

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502448

(P2004-502448A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 125 頁) 最終頁に続く	

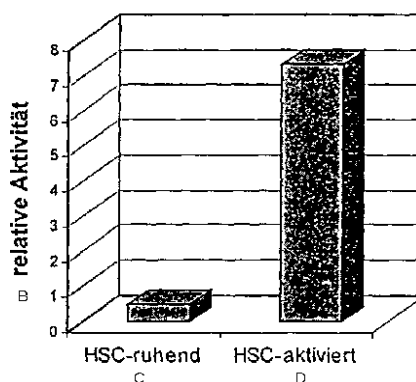
(21) 出願番号	特願2002-509372 (P2002-509372)	(71) 出願人	503019682
(86) (22) 出願日	平成13年7月10日 (2001.7.10)		セル センテル ケルン ジーエムビーエ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月10日 (2003.1.10)		イチ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007913		CELL CENTER COLOGNE
(87) 国際公開番号	W02002/004509		GmbH
(87) 国際公開日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		ドイツ国, 50931 ケルン, ヨセフ
(31) 優先権主張番号	100 33 633.7		ーステルツマンーストラッセ 50
(32) 優先日	平成12年7月11日 (2000.7.11)		Joseph-Stelzmann-Str.
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		50, 50931 Cologne,
(31) 優先権主張番号	100 53 879.7		Germany
(32) 優先日	平成12年10月31日 (2000.10.31)	(74) 代理人	100095577
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 小西 富雅
(31) 優先権主張番号	00128446.2	(74) 代理人	100100424
(32) 優先日	平成12年12月22日 (2000.12.22)		弁理士 中村 知公
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋線維芽細胞及び筋線維芽細胞様細胞における遺伝子発現、ゲノム改変、並びにレポーター発現

(57) 【要約】

本発明は、 α -平滑筋アクチン遺伝子 (α -SMA遺伝子) の特異的、調節配列領域、及び前記調節配列領域が作動的に他の機能塩基配列に結合してなる融合構造に関する。本発明はまた、細胞種特異的及び分化特異的レポーター発現、細胞種特異的及び分化特異的遺伝子変化 (改変、変異)、並びに細胞及び生物内での遺伝子発現変化のために前記調節配列領域を使用することに関する。

A Aktivität pRL-700 in HSC



A ACTIVITY pRL-700 IN HSC (HEPATIC STELLATE CELL)
 B RELATIVE ACTIVITY
 C HSC RESTING
 D...HSC ACTIVATED

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) α -SMA 遺伝子のヌクレオチド - 698 ~ + 18 からなる α 平滑筋アクチン遺伝子 (α -SMA 遺伝子) の調節配列領域からの 1 つ以上の機能領域 (番号付けは、図 5 A 及び 7 A に示される *rat tus norvegicus* の配列を意味する) と、
(ii) 天然 α -SMA をコードせず、配列 (i) と作動的に連結している少なくとも 1 つの追加の機能核酸配列と、を含む核酸配列の、
筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の SMA 陽性細胞の遺伝子発現及び / 又は一時的又は活性化後の細胞機能を操作するための医薬組成物を調製するための使用。

【請求項 2】

前記 α -SMA 遺伝子の前記調節配列領域の前記核酸配列が、
前記 α -SMA 遺伝子のヌクレオチド - 698 ~ + 18 からの少なくとも 10、好ましくは少なくとも 20 の連続した塩基を有する、及び / 又は
哺乳動物、特に霊長類、齧歯類、又は鳥類に由来し、特に好ましくはラット、マウス、ヒト、又はニワトリに由来する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記調節配列領域がラットに由来し、前記核酸配列が好ましくは、図 5 A に示される配列 (配列番号 1)、特に図 7 A に示される配列 (配列番号 5) の 1 つ以上の機能領域を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記機能領域が、
(i) 転写活性化核酸配列であり、特に、図 7 C に示される配列 (配列番号 7) に由来し、好ましくは、前記転写活性化配列は、図 7 C に示される配列の少なくとも 10、好ましくは少なくとも 40、特に好ましくは少なくとも 60 の連続した塩基を有し、特に好ましくは図 7 B 又は 7 C に示される配列 (配列番号 6 又は 7) を含むか、あるいは
(ii) 細胞種特異的核酸配列であり、特に、図 7 A の配列 - 698 ~ - 190 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 509) に由来し、特に好ましくは図 7 A の配列 - 698 ~ - 215 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 484) 又は図 7 I に示される配列 (配列番号 13) に由来し、好ましくは前記細胞特異的配列は、図 7 A の配列 - 698 ~ - 190 からの少なくとも 25、好ましくは少なくとも 35 の連続した塩基を有し、特に好ましくは図 7 I 又は 7 M に示される配列 (配列番号 13 又は 17) を含む、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記核酸配列が、転写活性化及び細胞種特異的核酸配列を含む、及び / 又は配列番号 5 ~ 17 に示される配列の中の 1 つを有する、請求項 3 又は 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記調節配列領域がマウスに由来し、好ましくは前記核酸配列図 5 B に示される配列 (配列番号 2) が 1 つ以上の機能領域を有し、特に配列番号 18 に示される配列を有する、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 7】

前記機能領域が、
(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 18 のヌクレオチド 490 ~ 697 に由来する、及び / 又は
(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 18 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 489 に由来する、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

前記調節配列領域がヒトに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 C に示される配列 (配列番号 3)、特に配列番号 19 に示される配列の 1 つ以上の機能領域を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 9】

前記機能領域が、

10

20

30

40

50

(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 513 ~ 715 に由来する、及び / 又は

(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 512 に由来する、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記調節配列領域がニフトリに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 D に示される配列 (配列番号 4)、特に配列番号 20 の配列の 1 つ以上の機能領域を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 11】

前記機能領域が、

10

(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 497 ~ 699 に由来する、及び / 又は

(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 496 に由来する、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記追加の機能核酸配列が、ペプチド又はタンパク質をコードする DNA 配列であり、特にレポーター遺伝子、薬理学的活性タンパク質をコードする配列、及び調節 DNA 配列から選択されるか、あるいは機能 RNA、特にリボザイムをコードする配列である請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

20

請求項 1 ~ 12 に定義される核酸配列、又はベクターを導入することを含み、前記核酸配列が生物又は器官に導入される、生物及び器官の筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の遺伝子発現及び / 又は細胞機能进行操作する方法。

【請求項 14】

in vivo 法又は *in vitro* 法であって、特に

(i) 前記生物又は器官への導入が、トランスジェニックノックアウト / ノックイン技術を利用して行われるか、あるいは

(ii) 前記方法が、遺伝子治療融合ベクターの利用である、

請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

30

(i) α -SMA 遺伝子のヌクレオチド - 698 ~ + 18 からなる α 平滑筋アクチン遺伝子 (α -SMA 遺伝子) の調節配列領域の 1 つ以上の機能領域 (番号付けは、図 5 A 及び 7 A に示される *rat tus norvegicus* の配列を意味する) と、

(ii) 配列 (i) と作動的に連結し、天然 α -SMA をコードせず、薬理学的活性タンパク質をコードする DNA 配列、調節配列、又は機能 RNA をコードする配列から選択される少なくとも 1 つの追加の機能核酸配列と、

を含む、核酸配列。

【請求項 16】

請求項 2 から 11 に定義される請求項 15 に記載の核酸配列。

【請求項 17】

40

請求項 4、7、9、又は 11 に定義される転写活性化核酸配列又は細胞種特異的核酸配列。

【請求項 18】

請求項 17 に定義される核酸配列を含む、又は請求項 15 若しくは 16 に定義される核酸配列が挿入されるベクター。

【請求項 19】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、又は請求項 18 に定義されるベクターに、一過的又は安定的にトランスフェクト、トランスフォーム、又は感染され、好ましくは

(i) 前記 α -SMA 遺伝子の前記調節配列の調節下でレポーターを発現するか、あるいは

50

は、

(i i) α - S M A 遺伝子の調節下で薬理的活性タンパク質、調節 D N A 配列、又は機能 R N A 配列の発現又は含有が起こる、
真核細胞又は生物。

【請求項 2 0】

請求項 1 5、1 6、又は 1 7 に定義される核酸配列、又は請求項 1 8 に定義されるベクターで、親細胞を、トランスフェクト、トランスフォーム、又は感染させること含む、請求項 1 9 に定義の真核細胞の作製方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 5、1 6、又は 1 7 に定義される核酸配列、又は請求項 1 8 に定義されるベクターを有する E S 細胞を、生物の胚盤胞に注入するステップと、代理母に着床させるステップとを含む、請求項 1 9 に定義の生物の作製方法。 10

【請求項 2 2】

請求項 1 5、1 6、又は 1 7 に定義される核酸配列、又は請求項 1 8 に定義されるベクターを生物又は器官に導入することを含み、

(i) 前記生物又は器官への導入が、好ましくはトランスジェニックノックアウト/ノックイン技術を利用して行われるか、あるいは

(i i) 前記方法が、好ましくは遺伝子治療融合ベクターの利用である、
生物又は器官の平滑筋細胞又は筋線維芽細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能进行操作する方法。 20

【請求項 2 3】

請求項 1 から 1 2 又は 1 5 から 1 6 に定義される核酸配列、あるいは請求項 1 8 に定義されるベクターを含み、好ましくは、生物又は器官の平滑筋細胞又は筋線維芽細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能の操作に好適である医薬組成物。

【請求項 2 4】

筋線維芽細胞性及び分化依存性レポーター発現のため、又は筋線維芽細胞性及び分化依存性遺伝子操作のための前記 α - S M A 遺伝子の前記調節配列領域の機能領域の使用であって、前記 α - S M A 遺伝子の前記機能領域が好ましくは

(i) 請求項 1 7 に定義される核酸配列である、

(i i) 請求項 1 から 1 2 又は 1 5 ~ 1 6 に定義される核酸配列である、及び/又は 30

(i i i) 請求項 1 8 に定義されるベクター中に存在する、

方法。

【請求項 2 5】

細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の一時的又は活性化後の S M A 陽性細胞を単離又はスクリーニングする方法であって、真核細胞又は生物のレポーター遺伝子の発現を、請求項 1 から 1 2 又は 1 5 から 1 6 に定義される α - S M A 遺伝子の調節配列の調節下でレポーターを使用して行うステップと、前記レポーターを検出するステップと、
を含む方法。

【請求項 2 6】 40

細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の一過的又は活性化後の S M A 陽性細胞を単離又はスクリーニングするための診断薬の製造のための請求項 1 から 1 2 又は 1 5 から 1 6 に定義される α - S M A 遺伝子の調節配列の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明が属する技術分野

本発明は、 α 平滑筋アクチン遺伝子 (α - S M A 遺伝子) の特異的調節配列領域と、 α - S M A 遺伝子の前記調節配列領域が他の機能核酸配列に作動的に連結している融合コンストラクトと、細胞種及び分化に特異的なレポーター発現 (特に、筋線維芽細胞中及び筋線 50

維芽細胞様細胞中において)、細胞種及び分化に特異的な遺伝子変化(改変、変異)、及び細胞と生物における遺伝子発現変化のための前記調節配列領域の使用とに関する。

【0002】

詳細には、本発明は、 α -SMA遺伝子の5'末端領域内にある配列から実質的になる前記特異的配列領域が、さらに別の機能核酸配列、好ましくはペプチド又はタンパク質をコードする核酸配列、調節DNA-配列、又は機能RNAをコードする配列と作動的に連結している融合コンストラクトに関し、前記融合コンストラクトをベクターに作動的に挿入し、そのベクターコンストラクトを真核細胞に導入する方法に関し、前記細胞をレポーターコンストラクトで一時的又は持続的にトランスフェクト、トランスフォーム、又は感染させ、 α -SMA遺伝子の前記調節配列の調節下でレポーターを発現させ、細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から、肺細胞又は一時的に α -SMA陽性の細胞、特に、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞を単離又はスクリーニングするためにそのレポーター発現を後に使用する方法に関し、前記融合コンストラクト(α -SMA遺伝子の調節配列、ならびにペプチド又はタンパク質をコードする配列、及びRNAをコードする配列をそれぞれ含む)によって、生物又は器官の α -SMA陽性細胞、特に筋線維芽細胞及び筋線維芽細胞様細胞の細胞機能のそれぞれの遺伝子発現を、トランスジェニック若しくはノックアウト/ノックイン技術の使用、又は遺伝子治療融合ベクターの利用によって操作する方法に関する。

10

【0003】

発明の背景

20

α -SMA遺伝子は、細胞骨格アクチンの種々のアイソフォームをコードするアクチン多重遺伝子ファミリーに含まれる。種々のアクチンの発現は、細胞種特異性が高く、分化に依存して調節される。成体では、骨格 α -アクチンは骨格筋で発現され、心臓 α -アクチンは心筋で発現され、 α -SMAは平滑筋で発現される。 α -SMA遺伝子の転写調節は、5'領域における正及び負に作動する調節要素の相互作用によって行われる(Blank, R. S.ら、J. Biol. Chem. 267:984-989 (1992)、Carroll, S. L.ら、J. Biol. Chem. 261:8955-8976 (1986)、Carroll, S. L.ら、Mol. Cell. Biol. 8:241-250 (1988)、Nakano, Y.ら、Gene. 99:275-289 (1991)、Minら、J. Biol. Chem. 265:16667-16675 (1990))。 α -SMA遺伝子の5'領域は、別々に保存されたシスエレメント様の2つのCARG-エレメント(CARG-A及びB)を含む(Carroll, S. L.ら、Mol. Cell. Biol. 8:241-250 (1988)、及びBlank, R. S.ら、J. Biol. Chem. 267:984-989 (1992))。CARGモチーフは、CC/GGが隣接するA/T繰り返しからなり、筋肉特異的な遺伝子調節の重要な要素として現在議論されている(Chow, K. L., Schwartz, R. J., Mol. Cell. Biol., 10, 528-538 (1990)、及びSobuc, K.ら、Mol. Cell. Biochem. 190:105-118 (1999))。トランスジェニックマウスにおけるレポーターの研究から、 α -SMA遺伝子の第1イントロンの別のCARGボックス(0)が、平滑筋細胞における α -SMAのin vivo発現に必要であることが示された(Mack, C. P., Owens, G. K., Circ. Res., 84:852-861 (1999))。

30

40

【0004】

さらに α -SMA遺伝子の5'領域は、基本的なヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子の潜在的な結合部位である2つのE-ボックスコンセンサス配列(CANN TG)(Johnson, A. D., Owens, G. K., Am. J. Physiol., 276, C1420-C1431 (1999))と、機能がまだ分かっていない別のコンセンサス配列(Hautmann, M. B.ら、J. Biol. Chem., 272:10948-10956 (1997)、及びMcNamara, C. A.

50

ら、Am. J. Physiol., 268:C1259-C1266 (1995))
を含む。

【0005】

α -SMA遺伝子は、平滑筋細胞(SMC)で細胞種特異的に発現される(Vanderkerckhove J. and Weber K., Differentiation 14:123-133 (1979)、Skalli, O.ら、J. Cell. Biol., 103:2787-2796 (1986)、及び同上、J. Histochem. Cytochem., 37:315-321 (1989))。WO00/24254号には、SMCにおける外来遺伝子の発現のために、5'領域の調節配列及び α -SMAの第1イントロンを使用する方法が開示されている。この刊行物には、SMCの関与する組織再構成のスクリーニング、SMCの関連する組織再構成のアゴニスト及びアンタゴニストの推定のスクリーニング、ならびにSMCの関連する組織再構成の治療薬のスクリーニングのためのベクター中へのこれらの配列の使用も開示されている。詳細には、WO00/24254号には、 α -SMA遺伝子の全配列(配列番号1:ラット α -SMA遺伝子の-2558bp~+2784bp、すなわち、-2558bpの5'領域、ならびに第1エクソン及びイントロンの+1~+2784bp領域)、SMCのin vivo発現に必要な第1イントロンの配列領域(+773~+1098、配列番号2参照)が開示されている。

10

【0006】

SMCの細胞特異的発現以外に、 α -SMA遺伝子は、骨格筋細胞及び心筋細胞の分化中に胚形成でも一時的に発現され(Ruzicka, D. L.ら、J. Cell Biol., 107:25775-25786 (1988)、Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J. J., Differentiation 39:161-166 (1988))、慢性的な器官の損傷後の瘢痕及び組織再構成中の異なる細胞種の創傷治癒中及び筋線維芽細胞性変化後の筋線維芽細胞でも一時的に発現される(Desmoulière A.ら、Exp. Nephrol. 3:134-139 (1995)、Gabbiani G., Cardiovasc. Res. 38:545-548 (1998)、同上のPathol. Res. Pract. 190:851-853 (1994)、同上のAm. J. Pathol. 83:457-474 (1976))。

20

30

【0007】

筋線維芽細胞は、中胚葉起源の細胞種であり、顕著なマトリックス形成、デスミン又はビメンチンとは異なる中間径フィラメントパターンを特徴とし、 α -SMA発現によって収縮することができる(Desmoulière, A.ら、Exp. Nephrol. 3:134-139 (1995)、Gabbiani, G., Cardiovasc. Res. 38:545-548 (1998)、同上、Pathol. Res. Pract. 190:851-853 (1994)、同上、Am. J. Pathol. 83:457-474 (1976))。これらは創傷治癒中に一時的に発生するが、永存性の筋線維芽細胞は慢性瘢痕プロセス及び結合組織又は器官の再構成に関与している。例えば、肝炎、糸球体腎炎、骨髄線維症、又は肺線維症などの慢性的臓器障害が原因である種々の線維疾患では、筋線維芽細胞が主要マトリックス形成細胞である(Friedman, S. L., New. Engl. J. Med. 328:1828-35 (1993)、Gressner, A. M., Kidney Int. 49:39-45 (1996)、MacPherson, B. R.ら、Hum. Pathol., 24:710-716 (1993)、Alpers, C. E.ら、Kidney Int. 41:1134-1142 (1992)、Thiele J.ら、J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 23(1):109-21 (1991)、Johnson, R. J.ら、J. Clin. Invest. 87:847-858 (1991)、Kapanci, Y.ら、Mod. Pathol. 10:1134-42 (1997))。したがって、筋線維芽細胞は調節された線維芽細胞

40

50

としても知られているが、それらの前駆細胞は器官の種類によって大きく異なる。慢性的な腎臓障害は、メサングウム細胞から筋線維芽細胞への分化転換の原因となる (Johnson R. J. ら、J. Clin. Invest. 87:847-858 (1991)、MacPherson B. R. ら、Hum. Pathol. 24:710-716 (1993))。肝臓の慢性障害は、肝星細胞 (HSC) の筋線維芽細胞への分化転換が起こる肝線維症の原因となり (Friedman S. L., New Engl. J. Med. 328:1828-35 (1993); Gressner A. M., Kidney Int. 49:39-45 (1996); Ramadori G. ら、Virch. Arch. [B] 59:349-357 (1990))、この障害が、慢性アルコール中毒、ウイルス性 B 型若しくは C 型肝炎への感染、又は他の慢性障害により引き起こされたかどうかには無関係である。肝星細胞は周細胞的性質を有し、休止期細胞は内因性ビタミン A の 80% を貯蔵する (Friedman S. L., New Engl. J. Med. 328:1828-35 (1993))。マトリックス形成、 α -SMA 発現に誘導される収縮能力、増殖開始、ビタミン A 減少、及び変更された増殖因子の性質を特徴とする筋線維芽細胞性分化転換の後、それらの細胞は肝線維症の維持及び悪化に大きく関与する (Friedman, S. L., New Engl. J. Med. 328:1828-35 (1993)、Gressner, A. M., Kidney Int. 49:39-45 (1996))。気管支喘息疾患及び肺線維症の場合、筋線維芽細胞が主要なマトリックス形成細胞である (Tremblay, G. M. ら、Can. Respir. J. 5(1):59-61 (1998)、Gizycki, M. J. ら、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16(6):664-73 (1997)、Gabbriellini, S. ら、Pathologica. 86(2):157-60 (1994))。in situ 癌から浸潤癌に進行する間に、筋線維芽細胞に、誘発された細胞外マトリックス形成及び収縮能力の特徴的性質が現れる (Tremblay, G. M. ら、Can. Respir. J. 5(1):59-61 (1998)、Gizycki, M. J. ら、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16(6):664-73 (1997)、Gabbriellini, S. ら、Pathologica. 86(2):157-60 (1994))。多くの癌では、ストローマ細胞は筋線維芽細胞であり (Terada, T. ら、J. Hepatol. 24:706-12 (1996)、Faouzi, S. ら、J. Hepatol. 30(2):275-84 (1999)、Kosmehl, H. ら、Br. J. Cancer. 81(6):1071-9 (1999)、Pujuguet, P. ら、Am. J. Pathol. 148:579-92 (1996)、Chomette, G. ら、Pathol. Res. Pract. 186(1):70-9 (1990)、Ronnov-Jessen, L. ら、J. Clin. Invest. 95(2):859-73 (1995))、これらはパラクリンに依存して腫瘍増殖に影響を与える (Neaud, V. ら、Hepatology 26:1458-66 (1997)、Tomlinson J. ら、Clin. Cancer Res. 5(11):3516-22 (1999))。しかし、例えば、種々の器官の筋線維芽細胞腫及び筋線維線維肉腫の場合のように、腫瘍細胞自体は筋線維芽細胞の子孫である場合もある (Gocht, A. ら、Pathol. Res Pract. 195(1):1-10 (1999)、Unden, A. B. ら、J. Invest. Dermatol. 107(2):147-53 (1996)、Auger, M. ら、Arch. Pathol. Lab. Med. 113(11):1231-5 (1989))。

【0008】

遺伝子治療では、慢性的な線維症及び腫瘍に取り組んでいる。筋線維芽細胞は多くの硬化性疾患及び腫瘍の中心的細胞種であるので、これらは遺伝子治療を含めた治療における理想的な標的細胞である。

(a) 例えば細胞内シグナル伝達物質をコードする遺伝子 (Walther, W., S 50

tein, U., Mol. Biotechnol. 13(1):21-28 (1999))、又は

(b) 結合によって特定の遺伝子の転写又は翻訳に影響するRNAをコードする配列領域 (Bai, J.ら、Mol. Ther. 1(3):244-254 (2000))、又は

(c) floxPが隣接する遺伝子領域を修飾する環状組み換え (CRE) の酵素 (Sauer, B. Methods 14:381-392 (1998))、の細胞種特異的及び分化依存的な発現調節によって、特定の標的細胞の治療が可能となる。ウイルス性ベシクル様アデノウイルス又はレトロウイルス派生物 (Miller, N. Whelan, J. Hum. Gene Ther. 8, 803-815, Mountain, A.ら、Nat. Genet. 18:119-128 (2000)、Schiedner, G.ら、Nat. Med. 3, 1145-1149 (1997)、Ory, D. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400-11406 (1996)、Feng, M.ら、Nat. Biotechnol. 15:866-870 (1997)) がベクターとして使用されることが多い。しかしプラスミドコンストラクトのDNAも単独、あるいはリポソーム又はポリマー体との凝集物として投与してもよい (Hengge, U.ら、Nat. Genet. 10:161-166 (1995)、Gottschalk, S.ら、Gene Ther. 3:3410-3414 (1990)、Wagner, E.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 87:3410-3414 (1990))。筋線維芽細胞機能の遺伝子治療法及び修飾のためには、好適な調節配列又はプロモーターが必要であり、これらによって筋線維芽細胞の細胞機能及び発現を適切な変化に向けることができるが、必要な条件はこれだけではない、調節配列をプロモーター中に使用することによってのみ、(a) 改変された遺伝子発現、(b) タンパク質合成の調節、又は(c) ゲノム改変によって筋線維芽細胞による細胞機能の性質に向かい、それによって細胞は遺伝子治療に応答しうる。

【0009】

本発明の要約

α -SMA遺伝子の調節配列領域 (以下、 α -SMA-5'領域と呼ぶ) の特性決定中に、驚くべきことに、 α -SMA-5'配列領域内の1つの領域すなわち -698 ~ +18領域 (他に明記しない限り、番号付けは図7Aに示される *rat tus norvegicus* の α -SMA遺伝子に基づいている) は、領域全体の活性とは異なる活性を示すことを発見した。例えば、 α -SMA遺伝子の -189 ~ +18の領域は転写を活性化させ、一方、-698 から -190の領域は細胞種特異的及び分化以前性の調節特性を示し、すなわち、この領域はコア領域 (-189 ~ +18) とともに細胞種特異的調節に応答する。ある領域によって、遺伝子発現を調節可能であり、筋線維芽細胞、筋線維芽細胞様細胞、及び胚性、一時的、又は誘発されたSMA発現細胞の機能も調節可能であるという発見に基づいて、筋線維芽細胞性調節制御システムを開発した。したがって、本発明は、

(1) (i) α 平滑筋アクチン遺伝子 (α -SMA遺伝子) の調節配列領域からの1つ以上の機能領域と、

(ii) 配列(i)と作動的に連結している少なくとも1つの追加の機能核酸配列と、を含み、前記調節配列領域は好ましくは前記 α -SMA遺伝子のヌクレオチド -698 ~ +18 (番号付けは、図5A及び7Aに示される *rat tus norvegicus* の配列を意味する) からなり、前記追加の機能核酸配列は前記 α -SMA遺伝子をコードしない核酸配列、

(2) (1) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記調節配列領域がラットに由来し、前記核酸配列が好ましくは、図5Aに示される配列 (配列番号1)、特に図7Aに示される配列 (配列番号5) の1つ以上の機能領域を含む、

(3) (2) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記機能領域が転写活性化核酸配列であり、特に図7Aに示される配列の配列 -189 ~ +18 (すなわち配列

10

20

30

40

50

7 C、配列番号 7) に由来する、

(4)(2) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記機能領域が細胞種特異的核酸配列であり、特に図 7 A で定義される配列 - 698 ~ - 190 に由来し、特に好ましくは配列 - 698 ~ - 215 に由来する、

(5)(1) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記調節配列領域がマウスに由来し、前記核酸配列は好ましくは図 5 B (配列番号 2) 示される配列、特に配列番号 18 の領域の 1 つ以上の機能領域に由来する、

(6)(5) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記機能領域が、

(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 18 に示される配列のヌクレオチド 490 ~ 697 に由来する、及び / 又は

(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に、配列番号 18 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 489 に由来する、

(7)(1) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記調節配列領域がヒトに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 C に示される配列 (配列番号 3)、特に配列番号 19 に示される配列の 1 つ以上の機能領域を含む、

(8)(7) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記機能領域が、

(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 513 ~ 715 に由来する、及び / 又は

(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 513 に由来する、

(9)(1) に定義される核酸配列の好ましい実施態様であって、前記調節配列領域がニワトリに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 D に示される配列、特に配列番号 20 の配列の 1 つ以上の機能領域を含む、

(10) 前記機能領域が、

(a) 転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 497 ~ 699 に由来する、及び / 又は

(b) 細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 1 ~ 496 に由来する、(9) に定義される核酸配列の好ましい実施態様、

(11)(3)、(6)、(8)、又は(10)に定義される転写活性化核酸配列、

(12)(4)、(6)、(8)、又は(10)に定義される細胞種特異的核酸配列、

(13)(11) 及び / 又は(12)に定義される核酸配列を含むベクター、

(14)(1) ~ (10) に定義される核酸配列が挿入されるベクター、

(15)(1) ~ (10) に定義される核酸配列、又は(13)若しくは(14)に定義されるベクターを一時的又は持続的にトランスフェクト、トランスフォーム、又は感染させた真核細胞又は生物、

(16)(1) ~ (10) に定義される核酸配列、又は(13)若しくは(14)に定義されるベクターを親細胞にトランスフェクト、トランスフォーム、又は感染させることを含む、(15)に定義される真核細胞を発生させる方法、

(17)(15) に定義される生物を発生させる方法であって、(1) ~ (10) に定義される核酸配列、又は(13)若しくは(14)に定義されるベクターをトランスフェクトした ES 細胞を、生物の胚盤胞に注入するステップと、代理母に着床させるステップとを含む、

(18)(15) に定義される真核細胞又は生物内でレポーター遺伝子を発現させることを含む、細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から平滑筋細胞、筋線維芽細胞、又は筋線維芽細胞様細胞を単離又はスクリーニングする方法、

(19)(1) ~ (10) に定義される核酸配列、又は(14)に定義されるベクターを器官又は生物に導入することを含む、生物及び / 又は器官の平滑筋細胞又は筋線維芽細胞の遺伝子発現及び / 又は細胞機能を操作する方法、

(20)(1) ~ (10)、(11)ないし(12)に定義される核酸配列、又は(14)に定義されるベクターを含む医薬組成物、ならびに

10

20

30

40

50

(21)特に、SMAが一時的に要請の胚性細胞内、筋線維芽細胞内、及び筋線維芽細胞様細胞内における、細胞種及び分化特異的なレポーター発現、細胞種及び分化に特異的な遺伝子改変、ならびに遺伝子発現及び/又は細胞機能の操作のための医薬組成物の細胞のために、(1)～(12)に定義される α -SMA遺伝子の調節配列領域の機能領域の使用すること、に関する。

以下では、添付の図面及び実施例によって本発明を具体的に説明する。

【0010】

発明の詳細な説明

本発明は、 α -SMA遺伝子の特定の調節配列、特に、図7のA～M(配列番号5～17)に示される1つ又は2つの配列を含む調節配列が、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞において作動的に連結した機能核酸配列、例えばレポーター遺伝子又は別の機能遺伝子の機能核酸配列の遺伝子発現、を調節可能であるという驚くべき発見に基づいている。

【0011】

本発明の実施態様(1)の核酸配列は、 α -SMA遺伝子の調節配列領域由来の1つ以上の機能領域を含む。この調節配列領域は、哺乳動物、特に霊長類、齧歯類、又は鳥類、特に好ましくは、ラット、マウス、ヒト、又はニワトリに由来しうる(Blank, R. S.ら、J. Biol. Chem. 267(2):984-989(1992)、Min, B. H.ら、J. Biol. Chem. 265:16667-16675(1990)、Reddy, S.ら、J. Biol. Chem. 265(3):1683-1687(1990)、Carroll, S. L.ら、J. Biol. Chem. 261(19):8965-8976(1986))。

【0012】

好ましい実施態様(2)では、前述したように本発明の調節配列領域はラットに由来する(Blank, R. S.ら、J. Biol. Chem. 267:984-989(1992))。その中で特に好ましいものは前記機能領域が転写活性化核酸配列を含み、特に好ましくは図7Cに示される配列に由来する。ここで、図7Cに示される配列の少なくとも10、好ましくは少なくとも40、特に好ましくは少なくとも60の連続した塩基を有する転写活性化配列が好ましく、特に好ましくは図7B及びCに示される配列(配列番号6又は7)を含む。あるいは、又はこれに加えて、前記機能領域は細胞種特異的又は分化依存的に調節される核酸配列であってよく、好ましくは図7Aの配列-698～-190(配列番号5のヌクレオチド1～509)に由来する領域であり、特に好ましくは図7Aの配列-698～-215に由来する領域である。ここで、図7Aの配列-698～-190から少なくとも25、好ましくは少なくとも35の連続した塩基を有する細胞種特異的配列が好ましく、特に好ましくは図7I又は7Mに示される配列を含む。

【0013】

好ましい実施態様(5)～(10)によると、別の選択として、本発明の調節配列領域は、あるいはマウス、ヒト、又はニワトリに由来し(Min, B. H.ら、J. Biol. Chem. 265:16667-16675(1990)、Reddy, S.ら、J. Biol. Chem. 265(3):1683-1687(1990)、Carroll, S. L.ら、J. Biol. Chem. 261(19):8965-8976(1986))、本発明の機能領域は前出の(5)～(10)で定義されている。本発明によると、特に好ましくは前記転写活性化核酸配列は、(6)、(8)、又は(10)に記載の転写活性化配列からの少なくとも10、好ましくは少なくとも40、特に好ましくは少なくとも60の連続した塩基と、(6)、(8)、又は(10)に定義される細胞種特異的配列からの少なくとも25、好ましくは少なくとも35の連続した塩基とをそれぞれ含む。配列番号18、19、及び20に記載の部分的配列(ラットの配列7A～M(図6のアラインメントによる))に対応する)が特に好ましい。

【0014】

本発明の実施態様(1)によるもう1つの機能核酸配列は、ペプチド若しくはタンパク質をコードするDNA配列(レポーター遺伝子、薬理学的活性タンパク質をコードする配列

、及び調節DNA - 配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない)、又は機能RNAをコードする配列(リボザイムが挙げられるが、これに限定されるものではない)となりうる。

【0015】

従来の研究によって α - SMA遺伝子フラグメントのレポーター遺伝子との連結が示されている(特に、Nakano, Y.ら、Gene 99(2):285-9(1991)、Blank, R. S.ら、J. Biol. Chem. 15,267(2):984-9(1992)、Johnson, A. D. und Owens, G. K., Am. J. Physiol. 276:C1420-31(1999)、Hautmann, M. B.ら、J Biol Chem. 272(16):10948-56(1997)、Simonson, M. S.ら、Am. J. Physiol. 268(4 Pt 2):F760-9(1995)、Kim, J. H.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 190(3):1115-21(1993)、McNamara, C. A.ら、Am. J. Physiol. 268:C1259-66(1995)、ならびにWO00/24254号及び米国特許第5,885,769号)。筋線維芽細胞性調節のための好適なレポーター遺伝子は、例えば、表1に記載の遺伝子である。本発明による別の機能遺伝子は、例えば、薬理学的活性タンパク質又はペプチド、及び調節DNA又はRNA配列をコードする遺伝子である。表1:使用可能なレポーター遺伝子の例であって、これらは α - SMA - 5' - 配列によって発現を調節可能である。

【0016】

【表1】

レポーター遺伝子	検出	配列 (配列番号)	参考文献
不安定化	488-507 nm	21	EP-A-0892047
赤色蛍光タンパク質	538-563 nm	22	
GFP 及びその変異体 (例えば青色変異体)	380-440 nm	23	EP-A-0892047
レウシフェラーゼ	発光	24	
セクレタシフェラーゼ		27	
SEAP ¹	BCIP ² , NBT ³	26	
CAT ⁴		28	
hGH ⁵		29	JP 1985234584
β -ガラクトシダーゼ	x-Gal ⁷	25	
西洋わさびペルオキシダーゼ	DAB ⁶ , AEC ⁷		EP-A-0234075

¹ SEAP:分泌アルカリホスファターゼ

² BCIP:5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート

³ NBT:ニトロブルーテトラゾリウム

⁴ CAT:クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ

⁵ hGH:ヒト成長ホルモン

⁶ DAB:3,3'-ジアミノベンジジン

⁷ AEC:3-アミノ-9-エチルカルバゾール

【 0 0 1 7 】

実施態様 (1 3) によるベクターは、従来のトランスフェクションベクター及び遺伝的伝達に好適なベクターを含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の実施態様 (1 5) による真核細胞又は生物は、親細胞のトランスフェクション、トランスフォーメーション、又は感染、及び生物の胚盤胞への E S 細胞の感染及びそれらの代理母への着床のための方法を使用して発生され得、それぞれの方法は当業者には公知である。

【 0 0 1 9 】

現在まで、休止細胞から筋線維芽細胞への移行に特異的な調節配列領域が発見されていなかったため、レポーターを使用した筋線維芽細胞性活性化のスクリーニングは可能でなかった。 - 6 9 8 ~ + 1 8 の配列領域 (配列番号 5) をレポーター遺伝子 (表 1 参照) と融合させて移入ベクターに挿入することによって、筋線維芽細胞性活性化のトランスフェクションスクリーニングが可能となる (図 1)。従来の筋線維芽細胞性活性化のスクリーニング方法では、免疫細胞学的又は免疫組織学的手順が選択され、これらの方法は細胞の固定、抗原の阻害、抗体のインキュベーション、及び検出などのいくつかのステップを含む (F . H o f m a n , C u r r e n t p r o t o c o l s i n i m m u n o l o g y , C h a p t . 5 . 8 : I m m u n o h i s t o c h e m i s t r y ; E d s . J . E . C o l i g a n , N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h , U S A (1 9 9 6))。通常、筋線維芽細胞の免疫細胞学的又は免疫組織学的検出は、 α - S M A タンパク質の免疫化学染色によって行われた。しかし、例えば毒性試薬による活性化の定量的測定は不可能であった。本発明では、好ましくは発光レポータータンパク質が筋線維芽細胞性トランスフォーメーションの α - S M A - 5 ' - 配列調節レポーターとして選択され、細胞の活性化は照度計 (ダイネックス・テクノロジーズ (D y n e x T e c h n o l o g i e s)、米国シャンティリー (C h a n t i l l y) 製 M L X M i c r o p l a t e L u m i n o m e t e r) で定量的かつ高感度に測定された (図 1)。定量的レポーターアッセイでは、定量的毒性学的及び薬理学的研究が本発明によって初めて可能となり、物質の筋線維芽細胞性活性化能力の評価が可能となり、それによって、慢性的な関連器官障害の可能性の検出が可能となる。

【 0 0 2 0 】

α - S M A - 5 ' - 配列レポーター融合コンストラクトを保持するベクターを含む細胞の筋線維芽細胞性移行の分析によって、治療薬組成物のスクリーニングが可能になると考えられ、本発明では例えば、毒素又はトランスフォーミング増殖因子 β (T G F β) のような線維形成性増殖因子による低下などの筋線維芽細胞性活性の低下を、 α - S M A - 5 ' - 配列調節レポーターによって読みとることができる。

【 0 0 2 1 】

α - S M A - 5 ' 配列領域 (- 6 9 8 ~ + 1 8) がレポーターの調節に使用される本発明により提供される方法は、筋線維芽細胞性活性のスクリーニング以外に、 α - S M A - 5 ' で調節されるレポーター発現によってある種の細胞を単離することを含む。この方法では、 α - S M A - 5 ' 配列領域を蛍光性レポーター (例えば、表 1 の G F P 参照) と作動的に連結することによって実施されることが好ましく、それによって、ベクターコンストラクトを生物又は細胞集団に導入した後、一過性の胚性 S M A 陽性細胞又は筋線維芽細胞性誘導細胞を、細胞混合物又は集合体から、蛍光を利用した F A C S ソーター (F A C S : 蛍光活性化細胞ソート処理) によって単離することができる。あるいは、 α - S M A - 5 ' 配列領域を別のレポーターと連結することで、光学顕微鏡又は蛍光顕微鏡の制御下での顕微解剖によって、筋線維芽細胞と筋線維芽細胞様細胞の領域を分離することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明は、胚様体の胚性心筋細胞、平滑筋細胞、又は骨格筋細胞への分化が可能な胚性幹細胞 (E S) における特異的遺伝子発現のための α - S M A 遺伝子の配列領域 - 6 9 8 ~

+ 18の役割も含む (Evans, M. J., Kaufmann, M. H., Nature, 292, 154-156 (1981))。α-SMA-5'配列領域の異なるドメインを有するコンストラクトを安定にトランスフェクトしたESを比較すると、胚性細胞集合体からの筋細胞、骨格筋細胞、及び平滑筋細胞の選択に関して、-189 ~ +18の配列領域 (図7C、SMA-190) で調節されるレポーターは不十分であり、α-SMA遺伝子の-698 ~ -190 (図7の配列I、J、K、L、及びM) 内の追加の5'位置ドメインが必要である (図2)。

【0023】

同様に、本発明は、α-SMA-5'配列領域又はその配列の部分領域 (図7の配列A ~ M) と、発現に影響する別の核酸配列の作動的連結に関する。例としては、β-グロブリン又はニワトリβ-アクチン遺伝子のイントロン配列 (図8A及びB、配列番号30及び31参照) が挙げられるが、図3に示されるベクター内のウイルスCMVなどの他のエンハンサー配列も挙げられる。しかし、本明細書では挙げなかった他の発現に影響を与える配列を、α-SMA-5'-配列又はそのドメイン (図7の配列A ~ M) に作動的に連結することもできる。

10

【0024】

レポーター遺伝子ではなく別のペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子領域がα-SMA-5'配列領域 (配列番号5 ~ 17) と連結される場合、作動的に連結した遺伝子領域がα-SMA-5'の調節によって発現される。本発明の好ましい実施態様では、目的の遺伝子領域の発現の調節に図7の配列Aが使用される。図1又は図3は図7の配列Aの転写調節の分化依存性を示している。配列Aによる転写調節で、筋芽細胞又は休止筋線維芽細胞性前駆体での発現は阻害されるが、筋管細胞の分化又は筋線維芽細胞性分化転換の後では、連結した遺伝子領域の発現が起こる。図7の配列Cが標的遺伝子と連結すると、線維芽細胞などの多くの細胞種で発現が起こり、図7の配列A、F、Gが連結すると、筋線維芽細胞又はSMCの子孫で発現が起こる。α-SMA-5'配列領域 (図7のA ~ M) によって転写調節される遺伝子領域は、さらに別の配列ドメインと連結させることができる。リーディングフレームに関して、ある種のタグ又はレポータードメインをコードする配列 (図3b) と連結することによって、α-SMA配列によって転写調節される遺伝子領域の遺伝子発現の監視、又はその領域がコードするタンパク質又はペプチドの精製が可能となる。

20

30

【0025】

α-SMA-5'配列領域 (図7の配列A ~ M) を、シグナル伝達物質のRNAをコードするDNA又は遺伝子領域を含む配列と作動的に連結させると、筋線維芽細胞の表現型を機能的に妨害することができる。このようなコンストラクトを、遺伝子治療に好適なベクター (例えば、様々な世代のアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、又はレンチウイルスベクター及びそれらの派生物 (Ory, D. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400-11406 (1996)、Feng, M.ら、Nat. Biotechnol. 15:866-870 (1997)) 及びプラスミドベクターに、それぞれ、そのまま又は荷電ポリマー又はリポソーム (Hengge, U.ら、Nat. Genet. 10:161-166 (1995)、Gottschalk, S.ら、Gene Ther. 3:448-457 (1996)) と組み合わせた集合体のいずれかで挿入した後、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の遺伝子治療法の予備的要求に適合させると、それを、硬化性疾患に使用することができる (Desmouliere, A.ら、Exp. Nephrol. 3:134-139 (1995)、Gabbiani, G., Cardiovasc. Res. 38:545-548 (1998)、同上、Pathol. Res. Pract. 190:851-853、同上、Am. J. Pathol. 83:457-474 (1976))、又は腫瘍疾患 (Terada, T.ら、J. Hepatol. 24:706-12 (1996)、Faouzi, S.ら、J. Hepatol. 30(2):275-84 (1999)、Kosmehl, H.ら、Br. J. Cancer. 81(6):10

40

50

71-9 (1999)、Pujuguet, P.ら、Am. J. Pathol. 148:579-92 (1996)、Chomette, G.ら、Pathol. Res. Pract. 186(1):70-9 (1990)、Ronnov-Jessen, L.ら、J. Clin. Invest. 95(2):859-73 (1995)、Gocht, Aら、Pathol. Res. Pract. 195(1):1-10 (1999)。

【0026】

図7の配列A～Mの領域(本発明では好ましくは図7の配列Aが使用される)を、環状組み換え(Cre)のための酵素(配列番号32)と作動的に連結することによって、筋線維芽細胞が分化した細胞中でfoxP-配列(図8C、配列番号33)の隣接する遺伝子領域の新しい組み換えが可能となる。Cre酵素の機能及びfloxed配列の向き次第で、選択された調節α-SMA-5'配列領域の調節下でfloxed遺伝子領域の逆転、切り出し、組み込み、又は移動が起こりうる。本発明によるベクターから選ばれた使用可能なコンストラクトを図4に示す。

10

【0027】

本発明による方法(17)では、トランスフェクトさせたES細胞を宿主生物の胚盤胞に注入して、さらに代理母に着床させる(V. Papaioannou, R. Johnson, Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A. L. Joyner, Oxford UK (1993)、T. Doetschman, Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press Inc. San Diego, USA (1994))。生まれて成体まで成長したトランスジェニックキメラ動物の戻し交雑の後、同型接合の動物に試験すべき毒素を注入して、導入遺伝子の発現をスクリーニングした。あるいは、方法(17)において、ベクター骨格のないコンストラクトにマイクロインジェクションによって前核に導入することで、トランスジェニック生物を得ることができる(J. W. Gordonら、Methods Enzymol. 101:411-33 (1983)、B. Hoganら、Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY (1994))。本発明の実施態様(15)及び(17)による生物としては、霊長類、齧歯類、及び有蹄類などの哺乳動物が挙げられるがこれらに限定されるものではない(ここでヒトの場合に関連の国内又は地域の法令によって特許を受けることができない場合には哺乳動物は非ヒト生物のみが考慮される)。実施態様(15)による真核細胞としては、上述の哺乳動物のすべての可能な細胞及び細胞系が挙げられる。

20

30

【0028】

本発明の実施態様(20)及び(21)による「医薬組成物」(課題、用途、追加の機能核酸配列の種類などによっては診断薬となりうる)は、使用形態に依存して、本発明の核酸配列/ベクター以外に、市販の添加剤、希釈剤、及びそれらと類似のものを含んでもよい。本発明の医薬組成物は、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能の操作に好適であり、これは、本発明の医薬組成物を(発明の背景で詳細に述べたように)慢性的な臓器の損傷が原因の線維症(例えば、肝炎、糸球体腎炎、骨髄線維症、又は肺線維症)及び腫瘍を含めた多数の疾患の治療及び診断に使用できることを意味する。

40

以下の非限定的な例を用いて本発明を説明する。

【0029】

実施例

材料及び方法

表2：使用したプライマー

【表2】

プライマー	配列 (配列番号)	α -SMA 遺伝子の領域
SMA-710-F	5'-GTC CTT AAG CTT GAT ATC AAG GGT CAG CG (37)	-710 ~ -682
SMA-30R	5'-GGC TTC TGA ATT CTG GGT GGG TGG TGT CT (38)	+1 ~ +29
SMA-245F	5'-TGT TCT CAG GCT CAG GAT G (39)	-252 ~ -235
SMA-190F	5'-CTG TTT CGA GAG AGC AAA GCT TAG G (40)	-203 ~ -181
SMA-100	5'-GAG TGA ACG GCC AGC TTC (41)	約 -100

10

【0030】

この実験では以下の市販のベクターを使用した：

共通クローニングベクターとして pBlue-script-SKII+ (クロンテック、ハイデルベルグ) 及び pGEM3Z (プロメガ、マンハイム) を使用した。 α -SMA プロモーターの領域を、プロモーターのないルシフェラーゼベクター pRL-null (プロメガ、マンハイム) にサブクローン化した。形成されたコンストラクトの活性を比較できるようにするために、さらに別のベクター、pRL-SV40 や pRL-CMV などの pRL ファミリー、及び pGL3 ファミリーのベクター (プロメガ、ハイデルベルグ) を使用した。

20

【0031】

実施例 1： α -SMA-5'-配列の作製

単離したラット DNA から、 α -SMA 遺伝子の 5'-プロモーター領域の長さ 736 bp のフラグメントを増幅し、クローン化した。最初にこれを、配列中にそれぞれ制限酵素認識部位を含むプライマー SMA-710F (HindIII) 及び SMA-30R (EcoRI) を使用して、ラットゲノム DNA から -708 ~ +28 の領域の PCR 増幅によって行った。制限酵素を使用した後、得られたフラグメント (-698 ~ +18) を pRL-null に連結することによって挿入し、真核細胞の実験用に得られたベクター pRL-SMA-700 を E.coli K12 株で増殖させた (図 7A の配列を参照)。

30

【0032】

実施例 2： α -SMA 遺伝子の 5' 領域の調節下のレポーター発現による筋線維芽細胞性分化のスクリーニング

A. α -SMA-5' 配列領域で調節されるレポーターベクターの調製： α -SMA-5' 領域レポーターコンストラクトを調製するために、 α -SMA の異なる様々な α -SMA-5' 領域をそれぞれレポーターベクターに挿入した。ラットゲノム DNA (上記参照) からプライマー SMA-710-F 及び SMA-30-R で増幅された産物を制限酵素 EcoRI 及び HindIII で切断し、pBSSK+ (ストラタゲン (Stratagene)) にクローン化して、pB-SMA-700 を作製した。 α -SMA 遺伝子の α -SMA-5' 領域中の制限酵素認識部位を使用し、EcoRI 及び特異的制限酵素を使用して pB-SMA-700 から切断しフラグメント SMA-480 (PstI)、SMA-215 (PvuII)、及び SMA-125 (DraII) を作製し、最初に pGEM (プロメガ) 又は pB-SK (ストラタゲン) にサブクローン化した。これによって pGEM-SMA-480、pGEM-SMA-215、及び pB-SMA-125 のプラスミドを得た。センスプライマーとしてプライマー SMA-245F (PstI) 又は SMA-190F (HindIII) を使用し、アンチセンスプライマーとして SMA-30R を使用して、特異的フラグメントを作製し、次にそれらのプライマーに関連する制限酵素認識部位でクローン化して、pGEM-SMA-245 及び pB-SMA190 を得た

40

50

。

【0033】

α-SMAプロモーターのすべてのプロモーターフラグメントを、EcoRI/HindIII又はEcoRI/SacIによってpRL-nullにサブクローン化し、それによってSMA-700~SMA-125の長さの異なる6つの欠失コンストラクトを作製した。

【0034】

B. 一過性トランスフェクション：トランスフェクション試薬FuGENE（登録商標）6（ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ、マンハイム）を使用してトランスフェクションを行った。1.2 μgのpRL-700及び0.3 μgのpGL3コントロールプラスミドで構成される1.5 μgのプラスミドDNAを各実験で使用した（DNA試薬比1:3に相当）。トランスフェクションのために、酵素的肝臓灌流及び密度勾遠心法でラット肝臓から単離した休止肝星細胞（HSC）（Knock, D. S., de Leeuw, A. M., Exp. Cell. Res., 139, 468-471（1982））、及びプラスチック皿で培養後筋線維芽細胞に分化させた分化HSC（ファルコン（Falcon））（Geerts, A.ら、J. Hepatology, 9, 59-68（1989））を使用した。

【0035】

C. 配列Aの調節下での休止HSC及び筋線維芽細胞性HSCにおけるレポーター活性の測定：二重ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム（DLR（登録商標）、プロメガ、マンハイム）を使用して活性を測定した。一過性トランスフェクションでは、筋線維芽細胞のみがpRL-700レポーターコンストラクトの明らかな活性を示した。α-SMA陰性細胞は、相対的活性の1%未満のレポーター活性を示した。筋線維芽細胞では、レポーターが14倍に誘発された。休止細胞は活性を示さなかった（>1%）（図1）。したがって、このコンストラクトを筋線維芽細胞性の分化のスクリーニングに使用することができる。

【0036】

実施例3：安定的にトランスフェクトさせた生物及び細胞のα-SMA-5'-配列調節下でのレポーター

A. α-SMA調節下となるレポーターベクターの構成：ニワトリβ-アクチン-プロモーター、及びニワトリβ-アクチンの第1イントロン（配列番号31）のフラグメントを有する修飾GFP-発現ベクター（pCAGGS）（Ikawa, M.ら、Develop. Growth Differ., 37:455-459（1995））から、制限酵素SnaBI及びApaIで消化することで心筋プロモーターを切り取り、pRL-700又はpRL-190をXhoI及びEcoRIで消化した後のそれぞれのα-SMA-5'配列領域（配列番号5又は配列番号7）で置き換えた。アガロースゲルによるバンドの精製後、「平滑末端」クローニングができるように突出末端を満たした。さらに、ベクターの再連結を防止するために、ベクターの5'末端の脱リン酸を行った。連結反応とE.coliへのトランスフォーメーションの後、陽性クローンを単離し、それらのプラスミドDNAを精製し、正しい方向にα-SMA-5'配列領域が挿入されているかを確認するために配列決定を行った。配列決定は、α-SMA-プロモーターの領域-100で結合する標識プライマーSMA-100（TM=63）を使用して行った。得られたコンストラクトを図2bに示す。

【0037】

B. α-SMA-5'-配列（図7A及び7Cの配列）で調節されるレポーター活性を使用した持続的トランスフェクタントのスクリーニング及び単離：安定的ES-トランスフェクタントを作製するために、2つのGFP-レポーターコンストラクトpSMA-GFP-700及び-190（図2b）を作製し、マウス胚性D3-幹細胞にトランスフェクトした。安定的にトランスフェクトされたクローンを、GFPコンストラクトに含まれるネオマイシン（G418）耐性を使用して選択した。この目的のために、トランスフェク

10

20

30

40

50

ションの24時間後に50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のネオマイシン(10 mg/ml 、Gibco BRL、Eggenstein)を加えた。

【0038】

幹細胞を分化させるため、これらの培養を、支持細胞を使用せず、LIFを添加していないDMEM(440 mg のD-グルコース、110 mg のピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、シグマ)、20% FCS(Gibco BRL、ゲーサズバーグ(Gaithersburg)、MD)、1×の非必須アミノ酸(Gibco BRL)、1×ペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco BRL)、及び0.1 mM の β -メルカプトエタノール(Sigma)を使用して行った。胚様体(EB)を形成させるために、 2.25×10^5 細胞及び 4.25×10^5 細胞のそれぞれを1 ml の培地に希釈した。それぞれの細胞浮遊液20 μl (450細胞又は800細胞)を懸滴培養した(Drab, M.ら、FASEB, 11:905-911(1997)、及びKolosssov, E.ら、J. Cell. Biol., 143:2045-2056(1998))。 10

【0039】

pSMA-GFP-190プロモーターフラグメントをトランスフェクトさせたEBの免疫組織学的観察から、GFP陽性細胞領域が常に α -SMAを発現するわけではなく、すべての α -SMA陽性細胞がGFPを発現するわけではないことが分かった。GFP陽性細胞は、アクチンを発現する心筋又は骨格筋細胞種であることが分かった。カルデスモン陽性平滑筋細胞ではGFP発現が見られなかった。

【0040】

対照的に、pSMA-GFP-700コンストラクトは、特異的なGFP発現を示し、これは心筋及び骨格筋領域ならびにカルデスモン陽性平滑筋細胞で見ることができた。 α -SMA遺伝子の図5の配列Aの調節下で観察されるレポーターのパターンは、胚形成中の分化ES細胞に対応する。したがって、SMA-700フラグメント(配列番号5)は、胚性及び一過的SMA陽性細胞の機能調節配列である。 20

【0041】

レポーター活性によって、細胞をトリプシン処理後に分離して(図2a)、別々に分析することができる。

【0042】

実施例4：筋線維芽細胞で導入遺伝子を発現するマウスの作製 30

A. 図2b/3に示されるコンストラクトのES細胞への安定的トランスフェクション：安定的にトランスフェクトされた胚性幹細胞を作製するために、 α -SMA遺伝子導入ベクターを、アンピシリン遺伝子内の部位を使用して制限酵素消化することによって線状化し、精製後に水に溶解した(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。その後、エレクトロポレーションを実施した。このために、 5×10^6 個のES細胞を0.7 ml のPBSに再浮遊させ、キュベットに移した。線状化プラスミドDNA30 μg (体積100 μl)を各エレクトロポレーションで使用した。DNAをキュベットに加えた後、氷上で10分間インキュベートし、取り出して、プレ複合体を形成させた。その後、Biorad(ミュンヘン)製のエレクトロポレータを使用して、500 μF 及び0.24 Vのインパルスが発生させた。その後、氷上で細胞を20分間インキュベートして再生させた後、ネオマイシン耐性支持細胞上に播種した。 40

【0043】

上記ES細胞を宿主マウスの胚盤胞に注入し、代理母に着床させた(V. Papaioannou, R. Johnson, in Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A. L. Joyner, Oxford UK(1993)、T. Doetschman, Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press Inc. San Diego, USA(1994))。生まれて成体まで成長したトランスジェニックキメラ動物の戻し交雑の後、得られた同型接合の動物に試験すべき毒素を注入して、導入遺伝子が発現をスクリーニングした。 50

【 0 0 4 4 】

あるいは、ベクター骨格のないコンストラクト（図 2 b 参照）をマイクロインジェクションによって前核に導入することで、トランスジェニックマウスを得ることができる（J. W. Gordon ら、Methods Enzymol. 101: 411-33 (1983)、B. Hogan ら、in Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Gold Spring Harbor, NY (1994)）。

【 0 0 4 5 】

B. 毒素注入による慢性肝臓障害及び筋線維芽細胞のスクリーニング

慢性肝臓障害を誘発するために、マウスへ 2 週間ごとに 4 % 四塩化炭素の鉱油溶液（6 ml / kg 体重）の腹腔内注入を 2 週間、4 週間、6 週間、又は 8 週間行った。これらのマウスについて、肺炎及び腎炎、ならびに肺又は腎臓における筋線維芽細胞の発生を調べた。四塩化炭素は主に肝炎の原因となるので、筋線維芽細胞の活性化が、トランスジェニック G F P マウスの肝臓において観察された。

【 0 0 4 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Odenthal, Margarete

<120> Gene Expression, Genomealteration And Reporterexpression

In Myofibroblasts And Myofibroblast-like Cells

<130> 011547wo/JH/ml

<140>

<141>

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 764

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

```

acggtcctta agcatgatat caagggctcag cgataaacca acaacatgca cgtggactgt 60
acctaaaggt taacgcagtt acagtgaatt tgactttctaa gtctctctta gggtaacata 120
ggctgggtgaa tcttgattac atacttccat atgtaataca tacagacttc attgataacta 180
cacacagact ccagactaca tacaatgtgg ctccataaaa atgacacac cctcgcagat 240
tcgcaggiga cccaagcatc ttigtgtata ggctaccttt tgcaacagtg ttgccttaaa 300
gtccagctia gtcagagaca ggcccttctt catcicaagc ccttagctaa tggacccaaa 360
ggctagcctg acaggaagag ctggcatctt ctgaggaatg tgcaaacat gcctgcgtct 420
gcttcattgac actagcccag tgtctgggca tttagcaggt tttcttgagg gctcaggatg 480
tttatcccca taagcagctg aactgcctcc tgtttcgaga gcagagcaga ggaatgcagt 540
ggaagagacc cagctcttgg ccaccagat tagagagttt tgtgctgagg tccctataatg 600
gttgigttag agtgaacggc cagcttcagc ctgtctttgc tcttgtttg ggaagcgagt 660
gggaggggat cagaccaggg ggctatataa ccttcagca ttcagcctcc ccagacacca 720
cccaccaga gtggagaagc ccagccagtc gccatcaggg taag 764

```

20

30

40

<210> 2

<211> 745

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atggtccta atcatgctgt taagggtcag taaaagcca gcaacatgct ggaatgttaa 60
 gggtaaaagc agttacagtg attctgactt ciaagttact ctttgggcaa cacaggctgg 120
 ttaatectca ciacatactt caattcctat ticcactcac ciccctcaag aacttgattt 180
 ataacagtg tgcctacat aaaatcatga ctctcttgca tatttatggg tgactcgaag 240
 catcttttga tctaggctac cttttgcaac agtgttgctt aaaaatcgca gctagtcaga 300
 gacaggccct tccttatcca agtcctcagc taatggccca aaagactagc ctgacagggg 360
 ctggcatctt ctgagggaatg tgcaaaccgt gccctgcgtct gtcccatgac actagcccag 420
 tgtctgggca ttttaagcagt tgttctgagg gcttaggaig tttatcccca taacgagctg 480
 agctgcctcc tgtttcggga gcagaacaga ggaatgcagt ggaagagacc cagctcttgg 540
 ccaccagat tagagagitt tgtgctgagg tccctatatg gtgtgttag agtgaacggc 600
 cagcttcagc ccgtcttgc tcttcttgg ggaggcgagt gggaggggat cagagcaagg 660
 ggctatataa ccttcagcc ttacgcctcc ccgggacacc acccaccag agtggagaag 720
 ccagccagt cgctgtcagg gtaag 745

10

<210> 3

<211> 763

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggtccta cttatgctgc taaattgctc ggtgacaaat tagtagacaa agctaattgca 60
 caaaaaaatg aatgtagtta tagtaatgca gaattccaaa ttctcttttg taagacatag 120
 gcctgtcaac cttgtctcca tacttcagtt cctgggttca ttgaaccaac acaaagacac 180
 aatgtataag tacaatgtag ctccataaa aacatcactc cctctatgta tttatagaca 240

20

gctgaagaaa tatctttctt ctttgcattc taccgttgta gaagggtttt aaaagtcctg 300
 gctaggcaga ggcagccctt tctgccccit tctgttctca gtttattagg aaatggcctg 360
 aaattccagc atgatatcaa gctggcatcc tctgtggaat gtcaatacca tgcctgcac 420
 tgcccattac cctagctcag tctctctggg catttctgca gttgttctga aggcctggcg 480
 tgtttatctc ccacaagcgg ctgaactgcc tcccgtttca tgagcagacc agtgggaatgc 540
 agtgggaagag acccacgctc cggccacca gattagagag ttttgtctg aggtccctat 600
 atggttgtgt tagactgaac gacaggctca agtctgtctt tgcctctgt tggggaagca 660
 agtgggagga gagcaggcca aggggctata taacccttca gctttcagct tccctgaaca 720
 ccaccagtg tggagcagcc cagccaagca ctgtcaggt aag 763

10

<210> 4

<211> 747

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 4

acactaggat gaagcttgc cacagtccct agtgccttgg aaataaacig atggagacag 60
 gatattgatt gicacccatt acaggctagg gacaccataa caacctgtta gcagaacgtt 120
 tacacagcct tcaaagacc taccatgaac cctatgcaac agcaggtact tcttttagta 180
 tccccccagt gcagacctt taagtgaatt tgtggcaaaa ttcagtagct gtttagcttg 240
 ccgaaagtat tctcattgct ttggccaaa tctttaacta atgcaaagtg tctccttaaa 300
 aacactttcc ctattacaaa tgactgctct ttcagtttc actctgcctc ttggatgttc 360
 ctgtgaaggc caggccctct ctctcttgt tgaacgttg ctcttctga cagagggtgt 420
 ctgtcccagg cagcctttc ttgcctcatt ttagcaagtt ctgcagtggt tatcttacac 480
 agctgaaagt ctctctctgt tcatgagct ctgcgttggg atgcagtggg agggactgac 540
 gcctgtcgac ccagattaga ggtttttgta ataaggctcc tataagggtt ttttagagac 600
 ttcggctctg tctctctcat ctctctcct tgttggggag gctgggtggg ggagaagagc 660
 tgaaggggct atataacctt ggtgcttttg gatacacagt gcaccatccc agagctgcta 720
 tccccagcca agcactgtca gggtaag 747

20

<210> 5

<211> 716

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 5

tgatatcaag ggtcagcgaat aaaccaacaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60
 gcagttacag tgattctgac tictaagtic ccttaggggt aacataggct ggtgaatcct 120
 gattacatac ticcataatgt aatacatata gacttcattg atactacaca cagactccag 180
 actacataca atgtggcttc cataaaatga tcactcctct gcagattcgc aggtagacca 240
 agcatctttt gttataggct accitttgca acaggttgc cttaaagtc cagctagica 300
 gagacagccc ctccctcatt tcaagccctt agctaattga cccaaaggct agcctgacag 360
 gaagagctgg catcttciga ggaatgtgca aacctgcct gcgtctgctc catggcacta 420
 gcccagtgtc tgggcatttg agcagttgtt ctgagggtc aggatgttta tccccataag 480
 cagctgaact gcctcctgtt tgcagagcag agcagaggaa tgcagtggaa gagacccagg 540
 cctctggcac ccagattaga gagttttgtg ctgagggtccc tatatggttg tgttagagtg 600
 aacggccagc ttacgctgtt ctttgctcct tgtttgggaa gcgagtggga ggggacaga 660
 ccagggggct atataaccct tcagcattca gcctccccag acaccacca cccaga 716

10

<210> 6

<211> 142

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 6

ggtccctata tggttgtgtt agagigaacg gccagcttca gcctgtcttt gctccttggt 60
 tgggaagcga gtggaggggg atcagaccag ggggtatata aacccttcag cattcagcct 120
 cccagacac caccaccca ga 142

20

<210> 7

<211> 207

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

gagcagagga atgcagtggg agagaccag gcctctggca cccagattag agagtittgt 60
 gctgaggicc ctatattggt ggttagagt gaacggccag cttcagccig tctttgctcc 120
 ttgtttggga agcgagtggg aggggatcag accagggggc tatataacc ttcagcattc 180
 agcctcccca gacaccacc acccaga 207

<210> 8

<211> 232

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

tgaactgcct cctgtttcga gagcagagca gaggaatgca gttgaagaga cccaggccic 60
 tggcaccag attagagagt ttgtgctga ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg 120
 gccagcttca gctgtcttt gctccttgtt tgggaagcga gtggagggg atcagaccag 180
 ggggctatat aacccttcag cttcagcct cccagacac caccaccca ga 232

<210> 9

<211> 262

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

gggctcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgcct cctgtttcga gagcagagca 60
 gaggaatgca gttgaagaga cccaggccic tggcaccag attagagagt ttgtgctga 120
 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gctgtcttt gctccttgtt 180
 tgggaagcga gtggagggg atcagaccag ggggctatat aacccttcag cttcagcct 240
 cccagacac caccaccca ga 262

10

20

<210> 10

<211> 502

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 10

tcctctgcag attcgcaggt gaccaagca tcttttgta taggctacct ttgcaacag 60
 tgttgcccta aagtcaccgc tagtcagaga caggcccttc ctccttcaa gcccttagct 120
 aatggaccca aaggctagcc tgacaggaag agctggcacc tctgaggaa tgtgcaaacc 180
 atgcctgcgt ctgctccatg gcactagccc agtgctctgg catttgagca gttgttcta 240
 gggctcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgcct cctgtttcga gacgagagca 300
 gaggaatgca gtagaagaga cccaggccct tggcaccag attagagagt tttgtgcta 360
 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gccgtcttt gctccttgtt 420
 tgggaagcga gtggagggg atcagaccag ggggctatat aacccttcag cattcagcct 480
 cccagacac caccaccca ga 502

10

<210> 11

<211> 539

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 11

cagactacat acaatgtggc ttccataaaa tgatcactcc tctgcagatt cgcaggtag 60
 ccaagcatct tttgttatag gctaccttct gcaacagtgt tgccttaaag tccagctag 120
 tcagagacag gcccttcttc atctcaagcc cttagctaat ggacccaaag gctagcctga 180
 caggaagagc tggcattctc tgaggaatgt gcaaaccaat cctgcgtctg ctccatggca 240
 ctagcccagt gtctgggcat ttgagcagtt gtctcagagg ctccagatgt ttatcccat 300
 aagcagctga actgcctcct gtctcagag cagagcagag gaatgcagtg gaagagacc 360
 aggcctctgg caccagatt agagagtttt gtgctgaggt cctataatg ttgtgttaga 420
 gtgaacggcc agcttcagcc tgtctttgt cctgttttgg gaagcgagtg ggaggggac 480
 agaccagggg gctatataac ccttcagcat tcagcctccc cagacaccac ccaccaga 539

20

<210> 12
<211> 65
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 12
gagcagagga atgcagtggg agagacccag gcctctggca cccagattag agagtittgt 60
gctga 65

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 13
tgaactgcct cctgtttcga gagca 25

10

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 14
gggctcagga tgtttatccc cataagcagc 30

20

<210> 15
<211> 240
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 15
tcctctgcag attcgcaggt gacccaagca tccttttgta taggctacct ttgcaacag 60

tggtgcctta aagtcaccgc tagtcagaga caggcccttc ctcactcaaa gcccttagct 120
aatggaccca aaggctagcc tgacaggaag agctggcacc tcttgaggaa tgtgcaaacc 180
atgcctgcgt ctgctccatg gcactagccc agtgctctgg catttgagca gttgttctga 240

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

cagactacat acaatgtggc ticcataaaa tgatcac 37

10

<210> 17

<211> 177

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

tgatatcaag ggtagcgat aaaccaaaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60
gcagttacag tgattctgac ttctaagttc ctttagggc aacataggct ggtgaatcct 120
gattacatac ticcataatg aatacatata gatticatig atactacaca cagactc 177

<210> 18

<211> 697

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

tgctgitaag ggtagtaaa aagccagcaa catgctggaa tgtaagggt taaagcagtt 60
acagtgattc tgacttctaa gtactcttt gggcaacaca ggctgggtta tcttactac 120
atacttcaat tctatttcc actcacctcc ctcaagaact tgatttataa acagtgtgcc 180
taccataaaa tcatgactcc tctgcatatt tatgggtgac tcgaagcacc ttttgatcta 240

20

ggctaccttt tgcaacagtg ttgcttaaaa atcgcagcta gtcagagaca ggcccttcct 300
 tatccaagtc ctcagctaat ggcccaaaag actagcctga caggggctgg catcttctga 360
 ggaatgtgca aaccgtgcct gcgtctgtcc catgacacta gcccagtgtc tgggcattta 420
 agcagttgtt ctgagggctt aggatgttta tccccataac gagctgagct gcctcctgtt 480
 tcgggagcag aacagaggaa tgcagtggaa gagaccacg ccttgccac ccagattaga 540
 gagttttgtg ctgaggtccc tatatggttg tgttagagtg aacggccagc ttcagcccg 600
 ctttgtctct tgtttgggag gcgagtggga ggggacaga gcaagggct atataaccct 660
 tcagccttca gcctccccgg gacaccacc acccaga 697

<210> 19

<211> 715

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tgctgctaaa ttgctcggtg acaaattagt agacaaagct aatgcacaaa aaaatgaatg 60
 tagttatagt aatgcagaat tccaaattcc tctttgtaag acataggcct gtcaaccttg 120
 tctccatact tcagttccig gtttcatiga accaacacaa agacacaatg tataagtaca 180
 atgtagcttc cataaaaaca tcactccctc tatgtattta tagacagctg aagaaatac 240
 tttcttcttt gcatcctacc gtggtagaag ggittiaaaa gtccgtgcta ggcagaggca 300
 gccctttctg cccctttctg ttctcagttt attaggaaat ggcttgaaat tccagcatga 360
 tagcaagctg gcatcctcig tggaaatgca ataccatgcc tgcactgcc cattacccta 420
 gtcagtgic tctgggcatt tctgcagtig ttctgaaggc tggcggtgtt tctcctccac 480
 aagcggctga actgcctccc gtttcatgag cagaccagtg gaatgcagtg gaagagacc 540
 acgtccggc caccagatt agagagtttt gtgctgaggt cctataatgg ttgtgttaga 600
 ctgaacgaca ggctcaagtc tgtctttgtt ccttggttgg gaagcaagtg ggaggagagc 660
 aggccaagg gctatataac ccttcagctt tcagcttccc tgaacaccac ccagt 715

<210> 20

<211> 699

10

20

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 20

```

ctgtccaca gttcctagtg ctttggaaat aaactgatgg agacaggata ttgattgtca 60
cccattacag gctagggaca ccataacaac cigttagcag aacgtttaca cagccitcaa 120
agaccctacc atgaacctta tgcaacagca ggtacttctt ttaglatccc ccagtgtag 180
acctttaag tgaatttgig gcaaaattca giagctgttt agcttgccga aagtattctc 240
attgccttgg tccaaatctt taactaatgc aaagtgtctc cttaaaaaca ctttccctat 300
tacaatgac tgccttttca gttttcactc tgcctcttgg atgttccgtg gaaggccagg 360
gacctctct cttgtttgaa cgtgtgtctt tctgacaga ggggtgtctg ccaggccag 420
ctttcttgc tgcattttag caagtctgc agtgtttatc ttacacagct gaaagtctcc 480
tctgtttca tgagctctgc gtgggaatgc agtgggaagg actgacacct gtcgaccag 540
attagaggtt ttgttaataa ggtccctata tggttttgtt agagacttgc gctctgtctc 600
tctcatctct gctccttgtt tgggaggctg gtgggaggag aagagctgaa ggggctatat 660
aacctgggtg cttttggata cacagtgcac catcccaga 699

```

10

<210> 21

<211> 845

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: EGFP

<400> 21

```

atggtagca agggcgagga gctgttacc ggggtgggic ccatcctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgaggcgca tgccacctac 120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tggccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgcctcagcc gctacccga ccacatgaag 240
cagcacgact tcttcaagtc cgcatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggiga agtctgaggg cgacaccctg 360

```

20

gigaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactiaaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcataagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 taccigagca cccagtcgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcca tcacatggc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggac actctcgga tggacgagct gtacaagaag 720
 citagccaig gcttcccgcc ggaggaggag gacgaggaig atggcacgct gcccatgtct 780
 tgtgccagg agagcgggat ggaccgtcac cctgcagcct gtgcttctgc taggatcaat 840
 gtgta 845

10

<210> 22

<211> 666

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Red

Fluorescent Protein

<400> 22

aagaatgta tcaaggagtt catgaggitt aaggctcgca tggaaaggaac ggtcaatggg 60
 cagagtttg aaatagaagg cgaaggagag gggaggccat acgaaggcca caataccgta 120
 aagcttaagg taaccaaggg gggacccttg ccatttgctt gggatatitt gtcaccacaa 180
 tttcagtaig gaagcaaggt atatgtcaag caccctgccg acataccaga ctataaaaag 240
 ctgtcatttc ctgaaggatt taaatgggaa agggicatga acttgaaga cggctggcgtc 300
 gttactgtaa cccaggattc cagtttgag gatggctggt tcatctacaa ggtcaagttc 360
 attggcgta actttccttc cgatggacct gttatgcaa agaagacaat gggctgggaa 420
 gccagcactg agcgtttgta tcctcgtgat ggcgtgtga aaggagagat tcataaggct 480
 ctgaagcga aagacggagg tcattacctt gttgaattca aaagtattta catggcaaag 540
 aagccgtgtc agctaccagg gtactactat gttgactcca aactggatat aacaagccac 600
 aacgaagact atacaatcgt tgagcagtat gaaagaaccg agggacgcca ccatctgttc 660

20

ctttag

666

<210> 23

<211> 719

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: GFP

<400> 23

atggtagca agggcgagga gctgtcacc ggggtggg ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttagcggtg tccggcgagg gcgaggcgga tgccacctac 120
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccggtcc ctggcccacc 180
 ctctgtagca cctgaccca cggcgtgcag tgcctcagcc gctaccccgga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtag agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaacttcaa cagccacaac gtcctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccc tgcctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcca tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcggca tggacgagct gtacaagta 719

10

20

<210> 24

<211> 937

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Renilla
 Luciferase

<400> 24

atgacttcga aagtttatga tccagaacaa aggaaacgga tgataactgg tccgcagtgg 60
 tgggccagat gtaaacaaat gaatgttctt gattcattta ttaattatta tgattcagaa 120
 aaacatgcag aaaatgcigt tatittttta catggtaacg cggccctctc ttatttatgg 180
 cgacatgttg tgccacatat tgagccagta gcgcggtgta ttataccaga ccttatttgg 240
 atgggcaaat caggcaaatc tggtaattgt tcttataggt tacttgatca ttacaaatat 300
 ctactgcat ggittgaact tcttaattta ccaaagaaga tcatttttgt cggccatgat 360
 tggggtgcit gtttggcatt tcattatagc tatgagcacc aagataagat caaagcaata 420
 gttcacgctg aaagtgtagt agatgtgatt gaatcatggg atgaatggcc tgatattgaa 480
 gaagatatig cgttgatcaa atcgaagaa ggagaaaaaa tggttttgga gaataacttc 540
 ttctgggaaa ccatgttgcc atcaaaaatc atgagaaagt tagaaccaga agaatttgca 600
 gcatatcttg aaccattcaa agagaaaggt gaagttcgtc gtccaacatt atcatggcct 660
 cgtgaaatcc cgttagtaaa aggttggttaa cctgacgttg tacaatttgt taggaattat 720
 aatgcittatc tacgtgcaag tgatgatita ccaaaaatgt ttattgaatc ggaccagga 780
 ttcttttcca atgctattgt tgaagggtgcc aagaagttc ctaatactga atttgtcaa 840
 gtaaaaggtc ttcatttttc gcaagaagat gcacctgatg aaatgggaaa atatatcaa 900
 tcgttcgttg agcgagttct caaaaatgaa caataat 937

10

<210> 25

<211> 3144

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: beta

Galactosidase

<400> 25

atgtcgttta cttigaccaa caagaacgtg atttctgttg cggctctggg aggcatttgg 60
 ctggacacca gcaaggagct gctcaagcgc gatcccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg 120
 gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc ctgacagcac atcccccttt cgccagctgg 180

20

cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag cctgaatggc 240
 gaatggcgct ttgcttggtt tccggcacca gaagcgggtc cggaaagctg gctggagtgc 300
 gatcttcttg aggcggatgc tgcgtcgtc ccttcaaac ggcatatgca cggttacgat 360
 gcgcccattt acaccaacgt aacctatccc attacgggtc atccggcgtt tgttcccacg 420
 gagaatccga cgggttgtta ctgcctcaca tttaatgttg atgaaagctg gctacaggaa 480
 ggccagacgc gaattatitt tgaatggcgtt aactcggcgt ttcattcttg gtgcaacggg 540
 cgctgggtcg gtacggcca ggacagtcgt ttgccgtctg aatttgacct gagcgcatit 600
 ttacgcgccg gagaaaaccg cctcgcggig atgggtctgc gttagagtga cggcagttat 660
 ctggaagatc aggatatttg gcggatgagc ggcatittcc gtgacgtctc gttgctgcat 720
 aaaccgacta cacaatcag cgatticcat gtgcccctc gcittaatga tgatticagc 780
 cgcgctgtac tggaggctga agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta 840
 acagtttctt tatggcaggg tgaacgcagc gtcgccagcg gcaccgcgcc ttccggcggg 900
 gaaattatcg atgagcgtgg tggttatgcc gatcgcgta cactacgtct gaacgtcgaa 960
 aaccggaac tgtggagcgc cgaatcccg aatctctatc gtgcgggtgt tgaactgcac 1020
 accgccgacg gcacgtgat tgaagcagaa gccctgcgat tcggtttccg cgagggtcgg 1080
 attgaaaatg gtcgtctgtc gctgaacggc aagccgttgc tgattcgagg cgtaaacgt 1140
 caccgacatc atctctgca tggtcaggtc atggatgagc agacgatggt gcaggatac 1200
 ctgctgaiga agcagaacaa ctttaacgcc gtgcgtgttt cgcattatcc gaaccatccg 1260
 ctgtgttaca cgctgtgcga ccgtacggc ctgtatgttg tggatgaagc caatattgaa 1320
 acccacggca tggtgccaat gaatcgtctg accgatgac cgcgctggct accggcgtg 1380
 agcgaacgcg taacgcgaat ggtgcagcgc gatcgtaat acccgagigt gatcatctgg 1440
 tcgctgggga atgaatcagg ccacggcgtt aatcacgac cgctgtatcg ctggatcaaa 1500
 tctgtcgaic ctccccgcc ggtgcagtat gaaggcggcg gagccgacac caccggccac 1560
 gatattatit gcccgatgia cgcgcgcgtg gatgaagacc agcccttccc ggtgtgtccg 1620
 aaatggtcca tcaaaaaatg gctttcgcta cctggagaga cgcgcccgtt gatcctttgc 1680
 gaatacgcc acgcgatggg taacagtcct ggccggttgc ctaatactg gcaggcggtt 1740
 cgtcagtatc cccgtttaca gggcggcttc gtcgggact ggggtgatca gtcgtgatt 1800
 aaatatgatg aaaacggcaa cccgtggctg gcttacggcg gtgattttgg cgatacgccg 1860
 aacgatcgcc agttctgtat gaacgggtctg gcttttgccg accgcacgcc gcatccagcg 1920

10

20

ctgacggaag caaaacacca gcagcagitt ticcagticc gttatccgg gcaaaccatc 1980
 gaagtigacca gcgaatacct gticcgtcat agcgataacg agtccttga ctggatggtg 2040
 gcgctggatg gtaagccgtt ggcaagcggg gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaaggt 2100
 aaacagtiga tgaactgcc tgaactaccg cagccggaga gcgccgggca actctggctc 2160
 acagtacgcg tagtgaacc gaacgcgacc gcatggtcag aagccgggca catcagcgcc 2220
 tggcagcagt egcgcttggc ggaaaacctc agtctgacgc tccccgcgc gtcccacgcc 2280
 atcccgcatc tgaccaccag cgaaatggat ttttgcacg agctgggtaa taagcgttgg 2340
 caatttaacc gccagtcagg ctttcittca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg 2400
 ctgacgccgc tgcgcgatca gttcaccctg gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt 2460
 gaagcgacc gccattgacc taacgcctgg gtcgaacgtt ggaaggcggc gggccattac 2520
 caggccgaag cagcgttgtt gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt 2580
 acgaccgctc acgcttggca gcatcagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac 2640
 cggattgatg gtagtggta aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca 2700
 ccgcatccgg cgcggattgg cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac 2760
 tggctcggat tagggccgca agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac 2820
 cgctgggata tgcattgtc agacatgtat accccgtacg tcttcccgag cgaaaacggg 2880
 ctgcgctcgc ggacgcgca attgaattat ggcccacacc agtggcgccg cgacttccag 2940
 ttcaacatca gccgttacag tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctgctg 3000
 cacgcggaag aaggcacatg gctgaatac gacggittcc atatggggat tggtagcgac 3060
 gactcctgga gcccgtcagt atcgccggaa ttacagctga gcgccggtcg ctaccattac 3120
 cagttggctt ggtgtcaaaa ataa 3144

10

20

<210> 26

<211> 1558

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: SEAP

<400> 26

atgtctgtgc tgtctgtgt gctgggcttg aggtctacagc tctccctggg catcatccca 60
 gttgaggagg agaaccggga cttctggaac cgcgaggcag cggaggccct gggtgccgcc 120
 aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttctt gggcgtatggg 180
 atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg 240
 gggccctgaga tacccttgcc catggaccgc ticcataatg tggctctgtc caagacatac 300
 aatgtagaca aacatgtgcc agacagtggg gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360
 aagggaacti tccagaccat tggcttgagt gcagccgcc gccttaacca gtgcaacacg 420
 acacgcggca acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcagt 480
 ggagtggtta ccaccacacg agtgcagcac gccctgccag ccggcaccta cggccacacg 540
 gigaaccgca acttggtact ggacgccgac gtgcttgctt cggcccgcca ggagggtgtc 600
 caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacatig acgtgatctt aggtggaggc 660
 cgaaagtaca tgtttcgcat gggaaccca gacctgagt acccagatga ctacagccaa 720
 ggtgggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaaat ggctggcgaa gcgccagggt 780
 gcccggtaig tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt ccttggaccg gtctgtgacc 840
 catctcatgg gtctcttga gccctggagac atgaaatagc agatccaccg agactccaca 900
 ctggaccctt ccttgatgga gatgacagag gtgcccctgc gccctgtgag caggaaaccc 960
 cgcggcttct tctcttctgt ggagggttgt cgcctcgacc atggctatca tgaaagcagg 1020
 gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttgcagcagc ccatgagag ggccggccag 1080
 ctaccacggc aggaggacac gctgagcctc gtcactgccg accactccca cgtcttctcc 1140
 ttggagggtt accccctgcg agggagctcc atcttcgggc tggcccttgg caaggcccg 1200
 gacaggaagg cctacacggt cctctatagc ggaacggtc caggctatgt gctcaaggac 1260
 ggcccccggc cggatgttac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagta 1320
 gcagtgcccc tggacgaaga gaccacgca ggcgaggacg tggcgggtgt cgcgcggcgc 1380
 ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgcag gagcagacct tcatagcgca cgtcatggcc 1440
 ttgcccgtt gccctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cgcggccgc ggccaccacc 1500
 gacgccgcgc acccgggtta ctctagagtc gggcgggcgc gccgcttcga gcagacat 1558

10

20

<210> 27

<211> 1651

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Luciferase

Firefly

<400> 27

```

catggaagac gccaaaaaca taaagaaagg cccggcgcca tctatccgc tgggaagatgg 60
aaccgctgga gagcaactgc ataaggctat gaagagatac gccctgggtc ctggaacaat 120
tgcttttaca gatgcacata tcgaggctga catcacttac gctgagtact tcgaaatgic 180
cgctcgggtg gcagaagcta tgaacgata tgggctgaat acaaatcaca gaatcgtcgt 240
atgcagttaa aactctcttc aattctttat gccgggtgtg ggcgcggtat ttatcggagt 300
tgcagttgcg cccgcgaacg acatttataa tgaacgtgaa ttgctcaaca gtaigggcat 360
ttcgcagcct accgtgggtg tcgtttccaa aaaggggtg caaaaaattt tgaacgtgca 420
aaaaaagctc ccaatcatcc aaaaaattat tatcatggat tctaaaacgg attaccaggg 480
attcagtcg atgtacacgt tcgtcacatc tcatctacct cccggtttta atgaatacga 540
ttttgtgcca gactccttcg ataggacaaa gacaattgca ctgatcatga actcctctgg 600
atctactggt ctgcctaaag gtgtcgtctt gccctataga actgcctgcg tgagattctc 660
gcatgccaga gatcctatit ttggcaatca aatcattccg gatactgcga ttttaagtgt 720
tgttccattc catcacggtt ttggaatgtt tactacacac ggatatttga tatgtggatt 780
tcgagtcgtc ttaatgtata gatttgaaga agagctgttt ctgaggagcc ttcaggatta 840
caagattcaa agtgcgcgtc tggigccaac cctattctcc ttcttcgcca aaagcactct 900
gattgacaaa tacgatttat ctattttaca cgaaattgct tctgggtggc ctccctctc 960
taaggaagtc ggggaagcgg ttgccaagag gtccatctg ccaggatatc ggcaaggata 1020
tgggctcact gagactacat cagctattct gattacacc gagggggaig ataaaccggg 1080
cgcggtcggg aaagtgttc catttttga agcgaaggtt gtggatctgg ataccgggaa 1140
aacgctgggc gtaaatcaaa gaggcgaact gtgtgtgaga ggtcctatga ttatgtccgg 1200
ttaigttaac aatccggaag cgaccaacgc cttgattgac aaggatggat ggctacattc 1260
tggagacata gcttactggg acgaagacga acacttcttc atcgttgacc gcctgaagtc 1320
tctgattaag taaaaaggct atcagggtgg tcccgctgaa ttggaatcca tcttgcctca 1380

```

10

20

acacccaac atcttcgacg cagggtcgc aggtcttccc gacgatgacg ccggigaact 1440
 tcccgccgcc gtgtgtgttt tggagcacgg aaagacgatg acggaaaaag agatcgtgga 1500
 ttacgtgcc agtcaagtaa caaccgcgaa aaagtgcgc ggaggagtig gtgtgtgga 1560
 cgaagtaccg aaaggctta ccgaaaaact cgacgcaaga aaaatcagag agatcctcat 1620
 aaaggccaag aaggcggaag agatgcctg g 1651

<210> 28

<211> 658

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: CAT

<400> 28

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gtgatataat ccaatggca tcgtaaagaa 60
 cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
 attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggccittatt 180
 cacattcttg ccgcctgat gaatgctcat ccggaactcc gtatggcaat gaaagacggg 240
 gagctggiga tatgggatag ttttaccct ttttacaccg ttttcaiga gcaaaatgaa 300
 acgttttcat cgctcaggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
 tcgcaagatg tggcgtgta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420
 aatagtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagtttga tttaaacgtg 480
 gccaatatgg acaacttctt cgccccgtt ttacgatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
 gacaagggtc tgatgccgtt ggcgattcag gtcatcatg ccgtttgtga tggcttccat 600
 gtcggcagaa tgcctaaiga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgt 658

<210> 29

<211> 582

<212> DNA

10

20

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: hGH

<400> 29

```

atgttccaa ctattccact gattgccttg ttcgataacg cgaatgctgcg tgcgcatcgt 60
ctgcaccaac tggcttttga cacttaccag gatttcgaag aagcatacat cccgaaagaa 120
cagaaataca gcttccctca gaaccacag acctcgttgt gtctctctga aagtaicccg 180
accccttcta accgcgaaga gaccagcag aaatcgaacc ttgaactgct tcgtatctcg 240
ctgttttcta ttcatctgig gctggagcca gtacagtacc tgcgttcggt ttctgcaaac 300
tcactgggat acggigcgtc tgacagtaac gtttacgacc tgcigaaaga cctigaagaa 360
gggatccaga cctgatggg tcgcttgga gatgggtcac cagcactgg tcagatcttc 420
aaacagactt actccaaatt cgatactaac tctcataacg atgatgctct gctgaaaaac 480
tacggcctgc tgtactgttt ccgtaaagat atggataaag ttgaaacttt cctgcgtatc 540
gttcagtgtc gtctgttga agggcgtgtt ggcttctaag ag 582

```

10

<210> 30

<211> 119

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 30

```

tataaataaa cccctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttcta cagctcctgg 60
gcaacgtgct ggttggtgig ctgtctatc attttgcaa agaaticact cctcaggig 119

```

20

<210> 31

<211> 802

<212> DNA

<213> *Gallus gallus*

<400> 31

```

ccctttgtgc ggggggagc ggctcgggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg 60

```

ccgcgtgcgg cccgcgcigc ccggcggcig tgagcgcigc gggcgcggcg cggggcttig 120
 tgcgcicgcg gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggcg gtgccccgcg gtgcgggggg 180
 gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt gggggggiga gcagggggig 240
 tgggcgcggc ggtcgggcig taaccccc ctcaccccc ctcgccgagt tgcctagcac 300
 ggccccgcit cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccggcg 360
 ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccggcg gggcggggcg cgctcggcg cggggagggc 420
 tcgggggagg ggcgcggcg ccccgagcg ccggcggcig tcgaggcgcg gcgagccgca 480
 gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga gggcgaggg acttccttig tcccaaatct 540
 ggcggagccg aaatctggga ggcgcggcg caccctctct agcggcgcg ggcgaagcgg 600
 tgcggcgccg gcaggaaggc aatggcgggg gaggcccttc gtgcgtcgcc gcgcccgct 660
 ccccttctcc atctccagcc tcggggcigc cgcaggggga cggcigcctt cgggggggac 720
 ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgig tgaccggcg ggtttatc ttccttctc 780
 tgttctccg cagccagcca tg 802

10

<210> 32

<211> 1032

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 32

atgtccaatt tactgaccgt acacaaaaat ttgcctgcat taccggtcga tgcaacgagt 60
 gatgaggc gcaagaacct gatggacatg ttcaggatc gccaggcggt ttctgagcat 120
 acctggaaaa tgcctctgic cgttgcggc tcgtgggcgg catggigcaa gttgaataac 180
 cggaaatggg ttcccgaga acctgaagat gttcgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
 cgcggctcgg cagtaaaac tatccagcaa catttgggc agctaaacat gcttcacgt 300
 cggtcggcg tgccacgacc aagtgcagc aatgcgtgt cactgggtat gcggcggaic 360
 cgaaaagaaa acgttgatgc cggtgaaagt gcaaaacagg ctctagcgtt cgaacgcact 420
 gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga tatacgtaat 480
 ctggcatttc tggggatigc ttataacacc ctgttacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
 agggttaaag atatctcacg tactgacggg gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600

20

aaaacgcigg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gccctgggggt aactaaactg 660
 gtcgagcgat ggatttcgt cctgggtgta gctgatgac cgaataacta cctgttttgc 720
 cgggtcagaa aaaatgggtg tgcgcgcga tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 780
 ctggaaggga ttttgaagc aactcctga ttgatitac gcgctaagga tgactctggt 840
 cagagatacc tggccctggc tggacacagt gcccggtgc gagccgcgc agatatggcc 900
 cgcgctggag tttaaatacc ggagatcatg caagctgggt gctggaccaa tgtaaatatt 960
 gtcatgaact atatccgtaa cctggatagt gaaacagggg caatgggtgc cctgctggaa 1020
 gatggcgatt ag 1032

<210> 33

<211> 34

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 33

ataacttcgt ataattgatg ctatcgaag ttat 34

<210> 34

<211> 384

<212> DNA

<213> Streptomyces avidinii

<400> 34

gctgctgaag caggtatcac cggcaccctg tacaaccagc tcggctcgac ctctatctg 60
 accgcgggcg ccgacggcgc cctgaccgga acctacgagt cggccgtcgg caacgccgag 120
 agccgctacg tctgaccgg tctgtacgac agcgcgcccg ccaccgacgg cagcggcacc 180
 gccctcgggt ggacgggtgc ctggaagaat aactaccgca acgcccacac cgcgaccacg 240
 tggagcggcc agtacgtcgg cggcgccgag gcgaggatca acaccagtg gctgctgacc 300
 tccggcacia ccgaggccaa cgcctggaag tccacgtcgg tcggccacga caccctcacc 360
 aaggigaagc cgtccgcgc ctc 384

10

20

<210> 35
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: myc epitope
<400> 35
ggatccgaac aaaagctgat ctcagaagaa gatctatgca ta 42

<210> 36
<211> 18 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: 5xHis
Sequence
<400> 36
catcaccatc atcattaa 18

<210> 37
<211> 29 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Primer
<400> 37
gtccttaagc ttgatatcaa gggtcagcg 29

<210> 38

<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Description of artificial sequence: Primer		
<400> 38		
ggcttctgaa ttctgggtgg gttgtgtct	29	
<210> 39		
<211> 19		10
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Description of artificial sequence: Primer		
<400> 39		
tgttttcagg ctccaggtg	19	
<210> 40		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Description of artificial sequence: Primer		
<400> 40		
ctgttttcgag agagcaaagc ttagg	25	
<210> 41		
<211> 18		
<212> DNA		30
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Description of artificial sequence: Primer		
<400> 41		
gagtgaacgg ccagcttc	18	

【図面の簡単な説明】

【図 1】

p R L - 7 0 0 - レポーターコンストラクトの調節下での休止状態及び筋線維芽細胞で活性化された肝星細胞 (H S C) のルシフェラーゼレポーター活性の測定。 40

【図 2 a】

分化した E B から分離した後に培養した単細胞の免疫細胞学的解析。 p S M A - G F P - 1 9 0 をトランスフェクトした細胞では、 α - S M A 陰性細胞 (1 C) でさえも G F P - 発現 (1 B) を示した。 p S M A - G F P - 7 0 0 をトランスフェクトした細胞では、G F P - 発現 (2 B) は α - S M A 発現細胞 (2 C) に限定された。

【図 2 b】

胚性幹細胞又はトランスジェニックマウスモデルで安定にトランスフェクトさせるための S M A - G F P - 7 0 0 及び S M A - G F P - 1 9 0 レポーターベクターの設計。外来の調節配列として、ニワトリ β - アクチンの第 1 イントロンを、G F P - レポーター (E G F P 変異体) と、 α - S M A 遺伝子の 5' 領域の 7 1 6 b p (配列番号 5) 又は 2 0 7 b 50

p (配列番号7)の間となるようにコンストラクトにクローン化する。安定なトランスフェクタントを選択するため、コンストラクトはアンピシリン耐性だけでなくネオマイシン耐性も有し、これによって真核細胞からG418を選択できる。

【図3a】

細胞株L6の胚性筋管細胞及び筋芽細胞の一過性トランスフェクション後に測定した異なる長さのSMAコンストラクト(SMA-125~SMA-700、図7参照)のルシフェラーゼレポーター活性。血清欠乏後に α -SMA発現筋管細胞に分化したL6細胞は、前駆L6筋芽細胞と比較すると全コンストラクトの導入が4~5倍となったことを示している。SMA-190コンストラクトは強くトランス活性化するが、SMA-700コンストラクトは分化依存的レポーター発現を制御する。SMAコンストラクトの活性は、SV40プロモーター活性(100%)に対して標準化した。各2回繰り返す3つの独立したアッセイを行った。

10

【図3b】

α -SMA遺伝子の716bp-5'-配列(配列番号5)の調節下で目的のペプチド又はポリペプチドを発現させるためのプラスミドコンストラクト。発現を検出するため、ストレプトアビジンをコードする配列(配列番号34)、及び/又は抗体(9E10)によって認識されるエピトープ様mycをコードする配列(配列番号35)、及び/又は精製が可能となる1~5個のヒスチジンをコードする配列(配列番号36)などの1つ以上のタグをインフレームで加えることによってオープンリーディングフレーム(ORF)を補うことができる。ペプチドならびに連結されるタグの配列は、細胞種特異的及び分化依存的な α -SMA遺伝子調節配列領域の調節下にある。

20

【図4】

α -SMA-5'-遺伝子領域の調節下でのLoxPの媒介するCre組み換え:

a. α -SMA-5'-配列領域の5'領域(配列番号5)と β -アクチンの第1イントロン(配列番号31)の併用によるCre遺伝子(配列番号32)の転写調節によって、筋線維芽細胞性分化後の筋線維芽細胞でのCre遺伝子の発現(1)、LoxPと隣接するネオマイシン遺伝子(neo)のCreの媒介による切り出し(2)、及びそれに続く目的遺伝子の発現(3)が行われる。

b. α -SMA-5'-配列領域の5'領域(配列番号5)と β -アクチンの第1イントロン(配列番号31)の併用によるCre遺伝子(配列番号32)の転写調節によって、筋線維芽細胞性分化後の筋線維芽細胞でのCre遺伝子の発現(1)、LoxPと隣接する対象遺伝子のCreの媒介による切り出し(2)が起こり、それによって目的遺伝子の発現が中断される(3)。

30

c. α -SMA-5'-配列領域の5'領域(配列番号5)と β -アクチンの第1イントロン(配列番号31)の併用によるCre-ER融合遺伝子(配列番号32+ER(登録商標)、Danielian PSら、Mol. Endocrinol. 7:232-240, 1993)の転写調節によって、筋線維芽細胞性分化後の筋線維芽細胞でのCre-ER融合遺伝子の発現(1)が起こる。0.1~2mgの4-OHTの添加又は注入後、ER-ペプチドはリガンドと結合できるようになり、Cre-ER/4-OHT複合体が形成される。続いて、この複合体は核に移され、図4a及びbに示されるCre媒介ステップ(2及び3)が行われる。

40

nS:核シグナルペプチド配列、斜線枠:イントロン配列、LP:リンカーペプチド配列、ER(登録商標):内因性17- β -エスタドリオールとは結合せず合成リガンドの4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)との親和性が高い改変エストロゲン受容体の配列、 β -A: β -アクチン-イントロン(配列番号31)、及びb4-OHT:4-ヒドロキシタモキシフェン。

【図5】

複数の種の α -SMAの5'-上流領域及びエクソン1の開始部分(領域-713~+52、番号付けは配列Aを基準にしている)

A:ラット(Rattus norvegicus; 配列番号1; Acc. No S7

50

6011; Blank, R. S. *ら*, J. Biol. Chem. 267(2): 984-989 (1992)。

B: マウス (*Mus musculus*; 配列番号2; Acc. No. M57409 M35194; Min, B. H. *ら*, J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990)。

C: ヒト (*Homo sapiens*; 配列番号3; Acc. No. J05193; Reddy, S. *ら*, J. Biol. Chem. 265(3): 1683-1687 (1990)。

D: ニワトリ (*Gallus gallus*; 配列番号4; Acc. M13756 D00041 N00041; Carroll, S. L. *ら*, J. Biol. Chem. 261(19): 8965-8976 (1986)。

【図6】

図5に示される配列のアライメント。

【図7】

ラット (*Rattus norvegicus*) 由来の本発明の好ましい α -SMA-配列を示す (配列番号)

A: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -698 ~ +18 (5)

B: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -124 ~ +18 (6)

C: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -189 ~ +18 (7)

D: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -214 ~ +18 (8)

E: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -244 ~ +18 (9)

F: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -484 ~ +18 (10)

G: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -521 ~ +18 (11)

H: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -189 ~ -125 (12)

I: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -214 ~ -190 (13)

J: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -244 ~ -215 (14)

K: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -484 ~ -245 (15)

L: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -521 ~ -485 (16)

M: α -SMA 遺伝子の 5' 領域: -698 ~ -522 (17)

【図8a】

Oryctolagus cuniculus の β -1-グロビン遺伝子; イントロン I / エクソン II 移行部位; Acc. No: V00882; 配列 1250 ~ 1343 (配列番号30)。

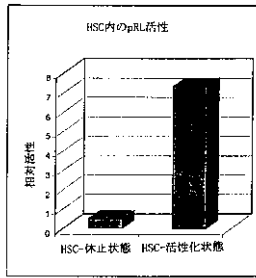
【図8b】

Gallus gallus の細胞質 β -アクチン遺伝子; Acc. No: X00182、イントロン I (544 ~ 1542); 配列 550 bp ~ 1503 bp で示される (配列番号31)。

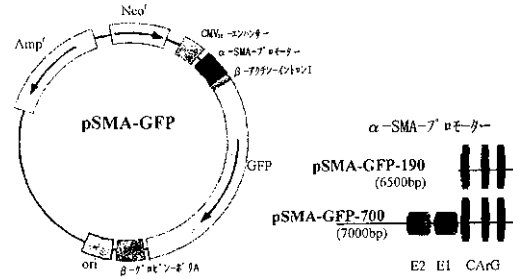
【図8c】

floxP 部位の配置: floxP-配列 (配列番号33) は、Cre (垂直矢印) によって2つの部位に切断される 8 bp 非対称コア領域に隣接する 13 bp の逆方向リピート (水平矢印) からなる。

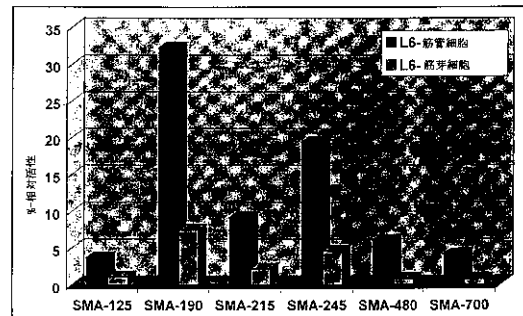
【図 1】



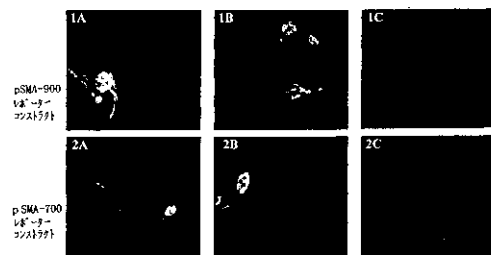
【図 2 b】



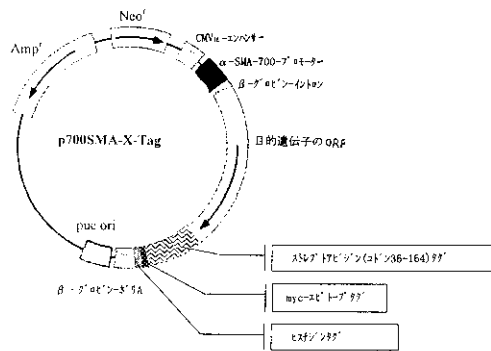
【図 3 a】



【図 2 a】



【図 3 b】



【図 4】

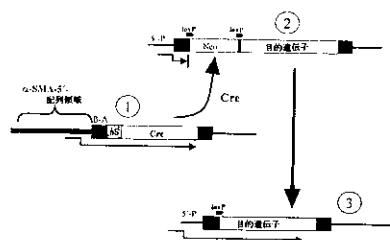


Fig. 4a

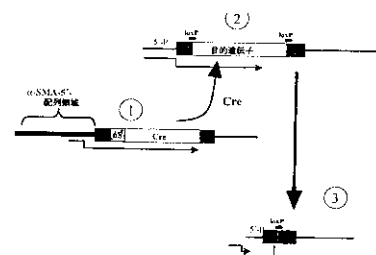


Fig. 4b

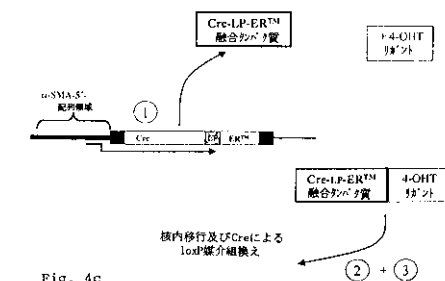


Fig. 4c

[illegible]

$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT} \quad 3' \\ 3' \text{TATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA} \quad 5' \\ \uparrow \end{array}$

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04509 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/47 (81) Bestimmungsstaaten (optional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, GU, HK, HU, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/JP90/07914
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 2001 (10.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 33 633.7 11. Juli 2000 (11.07.2000) DE
100 53 879.7 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE
00128446.2 22. Dezember 2000 (22.12.2000) EP
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: OHTENHAU, Margarete [DE/DE]; Blankenheimer Str. 39, 50937 Köln (DE).
- (73) Erfinder und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JUNG, Diana [DE/CH]; Weststrasse 7, CH-8003 Zürich (CH).
- (74) Anwälte: HELMING, Jörg usw.; Von Kreisker Selting Warner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (optional): ARIPO Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patent (BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENE EXPRESSION, GENOME ALTERATION AND REPORTER EXPRESSION IN MYOFIBROBLASTS AND MYOFIBROBLAST-LIKE CELLS

(54) Bezeichnung: GENEEXPRESSION, GENOMALTERATION UND REPORTEREXPRESSION IN MYOFIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLAST-ÄHNLICHEN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to specific, regulatory sequence regions of the alpha smooth muscle actin gene (α-SMA gene), and fusion structures in which said regulatory sequence regions of the α-SMA gene are operationally linked to other functional nucleic acid sequences. The invention also relates to the use of said regulatory sequence regions for cell type specific and differentiation specific reporter expression, for cell type specific and differentiation specific gene changes (alteration, mutation) and for gene expression changes in cells and organisms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft spezifische, regulatorische Sequenzbereiche des alpha Smooth Muscle Aktin-Gens (α-SMA-Gens), Fusionskonstrukte, in denen solche regulatorische Sequenzbereiche des α-SMA-Gens mit weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenzen operativ verknüpft sind, sowie die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzbereiche zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression, zu zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderungen (Alteration, Mutation) und zu Genexpressionsveränderungen in Zellen und Organismen.

WO 02/04509 A2

WO 02/04509

1

PCT/EP01/07913

Genexpression, Genomalteration und Reporterexpression in Myofibroblasten und myofibroblast-ähnlichen Zellen

5

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft spezifische, regulatorische Sequenzbereiche des alpha Smooth Muscle Aktin-Gens (α -SMA-Gens), Fusionskonstrukte, in denen solche regulatorische Sequenzbereiche des α -SMA-Gens mit weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenzen operativ verknüpft sind, sowie die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzbereiche zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression (insbesondere in Myofibroblasten und myofibroblast-ähnlichen Zellen), zu zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderungen (Alteration, Mutation) und zu Genexpressionsveränderungen in Zellen und Organismen.

Im einzelnen betrifft die vorliegende Erfindung Fusionskonstrukte, in denen der genannte spezifische Sequenzbereich, der im wesentlichen aus Sequenzen besteht, die sich im 5'-terminalen Bereich des α -SMA-Gens befinden, mit einer weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise mit peptid- oder proteinkodierenden Nukleinsäuresequenzen, regulatorischen DNA-Sequenzen oder funktionellen RNA-kodierenden Sequenzen operativ verknüpft ist; ein Verfahren, in dem die oben genannten Fusionskonstrukte in einen Vektor operativ inseriert werden und das Vektorkonstrukt in eukaryontische Zellen eingebracht wird; ein Verfahren, in dem die mit dem Vektorkonstrukt transient oder stabil transfizierten, transformierten oder infizierten Zellen, einen Reporter unter Kontrolle der genannten regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens exprimieren und die Reporterexpression zur Isolierung oder zur Sichtung embryonal oder transient α -SMA-positiver Zellen, insbesondere von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus genutzt wird; sowie ein

CONFIRMATION COPY

WO 02/04509

2

PCT/EP01/07913

Verfahren, bei dem mittels der genannten Fusionskonstrukte (die regulatorische Sequenzen des α -SMA-Gens und peptid- oder proteinkodierende bzw. RNA-kodierende Sequenzen enthalten) die Genexpression bzw. die Zellfunktion von α -SMA-positiven Zellen, insbesondere Myofibroblasten und myofibroblastähnlichen Zellen in Organismen bzw. in Organen unter Nutzung transgener oder knock-out/-in-Technologie oder gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation manipuliert werden.

Hintergrund der Erfindung

Das α -SMA-Gen ist ein Mitglied der Aktin-Multigenfamilie, die für verschiedene Isoformen der zytoskeletalen Aktine kodiert. Die Expression der verschiedenen Aktine ist in hohem Grade zelltypspezifisch und differenzierungsabhängig reguliert. So wird adult das skelettale α -Aktin in der Skelettmuskulatur, das cardiale α -Aktin in der Herzmuskulatur und das α -SMA in der glatten Muskulatur exprimiert. Die transkriptionelle Regulation des α -SMA-Gens wird durch ein Zusammenspiel von positiv und negativ wirkenden regulatorischen Elementen des 5'-Bereiches vermittelt (Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992); Carrol, S. L. et al., J. Biol. Chem. 261: 8955-8976 (1986); Carrol, S. L. et al., Mol. Cell. Biol. 8: 241-250 (1988); Nakano, Y. et al., Gene. 99: 275-289 (1991); Min et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990)). Der 5'-Bereich des α -SMA-Gens enthält verschiedene konservierte *cis*-Elemente wie zwei CArG-Elemente (CArG-A und B) (Carrol, S. L. et al., Mol. Cell. Biol. 8: 241-250 (1988) und Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992)). Die CArG-Motive bestehen aus einem A/T Repeat, das von CC/GG flankiert wird, und werden als maßgebliche Elemente der muskelspezifischen Genregulation diskutiert (Chow, K. L., Schwartz, R. J., Mol. Cell. Biol., 10, 528 - 538 (1990) und Sobuc, K. et al., Mol. Cell. Biochem. 190:105-118 (1999)). Reporterstudien an transgenen Reportermäusen zeigten, daß eine weitere CArG-Box (0) im ersten Intron des α -SMA-Gens für eine *in vivo* Expression von α -SMA in glatten Muskelzellen notwendig ist (Mack, C. P., Owens, G. K., Circ. Res., 84: 852 - 861 (1999)).

WO 02/04509

3

PCT/EP01/07913

Der 5'-Bereich des α -SMA-Gens enthält ebenfalls zwei E-Box Konsensussequenzen (CA NN TG), potentielle Bindestellen für basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren (Johnson, A. D., Owens, G. K., Am. J. Physiol., 276, C1420 - C1431 (1999)) und weitere Konsensussequenzen (Hautmann, M. B. et al., J. Biol. Chem., 272: 10948-10956 (1997) und McNamara, C. A. et al., Am. J. Physiol., 268: C1259-C1266 (1995)), deren Bedeutung im einzelnen nicht geklärt ist.

Das α -SMA-Gen wird zelltypspezifisch in glatten Muskelzellen (SMC) exprimiert (Vanderkerckhove J. and Weber K., Differentiation 14: 123-133 (1979) Skalli, O. et al., J. Cell. Biol., 103: 2787-2796 (1986) und idem, J. Histochem. Cytochem., 37: 315-321 (1989)). WO 00/24254 offenbart ein Verfahren, in dem die regulatorische Sequenzen des 5'-Bereichs und des ersten Introns des α -SMA für die Expression von heterologen Genen in SMC genutzt werden. Diese Druckschrift beschreibt ebenfalls die Verwendung dieser Sequenzen innerhalb von Vektoren für die Sichtung von Gewebeumstrukturierungen, die SMC involvieren, die mögliche Sichtung von Agonisten und Antagonisten der SMC assoziierte Gewebeumstrukturierungen sowie die Sichtung von therapeutischen Agenzien der SMC-assozierten Gewebeumstrukturierungen. Im einzelnen offenbart die WO 00/24254 eine allgemeine Sequenz des α -SMA-Gens (SEQ. ID. NO:1: von -2558 bp bis + 2784 bp des Ratten α -SMA-Gens, d. h. den -2558 bp 5-Bereich und den Bereich +1 bis +2784 bp des ersten Exons und des ersten Introns) und den Sequenzbereiche des ersten Introns (+ 773 bis +1098; siehe SEQ ID NO:2), die für eine *in vivo*-Expression in SMC notwendig ist.

Neben der zellspezifischen Expression bei SMC wird aber auch das α -SMA-Gen transient in der Embryogenese während der Differenzierung von skelettalen und kardialen Muskelzellen (Ruzicka, D. L. et al., J. Cell Biol., 107: 25775 - 25786 (1988); Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J. J., Differentiation 39: 161 - 166 (1988)), aber auch in Myofibroblasten während der

WO 02/04509

4

PCT/EP01/07913

Wundheilung sowie nach myofibroblastischen Veränderungen verschiedener Zelltypen in Vernarbungs- und Gewebeumstrukturierungsprozessen nach chronischer Organschädigung exprimiert (Desmoulière A. et al., *Exp. Nephrol.* 3: 134-139 (1995); Gabbiani G., *Cardiovasc. Res.* 38: 545-548 (1998); idem, *Pathol. Res. Pract.* 190: 851-853 (1994); idem, *Am. J. Pathol.* 83: 457-474 (1976)).

Myofibroblasten sind Zelltypen mesodermalen Ursprungs, die sich durch eine ausgeprägte Matrixproduktion, ein heterogenes Intermediatfilamentmuster mit Desmin oder Vimentin auszeichnen und durch die α -SMA-Expression die Fähigkeit zur Kontraktilität besitzen (Desmoulière, A. et al., *Exp. Nephrol.* 3: 134-139 (1995); Gabbiani, G., *Cardiovasc. Res.* 38: 545-548 (1998); idem, *Pathol. Res. Pract.* 190: 851-853 (1994); idem, *Am. J. Pathol.* 83: 457-474 (1976)). Sie treten temporär bei der Wundheilung auf, während persistierende Myofibroblasten bei chronischen Vernarbungsprozessen an der Bindegewebs- und der Organumstrukturierung beteiligt sind. In verschiedenen Fibroseerkrankungen aufgrund chronischer Organschädigung wie z.B. der Hepatitis, der Glomerulonephritis, der Myelofibrose oder fibrosierenden Lungenerkrankungen sind Myofibroblasten die Hauptmatrixproduzenten (Friedman, S. L., *New. Engl. J. Med.* 328: 1828-35 (1993); Gressner, A. M., *Kidney Int.* 49: 39-45 (1996); MacPherson, B. R. et al., *Hum. Pathol.*, 24:710 - 716 (1993); Alpers, C. E. et al., *Kidney Int.* 41: 1134-1142 (1992); Thiele J. et al., *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23(1):109-21 (1991); Johnson, R. J. et al., *J. Clin. Invest.* 87: 847-858 (1991); Kapanci, Y. et al., *Mod. Pathol.* 10: 1134-42 (1997)). Daher wurden Myofibroblasten auch als modulierte Fibroblasten bezeichnet; ihre Vorläuferzelltypen sind jedoch abhängig vom Organtyp sehr unterschiedlich. Chronische Nierenschädigungen führen zu einer Transdifferenzierung von Mesangialzellen zu myofibroblastischen Zellen (Johnson R. J. et al., *J. Clin. Invest.* 87: 847-858 (1991); MacPherson B. R. et al., *Hum. Pathol.* 24: 710-716 (1993)). In der Leber kommt es nach chronischer Schädigung unabhängig, ob die Ursache chronischer Alkoholabusus, virale Hepa-

WO 02/04509

5

PCT/EP01/07913

- titis B oder C-Infektionen oder andere chronische Schädigungen sind, zur Leberfibrose, in der Hepatische Sternzellen (HSC) zu Myofibroblasten transdifferenzieren (Friedman S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993); Gressner A.M., Kidney Int. 49: 39-45 (1996); Ramadori G. et al., 5 Virch. Arch. [B] 59: 349-357 (1990)). Hepatische Sternzellen besitzen perizytäre Eigenschaften und speichern im ruhenden Zustand 80 % des körpereigenen Vitamin A (Friedman S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993)). Nach myofibroblastischer Transdifferenzierung, die neben der Matrixproduktion und der α -SMA-Expression vermittelten Kontraktilität 10 durch eine einsetzende Proliferation, Vitamin A-Verlust und ein verändertes Wachstumsfaktorenprofil gekennzeichnet ist, sind sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung und dem Fortlauf der Leberfibrose beteiligt (Friedman, S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993); Gressner, A. M., Kidney Int. 49: 39-45 (1996)).
- 15 Bei bronchialen Asthma-Erkrankungen und fibrotischen Lungenerkrankungen sind Myofibroblasten die wesentliche Matrixproduzenten (Tremblay, G.M. et al., Can. Respir. J. 5(1):59-61 (1998); Gízycki, M.J. et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16(6):664-73 (1997); Gabbrielli, S. et al., Pathologica. 86(2):157-60 (1994)).
- 20 Beim Übergang von *in situ* Karzinomen in invasive Karzinome treten ebenfalls Myofibroblasten mit den typischen Eigenschaften von induzierter extrazellulärer Matrixproduktion und Kontraktilität auf (Cintorino, M. et al., Int. J. Cancer 47: 832 - 836 (1984); Gabbiani, G. et al., Am. J. Pathol. 83:457 - 474 (1976)).
- 25 In einer Vielzahl von Karzinomen sind die Stromazellen Myofibroblasten (Terada, T. et al., J. Hepatol. 24: 706-12(1996); Faouzi, S. et al., J. Hepatol. 30(2): 275-84 (1999); Kosmehl, H. et al., Br. J. Cancer. 81(6): 1071-9 (1999); Pujuguet, P. et al., Am. J. Pathol. 148: 579-92.(1996); Chomette, G. et al., Pathol. Res. Pract. 186(1): 70-9 (1990); Ronnov-Jessen, L. et al., J. Clin. Invest. 95(2): 859-73 (1995)), die in parakriner Ab- 30 hängigkeit das Tumorstadium beeinflussen (Neaud, V. et al., Hepatology 26: 1458-66 (1997); Tomlinson J. et al., Clin. Cancer Res. 5(11): 3516-22

WO 02/04509

6

PCT/EP01/07913

(1999). Aber die Tumorzellen können auch selber aus myofibroblastischen Abkömmlingen bestehen wie z.B. bei Myofibroblastomen und Myofibrosarcomen verschiedener Organe (Gocht, A. et al., Pathol. Res Pract. 195(1): 1-10 (1999); Unden, A.B. et al., J. Invest. Dermatol. 107 (2): 147-53 (1996); Auger, M. et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 113(11): 1231-5 (1989)).

Gentherapeutische Ansätze für chronische Fibroseerkrankungen und Tumorerkrankungen: Da Myofibroblasten die zentralen Zelltypen in vielen sklerosierenden Erkrankungen und mancher Tumorerkrankungen sind, sind sie ideale Zielzellen der Therapie, auch der Gentherapie. Durch eine zelltypspezifische, differenzierungsabhängige Kontrolle der Expression (a) von Genen kodierend für z.B. intrazellulären Signalmediatoren (Walther, W., Stein, U., Mol. Biotechnol. 13(1): 21 - 28 (1999)) oder (b) RNA-kodierenden Sequenzbereiche, die durch Anlagerung die Transkription oder die Translation bestimmter Gene beeinflussen (Bai, J. et al., Mol. Ther. 1(3): 244 - 254 (2000)) oder (c) eines Enzyms für eine zyklische Rekombination (CRE), das floxP-flankierte Genbereiche verändert (Sauer, B. Methods 14: 381 - 392 (1998)), wird eine Gentherapie bestimmter Zielzellen ermöglicht. Als Vektoren werden vielfach virale Vesikel wie z.B. adenovirale oder retrovirale Abkömmlinge (Miller, N. Whelan, J. Hum. Gene Ther. 8, 803 - 815; Mountain, A., Tibtech. 18: 119 - 128 (2000); Schiedner, G. et al., Nat. Genet. 18, 180 - 183 (1998); Parr, M. J., Nat. Med. 3, 1145 - 1149 (1997); Ory, D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400 - 11406 (1996); Feng, M. et al., Nat. Biotechnol. 15: 866 - 870 (1997)) benutzt. Aber auch die DNA eines Plasmidkonstruktes kann blank oder in Aggregaten mit Liposomen oder Polymerkörpern verabreicht werden (Hengge, U. et al., Nat. Genet. 10:161 - 166 (1995); Gottschalk, S. et al., Gene Ther. 3:3410 - 3414 (1990); Wagner, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:3410 - 3414 (1990)). Für gentherapeutische Ansätze und Veränderungen der myofibroblastischen Zellfunktion sind geeignete regulatorische Sequenzen bzw. ein Promoter notwendig, die/der die entsprechenden Zellfunktionseingriffe und

WO 02/04509

7

PCT/EP01/07913

Veränderungen in der Expression in Myofibroblasten dirigieren kann, voraussetzende Bedingung, die aber bislang nicht erfüllt ist. Denn erst durch den Einsatz regulatorischer Sequenzen innerhalb eines Promoters, die die Zellfunktionseigenschaften (a) durch eine veränderte Genexpression, (b) durch eine Einwirkung in die Proteinsynthese oder (c) durch Genomalteration myofibroblastensprechend dirigieren, können myofibroblastische Zellen gentherapeutisch angesprochen werden.

Zusammenfassung der Erfindung

Bei der Charakterisierung des regulierenden Sequenzbereichs des α -SMA-Gens (nachfolgend auch " α -SMA-5'-Sequenzbereich") wurde überraschenderweise gefunden, dass einzelne Bereiche hierin, nämlich innerhalb -698 bis +18 des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (Nummerierung, falls nicht anders angegeben, bezogen auf das in Fig. 7A gezeigte α -SMA-Gen aus *rattus norvegicus*) Aktivitäten aufweisen, die sich von der Aktivität des Gesamtbereiches unterscheiden. So wurde gefunden, dass der Bereich -189 bis +18 des α -SMA-Gens transkriptionsaktivierend ist, wohingegen der Bereich -698 bis -190 zelltypspezifische und differenzierungsabhängige regulative Eigenschaften aufweist, d. h. in Verbindung mit dem Core-Bereich (-189 bis +18) für die zelltypspezifische Kontrolle zuständig ist. Aufbauend auf den Befund, dass die Genexpression und/oder Zellfunktion in Myofibroblasten, myofibroblastähnlichen Zellen oder auch embryonal, transient oder induziert SMA-exprimierenden Zellen steuern können, wurde ein System für eine myofibroblastischen Steuerung erarbeitet. Die vorliegende Erfindung betrifft demgemäß

- (1) eine Nukleinsäuresequenz, umfassend
 - (i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens) und
 - (ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist, wobei vorzugsweise der regulatorische Sequenzbereich aus den Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht (wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Se-

WO 02/04509

8

PCT/EP01/07913

quenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist), und wobei die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz nicht für das natürliche α -SMA kodiert;

(2) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Ratte stammt

5 und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus der in Fig. 5A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:1), insbesondere aus der in Fig. 7A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:5), umfasst;

(3) eine bevorzugte Ausführungsform der in (2) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich eine transkriptionsaktivierende

10 Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -189 bis +18 der Fig. 7A (d.h. aus der Sequenz der Fig. 7C; SEQ ID NO:7) stammt;

(4) eine bevorzugte Ausführungsform der in (2) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -698 bis -190, be-

15 sonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215, der Fig. 7A stammt;

(5) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Maus stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5B gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:2) insbesondere aus der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz aufweist;

(6) eine bevorzugte Ausführungsform der in (5) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 490 bis 697 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt und/oder

25 (b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 489 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt;

(7) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Menschen stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle

30

WO 02/04509

9

PCT/EP01/07913

nelle Bereiche der in Fig. 5C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:3) insbesondere aus der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz aufweist;

(8) eine bevorzugte Ausführungsform der in (7) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

5 (a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 513 bis 715 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 512 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz

10 stammt;

(9) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Huhn stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5D gezeigten Sequenz insbesondere aus der in SEQ ID

15 NO:20 gezeigten Sequenz aufweist;

(10) eine bevorzugte Ausführungsform der in (9) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 497 bis 699 der in SEQ ID NO:20 gezeigten

20 Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 496 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt;

(11) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz, wie in (3), (6),

25 (8) oder (10) definiert;

(12) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz, wie in (4), (6), (8) oder (10) definiert;

(13) einen Vektor, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in (11) und/oder (12) definiert;

30 (14) einen Vektor, in dem eine Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10) definiert, inseriert ist;

(15) eukaryontische Zellen oder Organismen, die mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10) definiert oder einem Vektor, wie in (13) oder

WO 02/04509

10

PCT/EP01/07913

- (14) definiert, transient oder stabil transfiziert transformiert oder infiziert sind;
- (16) ein Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen Zellen, wie in (15) definiert, umfassend das Transfizieren, Transformieren oder Infizieren von Ausgangszellen mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder mit Vektoren, wie in (13) oder (14) definiert;
- (17) ein Verfahren zur Herstellung der Organismen, wie in (15) definiert, umfassend das Injizieren von ES-Zellen, die mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder mit Vektoren, wie in (13) oder (14) definiert, transfiziert sind, in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter;
- (18) ein Verfahren zur Isolierung oder zur Sichtung von Glatten Muskelzellen, Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus, umfassend die Expression eines Reportergens in einer eukaryontischen Zelle oder einen Organismus, wie in (15) definiert;
- (19) ein Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen, umfassend Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder einem Vektor, wie in (14) definiert, in die Organismen oder Organe;
- (20) ein Arzneimittel, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10), (11) oder (12) definiert, oder einen Vektor, wie in (13) oder (14) definiert und
- (21) die Verwendung eines funktionellen Bereichs aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens, wie vorstehend unter (1) bis (12) definiert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression, zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderung und zur Manipulation der Genexpression und/oder Zellfunktion, insbesondere in transient embryonal SMA-positiven Zellen, in Myofibroblasten und myofibroblastähnlichen Zellen.

WO 02/04509

II

PCT/EP01/07913

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beigelegten Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figurenbeschreibung

- 5 Fig 1: Messung der Luziferasereporteraktivität in ruhenden und myofibroblastisch-aktivierten Hepatischen Sternzellen (HSC) unter Kontrolle des PRL-700-Reporterkonstruktes.
- Fig 2a: Immunocytochemie nach Einzelzelldissoziation von differenzierten EB und Kultivierung der vom Verband gelösten Zellen. In pSMA-GFP-190 transfizierten Zellen zeigten auch α -SMA-negative Zellen (1C) eine GFP-Expression (1B). In pSMA-GFP-700 transfizierten Zellen war die GFP-Expression (2B) auf α -SMA-exprimierenden Zellen begrenzt (2C).
- 15 Fig 2b: Aufbau des SMA-GFP-700 bzw. SMA-GFP-190 Reportervektor für stabile Transfektionen in embryonale Stammzellen oder transgene Reportermausmodelle. In die Konstrukte ist zwischen den GFP-Reporter (EGFP-Variante) und den 716bp (SEQ ID NO:5) bzw. 207bp (SEQ ID NO:7) aus der 5'-Region des α -SMA-Gen als heterologe regulatorische
- 20 Sequenz das erste Intron des chicken β -Actins kloniert. Zur Selektion von stabilen Transfektanten hat das Konstrukt, neben der Ampicillinresistenz eine weitere Resistenz gegen Neomycin, die in eukaryotischen Zellen eine G418 Selektion erlaubt.
- 25 Fig 3a: Luciferasereporteraktivitäten unterschiedlich langer SMA-Konstrukte (SMA-125 bis SMA-700; vergleiche auch Fig. 7) die nach transienter Transfektion in embryonalen Myotuben und Myoblasten der Zelllinie L6 ermittelt wurden. L6-Zellen, die nach Serumzug in α -SMA-exprimierende Myotuben differenzieren, zeigten eine 4- bis 5fache Induktion aller
- 30 Konstrukte im Vergleich zu den Vorläufer L6-Myoblasten. Das SMA-190-Konstrukt besitzt einen stark transaktivierenden Einfluss. Das SMA-700-Konstrukt dirigiert dagegen eine differenzierungsabhängige Reporterex-

WO 02/04509

12

PCT/EP01/07913

pression. Die Aktivitäten der SMA-Konstrukte wurden mit der Aktivität des SV40-Promoter (100%) in Relation gesetzt. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen durchgeführt.

- 5 Fig. 3b: Plasmidkonstrukt zur Expression eines Peptids oder Polypeptids von Interesse unter Kontrolle der 716 bp-5'-Sequenz (SEQ ID NO:5) des α -SMA-Gens. Zur Detektion der Expression kann in den Consensus des Leserasters (ORF) ein oder mehrere Erkennungssequenzen (Tags) eingebaut werden wie die kodierende Sequenz für Streptavidin (SEQ ID NO:34) und/oder ein von einem Antikörper (9E10) erkanntes Epitop wie myc (SEQ ID:35), und/oder zur Aufreinigung auch eine für fünf Histidine kodierende Sequenz (SEQ ID NO:36) enthalten. Sowohl die Sequenz des Peptids von Interesse als auch die damit verknüpften TAG-Sequenzen unterliegen der zelltypspezifischen und differenzierungsabhängigen Kontrolle des regulativen Sequenzbereichs des α -SMA-Gens.

Fig 4: LoxP-vermittelte Cre-Rekombination unter Kontrolle des α -SMA-5'-Genbereichs:

- a.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-Gens (SEQ ID NO:32) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-Gens in Myofibroblasten (1), der Cre-vermittelten Excision des loxP-flankierten Neomycin-Gens (neo) (2) und der anschließenden Expression des Gens von Interesse (3).
- 25 b.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-Gens (SEQ ID NO:32) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-Gens in Myofibroblasten (1), der Cre-vermittelten Excision des loxP-flankierten Gens von Interesse (2), sodaß eine anschließende Expression des Gens von Interesse unterbrochen wird (3).

WO 02/04509

13

PCT/EP01/07913

c.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-ER-Fusionsgens (SEQ ID NO:32 +ERTM, Daniellian PS et al., Mol. Endocrinol. 7: 232-240, 1993) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-ER-Fusionsgens in Myofibroblasten (1). Nach Zusatz bzw. Injektion von 0,1 bis 2 mg 4-OHT kann im nächsten Schritt die Bindung des Liganden durch das ER-Peptid erfolgen und sich ein Cre-ER/4-OHT-Komplex bilden. Anschließend transloziert der Komplex in den Kern und es werden durch Cre die in Fig. 4a und b gezeigten genetischen Veränderungsschritte (2) und (3) durchgeführt.

In Fig. 4 bedeutet: nS: nukleäre Signalpeptidsequenz; schraffierte Fläche: Intronsequenz; LP: Linker Peptidsequenz; ERTM: Sequenz für alterierten Östrogenrezeptor mit hoher Affinität für den synthetischen Liganden, 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), der aber endogen produziertes 17 β -Estradiol nicht bindet; β -A: β -Aktin-Intron (SEQ ID NO:31); und 4-OHT: 4-Hydroxytamoxifen

Fig 5: 5'-upstream Region und Anfang Exon1 des α -SMA in verschiedenen Spezien (Region -713 bis +52, Nummerierung bezogen auf Sequenz A)

A: Ratte (*Rattus norvegicus*; SEQ ID NO:1; Acc. No S76011 ; Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem. 267(2): 984-989 (1992)).

B: Maus (*Mus musculus*; SEQ ID NO:2; Acc. Nos. M57409 M35194; Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990)).

C: Mensch (*Homo sapiens*; SEQ ID NO:3; Acc. No. J05193; Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265(3): 1683-1687 (1990)).

D: Huhn (*Gallus gallus*; SEQ ID NO:4; Acc. M13756 D00041 N00041; Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261(19): 8965-8976 (1986)).

Fig. 6: Alignment der in Fig. 5 gezeigten Sequenzen.

WO 02/04509

14

PCT/EP01/07913

Fig. 7: zeigt die bevorzugte, aus Ratte (*Rattus norvegicus*) stammenden α

-SMA Sequenzen der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO:)

- | | |
|---|------|
| A: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -698 bis +18 | (5) |
| B: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -124 bis +18 | (6) |
| 5 C: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -189 bis +18 | (7) |
| D: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -214 bis +18 | (8) |
| E: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -244 bis +18 | (9) |
| F: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -484 bis +18 | (10) |
| G: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -521 bis +18 | (11) |
| 10 H: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -189 bis -125 | (12) |
| I: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -214 bis -190 | (13) |
| J: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -244 bis -215 | (14) |
| K: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -484 bis -245 | (15) |
| L: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -521 bis -485 | (16) |
| 15 M: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -698 bis -522 | (17) |

Fig. 8A: β -1-Globin-Gen von *Oryctolagus cuniculus*; Intron II / Exon III-Übergang; Acc.No: V00882; Sequenz 1250-1343 (SEQ ID NO:30)

- 20 Fig. 8B: Cytoplasmisches β -Actin-Gen von *Gallus gallus*; Acc. No: X00182, Intron I (544-1542); gezeigt ist die Sequenz von 550 bis 1503 (SEQ ID NO:31).

- 25 Fig. 8C: Skizze einer floxP-site: Die FloxP-Sequenz (siehe auch SEQ ID NO:33) besteht aus 13 bp invertierten Repeats (horizontale Pfeile), die eine 8 bp asymmetrische Core-Region flankieren, welche an zwei Stellen (vertikale Pfeile) durch Cre geschnitten wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

- 30 Die vorliegende Erfindung beruht auf den überraschenden Befund, dass durch spezifische regulatorische Sequenzen des α -SMA-Gens, insbesondere solche die eine oder mehrere der in Fig. A bis M von Fig. 7 (SEQ ID

WO 02/04509

15

PCT/EP01/07913

NOs:5 bis 17) gezeigten Sequenzen enthalten, die Genexpression der hiermit operativ verknüpften funktionellen Nukleinsäuresequenz so z. B. eines Reportergens oder eines anderen funktionellen Gens in Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen gesteuert wird.

5

Die Nukleinsäuresequenz der Ausführungsform (1) der Erfindung enthält einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens. Dieser regulierende Sequenzbereich kann dabei von Säugern, insbesondere von Primaten oder Nagern oder Vögeln und besonders bevorzugt von Ratte, Maus, Mensch oder Huhn stammen (Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem. 267(2): 984-989 (1992); Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990); Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265 (3): 1683-1687 (1990); Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261 (19): 8965-8976 (1986)).

15

In der bevorzugten Ausführungsform (2) stammt der regulierende Sequenzbereich, wie vorstehend erwähnt, von der Ratte (Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992)). Besonders bevorzugt ist dabei, dass der funktionelle Bereich eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz aufweist und besonders bevorzugt aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz stammt. Hierbei sind insbesondere solche transkriptionsaktivierende Sequenzen bevorzugt, die wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsekutive Basen aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz aufweisen und besonders bevorzugt die in Fig. 7B oder 7C gezeigten Sequenzen (SEQ ID NOs:6 oder 7) umfassen. Alternativ oder zusätzlich hierzu kann der funktionelle Bereich eine zelltypspezifisch oder differenzierungsabhängig regulierende Nukleinsäuresequenz sein, bevorzugt eine solche, die aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 509 von SEQ ID NO:5), besonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215 der Fig. 7A, stammt. Dabei sind solche zelltypspezifische Sequenzen bevorzugt, die wenigstens 25, vorzugsweise wenigstens 35, konsekutive Basen aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A

20

25

30

WO 02/04509

16

PCT/EP01/07913

aufweisen und besonders bevorzugt die in Fig. 7I oder 7M gezeigten Sequenzen umfassen.

Gemäß der bevorzugten Ausführungsformen (5) - (10) stammt der regulierende Sequenzbereich alternativ von der Maus, dem Menschen oder dem Huhn (Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990); Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265 (3): 1683-1687 (1990); Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261 (19): 8965-8976 (1986)), wobei die funktionellen Bereiche vorstehend unter (5) bis (10) definiert sind. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist auch hier, dass die transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz wenigstens 10, bevorzugt wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsekutive Basen aus der unter (6), (8) oder (10) definierten transkriptionsaktivierenden Sequenz aufweist bzw. wenigstens 25, vorzugsweise wenigstens 35, konsekutive Basen aus der vorstehend unter (6), (8) oder (10) definierten zellspezifischen Sequenz aufweist. Insbesondere sind solche Teilsequenzen aus in den SEQ ID NOs:18, 19 und 20 gezeigten Sequenzen bevorzugt, die den Sequenzen 7A - 7M der Sequenz aus Ratte entsprechen (gemäß dem Alignment in Fig. 6).

Die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung kann dabei eine peptid- oder proteinkodierende DNA-Sequenz (einschließlich jedoch nicht eingeschränkt auf Reportergene, Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren und regulatorische DNA-Sequenzen) oder eine funktionelle RNA-kodierende Sequenz (einschließlich jedoch nicht eingeschränkt auf ein Ribozym) sein.

Frühere Arbeiten haben die Verknüpfung von α -SMA-Gen-Fragmenten mit Reportergenen gezeigt (u.a. Nakano, Y. et al., Gene 99(2): 285-9 (1991); Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem. 15, 267(2): 984-9 (1992); Johnson, A.D. und Owens, G.K., Am. J. Physiol. 276: C1420-31 (1999); Hautmann, M.B. et al., J Biol Chem. 272(16): 10948-56, (1997); Simonson, M.S. et al.,

WO 02/04509

17

PCT/EP01/07913

Am. J. Physiol. 268(4 Pt 2): F760-9 (1995); Kim, J.H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190(3): 1115-21 (1993); McNamara, C.A. et al., Am. J. Physiol. 268: C1259-66 (1995) sowie WO 00/24254 und US-Patent 5,885,769). Geeignete Reportergene für eine myofibroblastische Steuerung sind z. B. die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführten Gene. Andere funktionelle Gene im Sinne der vorliegenden Erfindung sind z. B. Gene, die für pharmakologisch aktive Proteine oder Peptide kodieren, und regulatorische DNA- und RNA-Sequenzen.

10 **Tab. 1:** Beispiele möglicher Reporter, deren Expression durch die α -SMA-5'-Sequenz kontrolliert werden kann

Reporter	Detektion	Sequenz (SEQ ID NO)	Referenz
destabilisiertes EGFP	488-507 nm	21	EP-A-0892047
red fluorescent Protein	538-583 nm	22	
GFP und Varianten z.B. Blue Variant	380-440 nm	23	EP-A-0892047
Renilla Luziferase		24	
Luziferase Firefly	Lumineszenz	27	
SEAP ¹	BCIP ² , NBT ³	26	
CAT ⁴		28	
hGH ⁵		29	JP 1985234584
β -Galactosidase	x-Gal ⁷	25	
Horseradish Peroxidase	DAB ⁶ , AEC ⁷		EP-A-0234075

¹ SEAP: secreted alkaline phosphatase

² BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat

³ NBT: Nitroblue-Tetrazolium

15 ⁴ CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase

⁵ hGH: human growth hormone

⁶ DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

⁷ AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol

WO 02/04509

18

PCT/EP01/07913

Der Vektor gemäß Ausführungsform (13) umfasst konventionelle Transfektionsvektoren und für den Gentransfer geeignete Vektoren.

- Die eukaryontischen Zellen oder Organismen gemäß Ausführungsform (15) der vorliegenden Erfindung können durch dem Fachmann wohlbekannte Transfektions-, Transformations- oder Infektionsverfahren von Ausgangszellen bzw. Infizieren von ES-Zellen in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter erhalten werden.
- Bislang war es nicht möglich den Vorgang der myofibroblastischen Aktivierung durch einen Reporter zu sichten, da ein regulierender Sequenzbereich, der spezifisch auf den Aktivierungsübergang von ruhenden Zellen zu myofibroblastischen Zellen anspricht, nicht gefunden wurde. Durch die Fusion des Sequenzbereichs von -698 bis +18 (SEQ ID NO:5) mit einem Reportergen (siehe Tabelle 1) und Insertion in einen Transfervektor und anschließender Transfektion kann die myofibroblastische Aktivierung gesichtet werden (Fig. 1). In bisherigen Methoden wurde für eine Sichtung des myofibroblastischen Aktivierungsvorgangs immunzytologische oder immunhistologische Verfahren gewählt, die mehrere Arbeitsschritte wie Fixieren der Zellen, Antigenblocken, Antikörperinkubation und Detektion beinhalteten (F. Hofman, Current protocols in immunology, Chapt. 5.8: Immunohistochemistry; Eds. J.E. Coligan et al., National Institute of Health, USA (1996)). Zur immunzytologischen bzw. immunhistologischen Detektion von Myofibroblasten konzentrierten sich die Verfahren auf die immunchemische Anfärbung des α -SMA-Proteins. Quantitative Aussagen über die Aktivierung z.B. durch ein toxikologisches Reagenz waren allerdings auf diese Weise nicht möglich. In der vorgelegten Erfindung wurde als α -SMA-5'-Sequenz kontrollierter Reporter des myofibroblastischen Transformationsprozeß vorzugsweise lumineszierende Reporterproteine gewählt und die Aktivierung der Zellen quantitativ und sehr empfindlich durch ein Luminometer (MLX Microplate Luminometer der Fa. Dynex Technologies, Chantilly, USA) gemessen (Fig. 1). Durch eine quantitative

WO 02/04509

19

PCT/EP01/07913

Reporterbestimmung ergibt sich durch das Verfahren erstmals die Möglichkeit toxikologische und pharmakologische Studien quantitativ durchzuführen, die dann Aussagen über das myofibroblastische Aktivierungspotential der Substanz ergeben und damit die Möglichkeit der Detektion des chronisch relevanten Organschädigungspotential.

Die Bestimmung des myofibroblastischen Übergangs an Zellen, die den Vektor mit dem α -SMA-5'-Sequenz-Reporterfusionkonstrukt beinhalten, birgt auch die Möglichkeit, therapeutische Medikamentsichtungen durchzuführen; hier kann eine Verminderung der myofibroblastischen Aktivierung, z.B. induziert durch ein Toxin oder einen fibrogenen Wachstumsfaktor wie z.B. Transforming Growth Factor beta (TGF β), anhand des α -SMA-5'-Sequenz kontrollierten Reporters ausgelesen werden.

Das erfindungsgemäße vorgelegte Verfahren, in dem α -SMA-5'-Sequenzbereiche (-698 bis +18) zur Reportersteuerung genutzt werden, umfaßt neben der Sichtung der myofibroblastischen Aktivierung die Isolierung von bestimmten Zellen anhand der α -SMA-5'- gesteuerten Reporterexpression. Dies wird in dem vorgestellten Verfahren vorzugsweise durch operative Verknüpfung von α -SMA-5'-Sequenzbereichen mit einem fluoreszierenden Reporter (z.B. GFP siehe Tabelle 1) durchgeführt, so daß nach Einbringen des Vektorkonstruktes in einen Organismus oder einer Zellpopulation die Isolierung von transient embryonal SMA-positiver Zellen oder von myofibroblastisch induzierten Zellen aus einem Zellgemisch oder Verbandes aufgrund der Fluoreszenz mithilfe eines FACS-Gerätes (FACS: Fluorescence activated cell sorting) durchgeführt werden kann. Alternativ erlaubt die Verknüpfung des α -SMA-5'- Sequenzbereichs mit anderen Reportern die Isolierung von Myofibroblasten und Arealen mit myofibroblastähnlichen Zellen durch Mikrodisektion unter licht- oder fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle.

WO 02/04509

20

PCT/EP01/07913

Die vorgelegte Erfindung umfaßt ebenfalls die Rolle des Sequenzbereichs -698 bis +18 des α -SMA-Gens für die spezifische Genexpression in embryonalen Stammzellen (ES), die in Embryoid Bodies zu embryonalen Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen oder Skelettmuskelzellen differenzieren können (Evans, M. J., Kaufmann, M. H., Nature, 292, 154 - 156 (1981)). Der Vergleich verschiedener stabil in ES-transfekzierter Konstrukte mit unterschiedlichen Domänen des α -SMA-5'-gelegenen Sequenzbereichs zeigte, daß für eine Selektion von Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und Glatten Muskelzellen aus embryonalen Zellaggregaten eine Reportersteuerung durch den Sequenzbereich -189 bis +18 (Fig. 7C; SMA-190) nicht ausreicht, sondern zusätzliche 5-gelegene Domänen im Bereich -698 bis -190 des α -SMA-Gens (Seq. I, J, K, L und M der Fig. 7) notwendig sind (Fig. 2).

Die Erfindung betrifft ebenfalls die operative Verknüpfung des α -SMA-5'-Sequenzbereichs oder Teilbereiche der Sequenzen (Seq. A bis M von Fig. 7) mit anderen die Expression beeinflussenden Nukleinsäuresequenzen. Beispiel sind Intronsequenzen wie die des β -Globin- (siehe Fig. 8a, SEQ ID NO:30) oder des Huhn- β -Aktin-Gens (siehe Fig. 8b, SEQ ID NO:31), aber auch andere Enhancersequenzen wie die des viralen CMV wie in dem Vektor von Fig. 3. Aber auch andere hier nicht genannte expressionsbeeinflussende Sequenzen können mit den α -SMA-5'-Sequenzen oder Domänen aus denen (Seq. A bis M von Fig. 7) operativ verknüpft werden.

Wird nicht ein Reportergen, sondern ein anderer peptid- oder proteinkodierender Genbereich mit den α -SMA-5'-Sequenzbereichen (SEQ ID NOs:5 bis 17) verknüpft, kommt es zu einer α -SMA-5'-gesteuerten Expression des operativ verknüpften Genbereichs. In der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird Sequenz A von Fig. 7 für eine Steuerung der Expression des Genbereichs von Interesse benutzt. Fig. 1 oder Fig. 3 zeigt die differenzierungsabhängige Expression unter transkriptioneller Kontrolle der Sequenz A von Fig. 7: Die transkriptionelle Kontrolle durch

WO 02/04509

21

PCT/EP01/07913

Sequenz A verhindert die Expression in Myoblasten oder ruhenden myofibroblastischen Vorläufer, während sie nach Myotubendifferenzierung oder nach myofibroblastischer Transdifferenzierung zur Expression des verknüpften Genbereichs führt. Wird Sequenz C von Fig. 7 mit dem Zielgen verknüpft, kommt es auch zur Expression in vielen Zelltypen wie z.B. in Fibroblasten, bei Verknüpfung der Sequenzen A, F, G von Fig. 7 in myofibroblastischen Zellen oder SMC-Abkömmlingen. Der durch α -SMA-5'-Sequenzbereiche (Seq. A bis M von Fig. 7) transkriptionell gesteuerte Genbereich kann wiederum ebenfalls mit zusätzlichen Sequenzdomänen verknüpft werden. Die Verknüpfung unter Berücksichtigung des Leseras-
 5 10 15 20 25 30

ters mit kodierenden Sequenzen für bestimmte Tags oder Reporterdomänen (Fig. 3b) ermöglicht die Verfolgung der Genexpression oder die Aufreinigung Proteins oder Peptids des durch α -SMA-Sequenzen transkriptionell gesteuerten Genbereichs.

Durch die operative Verknüpfung der α -SMA-5'-Sequenzbereiche (Seq. A bis M von Fig. 7) mit Sequenzen, die RNA kodierende DNA oder Genbe-
 15 20 25 30

reiche für Signalmediatoren enthalten, kann funktionell in den Phänotyp myofibroblastischer Zellen eingegriffen werden. Nach Insertion solcher Konstrukte in einen Vektor, der sich zur Gentherapie eignet (wie z.B. verschiedene Generationen von adenoviralen, retroviralen oder lentiviralen Vektoren und deren Abkömmlinge (Ory, D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 11400 - 11406 (1996); Feng, M. et al., Nat. Biotechnol. 15: 866 - 870 (1997)) bzw. nackte oder in Aggregaten mit geladenen Polymeren oder Liposomen zusammengefaßte Plasmidvektoren) (Hengge, U. et al., Nat. Genet. 10: 161-166 (1995); Gottschalk, S. et al., Gene Ther. 3: 448 - 457 (1996)) wird die Voraussetzung für gentherapeutische Ansätze myofibroblastischer Zellen und myofibroblastähnlicher Zellen geschaffen, die bei sklerosierenden Erkrankungen (Desmouliere, A. et al., Exp. Nephrol. 3: 134-139 (1995); Gabbiani, G., Cardiovasc. Res. 38: 545-548 (1998); idem, Pathol. Res. Pract. 190: 851-853; idem Am. J. Pathol. 83: 457-474 (1976)) und Tumorerkrankungen (Terada, T et al., J. Hepatol. 24: 706-

WO 02/04509

22

PCT/EP01/07913

12(1996); Faouzi, S. et al., J. Hepatol. 30(2): 275-84 (1999); Kosmehl, H. et al., Br. J. Cancer, 81(6): 1071-9 (1999); Pujuguet, P. et al., Am. J. Pathol. 148: 579-92 (1996); Chomette, G. et al., Pathol. Res. Pract. 186(1): 70-9 (1990); Ronnov-Jessen, L. et al., J. Clin. Invest. 95(2): 859-73 (1995); Gocht, A. et al., Pathol. Res. Pract. 195(1): 1-10 (1999) genutzt werden können.

Die operative Verknüpfung von Sequenzbereichen aus Sequenz A bis M aus Fig. 7, wobei in dieser Erfindung vorzugsweise die Sequenz A aus Fig. 7 benutzt wurde, mit dem Enzym für die zyklische Rekombination (Cre) (SEQ ID NO:32) ermöglicht es, in myofibroblastisch-differenzierten Zellen Genbereiche, die mit einer floxP-Sequenz (Fig. 8c, SEQ ID NO:33) flankiert wurden, neu zu rekombinieren. Hier kann nach Funktion des Cre-Enzyms und der Orientierung der floxP-Sequenzen eine Inversion, eine
15 Excision, Integration oder Translokation des gefloxten Genbereichs unter Kontrolle der gewählten regulierenden α -SMA-5'-Sequenzbereiche erfolgen. In dieser Erfindung gewählte mögliche Konstruktionen des Vektors sind in Fig. 4 dargestellt.

20 In dem Verfahren (17) gemäß der vorliegenden Erfindung werden transfi-
zierte ES-Zellen in Blastozysten eines Wirtsorganismus injiziert und in die Leihmutter eingesetzt (V. Papaioannou, R. Johnson, Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A.L. Joyner, Oxford UK (1993); T. Doetschman, Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press
25 Inc. San Diego, USA (1994)). Nach Rückkreuzungen der geborenen und herangewachsenen transgenen Chimäre werden homozygote Tiere intoxi-
ziert und auf ihre transgene Genexpression untersucht.
Alternativ können in dem Verfahren (17) die Konstrukte ohne Vektor-
rückrad durch Mikroinjektion in den Vorkern eingebracht werden und zu
30 transgenen Organismen führen (J.W. Gordon et al., Methods Enzymol. 101: 411-33 (1983); B. Hogan et al., Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, Gold Spring Harbor, NY (1994)).

WO 02/04509

23

PCT/EP01/07913

Organismen gemäß der Ausführungsformen (15) und (17) der vorliegenden Erfindung umfasst Säuger einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf Primaten, Nager und Huftiere (wobei es sich - falls humane Organismen unter den betreffenden nationalen oder regionalen Patentvoraussetzungen nicht schutzfähig sind - bei den Säugern um nicht-humane Säuger handelt). Die eukaryotischen Zellen gemäß Ausführungsform (15) umfassen alle möglichen Zellen und Zelllinien aus den obengenannten Säugern.

Die "Arzneimittel" gemäß Ausführungsformen (20) und (21) der vorliegenden Erfindung (je nach Aufgabenstellung, Anwendung, Art der weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenz usw. kann es sich dabei auch um ein Diagnostikum handeln) können - in Abhängigkeit von der Applikationsform - neben den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen/Vektoren noch handelsübliche Zusatzstoffe, Verdünnungsmittel und dergleichen enthalten. Die Arzneimittel sind dabei zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen geeignet, d.h. sie sind für die Behandlung und Diagnose einer Vielzahl von Erkrankungen (wie in dem Abschnitt "Hintergrund der Erfindung" ausgeführt) einschließlich Fibroseerkrankungen aufgrund chronischer Organschädigung (wie z.B. der Hepatitis, der Glomerulonephritis, der Myofibrose oder fibrosierenden Lungenerkrankungen) und Tumorerkrankungen einsetzbar.

Die Erfindung wird anhand der folgenden, nicht einschränkenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele

Materialien Und Methoden

30 Tabelle 2: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (SEQ. ID. NO)	Bereich im α -SMA-Gen
SMA-710F	5'-GTC CTT AAG CTT GAT ATC AAG GGT CAG CG (37)	- 710 bis -682
SMA-30R	5'-GGC TTC TGA ATT CTG GGT GGG TGG TGT CT (38)	+1 bis +29

WO 02/04509

24

PCT/EP01/07913

SMA-245F	5'-TGT TCT CAG GCT CAG GAT G (39)	-252 bis -235
SMA-190F	5'-CTG TTT CGA GAG AGC AAA GCT TAG G (40)	-203 bis -181
SMA-100	5'-GAG TGA ACG GCC AGC TTC (41)	um -100

Folgende kommerziell erhältliche Vektoren wurden im Verlauf der Arbeit benutzt:

- 5 Als allgemeine Klonierungsvektoren dienten pBluescript-SKII+ (Clontech, Heidelberg) und pGEM3Z (Promega, Mannheim). Bereiche des α -SMA-Promoter wurden anschließend in den promoterlosen Luciferase-Vektor pRL-null (Promega, Mannheim) kloniert. Um die Aktivität erzeugter Konstrukte zu vergleichen wurden aus der pRL-Familie zusätzlich pRL-SV40 und pRL-
- 10 CMV oder auch Vektoren der pGL3-Familie (Promega, Heidelberg) verwendet.

Beispiel 1: Herstellen der α -SMA-5'-Sequenz

- Aus isolierter Ratten-DNA wurde zunächst ein 736bp langes Fragment aus dem 5'-Promoterbereich des α -SMA-Gens amplifiziert und kloniert.
- 15 Dazu erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation des Bereichs von -708 bis +28 aus genomischer Ratten-DNA mit den Primer SMA-710F (HindIII) und SMA-30R (EcoRI), die die angegebenen Restriktionsschnittstellen in ihrer Sequenz beinhalten. Nach Restriktion wurde das Fragment (-698 bis +18)
- 20 in pRL-null durch Ligation inseriert und der resultierende Vektor pRL-SMA-700 für Untersuchungen an eukaryontischen Zellen in *E. coli* K12-Stämmen amplifiziert (siehe auch Sequenz von Fig. 7A).

Beispiel 2: Sichtung der myofibroblastischen Differenzierung durch Reporterexpression unter Kontrolle des 5'-Bereichs des α -SMA-Gens

- 25 A. Herstellen von durch α -SMA-5'-Sequenzbereiche regulierten Reportervektoren: Für die Herstellung der α -SMA-5'-Genbereich-Reporterkonstrukte wurden in Reportervektoren unterschiedliche 5'-Genbereiche des α -SMA inseriert. Das mit den Primern SMA-710-F und SMA-30-R hergestellte
- 30 Amplifikat (s. o.) von genomischer Ratten-DNA wurde mit EcoRI und

WO 02/04509

25

PCT/EP01/07913

HindIII geschnitten und in pBSSK + (Stratagene) kloniert und so pB-SMA-700 erzeugt. Unter Nutzung der vorhandenen Restriktionschnittstellen im 5'-Bereich des α -SMA-Gens wurden die Fragmente SMA-480 (PstI), SMA-215 (PvuII) und SMA-125 (DraII) erzeugt, indem sie mit EcoRI und dem spezifischen Restriktionsenzym aus pB-SMA-700 geschnitten wurden und zunächst in pGEM (Promega) oder pB-SK (Stratagene) kloniert wurden. Dabei entstanden folgende Plasmide: pGEM-SMA-480, pGEM-SMA-215 und pB-SMA-125. Mit den Primer SMA-245F (PstI) oder SMA-190F(HindIII) als sense Primer und SMA-30R als antisense Primer wurden spezifische Fragmente generiert, die anschließend über ihre primer-assoziierten Restriktionschnittstellen kloniert wurden, dadurch entstanden pGEM-SMA-245 und pB-SMA 190.

Alle Promoterfragmente des α -SMA-Promoter wurden über EcoRI/HindIII oder EcoRI/SacI in pRL-null kloniert, wodurch 6 unterschiedliche lange Deletionsreporterkonstrukte SMA-700 bis SMA-125 erzeugt wurden.

B. Transiente Transfektion: Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGENE™6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Pro Ansatz wurde 1,5 µg Plasmid-DNA verwendet, die sich aus 1,2 µg pRL-700 und 0,3µg pGL3-Kontrollplasmid zusammensetzten, was einem DNA/Reagenz-Verhältnis von 1 : 3 entspricht. Für die Transfektionen wurden ruhende Hepatische Sternzellen (HSC), die durch enzymatische Leberperfusion und Dichtegradientenzentrifugation aus der Rattenleber isoliert wurden (Knock, D. S., de Leeuw, A. M., Exp. Cell. Res., 139, 468 471 (1982)) und nach Kultur auf Plastikschalen (Falcon) in Myofibroblasten differenzierte HSC verwendet (Geerts, A. et al., J. Hepatology, 9, 59 - 68 (1989)).

C. Bestimmung der Reporteraktivität unter Kontrolle von Sequenz A in ruhenden HSC und in myofibroblastischen HSC: Eine Messung der Aktivitäten erfolgte mit dem Dualen-Luciferase Reporter-Assay-System (DLR™, Promega, Mannheim). In den transienten Transfektionen zeigten nur my-

ofibroblastische Zellen eine deutliche Aktivität des pRL-700-Reporterkonstrukt. α -SMA-negative Zellen zeigen Reporteraktivitäten, die unterhalb von einem Prozent der relativen Aktivität lagen. In Myofibroblasten wurde der Reporter um den Faktor 14 induziert. Ruhende Zellen hatten keine

5 Aktivitäten (>1%) (Fig. 1). Damit kann das Konstrukt nach Transfektion zur Sichtung der myofibroblastischen Differenzierung verwendet werden.

Beispiel 3: Reporter unter Kontrolle einer α -SMA 5'-Sequenz in stabil transfizierten Organismen und Zellen

10 A. Konstruktion eines Reporter-Vektors unter Kontrolle des α -SMA: Aus einem modifizierten GFP-Expressionvektor (pCAGGS) (Ikawa, M. et al., Develop. Growth Differ. 37: 455 - 459 (1995)) mit einem Fragment des Chicken-B-Actin-Promoter und dem ersten Intron des Chicken-B-Actins (SEQ ID NO:31) wurde das kardiale Promotorelement durch einen

15 Restriktionsverdau mit SnaBI und ApaI exzidiert und mit den jeweiligen α -SMA-5'-Sequenzbereichen (SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7) nach Verdau von pRL-700 oder pRL-190 mit XhoI und EcoRI ersetzt. Nach Aufreinigung der Banden über ein Agarosegel wurden die Enden aufgefüllt, um eine 'Blunt End'-Klonierung durchführen zu können. Um eine Religation des

20 Vektors zu verhindern, wurden bei diesem zusätzlich eine Dephosphorylierung der 5'-Enden durchgeführt. Nach einer Ligationsreaktion und Transformation in *E. coli* wurden positive Klone isoliert, deren Plasmid-DNA aufgereinigt und sequenziert und so der Einbau der α -SMA-5'-Sequenzbereiche in der richtigen Orientierung überprüft. Die Sequenzierung

25 wurde unter Verwendung des markierten Primers SMA-100 (TM=63°C), der im Bereich -100 des α -SMA-Promoter bindet, durchgeführt. Die Konstrukte sind in Fig. 2b dargestellt.

B. Sichtung und Isolierung von stabilen Transfektanten anhand der α -SMA-5-Sequenz (Sequenzen von Fig. 7A und 7C) kontrollierten Reporteraktivität: Zur Erzeugung von stabilen ES-Transfektanten wurden die bei-

30 den GFP-Reporterkonstrukte pSMA-GFP-700 und -190 (Abb.2b) hergestellt

WO 02/04509

27

PCT/EP01/07913

und in embryonale murine D3-Stammzellen transfiziert. Die stabil transfizierten Klone wurden mittels ihrer Neomycin (G418)-Resistenz, die im GFP-Konstrukt beinhaltet ist, selektioniert. Dazu wurde 24 Stunden nach der Transfektion zum erstenmal 50 µg/ml Neomycin (10 mg/ml, GibcoBRL, Eggenstein) zugesetzt.

Zur Differenzierung von Stammzellen wurden diese ohne Feederzellen und ohne Zugabe von LIF in DMEM (440 mg D-Glukose, 110 mg Natriumpyruvat, L-Glutamin, Sigma) mit 20 % FCS (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), 1x nicht-essentiellen Aminosäuren (GibcoBRL), 1x Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma) kultiviert. Für den Ansatz von Embryoid Bodies (EB) wurden $2,25 \times 10^5$ bzw. $4,25 \times 10^5$ Zellen in 1 ml Kulturmedium verdünnt. Jeweils 20 µl der Zellsuspension (450 oder 800 Zellen) wurden als hängende Tropfen kultiviert (Drab, M. et al., FASEB, 11: 905-911 (1997) und Kolossov, E. et al., J. Cell. Biol., 143: 2045-2056 (1998)).

Die Immunhistologie an EB, die mit dem pSMA-GFP-190 Promoterfragment transfiziert wurden, zeigte, daß GFP-positive Zellareale nicht immer eine α-SMA-Expression hatten und nicht alle α-SMA-positiven Zellen GFP exprimierten. GFP-positive Zellen konnten Actinin-exprimierenden kardialen oder skelettalen Muskelzelltypen zugeordnet werden. Caldesmon-positive glatte Muskelzellen wiesen keine GFP-Expression auf.

Im Gegensatz dazu zeigte das pSMA-GFP-700 Konstrukt eine spezifische GFP-Expression, die GFP-Expression konnte dabei sowohl in kardialen und skelettalen Bereichen als auch in caldesmonpositiven glatten Muskelzellen gefunden werden. Das gesichtete Reportermuster unter Kontrolle der Sequenz A in Fig. 5 des α-SMA-Gens entspricht in differenzierten ES-Zellen demjenigen während der Embryogenese. Daher ist das SMA-700-Fragment (SEQ ID NO:5) eine funktionsfähige Steuerungssequenz für die embryonal und transient SMA-positiven Zellen.

Anhand der Reporteraktivität konnten Zellen durch Trypsinierung vereinzelte werden (Fig. 2.a) und getrennt untersucht werden.

5 Beispiel 4: Herstellen von Mäusen mit transgener Genexpression in myofibroblastischen Zellen

A. Stabile Transfektion des in Fig. 2b/3 gezeigten Konstrukts in ES-Zellen:
Zur Herstellung von stabil transfizierten embryonalen Stammzellen wurden die α -SMA-Transgen-Vektoren zunächst durch einen Restriktionsver-
10 dau, dessen Schnittstelle im Ampicillingen liegt, linearisiert und nach einer Aufreinigung in H₂O gelöst (1 µg/µl). Anschließend wurde eine Elektroporation vorgenommen. Dazu wurden 5×10^6 ES-Zellen in 0,7 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und in eine Küvette überführt. Pro Elektroporationen wurden 30 µg linearisierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 100
15 µl verwendet. Nach Zugabe der DNA in die Küvette erfolgte zunächst eine Inkubation für 10 min auf Eis, die der Bildung von Präkomplexen diente. Danach wurde mit einem Elektroporator der Firma Biorad (München) bei 500 µF und 0,24 V ein Impuls erzeugt. Zur Regeneration wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend auf neomycinresistente Feederzellen plattiert.
20

Die ES- Zellen wurden in Blastozysten einer Wirtmaus injiziert und in die Leihmutter eingesetzt (V. Papaioannou, R. Johnson, in Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A.L. Joyner, Oxford UK (1993); T. Doetschman,
25 Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press Inc San Diego, USA (1994)). Nach Rückkreuzungen der geborenen und herangewachsenen transgenen Chimäre wurden homozygote Tiere intoxiziert und auf ihre transgene Genexpression untersucht.

Alternativ können Konstrukte ohne Vektorrückrad (siehe Fig.2b) durch Mikroinjektion in den Vorkern eingebracht werden und zu transgenen Mäusen führen (J.W. Gordon et al., Methods Enzymol. 101: 411-33 (1983); B.
30

WO 02/04509

29

PCT/EP01/07913

Hogan et al., in *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*, Gold Spring Harbor, NY (1994)).

B: Chronische Leberschädigung durch Intoxikation und myofibroblastische
5 Sichtung

Zur Induktion einer chronischen Leberschädigung wurden zwei wöchentli-
che Gaben von 4 % igem Tetrachlorkohlenstoff in Mineralöl (6 ml/kg Kör-
pergewicht) den Mäusen intraperitoneal 2, 4, 6 oder 8 Wochen lang ver-
abreicht. Die Mäuse wurden auf eine Pulmonitis und Nephritis sowie auf
10 das Auftreten myofibroblastischer Zellen in der Lunge und der Niere unter-
sucht. Da Tetrachlorkohlenstoff vor allem zu einer Hepatitis führt, wurde
in den Lebern transgener GFP-Mäuse die Aktivierung von myofibroblasti-
schen Zellen gesichtet.

15

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend
- (i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens), der aus Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht, wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Sequenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist, und
- (ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die nicht für das natürliche α -SMA kodiert und die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist
- zur Herstellung eines Arzneimittels zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von transient- oder nach Aktivierung SMA-positiver Zellen, von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei in der Nukleinsäuresequenz der regulierende Sequenzbereich des α -SMA-Gens
- wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 20 konsekutive Basen aus den Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens aufweist und/oder
 - von Säugern, insbesondere von Primaten oder Nagern, oder Vögeln stammt und besonders bevorzugt von Ratte, Maus, Mensch oder Huhn stammt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Ratte stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus der in Fig. 5A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:1), insbesondere aus der in Fig. 7A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:5), umfasst.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der funktionelle Bereich
- (i) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:7) stammt, und

WO 02/04509

31

PCT/EP01/07913

- wobei vorzugsweise die transkriptionsaktivierende Sequenz wenigstens 10, bevorzugt wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsequente Basen aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz aufweist und besonders bevorzugt die in Fig. 7B oder 7C gezeigte Sequenz (SEQ ID NOs:6 oder 7) umfasst; oder
- (ii) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 509 von SEQ ID NO:5), besonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 484 von SEQ ID NO:5) oder aus der Sequenz der Fig. 7I (SEQ ID NO:13) stammt, und wobei vorzugsweise die zellspezifische Sequenz wenigstens 25, bevorzugt wenigstens 35 konsequente Basen aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A aufweist und besonders bevorzugt die in Fig. 7I oder 7M (SEQ ID NO:13 oder 17) gezeigte Sequenz umfasst.
- 5 15 5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, wobei die Nukleinsäuresequenz sowohl eine transkriptionsaktivierende als auch eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz umfasst und/oder eine der in SEQ ID NOs:5 bis 17 gezeigten Sequenzen aufweist.
- 20 6. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Maus stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5B gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:2) insbesondere aus der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz aufweist.
- 25 7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der funktionelle Bereich
- (a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 490 bis 697 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt und/oder
- 30 (b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 489 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt.

WO 02/04509

32

PCT/EP01/07913

8. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Menschen stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:3) insbesondere aus der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz aufweist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei der funktionelle Bereich
- (a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 513 bis 715 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt und/oder
- (b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 512 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt.
10. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Huhn stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5D gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:4) insbesondere aus der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz aufweist.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei der funktionelle Bereich
- (a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 497 bis 699 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt und/oder
- (b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 496 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt.
12. Verwendung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz eine peptid- oder proteinkodierende DNA-Sequenz, insbesondere ausgewählt ist aus Reporter-Genen, Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren, und regulatorische DNA-Sequenzen, oder eine funktionelle RNA-kodierende Sequenz, insbesondere ein Ribozym, ist.

WO 02/04509

33

PCT/EP01/07913

13. Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen in Organismen oder Organen, umfassend das Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in Ansprüchen 1 bis 12 definiert, oder von Vektoren, in die solche Nukleinsäuresequenzen inseriert sind, in die Organismen oder Organe.

14. Verfahren nach Anspruch 13, das ein *in vivo* oder *in vitro* Verfahren ist und wobei insbesondere

(i) das Einbringen in die Organismen oder Organe unter Nutzung transgener oder knock-out /-in Technologie erfolgt, oder

(ii) das Verfahren eine gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation ist.

15. Nukleinsäuresequenz, umfassend

(i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens), der aus Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht, wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Sequenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist, und

(ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist und die nicht für das natürliche α -SMA kodiert und ausgewählt ist aus DNA-Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren, regulatorische DNA-Sequenzen und funktionellen RNA-kodierenden Sequenzen.

16. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 15, die wie in den Ansprüchen 2 bis 11 definiert ist.

17. Transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenzen oder zelltypische Nukleinsäuresequenzen, wie in Ansprüchen 4, 7, 9, oder 11 definiert.

18. Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 17 definiert, oder in dem eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 15 oder 16 definiert, inseriert ist.
- 5 19. Eukaryontische Zellen oder Organismen, die mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder einem Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, transient oder stabil transfiziert, transformiert oder infiziert sind, und die vorzugsweise
- 10 (i) einen Reporter unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens exprimieren; oder
- (ii) ein pharmakologisch aktives Protein, eine regulatorische DNA-Sequenz oder eine funktionelle RNA-Sequenz unter Kontrolle des α -SMA-Gens exprimieren oder aufweisen.
- 15 20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen Zellen, wie in Anspruch 19 definiert, umfassend das Transfizieren, Transformieren oder Infizieren von Ausgangszellen mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder mit Vektoren, wie in Anspruch 18 definiert.
- 20 21. Verfahren zur Herstellung der Organismen, wie in Anspruch 19 definiert, umfassend das Injizieren von ES-Zellen, die mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder mit Vektoren, wie in Anspruch 18 definiert, transfiziert sind, in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter.
- 25 22. Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen, umfassend das Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder Vektoren, wie in Anspruch 18
- 30 definiert, in die Organismen oder Organe,
- (i) wobei das Einbringen in die Organismen oder Organe vorzugsweise unter Nutzung transgener oder knock-out /-in Technologie erfolgt, oder

WO 02/04509

35

PCT/EP01/07913

(ii) wobei das Verfahren vorzugsweise eine gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation ist.

23. Arzneimittel, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in Ansprüchen 1 bis 12, 15, 16 oder 17 definiert, oder einen Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, wobei das Arzneimittel vorzugsweise zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen geeignet ist.
24. Verwendung eines funktionellen Bereichs aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens zur myofibroblastischen und differenzierungsabhängigen Reporterexpression und zur myofibroblastischen und differenzierungsabhängigen Genveränderung, wobei vorzugsweise der funktionelle Bereich des α -SMA-Gens
- (i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 17 definiert, ist;
 - (ii) eine Nukleinsäuresequenz, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert, ist und/oder
 - (iii) in einem Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, vorliegt.
25. Verfahren zur Isolierung oder zur Sichtung von transienten oder nach Aktivierung SMA-positiven Zellen, von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus, umfassend
- die Expression eines Reportergens in einer eukaryontischen Zelle oder in einem Organismus, die/der einen Reporter unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert, exprimiert und
 - die Detektion des Reporters.
26. Verwendung der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert zur Herstellung eines Diagnostikums zur Isolierung oder zur Sichtung von transienten oder nach

WO 02/04509

36

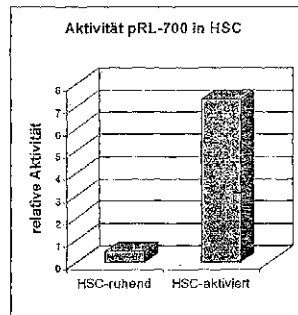
PCT/EP01/07913

Aktivierung SMA-positiven Zellen, von Myofibroblasten oder myo-fibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus

WO 02/04509

PCT/EP01/07913

Fig. 1



WO 02/04509

PCT/EP01/07913

Fig. 2a

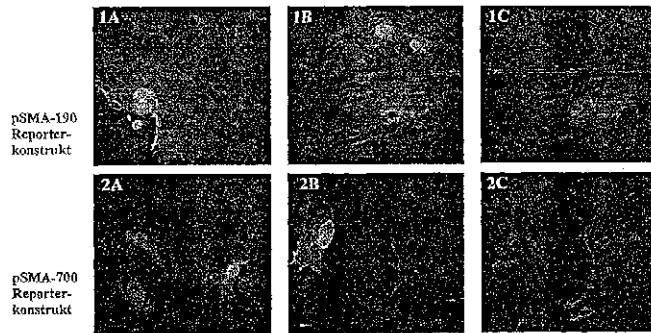
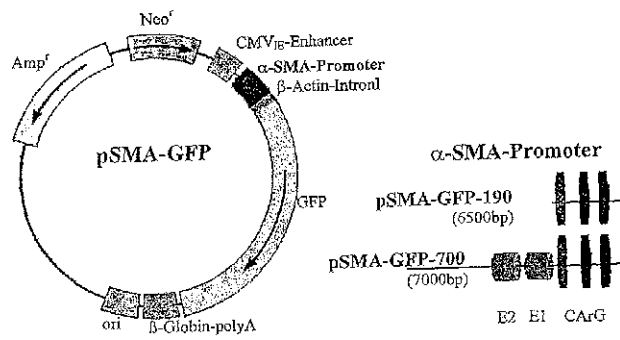


Fig. 2b



WO 02/04509

PCT/EP01/07913

Fig. 3a

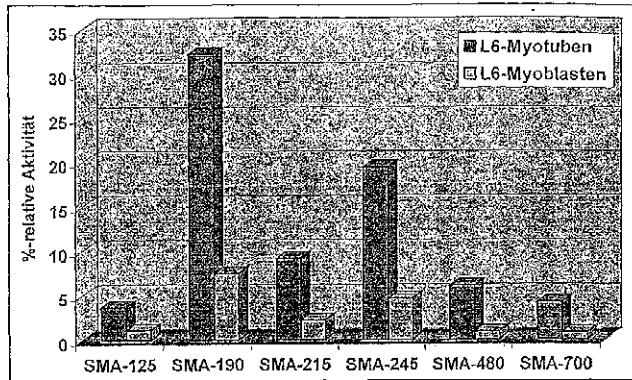
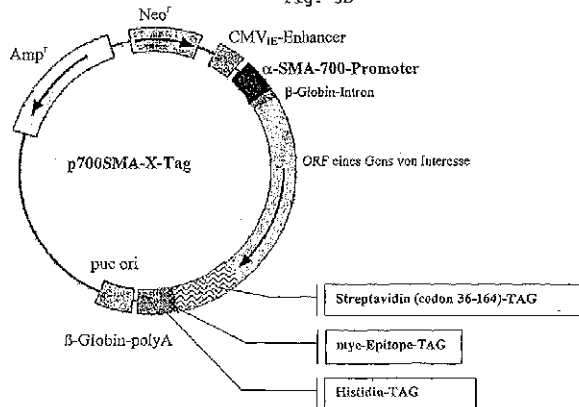


Fig. 3b



WO 02/04509

PCT/EP01/07913

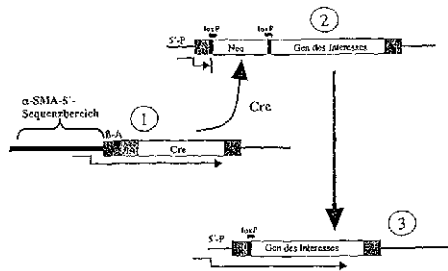


Fig. 4a

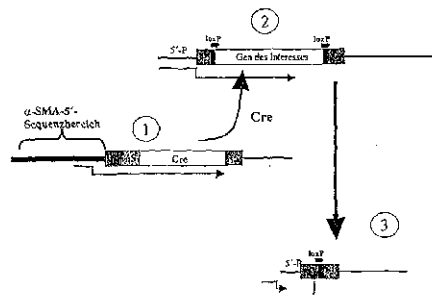
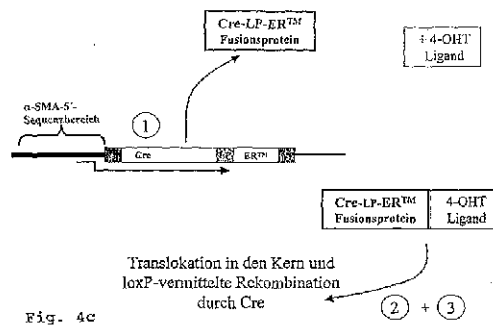


Fig. 4b

WO 02/04509

PCT/EP01/07913



PCV/EP01/07913

Fig. 5

[illegible]

WO 02/04509

PCT/EP01/07913

Fig. 6

```

RATTE 5'..ACGGTCCTTAAGCATGATATCAAGGGTCAGCGATAAACCAACATGCACGTCGACTGT
MAUS 5'..T-----T-----C-G-T-----TA-A-G-G-----A---
MENSCH 5'..T-----C---CTT---C-GCT---ATTG-TCG-TG-CAAAATTAGTAGACA-AGGTAATGCA
HUHN... 5'..-AC-AGGATCAAGCTTGTG-C--CA-T--CTA-TGCTTTGG-AATA-ACTGATG-AGACAG

RATTE ACCTAAGGGTTAAGCGATTACAGTGTATCTGACTTCTAAGTTCTCTTAGGTAACATA
MAUS -----A-----T-----A-----T-----C~
MENSCH C-AA-AA-A-G--T-----T--L--A--A--C--R-----T-TRAG---
HUHN GATATT-AT-GTCAC-CA-----GCTAGGG-CACCA--CAA--G---CAG--G-T

RATTE GGCTGGTGAATCCTGATTACATACCTCCATATGTATACATACAGACTTCATTGATACTA
MAUS -----T-----C-C-----AT-C-TATT-C-C-CACTTCC
MENSCH ---CT--C--C-T--TC-C-----GT-C-T-GT-----AC--A-
HUHN TA-ACAGCCT--AAAGACC-TAC-ATGAACCCATGTC-ACAG--GTACTTC-TT--G--

RATTE CACACAGACTCCAGACTACA TACATGTGGCTTCCATAAAATGATCACTCC TCTGCAG
MAUS -T-AGA--TTC-ATTATTA G-----C--A-----C-G-----AT
MENSCH ---A---A-A-TCTATA-G-----A-----AC-----C---ATGT
HUHN T -C-CC-AGTGCAGACCTTT--AGTGAATTG-GCCA---T-C-GT-GCTGT-TA--TT

RATTE ATTGCGAGGTGAC CCAAGC ATCTTTTGTATAGGCTACCTTTTGCAACAGTGTGCT
MAUS ---TATG-----T-G-----A-C-----
MENSCH ---TAT--AC--TGA-G-AAT---CT-CT-T-CA-G-TACCTGGTAGAA- G-TT-
HUHN GCCGAA--TATT-T-AIT--TTTGG-CCAAA-C-TTAA-AG-CAAGAGTGC-CCTAAA

RATTE T AAGTCCAGGTAGTCAGAGACAGGCCCTTCCATCTCAGGCCCTT A
MAUS -A---A-G-----T-----T-----T-----C
MENSCH ---A---GT-----G-----G-----T-GCC-CTTTCTGT-CTCAGTTTAT-
HUHN AACACT-T--CTA-TACA-AT---TGCT-T--AGTT-TCACTCTG-C-CTTGGATGTC

RATTE GCTAATGACCCAAAGGCTAGCCTGACAGGAAGAGCTGGCATCTTC TGAGGAATGTGCA
MAUS -----C-A--A-----G-----
MENSCH -GA-----C-TG---TT-C--A--T--C-----C---T-----
HUHN CTGTGAA-G-AGGGCTCTCT-CTTGTGTA-GGTGTGC---C---CAG-G-GTGT

RATTE AACCTGCGCTGCTGCTCTTCATGACACTAGCCCGTGTG TGGGCATTGAGCAGTTC
MAUS -----G-----TCC-----A-----A-----
MENSCH -----A-----C---T---C---T-----TC-----CT-----
HUHN CTGTCCAGGCAAG--TT-CTTGTGCA-TT -A-CA-G--CT----

RATTE TTCTGAGGGCTCAGGATGTTTATC CCCATAAGCAGCTG AACT GCTCTCTGTTTCGAG
MAUS -----T-----CG-----C-----G-----
MENSCH -----A---TG-CG-----T---C-G-G-----C-----AT-
HUHN -----T-----CA-----A--GTCT-----AT-

RATTE AGCAGAGCGAGGAATGCACTGGAAGAGACCCAGGCCCTCTGGCCACCCAGATTAGAGAT
MAUS -----A-----
MENSCH -----C---T-----C-----C-----
HUHN ---TCT--GTT-----G---TG--G---T-G-----GT-

RATTE TTTGTGCTGAGTCCCTATATGGTTGTGTATAGAGTGAACGGCCAGCTTCAGCCTGTCTTT
MAUS -----C-----C-----A-AG--CA--T-----C-----
MENSCH -----A-A-----T-----ACTT---TCTC-CTCT-TCA--C-
HUHN -----A-A-----T-----ACTT---TCTC-CTCT-TCA--C-

RATTE GCTTCTTGTGTTGGGAAGCGAGTGGGAGGGATCAGACCAGGGGCTATATAACCTTCAG
MAUS -----G-----G--A-----
MENSCH -----A-----A--G--G--A-----
HUHN -----G--TG-----A--AG--CTG-A-----GTT-

RATTE CATTACAGCTTCCCC AGACACCACCCACCCAGAGTGGAGAGGCCAGGCCAGTGGCCATCA
MAUS -----C-----CG-----TG-----
MENSCH -C-----T-----T GA-----T-----C-----AG-A-TG--
HUHN -T--TG-ATA-A- AGTG-----T-----CT-CT-TC-----AG-A-TG--

RATTE GGGTAAG...3'
MAUS .....3'
MENSCH .....3'
HUHN .....3'

```

WO 02/04509

PCT/EP01/07913

FIG. 7

A:

```

          TSNATCAA GGGTCAGCGA TAAACCAACA ACATGACCGT -660
GGACTGTACC TAAGGGTTAA CCGAGTTACA GTGATTCTGA CTTCTAAGTT CCTCTTAGGG -600
TAACATAGGC TGGTGAAATCC TGATTACATA CTCCATATG TAATACATAC AGACTTCATT -540
GATACATACAC ACAGACTCCA GACTACATAC AATGTGGCTT CCATTAATG ATCAGTCCCTC -480
TGCAGATTCCG CAGGTGACCC AGCATCTTT TGTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTG -420
CCTTAAAGTC CAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCTCAT CTCAGAGCCCT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAGGAGCTG SCATCTTCTG AGGAGTGTCC AAACCATGCC -300
TGCCTCTGCT CAGTGGCACT AGCCAGTCT CTGGCATTT GAGGAGTTGT TCTAGGGGCT -240
CAGCATCTTT ATCCCCATTA CAGCTGAGC TGCCTCTGT TCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGGACCCAG GCTCTTGSCA CCCAGATTAG AGAGTTTGT GCTAGGTCC -120
CTATATGTTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTCAGGCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA -60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCAACC ACCCAGA +18

```

B:

```

          GGTCC -120
CTATATGTTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTCAGGCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA -60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCAACC ACCCAGA +18

```

C:

```

          GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCTCTTGSCA CCCAGATTAG AGAGTTTGT GCTAGGTCC -120
CTATATGTTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTCAGGCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA -60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCAACC ACCCAGA +18

```

D:

```

          TGAAC TGCCTCTGT TCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCTCTTGSCA CCCAGATTAG AGAGTTTGT GCTAGGTCC -120
CTATATGTTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTCAGGCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA -60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCAACC ACCCAGA +18

```

E:

```

          GGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCCATAA CAGCTGAGC TGCCTCTGT TCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCTCTTGSCA CCCAGATTAG AGAGTTTGT GCTAGGTCC -120
CTATATGTTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTCAGGCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA -60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCAACC ACCCAGA +18

```

WO 02/04509

PCT/EP01/07913

FIG. 7 (Fortsetzung)

F:

```

TGCAGATTGC CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTG -480
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAGCCCTT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGGCTCTGCT CCATGGCACT AGCCCACTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGAGGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCATATA GCAGCTGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTGTG GCTGAGGTCC -120
CTATATGGTT GTGTTAGAGT GAAAGGCGAG CTCAGCCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA - 60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGG TATATACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCGA 1
GACACCAACC ACCAGA +18

```

G:

```

CA GACTACATAC AATGTGGCTT CCATAAATG ATCACTCCTC -480
TGCAGATTGC CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTG -420
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAGCCCTT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGGCTCTGCT CCATGGCACT AGCCCACTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGAGGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCATATA GCAGCTGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTGTG GCTGAGGTCC -120
CTATATGGTT GTGTTAGAGT GAAAGGCGAG CTCAGCCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA - 60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGG TATATACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCGA 1
GACACCAACC ACCAGA +18

```

H:

```

ATGCAGTGGG AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTGTG GCTGA -180

```

I:

```

TGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA -180

```

J:

```

CAGGATGTTT ATCCCATATA GCAGC GGGCT -240

```

K:

```

TGCAGATTGC CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTG -480
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAGCCCTT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGGCTCTGCT CCATGGCACT AGCCCACTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGA

```

L:

```

CA GACTACATAC AATGTGGCTT CCATAAATG ATCAC -480

```

M:

```

TGATATCAA GGGTCAGCGA TAAACACACA ACATGCAGGT -660
GGACTCTACC TAAGGGTTAA CCGAGTTACA GTGATTCIGA CTTCTAATTT CTTCTTAGGG -600
TAACTATAGG TGGTGAATCC TGATTACATA CTTCCATATG TAATACATAC AGACTTCATT -540
GATACTACAC ACAGACTC

```

PCIT/EP01/07913

TATATATAAGCC)GCTGCTGCTT AAGGATGCTT GAGGCTGCTT GCTGCTGCTT GAGGCTGCTT
GAGGCTGCTT GAGGCTGCTT GAGGCTGCTT GAGGCTGCTT GAGGCTGCTT GAGGCTGCTT

[illegible]

5'ATAACTTCGTATATGTATGCTATACGAAGTTAT'3'

 3'TATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA'5'

WO 02/04509
 SEQUNZPROTOKOLL
 1
 PCT/EP01/07913

<110> Odenthal, Margarete

5 <120> Genexpression, Genomalteration und Reporterexpression
 in Myofibroblasten und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen

<130> 011547wo/JH/ml

10 <140>
 <141>

<160> 41

15 <170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1
 <211> 764
 <212> DNA
 20 <213> Rattus norvegicus

<400> 1
 aggttcctta agoatgatat caagggtcag cgataaacca acaacatgca cgtggactgt 60
 acctaaagggt taacgcaggt acagtgattc tgactttctaa gttctcttta gggtaacata 120
 25 ggtcgtgtgaa tcttgattac atacttcac atgtatatac taacagcttc atgtatacta 180
 caacacagact ccagactaca taacatgttg ctccatataa atgacacac ctcgcagat 240
 tgcaggtga ccaacagcat tttgttata ggtacattt tgaacagtg ttgccttaa 300
 gtccacgta gtccagaca ggccttctt catctcaag ccttagctaa tggacccaa 360
 ggttagcctg ccaggaagag ctggcatctt ctgaggaatg tgaacacat gctcgtct 420
 30 gcttcctgac actagccag tgtctggga tttgagcagt tgtctgagg gctcaggatg 480
 tttatccca taagcagctg aactgcctcc tgtttcgaga gcagagcaga ggaatgcagt 540
 ggaagagacc cagctctgg ccacccagat tagagagttt tgtgctgagg tccctatatg 600
 gttgtgttag agtgaacggc cagcttcagc ctgtctttgc tcttgtttg ggaagcagat 660
 gggaggggat cagaccagg ggtatataa ccttcagca ttcagctcc ccagacacca 720
 35 cccaccaga gtggagaagc ccagccagtc gccatcaggg taag 764

<210> 2
 <211> 745
 40 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 2
 atggttcctta atcatgctgt taagggtcag taaaagcca gcaacatgct ggaatgttaa 60
 45 gggtaaaago agttacagtg attctgact ctaagttaact ctttgggcaa cacaggctgg 120
 ttaactctca ctacactct caattctcat ttcactcac ctccctcaag aacttgattt 180
 ataaacagtg tgcctacct aaaaatcaga ctctctgca tatttatggg tgactcgaag 240
 catcttttga tctaggtac cttttgcac agtgttgctt aaaaatcgca gctagtcaga 300
 gacagggcct tctttatca agtctcagc taatggccca aaagactagc ctgacagggg 360
 50 ctggcatctt ctgaggaatg tgcacacgt gctcgcctt gtccatgac actagccag 420
 tgtctgggca tttaagcagt tgttttgagg gcttaggatg tttatccca taacagctg 480
 agctgcctcc tgtttggga gcagaaacaa ggaatgcagt ggaagagacc cagctctgg 540
 ccacccagat tagagagtt tgtgctgagg tccctatatg gttgtgttag agtgaacggc 600
 cagcttcagc cgtctttgc tcttgtttg ggaagcagat gggaggggat cagagcagg 660
 55 ggtatataa ccttcagc ttcagctcc cgggacac accacccag agtggagaag 720
 ccagccagct cgtgtcagg gtaag 745

WO 02/04509	2	PC/T/EP01/07913
<210> 3		
<211> 763		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
5		
<400> 3		
atggtcccta cttatgctgc taaattgctc ggtgacaaat tagtagacaa agctaattga 60		
caaaaaaatg aatgtagtta tagtaattga gaattcoaaa ttctcttttg taagacatag 120		
gcctgtcaac cttgtctcca taactcaagt cctggtttca ttgaacaaac caaagacac 180		
aatgtataag taactgttag ctccataaa accataaact cctctatgta ttatagaca 240		
gctgaagaaa tatcttttct ctttgcatcc tccctggta gaagggtttt aaaagtccgt 300		
gctaggcaga ggcagccctt ttggccctt tctgtctca gtttattagg aaatggccgt 360		
aaattccagc atgataagaa gctggcatcc tctgtggaat gtcattacca tgcctgcatc 420		
tgccattacc cctagatcag tgcctctggg cattctctga gttgtctga aggttggcg 480		
tgttttatct ccccaagcgg ctgaactgcc tccctgttca tgagcagacc agtgaatgc 540		
agtggaaagag acccaagcgc cggccaccca gattagagag ttctgtggtg aggtccctat 600		
atggttgtgt tagactgaac gacagctcaa agtctgtctt tgcctctgtt ttgggaagca 660		
agtggagaga ggcagggcca aggggctata taaccttca gctttcagct tccctgaaca 720		
ccaccagtg tggagcagcc cagccaagca ctgtcagggt aag 763		
20		
<210> 4		
<211> 747		
<212> DNA		
<213> Gallus gallus		
25		
<400> 4		
acactaggat gaagcttgtc cacagttcct agtctttgg aaataaactg atggagacag 60		
gatattgatt gtcacccatt acaggctagg gacaccataa caacctgtta gcagaacgtt 120		
tacacagcct tcaagaaccc taacctgaac cctatgcaac agcaggtact tcttttagta 180		
tccccccagt gcagaacctt taagtgaatt tctggcaaaa ttacgtagct gtttagcttg 240		
ccgaagtat tctcattgct ttggtccaaa tctttaacta atgcacagtg tctcttaaa 300		
aaacatttcc ctattacaaa tgaactgctc ttcaagtttcc actctgctc ttggatgttc 360		
ctgtgaagga cagggcctct ctctcttgtt tgaactgtgt ctctctga cagaggtgt 420		
ctgtccacag cagcttttct ttgtctgatt ttgaactgtt ctgcagtggt tatcttaac 480		
agctgaaggt ctctctctct ttcatgagct ctgcgttggg atgcagtgga agggactgac 540		
gectgtcgac ccagattaga ggtttttgta ataaggtccc tatatggttt tgttagagac 600		
ttcggctctg tctctctaat ctctctctct tgtttgggag gctggtggga ggggaagac 660		
tgaagggggt atataacccct ggtgcttttg gataccacag gcccatccc agagctgcta 720		
40		
tccccagcca agcactgtca ggttaag 747		
<210> 5		
<211> 716		
<212> DNA		
<213> Rattus norvegicus		
45		
<400> 5		
tgaattcaag ggtcagcgat aaaccaacaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60		
gcacttacag tgaattctgac ttctaagttc ctcttagggt aactagagct ggtagactct 120		
gattacatac ttccatatgt aatacataca gaattcaatt atactacaca cagactccag 180		
actaactaca atgtggcctc cataaaatga tcaactcctc gcagattctg aggtgaccca 240		
agcatctttt gttataggct accttttgca aagtggttgc cttaagatcc cagctagcca 300		
gagacaggcc ctctctctac tcaagcctct agctaattga cccaaggctt agcctgacag 360		
55		
gaagagctgg catcttctga ggaattgtca aacctgctc ggtctgtct catggcacta 420		
gcccagtgtc tgggcatttg agcagttgtt ctgagggctc aggatgttta tccccataag 480		
cagctgaact gctctctgtt tcgagagcag agcagaggaa tgcagtgga gagaaccagg 540		
cctctggcac ccagattaga gaggtttgtg ctgaggtccc tatatggttg tgttagagt 600		
aacggccagc ttacagctgt ctctctctct tgtttgggaa gcagtggtga ggggatcaga 660		

WO 02/04509 3 PCT/EP01/07913

ccagggggct atataacccct tcagcattca gctcccccag acaccaccca cccaga 716

<210> 6
 5 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 6
 10 ggtccctata tgggtgtgtt agagtgaacg gccagcttca gctgtcttt gctcccttgt 60
 tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag ggggtctat aacctttcag ctttcagcct 120
 cccagacac caccaccca ga 142

<210> 7
 15 <211> 207
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 7
 20 gacagagga atgcagtga agagaccag gctctggca cccagattag agattttgt 60
 gctgaggtcc ctatatgtgt gtgttagagt gaacggccag cttcagcctg tctttgtccc 120
 ttgtttggga agcgagtggg agggatcag accaggggc tatataccc ttccagattc 180
 agctcccca gacacccc accaga 207

<210> 8
 25 <211> 232
 <212> DNA
 30 <213> Rattus norvegicus

<400> 8
 tgaactgcct cctgtttcga ggcagagca gaggatgca gtggaagaga cccaggcctc 60
 tggcaccag attagagagt ttgtgtctga ggtccctata tgggtgtgtt agagtgaacg 120
 gccagcttca gctgtcttt gctccttgtt tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag 180
 ggggtcttat aacctttcag ctttcagcct cccagacac caccaccca ga 232

<210> 9
 40 <211> 262
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 9
 45 ggggtcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgcct cctgtttcga ggcagagca 60
 gaggatgca gtggaagaga cccaggcctc tggcaccag attagagagt ttgtgtctga 120
 ggtccctata tgggtgtgtt agagtgaacg gccagcttca gctgtcttt gctccttgtt 180
 tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag ggggtcttat aacctttcag ctttcagcct 240
 cccagacac caccaccca ga 262

<210> 10
 50 <211> 502
 <212> DNA
 55 <213> Rattus norvegicus

<400> 10
 tctctgtcag attgcaggt gacccaagca tcttttgtta taggtacct ttgcaacag 60
 tgttgcttca aagtcacag tagtcagaga caggccttc ctcatctca gcccttagct 120

WO 02/04509

4

PCT/EP01/07913

```

aatggaccca aaggctagcc tgacaggaag agctggcctc ttctgaggaa tgtgczaacc 180
atgectgcgt ctgctccatg gcactagccc agtgtctggg catttgagca gtgtttotga 240
gggctcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgctt cctgtttcga gagcagagca 300
gaggaaatgca gtggaagaga cccagggctc tggcaccacg attagagagt ttgtgtctga 360
5 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gctgtctttt gctcctgttt 420
tgggaagcga gtgggaaggg atcagaccag ggggtatat aacctctcag cattcagcct 480
ccccagacac caccacacca ga                               502

10 <210> 11
    <211> 539
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

15 <400> 11
    cagactacat acaatgtggc ttccataaaa tgatcacctc tctgcagatt cgcaggtgac 60
    ccaagcatct tttgttatag gctacctttt gcaacagtgt tgccttaag tcccagctag 120
    tcagagacag gcccttcctc atctcaagcc attagctaat ggaaccaaag gctagcctga 180
    caggaaagagc tggcactctc tgaggaatgt gcaaacctag cctgcgtctg ctccatggga 240
    20 ctagccacgt gtctgggcat ttgagcagtt gttctgaggg ctccagatgt ttatcccat 300
    aagcagctga actgcotcct gttctgagag cagagcagag gaatgcagt gaagagagcc 360
    aggcctctgg caccagatt agagagtttt gtgtgaggt ccttatatgg ttgtgttaga 420
    gtgaacggcc agottcagcc tgtctttgct ccttgtttgg gaagcgagtg ggaggggac 480
    agaccagggg gctatataac ccttcagcat tcagcctccc cagaccacac ccaccacaga 539

25
    <210> 12
    <211> 65
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

30 <400> 12
    gagcagagga atgcagtga agagaccacg gccctctggca cccagattag agagtittgt 60
    gctga                               65

35
    <210> 13
    <211> 25
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

40 <400> 13
    tgaactgcct cctgtttoga gagca                               25

45
    <210> 14
    <211> 30
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

50 <400> 14
    gggctcagga tgtttatccc cataagcagc                               30

55 <210> 15
    <211> 240
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

```

WO 02/04509 5 PCT/EP01/07913

<400> 15
 tccctctgcag attctgcagg gacccaagca tctttttgta taggctacct ttgcaacag 60
 tggttgcctta aagtcaccag tagtcagaga caggcccttc ctcatctcaa gcccttagct 120
 aatggaccaca aaggcttagcc tgacaggaa agctggcacc tcttgaggaa tctgcaaaac 180
 5 atgccttgcgt ctgctccatg gcaactagccc agtgtctggg catttgagca gtgttctga 240

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16
 cagactacat acaatgtggc ttccataaaa tgaatcac 37

15

<210> 17
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

20

<400> 17
 tgatatcaag ggtcagcgat aaaccaacaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60
 gcagttacag tgattctgac ttctaagttc ctcttagggc aacataggct ggtgaatcct 120
 25 gattacatac ttccatctgt aatacataca gacttcattg atactacaca cagactc 177

<210> 18
 <211> 697
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

30

<400> 18
 tgcgtgtaag ggtcagtaaa aagccagcaa catgctggaa tgttaagggt taaagcagtt 60
 35 acagtgattc tgactctcaa gttactcttt gggcaacaca ggtgggttaa tctcactac 120
 atacttcaat tcttatttcc actacctccc ctcaagaact tgatttataa acagtgctgc 180
 taacataaaa tcatgactcc tctgcataat tatgggtgac tgaagcaco ttltgatota 240
 ggtacacttt tgcaacagtg ttgcttaaaa atgcagctga gtcagagaca ggccttctcc 300
 tatccaagtc ctacagctaat gggcccaaaag actagcctga caggggctgg catcttctga 360
 40 ggaatgtgca aaccgctgct gcgtctgtcc catgacacta gccagtgctc tgggcattta 420
 agcagttggt ctgagggtct aggatgttta tccccaatac gagctgagct ggcctctggt 480
 tcggggagcag aacagaggaa tgcagtgga gagaccacg ctctggccac ccagattaga 540
 gagttttgtg ctgaggtccc tatatggttg tgttagagtg aacggccagc ttcagccctg 600
 ctctgtctct tgtttgggag gcgagtggga ggggatcaga gcaaggggct atataaccc 660
 45 tccagcttca gcttcccccg gacaccacc acccaga 697

<210> 19
 <211> 715
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50

<400> 19
 tgcgtctaaa ttgctcgggt acaaatagtg agacaaagct aatgcacaaa aaatgaatg 60
 55 tagttatagt aatgcagaat tccaaattcc tcttctgaag acataggcct gtcacccctg 120
 tctccatact tcaagttcctg gtttcattga aaccaaccaa agacacaatg tataagtaca 180
 atgtagcttc cataaaaaa caactccctc tatgtattta tagacagctg aagaatatc 240
 ttctctcttt gcatcctaco gtggtagaag ggttttaaaa gtccgtgcta ggcagaggca 300
 gccctttctg cccctttctg ttctcagtt attaggaat ggctgaat tccagcatga 360

WO 02/04509 6 PCT/EP01/07913

```

tagcaagctg gcatctcttg tggaaatgca ataccatgac tgcacctgac cattacceta 420
gctcagtgtc tctgggcatt tctgcagttg ttctgagggc ttggcggttt tatctccac 480
aagcggcctga actgcctccc gtttcatgag cagacacagtg gaatgcagtg gaagagacc 540
acgctccggc caccagatt agagagtttt gtgctgaggt cctatatgg ttgtgttaga 600
5 ctgaacgaca ggcctcaagtc tctctttgct ccttgthttg gaagcaagtg ggaggagagc 660
aggccaagg gctatataac ccttcagctt tcagcttccc tgaacacac ccagt 715

<210> 20
<211> 699
<212> DNA
<213> Gallus gallus

<400> 20
15 cttgtccaca gttctcagtg ctttggaat aaactgatgg agacaggata ttgattgtca 60
cccattacag gctagggaca ccataaacac ctgttagcag aacgtttaca cagcctcaa 120
agacctacac atgaacccca tgcacacaga ggtacttctt ttagtatccc ccagtgca 180
accttttaag tgaatttctg gcaaaattca gtgctgttt agcttgccga aagtattctc 240
attgctttgg tcaaatctt taactaatgc aaagtgtctc cttaaaaaca ctttccctat 300
20 taacaaatgac tgcctcttca gtttctcctc tgcctcttgg atgttctctg gaaggccagg 360
gcctctctct cttgttttga cgtgtgtctt tccgtacaga ggtgtctgt ccaggccag 420
cttttcttgc tgccttttag caagtctgc agtgtttatc ttacacagct gaagtctcc 480
tctgttttca tgaagctctg gttggaaatc agtggaaagg actgacgctc gtccagccag 540
attagagggt tttgtaataa ggtccctata tggttttgtt agagacttgc gctctgtctc 600
25 tctcatctct gctcttctt tggagggtg gtggaggag aagagctgaa ggggtctatc 660
aaccttggtg cttttggata cacagtgcac catccaga 699

<210> 21
30 <211> 845
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
35 <221> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EGFP

<400> 21
atgttgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatctcgtt agagctggac 60
gggaagctaa accgcccaca gttccagctg tccggcgagg gcgaggcgca tcccactac 120
40 ggcaagctga cctggaagtt catctgcacc accggcaagc tgcctgtgct ctggcccacc 180
ctcgtgacca ccttgacctc cggcgtgcag tgccttcagc gctaccccca ccacatgaag 240
cagcagagct tcttcaagtc cggcctgcac gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggagc accgcaacta caagaccgac gccaggtgca agttcgaggg cgacacctg 360
gtgaaccgca tgaagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg accgcaacat cctggggcac 420
45 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gctctatata tggccgacaa gcagagaagc 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg accgcaagct gcagctcgcc 540
gacctatccc agcagacac cccctcggc gacggccccc tctgtctgac cgacaacac 600
tacctgagca cccagtcgca cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgaga tccatgggtc 660
ctgctggagt tctgtacgca cgcgggac acctctggca tggacagact gtacaagaag 720
50 cttgacatg gcttccgccc ggaagtgagg gacagagatg atggcagct gccatgtct 780
tgtcccagg agagcgggat ggaaccgac cctgcagcct gtgcttctgc taggatcaat 840
gtgta 845

<210> 22
55 <211> 666
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

```

WO 02/04509

7

PCT/EP01/07913

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Red
Fluorescent Protein

5 <400> 22
 aagaatgttta tcaaggagtt catgaggttt aagggttcgca tgaagggaac ggtcaatggg 60
 cccgaggtttg aaatggaagg cgaaggagag gggaggccat acgaaggcca caatcccgta 120
 aagctlaagg taaccaaggg gggacotttg ccatttgctt gggatatttt gtcaccacaa 180
 ttccagtatg gaagcaagggt atatgtcaag caccctgccg acataccaga ctataaaaag 240
 10 etgcatttcc ctgaaggatt taaatgggaa aggttcatac actttgaaga cggtagcgtc 300
 gttactgtaa ccaggatttc cagtttgcag gatggctggt tcatctacaa ggtcaagttc 360
 atbgttgta scotttccttc cgalggccot gttatggcaa agaagacaat gggctgggaa 420
 gccagacttg agcgttttga tccctgtgat ggctgtttga aaggagagat tcatagggtc 480
 ctgaagctga aagacggctg tcatctacata gttgaattca aaagtattta catggcaag 540
 15 aagcctgtgc agctaccagg gtactactat gttgactcca aactggatat aacaagccac 600
 aacgaagact atacaactgt tgagcagtat gaagaaccc agggagccca caatctgttc 666
 ctttag

20 <210> 23

<211> 719

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: GFP

<400> 23
 atggtgagca agggcgaggga gctgttcacc ggggtgtgtc ccatcctggt cgagctggag 60
 30 ggccagctaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggggga tgcacactac 120
 ggcaagctga cctgaagttt catctgcacc acgggcacg tgcctgtgcc ctggccacc 180
 ctgtagacca cctgaacca cggcgtgcag tgcttcagcc gtaacccga caacatgaag 240
 cagcagactc tcttcaagtc cgcctatgcc gaaggctacg tccagcagcg caacatcttc 300
 ttcaaggagc agggcaacta caagaccgca gcggagtgta agttcgagg cgaccccttc 360
 35 gtgaacgcca tggagctgaa gggcatcgac ttcgaaggag agggcaacat cctggggcac 420
 aaggtggagt acaacttcaa cagccacac gcttatatca tggccgaaa gcgaagagac 480
 ggcatacagg tgaacttcaa gatccgcac aacatcgagg auggcagct gtagctgtcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc gaaggccccc tctgtgtgcc cgaacaccac 600
 taactgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaacccaaay agaagcgga tccatgtgtc 660
 40 ctgctggagt tcttgaccgc cgcggggatc actctcgcca tggacagagt gtacaagta 719

<210> 24

<211> 937

45 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Renilla
Luciferase

50 <400> 24
 atgacttga aagtttatga tccagaacaa aggaacggga tgataactgg tccgcgtgg 60
 tgggocagat gtaaacaaat gaatgttctt gattcattta ttaattatta tgattcagaa 120
 55 aaacatgttg aaaaatgtgt tattttttta catggtaacg cggcctcttc ttattttatg 180
 cgacatgttg tgccacatat tgagccagta gcgcggtgta ttataccaga cttatttggt 240
 atgggcaaat caggcaaatc tggtaatggt tcttataggt tacttgatca ttacaatat 300
 ctactgcat ggtttgaact tcttaattta ccaagaaga tcatttttgt cggccatgat 360
 tgggtgtgctt gtttggcatt tcaattatga tatgagatc aagataagat caaagcata 420

WO 02/04509

8

PCT/EP01/07913

```

gttcacgctg aaagtgtagt agatgtgatt gaatcatggg atgaatggcc tgatattgaa 480
gaagatattg cgttgatcaa atctgaagaa ggagaaaaaa tggttttggg gaataacttc 540
ttcgtggaaa ccatgtttgc atcaaaaatc atgagaaagt tagaacccga agatattgca 600
gcctatcttg aaccattcaa agagaaagggt gaagttcgtc gtccaaactt atcatggcct 660
5 cgtgaatacc cgttagtaaa aggtggtaaa cctgacgttg tacaaattgt taggaattat 720
aatgcttacc tacgtgcaag tgatgattta ccaaaaatgt ttattgaatc ggaccocagg 780
ttcttttcca atgctattgt tgaagggtgc aagaagtttc ctaatactga atttgtcaaa 840
gtaaaagggt ttcatthttc gcaagaagat gaacctgatg aaatggggaa atatatcaa 900
rcgttcgttg agcgagttct caaaaatgaa caataat 937
10

<210> 25
<211> 3144
<212> DNA
15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: beta
Galactosidase
20

<400> 25
atgtcgttta ctttgaccaa caagaacgtg attttcgttg ccggtctggg aggcattggt 60
ctggacacca gcaaggagct gctcaagcgc gatcccgctg ttttacaacg tcgtgactgg 120
gaaaaccctg cgttaccaca acttaactgc cttgcagcac atcccccttt cgcagactgg 180
25 cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc 240
gaatggcgct ttgcctggtt tccggacaca gaagcggctg cggaaagctg cgtggagtgc 300
gatcttcctg aggcggatgc tgcgtcgtc cctccaaact ggcagatgca cgtttacgat 360
gcgcctcatc acacaaactg aacctatccc attacggtca atccgcgctt tgttccacgc 420
gagaaaccga cgggttgtta ctgcctcaca tttaatgttg atgaagctg cctacaggaa 480
30 ggcacagcgc gaattakttt tgatggcgtt aactcggcgt ttcatctgtg gtcacacggg 540
cgctcggctg gttacggcga gacagctcgt ttgcgctcgt aatttgacct gagcgattt 600
ttacggcgcc gaaaaaacgc cctcgcgtg atggtcgtcg gttggaatga cgcagattat 660
ctggaagatc aggatatgtg gcggatgagc ggcattttcc gtgacgtctc gttcgtcgat 720
aaaccgacta ccaaatcag cgatttccat gttgcacctc gctttaatga tgatttcaga 780
35 cgcctgttac tggaggctga agttcaagat tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta 840
acagtttctt tatgcaagg gtaaacgcag gtccgcagcg gcaacgcgcc ttccggcgtt 900
gaattatctg atgagcgttg tggttatgac gatcgcgtca cactacgtct gaacgtcgaa 960
aaccggaaac tgtggagcgc cgaatcccg aatctctatc gtgcggctgt tgaactgcac 1020
accgcgcagc gacgcgtgat tgaagcagaa gcctgcgatg tgggtttccg cgaaggtcgg 1080
40 attgaaatg gtctcgtgct gctgaacgac aagcgtttgc tgattcgagg cgttaaccgc 1140
cacgagcatc atcctctgca tggtcaggtc atggatgagc agacgatggt gcaggtatc 1200
ctgctgatga agcagaacaa ctttaacgac gtgcgtgtgt cgcattatcc gaacctccg 1260
ctgtgtgaca cgtgtgtgca ccgtacgccc ctgtatgttg tggatgaagc caatattgaa 1320
aaccacggca tgggtccaat gaatcgtctg accgatgac ccgcctggct accggcgatg 1380
45 agcgaacgcg taacgcgaat ggtgcagcgc gatcgtaatc acccgagtgt gatcatctg 1440
tcgtcgggga atgaatcagg ccaacgcgct aatcacgac gcctgtatcg ctggatcaaa 1500
tcctgtgac cttcccgccc ggtgcagtat gaagcgggcg gagcgcacac cagcgccacc 1560
gataktattt gcccgatgta cgcgcgcgtg gatgaagacc agcccttccc ggcgtgtccg 1620
aaatggtcca tcaaaaaatg gctttcgcta cctggagaga cgcgcgcgct gatcctttgc 1680
50 gaatacgcgc acccgatggg taacagctct ggccggtttc ctaaatatcg gcaggcgttt 1740
cgtcagtatc ccggtttaca gggcggtctc gctcgggact ggggtgatac gtccgtgatt 1800
aaatagatg aaaaacggaa cccgtggtcg gcttacggcg gtgattttgg cgatacgcgc 1860
aacgatcgcc agttctgtat gaacggtctg gctctttgac accgcacgac gcatccagcg 1920
ctgacgggag caaaacacca gaacagttt ttccagttcc gtttatccgg gcaaacacc 1980
55 gaagtaccca gcaataacct gttccgtcat agcgaataac agctccctga ctggatggtg 2040
gcgtcggatg gtaagccgct ggcacgggt gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaaggt 2100
aacagttgta ttgaactgcc tgaactacgc cagccggaga gcgcgggaca actctggctc 2160
acagtacgag tagtgcaacc gaacgcgacc gaatggteag aagccgggca catcagcgcc 2220
tggcagcagt ggcgtctgga ggaaaactc agtctgacgc tcccgcgcgc gtcacacgca 2280

```

WO 02/04509

9

PCT/EP01/07913

```

atcccgcatc tgaccaccag cgaataggat ttttgcacg agctgggtta taagcgttgg 2340
caatttaacc gccagtcagg cttctcttca cagatgttga ttggcgataa aaacaaactg 2400
ctgacgcgcg tgcgcgacga gttcaccctg gccgcgcgtg ataacgacat tggcgtaagt 2460
ggaacgcacc gccattgacc taacgcctgg gtgcgaacgt ggaaggcgcc gggcgattac 2520
5 caggcggaag cagcgttgtt gcagtgcacg gcagataaac ttgctgatgc ggtgctgatt 2580
acgacgcctc acgcgtggca gcacagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaccttac 2640
cggtatgatg gtatgtgtca aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca 2700
cgcaatccgg ccgggatttg cctgaactgc cagctggcgc aggtatgcga gggggttaaa 2760
10 ttgctcggat tagggcgcca agaaacctat ccgcacgcgc ttactgcgcg ctgttttgac 2820
cgctggggtc tgcattgttc agacatgtat aacccgtacg ttctcccgag cgaacacggt 2880
ctggcgtgcg ggaacgcgca attgaattat ggcacacacc agtggcgccg cgaattccag 2940
ttcaacatca gccgcacacg tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctctg 3000
cagcgggnag aaggcacatg gctgaatata gacggtttcc atatggggat tgggtggcag 3060
gactctctga gccgcctcag atcgccggaa ttacagctga ggcgcggtcg ctaccattac 3120
15 cagttggtct ggtgtcaaaa ataa
...
<210> 26
<211> 1558
20 <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> Beschreibung der künstlichen Sequenz: SBAP
25
<400> 26
atgctgctgc tgcctgctgc gctgggctgc aggtctacag tctccctggg cactatccca 60
gttgaggagg agaacccgga cttctggaac ccgagggcag ccgagggcct ggggtgcgcc 120
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttctt gggcgatggg 180
30 atggcgctgt ctacggtgac agctgcacgg atcctaaagc ggcagaagaa ggaacaaactg 240
ggcgctgaga taccctggcg catggacgcg ttcccatatg tggctctgtc caagacatac 300
aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360
aaggccaact tccagcccat tggcttgagt gcagccgccg gctttaacca gtgcacacg 420
acgcggcgca acgagtcact ctccctgagt aatggggcca aagaagcagg gaagtcatgt 480
35 ggaagtgtaa ccaccacag agtgacgac gcccgccag ccggaacctc cgcacacacg 540
gtgaacgcga actggtactc ggaatgcgac gtgcctgctt cggcccgcca ggaaggggtg 600
caggacatcg ctacgcagct cactctcaac atggacatg acgtgatcct aggtggaggg 660
cgaagctaca tgtttgcgat ggaaccccca gaacctgagt acccagatga ctacagccaa 720
ggtgggacca ggttggaagg gaagaatctg gtgcaggagt ggtggcgaa gccccaggtt 780
40 gcccggtatg tgtggaaagg cactgagctc atgcaggctt ccttggaacc gctctgtgac 840
catctctatg gtcctcttga gcttgagagc atgaataacg agatccacag agactccaca 900
ctggacccct cctgatgga gatgacagag gctgcctgct gctctgctgag caggaaaccc 960
cgcgcttctt tctctctctt ggggggtggt cgcctcgacc atggtctatc tgaagcagg 1020
gcttacgggg cactgactga gacgatcatg ttccagcagc ccattgagag ggcggggcag 1080
45 ctacaccagg aggaggacac gctgagcttc gtcactgccc accactccca cgtcttctcc 1140
ttcggaggct accccctgcg agggagctcc atcttcgggc tggccctctg caaggcccg 1200
gacaggaggc cctacacggt cctctatac ggaacgggtc caggctatgt gctcaaggac 1260
ggcgccggcg cggatgttac ccagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gtagcagtoa 1320
gcagtgcgcc tggacgaaga gacccacgca ggcgaggagc tggcggtggt ccgcgcggcg 1380
50 ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgcag gacacagcct tcatagcgca cgtcatggcc 1440
ttcgccgcct gccctggagc ctacaccgac tgcgacctgg cgcgcccgcc cggcacccac 1500
gacgcgcgcg acccggtta ctctagatc gggcgccgcg gccgcttcca gcagacat 1558
55 <210> 27
<211> 1651
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

```

WO 02/04509

10

PCT/EP01/07913

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Luciferase
Firefly

```

5 <400> 27
  catggagagac gccaaaaaca taaagaaagg ccggggcgcca ttctatccgc tgggaagatgg 60
  aacgcgtcga gagcaactgc ataaggctat gaagagatac gccctgggtc ctggaacaat 120
  tgcctttbaca gatgcacata tcgaggtgga catcacttac gctgagtact tggaaatgtc 180
  cgttcgggttg gcagaagcta tgaaaacgata tggggtgaat acaaatcaca gaatcgtcgt 240
10 atgcagtgaa aactctcttc aattctttat gccggtgttg ggcggttat ttatcggagt 300
  tgcagttgcs ccgcgaagcg acattataaa tgaacgtgaa ttgctcaaca gtatgggcat 360
  ttgcagcct accgtggtgt tggttccaa aaaggggttg caaaaaattt tgaacgtgca 420
  aaaaagctc caaatctcc aaaaatttat tatacggat tctaaacgg attaccagg 480
  atttcagtc atgtacagt tegtacatc tcatctacot ccgggtttta atgaatcga 540
15 ttttgagcca gagctcttc ataggacaa gacaaatgca ctgacatga actcctctgg 600
  atctactggt ctgcctaaag gtgtcgtct gctcctaga actgcttgc tgaattcttc 660
  gatgcacga gatcctatct ttggcaatca aatcattcog gatactgga ttttaagtgt 720
  tgttcattc catcacggt ttggaatgt tactacatc ggatattga tatgtggagt 780
  tgcagtcgtc ttaagtata gatttgaaag agagctgttt ctgaggagcc ttccggatta 840
20 caagattcaa agtcgcgtgc tgggtccaa cctattcttc ttcttcgca aaagcaatct 900
  gattgacaaa tacgatttat ctaatttaca cgaattgct tctggtggcg ctcccccttc 960
  taaggaaatc ggggaagcgg ttgcaagag gtccatctg ccaggtatca ggcaggata 1020
  tgggtcact gagactacat cagctattct gattacacc gagggggatg ataaacggg 1080
  ccgggtcgtt aaagtgttc catcttttga agcgaaggtt gtggtctgg ataccggaa 1140
25 aacgctgggc gtttaacaaa gagcgaaat gtgtgtgaga ggtcctatga ttatgtccgg 1200
  ttatgttaac aatccggaag cgaacacgc ctgtattgac aaggatggat ggtacattc 1260
  tggagacata gcttactggg acgaagacga acactcttc atcgttgac gctgaagtc 1320
  tctgataaag tacaaggct atcaggtggc tcccgctgaa ttggaatcca tcttgcctca 1380
  acaccccaac atcttcgacg caggtgtcgc aggtcttccc gacgatgac ccggtgaact 1440
30 tcccgctccc gttgtgttt ttgagtcagg aaagcagatg acggaanaag agatcgtgga 1500
  ttacgtcgcc agtcaagtaa caaccgcgaa aaagtgtcgc ggaggagttg tgtttgtgga 1560
  cgaagtacgc aaaggcttta ccggaaaact cgacgcaaga aaatcagag agatcctcat 1620
  aaaggccaag aaggcgcgaa agatcgccgt g
  1681

```

35

<210> 28

<211> 658

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CAT

```

45 <400> 28
  atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatgga tcgtaaagaa 60
  catcttgagg catctcagtc agttgtcaca tgaactata accagacgt tcagctggat 120
  attacggcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagacaa agttttatcc ggcctttatt 180
  cacattcttg ccgcctgat gaatgctcat ccggaactcc gtatggcaat gaaagacggt 240
  gagctgttga tatgggatg tgttcacct tgttaaccc ttttcaatga gcaaaactga 300
50 acgttttcat cgtctcggag tgaataccac gacgatctcc ggcagtttct acacatatat 360
  tcgcaagatg tggcgtgtta cgttgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gttttattgag 420
  aatatgtttt tegtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaagctg 480
  gccaatatgg acaactctct cgcctccgtt ttccagatgg gcaaatatta tacgcaagcg 540
  gacaaggtgc tgatgcgctt ggcgattcag gtccatcatg ccgtttgtga tggcttccat 600
55 tccggcagaa tgcctaatga attacaacag tactgcatg agtggcagg cggggcgt 658

```

<210> 29

WO 02/04509 II PCT/EP01/07913

<211> 582
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: b6H

<400> 29
 atgttcccaa ctattccact gagtcgcctg ttccataaac cgaatgtcgg tgcgcctcgt 60
 ctgcaccaaac tggcttttga cacttaccaag gaggttgaag aagcatatat ccgaaagaa 120
 10 cagaatataca gcttccctca gaacccacag aactcgttgt gtttctctga aagtatcccg 180
 accccttcta accgcgaaga gaccacagag aatcgaacc ttgaactgct tegtatctcg 240
 ctgctttctca ttcagtcgtg gctggagcca gtacagttcc tggcttcggt tttagoaaac 300
 tcaactggat accgtgcgtc tgcacgtaac gttaacgac tgcgtgaaga ccttgaaaga 360
 15 gggatccaga cctcgtggg tgcctcgaag gatggttca cgcgcactgg tccgatcttc 420
 aaacagactt actccaaatt cgtactaac tctcataac atgatgctct gctgaaaaac 480
 taccggctgc tgtactgctt ccgtaaaagt atggataag ttgaaacttt cctgcgtatc 540
 gttcagtgtc gttctgttga agggctcgtg ggcttcaat ag 582

20 <210> 30
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Oryetolagus cuniculus

25 <400> 30
 tataaataaa cccctctgct aaccatgttc atgccttctt othtttctca cagctcctcg 60
 gcaacgtgct ggttgttgtg ctgtctcctc attttggcaa agaattcact cctcaggtg 119

30 <210> 31
 <211> 902
 <212> DNA
 <213> Gallus gallus

35 <400> 31
 cccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg 60
 ccgcgtgctgg ccgcgtgtgc ccgcgggcta tgaagcctgc gggcgggcg cggggctttg 120
 tgcgtctccgc gtgtgcgaga ggggagcaga gccggggcg gtgccccgc gtcgggggg 180
 40 gctgcgaggg gaacaaaggt tgcgtgcgga gtgtgtgctt gggggggta gcaagggggtg 240
 tgggctcgggt ggtcgggctg taaccccccc ctgcaccccc ctccccagt tgcgtgagcac 300
 ggcocggctt cgggtgcagg cctccctgag gggcgtggcg cggggctcgc cgtcccgggc 360
 gggggggagc ggcaggtagg ggtgcggagc gggcgggggc cgcctcgggc cggggagggc 420
 tggggggagg ggcgcggcgg ccccgaggag ccgcggcgtg tccaggcgcg gcgagccgca 480
 45 gccattgcct tttatggtaa tgcgtgcgaga gggcgaggg acttcccttg tcccaaatct 540
 ggcggagcgc aaatctggga ggcgcggcgc cccccctct agcggggcg ggcgaagcgg 600
 tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggc gaggcccttc gtgcgtgcgc ggcgcgcgt 660
 ccccttctcc atctccagcc tccgggctgc cgcaggggga cggctgcctt cgggggggac 720
 ggggaggggc ggggttcggc ttctggcgta tgaccggcgg gggttatatc ttcccttctc 780
 50 tgttctctcg cagccagcca tg 803

<210> 32
 <211> 1032
 55 <212> DNA
 <213> Bacteriophage P1

<400> 32
 atgtccaat tactgacggt acaccaaact ttgcctgaat taccggctga tgnaacgagt 60

WO 02/04509

12

PCT/EP01/07913

```

gatgagggttc gcaagaacot gatggacatg ttccagggttc gccaggcggtt ttctgagoot 120
acctggaataa tgcttctgtc cgtttgcccg tctggtggcg catggtgcaa gttgaataac 180
cgggaatgggt ttcccgcaga acctgaagat gttccggatt atcttctata tcttcaggcg 240
cgcgggtctgg cagtaaaaaa tatccagcaa cgtttgggco agctaaacat gcttcacgtc 300
5 cgttcggggc tgcacgcacc aagtgaacgc aatgctgttt cactgggtat gggcgggabc 360
cgaaaagaaa acgttgatgc cgtgaacgt gcaaaacagg ctctagcgtt cgaacgact 420
gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgcgc gctgcacgga tatcgtaat 480
ctggcatttc tggggattgc ttataacac cgtttacgta tagccgaat tggcaggatc 540
aggggtaaaag atattctcag tactgaagg gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
10 aaaaacgctg ttacgcaccg aggtgtacgg aaggacatta gcttgggggt aactaaactg 660
gtcagagcgat ggaattccgt ctctggtgta gctgatgac cgaataacta cctgttttgc 720
cgggtcagaa aaaaatgggt tgccgcgcga tctgcccaca gccagctatc aactgcgcgc 780
ctggaaggga tttttgaag aactcatcga ttgatttacc ggcctaagga tgaactcgtt 840
cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccggtgct gagccgcgcg agatatgggc 900
15 cgcgtgggag ttccaatacc ggagatcatg caagctgggt gctggaccaa tgaatatatt 960
gctatgaact atatccgtaa cctggatagt gaaacagggg caatgggtgc cctgctggaa 1020
gatggcgatt ag                                     1032

20 <210> 33
    <211> 34
    <212> DNA
    <213> Bacteriophage P1

25 <400> 33
ataacttcgt ataattgatg ctatacgaag ttat                                     34

    <210> 34
    <211> 384
    <212> DNA
    <213> Streptomyces avidinii

    <400> 34
35 gctgctgaag caggtatcac cggcacctgg tacaaaccgc tgggtctgac ctctcatcgtg 60
accgcggggc ccgcgggcgc cctgaacgga acctacagat cggcgcgcg caacgcgcag 120
agcgcctacg tctgacccgg tctttacgac agcgcgcgcg ccacgcgcg cagcggcacc 180
gcccctcggtt ggaacgtggc ctgggaagat aactaccgca accgccactc cgcgaccacg 240
tggagcggcc agtacgtcgg cggcgcgcgag gcgaggatca acccccagtg gctgctgacc 300
40 tccggcacaa ccgaggccaa cgcctgggag tccacgctgg tggccacga caccctcacc 360
aagggtgaagc cgtccgcgcg ctcc                                     384

    <210> 35
    <211> 42
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

    <220>
50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: myc epitop

    <400> 35
ggatccgaac aaaagctgat ctacagaagaa gatctatgca ta                                     42

55 <210> 36
    <211> 18
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

```

WO 02/04509	13	PCT/EP01/07913
<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 5xHis Sequenz		
5	<400> 36 catcaccatc atcattaa	18
10	<210> 37 <211> 29 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
15	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer	
20	<400> 37 gtctcttaagc ttgatataca gggtcagcg	29
25	<210> 38 <211> 29 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
30	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer	
35	<400> 38 ggcttcttgaa ttctgggtgg gtggtgtct	29
40	<210> 39 <211> 19 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
45	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer	
50	<400> 39 tgtttctcagg ctcaggatg	19
55	<210> 40 <211> 25 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer	
	<400> 40 ctgttttcgag agagcnaagc ttagg	25
	<210> 41	

WO 02/04509

14

PCT/EP01/07913

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 41

10

gagtgaacgg ccagcttc

18

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

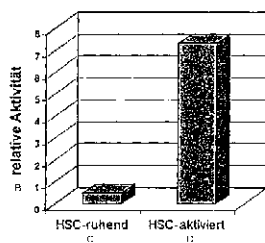
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/004509 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/47 (74) Anwälte: HEILING, Jörg usw.: Von Knedler, Selting
Weener, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (31) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07913
- (32) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 2001 (10.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 53 553.7 11. Juli 2000 (11.07.2000) DE
100 53 879.7 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE
00/28466.3 22. Dezember 2000 (22.12.2000) EP
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: OEDTIAL, Margarete (DE/DE); Bänker,
heimer, Str. 39, 50937 Köln (DE).
- (72) Erfinder: und
(75) Erfinder/Anmelder nur für USA: JUNG, Diana Veröffentlicht:
[DE/CH]; Weststrasse 7, CH-8003 Zürich (CH) — auf internationalen Recherchebericht

(54) Title: GENE EXPRESSION, GENOME ALTERATION AND REPORTER EXPRESSION IN MYOFIBROBLASTS AND
MYOFIBROBLAST-LIKE CELLS(54) Bezeichnung: GENEXPRESSION, GENOMALTERATION UND REPORTEREXPRESSION IN MYOFIBROBLASTEN
UND MYOFIBROBLAST-ÄHNLICHEN ZELLEN

A Aktivität pRL-700 in HSC



A: ACTIVITY pRL-700 IN HSC (=PROMOTERIAL ACTIVITY)
B: RELATIVE ACTIVITY
C: HSC RESTING
D: HSC ACTIVATED

(57) Abstract: The invention relates to specific, regulatory sequence regions of the alpha smooth muscle actin gene (α-SMA gene), and fusion constructs in which said regulatory sequence regions of the α-SMA gene are operably fused to other functional nucleic acid sequences. The invention also relates to the use of said regulatory sequence regions for cell type specific and differentiation specific reporter expression, for cell type specific and differentiation specific gene changes (alteration, mutation) and for gene expression changes in cells and organisms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft spezifische, regulatorische Sequenzbereiche des alpha Smooth Muscle Aktin Gens (α-SMA-Gen), Fusionskonstrukte, in denen solche regulatorische Sequenzbereiche des α-SMA-Gens mit weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenzen operativ verknüpft sind, sowie die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzbereiche zur zelltyp- und differenzierungspezifischen Reporterexpression, zur zelltyp- und differenzierungspezifischen Genveränderungen (Alteration, Mutation) und zur Genexpressionsveränderungen in Zellen und Organismen.

WO 02/004509 A3

WO 02/004509 A3 

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Rechercheberichts: 1. August 2002

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärung ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

【手続補正書】

【提出日】平成14年8月31日(2002.8.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i)(i) α -SMA遺伝子のヌクレオチド-698~+18からなる α 平滑筋アクチン遺伝子(α -SMA遺伝子)の調節配列領域からの1つ以上の機能領域(番号付けは、図5A及び7Aに示される *rat tus norvegicus* の配列を意味する)と、(ii)天然 α -SMAをコードせず、配列(i)と作動的に連結している少なくとも1つの追加の機能核酸配列と、を含む核酸配列の、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能进行操作するための医薬組成物を調製するための使用。

【請求項2】

前記 α -SMA遺伝子の前記調節配列領域の前記核酸配列が、前記 α -SMA遺伝子のヌクレオチド-698~+18からの少なくとも10、好ましくは少なくとも20の連続した塩基を有する、及び/又は哺乳動物、特に霊長類若しくは齧歯類、又は鳥類に由来し、特に好ましくはラット、マウス、ヒト、又はニワトリに由来する、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記調節配列領域がラットに由来し、前記核酸配列が好ましくは、図5Aに示される配列(配列番号1)、特に図7Aに示される配列(配列番号5)の1つ以上の機能領域を含む、請求項2に記載の使用。

【請求項4】

前記機能領域が、

(i)転写活性化核酸配列であり、特に、図7Cに示される配列(配列番号7)に由来し、好ましくは、前記転写活性化配列は、図7Cに示される配列の少なくとも10、好ましくは少なくとも40、特に好ましくは少なくとも60の連続した塩基を有し、特に好ましくは図7B又は7Cに示される配列(配列番号6又は7)を含むか、あるいは

(ii)細胞種特異的核酸配列であり、特に、図7Aの配列-698~-190(配列番号5のヌクレオチド1~509)に由来し、特に好ましくは図7Aの配列-698~-215(配列番号5のヌクレオチド1~484)又は図7Iに示される配列(配列番号13)に由来し、好ましくは前記細胞特異的配列は、図7Aの配列-698~-190からの少なくとも25、好ましくは少なくとも35の連続した塩基を有し、特に好ましくは図7I又は7Mに示される配列(配列番号13又は17)を含む、請求項3に記載の使用。

【請求項5】

前記核酸配列が、転写活性化及び細胞種特異的核酸配列を含む、及び/又は配列番号5~17に示される配列の中の1つを有する、請求項3又は4に記載の使用。

【請求項6】

前記調節配列領域がマウスに由来し、好ましくは前記核酸配列図5Bに示される配列(配列番号2)が1つ以上の機能領域を有し、特に配列番号18に示される配列を有する、請求項2に記載の使用。

【請求項7】

前記機能領域が、

(a)転写活性化核酸配列であり、特に配列番号18に示されるヌクレオチド490~697に由来する、及び/又は

(b)細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号18に示される配列のヌクレオチド1

～ 4 8 9 に由来する、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

前記調節配列領域がヒトに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 C に示される配列（配列番号 3）、特に配列番号 19 に示される配列の 1 つ以上の機能領域を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 9】

前記機能領域が、

（a）転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 5 1 3 ～ 7 1 5 に由来する、及び / 又は

（b）細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 19 に示される配列のヌクレオチド 1 ～ 5 1 2 に由来する、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記調節配列領域がニワトリに由来し、前記核酸配列が好ましくは図 5 D に示される配列（配列番号 4）、特に配列番号 20 の配列の 1 つ以上の機能領域を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 11】

前記機能領域が、

（a）転写活性化核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 4 9 7 ～ 6 9 9 に由来する、及び / 又は

（b）細胞種特異的核酸配列であり、特に配列番号 20 に示される配列のヌクレオチド 1 ～ 4 9 6 に由来する、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記追加の機能核酸配列が、ペプチド又はタンパク質をコードする DNA 配列であり、特にレポーター遺伝子、薬理学的活性タンパク質をコードする配列、及び調節 DNA 配列から選択されるか、あるいは機能 RNA、特にリボザイムをコードする配列である請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 に定義される核酸配列、又はベクターを導入することを含み、前記核酸配列が生物又は器官に導入される、生物及び器官の筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の遺伝子発現及び / 又は細胞機能を操作する方法。

【請求項 14】

in vivo 法又は *in vitro* 法であって、特に

（i）前記生物又は器官への導入が、トランスジェニックノックアウト / ノックイン技術を利用して行われるか、あるいは

（ii）前記方法が、遺伝子治療融合ベクターの利用である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

（i） α -SMA 遺伝子のヌクレオチド - 6 9 8 ～ + 1 8 の少なくとも 10 の連続した塩基からなるヒト α 平滑筋アクチン遺伝子（ α -SMA 遺伝子）の図 5 C（配列番号 3）に示される調節配列領域の 1 つ以上の機能領域（番号付けは、図 5 A 及び 7 A に示される *rat tus norvegicus* の配列を意味する）と、

（ii）配列（i）と作動的に連結し、天然 α -SMA をコードせず、薬理学的活性タンパク質をコードする DNA 配列、調節配列、又は機能 RNA をコードする配列から選択される少なくとも 1 つの追加の機能核酸配列と、を含む、核酸配列。

【請求項 16】

前記調節配列領域が、前記ヌクレオチド - 6 9 8 ～ + 1 8 の少なくとも 20 の連続した塩基を有する、及び / 又は配列番号 19 に由来する、及び / 又は請求項 9 に定義される、請求項 15 に記載の核酸配列。

【請求項 17】

請求項 9 に定義される転写活性化核酸配列又は細胞種特異的核酸配列。

【請求項 18】

請求項 17 に定義される核酸配列を含む、又は請求項 15 若しくは 16 に定義される核酸配列が挿入されるベクター。

【請求項 19】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、又は請求項 18 に定義されるベクターに、一過的又は安定的にトランスフェクト、トランスフォーム、又は感染され、好ましくは

(i) 前記 α -SMA 遺伝子の前記調節配列の調節下でレポーターを発現するか、あるいは、

(ii) α -SMA 遺伝子の調節下で薬理的活性タンパク質、調節 DNA 配列、又は機能 RNA 配列の発現又は含有が起こる、

真核細胞又は生物。

【請求項 20】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、又は請求項 18 に定義されるベクターで、親細胞を、トランスフェクト、トランスフォーム、又は感染させること含む、請求項 19 に定義の真核細胞の作製方法。

【請求項 21】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、又は請求項 18 に定義されるベクターを有する ES 細胞を、生物の胚盤胞に注入するステップと、代理母に着床させるステップとを含む、請求項 19 に定義の生物の作製方法。

【請求項 22】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、又は請求項 18 に定義されるベクターを生物又は器官に導入することを含む、

(i) 前記生物又は器官への導入が、好ましくはトランスジェニックノックアウト/ノックイン技術を利用して行われるか、あるいは

(ii) 前記方法が、好ましくは遺伝子治療融合ベクターの利用である、

生物又は器官の平滑筋細胞又は筋線維芽細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能进行操作する方法。

【請求項 23】

請求項 15、16、又は 17 に定義される核酸配列、あるいは請求項 18 に定義されるベクターを含み、好ましくは、生物又は器官の平滑筋細胞又は筋線維芽細胞の遺伝子発現及び/又は細胞機能の操作に好適である医薬組成物。

【請求項 24】

前記 α -SMA 遺伝子の前記調節配列領域の機能領域の、筋線維芽細胞性及び分化依存性レポーター発現のため、又は筋線維芽細胞性及び分化依存性遺伝子操作のための使用であって、前記 α -SMA 遺伝子の前記機能領域が好ましくは

(i) 請求項 15 ~ 17 に定義される核酸配列である、

(ii) 請求項 18 に定義されるベクター中に存在する、

方法。

【請求項 25】

細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞を単離又はスクリーニングする方法であって、

真核細胞又は生物のレポーター遺伝子の発現を、請求項 1 から 12 又は 15 から 16 に定義される α -SMA 遺伝子の調節配列の調節下でレポーターを発現させて行うステップと、

前記レポーターを検出するステップと、

を含む方法。

【請求項 26】

細胞混合物、細胞集団、細胞集合体、又は生物から筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞

を単離又はスクリーニングするための診断薬の製造のための請求項 1 から 1 2 又は 1 5 から 1 6 に定義される α - S M A 遺伝子の調節配列の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/07913
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12M C07K A61K A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBL, GENSEQ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 24254 A (BLANK RANDALL ;UNIV VIRGINIA (US); OMENS GARY K (US); MACK CHRISTO) 4 May 2000 (2000-05-04) cited in the application page 13, line 15 -page 14, line 4 page 16, line 7-16 page 18, line 27-36; figures 12,13 page 20, line 17 -page 22, line 12 page 26, line 8 -page 27, line 35 page 32, line 7-13	1-5, 12-26
Y	* see 6.1.3 on page 48 * * see 6.2.1 on page 50 * ----- -/-	13,14, 21,22
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, expo. exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but after the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date which is in conflict with the application but does not undermine the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 January 2002		Date of mailing of the international search report 23/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, 118, 8810 Palmblow 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2990, Tx: 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer ALCONADA RODRIG., A

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Appl. No. PCT/EP 01/07913
C (continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG FRANK ET AL: "Characterization of an E-box-dependent cis element in the smooth muscle alpha-actin promoter." ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 19, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 2591-2599, XP000998280 ISSN: 1079-5642 page 2594, right-hand column, paragraph 2; figures 4,5 figure 1	1-5,12, 15-20, 23-26
Y	---	6-11,13, 14,21,22
X	BLANK R S ET AL: "ELEMENTS OF THE SMOOTH MUSCLE ALPHA-ACTIN PROMOTER REQUIRED IN CIS FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION IN SMOOTH MUSCLE. EVIDENCE FOR CELL TYPE-SPECIFIC REGULATION" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 267, no. 2, 15 January 1992 (1992-01-15), pages 984-989, XP002923256 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1,2, 10-12, 15-20, 24-26
X	COGAN JOHN G ET AL: "Plasticity of vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription: Characterization of multiple, single-, and double-strand specific DNA-binding proteins in myoblasts and fibroblasts." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 19, 1995, pages 11310-11321, XP000993134 ISSN: 0021-9258 figures 1,6	1,2,6,7, 12, 15-20, 23-26
X	SAGA HIROSHI ET AL: "Phenotype-dependent expression of alpha-smooth muscle actin in visceral smooth muscle cells." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 247, no. 1, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 279-292, XP000998496 ISSN: 0014-4827 figures 6,7 -- -/-	1,2, 10-12, 15-20, 23-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. No. Application No.
PCT/EP 01/07913

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIN B ET AL: "THE 5'-FLANKING REGION OF THE MOUSE VASCULAR SMOOTH MUSCLE ALPHA ACTIN GENE CONTAINS EVOLUTIONARILY CONSERVED SEQUENCE MOTIFS WITHIN A FUNCTIONAL PROMOTER" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 27, 1990, pages 16667-16675, XP000992808 ISSN: 0021-9258 figures 2,3	6,7,12, 15-20, 23-26
Y	NAKANO Y ET AL: "TRANSCRIPTIONAL REGULATORY ELEMENTS IN THE 5' UPSTREAM AND FIRST INTRON REGIONS OF THE HUMAN SMOOTH MUSCLE AORTIC TYPE ALPHA ACTIN-ENCODING GENE" GENE (AMSTERDAM), vol. 99, no. 2, 1991, pages 285-290, XP000992809 ISSN: 0378-1119 figure 1	8,9,12, 15-20, 23-26
Y	CARROLL S L ET AL: "STRUCTURE AND COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE CHICKEN ALPHA-SMOOTH MUSCLE AORTIC ACTIN GENE AN ACTIN GENE WHICH PRODUCES MULTIPLE MESSENGER RNA SPECIES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 19, 1986, pages 8965-8976, XP000998146 ISSN: 0021-9258 figure 2	10-12, 15-20, 23-26

*For PCT/EP 01/07913, publication of second sheet July 1992.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP01/07913

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1, 2, 12-26 (in part) and 3, 4, 5 (in full)

Nucleic acid sequences comprising (i) at least one functional region from the regulatory sequence region of the alpha-SMA and (ii) at least one other functional nucleic acid sequence which is operationally linked with the sequence (i), the regulatory sequence region coming from the rat; vector comprising one such nucleic acid sequence; eukaryotic cells or organisms transfected by one such nucleic acid sequence; method for producing the eukaryotic cells or organisms by means of transfection of the inventive nucleic acid sequences; method for isolating or classifying smooth muscle cells, myofibroblasts or myofibroblast-like cells, including the expression of a reporter gene which is expressed under the control of the regulatory sequences of the alpha-SMA gene; method for manipulating the gene expression of smooth muscle cells and myofibroblasts, including introducing the inventive nucleic acid sequences into the organisms or organs; pharmaceuticals containing said nucleic acid sequences.

2. Claims Nos. 1, 2, 12-26 (in part) and 6, 7 (in full)

As invention 1, but the regulatory sequence comes from the mouse.

3. Claims Nos. 1, 2, 12-26 (in part) and 8, 9 (in full)

As invention 1, but the regulatory sequence comes from humans.

4. Claims Nos. 1, 2, 12-26 (in part) and 10, 11 (in full)

As invention 1, but the regulatory sequence comes from the chicken.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP01/07913

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box 1.1

Although Claims Nos. 13, 14, 19, 21, 22 and 25, as long as an in vivo method is being described, relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound or composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 01/07913	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0024254	A	04-05-2000	AU	1598600 A	15-05-2000
			WO	0024254 A1	04-05-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intern, wares Aktenzeichen PCT/LP 01/07913
C:(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Vorfindung, soweit erforderlich, unter Angabe der in Bezeichnung kommenden Teile	Seit. Anspruch Nr.
Y	MIN B ET AL: "THE 5'-FLANKING REGION OF THE MOUSE VASCULAR SMOOTH MUSCLE ALPHA ACTIN GENE CONTAINS EVOLUTIONARILY CONSERVED SEQUENCE MOTIFS WITHIN A FUNCTIONAL PROMOTER" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 27, 1990, Seiten 16667-16675, XP000992808 ISSN: 0021-9258 Abbildungen 2,3	6,7,12, 15-20, 23-26
Y	NAKANO Y ET AL: "TRANSCRIPTIONAL REGULATORY ELEMENTS IN THE 5' UPSTREAM AND FIRST INTRON REGIONS OF THE HUMAN SMOOTH MUSCLE AORTIC TYPE ALPHA ACTIN-ENCODING GENE" GENE (AMSTERDAM), Bd. 99, Nr. 2, 1991, Seiten 285-290, XP000992809 ISSN: 0378-1119 Abbildung 1	8,9,12, 15-20, 23-26
Y	CARROLL S L ET AL: "STRUCTURE AND COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE CHICKEN ALPHA-SMOOTH MUSCLE AORTIC ACTIN GENE AN ACTIN GENE WHICH PRODUCES MULTIPLE MESSENGER RNA SPECIES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 261, Nr. 19, 1986, Seiten 8965-8976, XP000998146 ISSN: 0021-9258 Abbildung 2	10-12, 15-20, 23-26

Internationales Akkordzeichen PCT/EP 01/07913

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1, 2, 12-26 (partiell) und 3, 4, 5 (vollständig)

Nukleinsäuresequenz, umfassend (i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-SMA und (ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist; wobei der regulierende Sequenzbereich von der Ratte stammt; Vektor, umfassend eine solche Nukleinsäuresequenz; eukaryotischen Zellen oder Organismen, die mit einer solchen Nukleinsäuresequenz transfiziert sind; Verfahren zur Herstellung der eukaryotischen Zellen oder Organismen durch Transfektion der Nukleinsäuresequenzen der Erfindung; Verfahren zur Isolierung oder Sichtung von glatten Muskelzellen, Myofibroblasten oder Myofibroblastähnlichen Zellen, umfassend die Expression eines Reportergens, die unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des alpha-SMA gens exprimiert sind; Verfahren zur Manipulation der Genexpression von glatten Muskelzellen, Myofibroblasten, umfassend das Einbringen von den Nukleinsäuresequenzen der Erfindung in die Organismen oder Organen; Arzneimittel, enthaltend die Nukleinsäuresequenz der Erfindung.

2. Ansprüche: 1, 2, 12-26 (partiell) und 6, 7 (vollständig)

Wie Erfindung 1, aber wobei die regulierende Sequenz von der Maus stammt.

3. Ansprüche: 1, 2, 12-26 (partiell) und 8, 9 (vollständig)

Wie Erfindung 1, aber wobei die regulierende Sequenz vom Mensch stammt.

4. Ansprüche: 1, 2, 12-21 (partiell) und 10, 11 (vollständig)

Wie Erfindung 1, aber wobei die regulierende Sequenz vom Huhn stammt.

Internationales Abkommen PCTEP 01 07913

WEITERE ANGABEN	PCT/SAJ 210
Fortsetzung von Feld I.1 Obwohl die Ansprüche 13, 14, 19, 21, 22 und 25, so weit sie ein in vivo Verfahren betreffen, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT Angaben zu Veröffentlichung des zur selben Patentfamilie gehörenden				Internat. Klassifizierung PCT/EP 01/07913	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0024254 A		04-05-2000	AU 1598600 A WO 0024254 A1		15-05-2000 04-05-2000

Formblatt PCT/PA/10 (Zusatz zur Patentanmeldung) (Juli 1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 100114362

弁理士 萩野 幹治

(72)発明者 オデンタル, マルガレテ

ドイツ国, 5 0 9 3 7 ケルン, ブランケンハイメル ストラッセ 3 9

(72)発明者 ユング, ディアナ

スイス国, C H - 8 0 0 3 チューリッヒ, ドゥブスストラッセ 3 9

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB20 CB01 CB17

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 EA04 FA10 GA11 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ13 QR60 QR69 QR72 QR77 QR80 QS24

QS28 QX02

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA46

4C084 AA01 AA07 AA13 DC50 ZA012 ZA592 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962

ZB262