

(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2005-535343

(P2005-535343A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027	AO1K 67/027 ZNA	4B024
C12N 5/10	C12Q 1/68 A	4B063
C12N 15/09	C12N 15/00 A	4B065
C12Q 1/68	C12N 5/00 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2004-529314 (P2004-529314)	(71) 出願人	505055088
(86) (22) 出願日	平成15年8月13日 (2003. 8. 13)		イマージ バイオセラピューティクス, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月14日 (2005. 4. 14)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/025199		2139、ケンブリッジ、テクノロジー
(87) 国際公開番号	W02004/016742		スクウェア 300
(87) 国際公開日	平成16年2月26日 (2004. 2. 26)	(71) 出願人	505055099
(31) 優先権主張番号	60/403, 405		ホーレー, ロバート ジェイ.
(32) 優先日	平成14年8月14日 (2002. 8. 14)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1778、ウェイランド、ダイブリン
		(74) 代理人	100102842
			弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α (1, 3) - ガラクトシルトランスフェラーゼ欠損細胞、選択する方法、およびそれらから作製された α (1, 3) - ガラクトシルトランスフェラーゼ欠損ブタ

(57) 【要約】

本発明は、非ヒト動物の遺伝子操作に関する。さらに具体的には、本発明は異種移植に用いられる非ヒト動物の遺伝子操作に関する。本発明は、GGTA1欠損細胞、生存するGGTA 1欠損ブタ、前記ブタを作製するための方法、ならびに、異種移植のために前記ブタの細胞、組織および臓器を使用する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生存する GGTA 1欠損ブタ。

【請求項 2】

ブタがミニチュアブタである、請求項 1 に記載のブタ。

【請求項 3】

GGTA 1欠損細胞を選択する方法であって、

(a) GGTA 1ヘテロ接合体ブタまたは胎仔から細胞系を得る工程；

(b) GGTA 1欠損細胞について細胞を濃縮する工程；および

(c) GGTA 1欠損生細胞について株をスキャンする工程

10

を含む、前記方法。

【請求項 4】

工程 (b) において、細胞が、

(a) 補体の存在下で、該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置すること；

(b) 抗 gal 試薬に結合している磁性マイクロビーズを用いて、該細胞を枯渇させること；

(c) 該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置し、抗抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて該細胞を枯渇させること；および

(d) 該株に gal エピトープリガンドを処置し、そして抗リガンド抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて該株を枯渇させること

20

からなる群から選択される少なくとも 1 つの処置により濃縮される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) において、細胞が、

(a) 補体の存在下で、該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置すること；

(b) 抗 gal 試薬に結合している磁性マイクロビーズを用いて、該細胞を枯渇させること；

(c) 該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置し、抗抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて該細胞を枯渇させること；および

30

(d) 該細胞に gal エピトープリガンドを処置し、そして抗リガンド抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて株を枯渇させること

からなる群から選択される複数の処置により濃縮される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) において、細胞が、下記の各処置：

(a) 補体の存在下で、該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置すること；

(b) 該細胞に gal エピトープリガンドを処置し、そして抗リガンド抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて、株を枯渇させること

40

を 3 回行うことにより濃縮される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞系がブタ胎仔線維芽細胞系である、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

細胞系がブタ胎仔線維芽細胞のクローン集団である、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

ブタ胎仔線維芽細胞がミニチュアブタ由来である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞系が幹細胞系である、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

50

- 【請求項 1 1】
幹細胞が始原幹細胞である、請求項 1 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 2】
抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体が霊長類の抗体である、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 1 3】
抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体が、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 1 4】
抗gal試薬が、抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体およびレクチンからなる群から選択される、請求項 4 ~ 5 のいずれかに記載の方法。 10
- 【請求項 1 5】
galエピトープリガンドがIB4結合体であり、抗エピトープリガンドが抗IB4結合体である、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 1 6】
IB4結合体がIB4ビオチンおよびIB4-FITCからなる群から選択され、抗IB4結合体が抗ビオチンおよび抗FITCからなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。
- 【請求項 1 7】
ブタGGTA 1欠損細胞。
- 【請求項 1 8】
細胞がGGTA 1遺伝子についてホモ接合体であり、かつ前記GGTA 1遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。 20
- 【請求項 1 9】
細胞がGGTA 1遺伝子について半接合体であり、かつ1つのみのGGTA 1アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。
- 【請求項 2 0】
細胞がGGTA 1遺伝子について複合ヘテロ接合体であり、かつ前記GGTA 1遺伝子は2つの異なる変異アレルを含む、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。
- 【請求項 2 1】
細胞がQ2由来である、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。 30
- 【請求項 2 2】
細胞がQ9由来である、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。
- 【請求項 2 3】
細胞がQ32由来である、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。
- 【請求項 2 4】
細胞がQ37由来である、請求項 1 7 に記載のブタ細胞。
- 【請求項 2 5】
ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープの発現を欠損しているブタ臓器。
- 【請求項 2 6】
臓器がGGTA 1遺伝子についてホモ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 2 6 に記載のブタ臓器。 40
- 【請求項 2 7】
臓器がGGTA 1遺伝子について半接合体である細胞を含み、かつ1つのみのGGTA 1アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 2 6 に記載のブタ臓器。
- 【請求項 2 8】
臓器がGGTA 1遺伝子について複合ヘテロ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は2つの異なる変異アレルを含む、請求項 2 6 に記載のブタ臓器。
- 【請求項 2 9】
ブタ臓器が、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、甲状腺および皮膚を含む群から選択される、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれかに記載のブタ臓器。 50

【請求項 3 0】

ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープの発現を欠損しているブタ組織。

【請求項 3 1】

組織がGGTA 1遺伝子についてホモ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 3 0 に記載のブタ組織。

【請求項 3 2】

組織がGGTA 1遺伝子について半接合体である細胞を含み、かつ1つのみのGGTA 1アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされている、請求項 3 0 に記載のブタ組織。

【請求項 3 3】

組織がGGTA 1遺伝子について複合ヘテロ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は2つの異なる変異アレルを含む、請求項 3 0 に記載のブタ組織。 10

【請求項 3 4】

GGTA 1欠損細胞を選択すること、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞を前記GGTA 1欠損細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母にNT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法。

【請求項 3 5】

GGTA 1欠損細胞が、ブタ胎仔線維芽細胞系由来である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

GGTA 1欠損細胞が、ブタ胎仔線維芽細胞のクローン集団由来である、請求項 3 4 に記載の方法。 20

【請求項 3 7】

ブタ胎仔線維芽細胞がミニチュアブタ由来である、請求項 3 5 または 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

ブタ胎仔線維芽細胞がGGTA 1 ノックアウトについてヘテロ接合体である、請求項 3 5 または 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

GGTA 1欠損細胞がQ2由来である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 0】

GGTA 1欠損細胞がQ9由来である、請求項 3 4 に記載の方法。 30

【請求項 4 1】

GGTA 1欠損細胞がQ32由来である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 2】

GGTA 1欠損細胞がQ37由来である、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、R44 RR15198を介して国立衛生研究所NCRRにより一部資金援助されている。米国政府は本発明についての権利を有する。 40

技術分野

本発明は、非ヒト動物の遺伝子操作に関する。さらに具体的には、本発明はいくつかの態様において、(1,3) - ガラクトシルトランスフェラーゼ (GGTA 1) 欠損細胞を選択すること、および異種移植に用いられる非ヒト動物の遺伝子操作に関する。

【0 0 0 2】

関連技術の概要

1980年代半ばの長期にわたる免疫抑制剤の導入以降、臨床における移植は末期の臓器不全に対する主要な処置の1つとなっている。この成功は、ヒト臓器の供給という2次的な問題を引き起こしており、このことは移植を必要としている患者に臓器を提供する能力を極めて制限している。この医学的必要性を解決するための主要なアプローチの1つは 50

、臓器の供給源として他の種を利用することである（異種移植）。R.W Evansは、Xenotransplantation, J.L. Platt, Ed. (ASM Press, Washington, DC, 2001), pp. 29-51において、倫理的配慮、繁殖の特徴、感染症の懸念ならびにその適合性のある大きさと生理機能から、ブタが第一選択肢の種であることを教示している。

【0003】

ブタから霊長類への臓器移植の進歩における主な障害は、ブタ細胞の表面における (1,3) - ガラクトシル - (gal) - エピトープ末端の存在である。ヒトおよび旧世界ザル (Old World monkey) は、進化の過程で対応するガラクトシルトランスフェラーゼ活性を失ってしまったために、ブタ臓器の超急性拒絶反応に関与するエピトープに対する予め形成された自然抗体を産生する。レシピエントの抗gal抗体のアフィニティー吸着による一時的な除去、およびトランスジェニックブタにおける補体制御因子の発現により、超急性拒絶反応期を過ぎてブタ臓器を生存させることができる。しかし、D. Lambrigts, D.H. Sachs, D.K.S Cooper, Transplantation 66, 547 (1998)は、抗体の戻りおよび残った補体活性が、高レベルの免疫抑制剤や他の臨床的介入の存在下であっても、臓器の生存を著しく制限する急性および遅延損傷の原因になる傾向にあると教示する。また、ドナー動物の遺伝子操作を介してgalエピトープの発現を減少させることにより、拒絶反応を抑制するための試みもなされてきた。

10

【0004】

不幸なことに、C. Costa et al., FASEB J. 13, 1762 (1999)は、H-トランスフェラーゼトランスジェニックブタにおけるgalトランスフェラーゼの競合的阻害が、エピトープ数を一部しか抑制しないという結果となることを開示している。他の同様なアプローチは、Sandrinらの米国特許5,821,117、Diamondらの米国特許6,166,288およびCooperらの米国特許6,331,658において開示されており、これらは全て炭水化物エピトープの発現を遺伝子的に改変して増加させることによって、galエピトープをマスクする方法を教示している。同様に、S. Miyagawa et al., J. Biol. Chem. 276, 39310 (2001)は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIトランスジェニックブタにおいてgalエピトープの発現をブロックする試みもまた、galエピトープ数を一部しか抑制しないという結果となり、霊長類レシピエントにおける移植片の生存を有意に延長することはできないことを教示する。ブタ細胞における多数のgalエピトープの存在を考えれば、この種のいかなるドミナントトランスジェニックアプローチも、抗galを介した損傷からの十分な保護を提供することはできないようである。

20

30

【0005】

A.D. Thall, P. Maly, J.B. Lowe, J. Biol. Chem. 270, 21,437 (1995)およびD'Aspicereらの米国特許5,849,991は、生存するGGTA 1ノックアウトマウスをES細胞技術を用いて作製できることを示している。K.L. McCreath et al., Nature 405, 1066 (2000)およびDenningらのPCT 公開WO 01/88096は、インビトロでターゲットされた体細胞を用いた、生存ヒツジの作製により証明されたように、核移植技術がある種の大動物の遺伝子座 (locus) 特異的改変に用いられ得ることを示している。K.W. Park et al., Anim. Biotech. In press (2001) は、遺伝的に改変された体細胞の核移植による、トランスジェニックブタの成功するクローニングと作製を開示する。GustafssonおよびSachsの米国特許6,153,428号(2000)は、インビトロでGGTA 1遺伝子が相同組み換えにより破壊されている、遺伝子改変ブタ細胞を開示する。Dai et al, Nature Biotechnol. 20 (3): 251-255 (2002)は、GGTA 1破壊遺伝子のブタヘテロ接合体の作製を示し、Lai et al, Science. 295: 1089 (2002)は、GGTA 1破壊遺伝子のミニチュアブタヘテロ接合体の作製を示す。

40

【0006】

Gustafssonらの米国特許6,413,769は、不活性化されたヘテロ接合体の、GGTA 1が破壊されたミニチュアブタ細胞の作製のための、合成アンチセンスオリゴヌクレオチド (S-オリゴヌクレオチド) の使用を教示する。Gustafssonらはさらに、ベクターにより抗生物質耐性配列、すなわちネオマイシン耐性をゲノム中に送達しGGTA 1遺伝子を不活性化させる、薬剤選択システムを用いることによる、ヘテロ接合体ミニチュアブタの作製をも示して

50

いる。残念なことに、Bondioli et al., Mol. Reproduc. Dev. 60: 189-195 (2001) は、インビボでのブタにおけるその達成のために核移植技術を使用する試みが不成功であったことを報告している。これはさらに、ロックアウトブタが作製できなかったことを開示する IoannuらのPCT公開WO 97/16064によっても報告されている

【0007】

Gustaffsonは、さらに米国特許6,413,769において、機能的に (1,3) - ガラクトシルトランスフェラーゼを産生することができないミニチュアブタの作製に、アンチセンス技術を用いる可能性、および、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-tk)などの二次的薬剤選択システムを用いて、ホモ接合体ミニチュアブタを作製するための方法をも開示している。不運にも、彼は、いずれの方法を用いても生存したホモ接合体ブタを作製したことを証明しておらず、GGTA 1が破壊された遺伝子に関して、細胞が産生され、有効であり得ることについて立証していない。

10

【0008】

したがって、GGTA 1エピトープをいずれも発現せず、そして、GGTA 1遺伝子の両アレル (allele) が破壊されているかまたは機能しなくなっているブタ；ならびにGGTA 1遺伝子について通常2つのアレルの代わりに1コピーのGGTA 1アレルを有するブタであって、GGTA 1アレルの前記コピーが破壊されているかまたは機能しなくなっている前記ブタを含むが、これに限定されないブタとして定義される、生存するGGTA 1欠損ブタに対する必要性がある。また、前記GGTA 1欠損ブタを作製する方法；および異種移植のための前記GGTA 1欠損ブタの組織および臓器を用いる方法に対する必要性もある。

20

【0009】

発明の概要

本発明は、生存するGGTA 1欠損ブタ、2頭のGGTA 1欠損ブタを交配させてGGTA 1欠損ブタの子孫を産生することを含む、前記ブタを作製するための方法、ならびに、異種移植のために前記ブタの細胞、組織および臓器を使用する方法を提供する。

1番目の側面においては、本発明は、生存するGGTA 1欠損ブタ (viable GGTA1 null swine) を提供する。前記ブタは、異種移植のための臓器、組織および細胞の供給源として有用である。前記ブタはまた、ブタの異種移植における、潜在的な遅延および慢性拒絶反応のメカニズムを克服することを目的とした現在開発中のアプローチの、より明確な評価を提供するためにも有用である。

30

【0010】

2番目の側面においては、本発明は、GGTA 1遺伝子の1つのアレルが破壊されているかまたは機能しなくなっている、ヘテロ接合体GGTA 1ブタまたはブタ胎仔から細胞系 (line of cells) を得ること；GGTA 1欠損細胞について細胞系を濃縮すること；そしてGGTA 1欠損生細胞について前記細胞系をスキャンすることを含む、GGTA 1欠損細胞を選択する方法を提供する。

【0011】

3番目の側面においては、本発明は、細胞系をGGTA 1欠損細胞について濃縮する工程が：補体の存在下で、前記系 (line) に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置すること；好ましくは抗体もしくはレクチンなどの抗gal試薬に結合している、磁性ビーズを用いて、前記系を枯渇させること (depleting)；前記系に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置し、その後、抗抗体 (anti-antibody) に結合している磁性ビーズを用いて前記系を枯渇させること；および、前記系にgalエピトープリガンドを処置し、その後、抗リガンド抗体でコートされている磁性ビーズを用いて前記系を枯渇させること、からなる群から選択される少なくとも1つの処置により達成される。前記のGGTA 1欠損細胞を濃縮する処置は、上記群から選択される複数の処置を含んでいてもよい。

40

【0012】

4番目の側面においては、本発明は、GGTA 1欠損ブタ細胞を提供する。前記細胞は、ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープを欠損しており、霊長類における超急性拒絶反応の克服に有用である。

50

5番目の側面においては、本発明は、ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープの発現が欠損しており、かつGGTA 1欠損細胞を含む、ブタ臓器を提供する。前記臓器は、霊長類における超急性拒絶反応の克服に有用である。

6番目の側面においては、本発明は、ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープの発現が欠損しており、かつGGTA 1欠損細胞を含む、ブタ組織を提供する。前記組織は、霊長類における超急性拒絶反応の克服に有用である。

【0013】

7番目の側面においては、本発明は、GGTA 1欠損細胞を単離すること、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞を破壊された細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。

10

8番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ2由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。

【0014】

9番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ9由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。

20

10番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ32由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。

11番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ37由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。

30

【0015】

図面の簡単な説明

図1. 抗体および補体による選択を複数のラウンド行った後の、野生型(F-12)およびGGTA 1ヘテロ接合体(355-F3)の胎仔細胞のフローサイトメトリー解析。細胞は、(1,3)-galエピトープ特異的なレクチンIB4を用い、染色前(塗りつぶしなしのトレース)または染色後(塗りつぶしのトレース)に解析した。細胞は、各選択から5~9日後に解析した。処置後の解析は、F12細胞の最後の選択から17日後および355-F1細胞の最後の選択から22日後に行われた。抗体/補体選択直後の細胞リカバー率を示し、これは処置中の細胞の喪失の全てを含んでいる。

【0016】

図2. 355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体/補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のフローサイトメトリー解析。選択されたクローンは、(1,3)-galエピトープ特異的なレクチンIB4を用いた染色前および染色後に解析し、抗体/補体選択を行っていない親の胎仔細胞系の染色と比較した。選択されたクローンでは、非galエピトープに結合しているバックグラウンドによる可能性のある、極めて低いレベルの染色が観察される。

40

【0017】

図3A. 355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体/補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のRT-PCR解析。レーン1: Q2。レーン2: Q9。レーン3: F12(WT胎仔線維芽細胞コントロール)。レーン4: 抗体/補体選択前の355-F1細胞。ラムダ(Lambda) Hind IIIマーカーのサイズをkbpで示す。選択前の355-F1細胞においては、2472bpの

50

ターゲットされた遺伝子座のPCR産物および1421bpの野生型遺伝子座のPCR産物が検出されているが、クローンQ2およびQ9においては2472bpの産物のみが検出されている。

【0018】

図3B. 355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体/補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のゲノム解析。レーン1~4: 3' ターゲティング解析。レーン1: Q2。レーン2: Q9。レーン3: F505 (WT胎仔線維芽細胞コントロール)。レーン4: 抗体/補体選択前の355-F1細胞。ラムダHind IIIマーカのサイズをkbpで示す。選択前の355-F1細胞においては、2.3kbpのターゲットされた遺伝子座のPCR産物および1.25kbpの野生型遺伝子座のPCR産物が検出されているが、クローンQ2およびQ9においては2472bpの産物のみが検出されている。レーン6~9: 5' ターゲティング解析。レーン6: Q2。レーン7: Q9。レーン8: F505 (WT胎仔線維芽細胞コントロール)。レーン9: 抗体/補体選択前の355-F1細胞。選択前の355-F1細胞においては、3.6kbpのターゲットされた遺伝子座のPCR産物および2.55kbpの野生型遺伝子座のPCR産物が検出されているが、クローンQ2およびQ9においては2472bpの産物のみが検出されている。

10

【0019】

図4. 核移植ドナー系 (line) の定量的サザンプロット解析。

示した供給源からのゲノムDNAを制限酵素Afl IIIで消化して、GGTA 1遺伝子座のエキソン9からの116bpのプロープおよびDQB遺伝子座からの107bpのプロープ (内部定量コントロール) に同時にハイブリダイズさせた。GGTA 1 プロープは、1.3kbの野生型フラグメントおよび、IRES-neo選択カセットを含む2.3kbの遺伝子ターゲットされたバンドにハイブリダイズする。F7サンプルは、野生型胎仔の線維芽細胞から調製された。355-F1サンプルは、自然抗体および補体による選択の前のGGTA 1ヘテロ接合体胎仔線維芽細胞から調製された。355-F1 4Xサンプルは、アフィニティー精製されたヒヒ自然抗体および補体を用いて4回選択された細胞集団から調製された。Qシリーズサンプルは、355-F1胎仔線維芽細胞から選択されたクローン細胞系からのものである。野生型GGTA 1アレルは、クローン化されていない4回選択された集団、または4つのQクローンのいずれにおいても検出されていない。

20

【0020】

図5. GGTA 1欠損仔ブタのサザンプロット解析。解析は、図4の説明文に記載したのと同様に行った。0177-1仔ブタおよび0177-2仔ブタのいずれも野生型アレルのGGTA 1遺伝子を含んでいない。

30

図6. GGTA 1欠損仔ブタ0177-1における (1,3)-galエピトープのフローサイトメトリー解析。仔ブタ0177-1、ヘテロ接合体胎仔355-F1および野生型胎仔F7から得られた、固定していない培養線維芽細胞を、フロー解析の前にFITCに結合したIB4を用いて染色した。正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)および染色していない0177-1線維芽細胞(-)をネガティブコントロールとして用いた。

【0021】

図7. 2月齢の仔ブタ0177-1。

図8. IB4-FITCおよび抗FITC磁性ビーズを用いて枯渇させた後の、ヘテロ接合体細胞に由来する細胞クローンにおける (1,3)-galエピトープのフローサイトメトリー解析。クローン15541.25および15541.63の解析を、IB4-FITC染色有り(+)および無し(-) で示す。

40

【0022】

図9. 仔ブタ15541由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞のIB4-FITC/磁性ビーズ枯渇により得られたクローン15541.25および15541.63のゲノム解析。3' ターゲティング解析を図3Bに記載したのと同様に行った。レーン1: 分子量マーカー、サイズをkbpで示す。レーン2: 野生型胎仔F3。レーン3: ヘテロ接合体雌性ブタ0226-1、仔ブタ15541の母親。レーン4: 野生型雄性ブタ14925、仔ブタ15541の父親。レーン5: ヘテロ接合体仔ブタ15541。レーン6: 15541細胞の磁性ビーズ枯渇後の15541細胞からクローン化された、クローン細胞系15541.25。レーン7: 15541細胞の磁性ビーズ枯渇後の15541細胞からクローン化された、クローン細胞系15541.63。選択前の15541細胞においては、2.3kbpのターゲッ

50

トされた遺伝子座のPCR産物および1.25kbpの野生型遺伝子座のPCR産物が検出されているが、クローン15541.63においては2472bpの産物のみが検出されている。クローン15541.25は、1つのターゲットされたアレルと野生型アレルと同じサイズの1つのアレルという矛盾のない産物をもたらしている。

【0023】

図10. IB4-FITC染色を行ったおよび染色を行っていない、PFI510欠損B細胞 (PFI510 Null B cell) のフローサイトメトリー解析。

図11. 4日齢の仔ブタPL751。

図12. 仔ブタPL751のゲノム解析。3' ターゲティング解析を図3Bについて記載したのと同様に行った。レーン1: 分子量マーカー、サイズをkbpで示す。レーン2: DNAなし。レーン3: ヘテロ接合体胎仔PFI510。レーン4: 野生型胎仔F505。レーン5: GGTA 1ヘテロ接合体コントロール細胞系PED D.13。レーン6: DNAなし。レーン7: 仔ブタPL751。前記仔ブタにおいては、遺伝子ターゲットされたアレルに由来する2472bpの産物のみが検出されている。

図13. IB4-FITC染色を行ったおよび染色を行っていない、仔ブタPL751由来の耳線維芽細胞のフローサイトメトリー解析。

【0024】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、非ヒト動物の遺伝子操作に関する。さらに具体的には、本発明は異種移植に用いられる非ヒト動物の遺伝子操作に関する。本発明は、生存するGGTA 1欠損ブタ、2頭のGGTA 1欠損ブタを交配させてGGTA 1欠損ブタの子孫を産生することを含む、前記ブタを作製するための方法、ならびに、異種移植のために前記ブタの細胞、組織および臓器を使用する方法を提供する。

本明細書において引用された特許および刊行物は、当分野の知識を反映しており、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。これら特許および刊行物と本明細書との間に矛盾が存在する場合には、後者を支持することとする。

【0025】

1番目の側面においては、本発明は、生存するGGTA 1欠損ブタを提供する。本発明の目的において、「GGTA 1欠損ブタ」とは、GGTA 1エピトープをいずれも発現せず、そして、GGTA 1遺伝子の両アレルが破壊されているかまたは機能しなくなっているブタ; ならびにGGTA 1遺伝子について通常の2つのアレルの代わりに1コピーのGGTA 1アレルを有するブタであって、前記アレルが破壊されているかまたは機能しなくなっている前記ブタを含むが、これに限定されないブタである。「破壊された (disrupted) 遺伝子」とは、改変されているために遺伝子コードのセグメントの転写および/または翻訳が影響を受けている、例えば、ノックアウト技術により、または、所望のタンパク質の遺伝子をさらに挿入すること、もしくは、存在する配列の転写を調節する制御配列を挿入することにより、そのセグメントのコードが読めなくなっている、遺伝子コードの一部を意味する。ある態様においては、GGTA 1アレルは、相同組み換えまたは他の挿入もしくは欠失により改変される。ある態様においては、GGTA 1アレルは変異により機能しなくなっている。

【0026】

ある態様においては、GGTA 1欠損ブタは、GGTA 1遺伝子の両アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされているブタをいい、これは本明細書では「ホモ接合体 (homozygous)」と称する。かかる態様は、一般に「遺伝子ノックアウト」、「遺伝子ノックイン」と称されるもの、および、かかる遺伝子を機能しないようにする、ネイティブなGGTA 1遺伝子の両方のネイティブなアレルの他の全ての改変を含む。

ある態様においては、GGTA 1欠損ブタは、通常の2つのGGTA 1アレルを有する代わりに1つのアレルのGGTA 1遺伝子しか有さないブタであり、これは、本明細書においては「半接合体 (hemizygous)」と称し、そのGGTA 1遺伝子の1つのアレルは破壊されているか、または機能しないようにされている。

ある態様においては、GGTA 1欠損ブタは、GGTA 1遺伝子に関して「複合ヘテロ接合体 (c

10

20

30

40

50

ompound heterozygote)」であり、ここでは前記のブタはGGTA 1遺伝子について2つの異なるアレルを有しているため、GGTA 1遺伝子が機能しないようにされている。

【0027】

ある好ましい態様においては、GGTA 1欠損ブタはミニチュアブタである。ある好ましい態様においては、GGTA 1欠損ブタは、Sachs et al., Transplantation 22, 559(1976)において開示されているミニチュアブタの子孫である。

かかるGGTA 1欠損ブタは、異種移植のための臓器、組織および細胞の供給源として有用である。かかるブタはまた、ブタの異種移植における、潜在的な遅延および慢性拒絶反応のメカニズムを克服することを目的とした現在開発中のアプローチの、より明確な評価を提供するためにも有用である。

【0028】

2番目の側面においては、本発明は、GGTA 1遺伝子の1つのアレルが破壊されているかまたは機能しないようにされている、ヘテロ接合体GGTA 1ブタまたはブタ胎仔から細胞系を得ること；GGTA 1欠損細胞について前記細胞系を濃縮すること、そしてGGTA 1欠損細胞について前記細胞系をスキャンすることを含む、GGTA 1欠損細胞を選択する方法を提供する。本発明の目的において、「スキャンする」とは、破壊された遺伝子の存在を評価するのに用いられる全ての方法を意味する。かかるスキャン方法は、当業者によく知られており、限定されないが、レクチンを用いた染色、フローサイトメトリー、PCR、RT-PCRおよびサザンブロットを含む。本発明の目的において、「系(line)」とは、同じ給源に由来する細胞の群である。かかる系を得る方法は、当業者によく知られている。系を得る非限定例は、細かく刻んだ組織をコラゲナーゼ/トリプシンで消化して、分散された細胞をハムF10培地、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ウシ胎仔血清(FBS)、ゲンタマイシンなどの抗生物質といった1種または2種以上の試薬を含有する栄養培地中、コラーゲンコートしたプレート上に播種することにより、ミニチュアブタ胎仔から初代線維芽細胞を単離することを含み、接着した細胞は低温保存され、「系」として働くこととなる。ある好ましい態様においては、ヘテロ接合体GGTA 1ブタは、ミニチュアブタであり、Lai et al, Science 295:1089 (2002)において開示されている方法により作製される。ある好ましい態様においては、ヘテロ接合体GGTA 1ブタは、ミニチュアブタであり、Sachs et al., Transplantation 22, 559(1976)において開示されているミニチュアブタの子孫である。ある好ましい態様においては、1つの破壊されたGGTA 1アレルを有するブタ胎仔は、Sachs et al., Transplantation 22, 559(1976)において開示されているミニチュアブタの子孫から得られる。

【0029】

ある好ましい態様においては、細胞系は、妊娠後、核移植された胎仔から得られたGGTA 1ヘテロ接合体細胞を単離し、Lai et al, Science 295:1089 (2002)において開示されている通りに前記細胞を培養することにより得られる。ある好ましい態様においては、細胞系は、ブタ胎仔線維芽細胞のクローン集団である。本発明の目的において、「クローン集団(clonal population)」とは、単一の細胞に由来する細胞の群をいう。本発明のブタ胎仔線維芽細胞は、当業者によく知られた技術を用いて得ることができ、限定されないが、胎仔組織を細かく刻むこと、ならびに、コラゲナーゼおよびトリプシンを用いて消化することを含む。ある好ましい態様においては、ブタ胎仔線維芽細胞は、Sachs et al., Transplantation 22, 559(1976)において開示されているミニチュアブタ由来の子孫であるミニチュアブタから得られる。ある好ましい態様においては、ブタ胎仔線維芽細胞は、GGTA 1ノックアウトについてヘテロ接合体である。ある好ましい態様においては、GGTA 1ノックアウトについてヘテロ接合体である細胞は、Lai et al, Science 295:1089 (2002)において開示されているミニチュアブタ由来の子孫から得られる。

【0030】

3番目の側面においては、2番目の側面において記載されたGGTA 1欠損細胞の細胞系を濃縮するステップが：補体の存在下で、前記系に抗ガラクトース-(1,3)-ガラクトース抗体を処置すること；好ましくは抗gal試薬に結合している、磁性ビーズを用いて、前

10

20

30

40

50

記系を枯渇させること；前記系に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置し、その後、抗抗体に結合している磁性ビーズを用いて前記系を枯渇させること；および、前記系にgalエピトープリガンドを処置し、その後、抗リガンド抗体でコートされている磁性ビーズを用いて前記系を枯渇させること、からなる群から選択される少なくとも1つの処置により達成される。ある好ましい態様においては、前記のGGTA 1欠損細胞を濃縮する処置は、上記群から選択される複数の処置を含む。ある好ましい態様においては、前記のGGTA 1欠損細胞を濃縮する処置は、上記群から選択される複数の処置の組合せを含む。本発明の目的において、「抗gal試薬」とは、ガラクトース - (1,3) - ガラクトースに結合する試薬であり、限定されないが抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体およびレクチンを含む。

10

【0031】

ある好ましい態様においては、抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体は、霊長類の抗体である。本発明の抗体は、限定されないが、ヒヒ、チンパンジー、ゴリラ、ヒトおよび、(1,3)ガラクトシル - (gal) - エピトープに対する抗体を産生する能力を有する他の霊長類であってもよい。本発明の目的において、「霊長類」とは、Merriam-Webster (2002)において定義されている通りのその辞書の意味であり、ヒト、類人猿、サルおよび（キツネザルおよびメガネザルのような）関連する種を含む、哺乳類の任意の（霊長）目を含む。本発明の抗体は、限定されないが、モノクローナル抗体およびそのフラグメントを含む。ある好ましい態様においては、霊長類の抗体はヒヒ血清由来である。

【0032】

ある好ましい態様においては、galエピトープリガンドは、限定されないが、IB4ビオチン(SIGMA, L2140)およびIB4-FITCなどのIB4給合体を包含し、そして抗リガンド抗体は、限定されないが抗ビオチンおよび抗FITCを包含する。

20

ある好ましい態様においては、細胞系をGGTA 1欠損細胞について濃縮する工程は、補体の存在下における抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体の複数回の処置と、引き続きIB4-FITCおよび抗FITCがコートされている磁性マイクロビーズを用いた複数回の枯渇の処置を含む。

他の全ての条件は、3番目の側面において記載された通りである。

【0033】

4番目の側面においては、本発明は、異種移植に有用な、GGTA 1欠損ブタ細胞を提供する。本発明の目的において、「GGTA 1欠損細胞」とは、(1,3)ガラクトシル - (gal) - エピトープを欠損している細胞であり、限定されないが、2つの破壊されているかまたは機能しないGGTA 1遺伝子を含む、ホモ接合体；GGTA 1遺伝子についての通常の2つのアレルの代わりに、1つのGGTA 1アレルを含み、その1つのGGTA 1アレルは破壊されているかまたは機能しないようにされている、半接合体；あるいは、GGTA 1遺伝子について2つの異なる変異アレルを含む、複合ヘテロ接合体、である細胞を包含する。かかる細胞は、本発明の1番目の側面によるブタに由来する。好ましい細胞は、限定されることなく、ランゲルハンス島細胞、血液前駆細胞、骨前駆細胞、および始原幹細胞を含む幹細胞を包含する。より好ましくは、細胞はこれらに由来するQ2、Q9、Q32またはQ37である。かかるGGTA 1欠損細胞は、霊長類における超急性拒絶反応の克服に有用である。

30

40

【0034】

5番目の側面においては、本発明は、異種移植に有用なブタ臓器を提供する。かかるブタ臓器は、GGTA 1欠損細胞を含み、霊長類において超急性拒絶反応に關与する(1,3)ガラクトシル - (gal) - エピトープを欠損している。かかる臓器は、本発明の1番目の側面によるブタに由来する。本発明の目的において、「臓器」とは、1または2以上の組織を含む組織された構造をいい、臓器は1または2以上の特異的な生物学的機能を行う。好ましい臓器は、限定されないが、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、肺、甲状腺および皮膚を含む。

【0035】

6番目の側面においては、本発明は、異種移植に有用な組織を提供する。かかるブタ組織は、霊長類において超急性拒絶反応に關与する(1,3)ガラクトシル - (gal) - エピトープ

50

ブを欠損しており、GGTA 1欠損細胞を含む。かかる組織は、本発明の1番目または2番目の側面によるブタに由来する。本発明の目的において、「組織」とは、細胞を含む組織された構造をいい、組織は、単独でまたは他の細胞もしくは組織と結合して、1または2以上の生物的機能を行う。

【0036】

7番目の側面においては、本発明は、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法を提供する。本発明のこの側面に係る方法は、GGTA 1欠損細胞を選択すること、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をGGTA 1欠損細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含み、ここで前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない。

10

ある好ましい態様においては、GGTA 1欠損細胞は、GGTA 1欠損細胞のクローン集団に由来する。

ある好ましい態様においては、卵母細胞は若い雌性豚(gilt)から入手される。ある好ましい態様においては、卵母細胞は雌性豚(sow)から入手される。ある好ましい態様においては、ドナー細胞は初代線維芽細胞である。

【0037】

ある好ましい態様においては、ドナー細胞は、除核された卵母細胞と融合される。また、ドナー細胞の核は、除核された卵母細胞の細胞質に直接注入されてもよい。

ある好ましい態様においては、NT-由来の胚は、代理母の子宮に単為生殖(parthenogenic)胚と共に移植される。ここで用いられる単為生殖胚とは、生存できない胚、すなわちさらに分裂して出産まで生存する能力を有さない胚を意味する。ある好ましい態様においては、NT-由来の胚は、代理母が交配した後に代理母の子宮に移植される。全てではないがいくつかの好ましい態様においては、卵母細胞はインピトロで成熟される。いくつかの好ましい態様においては、代理母は若い雌性ブタである。いくつかの好ましい態様においては、代理母は雌性ブタである。

20

【0038】

ある好ましい態様においては、卵母細胞は除核されている。ある好ましい態様においては、ドナー細胞の核は、除核された卵母細胞の細胞質に注入される。

ある好ましい態様においては、ドナー細胞はブタ胎仔線維芽細胞である。ある好ましい態様においては、NT-由来の胚は、交配していない代理母の子宮に移植される。全てではないがいくつかの好ましい態様においては、卵母細胞はインピトロで成熟される。

30

ある好ましい態様においては、ドナー細胞は、GGTA 1ノックアウトについてヘテロ接合体であるブタ胎仔線維芽細胞由来である。

いくつかの好ましい態様においては、代理母は若い雌性ブタである。いくつかの好ましい態様においては、代理母は雌性ブタである。

【0039】

8番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ2由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、8番目の側面に記載した通りである。

40

9番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ9由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、8番目の側面に記載した通りである。

【0040】

10番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ32由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発

50

情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、8番目の側面に記載した通りである。

11番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ37由来の細胞と融合させてNT-由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT-由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、8番目の側面に記載した通りである。

【0041】

下記例から、本発明のある有利な特徴が明らかになるであろう。GGTA 1の発現が欠損している細胞は、その酵素の非存在下における細胞のプロセスの研究や、 α -1,3-galエピトープの非存在下における血清反応性のアッセイおよびGGTA 1欠損動物の作製に有用である。後者の用途には、この酵素の発現を抑制する安定な遺伝子改変を備えた細胞の単離が必要である。

GGTA 1ヘテロ接合体細胞から始めるGGTA 1欠損細胞を単離するための従来の試みには、ヘテロ接合体細胞を選択するのに用いられたものとは異なる薬剤選択システムを組み合わせた、遺伝子ターゲティングベクターを用いたトランスフェクションが用いられてきた。Gustaffsonら米国特許6,153,428参照。2次的薬剤選択システムの開発と応用は今日まで成功していない。

【0042】

一方、本発明は、GGTA 1ヘテロ接合体細胞の機能しているアレルに変異を有する細胞の選択、または、G418などの2次的薬剤選択剤を用いることなくGGTA 1欠損細胞とすることができる体細胞組み換えを含む。GGTA 1を発現する細胞に対する繰り返しの選択は、 α -1,3-galエピトープに対するアフィニティー精製された霊長類の抗体暴露、次いで補体により溶解することによって行われる。代替的な処置または追加的な処置として、GGTA 1を発現する細胞の枯渇は、限定されないがgalエピトープリガンドまたは抗ガラクトース-(1,3)-ガラクトース抗体を含む抗gal試薬を用いて細胞を最初に処置し、あるいは処置せずに、次いで適切にコートされた磁性マイクロビーズを用いることにより行われる。抗体/補体の処置および枯渇は、任意の順序で複数回繰り返すことができる。上記方法を用いることにより、核移植に直接用いるためのGGTA 1欠損細胞が十分に濃縮された細胞の集団を得ることができる。また、濃縮された細胞の集団は、さらなる上記の抗体および補体を用いた選択もしくは枯渇を用いることにより、あるいは用いることなく、クローン化されてもよい。同様の選択は、 α -1,3-galエピトープに特異的に結合して細胞死を引き起こす他の試薬、または結合する細胞集団と結合しない細胞集団を物理的に分離することができる他の試薬を用いて行われてもよい。

【0043】

本発明によれば、核移植と組み合わせて、外来DNA配列を有しないGGTA 1遺伝子座の変異アレルを含む動物を作製することもできる。かかるアレルのホモ接合体動物は、臨床の異種移植において好ましく用いられる。また、かかるアレルには、GGTA 1ヘテロ接合体細胞の単離にもともと使用されたのと同じ選択システムを用いて、さらなる遺伝子改変を導入することができる。

下記例は、本発明のある特に好ましい態様をさらに説明することを意図しており、本発明の範囲を限定することを全く意図しない。特に言及しない限り、全ての化学物質はSigma (St. Louis, MO)からのものである。

【0044】

例 1

-1,3-galエピトープの発現を欠損する細胞集団の選択と解析

抗 α -1,3-gal抗体および補体を用いたGGTA1ヘテロ接合体355-F3細胞の複数回の選択により、 α -1,3-galエピトープの発現を欠損する細胞集団を選択する能力について調べた。GGTA1ヘテロ接合体細胞は、妊娠32日の、GGTA1ヘテロ接合体細胞を核移植した胎仔(355-F3)から、記載されているように(Lai et al., Science 295:1089)単離して培養した。胎

10

20

30

40

50

仔になる核移植胚を再構成するためのドナー細胞は、1つのアレルがベクターpGalGT S-Neo (Lai et al., Science 295:1089, 2002)を用いた相同組み換えにより不活性化されているGGTA1ヘテロ接合体である、ブタ0212-2の耳切片から外植し、培養した。355-F3細胞は、コラーゲンIでコートされたディッシュ上で、20% FBSおよび20 μ g/ml ゲンタマイシンを含むF10培地(メディア)中、5% CO₂、3% O₂および37 °Cで培養した。

【0045】

-1,3-galエピトープに対する抗体は、ナイーブなヒヒ血清から精製し、-1,3-gal L B-VIマトリックスカラム(Alberta Research Council, Canada.)を用いてGal糖に吸着させた。結合した抗体を、低pH(0.25%酢酸、Abbot Labs)によりカラムからトリスペースの塩緩衝液(0.2M TRISおよび0.6M 塩化ナトリウム)中に溶出した。溶出したフラクションをPBSで透析し、緩衝液をPBSに対して平衡化した。抗体のバッチは、30Kの重さで分画するAmicon Centriprepで濃縮し、その後50Kの重さで分画するCentriplus Concentratorで濃縮した。濃縮された抗体は、PBSに対して透析し、UV吸光度およびBradfordタンパク質アッセイにより濃度を決定した。最終的なストック溶液を5 mg/mlに希釈して-80 °Cで凍結した。

10

【0046】

上記細胞系は、メディア中の50~100 μ g/mlのアフィニティー精製された抗-1,3-gal I抗体(Nab)中、2~3 $\times 10^6$ 細胞/mlの懸濁液で、混合しながら室温で30分間処置した。洗浄した後、細胞をDNase I (10 μ g/ml)を含有するウサギ補体(1:8)(C')で、メディア中、混合しながら室温で45分間処置した。生存している細胞を計数し、播種して大量培養し、次の処置のために増殖させた。抗-1,3-gal抗体50 μ g/mlで処置1~3回目を行い、100 μ g/mlで処置4~6回目を行い、全部で6回のNab/C'処置を行った。処置は7~9日ごとに行った。各抗体/補体処置の前に、IB4-FITCを用いて、細胞を-1,3-galエピトープの存在について解析した。

20

【0047】

図1は、355-F3およびPFF-F12(野生型胎仔線維芽細胞)細胞の集団が、最初は、-1,3-galエピトープ特異的なレクチンIB4で鮮やかに染まっていることを示す。抗体および補体を用いた選択により、355-F3に由来する集団は、4回目の処置後では、特異的なIB4染色があってもごく僅かとなっている。一方、選択が行われた野生型の細胞は、IB4染色の平均ははるかに少ない減少を示した。両方の場合において、抗体および補体を用いた選択を複数回行うことにより、さらなる抗体/補体処置による溶解に耐性の細胞が高度に濃縮された集団がもたらされた。最後(6回目)の処置から22日後における355-F3由来の細胞の解析では、IB4結合の平均は全く増加を示さなかった。最後の処置から17日後におけるPFF-F12細胞の同様の解析では、IB4結合の平均はわずかに増加を示した。

30

【0048】

例2

野生型GGTA1の発現を欠損している細胞クローンの選択および分析

GGTA1ヘテロ接合体355-F1細胞は、妊娠32日の、核移植した胎仔(355-F1)から、記載されているように(Lai et al., Science 295:1089)単離して培養した。胎仔になる核移植胚を再構成するためのドナー細胞は、1つのアレルがベクターpGalGT S-Neo (Lai et al., Science 295:1089, 2002)を用いた相同組み換えにより不活性化されているGGTA1ヘテロ接合体である、ブタ0212-2の耳切片から外植し、培養した。細胞は、コラーゲンIでコートされたディッシュ上で、20% FBSおよび20 μ g/ml ゲンタマイシンを含むF10培地(メディア)中、5% CO₂、3% O₂および37 °Cで培養した。次いで、細胞を上記の懸濁液中で抗体および補体により2回処置し、その後、(1,3)-galエピトープの発現を欠損するクローンの単離のために、低密度で播種した。2回目の処置の後、細胞をコラーゲンIでコートされた96ウェルプレートに5および10細胞/ウェルで播種した。処置3~5回目として1日おきに、in situで100~500 μ g/mlの抗(1,3)-gal抗体を用いた1時間37 °Cでの処置、および1:8ウサギ補体を用いた1時間37 °Cでの処置を行った。ウェルの15%以上をカバーする細胞のパッチ(patch)を含むウェルを、48ウェルプレートに移し、翌日

40

50

n situで500 µg/mlの抗 (1,3)-gal抗体および補体を用いて処置した。細胞は、分子解析、IB4-FITC解析および凍結のために継代した。

【0049】

RNAおよびエタノール沈殿されたDNAは、QiagenからのRNeasyおよびDNeasyシステムを用いて調製した。最後の処置の後、生細胞を含むウェルをさらなる選択を行うことなく培養し、溶解に耐性のクローンをGGTA1遺伝子座の構造だけでなくエピトープおよびRNAの発現について解析した。2つの代表的なクローンであるQ2およびQ9の解析を図2および3に示す。両クローンともIB4にほとんど特異的に結合しないかまたは全く特異的に結合しない(図2)。およそ50ngのQ2およびQ9のRNAをAMV逆転写酵素XL (Takara Shuzo Co., Ltd.)を用いてcDNAに逆転写した。その後、cDNAをLA Taq DNAポリメラーゼ(Takara Shuzo Co., Ltd.)、GGTA1のエキソン2のフォワードプライマー-GT-598 (5'-TTCTGCAGAGCAGAGCTCAC)およびエキソン9のリバースプライマー-RN1 (5'-CCCTCAACCCAGAACAGATAAG)を用いた反応により増幅した。PCR産物を1%ゲルで解析した。RT-PCR産物のサザンプロットを、遺伝子ターゲットされたGGTA1遺伝子座とネイティブなGGTA1遺伝子座との両方に由来する転写産物を検出する、オリゴヌクレオチドR823 (5'-AGGATGTGCCTTGTACCACC)とハイブリダイズさせた。

10

【0050】

ネイティブな遺伝子座に対する1421塩基対のバンドとターゲットされた遺伝子座に対する2472塩基対のバンドが予測される。クローンのRT-PCR解析(図3)により、Q2およびQ9細胞に存在する遺伝子ターゲット遺伝子座由来の発現に基づくバンドが得られ、ネイティブなGGTA1遺伝子座に由来する発現に基づくバンドは得られなかった。約200ngのDNAは、F238およびR823の代わりにプライマーF248 (5'-GAAGAAGACGCTATAGGCAACG)およびRN1を用いて5'ゲノムアッセイを行う以外は記載されているように(Lai et al., Science 295:1089)、増幅して切断し、アガロースゲルで解析を行った。検出の感度を上げるため、ゲルのDNAをナイロンメンブレンに転写し、上記のようにオリゴヌクレオチドプローブR823にハイブリダイズさせた。ネイティブなGGTA1遺伝子座およびターゲットされたGGTA1遺伝子座からの5'ゲノムアッセイにおいては、それぞれ約2550bpと3600bpのEco RIのバンドにハイブリダイズすることが予想される。ネイティブなGGTA1遺伝子座およびターゲットされたGGTA1遺伝子座のそれぞれからの3'ゲノムアッセイにおいては、それぞれ約1250bpと2300bpのSac Iのバンドにハイブリダイズすることが予想される。ゲノムPCR解析(図3)により、355-F1細胞において、遺伝子ターゲットされた遺伝子座から予想される構造を有するGGTA1遺伝子座は存在するが、野生型GGTA1遺伝子座様の構造を有する遺伝子座は存在しないことが明らかになった。

20

30

【0051】

例3

野生型GGTA1の発現を欠損する細胞クローンをを用いた仔ブタの作製

細胞系Q2およびQ9(上記)、ならびに、同じ方法を用いて同時に作製された系Q32およびQ37を使用して、核移植を行った。図4は、GGTA1遺伝子由来のプローブにハイブリダイズさせた4種のクローン由来のDNAのゲノムサザンプロットを示しており、クローン化された細胞系のいずれにおいても野生型GGTA1アレルが存在しないことを確認している。Q32細胞系を用いた核移植により再構成された胚は、6頭の若い雌性代理母に移植され、そのうちの3頭において超音波検査により妊娠が明らかになった。これら妊娠したうちの1頭を出産まで継続させ、帝王切開の後、2頭の仔ブタを出産させた(仔ブタ0177-1および0177-2)。

40

【0052】

耳の線維芽細胞から調製したDNAのゲノムサザンプロット解析により、両方の仔ブタにおいて野生型GGTA1アレルが存在しないことを確認した(図5)。仔ブタ0177-1の耳線維芽細胞における-1,3-galエピトープの発現を、IB4-FITCを用いた染色の後にフローサイトメトリーによって調べたところ、陰性であり、このGGTA1欠損動物において-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性が存在しないことが確認された(図6)。仔ブタ0177-1

50

の2月齢における写真が図7として掲載されている。

【0053】

例4

磁性マイクロビーズを用いた枯渇後の、野生型GGTA1の発現を欠損する細胞クローンの選択と解析

前記のように酵素的消化によってGGTA1ヘテロ接合体仔ブタ15541の耳パンチから15541線維芽細胞を得た。2 μ g/mlのIB4-ビオチン(SIGMA, L2140)を含むIB4単離緩衝液(マグネシウムおよびカルシウム、0.5%の透析したBSAを含む1 \times PBS)を用いて、 2×10^7 個の細胞を 2×10^6 細胞/mlの濃度で10分間37 $^{\circ}$ Cにて染色した。その後、細胞を単離緩衝液で2回洗浄し、200 \times gで5分間遠心分離した。細胞を単離緩衝液中 1.25×10^8 細胞/mlに調整し、抗ビオチンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec, 130-090-485)を 10^7 細胞あたり20 μ lで加えた。

【0054】

ビーズと細胞の混合物を10分ごとに揺らして30分間4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。細胞を単離緩衝液で洗浄し、200 \times gで5分間遠心分離した。次いで、細胞を0.5mlの単離緩衝液に懸濁し、40ミクロンのろ過フィルターに通した。フィルターをさらに0.5mlの単離緩衝液で洗浄し、細胞を、適切なマグネットを有するMACS LD (Miltenyi Biotec, 130-042-901) 枯渇カラム(depletion column)にアプライした。フロースルーを推定されるgalエピトープ陰性細胞集団として回収し、コラーゲンIでコートされた96ウェルマイクロタイタープレートに1ウェルあたり1/3細胞でサブクロニングした。細胞のクローンを11~14日後に単離して、解析および低温保存のために増殖させた。

【0055】

クローン15541.25および15541.63を、FITCが結合したIB4レクチンを用いた染色の後、フローサイトメトリー解析によりgalエピトープの発現について調べた(図8)。両方のクローンの蛍光は、IB4-FITC染色を行わなかったもので観察される蛍光と識別できなかった。

DNAをクローン15541.25および15541.63から調製し、図3Bについて記載したのと同様に3'ゲノムRCR解析により解析した(図9)。クローン15541.25では、1つの遺伝子ターゲットされたアレルおよび野生型アレルと同じサイズの2番目のアレルが検出された；このクローンにおいては、厳密なGGTA1変異の性質は決定されなかった。クローン15541.63においては、GGTA1欠損細胞であるQ2、Q9、Q32およびQ37について上記で観察されたように、野生型GGTA1アレルを欠損していることが判明した。

【0056】

例5

galエピトープを有する細胞が枯渇しているクローン化されていない細胞集団を用いた仔ブタの作製

GGTA1ヘテロ接合体胎仔PFI510から得た細胞に、例1において記載したように抗体/補体溶解を3ラウンド行い、次いで、例4において記載したように、IB4-FITCおよび抗FITC磁性マイクロビーズを用いた枯渇を3ラウンド行った。枯渇させた細胞集団(PFI510欠損B細胞)のIB4-FITC染色を図10に示す。

ドナー株と同様にPFI510欠損B細胞を用いて核移植を行った。胚レシピエント1538に、1頭の生存している仔ブタ、PL751を出産させた(図11)。自然抗体および補体を用いて選択されたクローン細胞集団に由来する仔ブタにおいて上記で観察されたように、この仔ブタから得たゲノムDNAの解析によりWT GGTA1アレルが存在しないことが確認された(図12)。また、PL751由来の耳線維芽細胞のフロー解析により、IB4レクチンで染まる細胞が存在しないことも明らかになった(図13)。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】抗体および補体による選択を複数のラウンド行った後の、野生型(F-12)およびGGTA1ヘテロ接合体(355-F3)の胎仔細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示した図であ

10

20

30

40

50

る。

【図2】355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体 / 補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。

【図3】355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体 / 補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のRT-PCR解析 (A)、および 355-F1胎仔由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞の抗体 / 補体選択によって得られた、クローンQ2およびQ9のゲノム解析 (B) の結果を示した図である。

【図4】核移植ドナー系の定量的サザンプロット解析の結果を示した図である。

【図5】GGTA 1欠損仔ブタのサザンプロット解析の結果を示した図である。

【図6】GGTA 1欠損仔ブタ0177-1における (1,3)-galエピトープのフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。 10

【0058】

【図7】2月齢の仔ブタ0177-1を示した写真図である。

【図8】IB4-FITCおよび抗FITC磁性ビーズを用いて枯渇させた後の、ヘテロ接合体細胞に由来する細胞クローンにおける (1,3)-galエピトープのフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。

【図9】仔ブタ15541由来のGGTA 1ヘテロ接合体細胞のIB4-FITC / 磁性ビーズ枯渇により得られたクローン15541.25および15541.63 のゲノム解析の結果を示した図である。

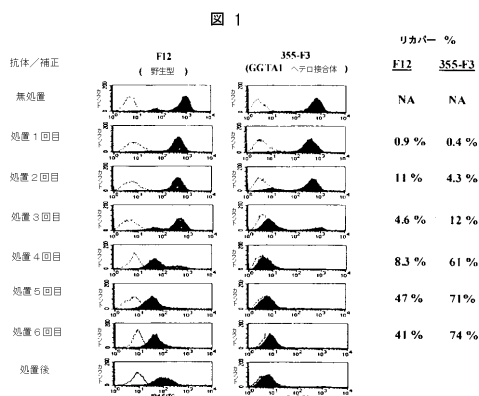
【図10】IB4-FITC染色を行ったおよび染色を行っていない、PFI510欠損B細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。 20

【図11】4日齢の仔ブタPL751を示した写真図である。

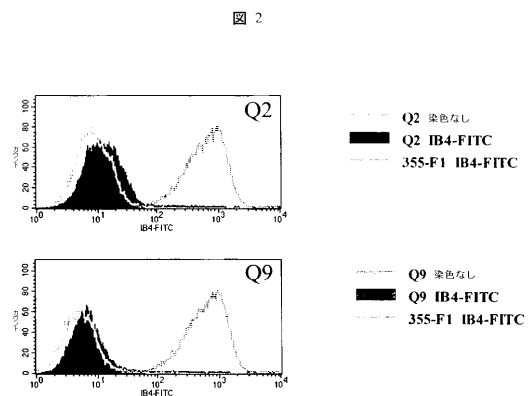
【図12】仔ブタPL751のゲノム解析の結果を示した図である。

【図13】IB4-FITC染色を行ったおよび染色を行っていない、仔ブタPL751由来の耳線維芽細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。

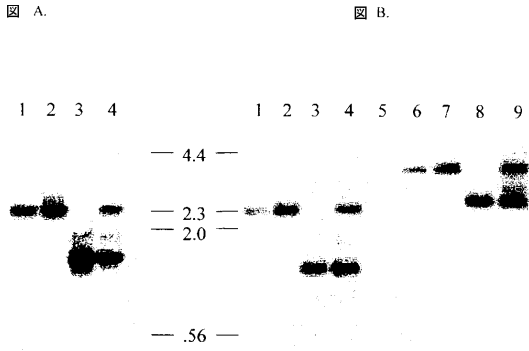
【図1】



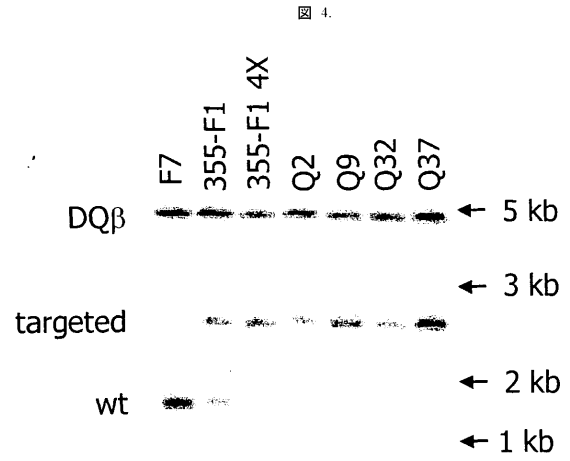
【図2】



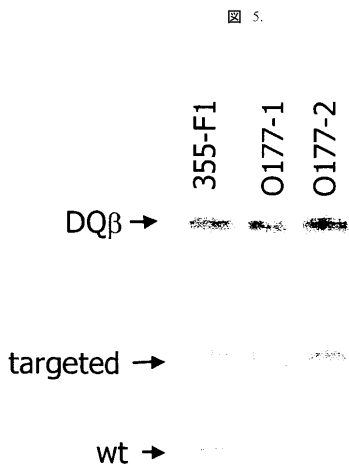
【 図 3 】



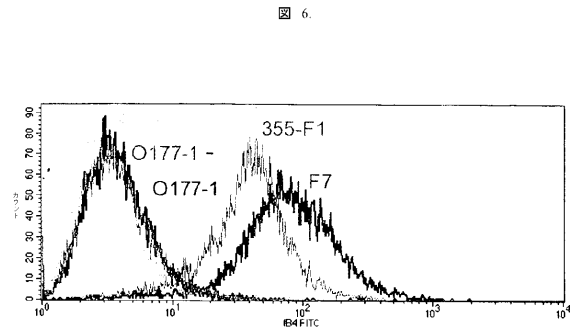
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

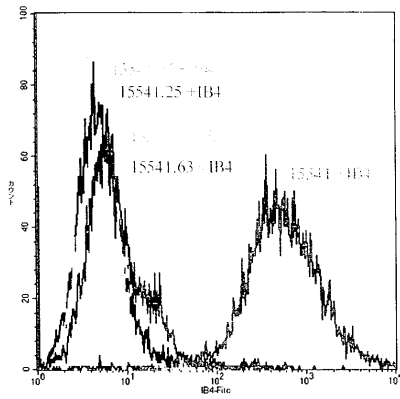


【 図 7 】



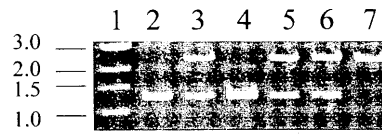
【 図 8 】

図 8.



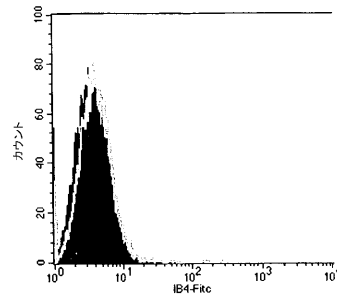
【 図 9 】

図 9.



【 図 10 】

図 10.



■ PFIS10 次亜亜細胞、染色なし
 ▨ PFIS10 次亜亜細胞、IB4-FITC 染色

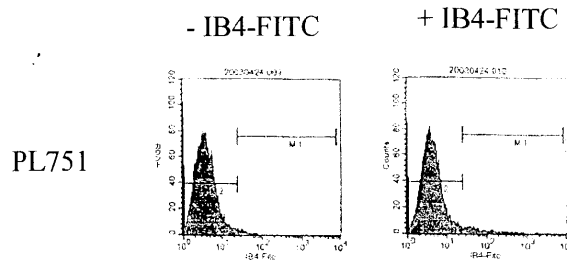
【 図 11 】

図 11.



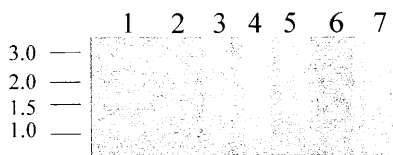
【 図 13 】

図 13.



【 図 12 】

図 12.



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/25199
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01K 67/027; C12N 5/00, 15/00 US CL : 800/17, 24; 435/325, 375 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) U.S. : 800/17, 24; 435/325, 375 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOZAWA, S. et al. Characteristics of Immunoglobulin Gene Usage of the Xenotibody Binding to Gal-alpha(1,3)Gal Target Antigens in the GAL Knockout Mouse. Transplantation. 15 July 2001, Vol. 72, No.1, pages 147-155.	1-8, 10-42
A	AYARES, D. et al. Cloning Pigs Deficient in Alpha 1,3 Galactosyltransferase. Graft. January/February 2001, Vol. 4, No. 1, pages 80-82.	1-8, 10-42
A	GOCK, H. et al. Deleting the Gal Epitope from the Donor Pig. Graft. January/February 2001, Volume 4, No. 1, pages 76-77.	1-8, 10-42
A	MIYAGAWA, S. et al. Masking and Reduction of the Galactose-alpha1,3-Galactose (alpha-Gal) Epitope, the Major Xenotigen in Swine, by the Glycosyltransferase Gene Transfection. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999, Volume 264, pages 611-614.	1-8, 10-42
Y	SAO, H. et al. A New Marrow T Cell Depletion Method Using Anti-CD6 Monoclonal Antibody-Conjugated Magnetic Beads and Its Clinical Application for Prevention of Acute Graft-vs.- Host Disease in Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Results of a Phase I-II Trial. International Journal of Hematology. 1999, Volume 69, pages 27-35.	4-8, 10-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 31 January 2004 (31.01.2004)		Date of mailing of the international search report 15 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized official Deborah Crouch, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

PCT/US03/25199

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	POLEJAEVA, I.A. et al. Cloned Pigs Produced by Nuclear Transfer from Adult Somatic Cells. Nature. 07 September 2000, Volume 407, pp. 86-90, especially pages 87-89.	1, 2 and 17-42
Y	ONISHI, A. et al. Pig Cloning by Microinjection of Fetal Fibroblast Nuclei. Science. 18 August 2000, Volume 289, pages 1188-1190, see especially pages 1188 and 1189.	1, 2 and 17-42
Y	BETTHAUSER, J. et al. Production of Cloned Pigs From In Vitro Systems. Nature Biotechnology. October 2000, Volume 18, pages 1055-1059, see especially pages 1055-1058.	1, 2 and 17-42
Y	MCCREATH, K.J. et al. Production of Gene-Targeted Sheep by Nuclear Transfer from Somatic Cells. Nature. 29 July 2000, Volume 405, pages 1066-1069, see especially pages 1067 and 1068.	1, 2 and 17-42
X	WO 95/28412 A1 (BIOTRANSPLANT, INC.) 26 October 1995, see pages 3-14.	1, 2 and 17-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/25199

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

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.: 9
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(72)発明者 ホーレー, ロバート ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01778、ウェイランド、ディプリン ロード 46

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 GA27 HA14

4B063 QA01 QA08 QQ08 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS34

4B065 AA90X AB01 BA01 CA44