１細胞を２日間、３７℃、５％　CO_2で培養した。２日目、培養培地を除去し、非接着細胞を培養培地の遠心により回収した。１　ｍｌの培養培地（上清）を後の一過性発現試験のために凍結した。トリプシン処理した細胞単層と遠心により培養培地から回収した細胞を合わせて、沈殿とした。細胞を５％　ＦＣＳを添加したＰＢＧ　１．０　培地に再懸濁し、1×10^6細胞／ｍｌ、1×10^5細胞／ｍｌ、1×10^4細胞／ｍｌの希釈液を作製した。それぞれの希釈液に５　μｇ／ｍｌまたは１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジン、または２００　μｇ／ｍｌまたは４００　μｇ／ｍｌのハイグロマイシンを添加した。選択培地を４日目、７日目、１０日目に交換し、Ｈ－ＣＢ－Ｐ１クローンの生育を顕微鏡下で制御した。８日目と１０日目の間に、生細胞が目視できた。１３日目、クローンをトリプシン処理により回収し、細胞を９６ウェルのプレートに播いたときに、ウェルに５細胞または１細胞が含まれるように、細胞ペレットをＰＢＧ　１．０　培地に懸濁した。選択圧（５　μｇ／ｍｌまたは１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジン、または２００　μｇ／ｍｌまたは４００　μｇ／ｍｌのハイグロマイシン）をその間維持した。１０日目、陽性細胞クローンと陰性細胞ク

ローンを区別するために、細胞を免疫染色した。細胞培養培地を除去し、細胞により産生される組換えタンパク質を認識する蛍光標識された抗体（２　μｇ／ｍｌ）を添加した標準培地に置き換えた。抗体懸濁液を５％　ＦＣＳを添加したＯｐｔｉＭｅｍ　１に置き換える前に、４時間、細胞単層上に置いた。細胞単層を蛍光顕微鏡で観察した。テキサスレッド結合抗体を用いる場合、４７０－４８０　ｎｍのスペクトルを透過するＵＶフィルター（ＷＧ）の顕微鏡を用いた。励起したテキサスレッド標識抗体は５９０　ｎｍのスペクトルの光を放出する。３３０－３５５　ｎｍのスペクトルを透過するＵＶフィルター（ＷＵ）をＡＭＣＡに結合した抗体を可視化するために用いた。励起ＡＭＣＡの放射光は青色のスペクトル（４２０　ｎｍ）を生じた。大きく、強い蛍光のクローンのみを考慮した。一つのウェルに単一のクローンのみとし、該細胞をさらにひろげた。一つのウェルに一つのクローン以上がある場合、個々のクローン（細胞）をマイクロキャピラリーでつり上げさらにひろげるために、新しい９６ウェルプレートに移した（以下の「マイクロキャピラリーによるつり上げ」を参照せよ）。

【００５６】

マイクロキャピラリーによるつり上げ：　マイクロキャピラリーピッキング装置として、ジョイスティックにより制御される可動アームについているキャピラリーを用いた。マイクロキャピラリーとアームをフードの内側に、ジョイスティックを外側から制御した。対象のクローンを免疫染色法（上記「Ｈ－ＣＢ－Ｐ１の選択」の項に記載）により同定する場合、マイクロキャピラリーをクローンの上に置き、真空ポンプでキャピラリー内を陰圧にし、対象の細胞塊をキャピラリーに吸引した。アームを９６ウェルプレートの新しいウェル上へ動かし、細胞をその中に注入した。

【００５７】

凍結保存：　長期間、細胞を保存するために、トリプシン処理した細胞を1×10^{6}から1×10^{7}細胞／ｍｌで再懸濁した。細胞を遠心（７００　ｒｐｍ、１０分）により沈殿させ、上清を除去した。細胞を冷却した前ならし培地（９００　μｌ）に再懸濁し、凍結バイアルを１８０　μｌのＤＭＳＯと７２０　μｌのＦＣＳで満たし、９００　μｌの細胞懸濁液をＤＭＳＯ／ＦＣＳ溶液中に移した。凍結バイアルを２４時間、特別な凍結容器で保存し、緩やかに細胞を凍結させた。長期間の保存のために、凍結バイアルを液体窒素タンクへ移した（－１９６℃保存）。

【００５８】

タンパク質産物の検出

ＥＣ－ウェスタンブロット（増強化学発光）：　ｈｏｂＦＣ抗体の検出のために、２０μｌの細胞培養上清を１０　μｌの５％　ＳＤＳと混合し、２分間、９７℃でインキュベートした。細胞培養培地はＩｇＭ抗体を含むと予想されるので、培養培地は処理しなかった。メンブラン（アマシャム－ファルマシア（Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ）；ハイボンド－Ｐ）を最初にメタノールでリンスし（１分）、水で３回洗浄し（１分）、プロットトランスファー緩衝液に浸した３　ＭＭ　濾紙片に置く前に、メンブランをプロットトランスファー緩衝液に浸した。５　μｌの前処理した培養培地（ｈｏｂＦＣ抗体）または５　μｌの未処理の（ＩｇＭ抗体）培養培地をメンブランにスポットし、１分間インキュベートした。メンブランをブロッキング緩衝液に置き、振盪しながら、３０分間インキュベートし、Ｔ－ＰＢＳでの５分間の洗浄を３回行った。ブロッキングしたメンブランを検出抗体溶液（ＩｇＧ　１：２０００、およびＩｇＭ　１：５０００）に置き、２時間インキュベートした。Ｔ－ＰＢＳでの２分、５分および１０分のさらなる洗浄を続けた。メンブランを現像液（アマシャム－ファルマシア、ＥＣＬ）中に置き、１分間インキュベートした。最後に、水分をどかし、３　ＭＭ　濾紙に載せ、乾燥しないようにセロファンでラップした。放射光を暗室で観察した。

【００５９】

実施例１：　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１細胞のＩｇＭ領域に特異的なターゲティングベクターの調製

抗体が高発現し、タンパク質が分泌されることがよく知られているので、組換え遺伝子をＩｇＭ配列領域に挿入した。それゆえ、最終的なターゲティングベクターには標的とさ

れるゲノムＩｇＭ配列と１００％相同性を有する配列が必要である。基本のターゲティングベクターｐＶＨＣμでは、長さが２　ｋｂのＶＨ領域と７．４　ｋｂのＣμイントロン領域を選択した（図３を参照せよ）。両者を校正活性をもつポリメラーゼ（プルーフスタート・ポリメラーゼ（キアゲン））を用いたＰＣＲの断片として単離し、ｐＣＲ４ＢｌｕｎｔＴＯＰＯベクター（インビトロジェン）にサブクローニングし、最終的にｐＶＨＣμと命名した一つのベクターに合わせた（図３を参照せよ）。

【００６０】

プラスミドｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃとｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃの調製：　基本のターゲティングベクターｐＶＨＣμは内在性カセットをもたない。ＣＥプロモーター、代替遺伝子ｈｏｂＦｃ、三つのＦＲＴ組換え部位、さらにハイグロマイシン耐性遺伝子およびＡＴＧ欠失ネオマイシン遺伝子を含む内在性カセットをベクターｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃからＢｓｔＤＩ－ＳｗａＩ断片として単離した。断片の末端をＫｌｅｎｏｗポリメラーゼで埋め、ＰｍｅＩで消化し、脱リン酸化した基本のターゲティングベクターｐＶＨＣμとライゲートした。得られたターゲティングベクターをｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃとした。

【００６１】

ＣＥＳプロモーター構築物を欠くが、内在性カセットのその他の部分を全て含む第二のベクターｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃをさらに構築した。ＢｓｔＢＩ－Ｂｓｔｌ１０７Ｉ断片をｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃから単離し、末端を埋めた。ｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃのＢｓｔｌ１０７Ｉ制限部位は、ｆｒｔ　ｗｔ部位とそれに続くｈｏｂＦｃ遺伝子のすぐ上流にあり、それゆえ単離したＢｓｔｌ１０７Ｉ－ＢｓｔＢＩ断片はプロモーターを欠いている。断片を前にＰｍｅＩで消化したｐＶＨＣμベクターにライゲートし、得られたベクターをｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃとした。ｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃとｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃの両ベクターにおいて、内在性カセットの活性のある耐性マーカー遺伝子はハイグロマイシン耐性遺伝子であった。ハイグロマイシン遺伝子の代わりにブラストサイジン遺伝子を含む別のセットのベクターも作製した。

【００６２】

ｐＶＨＣμＣＳＨｈｏｂＦｃｂｌａｓとｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓの構築：　内在性カセット中のマーカー遺伝子としてブラストサイジン遺伝子をもつターゲティングベクターを作製するために、ベクターｐｃＤＮＡＴＲＤをブラストサイジン遺伝子のドナーとして用いた。最初の工程として、ハイグロマイシン遺伝子とブラストサイジン遺伝子の交換があげられる。このために、ブラストサイジン遺伝子をＥｃｏＲＩ－ＳａｌＩ断片として、ｐｃＤＮＡＴＲＤから単離した。内在性カセットベクターｐｃＥＳＨｈｏｂＦｃもＥｃｏＲＩ－ＳａｌＩを用いて開環し、これによりハイグロマイシン遺伝子をＡＴＧ欠失ネオマイシンの部分とともに除去した。ブラストサイジン遺伝子を含む断片を開環したｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃにライゲートし、得られたベクターをｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓｄｅｌｅｔｅｄと命名した。

【００６３】

第二工程は、偶然に除去されたＡＴＧ欠失ネオマイシン遺伝子の再挿入であった。そのために、ＡＴＧ欠失ネオマイシン遺伝子を包含する断片をｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃから単離し、開環したベクターｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓｄｅｌｅｔｅｄに挿入した。得られたベクターをｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓとした。このベクターをブラストサイジン遺伝子のドナーベクターとして、ｐＶＨＣμＣＳＨｈｏｂＦｃとｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃに用いた。ＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片をｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃｂｌａｓから単離し、ＢａｍＨＩ－ＳａｌＩで開環したベクターｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃに挿入し、ｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃｂｌａｓを生じさせた。ＣＥＳプロモーターを欠く対照ベクターｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓを作製するために、ベクターｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃもまた、ＢａｍＨＩ－ＳａｌＩで消化し、再びｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓから単離したＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片をそこにライゲートした。

【００６４】

実施例２：　ｈｏｂＦｃクローンの選択
電気穿孔法：　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１細胞をプラスミドｐＶＨＣμＣｓｈｏｂＦｃｂｌａｓ、ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ、ｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃおよびｐＣＳｈｏｂＦｃｂｌａｓを用いて、電気穿孔法で処理した。トランスフェクション効率を調べるために、細胞をプラスミドｐＧＦＰＮ１ＶＡでトランスフェクトし、模擬対照として、細胞を水試料を用いて、電気穿孔処理した。トランスフェクション効率は約２０％であることが明らかとなった。電気穿孔処理後２日目に、トランスフェクトしたプラスミドに応じて、ハイグロマイシンまたはブラストサイジンのいずれかを培養培地に添加した。模擬トランスフェクト細胞が全て死滅した場合、他のトランスフェクション反応の細胞を集め、９６ウェルプレートのウェルあたり１細胞または５細胞のいずれかの密度で再度播いた。細胞を、適当な抗生物質を添加した培地で培養し続けた。

【００６５】
選択条件を最適化するために、細胞を電気穿孔処理後２日目に、Ｔ７５フラスコ中２０ｍｌに対して10^4細胞、10^5細胞、または10^6細胞播いた。培地には、５　μｇ／ｍｌまたは１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジン、または２００　μｇ／ｍｌまたは４００　μｇ／ｍｌのハイグロマイシンを添加した。１４日目、cm^2あたりのクローン数を調べた。クローンの最高数は、ＣＥＳプロモーターを欠くプラスミド（ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ）でトランスフェクトした1×10^6細胞を播いたフラスコで得られた。細胞をＣＥＳプロモーターをもつプラスミドでトランスフェクトすると、１／３のクローン数となった。さらに、これらのクローンの生育はＣＥＳプロモーターをもたないものよりも悪かった。

【００６６】
抗生物質がもつ、タンパク質産生クローンの選択に対する効果：　Ｔ７５フラスコのクローンの拡張に続き、クローンをトリプシン処理し、９６ウェルプレートに５細胞／ウェルで再度播いた。培養培地には、５　μｇ／ｍｌまたは１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジン、または２００　μｇ／ｍｌまたは４００　μｇ／ｍｌのハイグロマイシンのいずれかを添加した。播種後１０日目に、細胞をテキサスレッドを結合した抗ＩｇＧ抗体とＡＭＣＡ標識したＩｇＭに対する抗体を用いて染色した。ブラストサイジンを用いて培養した細胞では、高濃度の抗生物質を用いると、陽性クローンは減少するという結果を示した。１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジンを用いると、５　μｇ／ｍｌの場合に比べて、１００％以上のｈｏｂＦｃの陰性クローンを観察した。しかし、１０　μｇ／ｍｌのブラストサイジンを用いて培養した細胞を含む９６ウェルプレートの最初の３列をカウントし、プレート全体の結果を出したが、５　μｇ／ｍｌのブラストサイジンを用いて培養した細胞を含む９６ウェルプレートは全ての列をカウントした。

【００６７】
蛍光標識した抗体を用いた選択の利点：　免疫蛍光染色法を用いて、多数のクローンを迅速にスクリーニングできる。直接免疫法を用いて得られた結果は、標的配列のゲノムＤＮＡへの正しい組み込みの最初の兆候であった。発現しないクローンをこの方法で容易に検出した。免疫蛍光染色法は技術的に容易で、メチルセルロース染色法よりも低濃度の抗体を必要とし、細胞の生育に障害を与えない。顕著な傷害なしに、トリプシン処理や細胞を新しい培養器に移すためのマイクロキャピラリーつり上げの前に、細胞を免疫染色することができる。

【００６８】
実施例３：ＩｇＭ座への相同な挿入の検出
ターゲティングベクターをデザインするため、再編成した免疫グロブリン重鎖座を、抗体のｃＤＮＡ配列とヒトゲノム配列の情報を基に、組み立てた。ＩｇＭの産生がターゲティング法によりだめになることを確実にするために、ＡＴＧを含む完全なリーダー配列、Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子をターゲティングベクターから除き、１回の相同組換え事象によりゲノムから削除した。それゆえ、置き換え型のターゲティングベクターはＩｇＭ座と同一の遺伝子型の配列を含み、ｈｏｂＦｃ遺伝子、ブラストサイジンおよびＡＴＧ欠失ネオマ

イシン耐性遺伝子と直接交叉できる。第１４番染色体上に唯一の再編成された活性のあるＩｇＭ座が元の細胞系Ｈ－ＣＢ－Ｐ１に存在するので、相同組換え事象は、蛍光抗体染色と抗ＩｇＭ抗体を用いた上清のイムノブロッティングにより検出されるＩｇＭの発現を完全に止めてしまう。

【００６９】

ＩｇＭとＩｇＧのウェスタンブロット（ドットブロット）： ドットブロット法を、直接免疫染色法で得られた結果を検証するために用いた。これらのクローンの上清（培地）について、ＩｇＭとＩｇＧが存在するかを試験した。上清においてＩｇＭ陰性、ＩｇＧ陽性であれば、相同組換えが起きたと結論できた。

【００７０】

組み込まれた標的配列の検出のためのＰＣＲ： ターゲティングカセットがＩｇＭ座に組み込まれたかを検証するために、フォワードプライマーＶ５（配列番号：７）およびリバースプライマーＶ６（配列番号：８）またはＶ７（配列番号：９）と、鋳型として細胞クローンから単離したゲノムＤＮＡを用いたＰＣＲ反応を準備した。プライマーＶ５は、ターゲティングベクターに存在するＶｈｐｒｏｍ断片の外側のゲノムＶ遺伝子プロモーター配列に結合し、リバースプライマーＶ６は、ＣＥＳプロモーター内側に結合し（それゆえ、ＣＥＳプロモーターをもつプラスミドでトランスフェクトした細胞の場合のみ用いられる）、プライマーＶ７はｈｏｂＦｃ遺伝子の内側に結合する。記載したプライマーの組合せを用いると、ＰＣＲ産物の存在は両方のプライマー結合配列がともに局在すること、すなわち相同組換えに完全に依存する。ＰＣＲアッセイの感度を増加するために、一回目のＰＣＲ産物を鋳型として、プライマーＶＨｐｒｏｍＦ（配列番号：１）とＶＨｐｒｏｍＲ（配列番号：２）を用いたネストＰＣＲ反応に用いた。最終的なネストＰＣＲ産物をＨｉｎｃＩＩとＤｒａＩの制限酵素消化にかけ、得られた配列が正しいことを確認した。これら全てのアッセイから、ＰＢＧ０３クローンＨ６（ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ）、Ｄ４（ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ）、Ｅ１１（ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ）、Ｄ３（ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ）およびＧ８（ｐＶＨＣμｈｏｂｆｃｂｌａｓ）には正しく標的配列が組み込まれていた。クローンＤ３（ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ）をＰＢＧ０４とリネームし、ドイツ微生物・細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に寄託した。

【００７１】

実施例４：標的細胞クローンを作製するための組換え

クローンｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ Ｄ３（ＰＢＧ０４）を、第二の機能配列（ｆｒｔｗｔ、ＧＦＰ ＯＲＦおよびポリアデニル化シグナル、ＡＴＧとｆｒｔ５に続く最小プロモーター）を含有するベクター２、およびｆｌｐリコンビナーゼの機能発現ユニットを含有するプラスミドｐｆｌｐで、トランスフェクション試薬エフェクテン（ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ）（キアゲン）を用いて、トランスフェクトした。ベクター２はＧＦＰ発現ユニットを動かすプロモーターを含まない。機能化細胞（ＰＢＧ０４）は、２００ μｇ／ｍｌからのジェネティシン選択に感受性である。ベクター２は、ジェネティシン耐性を賦与するネオマイシン耐性遺伝子がない。予想されるように、緑色蛍光はトランスフェクション後１－４日では検出できなかった。ジェネティシンを用いた選択の２週間後、ＧＦＰを強く発現する個々の安定クローンを検出できた。ＧＦＰの発現は、機能プロモーターに近接して組み込まれるかに依存する。ジェネティシン耐性は、ベクター２のＡＴＧに続くネオ耐性遺伝子の再構築に依存する。全ての場合において、ｆｒｔｗとｆｒｔ Ｆ５の間の配列を置き換え、機能的にＣＥＳプロモーターとＧＦＰをリンクするとともに、ＡＴＧ欠失ネオマイシン遺伝子をＡＴＧとリンクしたと結論する。

【００７２】

実施例５：レプチンＦｃのグリコシル化パターンの研究

ＰＢ６０４のレプチンＦｃをローラーボトル培養で産生し、アフィニティクロマトグラフィ、ゲル濾過および膜濾過を含む一般的な工程で精製した。タンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチドをＰＮＧａｓｅ Ｆ消化により脱グリコシル化した。グリカン

を２－アミノ－ベンズアミドで標識し、Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｈｙｐｅｒｓｉｌ ＡＰＳ－２カラムのＨＰＬＣで分離した（図１６）。さらに、表５に示した個々の画分の特徴を調べるために、脱シアル化した、標識試料をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＢＲＵＫＥＲ ＢＩＦＬＥＸ™）にかけた。

【００７３】

Ｆｃ上の単一のＮ－グリコシル化部位は、３７％がシアル化された複合オリゴ糖構造をもち、この値はヒト血液中の抗体のシアル化の平均に近似する。シアル酸をさらにシアリダーゼ処理、ＤＭＢ標識、およびＢｉｓｃｈｏｆｆ Ｈｙｐｅｒｓｉｌ－ＯＤＳカラムによる分離により調べ、シアル酸リファレンスパネル（オックスフォード糖質科学（Ｏｘｆｏｒｄ ＧｌｙｃｏＳｃｉｅｎｃｅｓ））と比較した。主として、Ｎ－アセチルノイラミン酸を見出した。２％だけが、マウスミエローマ細胞で支配的な型である、免疫原性であることが示された、Ｎ－グリコリルノイラミン酸であった（Ｎｏｇｕｃｈｉ，Ａ． ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ，１７（１）：ｐ．５９－６２ （１９９５））。ヒト細胞では作られず、前から存在する抗体によりクリアランスが増加することが知られている、α１，３ Ｇａｌ構造はグリカンの１．３％にだけ見出された。上記の結果を表６に要約した。

【表５】

表５：Phenomenex Hypersil APS-2カラムの画分をMALDI-TOF-MS分析にかけた結果として同定されたオリゴ糖

ピーク	領域（%）	モノアイソトピック質量 (m/z)	提示される構造
1	1,2	1256,9	Man3HexNAc1
2	1,4	1402,9	Man3HexNAc1Fuc
3	8,0	1378,4 Main	High Man5
4	1,6	1377,9 1419,0	High Man5 Man3HexNAc1Hex1
5	4,3	1606,5	Man3HexNAc2Fuc
6	3,1	1565,5	Man3HexNAc1Hex1Fuc
7	2,7	1540,7 Trace 1581,7 Main	HighMan6 Man5HexNAc
8	4,7	1540,5 1581,5 Main 1622,7	HighMan6 Man5HexNAc Man3HexNAc2Hex1
9	9,3	1768,8	Man3HexNAc2Hex1Fuc
10	6,6	1743,8 Main 1784,9 Trace	Man5HexNAc1Hex1 Man3HexNAc2Hex2
11	8,7	1784,7	Man3HexNAc2Hex2
12	1,6	1784,5 1889,7 1930,7 Trace	Man3HexNAc2Hex2 Man5HexNAc1Hex1Fuc Man3HexNAc2Hex2Fuc
13	10,9	1930,8	Man3HexNAc2Hex2Fuc
14	3,0	1664,5 1946,9 Trace 2093,0	Bi - 2AB Man3HexNAc2Hex3 (Bi + Gal*) Man3HexNAc2Hex3Fuc (Bi+Fuc+Gal*)
15	25,7	2150,0	Man3HexNAc3Hex3
16	3,2	N.D.	
17	2,8	N.D.	
18	0,9	2031,2 2514,2	Tri - 2AB Man3HexNAc4Hex4

【表６】

表６：ヒト血液、ハムスターＣＨＯ、マウスＮＳ０、又はヘテロハイブリドーマＰＢＧ－０４から単離したタンパク質中のＮ結合オリゴ糖の特性のまとめ

特性	影響	PBG-04	CHO	NS0	ヒト
シアル化	↓proteol. Sens./Clearence	37%	可変	可変	35-40
N acetyl-	wanted	98%	高	低	100%
N glycolyl-	免疫原性	2%	低	高 (>50%)	no
2-6 linkage	unknown		no	no	可変
1-3 alpha gal.	Preexist. Ab: clearence	1,3%	可変	高	no
Bisecting GlcNAc	?→↓ コアのフコシル化	no	no	no	10%
コアのフコースなし	↑ ADCC, Fcγ－結合	60%	5%	10-50%	5%
G0-構造	↑ 二量体化 , G2→↑CDC	4;3%	可変	可変	低

【００７４】

実施例６：ＰＢＧ０４の軽鎖ラムダ座に対するターゲティングベクターの調製

再編成したラムダ鎖座の構造を既知のラムダ遺伝子のｃＤＮＡとヒトゲノム配列をアラインすることにより同定した。遺伝子は、可変遺伝子、すでに合体しているＪおよびＨセグメントからなる。Ｖ３－１９が可変遺伝子として同定された。

【００７５】

この方法は定常遺伝子座が１００％同一の遺伝子コピーを含むために、該遺伝子を同定するには不適当であった。ＰＣＲは、既知のリーダー配列と定常領域遺伝子間にある独特の介在配列のプライマーに基づく。プライマーＶ８１、Ｖ８３（それぞれ、配列番号：１３と１４）は、予想される制限パターンを示し、それゆえ、Ｈ－ＣＢ－Ｐ１の再編成されたラムダ遺伝子を構成する遺伝子（配列番号：２１）としてＪ２ｔｏＨ２を同定できる、正しいサイズのＰＣＲ産物をもたらした。この情報に基づき、再編成された座の配列を提示し、ターゲティングベクターを構築した。

【００７６】

可変遺伝子Ｖ３－１９のコーディング配列の５’上流に隣接する領域を、Ｐｒｏｖｅｓｔａｒｔポリメラーゼ（キアゲン）を用いて、プライマーＶ８９とＶ９４（それぞれ、配列番号：１５と１８）で作製した。４ｋｂ断片をｐＰＣＲ４ｂｌｕｎｔｔｏｐｏ（インビトロジェン）にクローニングした。３プライム隣接領域を２工程で増幅した：重複ＰＣＲ産物をプライマーＶ９０　Ｖ９１とＶ１１５　Ｖ１１６（それぞれ、配列番号：１６、１７、１９および２０）を用いて作製し、両断片に存在する一個所のＳｐｈＩ部位を介して並べた。隣接配列を単一ベクターＰＶＬＣＬにクローニングした（配列番号：２２）。

【００７７】

重鎖座の挿入とは独立に遺伝子の挿入を行うために、類似ではあるがヘテロ特異的なｆｒｔに基づく交換システムを設計した。５’３’の方向に、ヒトアルファ（１）アンチトリプシン遺伝子、ハイグロマイシン耐性マーカー、ｗｔ　ｆｒｔ部位、およびＡＴＧ欠失ヒスチジノール耐性マーカーに続く、ｆｒｔ　Ｆ３部位、ＣＭＶ　ＥＦ１アルファ雑種プロモーターを含む。これらのエレメントをｐＶＬＣＬにクローニングし、ｐＶＬＣＬａａｔｈｙｇを作製した。

【００７８】

ｆｒｔ　ｗｔとＦ５の部位は組換えを起こさないので、特異的な交換ベクターは重鎖座と軽鎖座を排他的に標的とすることができ、それぞれ、ネオマイシン耐性マーカーとヒスチジノール耐性マーカーに対するプロモーターと開始コドンを提供する。選択性を増加させるために、交換ベクターはｆｒｔ部位に対して異なるオープンリーディングフレームの開始コドンを含む。結果として、ベクターの誤ったｆｒｔ部位への取り込みは、それぞれの抗生物質への耐性を生じない。

【００７９】

ＰＶＬＣＬａａｔｈｙｇを電気穿孔法を用いて、ＰＢＧ－０４にトランスフェクトした。細胞をＴ７５フラスコに播き、２００　μｇ／ｍｌのハイグロマイシンで選択をした。３週間で得られたクローンを希釈クローニング法で単離し、相同交換で得られたクローンを、蛍光標識した抗ヒト　ラムダ鎖抗体を用いて、免疫蛍光シグナルなしで同定した。得られた細胞クローンを、アルファ１アンチトリプシンの発現で解析した。これらのクローンは高レベルで発現される二つの独立のトランスジーンを共発現するのに適している。好ましくは、これらの遺伝子は抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子である。ｆｌｐリコンビナーゼを用いた単一の交換反応で、重鎖および軽鎖の遺伝子をそれぞれの場所に組み込むことができる。

【図面の簡単な説明】

【００８０】

【図１】概念の概観、遺伝子のｆｒｔ部位におけるＩｇＨ座への部位特異的挿入を含む高収量発現細胞系を作出するための多段階工程。　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１のＩｇＨ座を図１ａおよび図１ｂの上側の図式で表す。ＩｇＨ座は可変遺伝子プロモーター、続いてタンパク質リーダー配列および、再編成され次にエンハンサーＥμ、ＭＡＲおよびＣμコーディング配列をもつ特異的Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子を含んでいる。相同組換えの標的配列を大理石模様で示す。ベクター１（ターゲティングベクター）の隣接配列因子「Ｖｈｐｒｏｍ」と「Ｃμ」、およびゲノムＤＮＡとの相同組換えを介して、隣接配列の間にある第一の機能化配列がゲノムＤＮＡに導入され、組換えＰＢＧ０３ゲノムが得られる。第一の機能化配列は、ｆｒｔ部位（ｆｒｔＦ５、ｆｒｔＦ３およびｆｒｔ　ｗｔ）、人工強力プロモーターＣＥＳ（図１ａ）または追加プロモーターなし（図１ｂ）を第一の発現遺伝子（ｈｏｂＦｃ）の上流に含有する。加えて、ブラストサイジンまたはハイグロマイシン耐性遺伝子、およびＡＴＧ欠損ネオマイシン遺伝子が第一の機能化配列の一部である。組換えゲノムは染色体ＤＮＡに組み込まれた第一の機能配列を有する。　ＦＬＰリコンビナーゼは、組換えＨ－ＣＢ－Ｐ１ゲノムのｆｒｔＦ５とｆｒｔＦ３部位、またはｆｒｔ　ｗｔとｆｒｔＦ３部位、およびベクター２（真の目的の遺伝子が導入され、人工の、または内在性のＶＨプロモーターから発現される）との組換えを触媒する（それぞれ図１ａおよび図１ｂ）。ｆｒｔ　ｗｔとｆｒｔＦ３との間にある第一の機能化配列の部分は、組換え後にＡＴＧ欠損ネオマイシン遺伝子と同一のオープンリーディングフレームを有するＡＴＧが続く弱いプロモーターに置き換えられる。得られたゲノムはｈｏｂＦｃ遺伝子およびブラストサイジンまたはハイグロマイシン耐性遺伝子を消失し、代わりに目的の遺伝子（標的遺伝子）および機能ｎｅｏ遺伝子を有する。

【図２】ターゲティングベクターの内在カセット（ＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ）。　ＣＥＳプロモーター、ｈｏｂＦｃ融合遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子および開始コドン（ＡＴＧ）欠損ネオマイシン遺伝子を含む内在カセットの詳細な構造を示す。より詳細には、内在配列は改良ｆｒｔ部位（ｆｒｔＦ５）、続いて初期ＣＭＶプロモーター／エンハンサーエレメントおよび延長因子アルファ遺伝子の第一イントロンを含むハイブリッドプロモーター構造を含む。次の要素は、ｆｒｔ野生型部位、続いてｈｏｂＦｃ融合遺伝子（ｈｏｂＦｃ）およびＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０ＰＡ）である。ブラストサイジン耐性遺伝子の発現を制御する弱いＳＶ４０プロモーターが続く。最後の要素は、改良ｆｒｔ部位（ｆｒｔＦ３）およびそれに続くＡＴＧ欠損ｎｅｏ遺伝子である。改良ｆｒｔ部位Ｆ３およびＦ５は同一部位で組換えを起こすが、野生型ｆｒｔ部位およびＦ５またはＦ３それぞれでは組換えを生じない。ｆｒｔ　Ｆ３部位はＡＴＧを欠く隣接するオープンリーディングフレームを形成するようにｎｅｏ遺伝子の上流に位置する。

【図３】隣接領域ＶｈｐｒｏｍとＣμを含む中間体ベクターｐＶＣμのクローニング法。　２　ｋｂのＶＨプロモーター配列を、ＰＢＧ０３細胞のゲノムＤＮＡから、フォワードプライマーＶＨｐｒｏｍＦ（配列番号：１）とリバースプライマーＶＨｐｒｏｍＲ（配列番号：２）を用いて増幅した。ＰＣＲ産物ＶＨｐｒｏｍをｐＣＲ　４ＢｌｕｎｔＴＯＰＯベクター（インビトロジェン）にクローニングし、得られたベクターをｐＶＨと命名した。７．４　ｋｂのＣμ領域をＨ－ＣＢ－Ｐ１のゲノムＤＮＡから、二つの重複断片、すな

わちＣμＭｉｔｔｅＲとＣμＭｉｔｔｅＦとして増幅した。プライマーＣμｉｎｔＶ（配列番号：３）とＣμＭｉｔｔｅＲ（配列番号：５）から産物ＣμＭｉｔｔｅＲが生じ、プライマーＣμＭｉｔｔｅＦ（配列番号：６）とリバースプライマーＣμｉｎｔＲ（配列番号：４）から断片ＣμＭｉｔｔｅＦが生じる。両断片をｐＣＲ　４ＢｌｕｎｔＴＯＰＯベクター（インビトロジェン）にクローニングし、得られたベクターをｐＣμＭｉｔｔｅＲおよびｐＣμＭｉｔｔｅＦとした。両方のベクターを制限酵素ＳｐｅＩとＤｒａＩＩＩで開環し、ｐＣμＭｉｔｔｅＲのＳｐｅＩ－ＤｒａＩＩＩ断片を開環したｐＣμＭｉｔｔｅＦに連結することにより、完全長のＣμ配列を再構築した。得られたｐＣμは完全長のＣμ領域（Ｃμイントロン）を有する。ＶＨプロモーター配列およびＣμ配列を、ｐＶＨおよびｐＣμの両者を制限酵素ＳｐｅＩとＰｍｅＩで消化し、分離したＶｈｐｒｏｍのＰｍｅＩ－ＳｐｅＩ断片をホスファターゼ処理した開環ベクターｐＣμに挿入することにより、一つのベクターｐＶＨＣμに結合した。

【図４】ターゲティングベクターｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃおよびｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃのクローニング法。　高活性プロモーターＣＥＳとｈｏｂＦｃ融合遺伝子を含むターゲティングベクターｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃを、ｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃから単離した末端を埋めたＳｗａＩ－ＢｓｔＢＩ断片を、ＰｍｅＩで消化し、脱リン酸化したｐＶＨＣμベクターにライゲートすることにより作製した。ｈｏｂＦｃ融合遺伝子を有し、ＣＥＳプロモーターを持たないターゲティングベクターｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃを、ｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃから単離した末端を埋めたＢｓｔ１１０７－ＢｓｔＢＩ断片を、ＰｍｅＩで消化し、脱リン酸化したｐＶＨＣμベクターにライゲートすることにより作製した。

【図５】ブラストサイジン耐性をもつターゲティングベクターｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓおよびｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓのクローニング法。　プラスミドｐｃＤＮＡＴＲＤをブラストサイジン遺伝子のドナーとして用いた。ハイグロマイシン遺伝子配列をベクターｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃからＦＲＴ５およびネオマイシン配列とともに除去するために、ベクターをＥｃｏＲＩとＳａｌＩで消化し、脱リン酸化した。ブラストサイジン耐性遺伝子配列を含むｐＣＤＮＡＴＲＤのＥｃｏＲＩ－ＳａｌＩ断片を前に開環したｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃベクターにライゲートし、得られたプラスミドをｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓｄｅｌｅｔｅｄと命名した。Ｆｒｔ　Ｆ５配列とＡＴＧ欠失ネオマイシン配列をｐＣＥＳＨｈｏｂＦｃからＳａｌＩ－ＳａｌＩ断片として単離し、ｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓｄｅｌｅｔｅｄのＳａｌＩ部位に再挿入した。得られたプラスミドｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓをｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃと共にｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓを作製するために用いた。ｈｏｂＦｃ配列とブラストサイジン遺伝子を含有するＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片をｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓから単離し、ＢａｍＨＩとＳａｌＩを用いて開環したベクターｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃに挿入し、ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓを得た。ベクターｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓを、ｈｏｂＦｃ遺伝子とブラストサイジン遺伝子を含むＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片を、ＢａｍＨＩとＳａｌＩで消化したベクターｐＶＨＣμＨｈｏｂＦｃにライゲートすることにより作製した。

【図６】Ｈ－ＣＢ－Ｐ１クローンの免疫染色。　ｐＶＨＣμＣＥＳＨｈｏｂＦｃｂｌａｓをもつＨ－ＣＢ－Ｐ１細胞のトランスフェクションにより得られたＨ－ＣＢ－Ｐ１クローンを、テキサスレッド結合抗ヒトＩｇＧ、ヤギのF_{γ}断片特異的抗体またはＡＭＣＡ結合抗ヒトＩｇＭ、ヤギの$Fc_{5\mu}$特異的抗体を用いて免疫染色した。左カラムはテキサスレッド結合抗体で染色し、ＵＶ　ＷＧフィルターで可視化した二つのＨ－ＣＢ－Ｐ１クローンを示す。右カラムには、ＡＭＣＡ結合抗ＩｇＭ抗体で染色し、ＵＶフィルターＷＵにより可視化した後の同一クローンを示した。上部パネルのクローンではＩｇＧのみの染色が明らかであり、下部パネルのクローンでは両抗体による染色が観察される。最初のクローンは相同組換えから得られ、他のクローンは機能配列の非正統的挿入を含んでいる。

【図７】Ｈ－ＣＢ－Ｐ１クローンの直接免疫染色とクローンのさらなる拡張。　細胞の生存度を危険にさらすことなしにＨ－ＣＢ－Ｐ１クローンが免疫染色されること、および続いて、染色された細胞の拡張が可能であることが示されている。96ウェルプレートで10日間培養されたＨ－ＣＢ－Ｐ１クローンをテキサスレッド結合抗ＩｇＧ抗体で免疫染色した

。通常の光学顕微鏡で可視化した免疫染色前のクローンの写真を最上部左パネルに示した。テキサスレッド結合抗ＩｇＧ抗体で免疫染色した同一クローンを最上部右パネルに示した。下部パネルはトリプシン処理後のウェルの写真である。下部左パネルに示したように、通常の光学顕微鏡下で写真を撮影すると、細胞は観察されない。右パネルはＵＶフィルターＷＵを通した同一ウェルを示している。細胞は完全にウェルからはがされ、蛍光抗体の沈殿がウェルに残り、細胞表面には接着していない。

【図８】個々のクローンの細胞培養上清の抗ＩｇＭドットブロット。　以下のクローン、１：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｄ６；２：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｇ８；３：ｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ａ３；４：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｂ４；５：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｄ３；６：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｇ８、の上清をメンブラン上にスポットし、ＥＣＲ染色法を行った。最初の細胞集団は均一にＩｇＭを産生するので、ＩｇＭ発現を検出できないクローンは、ターゲティングベクターにより調節されるＩｇＭ　Ｈ遺伝子の不活性化の結果である。相同隣接配列を欠くｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓのトランスフェクションにより生じたクローンＡ３はＩｇＭ座を標的とすることができず、ＩｇＭを発現する。

【図９】個々のクローンの細胞培養上清の抗ＩｇＧドットブロット。　以下のクローン、１：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ６；２：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ６（１：２希釈）；３：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ－Ｇ８；４：ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｇ８（１：２希釈）；５：ｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ａ３；６：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｂ４；７：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ３；８：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ３（１：２希釈）；９：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ３（１：１０希釈）；１０：ｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｇ８；１１：ｈｏｂＦｃ標品　５００　ｎｇ／ｍｌ；１２：ｈｏｂＦｃ標品　５０　ｎｇ／ｍｌ　ＩｇＧ、の上清をメンブラン上にスポットし、抗ＩｇＧ抗体を用いてＥＣＲ染色法を行った。

【図１０】ＰＣＲによる相同組換えの検出。　相同組換え事象が（ターゲティング）ベクターとＨ－ＣＢ－Ｐ１細胞のＩｇ座の間で起きているかを試験するために、ＰＣＲ法を適用した。組換えにより、ＡＴＧ欠損ネオマイシン遺伝子に続く、ｈｏｂＦｃ遺伝子および耐性遺伝子（ハイグロマイシンまたはブラストサイジン）がゲノムＶ遺伝子プロモーター配列とエンハンサーＥμの間に組み込まれる。Ｖｈｐｒｏｍ断片の外側のゲノムＶ遺伝子プロモーター配列に結合するフォワードプライマーＶ５（配列番号：７）を、最初の機能配列内に特異的に結合するプライマーＶ６またはＶ７（それぞれ配列番号：８と９）と組み合わせた。ＰＣＲ産物の存在は両方のプライマーが結合する配列の共存、すなわち相同組換えに強く依存する。陽性であることを確認するために、陽性と推定されるＰＣＲ産物を、プライマーＶｈｐｒｏｍＦとＶｈｐｒｏｍＲ（それぞれ配列番号：１と２）を用いたネストＰＣＲ反応に用いた。ａ：プライマーの位置、ｂ：ＰＣＲ産物の電気泳動分析左：第一のＰＣＲ　Ｖ５、Ｖ７レーン１：１ｋｂラダー（インビトロジェン）；レーン２：クローンｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｈ６；レーン３：クローンｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｂ１０；レーン４：クローンｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ４；レーン５：クローンｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ８；レーン７：陰性コントロール　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１右：ネストＰＣＲレーン１：１ｋｂラダー（インビトロジェン）；レーン２：陰性コントロール　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１；レーン３：クローンｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｈ６；レーン４：クローンｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ４；レーン５：クローンｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｅ１１

【図１１】選択圧なしでのｈｏｂＦｃの発現。　細胞を３ヶ月間選択圧なしで培養した。発現を調べるために、細胞を10^5細胞／ｍｌの密度で播種した。２４時間後、細胞培養上清を集め、抗ヒトＦｃ抗体を用いたウェスタンブロット（ドットブロット）にかけた。上清を左から右へ、無希釈、１：２希釈および１：１０希釈の順にフィルターにのせた。左：クローンｐＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ａ３（ランダム挿入）、中央上　ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｇ８；中央下　ｐＶＨＣμｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｇ８；右　ｐＶＨ

ＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ３発現はｈｏｂＦｃ遺伝子を含む機能化配列の相同的挿入の結果得られるクローンにおいて安定である。

【図１２】モデル標的遺伝子としてＧＦＰを用いた標的細胞クローンの生成。　クローンｐＶＨＣμＣＥＳｈｏｂＦｃｂｌａｓ　Ｄ３（ＰＢＧ０４と改名）を第二の機能配列（ｆｒｔｗｔ、ＧＦＰオープンリーディングフレームおよびポリアデニル化シグナル、ＡＴＧおよびｆｒｔＦ５に続く最小プロモーター）を含有するベクター２、およびｆｌｐリコンビナーゼの機能発現ユニットを含有するプラスミドｐｆｌｐでトランスフェクトした（注：ベクターは、発現させるための機能プロモーターが欠失しているので、元の細胞ではＧＦＰを発現できない）。Ｇ４１８を用いた選択の２週間後、ＧＦＰを高発現する個々の安定クローンを検出できる。Ｇ４１８耐性同様、ＧＦＰ発現は相同組換え事象に依存する。

【図１３】ヘテロハイブリドーマＨ－ＣＢ－Ｐ１における再編成の同定。　Ｈ－ＣＢ－Ｐ１由来の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子のｃＤＮＡの配列を決定し、データベースの配列と比較した。重鎖遺伝子を構成するゲノム遺伝子は、相同性から、再編成されていないゲノム配列と同一であった。Ｖ１－２、Ｄ１、Ｊ６およびμの同定を基に、再編成された座のゲノムマップを構築した。この情報を用いてＰＣＲプライマーを設計し、５’から可変遺伝子Ｖ１－２プロモーターを伸長し、Ｄ、Ｊおよびμイントロン配列を含むが、可変遺伝子のＡＴＧは含まれないそれぞれの断片を増幅し、ターゲティングベクターを構築するために用いた。　ラムダ軽鎖可変遺伝子Ｖ３－１９を同様に相同性検索により同定した。座が１００％同一の遺伝子コピーを含んでいるので、このアプローチは定常遺伝子を同定するには不適であった。定常領域遺伝子間の介在配列のプライマーに基づくＰＣＲから、Ｈ－ＣＢ－Ｐ１の再編成されたラムダ遺伝子を構成する遺伝子として、Ｊ２およびＨ２が同定された。

【図１４】Ｈ－ＣＢ－Ｐ１の染色体分析。　ＧＴＧバンディング、左パネル６８－９４染色体、が見出された。大部分はスペクトル核型分析でマウスの染色体として同定された（中央および右パネル）。Ｈ－ＣＢ－Ｐ１内のヒト染色体を、特異的に標識したヒト染色体ライブラリーを用いたハイブリダイゼーションにより同定した。８本の完全なヒト染色体、すなわち４、５、７、１０、１４、１７、１８、２２番染色体、さらに、４、８、９、１０、１１、１４、１６番染色体の断片を同定した。ヒトＩｇＨ座特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションの結果、完全な１４番染色体上に単一のＩｇＨ座があることが明らかとなった。

【図１５】哺乳類糖タンパク質のＮ結合オリゴ糖構造の概略図。　レプチン－Ｆｃ分子は二つのＮ結合オリゴ糖、Ｆｃドメインのそれぞれの鎖に一つを含む。

【図１６】レプチンＦｃのアミノ相－ＨＰＬＣ。　ＰＢＧ－０４のレプチンＦｃをローラーボトル培養で産生し、アフィニティクロマトグラフィ、ゲル濾過および膜濾過を含む一般的な方法により精製した。タンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチドをＰＮＧａｓｅ　Ｆ消化により脱グリコシル化した。グリカンを２－アミノ－ベンズアミドで標識し、Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｈｙｐｅｒｓｉｌ　ＡＰＳ－２－カラムのＨＰＬＣにより単離した。ピーク番号は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析で用いた画分を表す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> PROBIOGEN AG

<120> High Yield Heterologous Expression Cell Lines for Expression of Gene Products with Human Glycosylation Pattern

<130> 032353wo/JH

<140>
<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer VHpromF

<400> 1
atactagtcg gccgcaggca catccacagt cac 33

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer VHpromR

<400> 2
tcccgggtat cgatggagct ctcaggggat tc 32

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CμintV

<400> 3
catcgatccg ctactactac tacatgg 27

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CμintR

<400> 4

cggccacgct gctcgtat 18

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer CμMitteR

<400> 5
agctcacctg gtgcaact 18

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer CμMitteF

<400> 6
gacctaagct gacctagac 19

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V5

<400> 7
tccctccaaa agctgtag 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer V6

<400> 8
atggcggtaa tgttggac 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer V7

<400> 9
cacaagaatc cgcacagg 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer EBVtestR

<400> 10
cctgatattg caggtagg 18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer EBVtestF

<400> 11
taccgacgaa ggaacttg 18

<210> 12
<211> 377
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 12
cagctggtgc agtctggggc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc 60
aaggcttctg gatacacctt caccggctcc tatatgcact gggtgcgaca ggccccctgga 120
caaggccttg agtggatggg acggatcaat cctaacagtg gtggcacaaa ctatgcacag 180
aaatttcagg gcagggtcac catgaccagg gacacgtcca tcagcacagc ctacatggag 240
ctgagcaggc tgagatctga cgacacggcc gtgtattact gtgcgagaga caagctttcc 300
cggtcagaag taccagctgg ccgctactac tactacatgg acgtctgggg caaagggacc 360
acggtcaccg tctcctc 377

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V81

<400> 13
agcttcggct caacacag 18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V83

<400> 14
gccttacctg cagagatg 18

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V89

<400> 15
agtatacccc agaactctgc tt 22

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V90

<400> 16
ggccgctgcg gccggaagat gaggctgact 30

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V91

<400> 17
agcggccgct tgcaggacaa tatga 25

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V94

<400> 18
ttgcgtgaca ggctcagt 18

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V115

<400> 19
atcacacggc acttctcg 18

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer V116

<400> 20
gagatatcgg cttctggagg acact 25

<210> 21
<211> 14000
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Proposed
sequence of the arranged light chain locus

<400> 21
ctctccagca aggggataag agaggcctgg gaggaacctg ctcagtctgg gcctaaggaa 60
gcagcactgg tggtgcctca gccatggcct ggaccgttct cctcctcggc ctcctctctc 120
actgcacagg tgatcccccc agggtctcac caacctgccc agcccaaggg ttctgggtcc 180
agcgtgtcct tgattctgag ctcaggaggg cccttcctgt ggtgggcagg atgctcatga 240
ccctgctgca gggtgggagg ctggtggggc tgaactcccc ccaaactgtg ctcaaaggct 300
tgtgagagcc tgagggactg cacctgccag gagagagtag tgagttttca gttcaaagtc 360
tccatacaac aggaaagtca tgggccactg gggctggggc tgattgcagg ggataccctg 420
agggttcaca gactctctgg agcttgtctg ggacagcagg gcaagggatt tcataagaag 480
catctttcac ctgcaagcca acctctctct tatttattta tttatttatt tatttattta 540
tttatttatt tttatctttg caggctctgt gacctcctat gtgctgactc agccaccctc 600
ggtgtcagtg gccccaggac agacggccag gattacctgt gggggaaaca acattggaag 660
taaaagtgtg cactggtacc agcagaagcc aggccaggcc cctgtgctgg tcgtctatga 720
tgatagcgac cggccctcag ggatccctga gcgattctct ggctccaact ctgggaacac 780
ggccaccctg accatcagca gggtcgaagc cggggatgag gccgactatt actgtcaggt 840
gtgggatagt agtagtgatc atcccacggt gacacaggca gatgaggaag tgagacaaaa 900
acaccctccc agcctcggtc accctcttgc tccagccccg ggaagcctgt tgataaagcc 960
atgagtgaat ctggcccagt tcacctggat ctgagccttt caggttgccc ttccctccag 1020
ccccctccag gagtctctac agaagataca tcaggcataa atatggcctg gaagggccag 1080
aatcatctgg tgacttgggg ctgttgtgtg agttagagaa tgaaggcttg ggtggaaaga 1140
cagacagagg caacctctgt ccactgtcct acccctggat ggtcatatgg tggggacagg 1200
gcaagtcctt agaccaactg tctggatcag gccccagaac tactgcccag ttctgctgag 1260
gtcctggccc ccaggctgtg tggcagcctg tgattcccaa cagagcaaac cagaggaatg 1320
gacactgtga agtctgccca gatcccctcc tcaatgtgac ccacctggca ctgctgagaa 1380
gcccagcagc tcagagctgt gccctcactg ggaagtgctg ttggttgcag aaagcttcct 1440
caagtttgtg tccctttca gaggggttcg gtttaatcaa ccaagatctc aaatccttgc 1500
ctcaatttaa gatgccactg aatgaagggc ctcccagctc cagagctccc tgtgtggata 1560
cctgaggcct caatgtcaac tccatcacga gtcagggtct ccttctgccc cgtgttgcct 1620
ccccactcc cttctgaatc ttctgtgcat ggacatctct attgcagagt tagcttccag 1680
agaaccccat ctaagatggc cagctgtccc caacatgggt catcagggac ctgagtaggc 1740
cactataaac tgaaaactct ggtttctgtc caaatttgca gagtaaatgt tgaaatgccc 1800
aatctgatgg ttccttgaat ttttatggaa tgaaaaggga gcctgacatg ccaggtgctc 1860
tgggttgagg gattgttgga gtcagatctc cctgcaggaa agcccggggc aggggagca 1920
gcctcacccc tcacaggaac cacagataca cccacaaggt gagctgcagg atggatgctg 1980
cccacctcca ccctccacat cctctgtaaa tgttgctcct ttctacaact ccaaccagat 2040
atgtagatgt ggcgaactac gtaaaatacg gatcattcat cacatcaaaa cccactgcag 2100
gacaccctgg tcaacaaaga acccaatcac atccccatca actacatagt ttccaaattt 2160
tccatctcca gaaaaataac aataacaata tacatgaaaa tcgatgtaat ttatctcata 2220
cataatttca tgttgataac gtgaaaatga tagtattttg ctctactgaa ataaataaaa 2280
tatatatata tatctgaatt tatttgtctt atcttttcat atttaatgtg gtgactagac 2340
actaggggt cacaggagga tcgtgtcata ccactatggg acagagctcc tcacaactct 2400

ttcaggtgac aggtactgtt gagtaacctg ctgcaagcat ccccatctcc accagaccat 2460
ataagtgtga acccaggaag aggcactgga acaatagaga gaaaaacctg cttgtgcaga 2520
agacggtgcc cttgagccct gctcctgctc catcctacgg gtgccacatt catctcatgg 2580
tgtaatattt cgtgccctgc ctgagcttat gaccgagggg atatggcagg tctgactgtg 2640
tggttactgg tgtctcatga ggttctggat gtaacaaagc cctcgaatat agaagaggtt 2700
gttttcaaaa ggaaataatt atctactgca catgacatag acttgttgct aaatcccatg 2760
cgtctacact aggattctcc tctgaagcct tgccttaagc acaaggtttc agttcctatg 2820
tccagttcct ctattatggt agagtctgct agtttctctg gcccaatagc aggacactca 2880
ctccccccacc tgcacctgct gcagagcctt tctactcttg gccccaaaac actgggtgac 2940
acagttctca gacccatgat ttatagtgtc agtattcagg cctcaggggt ccctgatggc 3000
ttctctggct ccaagtctgg aaacacagcc tccatgacca tctctgggtt ccaggctgag 3060
gatgaggctg attattactg caactcacat aggagaggtg gcactttcca ccgtggtcca 3120
agttcatggg gaattgagac ccaaacctgc cctgggctct cagcctctct cttgttctga 3180
agatgcttcc tcaccctgtg caaggggctt cttgcagcac tgccttgaga atttcccctc 3240
tcccagctcc tctcctttct caccaggaag tccaaaagga aacctgctct gtgatttctc 3300
atccaggaca gtgacagctt cctgatgctt gtgtgctgtg gtccctgaat gtgcaactct 3360
tcctagctct tcaaatgcag gcacatagtg agaaaagctg cctgactggt gcattcactg 3420
ctgtttttaa ggatgtcctc acccaaaatg catcctcctc ccaaattgtg aagaacaatc 3480
tggacagagg tcattacagg gagtttcaag aaactgcatc ttattcaatt gtgtccacca 3540
tggtctggta aagatggccc tcctggatgg actattcctc tgcatgtctg tcctgaagca 3600
gtgaccactg tgagaagatc tgaacatgtt tgtgaggtat taaggacgag aggaaactgt 3660
tgtttttatt attcttttgt ttttgttttt gaaacaaact tttgctttgt cgccaggctg 3720
gagtgcagtg gcagaatctt ggcttactga aatctcagcc tcccaggctc taccaatgct 3780
ccctgcctca gcctcccgaa gagctgggat aacaggtgac caccaccatg cctggctgat 3840
ttttgtatat ttagtagaga cgggatttca ccatgttggc caggctggtc ttgaactcct 3900
gatctcaggt gatgcaccca cctcggcctc tcaaagggat gggaatacac acaggagcca 3960
ctgcatctgg cagtgttttt tttatttttg ctcctcctct ttgcctcaat acctcaggtt 4020
gctgagctgg ggagattttg cgtgacaggc tcagtgctcc ctcaaaatcc tcccgtctca 4080
attcgctggg gccctgtcct ggaaactccc caaaagtgga tggtgtccct ataggttggg 4140
agtttccaaa atggccccac agggaagagt taacgtgagt ccattccttc ttcctcattg 4200
acatccagca tttgtaattt ccatgggtgt caatactttt gtagctgaaa tctttcttaa 4260
tctactaaag gtgagaatga atttaataaa tattcagaca ttagttgcat ccaatattta 4320
aattttatga gtcaattggt agacatagcc attattatat ataatttagg cttcataaac 4380
tttgattaaa taggttttat taaaaacaaa gtaaccattt tattatgtgt ttagactata 4440
tcaacatgtt gtgtacctga aatatccaca agaaaatata tttcaaaaac caaattgtat 4500
ttattgtcta ttgttgcata aaaattgctc cctaatattt agcatggtaa gagaacacgt 4560
gtttgtgatc ttgtcacttc ggtgcatctg gaattgagag cagcttagtt ttgtggttct 4620
ggttctgggt tggtcatgaa gttgcagcca agctgtcagg ccaggctgca ttcagaggcc 4680
agagcaggtg gccaggccca gcctgagggg cttccactgt ccctaacctg tttgtctgat 4740
gtggaaaatc tcagaggaaa aggagagagt gaagtgtaag gcacctgtcc cagtcccctt 4800
tgtcaaaggc catcccatac ctgcaccatt tcttattctt tcctggggcg tcataggcat 4860
agagcactgc ccattcattc taacgctgta gagtattctg tagtaggatt ttagccatgc 4920
agcctctaat ggttatcacc atgattttga tcttacaaat cacactgcag caagcatccc 4980
tgtgcagact cctttgagtt catgtgtgca tatcaccata ggataaattt ccagaagtgg 5040
aattgctggg tcaaaaggat gtgcattttt aacttttatc cattgttttc atattcccct 5100
ccagttctac cagtttacaa taccagccct aaatattgat tggaattcat tggtgaaagt 5160
gcaagtttgt gccaacctat cagatataca aagttatctt gttacacatt tatttttgat 5220
ttctcctatt ttgcttgagg ttgagcattt actcaaatat ttcagtgctc attatgtttt 5280
aggatttggt aaaccgtttc ttcaatgcct cggtaagagg tattttagtc tttgccatgc 5340
acaagacaac gttgggataa tatgtatgtt ctgatacacc atctacaacg taatcattaa 5400
aacatataaa aaccactatc agttctgggg ccattaaaaa aattggtggc aggccaggga 5460
tgtcccacag gatgtggttt aacggtctct ggtttctagg gttatttgaa gtttgaacat 5520
tgcacccgca tatgttctat gtggagatct ctttgtgagg gacactgtaa ttcacctcct 5580
ctaggggcct gaggtctttc tttggataag aacctacctg taccatgtgt ttgattggat 5640
cttgtgtctg ctcaagacag ccctgtgtca caagctcatg actttcatct tcatccattt 5700
gctctgtttt gtgagagctt cagtatatca ggaatagaga ttcctccgag gtgaaaaatt 5760
agaggcagag ggaggggcaa atgggcaagg aagcttgcac caagtcggga gtgatccagt 5820
gtaggctgag agaaaaaagg tcttaaaatc agccttgtag ctgaaaccaa aaacacacaa 5880
gatggttggt gttctgagca tcattaacaa atgataaatg aagttgaact tttaaatgta 5940
ttgcaaattt ttataaagca agtagatcgt taaactcaga atgcaacaat ggaataaaga 6000
agagagtttg agatgttttt aaaatttatt tatttattta tttatttttg agatggagtc 6060
tcactctgtt gccaggctgg agtgcagtgg cacaatcgcg gctcactgca acatccacct 6120
cccgggttca agaaattctc ctgcctcagc ctcccaagta gctgggatta caagctctcg 6180

ccatcatgcc aggctaattt ttgtattttt tgtagagaca tggtttcaca atgttgacca 6240
ggatggtgtc aatctcctga cctcatgatc cacccgtctc ggcctcccaa agtgctggga 6300
ttacaggcat gaactaccgt gcctggctga gtttgagatt ttaactgtaa gtcctccaac 6360
taagttgcca tgacaagaac agggatgatg agagtggaaa tatgttatcc tgcaaattat 6420
cgttttatgt aaaagaatat tttccctctt ttaggtaaag gaagcatctt ctggagcacc 6480
ttctctctga ctatcaaagc accattaagc cacaaataaa ctgtaacatg aagtaggaaa 6540
caactgccct tttatataac cattgagagg tggctttata tgcataccaa aatgttgatg 6600
ctcaatgcta aaattggatt tagtaattta atatgcctac aagaaattaa ttttctttgg 6660
attatattat ttctgtgtac gatttatctt agttaacttg gaaatattct gctctaaaaa 6720
caactcttgt tttttgggtt atattttctg tatcaactat agctcttttc caaatgctgt 6780
cagagatagc ccatggctac tgatcacaaa attcaatttt atggcattta aattattcta 6840
tactctaaat tattttaaaa gtgcacagat gtgaattttt cacatctgac tcaaaaatgt 6900
tgctgatgtt gactcacttt tttatttcaa tcttattgaa gtaggagttt acttttctgg 6960
aacctggatg ataacaggag actggagagg aaaccccccа aattgttttc ctttaaaccc 7020
tcaggatgaa tcatcctgga taatcaccca cacttgattt gggtgatatc taaatgagag 7080
ttgggtctta gagtaggtgc tgagttagtt taggacttgc gctgttggaa tgagttgaat 7140
gtttttacaa gtgagaaaga catgagtttt ttggagtcca gagggtgggg ggttattggc 7200
tgaattaagt cccccaaaat gtatgcattg aagctgtaac acacaatatg tgactgaaat 7260
tgtgcatagg gtctttaaag aggtgactaa gtgaaaatga aaaaattagg gtggattctt 7320
ctcaaattgg actgatgtcc tcctaggaag aagaaatttg cacacacaga aatgaggcac 7380
cagaggtgag cgtgcagaga aaagaccagg tgaggattca gcaaggaggt agcaacctgc 7440
aagccaagga gagagtcctc aggggaaacc aaacccacta ccacctttat cttgggtttt 7500
ccagcttcag aactgtgaga aaatatgttt ctgccatttc ggtcactaat tctttcctat 7560
cttcttgtgg gagctctagc aaaaacaaga gggacccccaa agaccttgga tgagggagaa 7620
ggaggagatg gagcagggtg caggaggcgg tgcaggaagg ggctggaagg tcgggctctg 7680
aggtgcatct cctgggtgga atcttgactc cactccctat tgtctggagg acttgggaaa 7740
aacatttaac ctcctaatat tcactcacta ataaagatgg gcttgaagca caaggctccc 7800
catcatccta ttctatatta caaaagtctt cttgaggtaa cacttgtaaa actctcgcta 7860
atgcatctgg catgtattat ggactcataa gtagcccttc tgagtgatct agtgatgtgc 7920
agaaaatggc attcatgctg tgtgcaccag ggggcactgt gaggtttagt ctgaggcccc 7980
taatgagtcc aagcccctag taatgctcaa gggcgaagag cctgactgtt gcttcctatg 8040
aggccccttc tagtgggtaa atctgaaaat gcacttggcc cttcttctga tcttgagaaa 8100
ttactcagag aaggccatca ggctcagggc tcagacaaga accaggacaa atgttttagg 8160
gaatggagaa cagatttgca tccactgctc accagagcca cctaacgacg acacaagaat 8220
aaaggaagta gatttgcatg aagagacttc ccttcctatg ataagagagg cctggaggtt 8280
cctccttagc tgtgggctca gaagcagagt tctggggtgt ctccaccatg gcctggaccc 8340
ctctctggct cactctcctc actctttgca taggtgctgc ctcccagggc tcaaccccat 8400
attatcatgc tagctgtgcc aacctggccc tgagcttcgg ctcaacacag ggagtagtgt 8460
agggtgtggg actctaggcg tgaaaccctt atcctcacct cttctgtcct cttttgcata 8520
ggttctgtgg tttcttctga gctgactcag gaccctgctg tgtctgtggc cttgggacag 8580
acagtcagga tcacatgcca aggagacagc ctcagaagct attatgcaag ctggtaccag 8640
cagaagccag ggcaggcccc tatacttgtc atctatgata aaaacaaccg gccctcaggg 8700
atcccagacc gatttttgg ctccagctca ggaaacacag cttccttgac catcactggg 8760
gctcaggcgg aagatgaggc tgactattac tgtaactccc gggacagcag tggtcaccgt 8820
gtggttttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtg agtctcttct cccctctcct 8880
tccccgctct tgggacaatt tctgctgttt ttgtttgttt ctgtatcttg tctcaacttg 8940
tggtcagcct ttctccctgc atcccaggcc tgagcaagga cctctgccct ccctgttcag 9000
acccttgctt gcctcagcag gtcactacaa ccacttcacc tctgaccaca ggggcagggg 9060
actagataga atgacctact gagcctcgtc tgtctgtctg tctgtctgtc tctctgtttg 9120
tctctctgtc tctctgtttg tctctctgac tgtctgacag gcgcaggctg ggtctctaag 9180
ccttgttctg ttctggcctc ctcagtctgg gttcttgtcg gaacagcttt gtccttgggt 9240
tacctgggtt ccatctcctg gggaattggg aacaaggggt ctgagggagg cacctcctgg 9300
gagactttag aaggacccag tgccctcggg gctgatgctc gggaatcaca gagctgggac 9360
ccagagccag gatccagacc cagaatgagg taggaggtgg aggggctgcc ctgggcgtct 9420
gggggctgcc agggactgag ccctgagcca gcctgagact caggaaaccc cgtcaggagg 9480
gagaagggag aagcagactc tggacaccag aaagccaggg gaagggtcac aaaaggagtg 9540
gatgtgacgg aagggcgggc tcctgggtct cttcagaaca tatcccctgt gcccaggggg 9600
atcagagggg cagagtccac tgcgtgaaag ccccactgct atgaccaggt agccgggacg 9660
tggggtggat gccagaaaag actccacgga ataagagaga gcccaggaca gcaggcaggc 9720
tctccgatcc ccccaggccc ttgccccata cacgggctcc agaacacaca tttggctgga 9780
acagcctgag ggaccaaaag gccccagtat cccacagagc tgaggagcca ggccagaaaa 9840
gtaaccccag agttcgctgt gcaggggaga cacagagctc tctttatctg tcaggatggc 9900
aggaggggac agggtcaggg cgctgagggt cagatgtcgg tgttgggggc caaggccccg 9960

agagatctca ggacaggtgg tcaggtgtct aaggtaaaac agctccccgt gcagatcagg 10020
gcatagtgga aaacaccctg acccctctgc ctggcataga ccttcagaca cagagcccct 10080
gaacaagggc accccaacac ctcatcatat actgaggtca ggggctcccc aggtggacac 10140
caggactctg acccccctgcc cctcatccac cccgcaggtc agcccaaggc tgccccctcg 10200
gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt 10260
ctcataagtg acttctaccc gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc 10320
gtcaaggcgg gagtggagac caccacaccc tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc 10380
agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag 10440
gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcataggtt 10500
ctcaaccctc acccccacc acgggagact agagctgcag gatcccaggg gaggggtctc 10560
tcctcccacc ccaaggcatc aagcccttct ccctgcactc aataaaccct caataaatat 10620
tctcattgtc aatcagaaat cttgttttat ctcatttttt cttttctcac atataattcc 10680
tagcctttcc tgggttctca atttgtggtg gaaagaaccc tgaacccagt gggaaagttg 10740
cctatgtgaa ggggttctca gttccctggg catctctgca ggtaaggcct tcctcaccca 10800
gacacccctt cctcagctct ccactgtacc cctgagccac cagcctcgcc tggctgggac 10860
caggggggtg tcacactctc ctagattctg cctttcaaca gaaacctaac cacgcatcac 10920
acggcacttc tcgcatgcct tctgtgtctg ctccagtctc tgggctaaag agttgctggt 10980
ccgggacagg ggataggtcc gctcttggtc agatgccagg tccctgccat ggcatccctg 11040
accctatgca acaagccagt gactctggtg agctctctgt gtcaggagaa tccatgatcc 11100
agagtttcat attgtcctgc aagcatctgg tgggctgtag ctcttgccaa actgggaaat 11160
accatggccc agcatcagga tgcaggacag tccggagagg gaaatcagga gaagtgaagg 11220
ggtctctggg gagcccagat gtgggctaga ggcagaagta agggtgaaga gcacctatga 11280
gtcaatgtca tggtctcagc aggaacacag ttgaaaatcc ccattccaca caagaccgtt 11340
tagcaggaaa ggagtccata cttgtgctgc caccaggatg tcctgagaag ccttggagaa 11400
tgaaacatac aggtgcattt cctagacttg acaatgcacg ttagccaagt aaaggcaatg 11460
aaaagttctc tactagggaa ataatttcct gtggtaaagc ttagcttatg taaagtcaca 11520
tttatccatc tggcacctct aaaagcccca taatattctg caagatacta gtatgtcatg 11580
gaagtagttt atgaaacata aagtgagatt taagaacaaa gatgttacgg gtgtatgata 11640
agatggctac aggctcaggg tcaggctcga ggagtgaagg aggccgtgtc aaattcatga 11700
caagagttgg agctgggcca ggctgggtca gggctgtgtg aatgcagaca gagggctaca 11760
ggcaaggtca ggcatccatg aacactcagc tcccccagac cctcctgccc actgggacct 11820
tcgccctccc ttggtcacag tggtggagcc ttcctaccca aacctctatg gaggccctgg 11880
atgactgtgc gttcttagtg cccacgcaaa cttagactcc ctgtctctgc ctccagcaca 11940
tcaggaatgt ggcagctgag ttcaccagag ctgctgggtg gtcccgacag gccagggaca 12000
gagcccgcaa agacaggaag ctctgcagtc acaatgaggc agagaaatgg ccccttggtg 12060
cttgatcaca gccacccctg atccaaatcc cagcctctga attagaagaa ggctaaaagg 12120
ttctagtggc cacagtccct gtctaagccc atttcacaaa tgagaaaact aagaccaccc 12180
aaggagggcc agttacgtag gcctgctggg tacaaggcca aggtctactt cacacccagc 12240
agctgtccaa agactgagct gtgtcataag tttatattat gaagaactct gaacatataa 12300
ataaggagac agaaaaataa cagtgtccca tgttctcatc acccagcact caaaataagc 12360
aattcacaga tgatgccgac ccacccacag caaaataaat tctcccttac acaacattta 12420
gaaagaaata caagacatca gatctgttca gctgtaagta ctccattact gtcctggaat 12480
gacatggacc ttaaaataac tataatatca ctaccaaacc taaatagaaa ttatcactaa 12540
ttccctaata tcgagaaata agcagggtct cctcaaatgc atcagaaaca ccagaagtgc 12600
tttggcttag ttacatgttg gtgctgttgg tatttggggg tttaagttta tatgaggagc 12660
aatatgacat caaatggtga tgggtgcatg tgccatcagg ctggttgtca ctggtgaata 12720
tttcctcaat tgctctagag cctcccggca aggcaggagc tgcaggagct gagagctgtc 12780
tggagaactt cccctggctg ctatacagcc acgcctcctg gagcaggaac ctagggcttc 12840
cctcagcttt tattttcctg gaaaatgatt ctagcatgaa ggggattaac ttgattcaga 12900
ttggacattg caaaatagct tgcaaggaca gggagctgct accagcagag tcacccatgt 12960
cagactgcca ctcttgtagt aatgttagct gcataggatg gtcaatagct acatccctca 13020
gaagggaagg aaggcagagg gttgaggctt cagttcacct ccttctcatg agtgctgcag 13080
agtgtctgtg atgtcagagg tctgcagctg ggctctgttc acccaggagt gtgcttcatg 13140
ctctaggaag gagccacttt gcacacagaa gatccggggc ccagccatcc ttccagggtg 13200
aacaattcat gtcttctctc atggtgaact ctaggattca agccatctaa tgcttttgaa 13260
gccactgtca ttatatttaa ttgatgatga caggtggcca ccaatgatga atattttccc 13320
aggggagtc tccccaagtg gcttcagact tcctcacatg gccccagggg attaaatggc 13380
tcctgattac tcagaggata agaggttctg tcttatcatg ttccttttctt atttgtctta 13440
tgtgtctttc ctgccccagg cctgggatcc cccactgatc tcccttcccc tagtgagagg 13500
tgatatttgg agaccacatt ctggaggctc cctcatgtcc cccatttgaa aaagacaacg 13560
gcagcctcca ccctagctgt cccacccaac atgaggccag attcaggggt gcagggatgc 13620
tcccaaggtt accctaacag atgtgactgg cacttcatat tgggaccagc caggcctcac 13680
tgaccaggcc tatccaacta gaactactcc agaaggtggg gctgaaaccc accaaggttc 13740

ccagaacact gcactctagg gcaatcagcc tctgcatggg aggagaggag caccctctgc 13800
accaccccat ggtgttacca aaagttgaac catgggttgg ttcaactttg cagagaagag 13860
accacctatc ccatctgtgg aaattcactc cttagcgaca ctaatgccct ctaataaatt 13920
caatcctggg cctgagtgat ggttggtgca aaaaacaaat tcaagatccc agtgtcctcc 13980
agaagcctgg atttccaggg 14000

<210> 22
<211> 13685
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Vector pVLCL

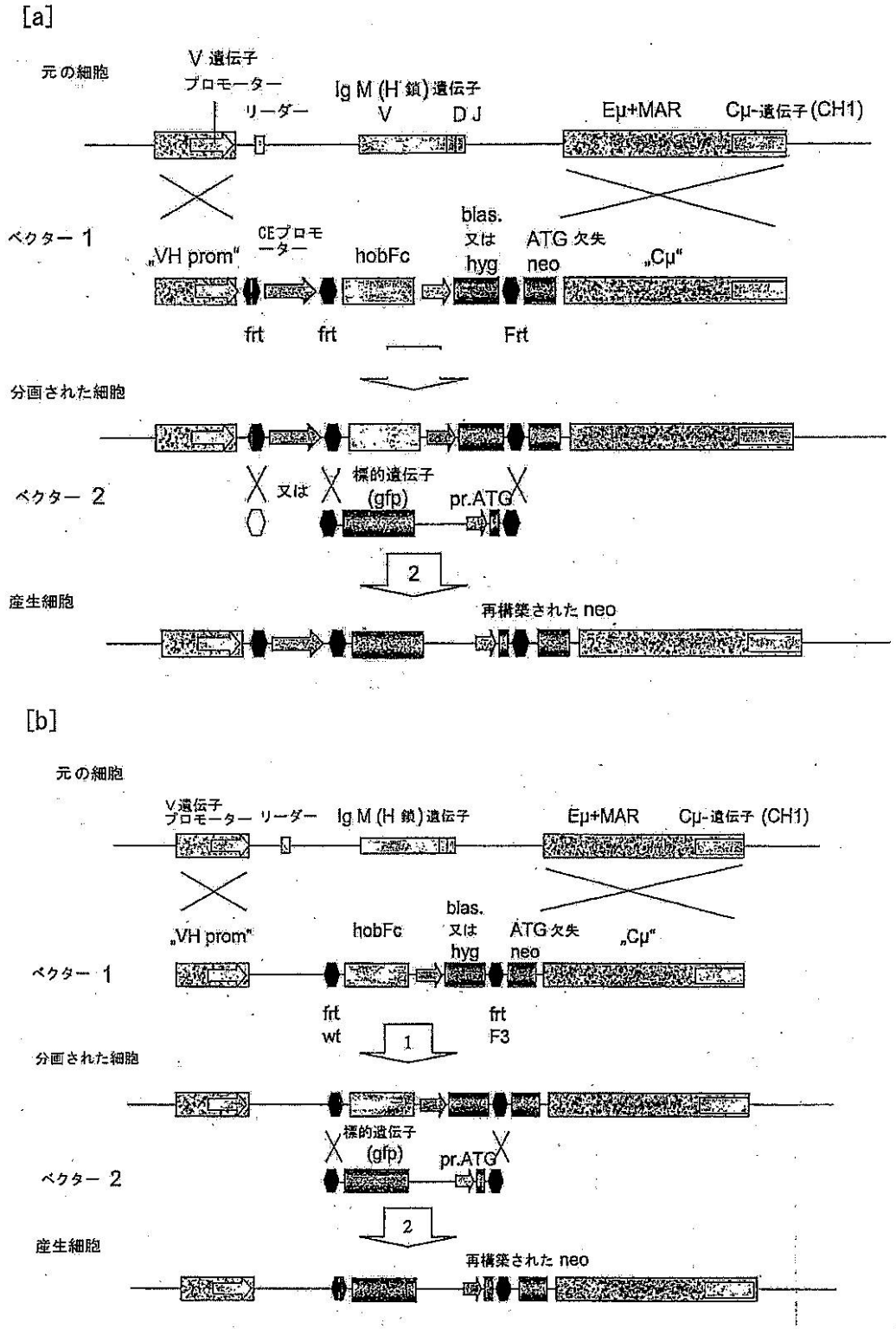
<400> 22
ctagtcctgc aggtttatcg gcttctggag gacactggga tcttgaattt gtttttgca 60
ccaaccatca ctcaggccca ggattgaatt tattagaggg cattagtgtc gctaaggagt 120
gaatttccac agatgggata ggtggtctct tctctgcaaa gttgaaccaa cccatggttc 180
aacttttggt aacaccatgg ggtggtgcag agggtgctcc tctcctccca tgcagaggct 240
gattgcccta gagtgcagtg ttctgggaac cttggtgggt ttcagcccca ccttctggag 300
tagttctagt tggataggcc tggtcagtga ggcctggctg gtcccaatat gaagtgccag 360
tcacatctgt tagggtaacc ttgggagcat ccctgcaccc ctgaatctgg cctcatgttg 420
ggtgggacag ctagggtgga ggctgccgtt gtctttttca aatgggggac atgagggagc 480
ctccagaatg tggtctccaa atatcacctc tcactaaggg aagggagatc agtgggggat 540
cccaggcctg gggcaggaaa gacacataag acaaataaga aaggaacatg ataagacaga 600
acctcttatc ctctgagtaa tcaggagcca tttaatcccc tggggccatg tgaggaagtc 660
tgaagccact tggggagact ccccctggga aaatattcat cattggtggc cacctgtcat 720
catcaattaa atataatgac agtggcttca aaagcattag atggcttgaa tcctagagtt 780
caccatgaga gaagacatga attgttcacc ctggaaggat ggctgggccc cggatcttct 840
gtgtgcaaag tggctccttc ctagagcatg aagcacactc ctgggtgaac agagcccagc 900
tgcagacctc tgacatcaca gacactctgc agcactcatg agaaggaggt gaactgaagc 960
ctcaaccctc tgccttcctt cccttctgag ggatgtagct attgaccatc ctatgcagct 1020
aacattacta caagagtggc agtctgacat gggtgactct gctggtagca gctccctgtc 1080
cttgcaagct attttgcaat gtccaatctg aatcaagtta atccccttca tgctagaatc 1140
attttccagg aaaataaaag ctgagggaag ccctaggttc ctgctccagg aggcgtggct 1200
gtatagcagc caggggaagt tctccagaca gctctcagct cctgcagctc ctgccttgcc 1260
gggaggctct agagcaattg aggaaatatt caccagtgac aaccagcctg atggcacatg 1320
cacccatcac catttgatgt catattgctc ctcatataaa cttaaacccc caaataccaa 1380
cagcaccaac atgtaactaa gccaaagcac ttctggtgtt tctgatgcat ttgaggagac 1440
cctgcttatt tctcgatatt agggaattag tgataatttc tatttaggtt tggtagtgat 1500
attatagtta ttttaaggtc catgtcattc caggacagta atggagtact tacagctgaa 1560
cagatctgat gtcttgtatt tcttttctaaa tgttgtgtaa gggagaattt attttgctgt 1620
gggtgggtcg gcatcatctg tgaattgctt attttgagtg ctgggtgatg agaacatggg 1680
acactgttat ttttctgtct ccttatttat atgttcagag ttcttcataa tataaactta 1740
tgacacagct cagtctttgg acagctgctg ggtgtgaagt agaccttggc cttgtaccca 1800
gcaggcctac gtaactggcc ctccttgggt ggtcttagtt ttctcatttg tgaaatgggc 1860
ttagacaggg actgtggcca ctagaacctt ttagccttct tctaattcag aggctgggat 1920
ttggatcagg ggtggctgtg atcaagcacc aaggggccat ttctctgcct cattgtgact 1980
gcagagcttc ctgtctttgc gggctctgtc cctggcctgt cgggaccacc cagcagctct 2040
ggtgaactca gctgccacat tcctgatgtg ctggaggcag agacagggag tctaagtttg 2100
cgtgggcact aagaacgcac agtcatccag ggcctccata gaggtttggg taggaaggct 2160
ccaccactgt gaccaaggga gggcgaaggt cccagtgggc aggagggtct gggggagctg 2220
agtgttcatg gatgcctgac cttgcctgta gccctctgtc tgcattcaca cagccctgac 2280
ccagcctggc ccagctccaa ctcttgtcat gaatttgaca cggcctcctt cactcctcga 2340
gcctgaccct gagcctgtag ccatcttatc atacacccgt aacatctttg ttcttaaatc 2400
tcactttatg tttcataaac tacttccatg acatactagt atcttgcaga atattatggg 2460
gcttttagag gtgccagatg gataaatgtg actttacata agctaagctt taccacagga 2520
aattatttcc ctagtagaga acttttcatt gcctttactt ggctaacgtg cattgtcaag 2580
tctaggaaat gcacctgtat gtttcattct ccaaggcttc tcaggacatc ctggtggcag 2640
cacaagtatg gactcctttc ctgctaaacg gtcttgtgtg gaatggggat tttcaactgt 2700
gttcctgctg agaccatgac attgactcat aggtgctctt cacccttact tctgcctcta 2760
gcccacatct gggctcccca gagacccctt cacttctcct gatttccctc tccggactgt 2820

cctgcatcct gatgctgggc catggtattt cccagtttgg caagagctac agcccaccag 2880
atgcttgcag gacaatatga aactctggat catggattct cctgacacag agagctcacc 2940
agagtcactg gcttgttgca tagggtcagg gatgccatgg cagggacctg gcatctgacc 3000
aagagcggac ctatcccctg tcccggacca gcaactcttt agcccagaga ctggagcaga 3060
cacagaaggc atgcgagaag tgccgtgtga tgcgtggtta ggtttctgtt gaaaggcaga 3120
atctaggaga gtgtgacacc cccctggtcc cagccaggcg aggctggtgg ctcaggggta 3180
cagtggagag ctgaggaagg ggtgtctggg tgaggaaggc cttacctgca gagatgccca 3240
gggaactgag aaccccttca cataggcaac tttcccactg ggttcagggt tctttccacc 3300
acaaattgag aacccaggaa aggctaggaa ttatatgtga gaaaagaaaa aatgagataa 3360
aacaagattt ctgattgaca atgagaatat ttattgaggg tttattgagt gcagggagaa 3420
gggcttgatg ccttggggtg ggaggagaga cccctcccct gggatcctgc agctctagtc 3480
tcccgtggtg gggggtgagg gttgagaacc tatgaacatt ctgtaggggc cactgtcttc 3540
tccacggtgc tcccttcatg cgtgacctgg cagctgtagc ttctgtggga cttccactgc 3600
tcaggcgtca ggctcagata gctgctggcc gcgtacttgt tgttgctttg tttggagggt 3660
gtggtggtct ccactcccgc cttgacgggg ctgctatctg ccttccaggc cactgtcacg 3720
gctcccgggt agaagtcact tatgagacac accagtgtgg ccttgttggc ttgaagctcc 3780
tcagaggagg gcgggaacag agtgaccgag ggggcagcct tgggctgacc tgcggggtgg 3840
atgaggggca gggggtcaga gtcctggtgt ccacctgggg agcccctgac ctcagtatat 3900
gatgaggtgt tggggtgccc ttgttcaggg gctctgtgtc tgaaggtcta tgccaggcag 3960
aggggtcagg gtgttttcca ctatgccctg atctgcacgg ggagctgttt taccttagac 4020
acctgaccac ctgtcctgag atctctcggg gccttggccc ccaacaccga catctgaccc 4080
tcagcgccct gaccctgtcc cctcctgcca tcctgacaga taaagagagc tctgtgtctc 4140
ccctgcacag cgaactctgg ggttactttt ctggcctggc tcctcagctc tgtgggatac 4200
tggggccttt tggtccctca ggctgttcca gccaaatgtg tgttctggag cccgtgtatg 4260
gggcaagggc ctgggggggat cggagagcct gcctgctgtc ctgggctctc tcttattccg 4320
tggagtcttt tctggcatcc accccacgtc ccggctacct ggtcatagca gtggggcttt 4380
cacgcagtgg actctgcccc tctgatcccc ctgggcacag gggatatgtt ctgaagagac 4440
ccaggagccc gcccttccgt cacatccact ccttttgtga cccttccccc ggctttctgg 4500
tgtccagagt ctgcttctcc cttctccctc ctgacggggt ttcctgagtc tcaggctggc 4560
tcagggctca gtccctggca gccccccagac gcccagggca gcccctccac ctcctacctc 4620
attctgggtc tggatcctgg ctctgggtcc cagctctgtg attcccgagc atcagccccg 4680
agggcactgg gtccttctaa agtctcccag gaggtgcctc cctcagaccc cttgttccca 4740
attccccagg agatggaacc caggtaaccc aaggacaaag ctgttccgac aagaacccag 4800
actgaggagg ccagaacaga acaaggctta gagacccagc ctgcgcctgt cagacagtca 4860
gagagacaaa cagagagaca gagagacaaa cagagagaca gacagacaga cagacagacg 4920
aggctcagta ggtcattcta tctagtcccc tgcccctgtg gtcagaggtg aagtggttgt 4980
agtgacctgc tgaggcaagc aagggtctga acagggaggg cagaggtcct tgctcaggcc 5040
tgggatgcag ggagaaaggc tgaccacaag ttgagacaag atacagaaac aaacaaaaac 5100
agcagaaatt gtcccaagag cggggaagga gaggggagaa gagactcacc taggacggtc 5160
agcttggtcc ctccgccgaa aaccacacgg tgaccactgc tgtcccggga gttacagtaa 5220
tagtcagcct catcttccgg ccgcagcggc caagggcgaa ttcgcggccg ctaaattcaa 5280
ttcgccctat agtgagtcgt attacaattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 5340
ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 5400
gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg ccctttcccaa cagttgcgca gcctatacaa 5460
acgaattcgc ccttagtata ccccagaact ctgcttctga gcccacagct aaggaggaac 5520
ctccaggcct ctcttatcat aggaagggaa gtctcttcat gcaaatctac ttcctttatt 5580
cttgtgtcgt cgttaggtgg ctctggtgag cagtggatgc aaatctgttc tccattcccc 5640
aaaacatttg tcctggttct tgtctgagcc ctgagcctga tggccttctc tgagtaattt 5700
ctcaagatca gaagaagggc caagtgcatt ttcagattta cccactagaa ggggcctcat 5760
aggaagcaac agtcaggctc ttcgcccttg agcattacta ggggcttgga ctcattaggg 5820
gcctcagact aaacctcaca gtgccccctg gtgcacacag catgaatgcc attttctgca 5880
catcactaga tcactcagaa gggctactta tgagtccata atacatgcca gatgcattag 5940
cgagagtttt acaagtgtta cctcaagaag acttttgtaa tatagaatag gatgatgggg 6000
agccttgtgc ttcaagccca tctttattag tgagtgaata ttaggaggtt aaatgttttt 6060
cccaagtcct ccagacaata gggagtggag tcaagattcc acccaggaga tgcacctcag 6120
agcccgacct tccagccccc tcctgcaccg cctcctgcac cctgctccat ctcctccttc 6180
tccctcatcc aaggtctttg gggtccctct tgtttttgct agagctccca caagaagata 6240
ggaaagaatt agtgaccgaa atggcagaaa catatttttct cacagttctg aagctggaaa 6300
acccaagata aaggtggtag tgggtttggt ttcccctgag gactctctcc ttggcttgca 6360
ggttgctacc tccttgctga atcctcacct ggtcttttct ctgcacgctc acctctggtg 6420
cctcatttct gtgtgtgcaa atttcttctt cctaggagga catcagtcca atttgagaag 6480
aatccaccct aatttttttca ttttcactta gtcacctctt taaagaccct atgcacaatt 6540
tcagtcacat attgtgtgtt acagcttcaa tgcatacatt ttgggggact taattcagcc 6600

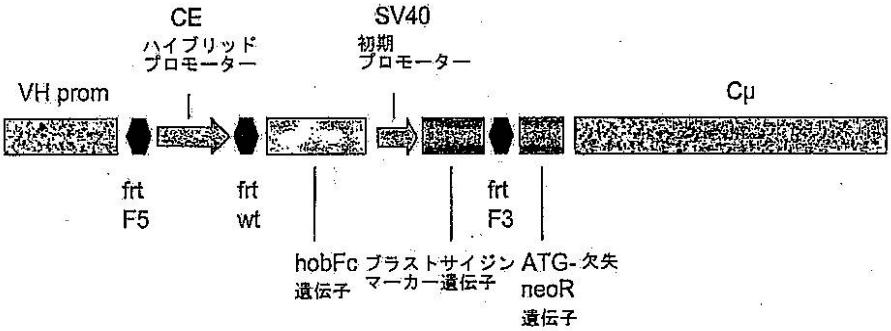
aataaccccc caccctctgg actccaaaaa actcatgtct ttctcacttg taaaaacatt 6660
caactcattc caacagcgca agtcctaaac taactcagca cctactctaa gacccaactc 6720
tcatttagat atcacccaaa tcaagtgtgg gtgattatcc aggatgattc atcctgaggg 6780
tttaaaggaa aacaatttgg ggggtttcct ctccagtctc ctgttatcat ccaggttcca 6840
gaaaagtaaa ctcctacttc aataagattg aaataaaaaa gtgagtcaac atcagcaaca 6900
tttttgagtc agatgtgaaa aattcacatc tgtgcacttt taaaataatt tagagtatag 6960
aataatttaa atgccataaa attgaatttt gtgatcagta gccatgggct atctctgaca 7020
gcatttggaa aagagctata gttgatacag aaaatataac ccaaaaaaca agagttgttt 7080
ttagagcaga atatttccaa gttaactaag ataaatcgta cacagaaata atataatcca 7140
aagaaaatta atttcttgta ggcatattaa attactaaat ccaattttag cattgagcat 7200
caacattttg gtatgcatat aaagccacct ctcaatggtt atataaaagg gcagttgttt 7260
cctacttcat gttacagttt atttgtggct taatggtgct ttgatagtca gagagaaggt 7320
gctccagaag atgcttcctt tacctaaaag agggaaaata ttcttttaca taaaacgata 7380
atttgcagga taacatattt ccactctcat catccctgtt cttgtcatgg caacttagtt 7440
ggaggactta cagttaaaat ctcaaactca gccaggcacg gtagttcatg cctgtaatcc 7500
cagcactttg ggaggccgag acgggtggat catgaggtca ggagattgac accatcctgg 7560
tcaacattgt gaaaccatgt ctctacaaaa aatacaaaaa ttagcctggc atgatggcga 7620
gagcttgtaa tcccagctac ttgggaggct gaggcaggag aatttcttga acccgggagg 7680
tggatgttgc agtgagccgc gattgtgcca ctgcactcca gcctggcaac agagtgagac 7740
tccatctcaa aaataaataa ataaataaat aaatttaaa aacatctcaa actctcttct 7800
ttattccatt gttgcattct gagtttaacg atctacttgc tttataaaaa tttgcaatac 7860
atttaaaagt tcaacttcat ttatcatttg ttaatgatgc tcagaacacc aaccatcttg 7920
tgtgtttttg gtttcagcta caaggctgat tttaagacct ttttctctc agcctacact 7980
ggatcactcc cgacttggtg caagcttcct tgcccatttg cccctcccc tgcctctaat 8040
ttttcacctc ggaggaatct ctattcctga tatactgaag ctctcacaaa acagagcaaa 8100
tggatgaaga tgaaagtcat gagcttgtga cacagggctg tcttgagcag acacaagatc 8160
caatcaaaca catggtacag gtaggttctt atccaaagaa agacctcagg cccctagagg 8220
aggtgaatta cagtgtccct cacaaagaga tctccacata gaacatatgc gggtgcaatg 8280
ttcaaacttc aaataaccct agaaaccaga gaccgttaaa ccacatcctg tgggacatcc 8340
ctggcctgcc accaattttt ttaatggccc cagaactgat agtggttttt atatgtttta 8400
atgattacgt tgtagatggt gtatcagaac atacatatta tcccaacgtt gtcttgtgca 8460
tggcaaagac taaaatacct cttaccgagg cattgaagaa acggtttacc aaatcctaaa 8520
acataatgag cactgaaata tttgagtaaa tgctcaacct caagcaaaat aggagaaatc 8580
aaaaataaat gtgtaacaag ataactttgt atatctgata ggttggcaca aacttgcact 8640
ttcaccaatg aattccaatc aatatttagg gctggtattg taaactggta gaactggagg 8700
ggaatatgaa aacaatggat aaaagttaaa aatgcacatc cttttgaccc agcaattcca 8760
cttctggaaa tttatcctat ggtgatatgc acacatgaac tcaaaggagt ctgcacaggg 8820
atgcttgctg cagtgtgatt tgtaagatca aaatcatggt gataaccatt agaggctgca 8880
tggctaaaat cctactacag aatactctac agcgttagaa tgaatgggca gtgctctatg 8940
cctatgacgc cccaggaaag aataagaaat ggtgcaggta tgggatggcc tttgacaagg 9000
gggactggga caggtgcctt acacttcact ctctcctttt cctctgagat tttccacatc 9060
agacaaacag gttagggaca gtggaagccc ctcaggctgg gcctggccac ctgctctggc 9120
ctctgaatgc agcctggcct gacagcttgg ctgcaacttc atgaccaacc cagaaccaga 9180
accacaaaac taagctgctc tcaattccag atgcaccgaa gtgacaagat cacaaacacg 9240
tgttctctta ccatgctaaa tattagggag caatttttat gcaacaatag acaataaata 9300
caatttggtt tttgaaatat attttcttgt ggatatttca ggtacacaac atgttgatat 9360
agtctaaaca cataataaaa tggttacttt gtttttaata aaacctattt aatcaaagtt 9420
tatgaagcct aaattatata taataatggc tatgtctacc aattgactca taaaatttaa 9480
atattggatg caactaatgt ctgaatattt attaaattca ttctcacctt tagtagatta 9540
agaaagattt cagctacaaa agtattgaca cccatggaaa ttacaaatgc tggatgtcaa 9600
tgaggaagaa ggaatggact cacgttaact cttccctgtg gggccatttt ggaaactccc 9660
aacctatagg gacaccatcc acttttgggg agtttccagg acagggcccc agcgaattga 9720
gacgggagga ttttgaggga gcactgagcc tgtcacgcaa aagggcgaat tcgcggccgc 9780
taaattcaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgtcg ttttacaacg 9840
tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atccccctttt 9900
cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 9960
cctatacgta cggcagttta aggtttacac ctataaaaga gagagccgtt atcgtctgtt 10020
tgtggatgta cagagtgata ttattgacac gccggggcga cggatggtga tccccctggc 10080
cagtgcacgt ctgctgtcag ataaagtctc ccgtgaactt tacccggtgg tgcatatcgg 10140
ggatgaaagc tggcgcatga tgaccaccga tatggccagt gtgccggtct ccgttatcgg 10200
ggaagaagtg gctgatctca gccaccgcga aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat 10260
gttctgggga atataaatgt caggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 10320
tttcacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg 10380

```
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct 10440
tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc 10500
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctcgcc 10560
gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt 10620
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 10680
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct 10740
gtcagcgcag gggcgcccgg ttcttttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 10800
actgcaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 10860
tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 10920
gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 10980
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca 11040
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 11100
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgagcatgcc 11160
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 11220
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 11280
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 11340
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct 11400
tcttgacgag ttcttctgaa ttattaacgc ttacaatttc ctgatgcggt attttctcct 11460
tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat acaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 11520
ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 11580
taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 11640
cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa 11700
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 11760
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 11820
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa 11880
gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 11940
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 12000
atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 12060
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 12120
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca 12180
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 12240
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 12300
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca 12360
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 12420
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg 12480
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 12540
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt 12600
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 12660
ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg 12720
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 12780
gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 12840
tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 12900
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 12960
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 13020
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag 13080
gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 13140
gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 13200
cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 13260
tttttacggt tcctgggctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 13320
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 13380
cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa 13440
ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac 13500
tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc 13560
caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa 13620
tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tcagaattaa ccctcactaa 13680
aggga                                                           13685
```

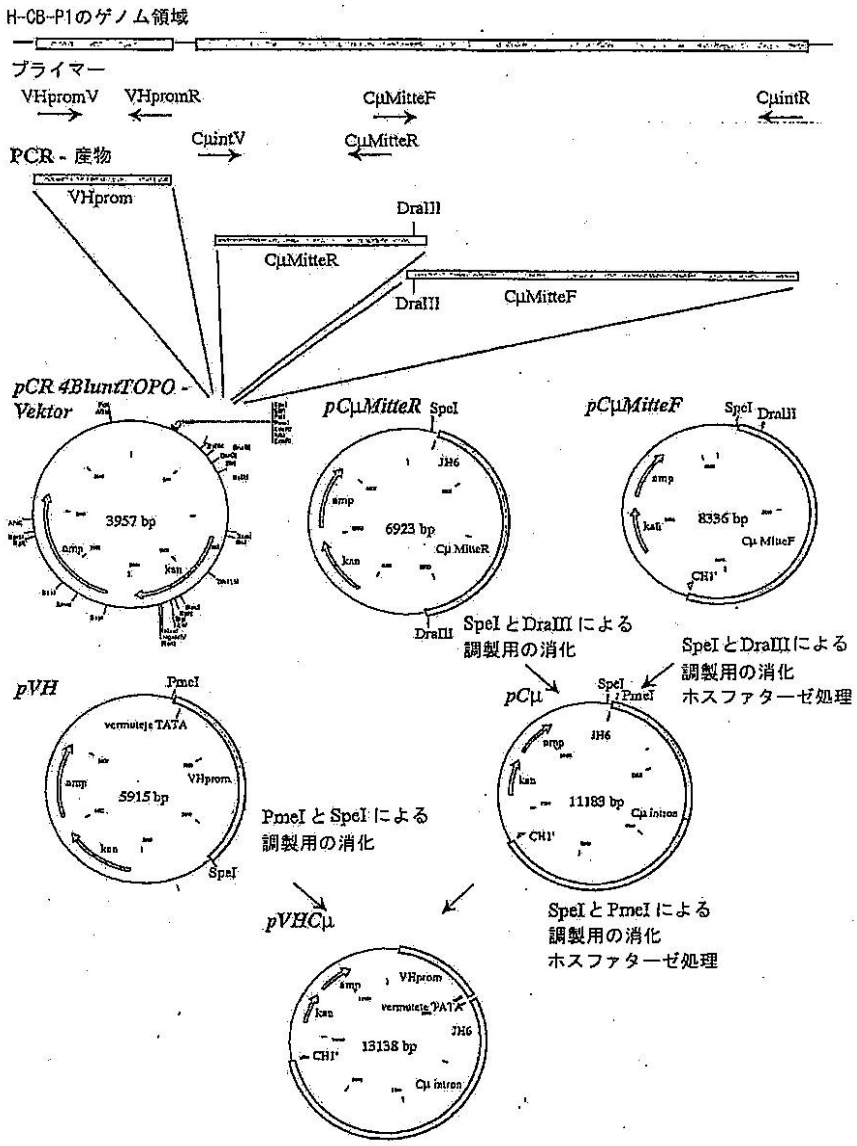
【図１】


[a]
元の細胞
V遺伝子
プロモーター
リーダー
Ig M (H鎖)遺伝子
V
D J
Eμ+MAR
Cμ-遺伝子(CH1)
ベクター 1
„VH prom"
CEプロモーター
hobFc
blas.
又は
hyg
ATG 欠失
neo
„Cμ"
frt
frt
Frt
分画された細胞
ベクター 2
又は
標的遺伝子
(gfp)
pr.ATG
2
産生細胞
再構築された neo
[b]
元の細胞
V遺伝子
プロモーター
リーダー
Ig M (H 鎖)遺伝子
Eμ+MAR
Cμ-遺伝子 (CH1)
„VH prom"
hobFc
blas.
又は
hyg
ATG 欠失
neo
„Cμ"
ベクター 1
frt
wt
1
frt
F3
分画された細胞
標的遺伝子
(gfp)
pr.ATG
ベクター 2
2
産生細胞
再構築された neo

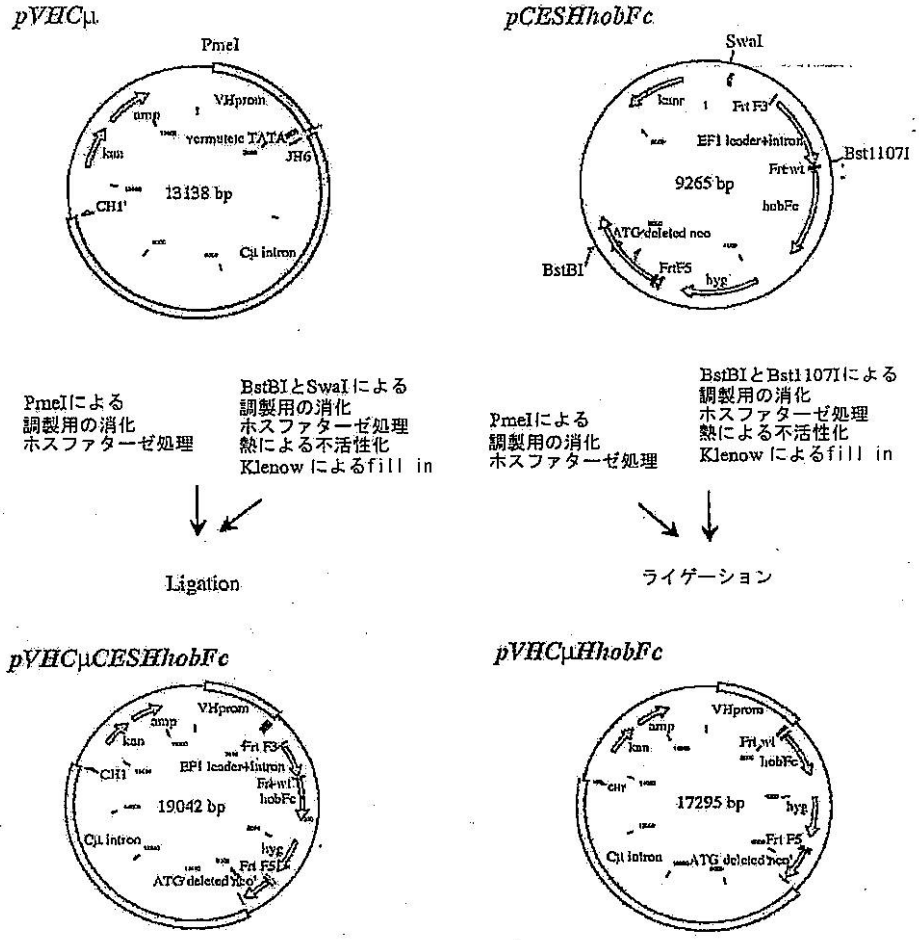
【図２】


CE
ハイブリッド
プロモーター
SV40
初期
プロモーター
VH prom
Cμ
frt
F5
frt
wt
frt
F3
hobFc
遺伝子
ブラストサイジン
マーカー遺伝子
ATG-欠失
neoR
遺伝子

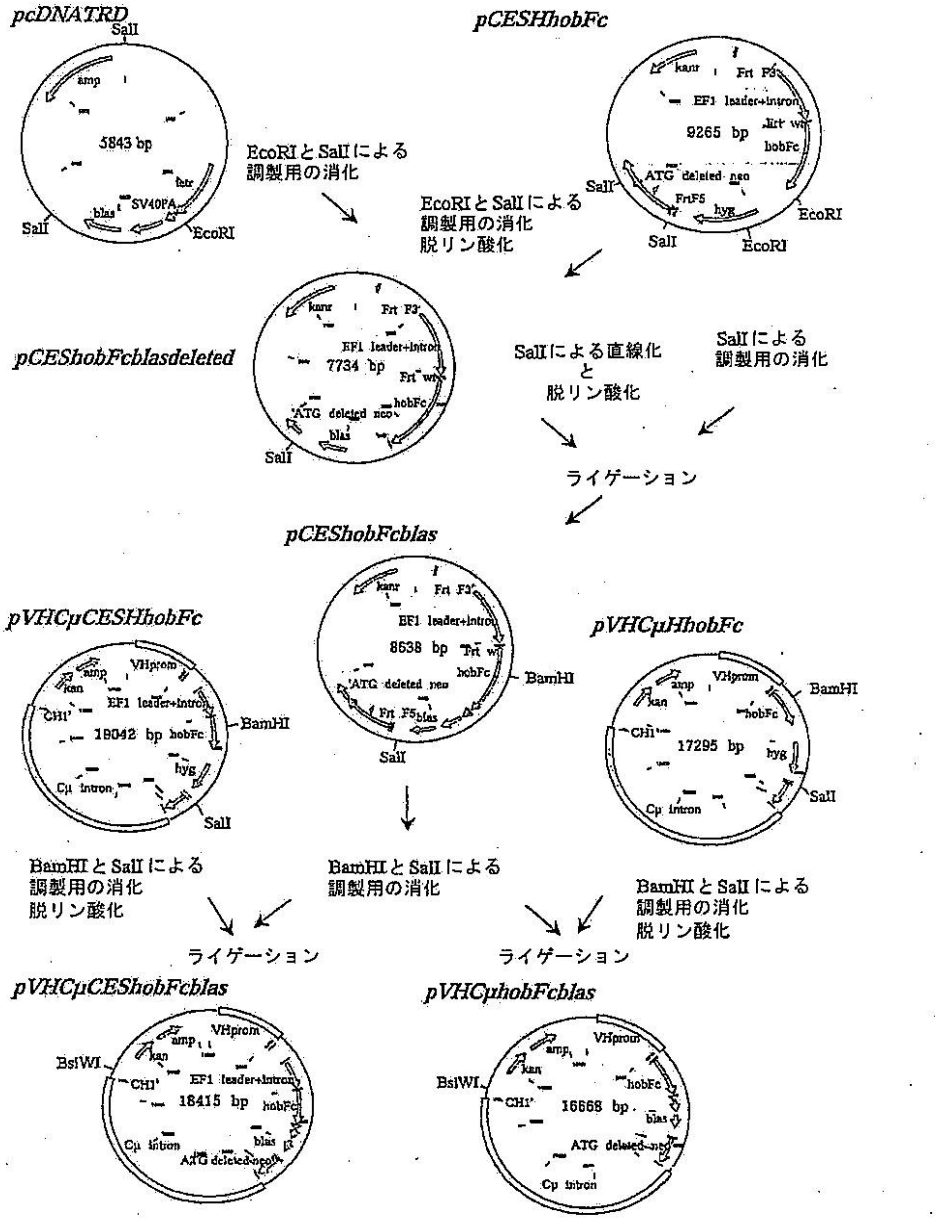
【図３】


H-CB-P1のゲノム領域
プライマー
VHpromV
VHpromR
CμMitteF
CμintR
CμintV
CμMitteR
PCR - 産物
VHprom
DraIII
CμMitteR
DraIII
CμMitteF
pCR 4BluntTOPO -
Vektor
3957 bp
amp
kan
pCμMitteR
SpeI
6923 bp
DraIII
pCμMitteF
SpeI
DraIII
8336 bp
SpeIとDraIIIによる
調製用の消化
SpeIとDraIIIによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
pVH
PmeI
5915 bp
SpeI
PmeIとSpeIによる
調製用の消化
pCμ
SpeI
PmeI
11183 bp
SpeIとPmeIによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
pVHCμ
VHprom
13138 bp

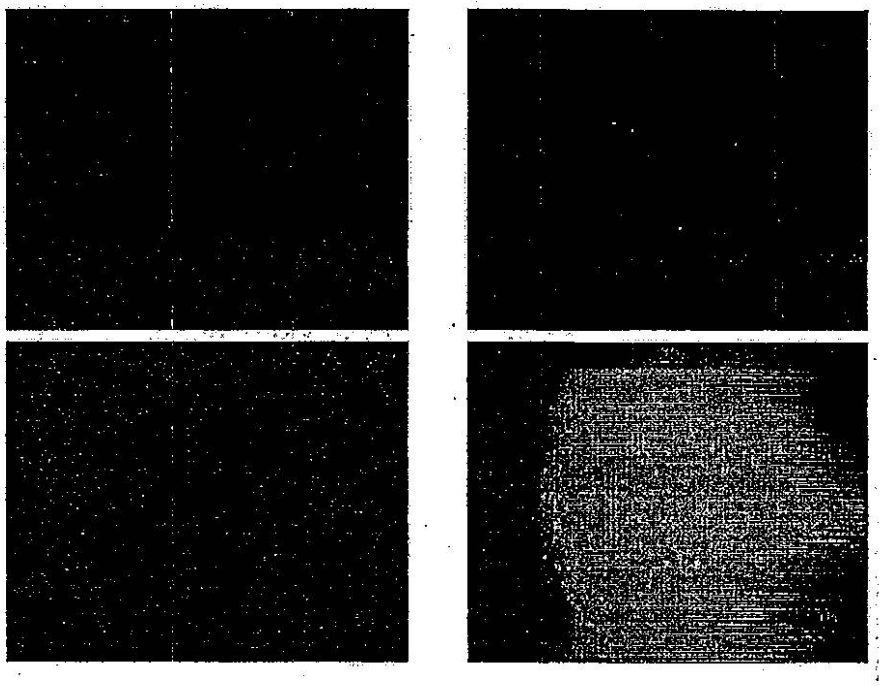
【図４】


pVHCμ
PmeI
VHprom
amp
kan
vermutejc TATA
JH6
13138 bp
CH1'
Cμ intron
pCESHhobFc
SwaI
kanr
Frt F3
EF1 leader+intron
Bst1107I
Frt-wt
9265 bp
hobFc
ATG-deleted neo
BstBI
FrtF5
hyg
PmeIによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
BstBIとSwaIによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
熱による不活性化
Klenow によるfill in
PmeIによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
BstBIとBst1107Iによる
調製用の消化
ホスファターゼ処理
熱による不活性化
Klenow によるfill in
Ligation
ライゲーション
pVHCμCESHhobFc
VHprom
amp
kan
Frt F3
CH1
EF1 leader+intron
Frt-wt
hobFc
19042 bp
Cμ intron
hyg
Frt F5
ATG deleted neo
pVHCμHhobFc
VHprom
amp
kan
Frt-wt
hobFc
17295 bp
hyg
Frt F5
Cμ intron
ATG deleted neo

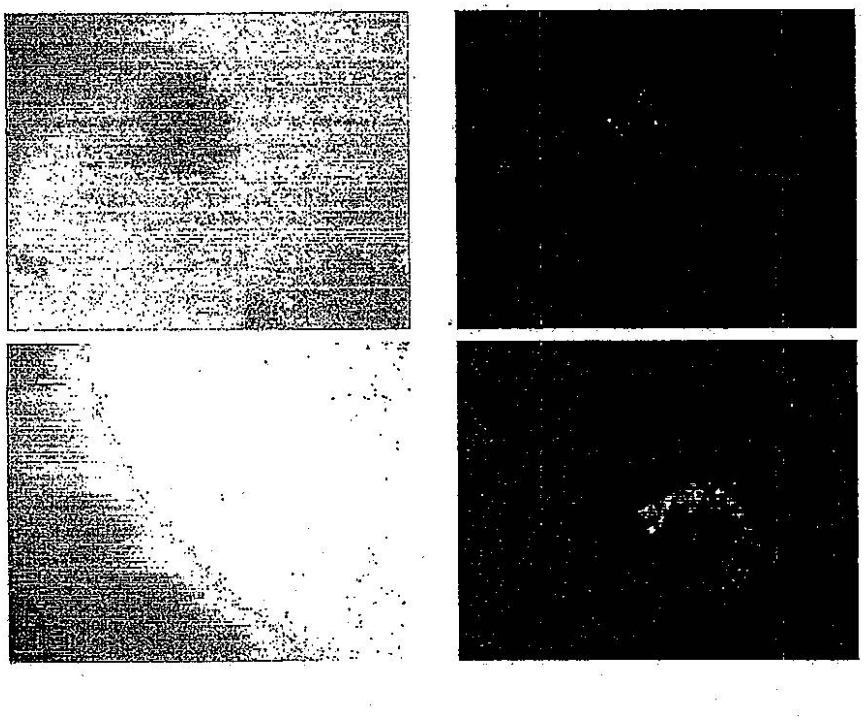
【図５】


pcDNATRD
SalI
amp
5843 bp
bstr
SV40PA
blas
SalI
EcoRI
EcoRIとSalIによる
調製用の消化
pCESHhobFc
kanr
Frt F3'
EF1 leader+intron
9265 bp
Frt' wt'
hobFc
ATG deleted neo
SalI
Frt F5'
hyg
EcoRI
SalI
EcoRI
EcoRIとSalIによる
調製用の消化
脱リン酸化
pCEShobFcblasdeleted
kanr
Frt F3'
EF1 leader+intron
7734 bp
Frt' wt'
ATG deleted neo
hobFc
blas
SalI
SalIによる直線化
と
脱リン酸化
SalIによる
調製用の消化
ライゲーション
pCEShobFcblas
kanr
Frt F3'
EF1 leader+intron
8638 bp
Frt' wt'
hobFc
ATG deleted neo
Frt F5'
blas
BamHI
SalI
pVHCμCESHhobFc
amp
VHprom
kan
EF1 leader+intron
CH1'
18042 bp
hobFc
BamHI
hyg
Cμ intron
SalI
pVHCμHhobFc
amp
VHprom
BamHI
kan
hobFc
CH1'
17295 bp
hyg
Cμ intron
SalI
BamHIとSalIによる
調製用の消化
脱リン酸化
BamHIとSalIによる
調製用の消化
BamHIとSalIによる
調製用の消化
脱リン酸化
ライゲーション
ライゲーション
pVHCμCEShobFcblas
VHprom
amp
BsiWI
kan
CH1'
EF1 leader+intron
18415 bp
hobFc
Cμ intron
blas
ATG deleted neo
pVHCμhobFcblas
VHprom
amp
BsiWI
kan
hobFc
CH1'
16668 bp
blas
ATG deleted neo
Cμ intron

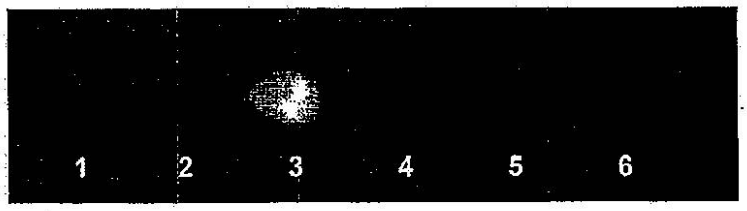
【図６】



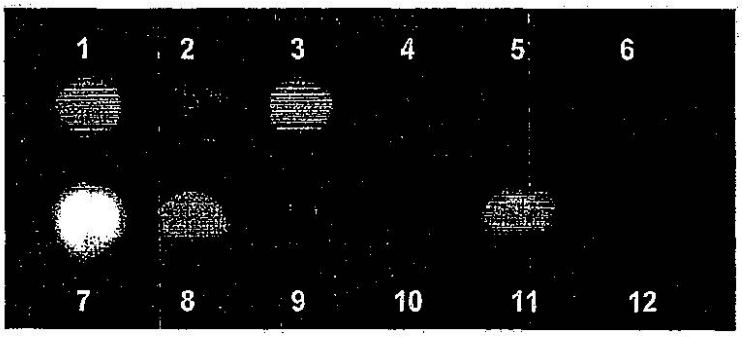
【図７】



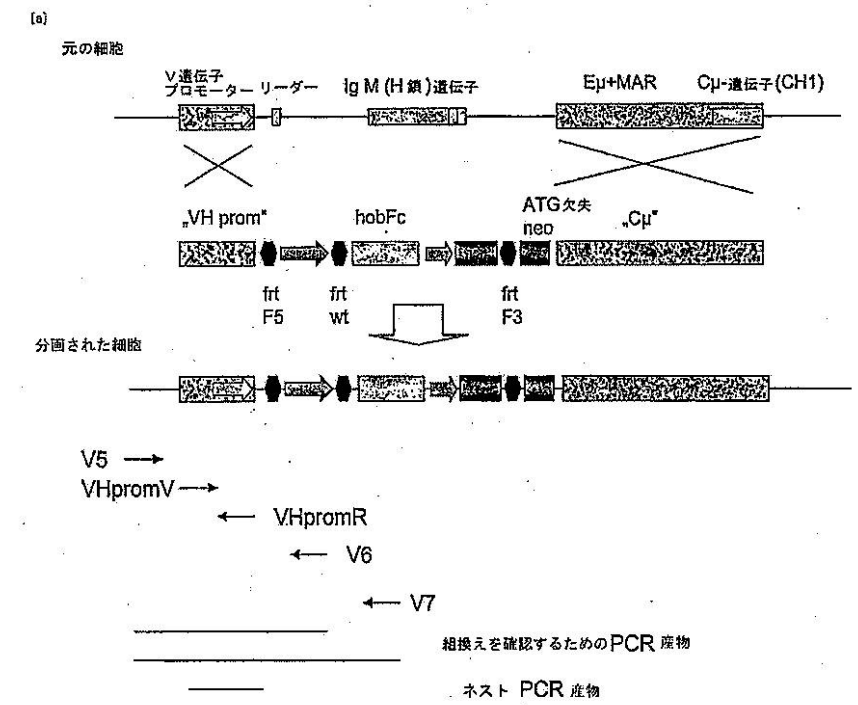
【図８】



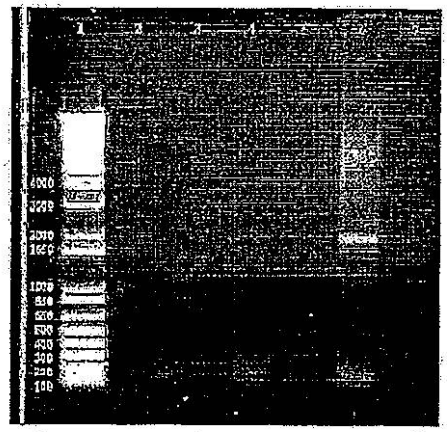
【図９】

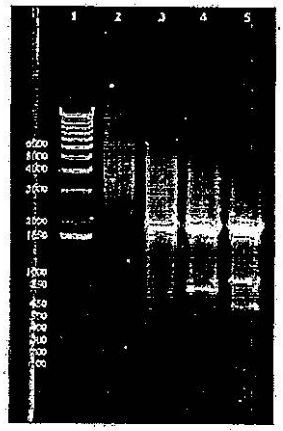


【図１０】

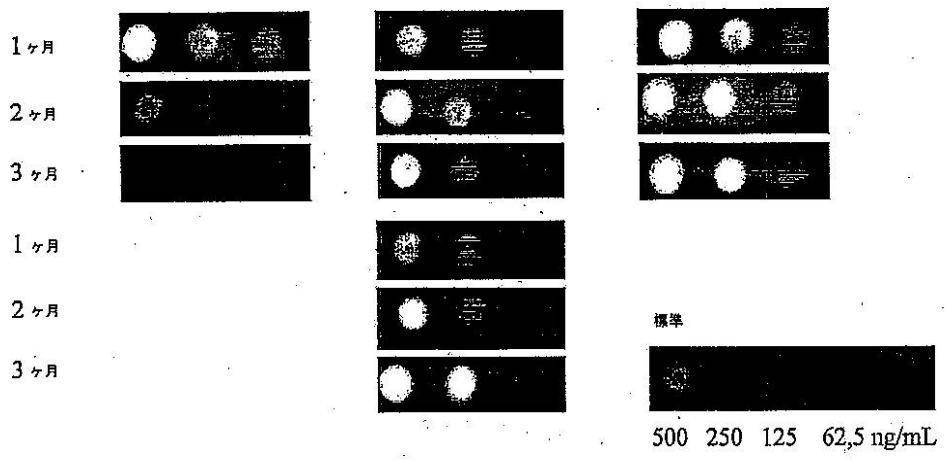

[a]
元の細胞
V遺伝子プロモーター
リーダー
Ig M (H鎖)遺伝子
Eμ+MAR
Cμ-遺伝子(CH1)
„VH prom"
hobFc
ATG欠失
neo
„Cμ"
frt
F5
frt
wt
frt
F3
分画された細胞
V5
VHpromV
VHpromR
V6
V7
組換えを確認するためのPCR産物
ネスト PCR 産物

[b]

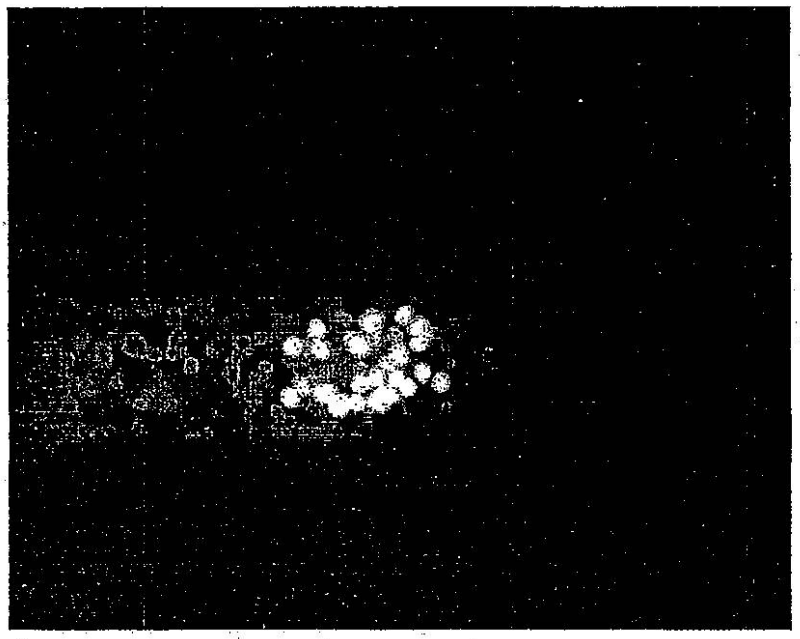




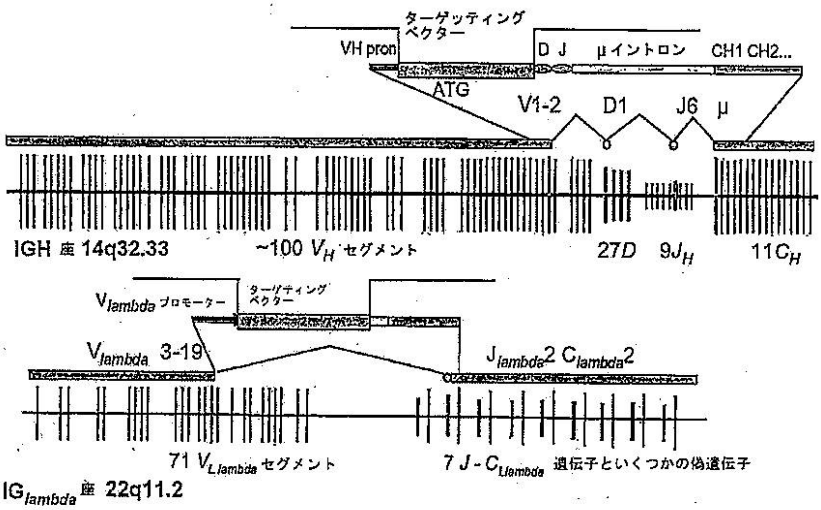
【図１１】



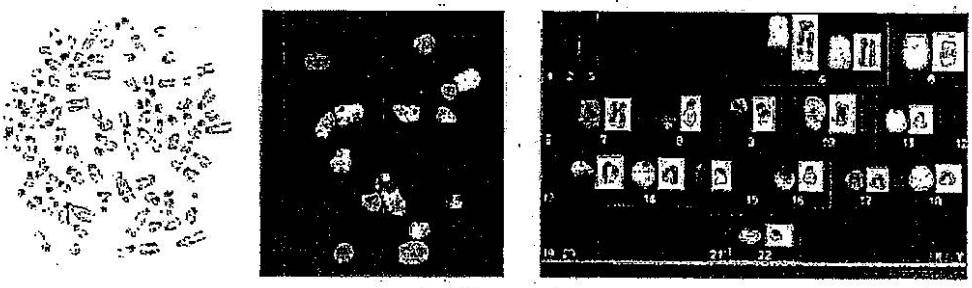
【図１２】



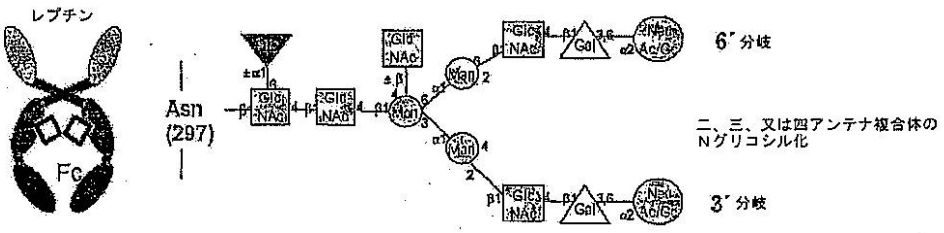
【図１３】


ターゲッティング
ベクター
VH pron
D J
μイントロン
CH1 CH2...
ATG
V1-2
D1
J6
μ
IGH 座 14q32.33
~100 V_H セグメント
27D
9J_H
11C_H
V_{lambda} プロモーター
ターゲッティング
ベクター
V_{lambda} 3-19
J_{lambda}2 C_{lambda}2
71 $V_{Llambda}$ セグメント
7 J-$C_{Llambda}$ 退伝子といくつかの偽遺伝子
IG_{lambda} 座 22q11.2

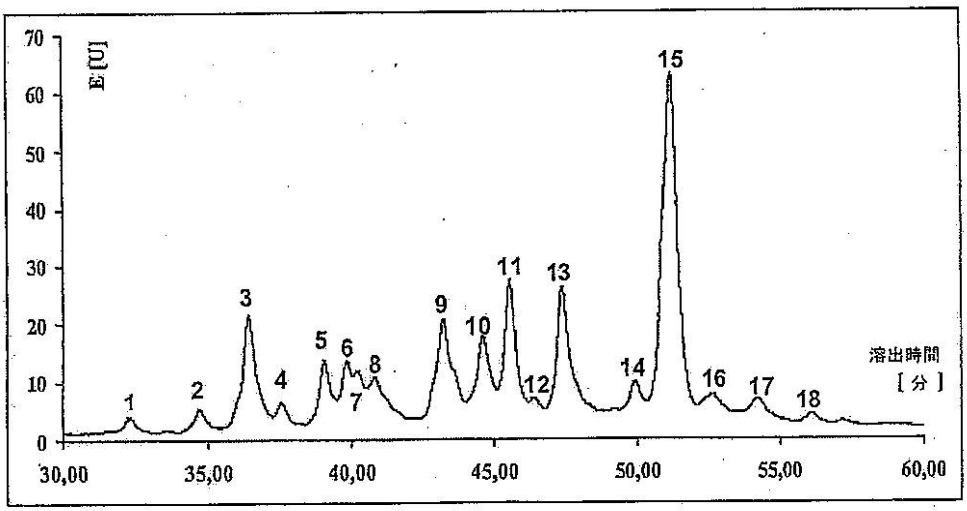
【図１４】



【図１５】


レプチン
Fc
Asn
(297)
6′分岐
二、三、又は四アンテナ複合体の
Nグリコシル化
3′分岐

【図１６】


E[U]
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
溶出時間
[分]
30,00
35,00
40,00
45,00
50,00
55,00
60,00

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP 03/11027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/85 C12N15/90 C12N5/10
C12P21/00

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)
IPC 7 C12N A01K C12P

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, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ESPERET CORINNE ET AL: "Non-erythroid genes inserted on either side of human HS-40 impair the activation of its natural alpha-globin gene targets without being themselves preferentially activated." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 33, 18 August 2000 (2000-08-18), pages 25831-25839, XP002225659 ISSN: 0021-9258 page 25835, column 1, last paragraph -page 25836, column 2, paragraph 1 --- -/--	1-3, 5-12,16, 17

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] 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 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
5 March 2004	15/03/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Aslund, J

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/11027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TRINH K R ET AL: "Site-specific and directional gene replacement mediated by Cre recombinase" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 244, no. 1-2, 20 October 2000 (2000-10-20), pages 185-193, XP004218458 ISSN: 0022-1759 cited in the application page 193 ---	11,12,17
X	KARREMAN S ET AL: "ON THE USE OF DOUBLE FLP RECOGNITION TARGETS (FRTS) IN THE LTR OF RETROVIRUSES FOR THE CONSTRUCTION OF HIGH PRODUCER CELL LINES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 9, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 1616-1624, XP000616161 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	12,17
X	WO 00 63410 A (EINSTEIN COLL MED ;LEBOULCH PHILIPPE (US); MASSACHUSETTS INST TECH) 26 October 2000 (2000-10-26) the whole document ---	11
A	WO 02 08409 A (OW DAVID W ;US OF AMERICA AS REPRESENTED B (US)) 31 January 2002 (2002-01-31) figure 1; examples 1,2 ---	1-17
A	FENG Y-Q ET AL: "SITE-SPECIFIC CHROMOSOMAL INTEGRATION IN MAMMALIAN CELLS: HIGHLY EFFICIENT CRE RECOMBINASE-MEDIATED CASSETTE EXCHANGE" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 292, no. 4, 1999, pages 779-785, XP000929622 ISSN: 0022-2836 cited in the application page 784; figure 1A -& WO 00 63410 A (EINSTEIN COLL MED ;LEBOULCH PHILIPPE (US); MASSACHUSETTS INST TECH) 26 October 2000 (2000-10-26) figure 4C --- -/--	1-17

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/11027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUSSENEGGER M ET AL: "Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 35-42, XP004155532 ISSN: 0167-7799 cited in the application page 36, column 2	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/11027

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0063410	A	26-10-2000	US	6534314 B1	18-03-2003
			AU	4343300 A	02-11-2000
			WO	0063410 A1	26-10-2000
WO 0208409	A	31-01-2002	AU	7707601 A	05-02-2002
			BR	0112633 A	16-09-2003
			CA	2416701 A1	31-01-2002
			CN	1455817 T	12-11-2003
			EP	1309709 A2	14-05-2003
			JP	2004504055 T	12-02-2004
			WO	0208409 A2	31-01-2002
			US	2002123145 A1	05-09-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,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,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,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

(72)発明者 サンディグ，ヴォルカー
ドイツ連邦共和国，１３０８６ ベルリン，ゴエセシュトラーセ ５４，プロバイオゲン アーゲー内
(72)発明者 ウィンクラー，カルステン
ドイツ連邦共和国，１３０８６ ベルリン，ゴエセシュトラーセ ５４，プロバイオゲン アーゲー内
(72)発明者 マルクス，ウィー
ドイツ連邦共和国，１３０８６ ベルリン，ゴエセシュトラーセ ５４，プロバイオゲン アーゲー内
(72)発明者 ウェルメリンゲル，トビアス
スイス国，ツェーハー－８８２０ ワーデンスワイル，ポスト オフィス ボックス ３３５，ホッシュール ワーデンスワイル

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 BA07 BA41 CA04 CA07 DA02 EA04 FA10 GA04 GA11
HA12 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24
4B065 AA93X AA94X AB01 AB02 AC14 BA02 BA08 CA25
4H045 AA11 AA20 DA75 FA72 FA74