



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314458**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 5/10

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19911164	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1990.07.25, PCT/US90/04178
(22) Inng. dag	1991.03.22	(85) Videreføringsdag	1991.03.22
(24) Løpedag	1990.07.25	(30) Prioritet	1989.07.25, US, 385651
(41) Alm. tilgj.	1991.03.22		1989.11.06, US, 431872
(45) Meddelt dato	2003.03.24		

(71) Patenthaver	Cell Genesys Inc, 344 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404, US
(72) Oppfinner	Raju S Kucherlapati, Darien, CT 06820, US Beverly H. Koller, Carrboro, NC, US Oliver Smithies, Chapel Hill, NC, US
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Ikke-differensierende pattedyrceile, fremgangsmåte for fremstilling derav, samt vev og DNA-konstruksjon**

(56) Anførte publikasjoner

A.J. Kormann et al, Proc.natl.Acad.Sci, Vol 84, side 2150-2154,1987
B.M. Perarnau et al, Journal of Immunology, Vol 141, No.15, 1988, side 1383-1389
R.H. Seong et al, Journal of Experimental Medicine, Vol 167, 1988, side 288-299
J.W. Chamerlain et al, Proc. Natl. Acad. Sci, Vol 85, 1988, side 7690-7694
J.A. Barbosa et al, Proc, Natl, Acad, Sci, Vol 81, 1984, side 7549-7553
A. Zimmer et al, Nature, Vol 338, 1989, side, 150-156
S.L. Mansaur et al, Nature, Vol 336, No.24, 1983, side 348-352

(57) Sammendrag

Homolog rekombinasjon anvendes for å inaktivere gener, spesielt gener forbundet med MHC antigener. Spesielt blir $\beta 2$ -mikroglobulingenet inaktivert for å redusere eller eliminere Klasse I-MHC antigener. De resulterende celler kan anvendes som universelle donatorer. I tillegg kan embryoniske stamceller modifiseres ved homolog rekombinasjon for anvendelse i produksjon av chimere eller transgeniske pattedyrverter.

Området til den foreliggende oppfinnelse er ikke-differensierende pattedyrcelle, fremgangsmåte for fremstilling derav, samt vev og DNA-konstruksjon. Den er basert på anvendelse av homolog rekombinasjon for å modifisere og inaktivere gener, for å produsere celler som kan tjene som
5 universelle donatorer i celleterapi.

For å beskytte virveldyr mot sykdom og infeksjon, er det blitt utviklet inngående beskyttende systemer. I pattedyr tjener immunsystemene som det primære forsvar med mange forskjellige celletyper og mekanismer for å beskytte verten. Det eksisterer en lang rekke hematopoetiske celler, hvorav de beskyttende
10 hovedlinjer er lymfoide og myeloide. Immunsystemet som er et resultat av celler fra de lymfoide og myeloide linjer er utviklet *in vivo*, for å gjenkjenne artsegne fra ikke-artsegne. De avvikende situasjoner hvor immunsystemet angriper seg selv, slik som reumatoid artritt, lupus erythematosus og visse former for diabetes, er tegn på hvor viktig det er for verten at bare fremmede agens blir angrepet. Den
15 beskyttende mekanisme som beskytter verten mot sykdom, som et resultat av invasjon av virus, bakterier, eller andre patogener, er også istand til å gjenkjenne celler som kommer fra en forskjellig pattedyrvert, selv en allogeen vert.

Som en del av systemet for artsegen versus fremmed gjenkjennelse, tjener overflatemembranprotein hovedhistologisk forenighetskompleks (MHC) antigener
20 en viktig rolle. Hver vert har et personlig sett av klasse I og II MHC-antigener, som tjener til å atskille denne vert fra andre verter. Lymfoidsystemet blir forutsagt ved gjenkjennelse av tilstedeværelsen av slike MHC-antigener som artsegne. Der hvor transplantasjon fra andre allogeen verter forekommer, med mindre transplantatet er tilpasset til verten eller verten er immunokompromittert, kan
25 transplantatet angripes og ødelegges av immunsystemet. Når det forekommer et transplantat som inkluderer lymfocytter, monocytter eller forløpere for disse, spesielt benmarg, kan et transplantat angripe verten som fremmed, hvilket resulterer i transplantat- versus- vertssykdom.

Det er mange situasjoner hvor en kan ønske å transplantere celler inn i en
30 mottakervert når mottakerens celler mangler, er ødelagt eller ikke fungerer. Når verten blir immunokompromittert, kan det være en interesse for å overføre spesifikke hvite celler, spesielt T-celler, som kan beskytte verten mot forskjellige sykdommer. Når verten mangler evnen til å reise opp et forsvar mot en spesiell

sykdom, kan det også være en interesse i å administrere spesifikke T-celler eller B-celler, eller forløpere for disse som kan supplementere vertens kompromitterte immunsystem. I andre tilfeller, der hvor visse celler mangler, slik som Langerhanske øyer i tilfelle av diabetes, eller celler som utskiller dopamin i tilfellet av Parkinsons's sykdom, eller benmargceller i forskjellige hematopoetiske sykdommer eller muskelceller i muskelsvinnsykdommer, eller retina epitelceller i synslidelser, ville det være ønskelig å være istand til å forsyne celler som kunne oppfylle den ønskede funksjon. For at cellene skal være effektive, må de være sikre mot angrep av verten, slik at de kan fungere uten å bli ødelagt av immunsystemet. Det er derfor av interesse å finne effektive måter å produsere celler som kan fungere, mens de er trygge fra angrep av en mottakers immunsystem.

Muterte pattedyrceller produseres ved homolog rekombinasjon, hvor cellene kan anvendes som universelle donorceller som et resultat av tap av MHC-antigener. Spesielt ved å inaktivere minst ett allel i minst én MHC-antigenkjede, f.eks. β_2 -mikroglubulin, kan det produseres celler som har redusert evne til ekspresjon av MHC-antigener og videre kan anvendes til fullstendig fjerning av ekspresjon av minst én type MHC-antigen. De resulterende celler som har redusert ekspresjon av MHC-antigener, kan anvendes som universelle donatorer som mangler markører for verts(mottaker)-immunangrep. Cellene kan også anvendes *in vitro* for å vekselvirke med andre celler.

Ifølge et aspekt av foreliggende oppfinnelse, er ikke-differensierende pattedyrceller kjennetegnet ved at den mangler minst ett hovedhistologisk forenlig kompleks (MHC)-antigen som et resultat av innføring av en lesjon i hver locus en underenhet av nevnte antigen ved transformasjon av nevnte pattedyrcelle med minst én DNA-konstruksjon som omfatter en sekvens homolog med minst én del av nevnte loci og nevnte lesjon og integrering av nevnte konstruksjon i nevnte loci.

Homolog rekombinasjon anvendes til inaktivering eller forandring av gener på en setedirigert måte, spesielt et gen forbundet med et MHC-antigen. Avhengig av naturen av cellen, kan cellen som mangler minst ett kompetent MHC-antigen finne anvendelse som donator til en allogen vert.

Av spesiell interesse er inaktiveringen av minst én, fortrinnsvis begge, kopier av en underenhet av et MHC-antigen, mer spesielt β_2 -mikroglobulin. Av spesiell interesse er fremgangsmåter som gir celler som mangler minst ett MHC-

antigen, Klasse I eller Klasse II, fortrinnsvis Klasse I, og disse celler kan tjene en rekke funksjoner i en levende vert.

Fremgangsmåte ved fremstilling av en ikke-differensierende pattedyr-celle som mangler minst ett hovedhistologisk forenlighetsantigen som et resultat av
 5 innføring av en lesjon i minst hver locus i en underenhet i nevnte antigen med transformasjon av nevnte pattedyr-celle med minst én DNA-konstruksjon for anvendelse i inaktivering av et gen som koder for nevnte antigen, hvor konstruksjonen omfatter en sekvens homolog med minst en del av nevnte loci og nevnte lesjon og integrering av nevnte konstruksjon i nevnte loci er et annet
 10 aspekt av foreliggende oppfinnelse som er kjennetegnet ved transformering av en vertscelle med nevnte DNA-konstruksjon, hvor nevnte konstruksjon omfatter et markørgen for seleksjon av vertsceller som omfatter nevnte DNA;

kartlegging av selekterte celler som omfatter nevnte konstruksjon for homolog integrering;

15 transformering av celler som har homolog integrering med nevnte konstruksjon; og

seleksjon av celler som mangler nevnte MHC-antigen på overflaten ved fravær av nevnte MHC-antigen.

Fremgangsmåten involverer transfeksjon av pattedyrceller, spesielt normale
 20 celler, i en forutbestemt art, med DNA forbundet med et av loci relatert til β_2 -mikroglobulingenet, α -underenheten(e) i Klasse I eller Klasse II MHC-antigenene eller β -underenheten(e) i Klasse II MHC-antigenene. De humane Klasse II MHC-antigener er HLA-DR, DP og DQ, hvor DR er av primær interesse.

Et tredje aspekt av foreliggende oppfinnelse er vev som omfatter de ikke-
 25 differensierte pattedyrcellene i henhold til oppfinnelsen.

Et ytterligere aspekt av den foreliggende oppfinnelsen er en DNA-konstruksjon for anvendelse i gen-inaktivering som er kjennetegnet ved at den omfatter minst 50 bp av en sekvens homolog med et locus i en underenhet i et MHC-antigen som flankerer en sekvens som koder for et markørgen istand til
 30 ekspresjon i en pattedyrvert, eventuelt kjennetegnet ved at den omfatter minst 50 bp av en sekvens homolog med β_2 -mikroglobulinlocus som flankerer en sekvens som koder for et markørgen istand til ekspresjon i en pattedyrvert.

DNA vil omfatte minst én del av gen(ene) i det spesielle locus med innføring av en lesjon i minst en, vanligvis begge kopier av det naturlige genet(ene) for å forhindre ekspresjon av et funksjonelt MHC-antigenmolekyl. Lesjonen kan være et innskudd, en delesjon, en erstatning eller en kombinasjon av disse. Når lesjonen

5 blir innført i bare en kopi av genet som blir inaktivert, blir cellene som har en enkelt, ikke-mutert kopi av målgenet, forsterket og kan underkastes en annen transformasjon, hvor lesjonen kan være den samme eller forskjellig fra den første lesjon, vanligvis forskjellig, og hvor en delesjon eller erstatning er involvert, kan den overlappe minst en del av lesjonen eller allelet. De resulterende

10 transformanter kartlegges for fravær av et funksjonelt målantigen, og DNA i cellen kan videre kartlegges for å sikre fravær av et villtype målgen. Alternativt kan homozygositet når det gjelder fenotype oppnås ved å avle fram verter som er heterozygote for mutasjonen.

Cellene som kan underkastes transformasjon, kan være en hvilken som helst pattedyrce

15 helst pattedyrce av interesse, som kan finne anvendelse i celleterapi, forskning, vekselvirkning med andre celler *in vitro* eller lignende. Celler av spesiell interesse inkluderer blant andre linjer de Langerhanske øyer, binyremargceller som kan utskille dopamin, osteoblaster, osteoklaster, epitelceller, endotelceller, T-lymfocytter, neuroner, gliaceller, ganglionceller, retinaceller, leverceller,

20 benmargceller og myoblast(muskel)-celler.

Disse celler vil velges for å oppnå en spesiell funksjon og innføres i en pattedyrvert eller anvendes til forskning eller annet formål. Også av interesse vil være stamcellene som virker som om forløpere for en hvilken som helst av de ovenfor nevnte celler, som kan være den opprinnelige forløper eller en forløper-

25 celle som allerede er dedikert til en spesiell linje. Av spesiell interesse vil være epidermalceller, slik som keratinocytter og retinaepitelceller, og myoblaster og hematopoetiske og andre celler som lett kan bearbeides *in vitro*, opprettholdes i lange tidsperioder i kultur og kan innføres i en vert, hvor cellene vil forbli levende og funksjonelle i lange tidsperioder.

30 Fremgangsmåtene anvendt for å inaktivere én eller begge kopier av et spesielt MHC-antigen vil være like, og forskjellige bare i valget av sekvens, anvendte selekterbare markører og fremgangsmåten anvendt til å identifisere fravær av MHC-antigenet, selv om like metoder kan anvendes for å sikre fravær

av ekspresjon av et spesielt antigen. Siden fremgangsmåtene er analoge, vil inaktivering av β_2 -mikroglobulinenet anvendes som et eksempel. Det må forstås at i det vesentlige de samme fremgangsmåter men med andre genetiske sekvenser vil være tilstrekkelige for α - og β -underenhetene i Klasse II MHC-antigenene.

Det kan anvendes DNA-konstruksjoner som gir den ønskede innføring av lesjonen i cellen. Konstruksjonene kan modifiseres for å inkludere funksjonelle enheter forskjellige fra den muterte sekvens som kan finne anvendelse i fremstillingen av konstruksjonen, amplifisering, transformasjonen av vertscellen, og integrering av konstruksjonen i vertscellen. Teknikker som kan anvendes, inkluderer kalsiumfosfat-DNA-kopresipitater, mikroinjeksjon av DNA i nukleus, elektroporering, bakterieprotoplastfusjon med intakte celler, transfeksjon eller lignende. DNA kan være enkelt- eller dobbeltstrenget, lineær eller sirkulær, ukveilet eller superspiral-DNA. For forskjellige teknikker for å transformere pattedyrceller, (se Keown et al., Methods in Enzymology).

Den homologe sekvens for målsøking av konstruksjonen kan ha én eller flere delesjoner, innskudd, substitusjoner eller kombinasjoner av disse. For eksempel kan β_2 -mikroglobulinenet inkludere en delesjon i et sete og et innskudd i et annet sete, som inkluderer et gen som kan anvendes til seleksjon, hvor tilstedeværelse av det innskutte gen vil resultere i et defekt, inaktivt proteinprodukt. Fortrinnsvis blir erstatningene anvendt. For et innskutt gen av spesiell interesse er et gen som gir en markør, f.eks. antibiotikaresistens slik som neomycinresistens, inkludert G418-resistens.

Delesjonen vil være minst omtrent 50 bp, mer vanlig minst omtrent 100 bp, og hovedsakelig ikke mer enn omtrent 20 kbp, hvor delesjonen normalt vil inkludere minst én del av det kodende området inkludert en del av eller ett eller flere eksoner, en del av eller ett eller flere introner, og kan eller ikke kan inkludere en del av de flankerende ikke-kodende områder, spesielt et 5'-ikke-kodende område (transkripsjonsregulatorisk område). Således kan det homologe området strekke seg ut over det kodende området inn i det 5'-ikke-kodende området eller alternativt inn i det 3'-ikke kodende området. Innskudd vil hovedsakelig ikke overskrive 10 kbp, vanligvis ikke overskride 5kbp, idet de hovedsakelig er minst 50 bp, mer vanlig minst 200 bp.

Den homologe sekvens bør inkludere minst omtrent 100 bp, fortrinnsvis minst omtrent 150 bp, mere foretrukket minst omtrent 300 bp av målsekvensen og hovedsakelig ikke overskride 20 kbp, vanligvis ikke overskride 10 kbp, fortrinnsvis mindre enn omtrent totalt 5kbp, idet det vanligvis har minst omtrent 50bp på
 5 motsatte sider av innskuddet og/eller delesjonen for å gi dobbel verkrysningsrekombinasjon.

I oppstrøms- og/eller nedstrøms-retning fra målkonstruksjonen, kan det være et gen som gir identifikasjon av hvorvidt det har forekommet en dobbel overkrysning. For dette formål kan herpes simplex virus tymidinkinasegenet
 10 anvendes, siden tilstedeværelse av tymidinkinasegenet kan påvises ved anvendelse av nuklosidanaloger, slik som acyclovir eller gancyclovir, for deres cytotoksiske virkninger på celler som inneholder et funksjonelt HSV-tk-gen. Fravær av følsomhet for disse nukleosidanaloger indikerer fravær av tymidinkinasegenet og derfor der hvor det har forekommet homolog rekombinasjon, at det
 15 også har forekommet et tilfelle av dobbel overkrysning.

Tilstedeværelse av markørgen-innskudd i β_2 -mikroglobulingenet fastsetter integreringen av målkonstruksjonen i vertsgenomet. Imidlertid vil DNA-analyse kreves for å fastsette hvorvidt homolog eller ikke-homolog rekombinasjon forekom. Dette kan bestemmes ved å anvende prober for innskuddet og så sekvensere 5'-
 20 og 3'-områdene som flankerer innskuddet for tilstedeværelse av β_2 -mikroglobulin som strekker seg utover de flankerende områder i konstruksjonen eller identifisere tilstedeværelse av en delesjon, når en slik delesjon er innført.

Polymerasekjedereaksjonen kan anvendes med fordel i påvisning av tilstedeværelse av homolog rekombinasjon. Det kan anvendes primerer som er
 25 komplementære med en sekvens i konstruksjonen og komplementære med en sekvens utenfor konstruksjonen og i mål-locus. På denne måte kan man bare oppnå DNA-komplekser som har begge primerene tilstede i de komplementære kjeder hvis det har forekommet homolog rekombinasjon. Ved å demonstrere tilstedeværelse av probesekvensene eller sekvensen med den forventede
 30 størrelse, blir forekomst av homolog rekombinasjon støttet.

Konstruksjonen kan videre inkludere et replikasjonssystem som er funksjonelt i pattedyrvertscellen. For det meste vil disse replikasjonssystemer involvere virusreplikasjonssystemer slik som Simian Virus 40, Epstein-Barr virus, papilloma virus, adenovirus og lignende.

Der hvor det er involvert et markørgen, slik som et innskudd, og/eller flankerende gen, avhengig av naturen av genet, kan det ha de villtype transkripsjonsregulatoriske områder, spesielt det transkripsjonsinitieringsregulatoriske området eller et forskjellig transkripsjonsinitieringsområde. Når som
 5 helst et gen er fra en vert hvor transkripsjonsinitieringsområdet ikke gjenkjennes av transkripsjonsmaskineriet i pattedyrvertscellen, vil et forskjellig transkripsjonsinitieringsområde være påkrevet. Dette området kan være tilstede eller induserbart, fortrinnsvis induserbart. En lang rekke transkripsjonsinitieringsområder er blitt isolert og anvendt med forskjellige gener. Av spesiell interesse
 10 som promotorer er promotorene til metallthionein-I og II fra en pattedyrvert, tymidinkinase, β -aktin, immunoglobulin promotor, humane cytomegalovirus promotorer og SV40 promotorer. I tillegg til promotoren kan villtypeforsterkeren være tilstede, eller en forsterker fra et forskjellig gen kan forenes med promotorområdet.

15 Konstruksjonen kan videre inkludere et replikasjonssystem hvor prokaryoter, spesielt *E. coli*, får anvendelse i fremstilling av konstruksjonen, kloning etter hver behandling, muliggjøring av analyse, slik som restriksjonskartlegging eller sekvensiering, fulgt av ekspansjon av en klon og isolering av plasmidet for videre behandling. Når nødvendig, kan det anvendes en forskjellig
 20 markør til påvisning av bakterietransformanter.

Så snart vektoren er blitt fremstilt, kan den videre behandles ved delesjon av bakteriesekvensene så vel som linearisering, hvor det kan gis en kort delesjon i den homologe sekvens, som hovedsakelig ikke overskrider omtrent 500 bp, idet den hovedsakelig er fra omtrent 50 til 300 bp. Den lille delesjon vil hovedsakelig
 25 være nær en eller annen ende i det målstrukturelle gen.

Så snart konstruksjonen er blitt fremstilt og behandlet og de uønskede sekvenser fjernet fra vektoren, f.eks. de uønskede bakteriesekvenser, er DNA-konstruksjonen nå ferdig til å innføres i målcellene. Som allerede angitt, kan enhver passende teknikk for å innføre DNA i målcellene anvendes. Etter
 30 transformasjon av målcellene, blir mange målceller selektert ved hjelp av positive og/eller negative markører, som tidligere angitt, neomycinresistens og acyclovir eller gancyclovir resistens. De celler som viser den ønskede fenotype kan så

videre analyseres ved restriksjonsanalyse, elektroforese, Southern analyse, polymerasekjedereaksjon eller lignende. Ved å identifisere fragmenter som viser tilstedeværelse av lesjonen(e) i målgensetet, kan man identifisere celler hvor homolog rekombinasjon har forekommet for å inaktivere én av de to kopiene av målgenet.

Den andre konstruksjon vil være forskjellig fra den første konstruksjon i det at den ikke nødvendigvis krever en markør for seleksjon, siden fravær av mål-MHC-antigenet på overflaten av cellene kan anvendes som markør. Således kan man igjen anvende innskudd, delesjoner eller erstatninger som lesjoner for å modifisere og inaktivere målgenet. På samme måte kan man påvise fravær av et Klasse II MHC-antigen på overflaten som bevis på fravær av ekspresjon av det spesielle Klasse II MHC-antigen.

Transformasjon av cellene hvori en av kopiene er blitt inaktivert, kan så utføres på samme måte eller på forskjellig måte i forhold til den tidligere transformasjonsmetode. De resulterende transformerte celler kan så selekteres ved fravær av mål-MHC-antigen på overflaten av cellen. Dette kan oppnås på en rekke måter. For eksempel kan man anvende antistoffer mot enhver epitop av mål-MHC-antigenet i konjunksjon med komplement for å drepe enhver celle som har antigenet. Alternativt kan man anvende konjugater av det passende antistoff, spesielt monoklonalt antistoff med et toksin, slik som A-kjeden i ricin, abrin, difteritoksin eller lignende. Affinitetskromatografering kan anvendes, hvor antistoffer kan anvendes til å fjerne celler som omfatter målantigenet. De resulterende celler som overlever, bør være frie for minst ett MHC-antigen på overflaten og må ikke være underkastet transplantatavvisning når de innføres *in vivo* som villtype celler.

De resulterende celler vil så kartlegges for å sikre at i det vesentlige ikke noen Klasse I MHC-antigener er på overflaten. Dette kan oppnås som beskrevet ovenfor ved å selektere for celler som mangler Klasse MHC-antigen. Cellene kan så dyrkes i et passende næringsmedium for ekspansjon og anvendes på en rekke måter. For eksempel, med keratinocytter, kan cellene anvendes for å erstatte hud i tilfelle av forbrenninger, hvor keratinocytter kan dyrkes for å danne et kontinuerlig lag før påføring.

På samme måte kan keratinocytter anvendes i tilfelle av plastisk kirurgi for å erstatte hud fjernet fra verten til anvendelse på et annet sted. Andre anvendelser for keratinocytter inkluderer transplantasjon i trykksår.

I tilfelle av Langerhanske øyer, kan de dyrkes og innføres i kapsler eller
 5 annet for innføring i en vert for produksjon av insulin. I tilfelle av retina epitelceller kan de injiseres i subretinarommet i øyet for å behandle synslidelser slik som flekkvis degenerasjon. I tilfelle av immunceller kan de injiseres i blodstrømmen eller andre steder for å behandle immundefekt. I tilfelle av myoblaster kan de injiseres på forskjellige steder for å behandle muskelsvinn, slik som Duchenne's
 10 muskeldystrofi.

Avhengig av naturen av cellene, den involverte terapi og lidelsen, kan cellene anvendes som filmer, innført i beholdere for opprettholdelse på et spesielt sted, eller som faste masser impregnert i inerte grunnmasser eller uavhengig av en grunnmasse. Antall celler administrert vil variere sterkt, avhengig av den
 15 spesielle anvendelse og måten hvorpå cellene blir administrert.

Administrering kan være ved injeksjon, topisk påføring, innsnitt og plassering i den passende lokalisering.

De følgende eksempler tilbys for å illustrere.

20

EKSPERIMENTELT

Prolifisering av epidermale keratinocytter som mangler MHC-antigen forårsaket av inaktivering av β_2 -mikroglobulingenekspressjon.

Celler

25

Epidermale keratinocytter fra mus oppnås fra huden til en nyfødt mus.

Hudprøvene skylles i serumfritt medium og skjæres i små fragmenter.

Fragmentene behandles med trypsin, og den resulterende enkeltcellesuspensjon vaskes og plates ut på 3T3 fibroblast tilførselslag. EGF (5 ng/ml) tilsettes på slutten av de 5 dager. Cellene opprettholdes i medium tilsatt hydrokortison
 30 (10^{-6} M), koleratoksin (10^{-7} M), insulin (5 ng/ml), transferrin (5 ng/ml) T3 (2×10^{-8} M) og 20% føtalt kalveserum. Ubrukte celler lagres i nitrogen i væskeform.

Humane epidermiske keratinocytter isoleres ved å anvende en fersk hudprøve fra en omskåret hud som kilde for keratinocytene. Prøven blir så behandlet i det vesentlige som beskrevet ovenfor.

DNA Vektorer

Muse- og de humane β_2 -mikroglobulingener som isolert og karakterisert av henholdsvis Parnes og Seidman, Cell 29: 661-669, (1982) og Gussow, et al., J. Immunol. 139:3132-3138 (1987), anvendes til homologi.

Konstruksjon av inaktiveringsvektor 1.

Inaktiveringsvektorene konstrueres fra 4kb *Hind*III-fragment av genom-DNA som omfatter de andre, tredje og fjerde eksoner av β_2 -mikroglobulingenet. 4 kb *Hind*III-subklonet i pBR322 kuttet med *Eco*RI, og det selekterbare neomycin fosfotransferase (neo^R) genet innskytes. Neo^R -genet oppnås fra pSV2neo (Southern og Berg, Mol. Appl. Genet. 1:322, (1982). Den resulterende vektor kalles B2KO1.

Konstruksjon av inaktiveringsvektor 2

Startplasmidet for konstruksjonen av den andre vektor er B2KO1. I dette tilfellet blir herpes simplex virus type 1 tymidinkinasegenet innskutt i *Hind*III-setet i B2KO1.

Inaktivering av en kopi av β_2 -mikroglobulin

DNA som anvendes til transformering i det første eller andre trinn, omfatter den innskutte sekvens med flankerende homologe sekvenser fra kloningsplasmid B2KO1 og den samme sekvens flankert i én ende av tk-genet fritt for bakterieplasmid-DNA. De resulterende DNA-fragmenter renses ved etanolpresipitering og oppklares ved passasje gjennom et 0,22 mikronfilter. DNA isoleres på konvensjonelle måter og innføres i keratinocytcellene ved mikroinjeksjon (Capecci, Cell 22:479-488 (1980). Omtrent 5-50 kopier av DNA-konstruksjonene injiseres inn i hver nukleus. Cellene blir så dyrket i selektivt medium som omfatter 200 μ g/ml G418 (Geneticin, Gibco Labs). For den andre konstruksjon blir cellene også platet ut i Gancyclovir (Syntex Corp., Palo Alto, CA) eller Acyclovir (Burrows-Wellcome, Research Triangle Park, NC). Celler fra kolonier isoleres og

analyseres ved polymerasekjedereaksjonen og Southern blot-hybridisering. Celler som demonstrerer en kopi av β_2 -mikroglobulinet som blir inaktivert, anvendes for å slå ut den andre kopi.

5 Inaktivering av den andre kopi av β_2 -mikroglobulingenet

Gen

Celler oppnådd ovenfra med et inaktivert β_2 -mikroglobulingen, mikro-injiseres som beskrevet ovenfor med det modifiserte B2KO2 plasmid, og celler som er resistente for Gancyclovir eller Acyclovir, isoleres. Celler som mangler Klasse I genekspresjon isoleres ved å kombinere cellene med monoklonale antistoffer spesifikke for β_2 -mikroglobulin og komplement som beskrevet av Parish et al. (1974) Eur. J. Immunol. 4:808. Resulterende levende celler dyrkes i selektert medium og passerer gjennom en affinitetskolonne av de samme monoklonale antistoffer. Kolonnen fremstilles som beskrevet av Harlow og Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press. Southern blot-analyse av cellene utføres for å fastsette det riktige locus for integrering. Cellene blir så ekspandert og lagret for videre anvendelse.

20 Dannelse av monolag av Keratinocytter

De resulterende celler som mangler Klasse I MHC, anvendes til å dyrke et monolag av keratinocytter som beskrevet av Rheinwald og Green, Cell 6:331-343, 1975. Dette lag transplanteres på allogene mus som beskrevet av Rheinwald og Green, 1975, *supra*. Cellene fester seg til overflaten og vokser for å gi et beskyttende hudlag.

Ved å følge den samme fremgangsmåten som beskrevet ovenfor for β_2 -mikroglobulin, kan HLA-DR-genene inaktiveres ved å anvende homologe sekvenser som flankerer α -underenheten i HLA-DR-genet i vertscellen. På denne måte blir celler som har Klasse II MHC-antigenet eller kan ha evne til å få ekspresjon av et slik antigen indusert, forhindret fra ekspresjon av det primære Klasse II antigen forbundet med den cellulære immunrespons.

Materialer og fremgangsmåter

Konstruksjon av målsøkende plasmid

- Plasmid pKC β_2 B inneholder hele β_2 m-genet i et 8,4 kbp *Xho*I-fragment
- 5 (Ozato og Orison, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2427-2431, 1985; Warner et al., Bio. Reprod. 36:611-616, 1987). 5'-*Xho*I til *Bam*HI-fragmentet i dette gen ble subklonet i pUC19. To *Kpn*I-restriksjonsenzymseter, ett i det 5'-flankerende DNA og det andre i den første intron, ble fjernet ved spalting med *Kpn*I, fulgt av behandling med T4-polymerase og religering. Et unikt *Cla*I-sete ble dannet i
- 10 ekson 2 ved delvis spalting med *Eco*RI, fulgt av behandling med Klenow-polymerase og ligering med *Cla*I-linkere. 1150 bp *Xho*I til HI-fragmentet av plasmid pMCI Neo (Kim og Smithies, Nucleic Acid Res. 16:8887-8903, 1988), som inneholder et neomycingen framdrevet av Herpes simplex virus tymidinkinasegen (HSV-tk) promotoren og en polyomforsterker, ble innskutt via linkere i dette *Cla*I-
- 15 setet. Det ble oppnådd to plasmider, C65.2.3 og C65.5.9, som var forskjellige i transkripsjonsorienteringen av det innskutte fragment med henblikk på transkripsjonsorienteringen av β_2 -mikroglobulingenet. 5'-*Xho*I til *Kpn*I-fragmentet i hvert av disse ble klonet inn i pUC19 for å oppnå målvektorene anvendt i våre forsøk. I plasmid C84.4B er 5'- til 3'-orienteringen av neomycin og β_2 m-
- 20 promotorene identisk. Den motsatte konfigurasjon forekommer i plasmid C84.2D.

PATENTKRAV

1. Ikke-differensierende pattedyrcelle,
karakterisert ved at den mangler minst ett hovedhistologisk forenlig
5 kompleks (MHC)-antigen som et resultat av innføring av en lesjon i hver locus en
underenhet av nevnte antigen ved transformasjon av nevnte pattedyrcelle med
minst én DNA-konstruksjon som omfatter en sekvens homolog med minst én del
av nevnte loci og nevnte lesjon og integrering av nevnte konstruksjon i nevnte loci.
- 10 2. Ikke-differensierende pattedyrcelle ifølge krav 1,
karakterisert ved at den mangler Klasse I hovedhistologisk forenlighets-
kompleks (MHC)-antigener som et resultat av innføring av en lesjon i hver β_2 -
mikroglobulinlocus ved transformasjon av nevnte pattedyrcelle med minst én DNA-
konstruksjon som omfatter en sekvens homolog med minst en del av nevnte loci
15 og nevnte lesjon og integrering av nevnte konstruksjon i nevnte loci.
3. Fremgangsmåte ved fremstilling av en ikke-differensierende pattedyrcelle
som mangler minst ett hovedhistologisk forenlighetsantigen som et resultat av
innføring av en lesjon i minst hver locus i en underenhet i nevnte antigen med
20 transformasjon av nevnte pattedyrcelle med minst én DNA-konstruksjon for
anvendelse i inaktivering av et gen som koder for nevnte antigen, hvor
konstruksjonen omfatter en sekvens homolog med minst en del av nevnte loci og
nevnte lesjon og integrering av nevnte konstruksjon i nevnte loci,
karakterisert ved transformering av en vertscelle med nevnte DNA-
25 konstruksjon, hvor nevnte konstruksjon omfatter et markørgen for seleksjon av
vertsceller som omfatter nevnte DNA;
kartlegging av selekterte celler som omfatter nevnte konstruksjon for
homolog integrering;
transformering av celler som har homolog integrering med nevnte
30 konstruksjon; og
seleksjon av celler som mangler nevnte MHC-antigen på overflaten ved
fravær av nevnte MHC-antigen.

4. Fremgangsmåte i henhold til krav 3,
karakterisert ved at nevnte MHC-antigen er et Klasse I antigen.
5. Fremgangsmåte i henhold til krav 4,
5 karakterisert ved at nevnte locus er β_2 -mikroglobulinlocus.
6. Vev, karakterisert ved at det omfatter celler i henhold til krav 1,
7. Vev i henhold til krav 6, karakterisert ved at nevnte celler er
10 keratinocytter.
8. DNA-konstruksjon for anvendelse i gen-inaktivering,
karakterisert ved at den omfatter minst 50 bp av en sekvens homolog
med et locus i en underenhet i et MHC-antigen som flankerer en sekvens som
15 koder for et markørgen istand til ekspresjon i en pattedyrvert.
9. DNA-konstruksjon for anvendelse i gen-inaktivering,
karakterisert ved at den omfatter minst 50 bp av en sekvens homolog
med β_2 -mikroglobulinlocus som flankerer en sekvens som koder for et markørgen
20 istand til ekspresjon i en pattedyrvert.