

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3733110号

(P3733110)

(45) 発行日 平成18年1月11日(2006.1.11)

(24) 登録日 平成17年10月21日(2005.10.21)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 K 35/36 (2006.01)	A 6 1 K 35/36	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	

請求項の数 8 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-359926 (P2002-359926)	(73) 特許権者	502448487
(22) 出願日	平成14年12月11日(2002.12.11)		トランスカリオティック セラピーズ, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平5-508767の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139 ケンブリッジ, アルバニー ストリート 195
原出願日	平成4年11月5日(1992.11.5)		
(65) 公開番号	特開2003-174897 (P2003-174897A)	(74) 代理人	100095832
(43) 公開日	平成15年6月24日(2003.6.24)		弁理士 細田 芳徳
審査請求日	平成14年12月12日(2002.12.12)	(72) 発明者	セルデン, リチャード エフ
(31) 優先権主張番号	787, 840		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02181 ウェルズレイ, プリズトル ロード 106
(32) 優先日	平成3年11月5日(1991.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	789, 188		
(32) 優先日	平成3年11月5日(1991.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	911, 533		
(32) 優先日	平成4年7月10日(1992.7.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 相同組換えによる脊椎動物細胞等のトランスフェクション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 標的部位に相同するターゲティング配列、および

(b) 外因性調節配列

を含有したDNA構築物を細胞の染色体DNA内の標的部位で相同組換えした場合、それにより、該調節配列を挿入または発現対象遺伝子の調節領域の全部もしくは一部と置換し、細胞における標的遺伝子の発現を変える、直鎖状DNA構築物、ここで、DNA構築物の各末端はエキソヌクレアーゼにより生成された1本鎖突出であり、一本鎖突出のそれぞれが100~1000ヌクレオチド長である、直鎖状DNA構築物。

【請求項2】

1本鎖突出のそれぞれが3'突出または5'突出である、請求項1記載の構築物。

【請求項3】

(a) 請求項1記載のDNA構築物をHT1080細胞に導入し、タンパク質をコードする標的遺伝子の発現を変化させるステップ；

(b) 該タンパク質の生産に適する条件下に細胞を培養し、それにより該タンパク質を生産するステップ；ならびに

(c) タンパク質が生産されたことを確認するステップを含む、タンパク質を生産する方法。

【請求項4】

タンパク質が、カルシトニン、インスリン、インスリノトロピン、インスリン様成長因子

10

20

、副甲状腺ホルモン、神経成長因子、インターロイキン、免疫グロブリン、触媒抗体、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、血液凝固V I I I因子、血液凝固I X因子、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質A - 1、グロビン、低密度リポタンパク質受容体、I L - 2受容体、I L - 2受容体アンタゴニスト、アルファ - 1型アンチトリプシン、免疫応答物質修飾因子、成長ホルモン、インターフェロン、グルコセレブロシダーゼ、コロニー刺激因子およびエリスロポエチンからなる群より選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

(d)細胞由来のタンパク質を単離するステップをさらに含み、かつ該タンパク質がエリスロポエチン、成長ホルモン、グルコセレブロシダーゼまたはコロニー刺激因子である、

10

【請求項6】

(a)調節配列を含有した請求項1に記載のDNA構築物を相同組換えに適する条件下に一次または二次細胞に導入し、それにより、該調節配列を挿入または発現対象遺伝子の調節領域の全部もしくは一部と置換し、該遺伝子の発現を変えるステップ、ならびに

(b)該一次または二次細胞を培養して、遺伝子の発現が変えられた相同組換え二次細胞のクローン細胞株を生産するステップ、

を含む、一次または二次細胞に存在する遺伝子の発現を変える方法。

【請求項7】

遺伝子が、ヒトエリスロポエチン遺伝子、成長ホルモン遺伝子およびインシュリン遺伝子からなる群より選択される、請求項6記載の方法。

20

【請求項8】

細胞が、線維芽細胞、角化細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液細胞成分、筋細胞、肝細胞およびそれらの前駆体からなる群より選択された脊椎動物起源の一次または二次細胞である、請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、直鎖状DNA構築物、該構築物を使用する、タンパク質を生産する方法、一次又は二次細胞に存在する遺伝子の発現を変える方法、トランスフェクトされた一次又は二次細胞、トランスフェクト二次細胞のクローン細胞株を生産する方法、並びにトランスフェクト二次細胞のクローン細胞株に関する。

30

【0002】

【従来の技術】

ヒトの遺伝子療法を開発する試みは、腎臓移植の初期の成功で健常者の細胞を遺伝疾患患者に移植することができるかもしれないと考えられるようになった1950年代にさかのぼる。ゴーシェ病およびニーマン - ピック病における酵素欠損の発見からまもなく、学者らは、まれな遺伝疾患を治療するために臓器移植、骨髄移植、および酵素投与を検討しはじめた(例えば、非特許文献1参照)。1960年代後期から1970年代初期までに、数名の研究者らは、患者自身の細胞に遺伝子を導入することもできるのではないかと考え、わずか数年後には最初のヒト遺伝子のクローニングが行なわれ当該分野の研究が強化された。

40

【0003】

最近まで、ヒトの遺伝子療法に関する理論的および実験的研究はほとんどいづれもごくまれな遺伝疾患に注目していて、当該分野の多くの者にとって遺伝子療法とは遺伝疾患を治療するために患者の遺伝子を変更することを意味するようになっていた。ところが、遺伝子療法は単なる遺伝疾患治療よりはるかに応用範囲が広いのである。遺伝子療法は、治療目的のタンパク質の長期投与によって改善されるであろう病因を問わないあらゆる状態を治療または治癒させるために、由来元が治療対象者であるか別の適当なソースである細胞を遺伝的に変更する医学的介入であると表現するのがより適切であろう。したがって、遺

50

伝子療法はインビボのタンパク質産生・送達システムと考えることができ、現在はタンパク質の投与によって治療されている疾患はほとんどすべてが遺伝子療法を用いる治療の対象候補となる。

【0004】

遺伝子療法は、生殖細胞遺伝子療法と体細胞遺伝子療法という2つの分野に分けることができる。生殖細胞遺伝子療法とは、精細胞、卵細胞、接合子、または早期段階の胚に改変を加えることをいう。倫理基準と実用基準のいずれから見ても、生殖細胞遺伝子療法はヒトに使用するには不適當である。生殖細胞遺伝子療法とは対照的に、体細胞遺伝子療法は治療を受けている者だけにしか影響を及ぼさない(体細胞とは完全個体に発育することができない細胞であり、生殖細胞以外の身体細胞すべてを含む)。したがって、体細胞遺伝子療法はヒトにおけるある種の障害の治療と治癒への合理的なアプローチである。

10

【0005】

体細胞遺伝子療法方式においては、体細胞(たとえば線維芽細胞、肝細胞、または内皮細胞)を患者から採取し、インビトロで培養し、治療上の興味もたれる単数または複数の遺伝子をトランスフェクトし、キャラクタライゼーションを行ない、患者に戻す。これら5段階を実施する手段は、既知の遺伝子療法方式の顕著な特徴である。

【0006】

現在利用可能な遺伝子療法へのアプローチは、発現させようとする遺伝物質を含むレトロウイルスベクターなどの感染性ベクターを利用する。このようなアプローチは、ベクター製造時に複製応答性ウイルスができてしまう可能性があること、治療用ウイルスと内因性(endogenous)レトロウイルスゲノムの間に組換えが起きて、新たな細胞特異性や宿主範囲をもったり病原性や細胞毒性が増大した感染性物質を生じる可能性があること、多数の細胞に独立的に組み込まれることで腫瘍原性挿入事象の危険が増大すること、レトロウイルス中のクローニング能力が制限され(治療応用性を制限する)対象産物のインビボ発現が短命であることなどの限界がある。遺伝子産物、とくに現在利用可能な方法に伴う危険を回避し長期的製造を可能にする遺伝子産物を提供する、より良いアプローチがあれば有用であろう。治療上の興味もたれるタンパク質は、該治療作用タンパク質をコードする外因性(exogenous)DNAを適当な細胞に導入することによって製造されるのが普通である。

20

【0007】

【非特許文献1】

ブラディー(Brady, R.), *NEJM* 275:312 (1966)

30

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、特にヒトの遺伝子療法に有益な、直鎖状DNA構築物、該構築物を使用する、タンパク質を生産する方法、一次又は二次細胞に存在する遺伝子の発現を変える方法、トランスフェクトされた一次又は二次細胞、トランスフェクト二次細胞のクローン細胞株を生産する方法、並びにトランスフェクト二次細胞のクローン細胞株を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、治療目的の産物(therapeutic product)をコードする外因性DNA、それ自体が治療目的の産物である外因性DNAおよび/またはトランスフェクト(transfected)細胞に対してそれに対応する非トランスフェクト細胞中で生ずるより高いレベルで遺伝子を発現させる外因性DNAをトランスフェクトされた脊椎動物由来、とりわけ哺乳類由来のトランスフェクト(transfected)一次および二次体細胞に関する。本発明はさらに、目的の(たとえば治療目的の)産物をコードするかそれ自体が目的の(たとえば治療目的の)産物である外因性遺伝物質(DNA)をトランスフェクトされた脊椎動物由来、とりわけ哺乳類由来のトランスフェクトされた一次および二次体細胞、一次および二次細胞にトランスフェクトを受けさせて外因性遺伝物質を取り込ませる方法、クローン細胞株(clonal cell strains)または不均一細胞株(heterogenous cell strains)を製造する方法、上記

40

50

トランスフェクト一次または二次細胞を用いる遺伝子療法の方法、本発明の方法によって作成されたトランスフェクト一次または二次細胞を使用することによって治療目的タンパク質を製造する方法、および該トランスフェクト一次または二次細胞を用いて抗体を製造する方法に関する。

【0010】

一つの態様においては、本発明は、ヒト成長ホルモン(hGH)、エリスロポエチン(EPO)またはインスリノトロピンなど臨床的に有用な産物をコードする外因性遺伝物質(DNAまたはRNA)をトランスフェクトされた脊椎動物由来、とりわけ哺乳類由来のトランスフェクト一次および二次体細胞、一次および二次細胞にトランスフェクトを受けさせてhGH、EPOまたはインスリノトロピンをコードする外因性遺伝物質を組み込ませる方法、hGH、EPOまたはインスリノトロピンをコードする外因性遺伝物質を発現するクローン細胞株または不均一細胞株を製造する方法、本発明のトランスフェクト細胞を使用することによるかhGH、EPOまたはインスリノトロピンをコードするDNAを個体に直接注射することによって、そのものを必要としている個体に対して生理的に有用な量のhGH、EPOまたはインスリノトロピンを提供する方法、および該トランスフェクト一次または二次細胞を用いて該コード化物に対する抗体を製造する方法に関する。

10

【0011】

別の態様においては、本発明は、脊椎動物、とりわけ哺乳類由来の細胞中でのジーンターゲティング(gene targeting)またはDNAターゲティング(targeting)の方法に関する。すなわち、本発明は、DNAの相同組換えまたはターゲティング(targeting)によって脊椎動物由来の一次または二次細胞にDNAを導入する方法であって、あらかじめ選択された部位で該一次または二次細胞のゲノムDNAに導入されることに関する。あらかじめ選択された部位は、使用するターゲティング配列を決定する。本発明はさらに、本発明の方法によって製造された相同的に組換えられた一次または二次細胞、相同的に組換えられた(HR)一次または二次細胞という、および該HR一次または二次細胞の用途に関する。

20

【0012】

本発明はまた、脊椎動物由来の一次細胞、二次細胞または不死化(immortalized)細胞中に存在する通常は該細胞中では全く発現されないか細胞中で有意量では発現されない遺伝子を働かせる、すなわち活性化させる方法に関する。相同組換えまたはターゲティングを用いて、対応する非トランスフェクト(nontransfected)細胞中で見られるレベルより高いレベルで遺伝子を発現させる調節配列を有する遺伝子と関係するのが正常である調節領域を置換または不活性化する。したがって、本発明は、トランスフェクト一次、二次または不死化細胞中で目的の産物をコードする内因性遺伝子を働かせる、すなわち活性化させることによってタンパク質を製造する方法に関する。

30

【0013】

本明細書で使用する場合、一次細胞という用語は、脊椎動物組織ソースから単離した(平板培養する前、すなわち皿やフラスコなどの組織培養容器に付着させる前に)細胞の懸濁液中に存在する細胞、組織から得た外植片中に存在する細胞両者とも一次平板培養された前タイプの細胞、およびこれら平板培養された細胞から得た細胞懸濁液を包含する。二次細胞または二次細胞株という用語は、培養中のその後のすべての段階の細胞をいう。すなわち、一次平板細胞を培養容器から取り出し、再び平板培養(継代)したとき、本明細書中ではこれをその後の継代におけるすべての細胞とともに二次細胞と呼ぶ。二次細胞は、1回以上継代された二次細胞より成る細胞株である。細胞株は、1)1回以上継代され、2)培養中に有限回数平均集団倍化を示し、3)接触によって阻害される足場依存性増殖の性質を示し(足場依存性は懸濁培養で増殖される細胞には適用されない)、しかも4)不死化されないことを特徴とする二次細胞から成る。「クローン細胞株」とは、単一の創始細胞に由来する細胞株であると定義する。「不均一細胞株」とは、2個以上の創始細胞に由来する細胞株であると定義する。

40

【0014】

本発明は、ゲノムに安定的に組み込まれているか細胞中でエピソーム的に発現されている

50

外因性DNAでトランスフェクトされた線維芽細胞、ケラチン細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液細胞成分(formed elements)、筋肉細胞、その他の培養可能体細胞、及び体細胞前駆体等の一次および二次体細胞を包含する。生じた細胞は、それぞれトランスフェクト一次細胞(transfected primary cells)およびトランスフェクト二次細胞と呼ぶ。該外因性DNAは、1)治療目的の産物である翻訳産物(例えばタンパク質)や転写産物(例えばリボザイムやアンチセンス核酸配列)などの産物をコードし、2)それ自体が治療目的の産物(例えば細胞調節タンパク質に結合するか遺伝子発現を変化させるDNA)であるか、3)レシピエント細胞(recipient cells)のゲノムDNAとの相同組換えを受けて内因性遺伝子の発現の変化(増大または低下)をもたらすDNAである。

10

【0015】

外因性DNAがレシピエント細胞によって発現される翻訳または転写産物をコードする態様においては、生じる産物は細胞内に保持され、細胞膜に取り込まれるか細胞から分泌される。本態様においては、治療目的の産物をコードする外因性DNAは、トランスフェクト細胞中の外因性DNAの発現に十分な付加的(additional)DNA配列とともに細胞に導入され、それらの配列に効果的(operatively)に結合される。

【0016】

外因性DNAが発現されない態様においては、遺伝子産物は存在せず、DNA自体が治療目的の産物となる。本態様においては、外因性DNAは、たとえば細胞調節タンパク質に結合するDNA配列、トランスフェクト一次または二次細胞中に存在するタンパク質、または核酸のキレート形成(sequestration)に十分なDNA配列、染色体の二次または三次構造を変化させるDNA配列、または転写調節要素であるDNA配列である。外因性DNAを発現させるか利用可能ならしめるために改変された上記一次細胞は、本明細書ではトランスフェクト一次細胞と呼び、組織から取り出し、初めて培地上に置かれた細胞を含む。外因性DNAを発現させるか利用可能ならしめるために改変された二次細胞は、本明細書ではトランスフェクト二次細胞と呼ぶ。

20

【0017】

外因性DNAがトランスフェクト(レシピエント)細胞のゲノムDNAとの相同組換えを受ける態様においては、該外因性DNAを導入すると、内因性(ゲノム性)配列の全体または一部を置換するか内因性配列を破壊することによって、該内因性遺伝子の発現を支配する内因性配列が無効化される。

30

【0018】

本発明の方法によってトランスフェクトを受けた一次および二次細胞は3つのタイプまたは範疇に分れる。すなわち、1)治療目的の産物を産生したり含有したりしない採取したままの(as obtained)細胞、2)治療目的の産物を産生するか含有するが、正常より少ない量(生理的に正常な下限より少ない量)または不完全である細胞、および3)生理的に正常なレベルで治療目的の産物を産生するがその含有量または産生量を増大または強化すべき細胞である。

【0019】

外因性DNAは様々な手法によって一次または二次細胞に導入される。たとえば、治療目的のタンパク質をコードする外因性DNAおよびレシピエント細胞中での発現に必要な付加的DNA配列を含む構築物をエレクトロポレーション、顕微注入、またはその他の手段(たとえばリン酸カルシウム沈殿法、リン酸カルシウム沈殿法変法、ポリブレン沈殿法、リポソーム融合法、受容体介在DNA送達法)によって一次または二次細胞に導入する。あるいは、外因性DNAを含むレトロウイルスベクターなどのベクターを用いることができ、該ベクターに感染させることで細胞を遺伝的に改変させることができる。

40

【0020】

トランスフェクト一次および二次細胞は、外因性DNA以外にも、発現されると抗生物質抵抗性、細胞毒性物質抵抗性、原栄養性、または表面タンパク質の発現などの選択可能表現型をレシピエントに付与する選択(selectable)マーカーをコードするDNAを任意に含

50

有していてもよい。それが存在することで、外因性DNAを含有する細胞を同定し選択することが可能になる。neo、gpt、dhfr、ada、pac、hyg、mdr、およびhisDなど様々な選択マーカー遺伝子を用いることができる。

【0021】

本発明のトランスフェクト細胞は、トランスフェクト一次細胞の集団、トランスフェクトクローン細胞株、トランスフェクト不均一細胞株、および前記3つのトランスフェクト細胞範疇の一つに属する少なくとも1個の代表的細胞が存在する細胞混合物として、また、1)治療目的のタンパク質(たとえば個体中に存在しないか、個体の生理的要求より産生量が少ないか、欠損しているか、非効率的または不適當に利用されているタンパク質、酵素機能や輸送機能などの新規機能を有するタンパク質)、または2)治療目的の核酸(たとえば調節タンパク質と結合、すなわちキレート形成するDNA、遺伝子発現を阻害するか本質的酵素活性を有するRNA)のいずれかである治療目的の産物の送達に反応する異常または好ましくない状態を有する個体の治療のための送達システムとして有用である。治療目的のタンパク質または核酸を提供する本発明の方法においては、トランスフェクト一次細胞、クローン細胞株または不均一細胞株を、異常または好ましくない状態を治療または予防しようとする個体に対し、生理的に意義のあるレベルで外因性DNAを発現または利用可能にするのに十分な量と適当な経路で投与する。生理的に意義のあるレベルとは、その産物の体内産生レベルに近いか、異常または好ましくない状態の改善をもたらすレベルである。本方法において投与される細胞は、治療目的の産物をコードする外因性DNA、それ自体が治療目的の産物である外因性DNA、または相同組換えによってゲノムDNA中のあらかじめ選ばれた部位に導入され、レシピエント細胞に正常状態ではその細胞中に発現されない産物を産生させるか、対応する非トランスフェクト細胞中で生じるよりも高いレベルで該産物を産生させるよう機能する、調節配列などの外因性DNAのトランスフェクトを受けた細胞である。調節配列(たとえばプロモーター)が導入される態様においては、該調節配列は、正常では遺伝子と関連している調節配列を置換または無力化させ、対応する非トランスフェクト細胞中で生じるレベルより高いレベルでの該遺伝子の発現をもたらす。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明は、治療目的の産物をコードする外因性DNA、それ自体が治療目的の産物である外因性DNA、および/またはトランスフェクト細胞に対してそれに対応する非トランスフェクト細胞中に存在するレベルより高いレベルで遺伝子を発現させる外因性DNAをトランスフェクトされた脊椎動物由来、とりわけ哺乳類由来の一次および二次体細胞に関する。

【0023】

本明細書で説明するように、脊椎動物、とりわけ哺乳類由来の一次または二次細胞に治療目的の産物をコードする外因性DNAをトランスフェクトすると、長期間にわたりインビトロとインビボのいずれにおいてもコードされた治療目的の産物を安定的かつ再現的に産生することが示されている。また、該トランスフェクト一次および二次細胞は、生理的に意義のあるレベルでインビボで該コード化産物を発現し、移植後の回収が可能で、再培養すると増殖し移植前の性質を示すことが示されている。この事実は、当該分野に習熟せる者が予想することと全く対照的である。なぜなら、たとえば、当該分野の専門家でさえも、正常な体細胞の寿命は有限であること、およびレトロウイルスを用いて細胞を遺伝的に改変させないかぎり、遺伝子療法への使用を妨げる適切な移植可能細胞を単離または培養することができないとみているからである。ミラー(Miller, A.D.), Blood, 76:271-278(1990)。ところが、レトロウイルスで処理した線維芽細胞を移植しても、せいぜい一時的に代謝が向上するだけであることが示されており、治療方式としては大きな限界があるとみられている。正常(不死化されていない)線維芽細胞は、「リン酸カルシウム沈殿法を用いてトランスフェクトするのが連続細胞株よりはるかに困難である」という特徴がある。ミラー(Miller, A.D.), Blood, 76:271-278(1990)。さらに、遺伝子療法のためにレト

10

20

30

40

50

ロウイルスを使わない方法を検討するにあたり、当該分野の専門家らは次のように考えるのが普通である。すなわち、「・・・遺伝子送達の効率は低く、・・・療法に必要な数百万の適切な変化を保証するためには、医師は不可能な数の細胞を患者から入手しなければならないであろう」[ベルマ (Verma, I.M.), *Scient. Amer.*, November 1990, pages 68-84]。

【 0 0 2 4 】

驚くべきことに、本出願人らは、目的の産物（すなわち治療目的のタンパク質またはそれに対する抗体が産生される抗原である翻訳産物）をコードする外因性DNAを含み、該外因性DNAを安定的に発現するトランスフェクト一次または二次細胞を製造することに成功している。本明細書で説明する方法を用いれば、その他の翻訳産物（天然には産生されない新規タンパク質）や転写産物（たとえばアンチセンスRNAまたはリボザイム）をコードする外因性DNAまたはそれ自体が治療目的の産物（たとえば、トランスフェクト細胞中に存在する調節タンパク質と結合する外因性DNA）である外因性DNAを含むトランスフェクト一次または二次細胞を製造することもできる。

10

【 0 0 2 5 】

本発明の方法は、1) トランスフェクト一次細胞を投与される個体またはその他のソースから得られた一次細胞の集団を提供し、2) 該一次細胞または一次細胞由来二次細胞に、上記のような外因性DNAおよび上記のような必要な付加的DNA配列を含むDNA構築物を導入してトランスフェクト一次または二次細胞を製造し、3) トランスフェクト一次または二次細胞を増殖に適した条件下で維持し、4) トランスフェクト一次または二次細胞を同定し、5) 増殖に適した培養条件下で十分な時間にわたり維持することによって(4)で同定したトランスフェクト一次または二次細胞からコロニーを作成することで、(4)で同定した(創始)細胞由来の細胞株を作成するというステップから成るものである。本方法の一つの態様においては、DNA構築物に存在する配列とゲノムDNAに存在するDNA配列の間の相同組換えによって外因性DNAをゲノムDNAに導入する。

20

【 0 0 2 6 】

トランスフェクト二次細胞のクローン集団を製造する本発明の方法の一つの態様においては、一次または二次細胞を含有する細胞懸濁液を、治療目的の産物をコードする外因性DNAおよびneo遺伝子などの選択マーカーをコードするDNAと混合する。該2つのDNA配列は、同一のDNA構築物または2つの異なるDNA構築物上に存在する。得られた混合物は、250～300ボルト、960μファラッドのキャパシタンスで、細胞がDNA構築物を取り込むのに適した一定時間（たとえば14ないし20ミリ秒）というのが通常条件であるエレクトロポレーションに付す。別の態様においては、顕微注射を用いてDNA構築物を一次または二次細胞に導入する。いずれの態様においても、外因性DNAを導入すると、トランスフェクト一次または二次細胞ができる。

30

【 0 0 2 7 】

不均一細胞株を製造する本発明の方法においては、単一のトランスフェクト一次または二次細胞を単離して創始細胞として使わないこと以外はクローン細胞株の製造について説明したのと同じステップを実施する。異なる点は、複数のトランスフェクト一次または二次細胞を培養して不均一細胞株を製造することである。

40

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、外因性DNAによってコードされるタンパク質に対して特異的な抗体を製造する方法にも関する。該方法においては、求める抗体に対する抗原を発現するトランスフェクト一次または二次細胞を動物レシピエント（たとえばウサギ、マウス、ブタ、イヌ、ネコ、ヤギ、モルモット、ヒツジ、ヒト以外の霊長類）に導入する。動物レシピエントは発現される抗原に対する抗体を産生するが、該抗原は完全タンパク質抗原であってもよいし、完全抗原をコードする無傷の遺伝子の断片によってコードされるペプチドであってもよい。該動物からポリクローナル血清を得る。トランスフェクト一次または二次細胞を使用することによってモノクローナル抗体を製造することもできる。目的のモノクローナル抗体に対する抗原を発現するトランスフェクト一次または二次細胞の動物レシピエント

50

から脾臓細胞を採取する。コプロウスキーら (Koprowski *et al.*) (米国特許第4, 172, 124号)の方法やケーラーら (Kohler *et al.*) [*Nature* 256:495-497 (1975)]の方法など公知の方法を用いて該脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を製造する。得られたポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体は、その他の方法によって製造された抗体と同じ目的(たとえば診断、予防、治療の目的)に用いることができる。

【0029】

本発明は、異常または好ましくない状態の治療において応用範囲が広く、様々な産物を個体に提供するために用いることができる。たとえば、本発明は、分泌タンパク質(主に全身性の作用または主に局所性の作用があるもの)、膜タンパク質(たとえば新たな細胞応答性や強化された細胞応答性を付与したり、毒性産物の除去を促進したり、細胞を標識化またはターゲティングする目的で)、または細胞内タンパク質(たとえば遺伝子発現に影響を及ぼしたり自己消化作用を得る目的で)を提供するために用いることができる。また、本発明は、遺伝子発現を変化させるアンチセンス(anti-sense)アプローチにおいて有用な操作RNAを製造するかそれに対して個体中で免疫応答が起きる抗原を提供する(ワクチン投与のように疾患を予防するため、または既存の状態を抑制するために)目的で、細胞タンパク質と結合するかキレート形成するように設計されたDNAを提供するために用いることができる。本発明は、異常または好ましくない状態の治療において、1)治療性がある(一つの遺伝子療法治療は患者の寿命を延長させる可能性がある)、2)精密な投与が可能である(生理的要求に基づく必要なタンパク質の最適用量を患者の細胞が連続的に決定し送達させるうえに、安定トランスフェクト細胞株は移植に先立ち詳細にインビトロでキャラクタライゼーションされて長期インビボ機能を正確に予想することができる)、3)患者を治療する際に適用が簡単である、4)患者の承諾に関する問題を排除する(1回の遺伝子療法治療を行なった後で毎日タンパク質を注射する必要がなくなる)、5)治療費用が減る(治療目的のタンパク質は患者自身の細胞によって合成されるので、コストのかかるタンパク質製造と精製の投資が不要になる)、および6)安全である(本発明は、患者の細胞を遺伝的に操作するためにレトロウイルスなどの感染性物質を使用することはないので、他の遺伝子療法方式の妨げとなっている安全性と有効性の問題が解決される)という点でとくに有利である。

【0030】

本明細書でさらに説明するように、脊椎動物、とりわけ哺乳類由来の一次または二次細胞にEPOをコードする外因性DNAをトランスフェクトすると、長期間にわたりインビトロとインビボのいずれにおいてもコード化EPOを再現的に産生することが示されている。また、トランスフェクト一次および二次細胞は生理的に意義のあるレベルでインビボでEPOを発現することが示されている。発現されたEPOはヒト尿から精製されたEPOまたは組換えヒトEPOに特有のグリコシル化パターンを有することが示されている。

【0031】

また、本明細書でさらに説明するように、脊椎動物、とりわけ哺乳類由来の一次または二次細胞にhGHをコードする外因性DNAをトランスフェクトすると、コードされたhGHを長期的にインビトロとインビボのいずれにおいても再現的に産生することが示されている。また、該トランスフェクト一次および二次細胞は生理的に意義のあるレベルでインビボでhGHを発現することが示されている。

【0032】

出願人らはまた、EPOをコードする外因性DNAを安定的に発現するトランスフェクト一次または二次細胞、上記トランスフェクト細胞のクローン細胞株および不均一細胞株を製造する方法、クローン及び不均一細胞株を製造する方法、およびEPOを発現するトランスフェクト細胞を用いて該コード産物を生理的に意義のあるレベルで哺乳類個体に送達する方法を完成した。本明細書で説明する構築物および方法は、たとえばEPO産生および/または機能が増大または強化される必要のある[たとえば、低下すなわち正常以下であるか、正常であってもその個体が赤血球産生の強化によって少なくとも一時的に利益を

10

20

30

40

50

受ける場合（たとえば透析前療法または透析療法実施中、AZTでエイズを治療中、手術後、または化学療法実施中）] 個体（ヒト）を治療するのに有用である。

【0033】

やはり本明細書で説明するように、脊椎動物、とりわけ哺乳類由来の一次または二次細胞に、インスリノトロピンをコードする外因性DNAをトランスフェクトすること、およびそれらを用いて、インスリンの産生、機能および/または感受性が低下している個体にインスリノトロピンを提供することができる。本明細書で使用する場合、インスリノトロピンという用語は、たとえばGLP(7-37)、GLP(7-36)、GLP-1(7-35)、GLP-1(7-34)などのグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)の誘導体、ならびにインビボのアミド化酵素によって生じるそれらのカルボキシ末端アミド化誘導体、トランケートされた(truncated)GLP-1のそれと実質的に同じ生物活性または血中安定性が、強化された生物活性または安定性をもたらすアミノ酸変化またはその他の変化を有する誘導体を含む。

10

【0034】

本明細書でさらに説明するように、本出願人らは、DNA構築物またはプラスミド中で一次または二次脊椎動物細胞にDNAを導入し、相同組換えによって該トランスフェクト一次または二次細胞のゲノムに組み込むことができるということも明らかにした。すなわち、本出願人らは、一次および二次哺乳類細胞におけるジーンターゲティングを証明したのである。本出願人らは、さらに、該外因性DNAは相同組換え体(HR)細胞中に目的の機能を有すること、および選択マーカー遺伝子によって付与される検出可能表現型に基づいて正しくターゲティングされた細胞を同定することができるということも証明した。

20

【0035】

また、本発明は、トランスフェクト一次、二次、または不死化細胞を用いてタンパク質を製造する方法に関する。本方法は、一次細胞、二次細胞、または不死化細胞に治療目的の産物をコードする外因性DNA、または治療目的の産物をコードする内因性遺伝子にターゲティングしかつそれを活性化させるのに十分なDNAをトランスフェクトするものである。たとえば、実施例18fと19と21は、選択された内因性遺伝子のターゲティングおよび活性化によるタンパク質製造について説明している。

【0036】

本出願人らは、選択マーカー遺伝子を含むプラスミド(プラスミドpCDNEO)、治療目的の産物をコードする遺伝子を含むプラスミド(プラスミドpXGH5)、または両方の遺伝子を含むプラスミド(pXGH301)の構築について説明する(実施例3)。また、ヒトゲノム中の特定の遺伝子座(HPRT座)へのターゲティングと薬剤抵抗性表現型に基づく選択に有用なプラスミドの構築についても説明する(実施例18a)。このプラスミドをpE3Neoと呼び、細胞ゲノムのHPRT座へ組み込むと、hprt⁻、6-TG抵抗性表現型を有しやはりG418抵抗性を示す細胞ができる。上記のように、本出願人らは、樹立細胞に導入されたDNAがHPRT遺伝子のエキソン3の位置にあることを証明することによって、樹立ヒト線維芽細胞系におけるジーンターゲティングにおいてpE3Neoが正しく機能することを明らかにした(実施例18b)。

30

【0037】

また、本出願人らは、pE3Neoを用いる一次および二次ヒト皮膚線維芽細胞におけるジーンターゲティングを証明し(実施例18c)、治療目的の産物[ヒト成長ホルモン(hGH)]をコードする遺伝子のヒトゲノムへのターゲティング挿入(targeted insertion)のためのプラスミドの構築について説明する(実施例18d)。本願はさらに、DNA末端の改変がゲノムDNAへのDNAターゲティングを強化すること(実施例18cと実施例18e)、および様々なターゲティングプラスミドの構築を強化することを明らかにする。たとえば、本出願人らは、ヒト細胞中で機能することが知られているネズミプロモーターの支配下にヒト遺伝子をおくための(実施例18fと18i)、遺伝子をフランキングする配列へのターゲティングと様々なスクリーニングおよび選択アプローチを用いるターゲティングされる二次線維芽細胞の単離のための(実施例18g、18h、18j、

40

50

18k)、コード産物を発現する相同組換え体一次または二次細胞を製造するために、ヒト以外またはヒトの由来のプロモーターの支配下において、一次または二次細胞中では正常に発現されないヒト遺伝子をおくための、ターゲティングプラスミド(実施例18f~18k)について説明する。

【0038】

さらに本発明の二つの態様について説明するが(実施例19)、いずれも、遺伝子(たとえばヒトEPO遺伝子)の上流にある正常調節配列を変化させて、非トランスフェクト状態では検出可能な量の遺伝子産物を発現しないのが普通である一次または二次細胞株中での遺伝子産物の発現を可能にするものである。一つの態様においては、ターゲティング事象(targeting events)の産物はキメラ性転写ユニットであり、調節要素および効果的に結合されたエキソンが、活性化させようとする目的の内因性遺伝子の上流に位置している。転写、スプライシング、および翻訳の結果、該外因性DNAのエキソン1によってコードされるアミノ酸が、内因性遺伝子中のエキソン2と下流エキソンによってコードされるアミノ酸と融合されたキメラ性タンパク質ができる。第2の態様においては、ターゲティング事象の結果、内因性遺伝子の調節配列とエキソン1配列が、対応する外生配列で置換される。転写、スプライシング、および翻訳の結果、上記したものと同様のキメラ性タンパク質ができる。通常、上記タンパク質の分泌は、膜透過とシグナルペプチドの除去を伴い、その結果、このケースでは、キメラ性シグナルペプチドを欠く正常なタンパク質ができる。いずれの場合も、キメラ性タンパク質はこの時点で目的の調節要素の支配下にある。

【0039】

実施例18f~18hおよび19は、ヒトEPO遺伝子の上流の正常な調節配列を変化させて、非トランスフェクト状態では検出可能な量のEPOを発現しない一次または二次線維芽細胞株におけるhEPO発現を可能にする態様について説明する。一つの態様においては、ターゲティングの結果、正常EPOタンパク質は無傷のままであるが、マウスメタロチオネインプロモーターの支配下におかれる。実施例18iおよび18jは、類似のターゲティング構築物を用いて一次または二次ヒト線維芽細胞中で内因性成長ホルモン遺伝子を活性化させることを明らかにする。ヒト線維芽細胞中のEPO発現の活性化に関するその他の態様においては、ターゲティング事象の産物はキメラ性転写ユニットであり、ヒト成長ホルモン遺伝子の最初のエキソンはEPOエキソン2-5の上流に位置する。転写(マウスメタロチオネインプロモーターの支配下にある)、スプライシング、および翻訳の産物は、hEPOシグナルペプチドのアミノ酸1-4がhGHのアミノ酸残基1-3で置換されたタンパク質である。このタンパク質のキメラ部分、すなわちシグナルペプチドは分泌の前に細胞から除去される。

【0040】

実施例は、ジーンターゲティングによって内因性遺伝子を活性化する方法であって、hEPOコード領域とhGHタンパク質コード領域の操作やその他の使用を必要としない方法を提供するものである。これらの方法により、通常は不活性の遺伝子を、インビボのタンパク質送達方法(たとえば遺伝子療法)およびインビトロのタンパク質製造(たとえば薬剤製造)にとって望ましい性質を有する細胞中で活性化させてもよい。

【0041】

図7と8は、hEPO遺伝子を転写的に活性化するための2つの方法を説明するものである。細線はhEPO配列を示し、太線はマウスメタロチオネインIプロモーター、点線ボックスはhGHの5'未翻訳領域、黒塗りボックスはhGHのエキソン1、ストライプいりボックスはhEPOのイントロン1に由来する10bpのリンカー、網かけボックスはhEPOの5'未翻訳領域、白抜きボックスはhEPO配列コード配列、HIIIIはHindIII部位を示す。

【0042】

本明細書で説明する当該分野における通常の技術を有する者にとって明白な方法、DNA構築物、またはプラスミド、またはそれらに改変を加えたものを用いれば、治療目的の産物(たとえばタンパク質、リボザイム、核酸)をコードする外因性DNAを脊椎動物(た

10

20

30

40

50

例えば哺乳類、ヒトおよびヒト以外の両者)の一次または二次細胞のゲノム中のあらかじめ選択された部位に挿入することができる。

【0043】

本明細書で説明する方法およびDNA構築物は、様々な目的に用いることができる。該方法は、レシピエントの一次または二次細胞中にすでに存在するDNAを修復、改変、欠失または置換する目的で、あるいは治療目的の産物またはその他の目的産物をコードするかそれ自体が治療目的の産物またはその他の産物である遺伝子またはDNA配列を一次または二次細胞中に(あらかじめ選択された部位に)導入する目的で、あるいは一次または二次細胞レシピエント中に存在する調節配列に対して付加または置換を行なう目的で、あるいは一次または二次細胞中に存在するある遺伝子の全体または一部をノックアウトまたは除去する目的で、あるいは普遍的なドナー細胞を製造する目的で、脊椎動物由来の一次または二次細胞を変化させるために用いることができる。

10

【0044】

トランスフェクト一次または二次細胞は、選択可能表現型を付与する選択マーカをコードするDNAを含むことで、同定と単離をしやすくしてもよい。本出願人は、外因性DNAを安定的に発現するトランスフェクト一次または二次細胞を製造する方法、上記トランスフェクト細胞のクローン細胞株および不均一細胞株、該クローン細胞株および不均一細胞株を製造する方法、および本発明のトランスフェクト一次または二次細胞の集団を使用することにより異常または好ましくない状態を治療または予防する方法も完成した。

【0045】

トランスフェクト細胞

本発明の方法によってトランスフェクトを受けさせる一次および二次細胞は様々な組織から得ることができ、培養状態で維持することができるすべての細胞型を含む。たとえば、本発明の方法によってトランスフェクトを受けさせることができる一次および二次細胞としては、線維芽細胞、ケラチン細胞、上皮細胞(たとえば乳房上皮細胞、腸上皮細胞)、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液細胞成分(たとえば白血球、骨髄細胞)、筋肉細胞、およびこれらの型の体細胞の前駆体などが挙げられる。一次細胞は、トランスフェクト一次または二次細胞を投与される個体から得るのが好ましいが、一次細胞は、同種または別種(たとえばマウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、トリ、ヒツジ、ヤギ、ウマ)のドナー(レシピエント以外)から得てもよい。

20

30

【0046】

トランスフェクト一次および二次細胞は、表現型の選択の有無にかかわらず、実施例5~7で説明するようにして製造されたものであり、たとえばEPOやインスリノトロピンをはじめとする治療目的の産物をコードする外因性DNAを発現することが示されている。

【0047】

不死化細胞も本発明の方法によってトランスフェクトを受けさせることができ、遺伝子療法またはタンパク質製造に用いることができる。本発明の方法によるタンパク質製造に有用な不死化ヒト細胞系の例としては、HT1080、HeLa、MCF-7乳癌細胞、K-562白血病細胞、KB癌腫細胞、および2780AD卵巣癌細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0048】

外因性DNA

本発明の方法によって一次または二次細胞に組み入れられる外因性DNAは、1)既存の状態を治療するかその発生を予防するのに有用な翻訳または転写産物など一次または二次細胞における発現が望まれる翻訳または転写産物(たとえばEPOまたはインスリノトロピン)をコードするDNA、および2)既存の状態を治療するかその発生を予防するのに有用なDNAなど遺伝子産物はコードしないがそれ自体が有用であるDNAまたは3)レシピエント細胞のゲノムDNAと相同組換えを起こして内因性遺伝子の発現の変化(増大または低下)が起きるDNAである。

【0049】

50

一次または二次細胞にトランスフェクトされたDNAは目的産物全体をコードすることができるが、該産物のたとえば単数または複数の活性部分または機能性部分をコードすることもできる。該産物は、たとえばホルモン、サイトカイン、抗原、抗体、酵素、凝固因子、輸送タンパク質、受容体、調節タンパク質、構造タンパク質、アンチセンスRNA、リボザイム、または天然には存在しないタンパク質または核酸（すなわち新規タンパク質または新規核酸）であることができる。該DNAは、天然にそれを含むソースから得ることができ、また、遺伝子操作技術や合成法を用いて製造することもできる。一次または二次細胞にトランスフェクトされたDNAは、1つ以上の治療目的の産物をコードすることができる。一次または二次細胞へのトランスフェクト後、該外因性DNAをレシピエント細胞のゲノムに安定的に組み込み（使用するDNA構築物中に存在する追加配列とともに）、そのゲノムから発現されたりその他の機能を示す。あるいは、該外因性DNAは、トランスフェクト一次または二次細胞内にエピソーム的に存在してもよい。

10

【0050】

目的産物をコードするDNAは、誘導可能プロモーターの支配下で細胞に導入し、できた細胞またはそれを個体に導入したものは該産物を発現しないがそうなるように誘導することができるという結果を得ることができる（すなわち、トランスフェクト細胞が産生された後の移植前または移植後に産生を誘導する）。無論、目的産物をコードするDNAは、導入の時点で（すなわち誘導なしに）発現されるようなやり方で細胞に導入することができる。

【0051】

選択マーカー

様々な選択マーカーを一次または二次細胞に組み込むことができる。たとえば、薬剤抵抗性、原栄養性、細胞毒性物質抵抗性、または表面タンパク質の発現などの選択可能表現型を付与する選択マーカーを用いることができる。用いることのできる選択マーカー遺伝子としては、neo、gpt、dhfr、ada、pac、hyg、およびhisdなどが挙げられる。付与された選択可能表現型は、レシピエントの一次または二次細胞の同定と単離を可能にする。

20

【0052】

選択マーカーは、ポジティブ選択可能なものとネガティブ選択可能なものの2つの範疇に分けることができる。ポジティブ選択においては、ポジティブ選択マーカーを発現する細胞は選択物質による処理に耐えることができる（neo、gpt、dhfr、ada、pac、hyg、mdr1、およびhisDなど）。ネガティブ選択においては、ネガティブ選択マーカーを発現する細胞は選択物質の存在下で破壊される（たとえばtk、gpt）。

30

【0053】

DNA構築物

外因性DNAおよび必要に応じて選択マーカーをコードするDNAをレシピエントの一次または二次細胞中での該外因性DNAの発現に必要な追加配列とともに含むDNA構築物を用いて、該コード産物を製造しようとする一次または二次細胞にトランスフェクトを受けさせる。該DNA構築物は、宿主細胞DNAとの相同組換えのためのターゲティング配列を含むこともできる。遺伝子産物をコードしない（および治療目的の産物である）外因性DNA配列を含み、さらに必要に応じて選択マーカーをコードするDNAを含むDNA構築物を用いて、一次または二次細胞にトランスフェクトを受けさせることができる。あるいは、レトロウイルス、ヘルペス、アデノウイルス、アデノウイルス関連性、オタフクカゼウイルス、ポリオウイルスベクターなどの感染性ベクターをこの目的に用いることができる。

40

【0054】

本発明の一つの態様においては、上記外因性DNAおよび該外因性DNAの発現に必要な配列などの追加配列を含むDNA構築物を用いることができる（たとえばプラスミドpXGH5またはプラスミドpXEPO1）。DNA構築物は、該外因性DNAの発現を支配

50

する誘導可能プロモーターを含むことで誘導可能発現を可能にすることができる。任意には、該DNA構築物は、細菌の複製開始点および細菌中における大規模プラスミド増殖を可能にする細菌の抗生物質抵抗性マーカーを含んでいてもよい。プロモーター、ポリアデニル化部位、およびスプライスジャンクションなどの追加配列とともに、選択マーカーをコードするDNAを含むDNA構築物を用いて、トランスフェクト一次または二次細胞に選択可能表現型を付与することができる（たとえばプラスミドpCDNEO）。該2つのDNA構築物は、本明細書で説明する方法を用いて一次または二次細胞に同時トランスフェクションされる。あるいは、外因性DNAと選択マーカーと追加配列（たとえば該外因性DNAの発現および選択マーカー遺伝子の発現に必要なもの）を含むDNA構築物を用いることもできる。このようなDNA構築物（たとえばhGH遺伝子とneo遺伝子を含むプラスミドPXGH301、またはEPO遺伝子とneo遺伝子を含むプラスミドpE3neoEPO；これらのプラスミドについては、それぞれ図3と6で説明する）。インスリノトロピンをコードする外因性DNAと追加配列（たとえばインスリノトロピン発現に必要な配列）を含む類似の構築物を製造することができる（たとえばプラスミドpXGLP1、実施例11参照）。これらの構築物は、プロモーター、ポリアデニル化部位、およびスプライスジャンクションなどその他の配列だけでなく、選択マーカーをコードするDNAも含むこともできる。

10

【0055】

DNAが筋肉への注射などによって個体に直接注射される場合、該DNA構築物は、外因性DNA、およびレシピエント細胞への該DNA構築物の進入の際にコード産物（たとえばEPO）の発現に必要なかつ十分な調節配列を含む。

20

【0056】

本発明のもう一つの態様においては、目的産物をコードする外因性DNA、相同組換えのためのターゲティング配列、および任意には1個以上の選択マーカーをコードするDNAを含むDNA構築物を用いて、相同組換えを起こさせる一次または二次細胞にトランスフェクトを受けさせる。本態様においては、外因性DNAの発現に必要なDNA配列も存在するのが普通である。遺伝子産物をコードしない外因性DNA配列を含み（および目的の産物である）、任意には選択マーカーをコードするDNAを含むDNA構築物を用いて、一次および二次細胞にトランスフェクトを受けさせることもできる。

【0057】

外因性DNA、ターゲティング配列および選択マーカーは単一のDNA構築物上または複数の構築物上にのせて細胞に導入することができる。DNA構築物の全長は成分（外因性DNA、ターゲティング配列、選択マーカー遺伝子）の数およびそれぞれの長さによって異なる。構築物の全長は少なくともヌクレオチド20個以上であるのが普通である。外因性DNAがゲノムDNAと相同組換えを起こすのに十分な相同性を有する構築物の場合、該構築物は単一の成分すなわち外因性DNAを含む。本態様においては、外因性DNAは相同性ゆえにゲノムDNA中への組み込みをターゲティングする(target integration) 役目も果たし、追加のターゲティング配列は不要である。このような構築物は、完全遺伝子、遺伝子部分、調節要素またはその一部、または除去されると調節配列と構造配列を機能的に類似させるDNA領域などの常在性DNA配列のノックアウト、置換、または修復に有用である。外因性DNAが選択マーカーである場合にも有用である。

30

40

【0058】

第3の態様においては、DNA構築物は、外因性DNAおよび通常は該外因性DNAの両端に存在する1つ以上の分散したターゲティング配列を含む。ターゲティング配列は、採取したままの細胞ゲノム中の、一次または二次細胞ゲノム中に存在するのが普通であるDNA配列である（たとえば必須遺伝子、非必須遺伝子または非コード性遺伝子、または以前の改変によってゲノム中に存在するもの）。このような構築物は、ホルモン、サイトカイン、抗原、抗体、酵素、凝固因子、輸送タンパク質、受容体、調節タンパク質、構造タンパク質、アンチセンスRNA、リボザイム、または天然には存在しないタンパク質または核酸などの治療目的の産物をコードする外因性DNAの組み込みに有用である。とくに

50

、外因性DNAは以下のもののうちの1種をコードすることができる。すなわち、因子VIIII、因子IX、エリスロポエチン、アルファ-1型アンチトリプシン、カルシトニン、グルコセレブロシダーゼ、成長ホルモン、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、アポリポタンパク質E、IL-2受容体およびその拮抗剤、インスリン、グロビン、免疫グロブリン、触媒抗体、インターロイキン、インスリン様成長因子、スーパーオキシドジスムターゼ、免疫応答物質修飾因子、副甲状腺ホルモン、インターフェロン、神経成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、およびコロニー刺激因子である。このような構築物は、トランスフェクト一次または二次細胞中のタンパク質または核酸のキレート形成に十分なDNA配列、細胞調節タンパク質に結合するDNA配列、染色体の二次構造または三次構造を変化させるDNA配列、および一次または二次細胞のゲノムDNA中の転写調節要素であるDNA配列などの治療目的の産物である外因性DNAの組み込みにも有用である。

10

【0059】

第4の態様においては、DNA構築物は、外因性DNA、ターゲティングDNA配列、および少なくとも1個の選択マーカーをコードするDNAを含む。この第4の態様においては、構築物成分の順序は、ターゲティング配列-外因性DNA-単数または複数の選択マーカーをコードするDNA-ターゲティング配列であってよい。本態様においては、1個以上の選択マーカーが構築物に含まれ、これによって選択可能表現型に基づく選択が可能となる。構築物を安定的に組み込む細胞は選択物質による処理に耐える。安定トランスフェクト細胞のサブセットはHR細胞となるであろうが、このものはPCR、サザンハイブリダイゼーション、および表現型スクリーニングをはじめとする様々な手法によって同定することができる。

20

【0060】

第5の態様においては、DNA構築物中の成分の順序はターゲティング配列-選択マーカー1-ターゲティング配列-選択マーカー2であってよい。本態様においては、選択マーカー2はネガティブ選択性を示す。すなわち、選択マーカー2の遺伝子産物は、選択マーカー2を発現する細胞を殺す物質(通常は薬物または代謝類似体)を含有する適当な培地処方における成長に対する阻害を基準として選択することができる。選択マーカー1をランキングするターゲティング配列と宿主細胞ゲノム中の相同配列の組換えは、選択マーカー1のターゲティング組み込み(targeted integration)をもたすが、選択マーカー2は組み込まれない。このような組換え事象は、選択マーカー1を安定的にトランスフェクトされているが選択マーカー2は安定的にトランスフェクトされていない細胞を生じるが、このような細胞は、選択マーカー1の成長を許す選択物質と選択マーカー2の成長を阻害する選択物質を含有する培地における成長を基準として選択することができる。

30

【0061】

DNA構築物に関するすべての態様において、外因性DNAは1個以上の産物をコードすることができるが、1個以上の治療目的の産物またはそれぞれの1個以上のものであることができるので、複数の産物を送達することが可能となる。

【0062】

一次または二次細胞のトランスフェクションおよびクローン細胞株または不均一細胞株の製造

40

本発明の方法を図4に概略的に示す。図に示すように、まず、脊椎動物の組織を得るが、これはパンチ生検その他、対象の一次細胞型の組織ソースを得る外科的方法などの公知の手順を用いて行なう。たとえば、線維芽細胞またはケラチン細胞のソースとしてパンチ生検を用いて皮膚を採取する。酵素消化または外片移植などの公知の方法を用いて一次細胞の混合物を組織から得る。酵素消化を用いる場合は、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ジスペラーゼ、プロナーゼ、トリプシン、エラスターゼ、キモトリプシンなどの酵素を用いることができる。

【0063】

生じた一次細胞混合物は直接トランスフェクトに付してもよいし、まず培養し、プレート

50

から移し、再懸濁してからトランスフェクトに付してもよい。一次細胞または二次細胞は、ゲノムに安定的に組み込ませる外因性DNAおよび任意には選択マーカーをコードするDNAと結合させ、トランスフェクトを行なうために処理する。外因性DNAと選択マーカーコードDNAはそれぞれ別の構築物（たとえばpXGH5およびpCDNEO、図1と2参照）上、または、単一の構築物（たとえばpXGH301およびpE3neoEPO、図3と図6参照）上にある。適当な量のDNAを用いて、外因性DNAを含有し正しく発現する少なくとも1個の安定トランスフェクト細胞を産生させる。一般に、0.1~500 μ gのDNAを使用する。

【0064】

本発明の方法を用いて1個の選択マーカー遺伝子だけを導入すると、原料細胞10万個あたり170個（エレクトロポレーションによって処理された588個の原料細胞のうち1個、実施例6）ないし2千個（顕微注入によって処理された49個の原料細胞のうち1個、実施例5）の安定トランスフェクト細胞ができる。本発明の方法を用いて治療目的の遺伝子と選択マーカー遺伝子を導入すると、原料細胞10万個あたり7個（エレクトロポレーションによって処理された14,705個の原料細胞のうち1個、実施例6）ないし950個（顕微注入によって処理された105個の原料細胞のうち1個、実施例5）の安定トランスフェクト細胞ができる。これらの安定トランスフェクト体のうちの43~90%が治療に遺伝子を発現する。正しく発現する細胞は1個あればよいので、原料細胞はかなり少なくてもよいことが明らかである。逆に、本発明の方法よりかなり効率の悪いトランスフェクト方法を用いると、原料細胞ソースとして大量の個体組織を使用しないか

【0065】

トランスフェクト一次または二次細胞を製造する本発明の方法の一つの態様においては、実施例で説明するようにエレクトロポレーションによってトランスフェクトが促進される。エレクトロポレーションは、単数または複数のDNA構築物の一次または二次細胞への進入をもたらすのに適した電圧とキャパシタンス（および対応する一定時間）で行なわれる。エレクトロポレーションは、広い電圧範囲（たとえば50~2000ボルト）と対応するキャパシタンスで行なうことができる。本明細書で説明するように、エレクトロポレーションは、250~300ボルトの範囲のエレクトロポレーション電圧、および960 μ ファラッドのキャパシタンスで行なう場合に非常に効率が良い。通常、合計約0.1~500 μ gのDNAを使用する。実施例で説明するように、合計60 μ gのDNA、250~300ボルトの電圧、960 μ ファラッドのキャパシタンス、14~20msecの一定時間という条件を使用すると効率がよいことが示されている。

【0066】

本発明の方法のもう一つの態様においては、顕微注入を用いて一次または二次細胞をトランスフェクトに付す。例えば実施例5参照。あるいは、リン酸カルシウム沈殿法、リン酸カルシウム沈殿法変法、ポリブレン沈殿法、リポソーム融合法、および受容体介在遺伝子送達法などの公知の方法を用いて細胞をトランスフェクトに付すことができる。安定トランスフェクト二次細胞を増殖させるとともにトランスフェクト二次細胞のクローン細胞株を生じる培養条件下で十分な時間にわたり、1個の安定トランスフェクト細胞を単離、培養、継代培養する。あるいは、複数のトランスフェクト細胞を培養、継代培養して、不均一細胞株を作成する。

【0067】

トランスフェクト一次または二次細胞は、治療目的の産物（たとえばEPO）を効果的な量で個体に提供するのに十分なサイズのクローン細胞株または不均一細胞株を産生させるのに十分な回数倍化を起こす。一般に、たとえば0.1cm²の皮膚生検標本を採取すると、10万個の細胞を含んでいると考えられる。1個の細胞を用いてクローン細胞株を作成し、約27回の倍化を起こすと1億個のトランスフェクト二次細胞ができる。約10万個の細胞から成るオリジナルのトランスフェクト集団から1個の不均一細胞株を作成する場合、1億個のトランスフェクト細胞を作成するには10回の倍化で十分である。

【 0 0 6 8 】

トランスフェクトクローン細胞株または不均一細胞株中の必要な細胞の数は変化し、様々な要素によって変わるが、その要素としては、トランスフェクト細胞の使用、トランスフェクト細胞中の外因性DNAの機能レベル、トランスフェクト細胞の移植の部位（たとえば、使用可能な細胞の数は移植の解剖学的位置によって制限される）、および患者の年齢、体表面積、および臨床状態などが挙げられるがこれらに限定されない。これらの要素を考慮にいれると、明確な成長ホルモン欠損を有する点以外は健常な60kgの患者に治療作用レベルのヒト成長ホルモンを送達するためには、約1～5億個のトランスフェクト線維芽細胞が必要である。これは、患者の親指の先端に存在する細胞の量にほぼ相当する。

【 0 0 6 9 】

外因性DNAのエピソーム発現

細胞内部に存在するがゲノムにまだ組み込まれていないDNA配列をエピソームという。組換え体エピソームは少なくとも3つの状況において有用となる場合がある。すなわち、1) 特定の細胞型が外因性DNAを安定的に組み込む能力を欠く場合、2) 特定の細胞型がDNAの組み込みによって悪影響を受ける場合、および3) 特定の細胞型が、組み込まれたDNAではなくエピソームDNAを持っていて向上した治療機能を示す能力がある場合である。

【 0 0 7 0 】

実施例で説明する遺伝子療法のトランスフェクトおよび培養アプローチを用いれば、エピソームのかたちの外因性DNAを脊椎動物の一次および二次細胞に導入することができる。エプスタイン-バールウイルスの複製開始点と核抗原のDNA配列を追加することによってプラスミドpXGH301をそのようなエピソームに変換することができる [イェーツ (Yates, J.L.), *Nature* 319:780-7883 (1985)]。あるいは、脊椎動物の自己複製配列を該構築物に導入することができる [ウェイドル (Weidle, U.H.), *Gene* 73(2):427-437(1988)]。これらおよびその他のエピソーム的に得られた配列も、選択マーカーを有さないpXGH5などのDNA構築物に含ませることができる。次いで、本願に説明するようにして該エピソーム外因性DNAを一次または二次脊椎動物細胞に導入する（選択マーカーがエピソームに含まれている場合、選択剤を用いてトランスフェクト細胞を処理する）。

【 0 0 7 1 】

トランスフェクト二次細胞のクローン細胞株または不均一細胞株の移植

上記および下記実施例において説明する方法によって製造されたトランスフェクト細胞は、治療目的の産物を送達しようとする個体に公知の方法を用いて導入される。次いで、クローン細胞株または不均一細胞株を、様々な投与経路を用いて様々な部位に（たとえば腎臓被膜下、皮下、中枢神経系（鞘内(intrathecal)を含む）、血管内、肝臓内、内臓内、腹腔内（大網内を含む）、または筋肉内移植）公知の方法を用いて個体に導入する。トランスフェクト細胞は個体に移植されると、外因性DNAによってコードされる治療目的の産物を産生するか、外因性DNA自体によって影響を受ける。たとえば、血液中に正常に見られるタンパク質である因子IXの欠損によって引き起こされる出血障害であるB型血友病であると診断された個体は、遺伝子療法治療の対象候補である。患者は微小皮膚生検を受けるが、これは外来で行なうことができる簡単な手順である。マッチの頭程の大きさの皮膚片をたとえば腕の下から採取するが、採取には約1分かかる。試料を処理すると、患者の細胞（この場合は線維芽細胞）が単離され、これに遺伝子操作を加えて、失われた因子IXを産生させる。患者の年齢、体重、および臨床状態に応じて必要数の細胞を大規模培養する。プロセス全体で4～6週を要するのが普通であり、終了時にやはり外来で、適当な数の遺伝子操作細胞を個体に導入する（たとえば患者の皮膚下に注射して戻すことによって）。この時点で、患者は自己の因子IXを産生する能力を獲得しており、もはや血友病ではなくなっている。

【 0 0 7 2 】

類似のアプローチを用いてその他の状態や疾患を治療することもできる。たとえば、ヒト

10

20

30

40

50

成長ホルモンを発現する一次または二次細胞を移植することでヒト成長ホルモンを個体に投与することによって小人症を治療することができ、EPOを発現する一次または二次細胞を移植することによって貧血を治療することができる。

【0073】

上記実施例以外にも、上記のようにして製造されたインスリノトロピンコード性DNAを含有するトランスフェクト細胞を、インスリン産生、分泌、機能および/または感受性が低下している個体に送達する。これらのトランスフェクト細胞は、公知の方法によって様々な投与部位で(たとえば腎臓、被膜下、皮下、中枢神経系(鞘内(intrathecal)を含む)、血管内、肝臓内、内臓内、腹腔内(大網内を含む)、または筋肉内移植)個体に導入される。トランスフェクト細胞は個体に移植されると、外因性DNAによってコードされるインスリノトロピンを産生する。たとえば、インスリン産生、分泌、または感受性が損なわれている個体は、本明細書で説明するようにして製造されたインスリノトロピンコード性外因性DNA発現トランスフェクト細胞の移植による療法または予防治療を受けることができる。遺伝子操作を行なう細胞は上記のようにして得、同様にして十分な数の細胞を産生するように処理され、個体に再導入される。

10

【0074】

これらの実施例が示唆するように、使用する細胞は患者特有の遺伝子操作細胞であるのが普通であるが、同種の他の個体または異種から細胞を得ることもできる。そのような細胞の使用は、移植細胞の拒絶を防ぐために免疫抑制剤の投与、組織適合性抗原の変更、またはバリアーデバイスの使用を必要とする。

20

【0075】

一つの態様においては、バリアーデバイス(barrier device)を用いて、レシピエント以外のソース(例えば別の者、又はウシ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、齧歯類等ヒト以外の哺乳類)から得た移植細胞の拒絶を防止するのに使用される。本態様においては、外因性DNAによってコードされる産物がレシピエントの循環系または組織を通過することを許すが細胞とレシピエント免疫系の接触を防止して、細胞に対するレシピエントの免疫応答(及び起こりうる拒絶)を防ぐ物質(例えばアミコンXM-50などの膜)でできたバリアーデバイスの中に、本発明のトランスフェクト細胞は置かれる。あるいは、hGH、EPO、又はインスリノトロピンをコードするDNAを例えば筋肉あるいはその他の適当な部位への直接注射法によって導入することができる。本態様においては、DNA構築物は、治療目的の産物(例えばEPO、インスリノトロピン)をコードする外因性DNA及びレシピエント細胞における外因性DNAの発現に十分な調節配列を含んでいる。個体への注射後、DNA構築物は一部のレシピエント細胞によって取り込まれる。DNAは単独で注射することもできるし、生理的に適合性のある担体(例えば生理学的緩衝液)及び任意にはDNA構築物の細胞への進入の効率を高めたり、DNAを安定化させたり、DNAを分解から守る物質等その他の成分を含む処方として注射することもできる。

30

【0076】

多くの疾患の場合、これは1回きりの治療であるが、他の疾患では頻回の遺伝子療法治療が必要となろう。

【0077】

トランスフェクト一次および二次細胞および細胞株の用途

本明細書で説明するトランスフェクト一次または二次細胞または細胞株は、酵素、ホルモン、サイトカイン、抗原、抗体、凝固因子、アンチセンスRNA、調節タンパク質、転写タンパク質、受容体、構造タンパク質、リボザイム、新規(天然には存在しない)タンパク質および核酸産物、および遺伝子操作DNA等の治療目的の産物の媒体または送達システムとしての応用範囲が広い。例えば、トランスフェクト一次または二次細胞を用いて治療作用タンパク質を提供することができ、そのようなタンパク質としては、ファクターVII、ファクターIX、エリスロポエチン、アルファ-1型アンチトリプシン、カルシトニン、グルコセレブロシダーゼ、成長ホルモン、低密度リポタンパク質(LDL)、アポリポタンパク質E、受容体IL-2受容体およびその拮抗剤、インスリン、グロビン、免

40

50

疫グロブリン類、触媒抗体、インターロイキン類、インスリン様成長因子類、スーパーオキシドジスムターゼ、免疫応答修飾物質、副甲状腺ホルモンおよびインターフェロン、神経成長因子類、組織プラスミノゲンアクチベーター類、およびコロニー刺激因子類などが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、トランスフェクト一次および二次細胞を用いて個体を免疫することができる（すなわちワクチンとして）。

【0078】

本発明の細胞株の多彩な用途は、以下に示すようにまとめると最も便利であろう。該細胞株は下記の治療目的の産物を送達する目的に用いることができる。1．主に全身作用を示す分泌タンパク質。2．主に局所作用を示す分泌タンパク質。3．新規の、または強化された細胞応答性を付与する膜タンパク質。4．毒性産物の除去を促進する膜タンパク質。5．細胞を標識化またはターゲティングする膜タンパク質。6．細胞内タンパク質。7．遺伝子発現に直接的に影響する細胞内タンパク質。8．自己消化作用を示す細胞内タンパク質。9．調節タンパク質と結合またはキレート形成する遺伝子産物 - 遺伝子操作 DNA。10．リボザイム。11．遺伝子発現を阻害するためのアンチセンス - 遺伝子操作 RNA。

10

【0079】

本発明のトランスフェクト一次または二次細胞は、現在は患者の協力としばしば医学スタッフの参加を要して静脈内、筋肉内、または皮下投与されている治療目的のタンパク質（たとえばホルモン、酵素、凝固因子）を投与するために用いることができる。トランスフェクト一次または二次細胞を用いる場合、個体に投与する前に、一般的に単離ポリペプチドを用いるときに必要なポリペプチドを高度に精製する必要はない。また、本発明のトランスフェクト一次または二次細胞は正常に産生されるのと同じように治療目的の産物を産生する。

20

【0080】

本発明のトランスフェクト一次または二次細胞を使用することの利点の一つは、個体に導入される細胞の数を調節することによって体内に送達される産物の量を調節することができることである。また、場合によっては、産物が不要になったときにトランスフェクト細胞を除去することができる。本発明のトランスフェクト一次または二次細胞を使用する治療のもう一つの利点は、亜鉛、ステロイド剤、またはタンパク質産物または核酸産物の翻訳または転写に影響を及ぼす核酸産物の安定性に影響を及ぼす物質の投与などによって、治療目的の産物の産生を調節することができることである。

30

【0081】

本発明において説明するインビボのタンパク質製造および送達システムを用いて治療目的で送達することができるその他の分子としては、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) およびグルカゴン様ペプチド1誘導体 (GLP-1誘導体) がある。GLP-1誘導体としては、トランケートされた誘導体 GLP-1 (7-37)、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-35)、GLP-1 (7-34)、およびその他のトランケートされたカルボキシ末端アミド化誘導体、ならびにトランケートされた GLP-1誘導体のものと実質的に同じ生物活性または血中安定性、または強化された (トランケートされた GLP-1誘導体のものより大きい) 生物活性または血中安定性をもたらすアミノ酸置換、欠失、付加、またはその他の変化 (たとえば非アミノ酸成分の付加) を有する GLP-1誘導体などが挙げられる。本明細書で使用する場合、GLP-1誘導体という用語は上記分子すべてを含む。本明細書で使用する場合、GLP-1関連ペプチドという用語は GLP-1 と GLP-1誘導体を含む。GLP-1誘導体はインスリノトロピンまたはインクレチンとも呼ばれ、胃腸管細胞によって正常に循環系に分泌される。インビボの研究で、これらのペプチドは内分泌臓からのインスリン分泌を刺激しグルカゴン分泌を阻害するとともに末梢組織中のインスリン感受性を増大させる機能を果たすことが明らかにされている [ゴーケラ (Goike, R. *et al.*) (1991) *Eur. J. Clin. Inv.* 21:135-144; ゲートニアクラ (Gutniak, M. *etal.*) (1992) *New Engl. J. Med.* 326:1316-1322]。インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) 患者は、低下したインスリン感受性を補うために高レベルのイン

40

50

スリンで治療されることが多い。したがって、G L P - 1 誘導体によるインスリン放出の刺激とインスリン感受性の増大はN I D D M患者にとって利益となるであろう。インスリン分泌のインスリノトロピン誘導刺激は血糖値に強く依存するという事実はとくに重要であり、これらのペプチドはインピボにおける血糖値上昇に反応してインスリン放出を刺激し、最終的には血糖値を下げる作用を示すことが示唆される。

【 0 0 8 2 】

相同組換えによる遺伝子の調節配列の置換

本明細書で説明するように、遺伝子ターゲティングを用いて、異なる遺伝子から単離した調節配列、または遺伝子工学的方法を用いて合成した新規調節配列で遺伝子の既存の調節領域を置換することができる。このような調節配列は、プロモーター、エンハンサー、骨格付着領域、ネガティブ調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位、またはこれら配列を組み合わせたものから成るものであってよい。(あるいは、産生されるRNAまたはタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列は、ターゲティングによって置換、除去、付加、またはその他の改変を加えることができ、そのような配列としては、ポリアデニル化部位、mRNA安定性要素、スプライス部位、タンパク質の輸送または分泌特性を強化または変化させるためのリーダー配列、またはタンパク質またはRNA分子の機能または安定性を変化または向上させるその他の配列などが挙げられる。)

【 0 0 8 3 】

いくつかの態様が可能である。まず、ターゲティング事象は、調節配列の単純挿入によって遺伝子を新しい調節配列の支配下におくものであってよい(たとえば新規プロモーターまたはエンハンサーまたはその両者を遺伝子の上流に挿入する)。次に、ターゲティング事象は、組織特異性ネガティブ調節要素の欠失など調節要素の単純欠失であってよい。第3に、ターゲティング事象は、既存の要素を置換するものであってよく、たとえば組織特異性エンハンサーを天然に存在する要素より広い異なる細胞型特異性を有するエンハンサーで置換することができる。本態様においては、天然に存在する配列が失われ、新規配列が付加される。いずれの場合も、ターゲティングDNAと近接の1個以上の選択マーカー遺伝子を使用することで外因性DNAが宿主細胞ゲノムに組み込まれている細胞の選択を可能にすることによって、ターゲティング事象の判定が促進される。ターゲティングの判定は、ネガティブ選択マーカーが外因性DNAに連結されるがネガティブ選択マーカーがターゲティング配列をフランキングするような、そして宿主細胞ゲノム中の配列との正しい相同組換え事象がネガティブ選択マーカーの安定組み込みをもたらさないような、ネガティブ選択性を示す1個以上のマーカー遺伝子を使用することによっても促進される。この目的に有用なマーカーとしては、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ(TK)遺伝子または細菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子などが挙げられる。

【 0 0 8 4 】

以下実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されない。

【 0 0 8 5 】

【実施例】

実施例1．線維芽細胞の単離

a．線維芽細胞の起源

ヒトの線維芽細胞は、肝臓、腎臓、肺、皮膚由来の生検試料を含めて、様々な組織から得ることができる。ここに示されている方法は皮膚の線維芽細胞を単離するために最適化されたもので、最小限度の不快感と危険で様々な年齢の個体から容易に得られる(胚および胎児の線維芽細胞はこの方法を用いて同様に単離できるかも知れない)。他の組織から線維芽細胞を単離したいときはこの方法を多少変更する必要があるかも知れない。

【 0 0 8 6 】

ヒトの皮膚は環状切除あるいはパンチ生検により得られる。その試料は三つの主要な成分から成っている。それは皮膚そのものの表皮および真皮の層、および真皮の層に付着した筋膜の層である。線維芽細胞は真皮および筋膜の両方から単離することが可能である。

【0087】

b. ヒトの筋膜線維芽細胞の単離

およそ 3 cm^2 の組織をおよそ 10 ml の洗浄溶液 ($100\text{ units/ml penicillin G}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/ml streptomycin sulfate}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{g/ml Fungisone}$ を含む Hank's Balanced Salt 溶液) の中へ入れ室温で10分間、計3回緩やかに攪拌した。組織を次に 10 ml の消化溶液 ($0.1\text{ units/ml collagenase A}$ 、 $2.4\text{ units/ml grade II Dispase}$ を含んだ洗浄溶液) を入れた 100 mm 組織培養皿に移した。

【0088】

解剖顕微鏡の元に、皮膚を表皮が裏側になるようにする。筋膜細胞は切り裂く事 (blunt dissection) により真皮や表皮から分離される。筋膜組織は次に小さい断片 (1 mm 未満) に切断され、回転台の上で 37°C で30分間インキュベートされる。酵素/細胞懸濁液は取り除かれ、保存される。そして 10 cc の消化液を残った組織の断片にさらに加え、その組織は30分間 37°C で再インキュベートされる。酵素/細胞懸濁液はプールされ、15ゲージの針に数回通し、150メッシュスクリーンを装備した Collector Sieve (Sigma) に通す。細胞懸濁液を 1100 rpm 、15分間、室温で遠心分離する。上清は吸引され、ばらばらにされた細胞を 10 ml の栄養培地 (以下を参照) に再懸濁した。線維芽細胞の培養は、細胞培養処理用フラスコ (Corning) の上でおよそ $40,000\text{ cells/cm}^2$ の濃度で開始された。

【0089】

c. ヒト真皮線維芽細胞の単離

筋膜は上述したように皮膚生検あるいは環状切除試料から遊離される。そして、皮膚は 0.5 cm^2 未満の小さな断片に切断される。組織を 0.25% トリプシンで60分間、 37°C でインキュベートする (あるいは、組織をトリプシンで18時間、 4°C でインキュベートしてもよい)。解剖顕微鏡下で、真皮と表皮を分離する。真皮の線維芽細胞は、筋膜の線維芽細胞について以前に記述されたように単離される。

【0090】

d. ウサギの線維芽細胞の単離

方法は基本的に以前に記述されたとおりである。皮膚は、剃って、承認された方法で外科的に調整された殺菌溶液を用いて洗浄された領域から取られるべきである。

【0091】

実施例 2 . 線維芽細胞の培養

a. ヒトの線維芽細胞の培養

融合性 (confluent) であるとき、最初のカルチャーは通常の方法でトリプシン処理され、およそ $10,000\text{ cells/cm}^2$ になるように蒔かれる。細胞を 5% CO_2 を含む湿らせた空気のもと 37°C で培養する。ヒト線維芽細胞栄養培地 (DMEM 、 sodium pyruvate を含む高 glucose 、 $10\text{ - }15\%$ 子牛血清、 20 mM HEPES 、 20 mM L-glutamine 、 $50\text{ units/ml penicillin G}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/ml streptomycin sulfate}$ を含んでいる) は1週間に2度交換する。

【0092】

b. ウサギ線維芽細胞の培養

細胞はトリプシン処理され、ヒト線維芽細胞について記述されているように培養する。ウサギ線維芽細胞栄養培地は 20% 子牛血清を含む MCDB - 110 (Sigma) と調節された培地の $1:1$ 溶液で構成されている。調節された培地とは基本的に、2 - 3日集合培養で生育したウサギ線維芽細胞から取り除かれたヒト線維芽細胞栄養培地 (15% 子牛血清を含む) である。

【0093】

実施例 3 . ヒト成長ホルモンおよびネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド (pXGH 301) の構築

10

20

30

40

50

p X G H 301 は二段階の方法で構築された。p B R 322 由来の S a I I - C l a I 断片 (p B R 322 の 23-651 の位置) が単離され、そして S a I I - C l a I 処理 p c D N E O の中へ挿入され、その結果 p c D N E O の S V 40 初期プロモーター領域の上流に B a m H I 部位が導入された。このプラスミド、p B N E O を BamHI で消化し、S V 40 の初期プロモーターの支配下にある neo 遺伝子を含む 2.1 k b の断片が単離され、B a m H I で処理された p X G H 5 に挿入された。neo と h G H 遺伝子はお互いに同じ方向に転写される、2.1 k b B a m H I 断片の単一の挿入を持つプラスミドが単離された。このプラスミドは p X G H 301 と命名された (図 3)。

【 0 0 9 4 】

実施例 4 . マウスメタロチオネインプロモーターの支配下にあるヒトエリスロポエチン遺伝子を含むプラスミド (p X E P O 1) の構築

発現プラスミド p X E P O 1 はマウスメタロチオネイン (m M T) プロモーターにより転写を制御されている h E P O 遺伝子を持っている。p X E P O 1 は次のように構築される。プラスミド p U C 19 (A T C C # 37254) は K p n I および B a m H I により処理され、マウスメタロチオネインプロモーター [Hamer, D. H. and Walling, M., J. Mol. Appl. Gen., 1:273-288 (1982)。この断片はまた、ジーンバンクにより利用可能な m M T の配列、即ち、M U S M T I、M U S M T I P、M U S M T I P R M の解析からデザインされた P C R プライマーを用いて、マウスゲノム DNA より単離することが可能である。] を含む 0.7 k b の K p n I - B g l I I 断片にライゲーションされた。結果として得られたクローンは p X Q M 2 と呼ぶ。

【 0 0 9 5 】

h E P O 遺伝子は完全な h E P O 遺伝子を持ったバクテリオファージ のクローンから単離された。このバクテリオファージは、ヒト S a u 3 A、つまり 0.77 k b のヒト遺伝子を持つ ベクター L A M B D A D A S H の中に構築された部分的なゲノム DNA ライブラリー (S t r a t a g e n e) をスクリーニングすることにより単離された。この 0.77 k b の断片は以下に示されたプライマーを用いてポリメラーゼチェーンリアクション (P C R) によりヒトゲノム DNA から増幅された。

【 0 0 9 6 】

ヒト E P O P C R プライマー :

オリゴ h E P O - 1 : 5 ' G T T T G C T C A G C T T G G T G C T T G (S E Q I D N O 1) (ジーンバンクの H U M E R P A 配列の 2214 - 2234 の位置)

【 0 0 9 7 】

オリゴ h E P O - 2 : 5 ' T C A A G T T G G C C C T G T G A C A T (S E Q I D N O 2) (ジーンバンクの H U M E R P A 配列の 2986 - 2967 の位置)

【 0 0 9 8 】

増幅された断片、これはヒト E P O 遺伝子のエキソン 4 および 5 を含んでいるが、放射標識され、そしてヒトゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングするために用いられた。完全なヒト E P O 遺伝子を含む 5.4 k b の H i n d I I I - B a m H I 断片を持つファージは、公表された DNA 配列および制限酵素マッピングデータ [Lin, F-K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7580-7584 (1985)] に基づいて完全な遺伝子を含んでいると仮定された。

【 0 0 9 9 】

4.8 k b の B s t E I I - B a m H I 断片 (B s t E I I 部位はジーンバンク H U M E R P A の配列の 580 の位置であり、B a m H I 部位はこの部位の 4.8 k b 3' 側の位置にあり、シーケンスされた領域の外側にある) はバクテリオファージのクローンから単離された。精製された断片は大腸菌 DNA ポリメラーゼのクレノー断片で処理して平滑末端化され、H i n c I I で処理された p X Q M 2 へライゲーションされ、サブクローニングされた m M T プロモーターの 3' 側に近接した p U C 19 に由来するポリリンカーに切り込む。取り除かれた B s t E I I 部位が m M T プロモーターに隣接している、一つの配向性が制限酵素地図で同定され、p X E P O 1 (図 5) と命名された。

10

20

30

40

50

【0100】

実施例5．顕微注入による一次ヒト線維芽細胞の安定なトランスフェクション

細胞の核へのDNAの直接的な注入は、細胞を安定にトランスフェクトするための別の方法である。一次および二次ヒト包皮線維芽細胞がこの方法により安定にトランスフェクトされる可能性については既に報告されている。プラスミドRV6.9 h (Zheng, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:18 8067-8071 (1991))由来の8 kb HindIII断片はゲル電気泳動および陰イオン交換カラム(QIAGEN Inc.)を通す事により精製された。(10 μg/ml)のDNAを外径0.1 μmのガラス針を用いて一次あるいは二次ヒト包皮線維芽細胞に注入した。2,000細胞への注入の後、41個のG418^rのクローンが単離された(49の出発細胞中1個)。

10

【0101】

hGH発現クローンもまた、顕微注入によって作成された。プラスミドpXGH301はScal処理(pUC12骨格の中のamp^r遺伝子に1回切れ込みを入れる)により直線化され、陰イオン交換カラム(QIAGEN Inc.)を通すことにより精製され、外径0.1 μmのガラス針を用いて一次あるいは二次ヒト包皮線維芽細胞に注入された。2.5-20 μg pXGH301/mlの範囲で幾つかのDNA濃度が用いられた。2,100細胞への顕微注入の後、20個のG418耐性クローンが単離された(105の出発細胞中1個)。G418細胞の画分は、処理された全ての細胞のおよそ1%である。解析された10クローンの内の9個はhGHを発現した。この実験で単離されたクローンのhGH発現の平均値は0.6 μg/10 cells/24hrであり、3つのクローンはhGHの長期的な発現を研究するために拡大された。3つのクローンすべてhGHを安定に発現しており、hGHは3つの株に対してそれぞれ33、44および73mpdで常に生産されている。

20

【0102】

上述された方法を用いて、例えばpE3neoEPOのような他のDNA構築物を持つ一次ヒト線維芽細胞の安定なトランスフェクションが得られるかも知れない。

【0103】

実施例6．外因性DNAおよび選択マーカー遺伝子による一次および二次線維芽細胞のエレクトロポレーションを用いたトランスフェクション

対数増殖期あるいは初期定常期の線維芽細胞はトリプシナイズされ、栄養培地を用いてプラスチック表面から洗い流された。一定量の細胞懸濁液はカウントするために取り除かれる、そして、残りの細胞は遠心分離される。上清は吸引され、ペレットは5 mlのエレクトロポレーションバッファー(20 mM HEPES pH 7.3, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 6 mM dextrose)に再懸濁される。細胞は再び遠心分離され、上清は吸引され、細胞は1 mg/ml アセチル化ウシ血清アルブミンを含むエレクトロポレーションバッファーに再懸濁される。最終的な細胞懸濁液はおよそ3 × 10⁶ cells/mlの細胞を含んでいる。エレクトロポレーションは再懸濁後すぐに行われるべきである。

30

【0104】

スーパーコイル状のプラスミドDNAは0.4 cmの電極のギャップを持った滅菌したキュベット(Bio-Rad)に入れられる。最終DNA濃度は一般に少なくとも120 μg/mlである。0.5 mlの細胞懸濁液(およそ1.5 × 10⁶細胞を含んでいる)をその後キュベットに加え、細胞懸濁液とDNA溶液とを緩やかに混合する。エレクトロポレーションはGene-Pulser装置(Bio-Rad)を用いて行われる。キャパシタンスおよび電圧はそれぞれ960 μF (Farads)および250-300 Vに設定される。電圧が上昇すると、細胞の生存数が減少するが、ゲノムの中に導入されたDNAが安定に組み込まれている生存細胞のパーセンテージが劇的に上昇する。これらのパラメーターが与えられると、およそ14-20 msecのパルス時間が観察されるだろう。

40

【0105】

エレクトロポレーションされた細胞はおよそ5分間室温でインキュベートされ、そしてキュベットの内容物はその後滅菌されたトランスファーピペットで緩やかに取り除かれる

50

。細胞は10cmの皿の中の10mlのあらかじめ暖められた栄養培地（上記のように15%の子牛血清を含んでいる）に直接加えられる。そして上述のように培養される。その翌日、培地は吸引され、そして10mlの新鮮な培地と交換され、さらに16-24時間培養される。その翌日、クローニング効率およびG418耐性コロニーを選別するために細胞のサブカルチャーが行われる。細胞はトリプシン処理され、カウントされ、そして平板培養される。特に、線維芽細胞はクローニング効率の決定のためには 10^3 cells / 10cm dishで培養し、G418選択のためには $1-2 \times 10^4$ cells / 10cm dishで培養する。

【0106】

ヒト線維芽細胞は線維芽細胞栄養培地（15%子牛血清を含む）の中に300-400 μ g/mlのG418（およそ50%の効力を示すGeneticin, disulfate salt ; Gibco）を含む培地でG418耐性の選択をする。クローニング効率はG418の非存在下で確かめられた。培養された細胞は12-14日間インキュベートされる。そしてその時細胞はホルマリンで固定され、crystal violetで染色され、カウントされ（クローニング効率プレート）あるいはクローニングシリンダーを用いて単離される（G418プレート）。ウサギ線維芽細胞のエレクトロポレーションおよび選択は選択条件を除いてヒト線維芽細胞について記述されたのと基本的に同じように行われる。ウサギ線維芽細胞は1mg/mlのG418を含む培地で選択される。

【0107】

線維芽細胞は新鮮な切除されたヒト包皮から単離された。カルチャーはDMEM + 10%子牛血清の中に50,000 cells/cmになるように蒔かれた。カルチャーが融合性(confluent)になったとき、線維芽細胞はトリプシン処理することにより集められ、エレクトロポレーションによりトランスフェクトされた。トランスフェクト条件はプラスミドpcDNE Dを用いたトランスフェクションにより評価された。ほぼ最適な条件（エレクトロポレーション電圧が250ボルトでキャパシタンスが960 μ F (Farads)でプラスミドpcDNE Oが60 μ g)での典型的なエレクトロポレーション実験の結果、処理細胞588個につきG418コロニー1個（全ての処理細胞のうち0.17%）、あるいは71のクローン化可能な細胞につきG418コロニー1個が得られた(1.4%)。

【0108】

9回の別々のエレクトロポレーション実験が至適条件付近（エレクトロポレーション電圧が300ボルトでキャパシタンスが960 μ Fの設定においてプラスミドpcDneoが60 μ g)で行われ、平均して、1,899個の処理細胞につき一つのG418コロニーが観察され(0.05%)、これは、処理細胞の1/882から1/7,500の範囲であった。これは平均して、38個のクローン化可能細胞あたり一つのG418コロニーに相当する(2.6%)。

【0109】

低いパッセージ(low passage)の一次ヒト線維芽細胞をプラスミドpcDNE OおよびpXGH5を用いたコトランスフェクションによりhGH発現細胞へ変換した。典型的には、二つのプラスミドの等モル数の混合液60 μ gが至適条件（エレクトロポレーション電圧300ボルト、キャパシタンス960 μ Farads)付近でトランスフェクトされた。このような実験の結果、処理細胞14,705につきG418コロニーは一つであった。

【0110】

これらおよび同一のトランスフェクション条件で単離された他の細胞についてのhGH発現データは以下に要約されている。最終的に全G418^rコロニーの98%が集団培養するために広げることが可能であった。

【0111】

解析されたG418 ^r コロニーの数	154
G418 ^r / hGH発現コロニーの数	65
hGH発現の平均レベル	2.3 μ ghGH / 10^6 Cells / 24hr
hGH発現の最大レベル	23.0 μ ghGH / 10^6 Cells / 24hr

【0112】

安定なトランスフェクタントはまた、neoおよびhGH遺伝子が同一のプラスミド分子

10

20

30

40

50

(実施例3)に存在しているDNA構築物である、pXGH301を用いた一次又は二次ヒト線維芽細胞のエレクトロポレーションにより作製されている。例えば、 1.5×10^6 細胞が60 μ gのpXGH301を用いて300ボルト、960 μ Faradsでエレクトロポレーションされた。G418耐性コロニーはトランスフェクトされた二次線維芽細胞から単離され、その頻度は 1.5×10 個の処理細胞のうちG418耐性コロニーが652であった(2299処理細胞につき1個)。これらのコロニーのおよそ59%がhGHを発現した。

【0113】

実施例7. 選択が存在しない状態でのトランスフェクタントの単離

プラスミドpXGH5を用いた一次線維芽細胞の安定なトランスフェクションは、レシピエント線維芽細胞が周囲の培地中にヒト成長ホルモン(hGH)を分泌できるようにする。したがってhGH(あるいは他の発現蛋白質)に対するラジオイムノアッセイは、選択マーカーと選択試薬の使用に代わる単純かつ迅速なトランスフェクタント検索法として用いる事ができる。加えて遺伝子の発現を全く必要としないPCRのような検索法を用いることにより外来DNAの安定な組み込みの真の頻度を決定する事も可能であろう。

【0114】

以下に述べる実験結果より、コトランスフェクトさせた(cotransfected)プラスミドによる選択なしで安定にhGHを発現するトランスフェクタントを、実際に分離できることが示された。これらの実験は一次ヒト包皮線維芽細胞および一次ウサギ皮膚線維芽細胞で成功している。安定な発現トランスフェクタントの頻度は約10コロニーに一つであった。

【0115】

1. ヒト包皮組織

新たに組織から分離された約 2.0×10^6 個の細胞は300V、960 μ Faradsの条件で60 μ gのpXGH5を用いてエレクトロポレートした。細胞は温めておいた10mlの培地を含む100mm組織培養皿にすばやく蒔き、加湿した5%CO₂大気中37で培養した。トランスフェクション2日後に 5×10^3 個の細胞を24穴クロニングプレート(Bellco Glass Co.)で継代培養した。24穴プレートのそれぞれの穴は16の、より小さな穴を含んでいる(384穴/プレート)。8日後、大きい24穴中10穴についてラジオイムノアッセイによりhGHの発現を検索した。10穴全てが有意なhGH発現を示した。培地を吸引し新しい培地に交換し、24時間後にhGHを測定した。10穴ともすべて、hGHを再び発現していた。この時点で10穴それぞれのコロニー数をカウントした。大きな穴あたり平均11.5コロニーであった。もし、1穴あたり最低1個の安定なトランスフェクタントがあるとすれば、トランスフェクション頻度の最下限はクロニング可能(clonable)細胞の約8~9%と計算できる。

【0116】

大きい穴の中の小さな16穴それぞれの個々のコロニーはトリプシン処理され、96穴プレートの16穴に移された。3日後にそれぞれの穴でhGH発現を測定した。16穴のうちの一つは、hGHを発現している細胞を含んでいることが分かった。この穴の細胞を培地に広げた。これらの細胞、HF26-19Mは42mpdまで培養後、260ng/10⁶cells/24hrのhGHを生産した。

【0117】

上記の実験は他の一次ヒト包皮線維芽細胞培養物を用いてくりかえされた。この実験からhGHを発現する二次クローンが単離された。24mpdまで培養後、この細胞HF24-GH1は、60ng hGH/10cells/24hrのhGHを生産した。hGH生産は細胞が45mpdになるまで続け、その時点で細胞を凍結した。トランスフェクション頻度の下限は最初の実験とほぼ同じ(クロニング可能(clonable)細胞の6~7%)であった。

【0118】

2. 一次ウサギ線維芽細胞

一次ウサギ皮膚細胞はpXGH5でトランスフェクトされた。エレクトロポレーションの条件は上記のヒト組織エレクトロポレーションに従った。1 $\times 10^3$ 個の細胞を384穴プレート中で継代培養した。七日後、大きい24穴中10穴についてhGHの測定を

10

20

30

40

50

行った。10穴中9穴でhGHが発現されていた。これらのうちのひとつを選んでコロニーを単離した。この穴は小さい16穴に分散した9コロニーを含んでいた。小さな16穴それぞれに入っている細胞をトリプシン処理し、96穴プレートの16穴に移した。引き続いてのhGH測定では、16穴中の1つでhGHが発現していることが示された。このクローンを培地に広げた。hGHの生産は35mpdまで培養後で58ng/10cells/24hrであった。この実験で算出されるトランスフェクト頻度は総計9コロニー中、hGH発現が1コロニーであった(11%)。

【0119】

実施例8. トランスフェクト一次ヒト皮膚線維芽細胞由来の細胞株による長期間 in vitro hGH生産

線維芽細胞は、新たに切除されたヒト皮膚線維芽細胞から単離し、10%の仔牛血清を含むDMEM中で培養した。pcDNEO及びpXGH5の等モル混合物60μgでエレクトロポレーション〔250V, 960μF (Farads)〕を行い、処理された細胞はG418を含む(300μg/ml)培地中で選択した。コロニーは単離され、常法に従い広げ、得られた一次細胞株は、培養中の時間の関数としてのhGH発現の安定性をモニターするため、繰り返し継代培養した。そういった2つの種、HF96-11及びHF96-23から得られたデータを図9に示した。細胞は10%の仔牛血清を含むDMEM中、低レベルのG418(75μg/ml)で保持し、接種密度10000cells/cm²で継代培養した。培養液は細胞の植え継ぎ(passaging)のための採取に先立つこと24hrで交換した。植え継ぎ時には培養液の適量をhGH測定のために除去し、それから細胞を回収し、計数し、再び接種した。培地中のhGH濃度は市販されるイムノアッセイを用いて測定した。hGHレベル(μg/10⁶cells/24hrで示した)は9~28代の種々の培養継代数に対してプロットした。これらのアッセイの結果は、この長期にわたるin vitro培養期間(例えば、2つの異なる株から得られたデータは、HF96-11が第28代で69mpdに達し、一方でHF96-23が第27代で76mpdに達していることを示している)を通して、hGH発現が著しく一定に保持されることを示している。

【0120】

実施例9. トランスフェクトされた一次及び二次ウサギ皮膚線維芽細胞から得られた細胞株による長期間 in vitro hGH生産

線維芽細胞は新たに切除されたウサギ皮膚から単離し、10%の仔牛血清を含むDMEMで培養した。pcDNEO及びpXGH5の等モル混合物60μgでエレクトロポレーション(250V, 960μF)を行い、処理された細胞はG418を含む(1mg/ml)培地中で選択した。コロニーはクローニングシリンダーを用いて単離され常法に従い広げ、得られた一次細胞株は、培養中の時間の関数としてのhGH発現の安定性をモニターするため、繰り返し継代培養した。そのようなうちの一種、RF40/1-3から得られたデータを図10に示した。RF40/1-3細胞は選択不在でウサギ線維芽細胞栄養培地中で保持され、接種密度10000cells/cm²で継代培養した。培養液は細胞の継代培養のための回収に先立つこと24hrで交換した。継代時には培養液の一定量をhGH測定のために除去し、それから細胞を回収し、計数し、再び接種した。培地中のhGH濃度は市販されているイムノアッセイ(Nichols institute)を用いて測定した。hGHレベル(μg/10⁶cells/24hrで示した)はそれぞれおよそ28~84の培養平均倍加(mpd)レベルにあたる4、8、10、13、16、19、22代の培養継代数に対してプロットした。これらのアッセイの結果は、この長期にわたるin vitro培養期間を通して、hGH発現が著しく一定に保持されており、実質的に約20mpdで観測されるレベル(47μg/10⁶cells/24hr)に等しい。

【0121】

実施例10. マウスにおけるヒト成長ホルモンの長期発現

ヌードマウスは、遺伝子工学的な操作を受けた細胞の組織移植が治療上有益なタンパク質

10

20

30

40

50

を動物の体循環に送達する能力を研究するうえで貴重な系をもたらしている。これらの動物は、他に比べて免疫不能 (immune-incompetence) であるのである種の一次及び二次ウサギ線維芽細胞を長期にわたって *in vivo* で生存させ得ると考えられている。

【0122】

腎下部皮膜への細胞の移植のためにマウスは Avertin (2% w/v 2,2,2-トリプロモエタノール、2% v/v 2-メチル、2-ブタノールの溶液) を 0.017 ml/g 体重の割合で腹腔注射される。腎臓 (一般には左腎臓) は肋骨の下約 3 mm につくられた 8 ~ 10 mm の切開部を通して操作する。皮膚、腹筋、腹膜及び腎側筋膜を腎臓を露出させるために後退 (retract) させた。小さな鉗子を用いて腎臓を腹腔から取り出す。27ゲージの皮下注射針が腎皮膜に小さな開口部を作るのに用いられる。20ゲージの I.V. カテーテルを用いて移植されるべき細胞 (一般に 5 ~ 10 μ l の容積中に 300 万個の細胞) は 1 ml シリンジに吸い込まれ、腎皮膜の下にゆっくりと注入される。細胞がその腎被膜の開口部から遠くへ放出されるように注意する。切開部はステープル一つで筋肉及び皮膚を通して縫合される。軽麻酔がかかるまでメトキシフランをいれた大きなビーカーにネズミをいれた後、血を採取した。眼窩腔から血液を採取するためにパストゥールピペットの先端を眼と眼窩周辺部位の間に入れた。血清の hGH レベルは市販されているキット (Nichol's Institute) を用いて測定した。

10

【0123】

我々の最初の実験では、500 万個のトランスフェクトウサギ線維芽細胞 (RF20-11) をヌードマウスに移植した。このマウスは一年間、その血清中に検出可能な hGH を示していた。発現の経時変化を以下に示す。

20

【0124】

月	1	2	3	4	6	12
血清 hGH (ng/ml)	0.7	0.7	0.8	0.6	0.7	0.6

【0125】

さらにマウスに 96 μ g / 10 cells / 24 hr を発現するウサギ線維芽細胞株 (RF40/1-3) を移植したより大規模な実験が行われた。この実験の結果は図 11 に示す。バーは標準誤差を示し、N はそれぞれの時点で採取されたマウスを示している。これらの結果から、平均血清 hGH レベルが 14 カ月以上も比較的一定を保っており、移植以来平均 1 ~ 3 ng / ml であることが示される。この期間中に渡って移植細胞に起因するどのようなタイプの副作用も観測されなかった。

30

【0126】

実施例 11. 腎下部被膜移植組織由来の hGH 生産細胞の再培養

移植細胞の生存能力のストリンジェント (stringent) テストは、動物から切除して *in vitro* で再培養した際に、生育し、移植前の性質を示す能力とした。24.5 μ g / 10⁶ cells / 24 hr を発現する RF40/1-3 細胞 (3 \times 10⁶ cells / マウス) をヌードマウスの腎下部被膜の下に移植した。これらの細胞は移植前に培地中で 49 mpd を示していた。 *in vivo* で 5 又は 10 週間経過後、動物を屠殺し腎臓を回収し、移植組織近傍の細胞 (腎臓表面で明白に見える) を顕微切除した。得られた組織をスケールダウンした標準的な酵素的細胞分散法 (実施例 6) にかけて、単一細胞懸濁物 (single cell suspension) を G418 を含む培地にいれた。細胞培養のデータは移植後 5 週のマウス由来の再培養組織 5 つと移植後 10 週のマウス由来の再培養組織 4 つから得られた。回収された細胞は培地中で 19 mpd まで増殖させ、そして hGH レベルを、培地に移した後約 10 日から約 50 日間の範囲の様々の時点で分析した。これらの実験結果を図 12 に示した。図 12 のそれぞれの点は少なくとも独立した 4 つの回収 (recovery) 試験の平均 (標準偏差を含む) を示している。5 週および 10 週の移植組織の両者の実験において、hGH を高レベルで発現する G418^r 細胞が回収され、hGH 発現は *in vitro* での 19 回の回収後の倍加の間に渡って比較的安定であった。

40

【0127】

50

実施例 12 . トランスフェクトされた自己由来細胞を移植したウサギでのヒト成長ホルモンの発現と高力価の抗 h G H 抗血清の生産

自己移植遺伝子治療実施のためのすべての技術的・論理的要求を探求する実験がウサギで行われている。最初に皮膚生検資料を 8 匹の生きているウサギから採取する。皮膚線維芽細胞を単離して一次培養した。i n v i t r o で一継代後、p X G H 3 0 1 または p X G H 5 と p c D N E O でトランスフェクトした。G 4 1 8 耐性クローンを単離し h G H 発現について分析した。1 0 μ g / 1 0⁶ c e l l s / 日より大を発現するクローンをローラーボトルに広げた。最終的に各クローンの細胞をローラーボトルから回収し、皮膚生検のドナーとして用いられた同一のウサギに S R C 細胞移植または I P 注入するために調製した。

10

【 0 1 2 8 】

ウサギ皮膚線維芽細胞を単離するため、沈静に達するまでウサギに塩酸ケタミン (5 0 m g / k g 体重) および塩酸キシラジン (5 m g / k g 体重) の筋肉内注射により麻酔をかける。動物は一部、例えば右骨盤関節上部などを刈り込み、常法を用いて外科手術の準備をする。卵形のパッチを作るように背部と腹部でつながる 2 つの弓形の切開部を約 3 c m 離して作る。鋸歯状鉗子を用いて表皮を除去し、小鋏でその下の筋膜を除去する。表皮と筋膜を培地中に移し、切開部を 3 - 0 ナイロン縫合糸で縫合する。ウサギは回復のため温床上に移す。筋膜線維芽細胞は、実施例 1、2 及び 4 で述べるように、培養、トランスフェクトされ、選択される。

【 0 1 2 9 】

腎被膜内へ細胞を移植するため、上記の通りにウサギに麻酔する。動物は右側面の横臥位に置き、左肋骨下側を露出させる。動物は剃られ、承認された方法に従って準備をした。1 2 番目の肋骨の下約 2 c m の所の背腹部の 6 c m の切開部を通して左腎臓に到達した。切開部を腹筋、腹膜、腎周囲の脂肪・筋膜まで貫通させる。バルフォア開創器を用いて腹部切開口を保持し、腎周囲の脂肪と筋膜の切除を行なう。1 1 ゲージの手術刀を用いて腎臓被膜表面に 2 ~ 3 m m の切開口を作る。2 0 ゲージの I . V . カテーテルを用いて移植細胞 (一般に 1 6 5 ~ 6 6 0 μ l 中に 1 ~ 2 億個の細胞) を 1 m l シリンジにいれ、ゆっくりと腎被膜下部に注入する。腎被膜の開口部から遠位に細胞が放出されるように注意する。腹膜口は 3 - 0 可吸着性クロミック縫合糸 (adsorbable chromic gut) を用いて腹膜および腹筋を縫合して閉じる。皮膚は 3 - 0 ナイロン縫合糸と滅菌ガーゼ絆創膏で縫合し、

20

30

【 0 1 3 0 】

h G H 発現レベルおよび動物に導入した細胞数についての関連情報を表 1 にまとめる。8 匹すべての動物で血清 h G H レベルが容易に検出可能であった。1 4 日目までにどの動物の h G H も検出されなくなった。これらの動物血清中からの最終的な h G H の消失は予期されていた、というのはヒト成長ホルモンはウサギにとって抗原となることが知られているからである。したがって血清サンプルは抗 h G H 抗体についてアッセイした (抗ウサギ I g G の E L I S A によって定量される) 。それぞれの場合において、血清 h G H レベルの減少は抗 h G H 抗体の増加に一致している。

40

【 0 1 3 1 】

【 表 1 】

表 1

hGH発現線維芽細胞のウサギへの自己移植

実験/ ウサギ	細胞数 ($\times 10^6$)	移植部位	インビトロ発現
TKR5	120	SRC	14.0
TKR6	160	SRC	9.9
TKR10	120	SRC	8.0
TKR13	127	SRC	2.8
TKR9	900	IP	8.0
TKR11	1089	IP	0.7
TKR12	840	IP	3.6
TKR14	726	IP	6.7

10

実験/ ウサギ	血清hGH (ng/ml)					
	1日目	2日目	4日目	7日目	10日目	14日目
TKR5	1.9	0.8	0.3	0.9	<0.1	<0.1
TKR6	7.4	3.1	0.7	0.6	0.2	<0.1
TKR10	4.7	1.4	0.3	<0.1	<0.1	<0.1
TKR13	0.6	0.6	0.2	0.2	0.5	<0.1
TKR9	34.5	3.4	0.9	0.8	<0.1	<0.1
TKR11	3.6	0.3	0.2	0.1	<0.1	<0.1
TKR12	7.1	1.6	0.4	0.3	0.1	<0.1
TKR14	95.0	28.3	6.3	<0.1	<0.1	<0.1

20

【0132】

30

これらの結果から、トランスフェクトされた皮膚線維芽細胞を用いたウサギでの自己由来遺伝子治療を行うために技術的障壁がないであろうことが示された。遺伝子工学的に修飾された自己由来細胞によるhGH供給が8匹の実験動物すべてで成功した。予想されたように、血清hGHレベルは、抗hGH抗体の増加に従って減少した。高力値(1:40000)はIPまたはSRCを移植した動物ではまれではなく、このことは1回の移植処置による持続的なタンパク質供給が、脊椎動物の予防接種やタンパク質抗原に対する高力価抗体の生産のための効率的な手法となり得るといふ提案と一致している。

【0133】

実施例13. トランスフェクトヒトとウサギの二次皮膚線維芽細胞によるインビトロでのhEPOの生産

40

1. ヒト皮膚線維芽細胞

線維芽細胞は新しく切り出されたヒト皮膚線維芽細胞から分離され、そしてDMEM + 15%牛血清中で培養された。60 μ g のpcDNE0とpXEP01の等モル混合物とのエレクトロポレーション(250ボルト、960 μ ファラッド)は1継代細胞で行われ、そして処理された細胞はG418を含む培地(300 μ g/ml G418)で選択された。コロニーは単離され、標準的な方法を使って広げられた。56の個々のクローンの分析から由来したデータは表2に示されている。細胞はDMEM + 15%牛血清中のG418中(300 μ g/ml G418)に保持され、そして10,000細胞/cm²の接種密度で植えつがれた。培養培地は継代のために細胞が採取される24時間前に変えられた。継代の時には、培養培地の部分はhEPO分析のために除かれ、そして細胞はそれから採取され、数えられ、再び植え継がれた。培地中のhEPO濃度は商業的に利用で

50

きるELISA(R & D systems)を用いて決定された。hEPO濃度は $mU / 10^6 \text{ cells} / 24\text{hr}$ として表され、そして発現レベルは69から55,591 $mU / 10^6 \text{ cells} / 24\text{hr}$ に広がり、全G418耐性コロニーの19%が検出できる濃度のhEPOを発現した。

【0134】

【表2】

表 2
p cDNEOとpXEP01を用いてのコトランスフェクション
によって単離された、独立した56個の二次ヒト線維芽細胞
クローンにおけるhEPOの発現

H E P O 発 現 レ ベ ル ($mU / 10^6 \text{ 細胞} / 24\text{時間}$)	クローン数
< 1,000	10
1,000-10,000	28
10,000-50,000	17
>50,000	1

10

20

【0135】

pcDneoとpXEP01を同時にトランスフェクションすることにより分離されたヒト線維芽細胞由来のクローンの、分泌されたhEPOのグリコシル化の状態の分析がされた。培地がhEPO生産細胞からあつめられ、そしてヒトエリスロポエチンに特異的なマウスモノクローナル抗体(Genzyme Corporation)を用いて免疫沈降された。免疫沈降された物質は12.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動され、そしてPVDF膜(Milipore)に写された。膜は免疫沈降に用いた同じ抗hEPOモノクローナル抗体を用いて調べられ、次にHRP結合ヒツジ抗マウスIgG抗血清(Cappel)を用いて処理され、その後hEPOを蛍光産物の生産を通して目に見えるようにするために発光検出(ECL Western blotting detection kit, Amershan)を行った。

30

【0136】

pXEP01とpcDNEOを同時にトランスフェクションした正常ヒト線維芽細胞によって分泌されたhEPOのウエスタンブロット分析はヒトエリスロポエチンに特異的な抗体と反応する、およそ34kdの分子量を持つ分子であることを証明した。これは、本来存在する完全にグリコシル化されたヒトエリスロポエチンの予想されている大きさである。

【0137】

トランスフェクションされたヒト線維芽細胞クローンによって生産されたヒトエリスロポエチンについて、尿から単離される天然ヒトエリスロポエチン又はチャイニーズハムスター卵巣細胞によって生産された組換えhEPOのN-とO-結合グリコシル化の両方の性質を持つかどうか決定するために分析された。ウエスタンブロット分析はpXEP01とpcDNEOを同時にトランスフェクションした正常ヒト線維芽細胞のクローン株からの上清上で行われた。上清のサンプルは、最初にエンドグリコシダーゼ-F(New England Nuclear)、ノイラミニダーゼ(Genzyme)あるいはO-グリカナーゼ(Genzyme)を用いて処理された。エンドグリコシダーゼ-Fを用いた処理で分子量が34kdから約27kdへのシフトを生じた。ノイラミニダーゼを用いた処理ではかろうじてバンドの位置のわかるシフトを生じ、一方O-グリカナーゼを用いた処理は免疫反応バンドの大きさが約18.5kdに下がるという大きなシフトを生じた。これらの結果より、尿から分離された天然のヒトエリスロポエチンあるいはチャイニーズハムスター卵巣細胞によって生産された組換えhEPOと得られたそれらとは区別できない〔ブラウンら、(Browne, J. K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:693-702(1986))〕。

40

50

【 0 1 3 8 】

2 . ウサギ線維芽細胞

線維芽細胞は新しく切り出されたウサギ皮膚から分離され、そしてDMEM 10%牛血清で培養された。60 μ g のpcDNE0とpXEP01の等モル混合物を用いたエレクトロポレーション (250ボルト、960 μ ファラッド) が行われ、そして処理された細胞はG418を含むウサギ線維芽細胞成長培地 (1 mg/ml G418 ; 実施例 2) 中で選択された。コロニーは分離され、標準的方法を用いて広められ、そして生じた二次細胞株のhEPO発現を分析された。49の個々のウサギ線維芽細胞クローンから由来したデータは表 3 に示す。これらのクローンの発現レベルは43から 2,900,000mU / 10⁶ 細胞 / 24時間範囲で、全G418耐性クローンの72% が検出できる濃度のhEPOを発現した。

10

【 0 1 3 9 】

【表 3】

表 3

p c D N E O と p E E P O を用いてのコトランスフェクション
によって単離された、独立した49個の二次ウサギ線維芽細胞
クローンにおけるh E P O の発現

<u>h E P O 発 現 レ ベ ル</u> <u>(mU / 10⁶ 細胞 / 24時間)</u>	<u>ク ロ ー ン 数</u>
< 1,000	1
1,000 - 10,000	3
10,000 - 50,000	7
50,000 - 500,000	19
> 500,000	19

20

【 0 1 4 0 】

実施例 1 4 . ヒトEPO 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の両方を持つプラスミドの構築

HPRT配列 (Genbank entry HUMHPRTB, エドワーズら (Edwards, A et al.), Genomics, 6:5 93-608(1990)) 内でHPRT遺伝子のエキソン 2 および 3 を含む11,960から18,869の位置に広がっている6.9 kbのHindIII 断片がpUC12 のHindIII 部位にサブクローニングされる。生じたクローンはHPRT遺伝子断片のエキソン 3 内の唯一のXhoIの部位で切断され、そしてpMC1NE0(Stratagene) からのneo 遺伝子を含む1.1 kbのSalI-XhoI 断片が挿入され、エキソン 3 のコーディング配列を壊す。1方向つまりneo 転写の方向を持ちHPRT転写とは反対方向を持つ物が選ばれ、pE3Neoと名付けられた。pE3neoはHPRT配列とneo 遺伝子の5'側の結合部位に唯一のXhoI部位を持つ。pE3neoはXhoIで切られ、大腸菌DNA ポリメラーゼのクレノウ断片を用いて処理されることにより平滑末端にされる。

30

【 0 1 4 1 】

neo 選択プラスミドpE3Neo内にhEPO遺伝子を挿入するためにプラスミドpXEP01 (実施例 3 ; 図 5) から5.1 kbのEcoRI-HindIII 断片が分離された。EcoRI 部位はmMT プロモーターの5'側の隣に位置しており、HindIII 部位は5.1 kb離れたhEPOコーディング領域の3'側にある。精製された断片は大腸菌DNA ポリメラーゼのクレノウ断片を用いて処理されることによって平滑末端にされ、上で述べたXhoI消化され、そして平滑末端のされたpE3neo断片につなげられる。大腸菌への形質転換の後、pE3neoに挿入された1 コピーのmMT-hEPO断片を持つプラスミドは隣接するneo 遺伝子と同じ方向にhEPO遺伝子が転写されることを制限酵素分析によって確認された。このプラスミドはpE3neoEPO と名付けられた。hEPOを発現するG418^r クローンの直接選択ができることに加えて、この断片はヒトHPRT位へhEPO遺伝子を組み込みさせるためのジーンターゲティングの際にも用いられるだろう。

40

【 0 1 4 2 】

50

実施例 15 . hEPO遺伝子と選択マーカー (pE3neoEPO) を発現するヒト線維芽細胞クローンの分離

線維芽細胞は新しく切り出されたヒト皮膚線維芽細胞から分離され、そしてDMEM + 15%牛血清中で培養された。60 μ g のスーパーコイル化された (supercoiled) pE3neoEPO を用いた電圧ポレーション (250ボルト, 960 μ ファラッド) は一継代細胞で行われ、そして処理された細胞はG418を含む培地 (300 μ g/ml G418) で選択された。コロニーは分離され、標準的な方法で広げられた。26の個々のクローンの分析に由来するデータは表4に示されている。細胞はDMEM + 15%牛血清中のG418中 (300 μ g/ml G418) で保持され、接種密度10,000細胞 / cm^2 で植えつがれた。培養培地は継代のために細胞を採集する24時間前に変えられた。継代の時、培養培地の一部分はhEPO分析のために取り除かれ、それから細胞は採集され、数を測定され、そして再び植え継がれた。培地中のhEPO濃度は商業的に利用できるELISA (R and D systems) を用いて決定された。hEPO濃度は $\text{mU hEPO} / 10^6$ 細胞 / 24時間としてあらわされ、そして発現レベルは240 から961,620 $\text{mU} / 10^6$ 細胞 / 24時間の範囲であった。全G418耐性クローンの89%が検出できる濃度のhEPOを発現した。

【0143】

【表4】

表 4

pE3neo-EPOを用いてのトランスフェクションによって単離された、独立した26個の二次ヒト線維芽細胞クローンにおけるhEPOの発現

<u>hEPO発現レベル</u> ($\text{mU} / 10^6$ 細胞 / 24時間)	<u>クローン数</u>
< 1,000	2
1,000 - 10,000	2
10,000 - 50,000	9
50,000 - 500,000	12
> 500,000	1

【0144】

hEPOを発現するヒト線維芽細胞クローンは60 μ g のHindIII 消化したpE3neoEPO を用いた電圧ポレーションによっても分離される。hEPOを発現するウサギ線維芽細胞クローンはウサギ線維芽細胞クローンが1 mg/ml G418を含むウサギ線維芽細胞成長培地 (実施例2) で選別されるのを除いて、全く同じトランスフェクションの条件でプラスミドpE3neoEPO を用いて分離される。

【0145】

実施例 16 . 生物学的に活性なヒトエリスロポイエチンのマウス中での発現

マウスは、動物の一般循環系で治療学的に有用なタンパク質を供給する能力を持つ、遺伝子学的に修飾された細胞の移植の研究において貴重な系をもたらしている。ヌードマウスの相対的な免疫不全は外来の移植が生物学的機能を保持するのを許し、特定の一次及び二次ウサギ線維芽細胞を長期にわたってインビボで生存させ得るかもしれない。

【0146】

腎下部皮膚への細胞の移植のためにマウスはアベルチン (Avertin) を0.0175 ml / g 体重の割合で腹腔注射する。腎臓 (一般には左腎臓) は肋骨の下約3 mmにつくられた8 ~ 10 mmの切開部を通して操作する。皮膚、腹筋、腹膜及び腎側筋膜を腎臓を露出させるために萎縮させた。小さな鉗子を用いて腎臓を腹腔から取り出す。27ゲージの皮下注射針が腎臓に小さな開口部を作るのに用いられる。20ゲージのI.V.カテーテル

を用いて移植されるべき細胞（一般に5～10 μ lの容積中に300万個の細胞）は1mlシリンジに回収され、腎皮膜の下にゆっくりと注入される。細胞が腎皮膜の開口部から遠く放出される事に注意が払われる。切開部は一本の繊維(staple)で筋組織及び皮膚を通して縫合される。軽い麻酔がかかるまでメトキシフランをいれた大きなピーカーにネズミをいれた後、血を採取した。眼窩腔から血液を採取するためにパストールピペットの先端を眼窩周辺部位の間に入れる。血清hEPOレベルは商業的に利用可能なキット(R and D Systems)を用いて決定される。血液の部分もヘマトクリットレベルを決定するためにEDTAで覆った毛細管(Stat spin, Norwood, MA)に吸い込まれる。

【0147】

ウサギ皮膚線維芽細胞のクローン株は実施例13で述べられた方法によって分離された。RF115-D4と名付けられたあるクローンではヒトEPO遺伝子が安定してトランスフェクションされていると決定され、そしておよそ786,000mU hEPO/10⁶細胞/24時間発現された。300万の細胞が6匹のヌードマウスの腎下部皮膜に15つつ移植された。およそ400 μ lの血液が移植後1日目と7日目に吸い取られ、そしてその後は21日目まですべての日に吸い取られた。この期間の低張性ショックを防ぐために採血の後塩溶液が等量注射された。血液はその後63日目まで週ごとに吸い取られた。同じ採血スケジュールが細胞移植していない10匹のマウスに用いられた。図13aは一般に赤血球数の指標として用いられている血液ヘマトクリット(HCT)に対するこれらの処置の作用が示されており、移植及びコントロール動物について測定されている。コントロール動物においてはHCTは7日目までには急激に落ちて、その後15日目までに大体普通のレベルに戻る。対してhEPO発現細胞の移植を受けた動物は7日目までに高いHCTレベルを示した。HCTは63日目まで高いままで、移植後35日目には1日目のレベルの45%よりも1.4倍高い64%のピークに達する。図13bに示されているように、免疫反応性(immunoreactive)hEPOは移植された動物の血液中で簡単に検出できた(キットの製造元によってhEPO ELISAの感度性は2mU/mlであると決められており(R & D System)、そしてELISAキットで使われている抗体と内因性のマウスEPOは交差反応を示さない)。移植された動物のhEPOレベルは移植後7日目から63日目までに29から9mU/mlまで徐々に落ちた。

【0148】

本実施例は、hEPOを発現し分泌するために遺伝的に処理された普通の皮膚線維芽細胞は、1)インビボで生存して2か月間まで動物の全身循環系にhEPOを供給することができ、そして2)生産されたhEPOは生物学的に機能し、しばしば採血されるコントロール動物に観察されるヘマトクリット値の低下を防止するために働き、コントロールの動物では貧血反応を生じる採血スケジュールを試されたときでさえ、最終的にHCTの増加を生じるという事をはっきりと証明した。

【0149】

実施例17. GLP-1(7-37)発現プラスミドをトランスフェクションした後の二次ヒト皮膚線維芽細胞株からのGLP-1(7-37)の発現

GLP-1の7から37のアミノ酸残基の部分〔GLP-1(7-37);Genebank sequence HUMGLUCG2において7214から7306の塩基対によってコードされている〕はインビボでインスリノトロピン活性を持つことが証明された。プラスミドpXGLP1は、GLP-1(7-37)の部分、そのN末端において、小胞体を通しての運搬を効果的にするためにヒト成長ホルモン由来の26アミノ酸のシグナルペプチドと融合するように構築される。この融合タンパク質は、分泌前に、分泌産物がGLP-1の7-37残基のみから構成されるように、残基26のすぐC末端側が切断される。シグナルペプチドの発現:GLP-1(1-37)融合タンパク質はマウスメタロチオネインプロモーターによってコントロールされる。

【0150】

プラスミドpXGLP1は次のように構築される:プラスミドPXGH5〔Selden, R. F., Mol. Cell Biol. 6:3173-3179(1986)〕がSmaIで消化され、BglIII部位を含む2本鎖のオリゴヌクレオチド(BglIII linkers;New England Biolabs)につなげられる。つなげられた産物

10

20

30

40

50

はBglIII とEcoRI で処理され、そしてヒト成長ホルモン遺伝子の3'側の翻訳されない領域に相当する0.32kbの断片が分離された(Genbank entry HUMGHCSAの6698位のSmaI部位にBglIII linkerを持つ)。hGH断片も、Genbank entry HUMGHCSAの6698から7321の間を増幅するために設計されたPCRプライマーを用いてヒトゲノムDNAから既知の方法で分離された。マウスメタロチオネイン(mMT)プロモーター〔Harmer, D. H. and Walling, M. J. Mol. Appl. Gen., 1:273-288(1982)〕を含む1.45のEcoRI-BglIII断片が次に分離された。マウスメタロチオネインプロモーターは、マウスゲノムDNAから、Genbankから利用できるmMT配列(すなわち Genbank entries MUSMTI, MUSMTIP, MUSMTIPRM)の分析から設計されたPCRプライマーを用いて、既知の方法で分離された。プラスミドpUC19(ATCC#37254)がEcoRIで切断され、細菌アルカリフォスファターゼを用いて処理された。処理されたプラスミドは上で述べられたhGHやmMT断片に繋がられた。生ずるプラスミドは、マウスメタロチオネインプロモーターと、BglIII部位で繋がられたhGHの3'側の翻訳されない領域をそれぞれ一コピー持つ。

10

【0151】

pX1と名付けられこのプラスミドはBglIIIで処理され、完全な長さの線状産物がゲル電気泳動によって精製された。11.1と11.2のオリゴヌクレオチドは、PCRによってヒトゲノムDNAからGLP-1の7-37のアミノ酸をコードするDNA配列の増幅のために用いられる。増幅された産物(104 bp)は精製されpXGH5とオリゴヌクレオチド11.2、11.3、11.4、11.5に混合され、PCRに付す。オリゴヌクレオチド11.3と11.4は相補的でありhGHシグナルペプチドとGLP-1アミノ酸残基7の間の所望の連結部(junction)に相当する。500塩基対の増幅産物は、hGH(Genbank entry HUMGHCSAの5168から5562のヌクレオチド)からの5'側の翻訳されない領域やエキソン1、イントロン1、エキソン2配列の一部を含んでおり、GLP-1の7-37残基をコードする15の融合されたものがストップコドンの前にある。断片は設計によって、両末端にBamHI部位がフランクしている。

20

【0152】

断片はBamHIで切断され、上で述べられたpX1のBglIII処理物に連結される。連結産物は、GLP-1残基37がmMTプロモーターの遠位になるように、pX1においてmMTプロモーターと3'側の翻訳されないhGH配列を分離してBglIII部位に挿入されているhGH-GLP-1(7-37)融合産物の一コピーを用いて分析し同定される。

【0153】

30

【表5】

表 5

hGH-GLP-1 (7-37) 融合遺伝子の
増幅のためのオリゴヌクレオチド

- 11.1 5' CATGCTGAAG GGACCTTTAC CAGT (SEQ ID NO 3)
- 11.2 5' TTGGATCCTT ATCCTCGGCC TTTCACCAGC CA
(SEQ ID NO 4) BamHI
- 11.3 5' GGCTTCAAGA GGGCAGTGCC CATGCTGAAG GGACCTTTAC CAGT
(SEQ ID NO 5)
- 11.4 5' ACTGGTAAAG GTCCCTTCAG CATGGGCACT GCCCTCTTGA AGCC
(SEQ ID NO 6)
- 11.5 5' AAGGATCCCA AGGCCCAACT CCCC GAAC (SEQ ID NO 7)
BamHI
- 11.6 5' TTGGATCCTT ATCGGCC TTTCACCAGC CA (SEQ ID NO 8)
BamHI

10

20

【 0 1 5 4 】

他の方法として、小さいサイズのシグナルペプチドと必要とされるGLP-1の一部で、完全な融合遺伝子が合成的に調製できる。LDL レセプターのシグナルペプチド(アミノ酸残基1-21)、プレプログルカゴン(アミノ酸残基1-20)またはヒト成長ホルモン(アミノ酸残基1-26)をコードするDNAが知られている方法で合成できると考えられ、そして同じように合成したGLP-1の7-37または7-36(すぐにストップコドンがつづく)のアミノ酸をコードするDNAとin vitroで連結される。これらの分子を設計し、合成するのに必要な配列は、Genbank エントリーの HUMLDLRO1(ヒトLDLレセプター)、HUMGLUCG2(ヒトGLP-1とグルカゴン配列)とHUMGHCSA(ヒト成長ホルモン)において簡単に利用できる。連結産物はヒト線維芽細胞に使用されるための適当な哺乳類発現ベクターに挿入することができ、プラスミドpMSG(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ)は5'側と3'側の翻訳されない配列、スプライス部位、ポリA付加部位、エンハンサーとヒト皮膚線維芽細胞で用いられるプロモーターを持つので、この目的に適当である。別の方法として、連結産物は適当な5'側の翻訳されない配列を用いて合成され、上で述べえられたプラスミドpX1に挿入することも可能である。

30

【 0 1 5 5 】

第二のインスリノトロピック(insulinotropic)なGLP-1、つまりGLP-1(7-36)は、上述のオリゴヌクレオチド11.2をオリゴヌクレオチド11.6で置換することによって発現できる。後のクローニング操作の全てはpXGLP1構築のために上述した方法に従い、GLP-1(7-37)特有のC末端のグリシン残基を最終産物が欠くようになる。他に、インスリノトロピンGLP-1(7-36)アミドをつくるために、ペプチジルグリシンアルファアミド化酵素の活性によって、インピボでこの末端のグリシン残基を除いても良い。

40

【 0 1 5 6 】

プラスミドpXGLP1は、実施例13でpXEP01とpcDNE0について述べたとおりにプラスミドpcDNE0と共に一次ヒト線維芽細胞にコトランスフェクト(co-transfect)される。クローンはG418を含む培地で選別され、96穴プレートに移され、そして細胞上清のGLP-1(7-37)活性または免疫反応性について測定する。GLP-1(7-37)活性は、細胞上清をラットインスリノーマR1Nm5F細胞と一緒に加温放置し、市販のインスリンラジオイムノアッセイ(Coat-a-Count Insulin, DPC, Los Angeles, CA)を用い、これらの細胞からインスリン分泌を誘導するための上清の能力を測定することによって決定された。GLP-1(7-37)抗原は、市販

50

の抗GLP-1抗血清(Peninsula Laboratories、Belmont、CA)を用いて測定される。GLP-1(7-37)ポジティブクローンは実施例16で述べられているようにヌードマウスに移植するため広げられ、そして血液サンプルが血清ヒトGLP-1(7-37)レベルを測定するために採取された。

【0157】

インビボの活性は絶食動物において、腹膜内にグルコースを注射をした後(体重1gあたり1mgのグルコース)、インスリン生成の指数の測定によってモニターされる。一般には、32匹の移植を受けたマウスのグループと受けていないグループは一晚絶食され、28匹がグルコースを注射された。注射後、28匹のマウスは任意に4匹づつ7つのグループに分けられ、そして血液が(血清グルコースとインスリンのために)、それぞれのグループについて注射後5、10、20、30、45、60、90分に採取され、絶食コントロールとしてグルコース注射をしないグループとともに行われた。GLP-1(7-37)発現細胞を受けた動物における注射後のインスリン生成の指数(血液中におけるグルコースに対するインスリンの割合)の移植しない動物をうわまる増加は、発現されたペプチドのインビボにおけるインスリノトロピック活性を支持するものである。

10

【0158】

実施例18. 遺伝子ターゲティングによるトランスフェクト細胞株の作製

トランスフェクトするDNAが、相同組み換え事象を通して、染色体DNA配列に導入される時、または部分的に置換する時に、ジーンターゲティングが生じる。このような事象はどのようなトランスフェクト実験の途中でも生じる可能性があるが、それらは非相同又は不正の(illegitimate)組み換えによってプラスミドDNAが組み込まれるという事象が大過剰に起こることによって、通常マスクされている。

20

【0159】

a. ヒト細胞中のジーンターゲティング事象の選択に有用な構築物の作製

ターゲティングの事象を選択する一つの方法は、トランスフェクトするDNAの組み込みによる遺伝子機能の消失を選択する遺伝子的選択によるものである。ヒトHPR T遺伝子座(locus)はヒポキサンチン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素をコードしている。hprt⁻細胞は、6-チオグアニン(6-TG)類似のヌクレオシドを含む培地で増殖することにより選択することができる。すなわち、野生型(HPR T⁺)対立遺伝子(allele)を持つ細胞は、6-TGによって死滅するが、変異体(hprt⁻)対立遺伝子を持つ細胞は生きつづけることができる。従って、HPR T遺伝子機能を破壊する、ターゲティングされた事象を保持する細胞が6-TG培地で選択できる。

30

【0160】

HPR T遺伝子座に対するターゲティングのためのプラスミドを構築するために、HPR T配列[遺伝子バンク(Genebank)名HUMHPR TB:エドワーズ(Edwards, A.)ら, Genomics 6:593-608(1990)]の11,960~18,869位を含みかつHPR T遺伝子のエキソン2と3を含む6.9kbのHindIII断片がpUC12のHindIIIの中にサブクローン化される。得られたクローンはHPR T遺伝子断片のエキソン3の唯一のXhoI部位で切断され、pMC1Neo(Stratagene)からのneo遺伝子を含む1.1kbのSalI-XhoI断片が挿入されて、エキソン3をコードする部分が除かれる。HPR T転写の方向と反対方向のneo転写の方向を持った一つのオリエンテーション(orientation)が選りだされ、pE3Neoと名付けられた。正常なHPR Tエキソン3をneoを欠いた(neo-disrupted)型のもので置換すると6-TG耐性表現型のhprt⁻が得られるであろう。このような細胞はG418耐性でもある。

40

【0161】

b. 確立したヒト線維芽細胞系でのジーンターゲティング

不死化した細胞系におけるターゲティングを示すため、そして、ジーンターゲティングにおいてpE3Neoが適切に機能することを確立させるため、ヒト線維肉腫細胞系HT1080(ATCC CCL 121)がpE3Neoによりエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトされた。

50

【0162】

HT1080細胞は、エレクトロポレーションに先立って、15%子牛血清(Hyclone)含有のHAT(ヒポキサンチン/アミノプテリン/キサンチン)補填のDMEM培地で維持された。エレクトロポレーションの2日前に、細胞をアミノプテリンのない同様の培地に移し変える。等比級数的に増殖した細胞をトリプシン処理し、DMEM/15%子牛血清で希釈し、遠心分離して、PBS(リン酸緩衝化食塩水)に再懸濁させて、1ml当たり1330万細胞の最終細胞体積にする。pE3NeoはHindIIIで処理され、pUC12骨格から8kbのHPRT-neo断片を分離し、フェノール抽出とエタノール沈殿により精製して、600 μ g/mlの濃度で再懸濁させる。50 μ l(30 μ g)を、エレクトロポレーション用チューブ(cuvette)(0.4cm電極間隔、Bio-Rad Laboratories)に、750 μ lの細胞懸濁液(細胞数1000万)と共に加える。エレクトロポレーションが450V, 250 μ Farads(Bio-Rad Gene Pulser; Bio-Rad Laboratories)で行われた。チューブの内容物を直ちに、15%子牛血清含有のDMEM培地に加えて、25mlの培地当たり、100万個の細胞になるような細胞懸濁液を作る。この処理された細胞懸濁液25mlを150mm径の組織培養皿にまいて、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス中で培養する。24時間後、G418溶液を直接その皿に加えて、G418として800 μ g/mlの最終濃度のものにする。5日後、培地をDMEM/15%子牛血清/800 μ g/ml G418の培地に換える。エレクトロポレーションの9日後に培地をDMEM/15%子牛血清/800 μ g/ml G418及び10 μ M6-チオグアニン含有のものに換える。G418と6-TGに耐性のコロニーがこの2重選別の開始後14~16日後に、クローニングシリンダーを用いて採取された。

10

20

【0163】

HT1080細胞における5個の代表的なターゲティング実験の結果を表6に示す。

【0164】

【表6】

表 6

トランスフェクション	被処理細胞数	G418 ^r 6-TG ^r クローン数
1	1 \times 10 ⁷	32
2	1 \times 10 ⁷	28
3	1 \times 10 ⁷	24
4	1 \times 10 ⁷	32
5	1 \times 10 ⁷	66

30

【0165】

トランスフェクション例5では、G418^rコロニーの全収率決定用のコントロール皿によると、33,700個のG418^rコロニーが最初1 \times 10⁷個の処理細胞から発生することが示された。このように、ターゲットされた現象とターゲットされない現象の比は、66/33,700すなわち1対510である。この5つの実験を合わせると、ターゲットされた現象は、3.6 \times 10⁻⁶の頻度すなわち処理細胞の0.00036%という頻度で発生する。

40

【0166】

制限酵素と、neoとHPRT遺伝子から得られたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション実験から、HPRT遺伝子座のHPRTのエキソン3中の予想された位置にneo遺伝子が位置していることが示された。

50

【 0 1 6 7 】

c . 一次及び二次のヒト皮膚線維芽細胞でのジーンターゲティング

p E 3 N e o を H i n d I I I で切断し、p U C 1 2 骨格から 8 k b の H P R T - n e o 断片を分離し、フェノール抽出とエタノール沈殿により精製する。D N A は、2 m g / m l となるよう再懸濁する。0 . 5 m l の容量中、3 0 0 万個の二次ヒト包皮線維芽細胞が 1 0 0 μ g の H i n d I I I p E 3 N e o (5 0 μ l) と共に、2 5 0 ボルトと 9 6 0 μ F アラッドでエレクトロポレートされた。3 回に分けてトランスフェクションを行い、全部で 9 0 0 万個の処理細胞となった。1 5 0 m m 培養皿ごとに、5 0 0 , 0 0 0 個の細胞が G 4 1 8 選択用にまかれた点を除き、実施例 6 記載のように細胞を処理し、G 4 1 8 耐性株を選択する。選択条件で 1 0 日後に、培養液を 4 0 0 μ g / m l の G 4 1 8 と 1 0 μ M 6 - T G を含むヒト線維芽細胞栄養培地に換える。2 種の薬剤の組み合わせで選択することを、さらに 1 0 日継続する。培養皿を顕微鏡で見て、両薬剤に耐性なヒト線維芽細胞コロニーを検索する。G 4 1 8^r t - T G^r コロニーの比率は、9 0 0 万個の処理細胞当たり 4 個である。これらのコロニーは、コロニーを作り得るすべての細胞の 0 . 0 0 0 1 % (又は、1 0 0 万分の 1) となっている。G 4 1 8^r コロニーの全収量を決定するために用いられるコントロール用培養皿から、最初の 9×10^6 個の処理細胞から 2 8 5 0 個の G 4 1 8^r コロニーが発生し得ることが示された。このように、ターゲットされない現象に対するターゲットされたものの比率は 4 / 2 , 8 5 0 すなわち 1 対 7 1 2 である。制限酵素及び、n e o と H P R T 遺伝子に由来するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション実験により、H P R T 遺伝子座の H P R T エキソン 3 の中の予想される部位に n e o 遺伝子が位置し、そしてこれら 4 個のクローン化された細胞株中に、ターゲティングが生じていることが示される。両薬剤に耐性なコロニーはトランスフェクトされる一次細胞からも単離される ($1 / 3 . 0 \times 10^7$) 。

10

20

【 0 1 6 8 】

いくつかの p E 3 N e o ターゲティング実験の結果は表 7 にまとめられている。H i n d I I I で処理された p E 3 N e o は、直接トランスフェクトされるか、又はトランスフェクションに先立って 5 ' 端に単鎖の突出部を発生させるため、エキソヌクレアーゼで処理された (実施例 1 8 c 参照) 。長さが 1 7 5 から 9 3 0 塩基対の範囲の単鎖領域を持った D N A が試験された。H i n d I I I のみで分解した p E 3 n e o を用いて、1 / 7 9 9 G 4 1 8 - 耐性コロニーが、制限酵素とサザンハイブリダイゼーション分析により、H P R T 遺伝子座にターゲティングされた挿入である n e o 遺伝子があることが、同定された (全部で 2 4 個の目的のクローンが単離された) 。1 7 5 塩基対の突出部を用いた時に、ターゲティングは最大に増強され (約 1 0 倍の増強) 、1 / 8 0 G 4 1 8^r コロニーに、H P R T のターゲティングの診断に役立つ制限断片の存在が示される (全部で 9 個の目的とするクローンが単離された) 。このように、ここに記載された条件と組み換え D N A 構築物を用いれば、ターゲティングは通常のヒト線維芽細胞で容易に観察でき、全体のターゲティングの頻度 (ターゲットされたクローンの数を、G 4 1 8 耐性株へ安定にトランスフェクトされたクローンの数で割ったもの) は、実施例 1 8 e に記載するような方法で、単鎖の突出尾部を含むターゲティング構築物でトランスフェクトすることで増強され得る。

30

40

【 0 1 6 9 】

【 表 7 】

表 7

ヒト線維芽細胞のHPRT遺伝子座へのターゲティング

pE3neo 処理	試験数	G418 ^r コロニー 当たりの標的数	標的クローンの 総数
HindIII切断	6	1/799	24
175bp 突出	1	1/80	9
350bp 突出	3	1/117	20
930bp 突出	1	1/144	1

10

【0170】

d. ヒトのゲノムへの治療に有益な遺伝子のターゲティング挿入のための構築物作製とジーンターゲティングでのその利用

治療に有益な遺伝子が、neo遺伝子に隣接するかその近くのHPRTのコーディング領域に挿入されているpE3Neo変異型は、レシピエント一次又は二次細胞染色体の特定の位置に、治療に有益な遺伝子をターゲティングするために使用することができる。HPRT遺伝子座にhGH遺伝子をターゲティングするために、このようなpE3Neo変異型を構築することができる。

20

【0171】

pXGH5はEcoRIで処理され、hGH遺伝子とそれに結合したマウスメタロチオニン(mMT)プロモーターを含む4.1kb断片が分離される。EcoRIの突出部はE. coli DNAポリメラーゼからのクレノー(Klenow)断片で埋められている。別個にpE3Neoはneo断片とHPRTエキソン3の結合(エキソン3に挿入された3'側の結合)を切断するXhoIで処理する。直鎖状になったプラスミドのXhoI突出端は、E. coli DNAポリメラーゼからのクレノー断片で埋め合わされ、得られた断片が4.1kbの平滑末端のhGH-mMT断片につながる。つながれた混合物由来のバクテリアのコロニーは、hGH-mMT断片が単一コピー挿入されているか及び方向は合っているかが、制限酵素分析によってスクリーニングされ、neo遺伝子と同じ方向で転写されたhGH遺伝子が選ばれてpE3Neo/hGHと名付けられる。pE3Neo/hGHをHindIIIで切断し、HPRT, neoとmMT-hGH配列を含む12.1kbの断片を切り離す。切断したDNAが処理されて、実施例18cに記載する一次又は二次ヒト線維芽細胞にトランスフェクトされる。G418^r TG^r コロニーが選択され、実施例18cに記載するように、HPRT遺伝子中へのmMT-hGHとneo配列のターゲティング挿入について分析される。個々のコロニーは市販される免疫測定法(Nichols Institute)を用いて、hGHの発現を測定する。

30

【0172】

二次ヒト線維芽細胞をpE3Neo/hGHでトランスフェクトし、チオグアニン耐性コロニーが、安定なhGHの発現についておよび制限酵素とサザンハイブリダイゼーション分析法によって、分析された。13個のTG^r コロニーが分析され、8個のコロニーが内在性のHPRT遺伝子座にhGH遺伝子が挿入されていると同定されている。8個の株はすべて、hGHの有意な量を安定に発現しており、24時間の平均発現レベルは22.7 µg/10⁶ 細胞であった。

40

【0173】

e. ターゲティングを増強させるためのDNA末端の修飾

いくつかの一連の証拠から、E. coli、バクテリオファージ、S. cerevisiaeとアフリカツメガエルにおける或る相同性組み換えの過程に、3'端突出部が関与することが示唆されている。アフリカツメガエルの卵母細胞においては、数百個の塩基対の長さの3'端突

50

出部を持った分子が、制限酵素で消化されて発生する非常に短い突出部(4bp)を持った分子よりも、顕微注入後に非常にすみやかに同様に処理された分子と組み換えを起こした。酵母においては、数百個の塩基対の長さを持った3'端突出部の発生が減数分裂的(meiotic)組み換えにおける律速段階であるように見える。ヒト細胞の組み換えにおいて3'端突出部が関与するとの証拠は報告されておらず、ある種の修飾DNA基質が、どのような種においても、ターゲティング(相同性組み換えの一種)を促進するという事は示されていない。ヒトの細胞において、ターゲティングに関する3'端突出部の効果は、試験されていない。以下の実施例に記載の実験から、5'端突出部が一次及び二次のヒト線維芽細胞のターゲティングに最も有効であることが示された。

【0174】

トランスフェクトするDNA分子の末端を修飾することによって、ターゲティングを増強させることに関する報告はなされていない。この実施例では分子末端を2本鎖型から1本鎖型に変換することによる直鎖状DNA分子の末端の修飾により、一次及び二次のヒト線維芽細胞の染色体へのターゲティングが増強できることを示す。

【0175】

1100µgのプラスミドpE3Neo(実施例18a)がHindIIIで切断される。このDNAは、フェノール抽出とエタノール沈殿の後に、直接用いることができる。あるいはHPRとneo遺伝子のみを含む8kbのHindIII断片が、ゲル電気泳動法によってpUC12ベクター配列と分離することができる。HindIII切断したDNAのExoIII処理により、両末端に、各フリーの3'末端で始まり、5'の突出端を残す広範なエンドヌクレオティックな切断が起こる。エンドヌクレオティック反応の程度とその結果としての5'端突出部の長さは、ExoIII処理反応の時間を変化させることにより、コントロールできる。HindIII処理されたpE3Neoの100µgのExoIII処理反応が、供給者の推薦する条件に従い、30秒、1分、1.5分、2分、2.5分、3分、3.5分、4分、4.5分と5分の時間で実施された。消化反応の程度をモニターするため、それぞれの時間の時点で、ExoIIIで処理されたDNAを1µg含むように採取された試料を、マングベーンヌクレアーゼ(Promega)を用いて供給者の推薦する条件で処理し、その試料をゲル電気泳動で分画する。未処理のHindIII処理されたpE3NeoとExoIIIとマングベーンヌクレアーゼで処理された同じ分子のサイズの違いを測定する。2つに分かれたこのサイズの相違から、分子のそれぞれの末端にある5'端突出部の平均の長さが出る。上述の時間の点と30°での処理では、作りだされる5'端突出部は100~1000塩基の範囲である。

【0176】

それぞれの反応時点で採取されたExoIII処理のDNA60µg(pE3Neoの全HindIII処理物)が精製され、実施例18cに記載の条件下で一次及び二次のヒト線維芽細胞へエレクトロポレーションにより導入された。それぞれのExoIII処理調製物でターゲティングがどの程度増強されたかについては、G418^r6-TG^rコロニーの数を計測し、ExoIIIで未処理のHindIIIで切断されたpE3Neoによるターゲティングで得られた数と比較することによって定量される。

【0177】

3'端突出部の効果も又、同様の系を用いて定量することができる。この場合、HindIIIで処理されたpE3Neoを用いて、供給者の推薦する条件で時間間隔を変えてバクテリオファージT7遺伝子6エキソヌクレアーゼ(United States Biochemicals)で処理する。処理の程度(末端毎に作りだされた3'端突出部の平均の長さ)とエレクトロポレーションの条件の決定は、ExoIIIで処理されたDNAに関する記載に準じる。それぞれのT7遺伝子6エキソヌクレアーゼ処理調製物で、ターゲティングが増強される程度については、G418^r6-TG^rコロニーの数を計測し、T7遺伝子6エキソヌクレアーゼ未処理のHindIII処理pE3NEOによるターゲティングで得られた数と比較することによって定量される。

【0178】

5'及び3'端突出部を発生させる他の方法も可能である。例えば、相互に部分的にオーバーラップしている2つの直鎖状分子を変性させ、アニーリングすることで、出発時の直鎖状分子と区別できない再アニーリングされた断片とともに、それぞれの分子の両末端に3'端突出部を有する分子、あるいは両末端に5'端突出部を有する分子の混合物が得られる。突出部の長さは2つのDNA断片の間で共通でないDNAの長さから決定される。

【0179】

f. 一次及び二次ヒト線維芽細胞においてマウスメタロチオネンプロモーターの制御下にヒトエリスロポエチン遺伝子を置くためのターゲティングプラスミドの構築

以下に、本件発明の一つの態様を例示する。そこでは、得られたままの状態では有意な量でEPOを発現しない一次及び二次ヒト線維芽細胞株において、ヒトエリスロポエチンが発現できるように、ヒトのエリスロポエチン(EPO)遺伝子上流に位置する正常なポジティブとネガティブの調節配列を変化させる。

【0180】

ヒトEPOをコードする領域の上流にのみ存在する領域をPCRで増幅することができる。この目的のために用いられる3組のプライマーが、発表されているヒトEPOの解析からデザインされた[Genbank 名称 HUMERPA; Lin, F-K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7580-7584(1985)]。これらプライマーの組は609, 603又は590bpの断片を増幅することができる。

【0181】

【表8】

表 8

プライマー	HUMERPA コーディネート (coordinate)	配列	断片サイズ
F1	2 → 20	5' AGCTTCTGGGCTTCCAGAC (SEQ ID NO 9)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC (SEQ ID NO 10)	609bp
F2	8 → 24	5' TGGGCTTCCAGACCCAG (SEQ ID NO 11)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC	603bp
F3	21 → 40	5' CCAGCTACTTTGCGGAACTC (SEQ ID NO 12)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC	590bp

【0182】

3つの断片は実質的に重なりあっていて、本件の目的には交換可能なものである。翻訳開

始部位を基準に - 6 2 3 ~ - 1 4 に広がった (HUMERPAヌクレオチドの2 ~ 6 1 0位) 6 0 9 b p断片の両端にC l a Iリンカーが結合される。その結果得られたC l a I - 結合断片をC l a Iで消化し、p B l u e s c r i p t I I S K / + (Stratagene)のC l a I部位に挿入する。その際の配向性はHUMERPAヌクレオチド位置6 1 0がプラスミドポリリンカーのS a l I部位に隣接するようにする。このプラスミドp 5 ' E P OをE P O上流部分の断片中に唯一あるF s p I又はS f i I部位で、別々に切断し(HUMERPAヌクレオチド位置として各々1 5 0と4 0 5)、マウスのメタロチオネンプロモーターに連結させる。典型的には、m M T - I遺伝子から得られた1 . 8 k bのE c o R I - B g l I I I [m M Tをコードしない(DNA)配列を含むものとして; Hamer, D.H. and Walling M., *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 273 288(1982); この断片はまた、G e n b a n kから入手できるm M T配列、例えばM U S M T I、M U S M T I P、M U S M T I P R Mの解析からデザインされるP C Rプライマーを用いてマウスゲノムDNAから公知方法により単離することもできる)を公知方法で平滑末端化し、S f i Iで処理した(先端を同様に平滑末端にした)p 5 ' E P OあるいはF s p Iで処理したp 5 ' E P Oと結合させる。得られたクローンの配向性が分析され、前のm M T B g l I I I部位がプラスミドポリリンカー中のS a l I部位の近くにあるものが、一次及び二次のヒト線維芽細胞をターゲティングするために用いられる。この配向性は、最終の構築物の中で、HUMERPAヌクレオチド位置6 1 0の方向に向かってm M Tの転写を指向させる。得られたプラスミドは、F s p IとS f i I部位で、それぞれm M Tの挿入を行うことから、p 5 ' E P O - m M T F及びp 5 ' E P O - m M T Sと名付けられている。

【 0 1 8 3 】

さらに上流の配列は、負の調節要素あるいは最初のターゲット配列の上流に存在するエンハンサーの修飾、欠失及び/又は置換が望ましい場合に、有用である。E P Oの場合には、肝臓外の組織と腎臓外組織の中で、E P Oの発現を抑制する負の調節要素 [Semenza, G.L. et al., *Mol. Cell Biol.* 10: 930-938(1990)] は欠失することができる。6 k b断片中に一連の欠失のあるものが調製される。削除された領域は幅広い宿主細胞活性を有するエンハンサーで置換されてもよい [例えば、サイトメガロウイルス (C M V) からのエンハンサー]。

【 0 1 8 4 】

HUMERPA配列の5'末端の前にB a m H I部位(遠位)とH i n d I I I部位(近位)が位置するので、p B l u e s c r i p t I I S K / +ベクター中の6 0 9 b p 5' E P O断片の配向性が選択された。このように、6 0 9 b p断片の上流部分に通常存在する6 k b B a m H I - H i n d I I I断片 [Semenza, G.L. et al., *Mol. Cell Biol.* 10: 930-938(1990)] は、公知方法を用いて染色体DNAから単離できる。例えばバクテリオファージ、コスミドあるいは酵母の人為染色体ライブラリー (artificial chromosome library) を、6 0 9 b pのP C R増幅断片をプローブとしてスクリーニングすることができる。所望のクローンは6 k bのB a m H I - H i n d I I I断片を有するであろうし、その同定は公知方法で決定されたヒトE P O遺伝子の周辺の制限酵素地図とこの制限酵素地図を比較することによって確認することができる。また別の方法として、6 0 9 b p断片をプローブとして用いて、E P O遺伝子上流部分のヒトゲノムの制限酵素地図を作成することによって、HUMERPAコーディネート2と6 0 9に間に起始し、上流B a m H I部位を越えて延びる断片を作る酵素を同定することができる。この断片は、ヒトゲノムDNAの適当に処理したものからゲル電気泳動法で単離することができ、バクテリアあるいは酵母のクローニングベクターに結合させることができる。正しいクローンは6 0 9 b pの5' E P Oプローブにハイブリダイズし、6 k bのB a m H I - H i n d I I I断片を含有する。単離された6 k b断片は、正しい配向性でp 5' E P O、p 5' E P O - m M T F又はp 5' E P O - m M T Sに挿入(H i n d I I I部位がHUMERPAヌクレオチド位置2に隣接するように)される。さらに、上流の配列を公知方法で単離することができ、それには染色体ウォーキングテクニックを用いるか、あるいは6 0 9 b pの5' E P Oプローブにハイブリダイズする酵母人為染色体の単離によって行うことができ

る。

【0185】

以上述べたクローニングのストラテジーは、その後の一次、二次ヒト線維芽細胞のターゲティングされたトランスフェクションを可能にするためのEPOの上流配列のインピットでの修飾を可能にする。このストラテジーでは、負の調節領域の欠失とともに簡単なmMTプロモーターの挿入、また負の調節領域の欠失と広範囲の宿主細胞活性を有するエンハンサーによる置換について述べている。

【0186】

g. ヒトEPO遺伝子の隣接配列に対するターゲティングと、標的一次、二次および不死化されたヒト線維芽細胞のスクリーニングによる単離

ターゲティングに際し、プラスミドを制限酵素で切断し、プラスミドの骨格 (backbone) から挿入配列を切り離す。p5' EPO-mMTSの場合、HindIII と SalI で切断することにより 2.4 kb のターゲティングフラグメントが切り離されるが、このフラグメントは1.8 kb の mMTプロモーターと、該プロモーターの5'、3'側にそれぞれ隣接した405bp と204bp の配列よりなる。この隣接配列は、この構築物を EPO遺伝子の調節領域にターゲティングするためのDNAである。このDNA、または2.4kbのターゲティングフラグメントのみがフェノール抽出およびエタノール沈澱により精製され、実施例18cに記載された条件下で一次あるいは二次のヒト線維芽細胞にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた細胞は、ヒト線維芽細胞栄養培養液中、150mm ディッシュに蒔かれる。48時間後、細胞は 10,000cells/cm²の密度〔1ウエル当たり約20,000細胞の割合。もし10⁶のクローニング可能な (clonable)細胞に対し1回の割合でターゲティングを行うならば、(実施例18c)、その際単一の発現コロニーを分離するためのアッセイに約50ウエルが必要であろう〕で24ウエルのディッシュに蒔かれる。トランスフェクトする (transfecting)DNA が EPOの上流の相同領域をターゲットする細胞は、mMTプロモーターの制御下でEPOを発現するだろう。10日後、すべてのウエルの上清は、市販の利用可能なイムノアッセイキット (アムジェン) を用いてEPOの発現についてアッセイされる。EPOの合成が認められるウエルからのクローンが、既知の方法を用いて分離される。代表的には個々のウエルあるいはプレート中に分離された異なる細胞集団のフラクションをアッセイし、これらのポジティブなウエルのフラクションのアッセイを必要に応じて繰り返し、最終的に1ウエル当たり1細胞の割合で蒔かれた96穴のマイクロタイタープレートをスクリーニングすることによりターゲ 30

ティングされたコロニーが分離される。プレートライセート (plate lysates) 全体からのDNAが、HUMERPA 核酸部位1の上流に位置するプライマーとmMTに特異的なプライマーを用いたPCRによりフラグメントを増幅することにより、分析され得る。この一対のプライマーは、DNA配列に基いてその長さが正確に予想されるようなDNAフラグメントを増幅するはずである。ポジティブなプレートがトリプシン処理され、次々と低い希釈で蒔きなおし、ターゲットされた細胞を分離するのに必要なまで、DNAの調製とPCRのステップが繰り返される。

【0187】

ここで述べられたターゲティングの手法は、通常の薬物供給 (pharmacologic delivery) のためにhGHを産生させる目的で、不死化されたヒトの細胞 (たとえばHT1080線維芽細胞、HeLa、MCF-7乳癌細胞、K-562白血病細胞、KB癌細胞、あるいは2780AD卵巣癌細胞) においてhGHの発現を活性化することにもおそらく使用されるだろう。 40

【0188】

h. ヒトEPO遺伝子の隣接配列に対するターゲティングと、ターゲティングされた一次、二次および不死化されたヒト線維芽細胞のポジティブあるいはポジティブ/ネガティブ組み合わせ選択システムによる単離

p5' EPO-mMTF、p5' EPO-mMTS、および上流に付加的な6kbのBamHI-HindIIIフラグメントを有する誘導体を構築するためのストラテジーは、mMTプロモーターに隣接したneo遺伝子の挿入という付加的なステップを続けて行うことができる。加えて、ネガティブな選択マーカ、例えばgpt [pMSG (ファルマシア) あるいは他の適切な供給源から得られる] 50

は pBluescriptIIISK/ + ポリリンカー中の HUMERPA配列に隣接して挿入することができる。前者の場合、G418^r コロニーが分離され、ターゲットされたコロニーを同定するためにコロニー集団から調製されたDNAのPCR増幅、又は制限酵素とサザンハイブリダイゼーション分析により、スクリーニングされる。後者の場合、G418^r コロニーは、gpt遺伝子の組み込み(integration)に対する選択のために、6-thioxanthineを含む培養液中に蒔かれる〔ベスナード(Besnard, C)ら、*Mol.Cell.Biol.* 7;4139-4141 (1987)〕。付言するに、HSV-TK 遺伝子はgptのような挿入配列とは反対側に配置でき、それにより400 µg/mlのG418、100 µMの6-thioxanthine、25 µg/ml gancyclovirを含むヒト線維芽細胞栄養培養液中で細胞を増殖させることにより、neoに対するポジティブ選択あるいはgptとTK両方に対するネガティブ選択が可能となる。二重のネガティブ選択法は、真のターゲティングに対する、ほぼ完全な選択法となるであろうし、サザンプロット分析は最終的な確証を与えるだろう。

10

【0189】

ここで述べられたターゲティングの手法は、通常の薬物供給のためにhEPOを産生させる目的で、不死化されたヒトの細胞(たとえばHT1080線維芽細胞、HeLa、MCF-7乳癌細胞、K-562白血球細胞、KB癌細胞、あるいは2780AD卵巣癌細胞)においてhEPOの発現を活性化することにもおそらく使用されるだろう。

【0190】

i. 一次のヒト線維芽細胞において、マウスメタロチオネインプロモーターの制御下にヒト成長ホルモン遺伝子を配置することを目的とした、ターゲティングプラスミドの構築
以下の実施例は、一次、二次のヒト線維芽細胞株においてヒト成長ホルモン遺伝子を発現させるために、該ヒト成長ホルモン遺伝子上流に位置する通常の調節配列を変化させる、という本発明の一態様を説明している。

20

【0191】

EPO 遺伝子の調節領域に対するターゲティングに関して実施例18fで述べられたのと同様のターゲティング分子が、ヒト成長ホルモン N遺伝子の5'末に由来するクローン化されたDNAフラグメントを利用して得られる。HUMGHCSA(Genbank Entry)ヌクレオチド部位3787-5432(2つのEcoNI制限酵素部位では含まれた部分であり、クローニング、あるいはこのフラグメントを含むサブクローンの診断的切断に対して都合の良いサイズのフラグメントを提供する)に相当する約1.8kbのフラグメントが、この領域における HUMGHCSA 配列の分析によってデザインされたPCRプライマーにより増幅される。この領域は、hGH 遺伝子 Nイントロン1の途中から翻訳開始部位の5'側より約1.4kb上流にまで及ぶ。pUC12がEcoRIとBamHIで切断され、クレノーで処理することにより平滑末端化され、希釈条件化で再環状化される。その結果、プラスミドはEcoRIとBamHIが欠失されたものとなる。このプラスミドはpUC12XEBと命名される。HindIIIリンカーが、増幅したhGHフラグメントにライゲートされ、その結果物であるフラグメントはHindIIIで切断され、HindIIIで切断されたpUC12XEBにライゲートされる。その結果得られたプラスミド、pUC12XEB-5'hGHは、hGH転写開始部位のすぐ上流に位置する0.5kbフラグメントを除去するためにEcoRIとBamHIで切断される。切断されたDNAは、mMT-I遺伝子由来の1.8kb EcoRI-BglIIフラグメントにライゲートされる。〔mMTのコード配列は含んでいない。ハマーとウォリング(Hamer, D.H. and Walling, M.), *J. Mol. Appl. Gen.* 1.:273-288 (1982);フラグメントはGenbankから入手可能なmMT配列、たとえばMUSMTI、MUSMTIP、MUSMTIPRMの分析によりデザインされるPCRプライマーを用いてマウスのゲノムDNAから既知の方法でも分離され得る。〕このプラスミドp5'hGH-mMTは、上流のhGH配列(upstream hGH sequences)が両側に隣接するmMTプロモーターを有している。

30

40

【0192】

以上述べたクローニングのストラテジーにより、hGHの上流の配列がインビトロで修飾され、引き続いて一次および二次のヒト線維芽細胞のターゲット化トランスフェクションがなされる。このストラテジーは、mMTプロモーターの単純な挿入を示す。たとえば幅広い宿主細胞特異性を有するエンハンサーを挿入mMT配列の上流に挿入させるといった、他の

50

ストラテジーも考え得る。

【0193】

j. ヒト hGH 遺伝子に隣接する配列のターゲティング、およびターゲティングされた一次、二次および不死化されたヒト線維芽細胞のスクリーニングによる単離

ターゲティングに際し、プラスミドを制限酵素で切断し、プラスミドの骨格から挿入物を切り離す。p5' hGH-mMT の場合、HindIII で切断することにより 2.9kbのターゲティングフラグメントが切り離されるが、このフラグメントはこの構築物を hGH 遺伝子の調節領域にターゲティングするための DNA が、その 5' および 3' 側に隣接した 1.8 kb の mMT プロモーターからなる。この DNA、または 2.9kb のターゲティングフラグメントのみがフェノール抽出およびエタノール沈澱により精製され、実施例 6 に記載された条件下で一次あるいは二次のヒト線維芽細胞にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた細胞は、ヒト線維芽細胞栄養培養液存在下、150mm ディッシュに蒔かれる。48時間後、細胞は 10,000 cells/cm² の密度 [1 ウエル当たり約 20,000 細胞の割合。もし 10⁶ のクローニング可能な (clonable) 細胞に対し 1 回の割合でターゲティングを行うならば (実施例 18c)、その際単一の発現コロニーを分離するためのアッセイに約 50 ウエルが必要であろう] で 24 ウエルのディッシュに蒔かれる。トランスフェクトする (transfecting) DNA が hGH の上流の相同領域をターゲットした細胞は、mMT プロモーターの制御下で hGH を発現するだろう。10日後、すべてのウエルの上清が市販の利用可能なイムノアッセイキット (ニコルズ) を用いて hGH の発現についてのアッセイに供される。hGH の合成が認められるウエルからのクローンが、既知の方法を用いて分離される。代表的には個々のウエルあるいはプレート中に分離された異なる細胞集団のフラクションをアッセイし、これらのポジティブなウエルのフラクションのアッセイを必要に応じて繰り返し、最終的に 1 ウエル当たり 1 細胞の割合で蒔かれた 96 穴のマイクロタイタープレートをスクリーニングすることにより、ターゲティングされたコロニーが分離される。プレートライセート全体からの DNA が、HUMGHCSAヌクレオチド部位 5,432 の下流に位置するプライマーと mMT に特異的なプライマーを用いた PCR によってフラグメントを増幅することにより、分析され得る。この一対のプライマーは、DNA 配列に基いてその長さが正確に予想されるような DNA フラグメントを増幅するはずである。ポジティブなプレートがトリプシン処理され、次々と低い希釈で蒔きなおし、DNA の調製と PCR のステップが、ターゲットされた細胞を分離するのに必要なまで繰り返される。

【0194】

ここで述べられたターゲティングの手法は、通常の薬剤供給のために hGH を産生させる目的で、不死化されたヒトの細胞 (たとえば HT1080 線維芽細胞、HeLa、MCF-7 乳癌細胞、K-562 白血病細胞、KB 癌細胞、あるいは 2780AD 卵巣癌細胞) において hGH の発現を活性化することにもおそらく使用されるだろう。

【0195】

k. ヒト hGH 遺伝子の隣接配列に対するターゲティングと、ターゲティングされた一次、二次および不死化されたヒト線維芽細胞のポジティブあるいはポジティブ/ネガティブ組み合わせ選択システムによる単離

p5' hGH-mMT を構築するためのストラテジーは、mMT プロモーターに隣接した neo 遺伝子の挿入という付加的なステップを続けて行うことができる。加えて、ネガティブな選択マーカー、例えば gpt [pMSG (ファルマシア) あるいは他の適切な供給源から得られる] は pUC12 ポリリンカー中の HUMGHCSA 配列に隣接して挿入することができる。前者の場合、G418^r コロニーが分離され、ターゲットされたコロニーを同定するためにコロニー集団から調製された DNA の PCR 増幅、又は制限酵素とサザンハイブリダイゼーション分析によりスクリーニングされる。後者の場合、G418^r コロニーは、gpt 遺伝子の組み込みのネガティブ選択のために、thioxanthine を含む培養液中に蒔かれる [ベスナード (Besnard, C) ら、*Mol. Cell. Biol.* 7:4139-4141 (1987)]。付言するに、HSV-TK 遺伝子は gpt のような挿入配列とは反対側に配置でき、それにより、400 μg/ml の G418、100 μM の 6-thioxanthine、25 μg/ml gancyclovir を含むヒト線維芽細胞栄養培養液中で細胞を増殖させること

10

20

30

40

50

により、neo に対するポジティブ選択あるいはgpt とTK両方に対するネガティブ選択が可能となる。二重のネガティブ選択法は、真のターゲティングに対し、ほぼ完全な選択法となるであろう。サザンブロット分析は確認的なものである。

【 0 1 9 6 】

ここで述べられたターゲティングの手法は、通常の薬剤供給のためにhGHを産生させる目的で、不死化されたヒトの細胞（たとえばHT1080線維芽細胞、HeLa、MCF-7 乳癌細胞、K-562 白血病細胞、KB癌細胞、あるいは2780AD卵巣癌細胞）においてhGH の発現を活性化することにも、おそらく使用されるだろう。

【 0 1 9 7 】

実施例 19 . ヒトの成長ホルモンとエリスロポエチンの配列が融合されたキメラ型転写単位を生じさせるターゲティングプラスミドの構築

10

以下の実施例は、得られたままのトランスフェクトされていない状態では検出可能な量のEPOを発現しないような一次あるいは二次の線維芽細胞株において、ヒトEPO 遺伝子の上流に位置する本来の調節配列をhEPOの発現が可能ないように変化させる、という本発明の2つのさらなる態様を説明している。これらの態様において、ターゲティングの結果物は、ヒト成長ホルモン遺伝子第1エキソンがEPOのエキソン 2-5 の上流に位置するようなキメラ型転写単位である。転写、スプライシング、翻訳の産物は、hEPO のシグナルペプチドのアミノ酸 1-4がhGH のアミノ酸残基 1-3に置き変わったようなタンパク質である。2つの態様は、挿入される外来の調節配列の相対的な位置と、最終的にプロセッシングされた転写産物を生産するのに必要であるスプライシングの特異的なパターンに関して異なる

20

【 0 1 9 8 】

プラスミド pXEP0-10 は、ヒトの第7染色体上に内在的に存在する hEPO 遺伝子に対するジーンターゲティングにより、hEPOのエキソン 1をhGH のエクソン 1で置き換えるためにデザインされる。プラスミド pXEP0-10 は以下のように構築される。まず、HindIII-BamHIで切断されたpBluescriptII SK+ (Stratagene, LaJolla, CA)中に、hEPOのコード領域の上流に存在する6kbのHindIII-BamHIフラグメント(実施例18f参照)を挿入することにより、中間的なプラスミド pT163が構築される。このライゲーションの産物は、pT163を構築するために、XhoI およびHindIII で切断されpMCIneoPolyA [Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. *Cell* 51: 503-512 (1987)。Stratagene, LaJolla, CAから入手可能] 由来の1.1kb HindIII-XhoI フラグメントにライゲートされる。オリゴヌクレオチド 13.1-13.4は、融合フラグメント作製のためにポリメラーゼ・チェイン・リアクションに利用される。融合フラグメントとはマウスメタロチオネイン 1(mMT-1) プロモーター - hGH エキソン1 配列が、hEPOイントロン1 の配列に付加的に融合されたものである。まず、オリゴヌクレオチド13.1と13.2が、pXGH5 由来の約0.73kbのmMT-1 プロモーター - hGH エキソン1 フラグメントを増幅するために使用される(図1)。次に、オリゴヌクレオチド 13.3と13.4が、主としてヒトゲノムDNA 由来の hEPO イントロン1 よりなる約0.57kbのフラグメントを増幅するために、使用される。最後に2つの増幅されたフラグメントが混合され、最終的な融合フラグメント(融合フラグメント3)を作製するために、オリゴヌクレオチド13.1と13.4でさらに増幅される。融合フラグメント3は、SalI 部位によりmMT-1

30

40

【 0 1 9 9 】

- 13.1 5' AAAAGTCGAC GGTACCTTGG TTTTAAAAAC CAGCCTGGAG
 SalI kpnI
 (SEQ ID NO 13)
- 13.2 5' CCTAGCGGCA ATGGCTACAG GTGAGTACTC GCGGGCTGGG CG
 (SEQ ID NO 14)
- 13.3 5' CGCCCAGCCC GCGAGTACTC ACCTGTAGCC ATTGCCGCTA GG
 (SEQ ID NO 15)
- 13.4 5' TTTTCTCGAG CTAGAACAGA TAGCCAGGCT GAGAG
 XhoI
 (SEQ ID NO 16)

10

オリゴ13.1の太文字でない領域は、5'末端に本来の Kpn I 部位を有する mMT-I プロモーターに同一である。太文字の部分は、5'末端を Sal I 部位に変換するための Sal I 部位のテール(tail)を意味する。オリゴ13.2と13.3の太文字領域は hGH 配列を意味し、一方太文字でない領域は hEP0 遺伝子由来のイントロン 1 配列である。オリゴ13.4の太文字でない領域は hEP0 イントロン 1 の最後の 25 ベースに同一である。太文字の領域は、増幅されたフラグメントの 3'末端を Xho I 部位に変換するための Xho I 部位のテールを含む。

【 0 2 0 0 】

20

プラスミド pXEPO-11 は、mMT-I プロモーターと hEP0 構造遺伝子上流に存在する hGH のエキソン 1 とプロモーター領域をヒト第 7 染色体上の内在的な hEP0 の領域に配置するように、ジーンターゲットングによりデザインされる。プラスミド pXEPO-11 は以下のように構築される。オリゴヌクレオチド 13.1 と 13.5-13.7 が、融合フラグメントを作製するためにポリメラーゼ・チェーン・リアクションにおいて利用される。融合フラグメントとは、マウスメタロチオネイン I (mMT-I) プロモーター - hGH エキソン 1 配列が、hEP0 コード領域に対し -1 から -630 に相当する hEP0 の配列に融合されたものである。最初に、pXGH 5 由来の約 0.73kb の mMT-I プロモーター - hGH エキソン 1 のフラグメントを増幅するために、オリゴヌクレオチド 13.1 と 13.5 が使用される (図 1)。次にヒトのゲノム DNA から、主として hEP0 のコード領域に対し -1 から -620 に相当する hEP0 の配列よりなる約 0.62kb

30

のフラグメントを増幅するために、オリゴヌクレオチド 13.6 と 13.7 が使用される。オリゴ 13.5 と 13.6 の両方は、hGH イントロン 1 hEP0 プロモーター領域に位置する 10bp のリンカー配列を含んでおり、その配列は、天然の hEP0 イントロン 1 のスプライス供与部位に相当する。最後に、mMT-I 部分の 5' 側の Sal I 部位と hEP0 プロモーター領域の 3' 側の Xho I 部位により隣接された最終的な融合フラグメント (融合フラグメント 6) を作製するために、2 つの増幅されたフラグメントは混合され、さらにオリゴヌクレオチド 13.1 と 13.7 で増幅される。融合フラグメント 6 は、Xho I と Sal I で切断され、Xho I で切断された pT163 に結合される。ライゲーションの混合液は E. coli にトランスフォームされ、hEP0 プロモーター配列の 3' 側に Xho I 部位が復活した融合フラグメント 6 が一つ挿入されたクローンが同定され、pXEPO-11 と命名される。

40

【 0 2 0 1 】

13.5 5' CCTAGCGGCA ATGGCTACAG GTGAGTACTC AAGCTTCTGG
 HindIII
 GCTTCCAGAC CCAG (SEQ ID NO 17)

13.6 5' CTGGGTCTGG AAGCCCAGAA GCTTGAGTAC TCACCTGTAG
 HindIII
 CCATTGCCGC TAGG (SEQ ID NO 18)

13.7 5' TTTTCTCGAG CTCCGCGCCT GCGCGGGGTC CCTC
 XhoI
 (SEQ ID NO 19)

10

オリゴ13.5と13.6の太文字の領域は hGHの配列を意味する。イタリックの領域は hEPO イントロン1の最初の10塩基対に相当する。残りのオリゴは hEPO コード領域に対し-620から-597のhEPOの塩基配列に相当する。オリゴ13.7の太文字でない領域は hEPO のコード領域に対し-1から-24の塩基と同一である。太文字の領域は、増幅されたフラグメントの3'末端を XhoI 部位に変換するための XhoI 部位のテールを含んでいる。

20

【0202】

プラスミド pXEPO-10は、hEPOの配列を両側に連結したmMT-1/hGH 融合物を含む7.3kb のフラグメントを Bam HI とXhoIで切断して遊離することにより、ジーンターゲティングのために使用され得る。このフラグメント(ターゲティングフラグメント1)はhEPOのコード配列を含んでおらず、ヒトのEPO の遺伝子座(locus)にターゲティングを方向づけするhEPOのコード領域の上流-620から約-6620の配列とhEPOイントロン1の配列のみを有している。ターゲティングフラグメント1は、実施例18cで述べられていると同様の条件を用いて一次あるいは二次の皮膚線維芽細胞にトランスフェクトされる。G418に耐性のコロニーを選んで96ウエルプレートの各ウエルに入れ、ELISA アッセイ(R & D システム、ミネアポリスMN)によりEPO の発現がスクリーニングされる。トランスフェクト(transfecting) DNAがランダムにヒトゲノム中に組み込まれた(integrates)細胞は、EPO を産生することができない。トランスフェクト(transfecting)DNA が、内在的なhEPOイントロン1および hEPO 上流配列と相同組み換えをおこした細胞は、mMT-1 のプロモーター、非転写配列、hGHの5'非翻訳配列、hGH エキソン1が正常の hEPO のプロモーターと hEPO エキソン1に入れ替わったキメラ遺伝子を含んでいる(図7参照)。ターゲティングフラグメント1中の非hEPO配列は、hEPOイントロン1の下流のhEPO配列に結合している。天然の hEPO 調節領域のmMT-1 プロモーターによる置換は、本来ならEPO を発現しない線維芽細胞中のEPO 遺伝子を活性化する。hEPOエキソン1の hGHエキソン1による置換により、hEPOシグナルペプチドの最初の4アミノ酸が hGHのアミノ酸1-3に置換されているタンパク質が得られ、翻訳後のプロセッシングにより成熟したタンパク質から除かれ、発現細胞により分泌される機能的なキメラのシグナルペプチドが生成される。

30

40

【0203】

プラスミド pXEPO-11は、Bam HIとXhoIで処理することにより、両端が hEPO 配列により flank された(flanked) mMT-1/hGH 融合体を含む7.4kb のフラグメントを得て、ジーンターゲティングに用いることができる。このフラグメント(ターゲティングフラグメント2)は、hEPOをエードする配列を含んでおらず、ヒトEPO領域へのターゲティングを指向するため、hEPOコード領域の-1からおよそ-6620上流にある配列のみを有する。ターゲティングフラグメント2は実施例18gに記載されたものと同様の条件を用いて、一次又は二次ヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクトされる。G418耐性コロニーは96穴プレートの各々の穴に分別され、ELISA

50

アッセイ (R & D システムズ , ミネアポリス , ミネソタ) により、 E P O の発現でスクリーニングされる。トランスフェクトした D N A がヒトゲノムの中ヘランダムにとりこまれた細胞は E P O を産生できない。フラグメントした D N A が内在性の h E P O プロモーター及び上流の配列と相同組み換えを起こした細胞は、 m M T - I プロモーターと非転写配列、 h G H 5 ' 非翻訳配列及び h G H エキソン 1 及び、 h E P O イントロン 1 の最初の 10 塩基から成る 10 塩基対リンカーが h E P O をコードする領域に対して - 6 2 0 位 (position) に存在する H i n d I I I 部位に挿入されたキメラ遺伝子を含んでいる (図 8 参照) 。通常サイレントである h E P O プロモーターの上流に m M T - I プロモーターが存在することにより、 (5 ' から 3 ' への) 非翻訳メタロチオネイン及び h G H 配列、 h G H エキソン 1、 h E P O イントロン 1 由来の最初の 10 塩基と同一の 10 塩基、そして通常

10

の h E P O プロモーターと h E P O エキソン 1 (E P O をコードする配列に対して - 6 2 0 から + 1 3 位) のメッセージ (message) の合成が、一次あるいは二次皮膚線維芽細胞中で導かれるであろう。 h E P O イントロン 1 の 10 塩基対リンカー配列は、 h G H エキソン 1 を続く下流の h E P O エキソン 2 のすぐ上流であるスプライスアクセプタ部位に結合させるためのスプライスドナー部位として働く。よってその結果、生じる転写のプロセッシングは、 h E P O プロモーター、エキソン 1 そしてイントロン 1 配列をスプライスアウトするであろう。 h G H エキソン 1 による h E P O エキソン 1 の置換により、 h E P O シグナルペプチドの最初の 4 アミノ酸が、 h G H のアミノ酸 1 ~ 3 で置きかわった蛋白が得られ、成熟蛋白から翻訳後プロセッシングによって切り離され発現細胞から分泌される機能的なキメラシグナルペプチドを作りだすことになる。

20

【 0 2 0 4 】

p X E P O - 1 0 と p X E P O - 1 1 に関する一連の構築物は、公知方法を用いて構築されるであろう。これらの構築物においては、 m M T - I プロモーターと h G H 配列の相対的位置は、 m M T - I / h G H 配列が h E P O 上流配列に挿入される位置と同様、ジーンターゲティングを促進する別のキメラ転写ユニットを作るため、融合転写体のより能率的な発現を生じさせるため、又は、他の望ましい性質を付与するため変えることができる。このような構築物は、通常の h E P O 領域を指向したジーンターゲティングにより、 h G H - h E P O 融合遺伝子が外来性のプロモーターの支配下にあると同様の結果を与えるであろう。例えば、 h E P O 遺伝子の上流にある 6 k b の H i n d I I I - B a m H I フラグメント (実施例 1 8 f 参照) は、 n e o 遺伝子と m M T - I プロモーター / h G H

30

融合フラグメントの挿入部位に用いうる多くの制限酵素認識部位を有する。このような部位の 1 つ、 H i n d I I I 部位のおよそ 1 . 3 k b 上流にある B g l I I I 部位は、この領域で唯一のものであり、 1 個又はそれ以上の選択マーカー及び一次、二次あるいは不死化したヒト細胞での E P O 発現の活性化に寄与する他の遺伝子の調節領域の挿入に用いうる。

【 0 2 0 5 】

第一に、中間体プラスミド p T 1 6 4 は、 h E P O コード領域の上流にある 6 k b H i n d I I I - B a m H I フラグメント (実施例 1 8 f) を、 H i n d I I I - B a m H I で処理された p B l u e s c r i p t I I S K + [ストラタジーン , ラジヨラ , カリフォルニア (Stratagene , Lajolla , CA)] に挿入することにより、構築する。プラスミド p

40

M C 1 n e o P o l y A [トーマス K . R . 及びカペッチ M . R . (Thomas , K . R . and Capecchi , M . R .) Cell 51 503-512 (1987) : ストラタジーン , ラジヨラ , カリフォルニア (Stratagene , Lajolla , CA) より市販] は B a m H I 及び X h o I によって処理され、 E . coli D N A ポリメラーゼのクレノー断片処理により、平滑末端化し、それによって生じる 1 . 1 k b のフラグメントが精製される。 p T 1 6 4 は B g l I I I で処理され、 E . coli D N A ポリメラーゼのクレノー断片処理により、平滑末端化される。前記 2 個の平滑末端断片はつなぎ合わされ、コンピテント (competent) E . coli 中にトランスフォームされる。 1 . 1 k b の n e o フラグメントが 1 個挿入されたクローンを単離し、平滑な X h o I 部位と B g l I I I 部位の融合にて再生された B g l I I I 部位がプラスミド p T 1 6 4 にある唯一の H i n d I I I 部位から 1 . 3 k b 離れたところに位置しているものを

50

翻訳配列及びhGHエキソン1、及びhEPOイントロン1の最初の10塩基対から成る10塩基対リンカーがhEPOをコードする領域に対しておよそ-1920の位置にあるBglII部位に挿入されているキメラ遺伝子を含んでいる。通常サイレントであるhEPOプロモーターの上流にmMT-Iプロモーターが存在することにより、(5'から3'への)非翻訳メタロチオネイン及びhGHの配列、hGHエキソン1、hEPOイントロン1の最初の10塩基対と同一のDNA10塩基、及びhEPO上流領域とhEPOエキソン1(EPOをコードする配列に対し、およそ-1920から+13位)のメッセージの合成が一次、二次あるいは不死化線維芽細胞(又は他のイト細胞)中で導かれるであろう。hEPOイントロン1由来の10塩基対リンカー配列は、hGHエキソン1をhEPOエキソン2のすぐ上流にある下流のスプライスアクセプター部位に結合させるためのスプライスドナー部位として働く。その結果生じる転写のプロセッシングは、hEPO上流配列、プロモーター領域、エキソン1及びイントロン1配列をスプライスアウトするであろう。pXEPO-10、-11及び-12を用いた場合、メッセージの転写後のプロセッシングは、mMT-IプロモーターとhEPOエキソン1の間のhEPO上流配列にある所望のメッセージを作り出すのに必要な生産的スプライシングの発生レベルを下げるスプライスアクセプター部位を除去するインビトロ突然変異法を用いることにより、改良されるかもしれない。hGHエキソン1によるhEPOエキソン1の置換により、hEPOシグナルペプチドの最初の4アミノ酸がhGHのアミノ酸1-3で置きかわったタンパク質が得られ、成熟タンパク質から翻訳後プロセッシングにより切り離され、発現細胞から分泌されるキメラシグナルペプチドが生じる。

【0210】

実施例20. hGH及び/又はneo遺伝子を有するプラスミドによる正常ヒト乳房上皮細胞の安定なトランスフェクション

乳組織から分離された管断片の消化によりヒト乳房上皮細胞(HMEC)を得る。乳組織は脂肪を取り去り、2~4mm³の薄片に細切する。細切された組織は、ハンクス基本塩溶液(HBSS)で洗い、次にトリプシン化フラスコ〔ベルコ、ヴィンランド、ニュージャージー(Bellico, Vineland, NJ)〕中で10g組織あたりおよそ50mlの酵素溶液の割合で、酵素溶液にひたす。酵素溶液はコラゲナーゼA(ベーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、インディアナ)1mg/ml及びヒアルロンダーゼ(シグマ、セントルイス、モンタナ)100ユニット/mlを、5%子ウシ血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(ギブコ、グランドアイランド、ニューヨーク)及び10µg/mlウシインシュリン(シグマ)を含む乳房上皮細胞基本培地(MEBM、クロネケティクス、サンディエゴ、カリフォルニア)で溶解したものから成る。消化は、37、5%CO₂の条件下、オービタル振盪機(180rpm)で一晩行われる。消化された組織は、大口径のピペットで繰り返し吸引放出することによりさらに分解させる。管断片(ductal fragment)は、15又は50mlの円錐遠心分離管で1000rpm、10分間遠心し、HBSS(10~40ml)で3回洗う。ペレットは、凍結用培地(MEBM+20%子ウシ血清+10%DMSO)に再度懸濁させ、液体窒素で凍らせておくか、単一細胞を得るために更に消化を行う。単一細胞を得るために、トリプシン(0.05%トリプシン-EDTA、ギブコ)を管ペレット(0.5mlペレットあたり10mlトリプシン)に加え、オービタル振盪機上で37、30分(200rpm)インキュベートする。トリプシン処理は、2mlの子ウシ血清を加えて終了させ、細胞は1200rpm10分間の遠心で沈殿させる。細胞ペレットは増殖用培地に再懸濁させ、数を数えて非コーティング培養器に10,000cells/cm²接種する。HMECは、ウシインシュリン(10µg/ml、シグマ)、上皮細胞成長因子(10ng/ml、コラボラティブリサーチ、ワルサム、マサチューセッツ)、ウシトランスフェリン(5µg/ml、シグマ)、ヒドロコチゾン(0.14µM、シグマ)及びウシ下垂体抽出物(35µg/ml、シグマ)を含むMEBMからなる血清を含まない成長培地MEGMで通常培養される。

【0211】

培養初期のサブコンフルエント(subconfluent)なHMECがトリプシン処理され、HBSS

10

20

30

40

50

S + 15%子ウシ血清に再懸濁され、計数される。細胞は次にペレットにし、10 mlのエレクトロポレーション緩衝液 (EPB) に再懸濁して、もう一度ペレットにする。細胞は 3×10^6 cells/ml の割合で EPB + ウシ血清アルブミン (BSA, シグマ) に再懸濁させる。スーパーコイルプラスミド DNA を 0.4 cm 電極ギャップを有する滅菌キュベット (バイオラッド, メルヴィル, ニューヨーク) に加える。0.5 ml の細胞懸濁液をキュベットに加え、滅菌トランスファーピペット (コスター, ケンブリッジ, マサチューセッツ) を用いて DNA と混合する。エレクトロポレーションのため、ジーンパルサー機器 (バイオラッド, メルヴィル, ニューヨーク) は、容量 960 μ F 及び 150 - 400 V にセットする。エレクトロポレーションに続いて、細胞はトランスファーピペットで除かれ、MEGM を入れた 15 ml ポリプロピレン円錐遠心管に移される。細胞懸濁液は、選別のため、 1.5×10^6 cells / 100 mm dish の密度で組織培養皿に加えられる。48 時間後、細胞は 50 μ g/ml の G418 (ジェネチシン, ギブコ) を含む MEGM で再び培養される。選別皿は、2 mm² 又はそれ以上大きな独立したコロニーが認められるまで、14 ~ 28 日間インキュベートされる。選別期間中、培養物には 1 週間 MEGM + 50 μ g/ml G418 を再添加せず、その後、週 2 回再添加する。コロニーは、クローニングシリンダーで単離され、96 又は 24 穴プレートに移される。

10

【0212】

HMEC は、電圧域 150 - 400 V で、pXGH301 (120 μ g)、pcDNEO (5 - 60 μ g) でトランスフェクトされるか又は pXGH5 と pcDNEO (各々 100 μ g) でコトランスフェクトされた。23 個の hGH 発現クローンにおける hGH 発現の平均は 2.2 μ g hGH / 10^6 cells / 24 時間であった。表 9 はトランスフェクトされたクローンとトランスフェクトされなかったクローンのサンプルが示した細胞分裂の数を要約したものである。データが示すように安定にトランスフェクトされたヒト乳房上皮細胞クローンは 20 回以上の細胞分裂を示し、インビボでの蛋白供給や遺伝子治療のための細胞移植物としても使えるかも知れない。

20

【0213】

【表 9】

表 9

ヒト乳房上皮細胞クローンの集団倍化能力

条 件	次のmpdに達した クローンの数:	
	10-20mpd	>20mpd
トランスフェクションせず	12	10
pcDNEO	2	13
pXGH301	1	5
pcDNEO+pXGH5	12	15

30

40

【0214】

実施例 2.1 . 不死化ヒト線維芽細胞株におけるヒト EPO 領域のターゲティングと活性化
ヒト線維芽細胞中で内在性 hEPO 遺伝子が活性化されうるといふ仮説を試すため、ターゲティング構築物 pXEPO-13 が作られた。まず、マウスのメタロチオネイン - 1 プロモーター (mMT-I) に結合した hEPO 遺伝子の最初のコドンの上流にある 63 bp のゲノム hEPO 配列を含むプラスミド pT22.1 が構築された。mMT-I と hEPO 配列を結合させるため、オリゴヌクレオチド 22.1 から 22.4 が PCR に用いられた。これらのプライマーの性状は次の通りである。22.1 は、mMT-I KpnI 部位の 28 bp 上流から始まる mMT-I プロモーターの一部と相同な 21 塩基オリゴヌ

50

クレオチドである。22.2と22.3は、hEPO遺伝子の最初のコドンの35塩基上流に始まる28bpのhEPO配列及びオリゴヌクレオチド22.2の塩基29から始まるmMT-I配列を含むようなhEPO及びmMT-I配列の結合を定める58ヌクレオチドの相補的プライマーであり、天然のmMT-IのBglIII部位を有し、mMT-I配列を30塩基延長させる。22.4は21ヌクレオチドの長さでhEPO遺伝子の最初のコドンの725bp下流に始まるhEPO配列と相同である。これらのプライマーは、上述のようにmMT-IとhEPO配列の融合物を含む1.4kbのDNA断片を増幅するのに用いられた。その結果生じるフラグメントは、KpnIで切断され（PCRフラグメントは2つのKpnI部位を含む：mMT-Iプロモーター領域唯一の天然KpnI部位と、hEPO配列中唯一の天然KpnI部位である）、精製される。プラスミドpXEPO1（図5）は、同様にKpnIで切断され、1.4kbフラグメントと6.4kbフラグメントを遊離させた。6.4kbフラグメントは精製され、1.4kbのKpnI PCR融合フラグメントにつながれた。得られた構築物をpT22.1と呼ぶことにした。2番目の中間体、pT22.2はhEPO構造遺伝子上流にあるおよそ6kbのHindIII-BamHIフラグメント（実施例18f参照）をBamHIとHindIIIで切断したpBSISK+（ストラタジーン，ラジヨラ，カリフォルニア）につないで構築した。3番目の中間体pT22.3の構築はまず、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むpMCINEOpolyA（ストラタジーン，ラジヨラ，カリフォルニア）から1.1kbのXhoI/BamHIを切り出した。フラグメントは次にDNAポリメラーゼIのクレノー断片（ニューイングランド バイオラプス）で平滑末端化された。このフラグメントは、次にpBSISK+のHincII部位（同様にしてDNAポリメラーゼIで平滑末端化している）につながれて、pT22.3が作られた。4番目の中間体、pT22.4はpT22.2由来のneo遺伝子を含む1.1kbのXhoI/HindIIIフラグメントを精製し、このフラグメントをXhoIとHindIIIで切断したpT22.2につないで作られた。従ってpT22.4はhEPOフラグメント上流のBamHI-HindIIIのHindIII部位に隣接したneo遺伝子を有する。最後にpXEPO-13は、pT22.1から2.8kb EcoRI/AccIフラグメントをまず切り出すことにより作られた。このフラグメントのEcoRI部位は、mMT-Iプロモーターの5'境界を定め、一方、このフラグメントのAccI部位はhEPOエキソン5の中にある。このようにAccI/EcoRIフラグメントは、ほとんど完全なhEPO発現ユニットを含み、エキソン5の一部と天然のポリアデニル化部位のみを欠く。この2.8kb EcoRI/AccIフラグメントは精製され、DNAポリメラーゼIのクレノー断片処理により平滑末端化され、そしてXhoIで処理され、平滑末端化したpT22.4につなぎ合わされた。

【0215】

HT1080細胞はPvuI-BamHIで切断されたpXEPO-13でトランスフェクトされた。このように切断されたpXEPO-13は次のような3つの断片を作る。amp遺伝子の一部を含む1kbのベクターフラグメント、残りのベクター配列の1.7kbフラグメント及びhEPO, neoおよびmMT-I配列を含む約8.9kbの断片である。8.9kbのBamHI/PvuIフラグメントは、次の配列をBamHI部位から順に含んでいた。6.0kbの上流hEPOゲノム配列、1.1kbのneo転写ユニット、0.7kbのmMT-Iプロモーター及びエキソン5内にトランケートされた2.8kbのhEPOコーディング配列である。上記方法で切断された45μgのpXEPO-13は、1200万個の細胞のエレクトロポレーションに用いられた（エレクトロポレーション条件は、実施例18bに記載）。このエレクトロポレーションは合計8回繰り返され、計9600万細胞に行われた。細胞はmlあたり100万個の細胞密度になるよう培地と混合され、1ml量が各々最少35mlのDMEM/15%子ウシ血清を含む計96個の150mm組織培養プレート（ファルコン）に分注された。翌日、培地は吸引除去され、0.8mg/mlのG418（ギブコ）を含む新しい培地に交換された。10日間のインキュベーションの後、各プレートの培地はhEPOのELISA分析（R&Dシ

10

20

30

40

50

ステムズ)のため、サンプリングされた。96プレートのうち6個が少なくとも10mU/mLのhEPOを含んでいた。これらのプレートの1つ、第18番がhEPO発現コロニーの精製のために選ばれた。96の150mmプレートの各々がおよそ600のG418耐性コロニー(全96プレート上のG418耐性コロニーの集計見積もりは57,600)を含んでいた。18番プレート上の約600コロニーは、トリプシン処理され、364穴プレート(ステアリン)に50cells/mLで再接種された。1週間のインキュベート後364穴プレートの大きい穴あたり約10個の割合で、単独のコロニーが見えるようになった(このプレートは24の大きい穴の各々の中に16の小さい穴がある)。個々の穴は、この時hEPO発現についてスクリーニングされた。2つの大きい穴が少なくとも20mU/mLのhEPOを含んでいた。A2号の穴で16の小さい穴の間に15のコロニーがあることが認められた。これらの小さい穴の個々の中身はトリプシン処理され、96穴プレートの16の別々の穴に移された。7日間のインキュベートの後、これら各々の穴から培地がhEPOのELISA分析のためサンプリングされた。番号10の穴1つだけがhEPOを含んでいた。この細胞株は、HT165-18A2-10と命名され、定量的EPO分析、RNA単離、DNA単離のため培養に供された。hEPO生産の定量分析の結果は、2,500ミリユニット/100万細胞/24時間であった。

10

【0216】

hEPOエキソン5のAccI部位から3'非翻訳領域のBglII部位にのびる0.2kbのDNAプローブが、HT165-18A2-10細胞のゲノムDNAのプローブに用いられた。エキソン5のAccI部位でトランケートされたターゲティング構築物、pX EPO-13は、これらAccI/BglII配列を有していないので、hEPO領域のターゲティングのため好適(diagnostic)である。天然hEPO配列が相同的に組み込まれた細胞株だけがAccI/BglII配列と相同配列を含むhEPO mRNAを作るのであろう。HT165-18A2-10は、32-PでラベルしたAccI/BglII hEPOプローブとハイブリダイズする予期された大きさのmRNAを発現しているのがノーザンブロットにおいて認められた。制限酵素とサザンブロット分析により、neo遺伝子とmMT-IプロモーターはHT165-18A2-10細胞の2つのhEPOアレルのうちの1つに対してターゲットされたことが確認された。

20

【0217】

これらの結果により、相同組み換えは、ヒト線維芽細胞中で通常サイレントである遺伝子の調節領域をターゲットし、その遺伝子の機能を活性化させるのに用いることが示された。

30

【0218】

22.1 5' CACCTAAAAT GATCTCTCTG G (SEQ ID NO 22)

22.2 5' CGCGCCGGGT GACCACACCG GGGGCCCTAG ATCTGGTGAA
GCTGGAGCTA CGGAGTAA (SEQ ID NO 23)

40

22.3 5' TTA CTCCGTA GCTCCAGCTT CACCAGATCT AGGGCCCCCG
GTGTGGTCAC CCGGCGCG (SEQ ID NO 24)

22.4 5' GTCTCACCGT GATATTCTCG G (SEQ ID NO 25)

【0219】

配列表フリーテキスト

配列番号：1の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。

配列番号：2の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。

50

配列番号：3の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：4の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：5の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：6の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：7の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：8の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：9の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：10の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：11の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：12の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：13の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：14の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：15の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：16の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：17の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：18の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：19の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：20の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：21の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：22の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：23の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：24の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。
 配列番号：25の塩基配列は、実施例で使用したプライマーの配列である。

10

20

【0220】

均等物

当業者であれば、単に常識的実験手法を用いて、ここに述べた発明の具体的態様に対する多くの均等物を知りまた確認し得るであろう。これらのおよび他の全ての均等物は下記のクレームの範疇に含まれるものである。

【0221】

【発明の効果】

本発明により、特にヒトの遺伝子療法に有益な、直鎖状DNA構築物、タンパク質を生産する方法、一次または二次細胞に存在する遺伝子の発現を変える方法、トランスフェクトされた一次または二次細胞、トランスフェクト二次細胞のクローン細胞株を生産する方法、並びにトランスフェクト二次細胞のクローン細胞株が提供される。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、マウスメタロチオネインプロモーターの支配下にあるヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子を含むプラスミドpXGH5の概略図である。

【図2】図2は、プラスミドpCDのBamHI部位に挿入したプラスミドpSV2neoに由来するneoコード領域(BamHI-BglII断片)、pBR322由来のAmp^r-R配列とpBR322Ori配列、およびSV40由来のポリAと16Sスプライスジャンクションと初期プロモーター領域を含むプラスミドpCDNEOの概略図である。

40

【図3】図3は、ヒト成長ホルモン遺伝子およびneo遺伝子を含むプラスミドpXGH301の概略図である。

【図4】図4は、本発明の方法の流れ図である。

【図5】図5は、プラスミドpXEP01の概略図である。黒色実線アークはpUC12バックボーンを示し、矢印はアンピシリン抵抗性遺伝子の転写の方向を示す。点線アークはマウスメタロチオネインプロモーター(pmMT1)を示す。黒ボックスによって遮られた白抜きアークはヒトエリスロポエチンEPO遺伝子を示す(黒ボックスはエキソンを示し、矢印はhEPO転写方向を示す)。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の相対的位置

50

を示す。

【図6】図6は、プラスミドpE3neoEPOの概略図である。ヒトエリスロポエチン遺伝子およびneo並びにamp抵抗性遺伝子の位置を示す。矢印は様々な遺伝子の転写の方向を示す。pmMT1はマウスメタロチオネインプロモーター(hEPO発現を促す)を示し、pTKは単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼプロモーター(neo発現を促す)を示す。マップの点線部分は、ヒトHGPRT配列の位置を示す。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の相対的位置を示す。

【図7】図7は、hEPO遺伝子を転写的に活性化させる方法の図式である。

【図8】図8は、hEPO遺伝子を転写的に活性化させる方法の図式である。

【図9】図9は、トランスフェクト一次ヒト皮膚線維芽細胞(2系統、HF96-11と HF96-23)による長期インビトロhGH産生の判定結果を示す。 10

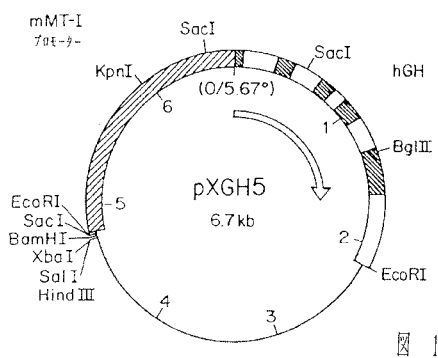
【図10】図10は、トランスフェクト一次ウサギ皮膚線維芽細胞によるインビトロでのヒト成長ホルモン(hGH)発現のグラフ図である。

【図11】図11は、トランスフェクトhGH発現ウサギ線維芽細胞を移植されたマウスにおけるhGHの血清レベルの経時変化を調べるアッセイの結果を示す。

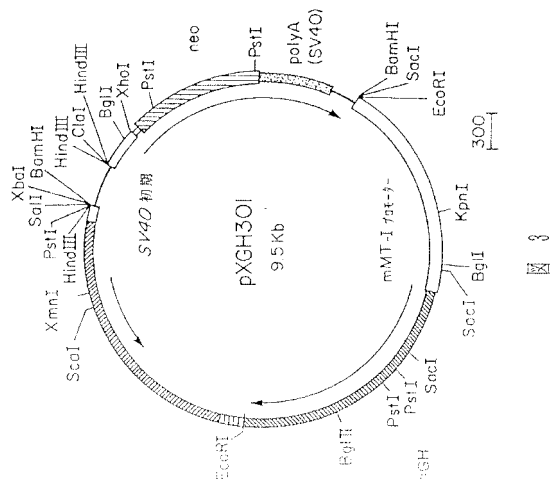
【図12】図12は、腎臓被膜下移植片から回収した細胞におけるヒト成長ホルモン(hGH)発現のグラフ図である。

【図13】図13aは、対照マウスおよびトランスフェクトhEPO発現ウサギ線維芽細胞を移植されたマウスにおけるヘマトクリット(HCT)値を示す。図13bは、トランスフェクトhEPO発現ウサギ線維芽細胞を移植されたマウスの血清中のhEPOを検出するアッセイの結果を示す。 20

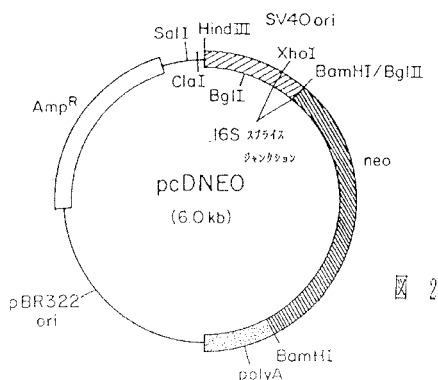
【図1】



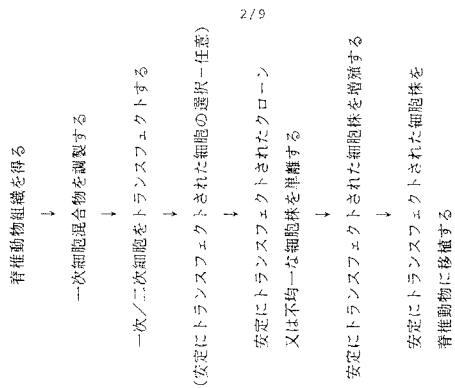
【図3】



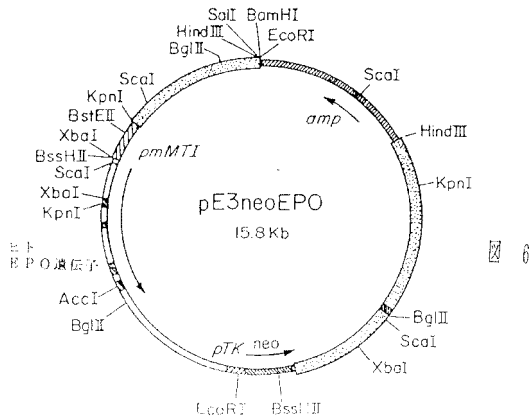
【図2】



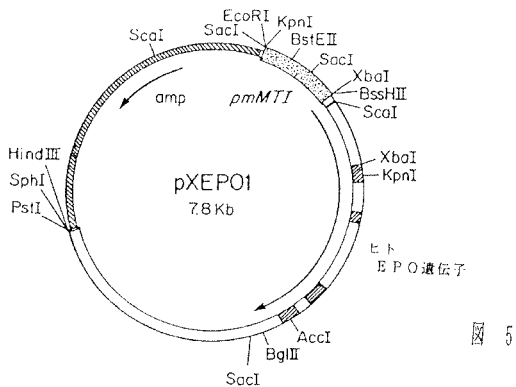
【 図 4 】



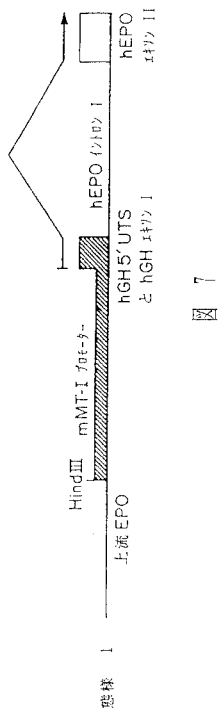
【 図 6 】



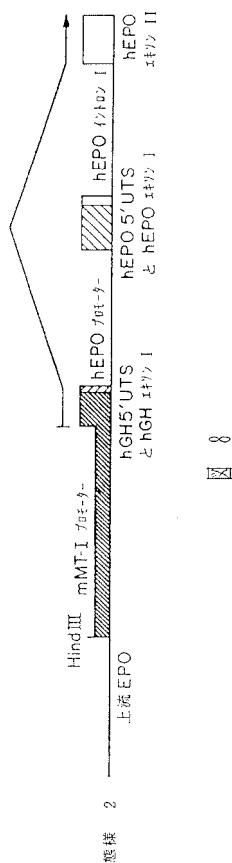
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

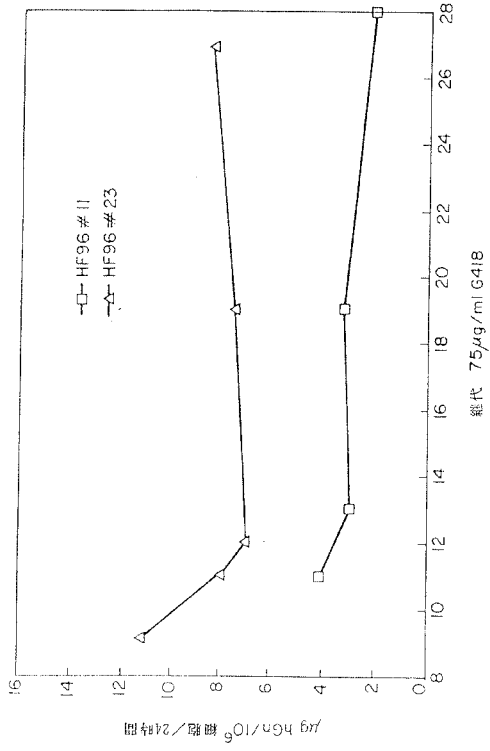


図 9

【 図 10 】

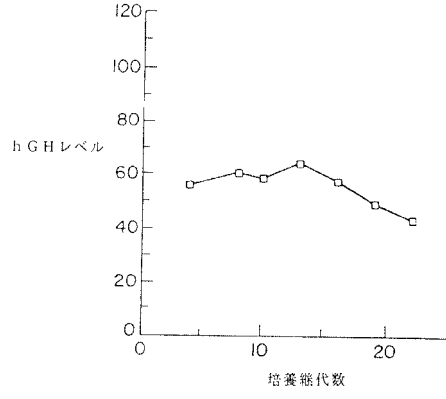


図 10

【 図 11 】

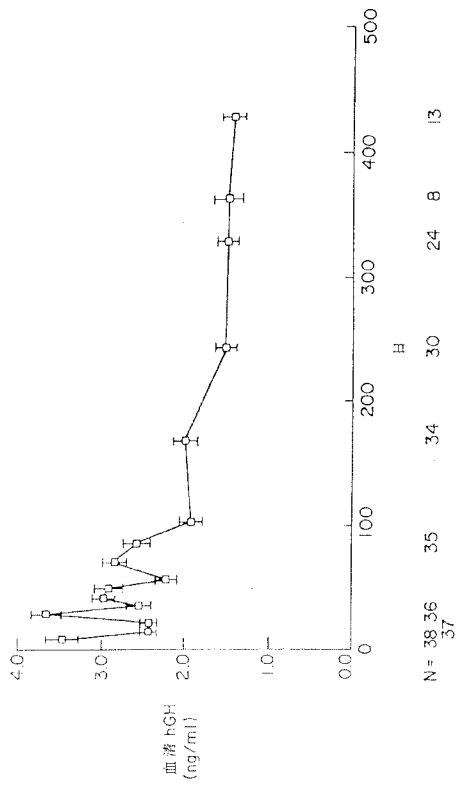


図 11

【 図 12 】

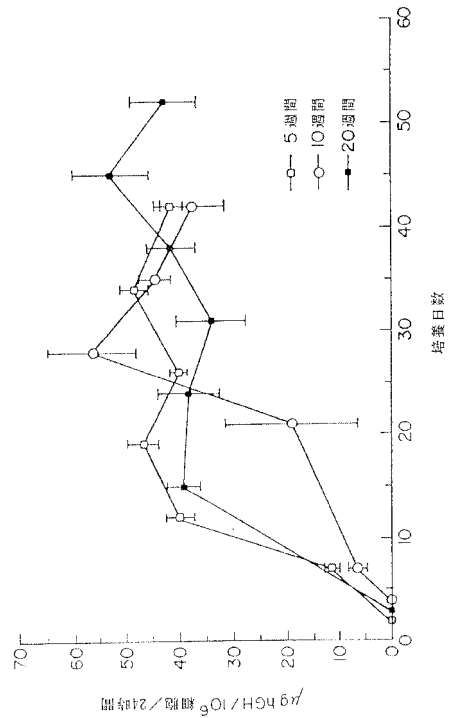


図 12

【 図 13 】

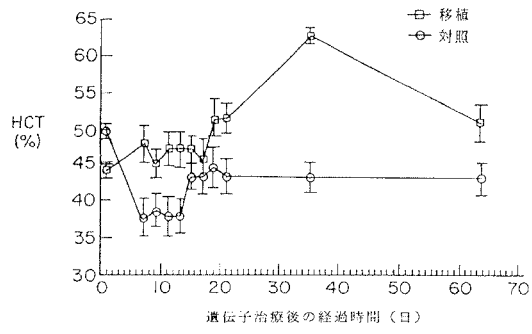


図 13a

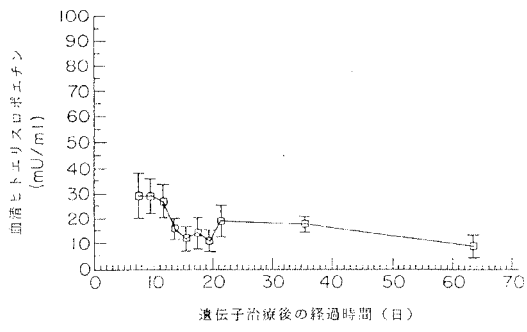


図 13b

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	5/06 (2006.01)	A 6 1 P	5/06
A 6 1 P	5/18 (2006.01)	A 6 1 P	5/18
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	39/06 (2006.01)	A 6 1 P	39/06
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 1

前置審査

- (72)発明者 ハートレイン, ミカエル ダブリユウ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 1 9 ボックスボロー, リード ファーム ロード
 1 6 7
- (72)発明者 トレコ, ダグラス エイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 7 4 アーリントン, プラントウッド ロード 8 7

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 特開昭63-126488(JP, A)
 特表平02-503265(JP, A)
 国際公開第91/009955(WO, A1)
 Science, Vol.236, pp.714-718 (1987)
 Nature, Vol.336, No.24, pp.348-352 (1988)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, pp.4294-4298 (1991)
 J.Biol.Chem., Vol.261, No.21, pp.9637-9643 (1986)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
 C12N 5/00
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 PubMed