(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 082 T2** 2004.05.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 626 012 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 082.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/00926**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 905 784.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/016177**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.02.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **19.08.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.11.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.07.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/65**
C12N 15/90, A01K 67/027, C12N 5/10

(30) Unionspriorität:
833992 **11.02.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Cell Genesys, Inc., Foster City, Calif., US; The President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:
SEIDMAN, G., Jonathan, Milton, US;
JAKOBOVITS, Aya, Menlo Park, US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **ERZIELEN VON HOMOZYGOTEM DURCH ZIELGERICHTETE GENETISCHE EREIGNISSE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebet

[0001] Das Gebiet dieser Erfindung betrifft das Targeting von Genen in lebensfähigen Zellen.

Hintergrund

[0002] Es gibt ständige Fortschritte im Vermögen, Zellen zu modifizieren. Einer der interessantesten Bereiche DER Behandlung genetischeR Erkrankungen ist die Gentherapie. In jenen Situationen, wo Zellen isoliert werden können, die relativ langlebig sind und in Kultur gezüchtet und vermehrt werden können, hat man die Möglichkeit, solche Zellen aus einem Wirt, entweder dem erkrankten Wirt oder einem allogenen Wirt; zu isolieren. Die Zellen können dann in Kultur gezüchtet, vermehrt und mittels homologer Rekombination modifiziert und die modifizierten Zellen dem Wirt wiederum eingesetzt werden.
[0003] In anderen Situationen wird die Herstellung von Produkten gewünscht, die für den Wirt exogen sind. In dieser Situation kann man embryonale Stammzellen modifizieren, diese einem Blastozyten zusetzen und dann einen chimären Wirt erzeugen. Dieser chimäre Wirt kann dann gepaart werden und die Nachkommenschaft entweder als heterozygote Mutanten verwendet oder weiter gepaart werden, um homozygote Mutanten zu erhalten. Indem in den Embryonalzellen für geeignete Veränderungen gesorgt wird, kann man verschiedene Humanproteine in Rindermilch und dergleichen produzieren.
[0004] Alternativ dazu könnte erwünscht sein, die Natur oder die Eigenschaften eines Produkts eines Wirts, wie z. B. Fleisch, Pflanzenöle, Größe und dergleichen, zu verändern. In vielen Fällen wird die homologe Rekombination mit beiden Genen erforderlich sein, da der Wirt für gewöhnlich diploid ist. Dies bedeutet, dass man eine große Anzahl von Schritten durchlaufen muss, und zwar zunächst das Modifizieren eines Gens, das Sicherstellen, dass die richtige Modifizierung aufgetreten ist, dann das Verwenden der modifizierten Zellen zur Wiederholung des Prozesses und Modifizieren des zweiten Gens. Sogar, wenn die Modifizierung ein Knock-out ist, nämlich die Einführung einer störenden Sequenz und/oder Deletion in den Target-Locus, kann der Prozess zeitaufwändig und kostenintensiv sein. Es besteht daher ein wesentliches Interesse in der Fähigkeit, Techniken zu entwickeln, die Verbesserungen der Effizienz bei der Erzielung genetischer Modifizierungen am Target-Locus ermöglichen.

Relevante Literatur

[0005] Verfahren zur Modifizierung von ES-Zellen und Detektion der modifizierten Zellen finden sich bei Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7036–7040 (1991). Paludan et al., Gene 45, 421–426 (1989), berichten über die erhöhte Resistenz von Zellen, die mehrfache neo-Gene umfassen. Die spontane Produktion homozygoter Zellen aus heterozygoten, kultivierten Zellen ist von Nelson et al., Mol. Cell. Biol. 9, 1284–1288 (1989); Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1634–1637 (1987); Rajan et al., J. Immunol. 145, 1598–1602 (1990), und Campbell et al., Mol. Cell. Biol. 1, 336–346 (1981), berichtet worden.
[0006] Zijlstra et al., Nature 342, 435–438 (1989), berichten von der Keimbahn-Transmission eines (β_2-Microglobulin-Gens, das durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen produziert wird. Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7036-7040 (1991), berichten über embryonale Stammzellen, denen eine funktionelle inhibitorische G-Protein-Untereinheit (α_2) fehlt, hervorgebracht mittels Gen-Targeting beider Allele. Paludan et al., Gene 85, 421–426 (1989), berichten, dass eine abgestufte Resistenz des G418-Proteins eine differentielle Selektion kultivierter Säugetierzellen bewirkt, die neo-Gen exprimieren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Homogenotisierung von Gen-Targeting-Ereignissen wird durch Einführen von DNA in Zellen erzielt, wo die DNA Homologie mit einem Target-Locus aufweist und ein Markergen enthält. Zellen, die homolog rekombinieren, werden selektiert und erhöhten Mengen des Selektionsmittels ausgesetzt. Es werden dann Zellen selektiert, die eine Gen-Umwandlung erfahren haben, wobei die Mutante nun bezüglich der Modifizierung homozygot ist. Das selektive Gen ist normalerweise eines, das Medikamentenresistenz verleiht und ist normalerweise nicht zur Amplifikation fähig.

Beschreibung spezieller Ausführungsformen

[0008] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Modifizierung eukaryotischer Zellen bereit, so dass sie an einem Target-Locus homozygot sind, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: Einführen eines Konstrukts in Wirtszellen, wobei das Konstrukt ein Markergen umfasst, das von Regionen flankiert wird,

die gegenüber dem Target-Locus homolog sind, um ein Gemisch von Zellen zu produzieren, die modifizierte Zellen umfassen, in denen das Konstrukt an einer einzigen Target-Stelle homolog rekombiniert wird, worin das Markergen ein nicht amplifizierbares Gen ist, das den modifizierten Zellen die Fähigkeit verleiht, sich in einem selektiven Medium bevorzugt zu vermehren; Selektieren der Zellen, die das Konstrukt umfassen, mit Hilfe des Markergens, indem die Zellen in selektivem Medium bei einer ersten Menge Selektionsmittel gezüchtet und lebensfähige Zellen auf homologe Rekombination analysiert werden, um eine im Wesentlichen reine Population modifizierter Zellen bereitzustellen, die homologe Rekombination an einem oder mehreren Taget-Loci erfahren haben; Aussetzen der Population modifizierter Zellen gegenüber einer Menge Selektionsmittel, die größer als die erste Menge ist, wobei ein Rekombinationsereignis stattfindet, um Zellen bereitzustellen, die bezüglich des Markergens am Taget-Locus homozygot sind; und das Isolieren der homozygoten Zellen.

[0009] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Modifizieren von Säugetierzellen, so dass sie am Target-Locus homozygot sind, bereit, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: Das Einführen eines Konstrukts in Säugetier-Wirtszellen, wobei das Konstrukt ein Markergen umfasst, das von Regionen mit Homologie zum Taget-Locus flankiert ist, um ein Gemisch von Zellen zu erzeugen, das modifizierte Zellen umfasst, in denen das Konstrukt mit einem einzigen Target-Locus homolog rekombiniert wird, worin das Markergen ein Antibiotika-Resistenzgen ist, das den modifizierten Zellen die Fähigkeit verleiht, sich in einem selektiven Medium bevorzugt zu vermehren; das Selektieren von Zellen, die das Konstrukt umfassen, mit Hilfe des Markergens, indem die Zellen in selektivem Medium mit einer ersten Menge an Antibiotikum gezüchtet und lebensfähige Zellen auf homologe Rekombination analysiert werden, um eine im Wesentlichen reine Population modifizierter Zellen bereitzustellen, die an einem oder mehreren Target-Loci homologe Rekombination erfahren haben; das Vermehren der reinen Population modifizierter Zellen; das Aussetzen der vermehrten Population modifizierter Zellen gegenüber einer Menge an Antibiotikum, die größer als die erste Menge ist, wodurch ein Rekombinationsereignis stattfindet, um Zellen bereitzustellen, die bezüglich des Markergens am Target-Locus homozygot sind; und das Isolieren der homozygoten Zellen.

[0010] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer kultivierten Säugetierzelle bereit, die eine homozygote Unterbrechung an einem Target-Locus enthält, der zwei Kopien desselben endogenen Gens umfasst, worin das Verfahren das Kultivieren einer Zelle umfasst, die entweder durch das Verfahren des ersten oder das des zweiten Aspekts der Erfindung erhalten wurde.

[0011] Mutierte Zellen, die an einem Target-Locus homozygot sind, werden durch Einführen von DNA in die Zellen produziert, wo die DNA Homologie zum Target-Locus aufweist und ein Markergen umfasst, das die Selektion von Zellen ermöglicht, die das integrierte Konstrukt umfassen. Die Zellen werden dann auf homologe Rekombinanten hin gescreent. Die homologen Integranten werden erhöhten Mengen des Selektionsmittels ausgesetzt, wobei auf Zellen selektiert wird, die mehrfache Kopien des Selektionsmittels nicht aufgrund von Amplifikation aufweisen. Die Zellen werden dann auf Homozygotie am Target-Locus hin analysiert.

[0012] Verschiedene Konstrukte können für die homologe Rekombination an einem Target-Locus hergestellt werden. Für gewöhnlich enthält das Konstrukt zumindest 50 bp und nicht mehr als 500 kbp einer Sequenz, die mit dem Target-Locus homolog ist. Das Markergen ist normalerweise an beiden Seiten von homologen Sequenzen flankiert.

[0013] Es können verschiedene Markergene eingesetzt werden, die die folgenden Eigenschaften aufweisen. Das Markergen ist insofern nicht amplifizierbar, als das man mit ansteigenden Konzentrationen des Selektionsmittels keine spontanen Ereignisse detektiert, bei denen das Gen eine Tandem-Replikation erfahren hat. Das Selektionsmittel sollte nicht extrem toxisch sein, so dass geringfügige Variationen der Konzentration keine signifikante Wirkung auf die Lebensfähigkeit von Zellen haben sollten. Folglich kann man für leichte Abstufungen der Veränderung der Konzentration des Selektionsmittels sorgen, damit spezifisch Zellen selektiert werden, die eine erhöhte Resistenz gegen das Selektionsmittel aufweisen. Abstufungen werden im Allgemeinen dermaßen sein, dass beim Ausplattieren der heterozygoten Mutante bei höheren Konzentrationen des Selektionsmittels eine Koloniebildungseffizienz von ungefähr 1 von 10–10^5 auftritt.

[0014] Die Transkriptionsinitiationsregion für das Markergen kann jede zweckdienliche Region, entweder induzierbar oder konstitutiv, sein. Durch Bereitstellen einer induzierbaren Transkriptionsinitiationsregion kann das Markergen still sein, wenn die Zellen in einen Wirt eingeführt werden, wo das induzierbare Mittel nicht vorhanden ist, oder das Gen beim Einführen in einen Wirt oder bei der Reifung oder Differenzierung der Zellen eingeschaltet werden. Induktion kann aufgrund von Temperatur, spezifischen Verbindungen usw. erfolgen. Es ist eine breite Vielfalt von Promotoren in der Literatur beschrieben worden, die konstitutiv oder induzierbar sind, wo die Induktion die Folge von Temperatur, Induktionsmitteln, eines beliebigen Zelltyps oder eines speziellen Reifestadiums sein kann. Weiters ist eine Reihe von viralen Promotoren bekannt, die ebenfalls Verwendung finden können. Promotoren von Interesse umfassen den β-Actin-Promotor, frühe und späte SV40-Promotoren, Phosphoglycerat-Kinase-Promotor („PGK"), Immunglobulin-Gen-Promotor, Thymidin-Kinase-Promotor, Human-Cytomegalovirus-Promotor und der Friend-Milz-Focusbildungs-Virus-Promotor. Die Promotoren können mit Enhancern assoziiert sein oder auch nicht, wobei die Enhancer mit dem jeweiligen Promotor natürlicherweise assoziiert oder mit einem anderen Promotor assoziiert sind.

[0015] Es wird eine Terminationsregion vorhanden sein, wobei die Terminationsregion mit dem Markergen natürlicherweise assoziiert oder von einem anderen Gen hergeleitet sein kann. Meistens sind die Terminationsregionen nicht entscheidend, und es kann eine breite Vielfalt von Terminationsregionen eingesetzt werden, ohne die Expression oder den Nutzen des Markergens nachteilig zu beeinflussen.

[0016] DNA-Konstrukte werden zur Integration in den Target-Locus hergestellt. Das Konstrukt umfasst das Markergen mit seinen geeigneten Transkriptions- und Translationsinitiations- und Terminationsregulationssequenzen, flankiert von mit dem Target-Locus homologen Regionen. Die Integration des gegenständlichen Markergens am Target-Locus kann die funktionelle Expression auf vielfältige Weise stören, vorzugsweise durch Insertion in die kodierende Region oder in ein Exon des Target-Locus, kann jedoch auch durch Insertion in ein Intron stören, wo das Konstrukt eine dem Markergen benachbarte Spleiß-Akzeptorstelle aufweist, so dass der Target-Locus trunkiert und die Expression eines funktionsfähigen Proteins verhindert wird. Wenn man es wünscht, kann man, anstelle des Bereitstellens einer unabhängigen Transkriptionsinitiationsregion als Teil des Konstrukts, für die Integration in den Target-Locus an einer Stelle sorgen, die das Markergen unter der Transkriptionskontrolle der Transkriptionsinitiationsregion des Target-Gens einführt, z. B. in ein Intron, wo das Konstrukt am 5'-Terminus des Markergens eine Spleiß-Akzeptorstelle aufweist, oder in ein Exon, das die Fusion der Leseraster der Taget- und Markergene bewirkt. Der bedeutsame Faktor ist, dass die Integration des Markergens am Target-Locus die Inaktivierung des Target-Gens bewirkt.

[0017] Die Regionen, die mit dem Target-Locus homolog sind, weisen für gewöhnlich ein Länge von zumindest ungefähr 50 bp, häufiger zumindest ungefähr 150 bp auf, können bis zu ungefähr 500 kbp lang sein, und werden für gewöhnlich nicht länger als ungefähr 20 kbp, vorzugsweise nicht länger als ungefähr 10 kbp sein. Für gewöhnlich wird Homologie von zumindest ungefähr 20, häufiger zumindest ungefähr 50 bp 5' und 3' des Markergens bestehen. Verschiedene Betrachtungen werden im Ausmaß der Homologie einbezogen, wie z. B. die Größe des Target-Locus, Verfügbarkeit von Sequenzen, relative Effizienz von Doppel-Crossing-over-Ereignissen am Target-Locus Ähnlichkeit der Target-Sequenz mit anderen Sequenzen und dergleichen.

[0018] Die Regionen) mit Homologie kann/können Mutationen umfassen, wo die Mutationen das Target-Gen weiter inaktivieren, indem eine Rasterverschiebung bereitgestellt oder eine Schlüssel-Aminosäure bereitgestellt wird, oder die Mutation kann ein funktionsgestörtes Allel korrigieren usw. Für gewöhnlich wird die Mutation eine subtile Veränderung sein, die ungefähr 5% der homologen flankierenden Sequenzen nicht überschreitet und für gewöhnlich weniger als 50 bp beträgt. Wenn die Mutation eines Gens gewünscht wird, kann das Markergen in ein Intron insertiert werden, so dass es bei Transkription aus dem Target-Gen herausgeschnitten wird.

[0019] Das Konstrukt wird gemäß bekannten Verfahren hergestellt, wobei verschiedene Fragmente zusammen gebracht, in geeignete Vektoren eingeführt, kloniert, analysiert und dann weiter manipuliert werden, bis das gewünschte Konstrukt hergestellt worden ist. Verschiedene Modifizierungen können an der Sequenz vorgenommen werden, um Restriktionsanalyse, Herausschneiden, Identifizierung von Sonden und dergleichen zu ermöglichen. Es können wie gewünscht stumme Mutationen eingeführt werden. In verschiedenen Stadien können Restriktionsanalyse, Sequenzierung, Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion, Primer-Reparatur, In-vitro-Mutagenese oder dergleichen eingesetzt werden.

[0020] Das Konstrukt wird für gewöhnlich unter Verwendung eines bakteriellen Vektors, einschließlich eines prokaryotischen Replikationssystems hergestellt, der z. B. eines Ursprungs ist; der von E. coli erkannt wird, wobei das Konstrukt in jedem Stadium kloniert und analysiert werden kann. Ein Marker, derselbe wie der für die Insertion zu verwendende oder ein anderer, kann eingesetzt werden, wobei der prokaryotische Marker für gewöhnlich von der Einführung in die Target-Zelle entfernt wird. Sobald das den Vektor enthaltende Konstrukt vervollständigt worden ist, kann er durch Deletion der bakteriellen Sequenzen, Linearisierung, Einführen einer kurzen Deletion in der homologen Sequenz, die im Allgemeinen ungefähr 500 bp nicht überschreiten, im allgemeinen unter ungefähr 20% der homologen Sequenz, für gewöhnlich in Bereich von ungefähr 50–300 bp liegt, weiter manipuliert werden. Nach der schlussendlichen Manipulation ist das Konstrukt einsatzbereit, um in die Zelle eingeführt zu werden.

[0021] Eine breite Vielfalt eukaryotischer Target-Zellen kann eingesetzt werden, normalerweise sind es Zellen aus Wirbeltieren, insbesondere Säugetieren, erwünschterweise Haustieren oder Primaten. Die Zellen, die der Transformation unterzogen werden, können beliebige Säugetierzellen von Interessen sein, die in der Zelltherapie, Forschung, Wechselwirkung mit anderen Zellen in vitro oder dergleichen Verwendung finden können. Zellen von besonderem Interesse umfassen unter anderen Zelllinien Stammzellen, z. B. hämatopoetische Stammzellen, nicht-humane embryonale Stammzellen usw. die Langerhans'schen Inseln, Nebennierenmarkszellen, die Dopamin sekretieren können, Osteoblasten, Osteoklasten, Epithelzellen, Leukozyten, z. B. B- und T-Lymphozyten, Myelomonozytenzellen usw., Neuronen, Glialzellen, Ganglienzellen, Retinazellen, Leberzellen, z. B. Hepatozyten, Knochenmarkszellen, Keratinozyten, Haarfollikelzellen und Myoblast- (Muskel-) Zellen.

[0022] Für nicht-humane Stammzellen kann eine nicht-humane Embryonalstammzelllinie eingesetzt werden oder es können nicht-humane Embryonalstammzellen frisch aus einem nicht-humanen Wirt erlangt werden. Die Zellen können auf einer geeigneten fötalen Fibroblastenschicht gezüchtet oder in Gegenwart von Leukä-

mie inhibierendem Faktor (LIF) gezüchtet und dann verwendet werden. Die nicht-humanen Embryonalstammzellen können in einen Blastozyten injiziert werden, um ein chimäres, nicht-humanes Tier bereitzustellen.

[0023] Stromauf und/oder stromab des Target-Gen-Konstrukts kann sich ein Gen befinden, das dafür sorgt, dass festgestellt werden kann, ob ein Doppel-Cross-over stattgefunden hat. Zu diesem Zweck kann das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase- (HSV-tk"-) Gen eingesetzt werden, da die Anwesenheit des Thymidinkinase-Gens durch Verwendung von Nucleosidanaloga wie z. B. Acyclovir oder Gancylovir wegen ihrer zytotoxischen Wirkungen auf Zellen, die ein funktionelles HSV-tk-Gen enthalten, detektiert werden kann. Die Resistenz gegen diese Nucleosidanaloga weist auf die Abwesenheit des Thymidin-Kinase-Gens hin und zeigt daher an, dass ein Doppel-Cross-over-Ereignis und folglich homologe Rekombination ebenfalls stattgefunden hat.

[0024] Zahlreiche Techniken können zur Einführung des Konstrukts in die Wirtszelle eingesetzt werden. Techniken, die verwendet werden können, umfassen Calciumphosphat/DNA-Copräzipitate, Mikroinjektion von DNA in die Zelle, Elektroporation, Lipofektion, Bakterienprotoplastenfusion mit intakten Zellen, Transfektion oder dergleichen. Die DNA kann einzelsträngige, lineare oder zirkuläre, entspannte oder supergeknäulte DNA sein. Zu verschiedenen Techniken zum Transformieren von Säugetierzellen siehe Keown et al., Meth. in Immun. 185, 527–537 (1990). Die Zellen können dann in geeignet gewähltem Medium gezüchtet werden, um Zellen zu identifizieren, welche die geeignete Integration bereitstellen. Jene Zellen, die den gewünschten Phänotyp aufweisen, können dann mittels Restriktionsanalyse, Elektrophorese, Southern-Analyse, Polymerasekettenreaktion oder dergleichen weiter analysiert werden. Durch Identifizieren von Fragmenten, die die geeignete Insertion an der Target-Genstelle aufweisen, kann man Zellen identifizieren, in denen eine homologe Rekombination aufgetreten ist, um eine oder zwei Kopien des Target-Gens zu inaktivieren oder anderweitig zu modifizieren.

[0025] Die das integrierte Markergen enthaltenden heterozygoten Zellen können dass in einem geeigneten Kulturmedium über einen ausgedehnten Zeitraum, für gewöhnlich zumindest eine Woche und bis zu sechs Wochen und mehr vermehrt werden. Die Zellen können dann ausplattiert und Einzelkolonien bei verschiedenen Konzentrationen des Medikaments, gegen das das Markergen Resistenz verleiht, selektiert werden. Beispielsweise kann bei Neomycin-Resistenz in Abhängigkeit von der Natur der Zellen die G418-Konzentration von ungefähr 0,5–4 mg/ml, häufiger von ungefähr 0,5–2,5 mg/ml variieren. Die überlebenden Kolonien können dann gescreent werden, um nachzuweisen, dass das funktiσnelle endogene Gen abwesend ist oder in geeigneter Weise mutiert worden ist. Wie oben beschrieben können verschiedene Techniken verwendet werden, um auf das Vorhandensein von Homozygotie der Mutante zu analysieren. Die resultierende homozygote Zellen wird zwei Kopien desselben Gens an verschiedenen Chromosomen aufweisen und normalerweise das Markergen umfassen. Die Zelle wird andernfalls frei vom Konstrukt sein.

[0026] Die vorliegende Erfindung kann breite Anwendung finden, wo erwünscht ist, ein bestimmtes Gen zu inaktivieren oder eine Veränderung in ein Gen am Target-Locus einzuführen. Gene von Interesse umfassen eine Reihe von Oberflächenmembranprotein-Genen. Ein Gebiet von Interesse ist die Verminderung der Expression von Hauptkompatibilitätskomplexantigenen der Klasse I und/oder II oder der einzelnen Gruppen, wie z. B. A, B, C, DP, DQ und DR. Für das Knock-out der Klasse I kann man für die Integration in das (32-Microblobulin-Gen sorgen. Für Klasse II-Antigene kann der Knock-out der DR-Gene ausreichend sein. Folglich kann man die mit der Gegenwart fremder MHC-Antigene assoziierte Immunantwort vermindern, wenn solche Antigene in einen Wirt eingeführt werden. Alternativ dazu kann es erwünscht sein, die Expression des Wirtsgens zu inhibieren, wenn man ein exogenes Immunglobulin-Gen einführt, z. B. durch Knock-out des Wirts-Immunglobulin-Locus beim Einführen eines exogenen Locus. Andere Gene von Interesse umfassen jene, welche die MHC-Expression oder andere Komponenten der Antigen-Präsentationsmaschinerie der Zelle beeinträchtigen, was sich letztlich auf die Immunogenität auswirkt.

[0027] Mann kann ferner das vorliegende Verfahren anwenden, um verschiedene metabolische Prozesse zu untersuchen, um die Wirkung der Abwesenheit einer bestimmten genetischen Fähigkeit und dergleichen festzustellen. Auf diese Weise kann an in der Lage sein, die Rolle von bestimmten Onkogenen, die Wirkung von regulatorischen Proteinen, die Rollen von Enzymen, die Gegenwart alternativer Stoffwechselwege und dergleichen festzustellen.

[0028] Man kann das vorliegende Verfahren auch zur Einführung von Mutationen in funktionsgestörte Allele verwenden, so dass genetische Defekte geheilt werden, insbesondere wo subtile Veränderungen beteiligt sind, wie z. B. jene, die weniger als ungefähr 50 bp, häufiger weniger als ungefähr 10 bp umfassen. Folglich könnte man Stammzellen wie z. B. hämatopoetische Stammzellen modifizieren, um Erkrankungen wie z. B. Sichelzellenanämie, β-Thalassämie, Hämophilie usw. zu heilen, wobei für die Gentherapie auf Gene abgezielt wird, die Gene für β-Globin, Enzyme des Erythrozytenmetabolismus, das Komplementsystem, Gerinnungsfaktoren, Dystrophin, Enzyme des Kohlenhydrat-, Lipid-, Aminosäure-, Steroid- und Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsels, Transportproteine, z. B. Cystofibrose-Transmembranregulator und dergleichen umfassen.

[0029] Die modifizierten nicht-humanen Embryonalstammzellen können verwendet werden, um chimäre nicht-humane Säugetiere herzustellen, indem die homogenotisierten nicht-humanen Stammzellen in eine Blastozyte injiziert und dann nach herkömmlichen Techniken in einem nicht-humanen weiblichen Wirtssäuge-

tier (zur Schwangerschaft gebracht werden). Die heterozygote Nachkommenschaft kann dann mittels PCR, Southern-Blotting oder dergleichen auf Anwesenheit der Veränderung an der Stelle des Target-Locus gescreent werden. Nach Paarung mit dem Wirt der Wildform derselben Spezies kann die resultierende chimäre Nachkommenschaft gekreuzt werden, um homozygote Wirte zu erlangen. Die homozygoten Wirte können eine Reihe von Veränderungen aufweisen, wobei das Gen am Target-Locus funktionsunfähig gemacht werden kann, als funktionstüchtig beibehalten, jedoch verändert sein kann oder beibehalten und mit zusätzlicher genetischer Fähigkeit ausgestattet sein kann, wobei die zusätzliche Fähigkeit durch gleichzeitige Transkription mit dem Gen am Target-Locus coreguliert sein kann.

[0030] Der Säugetierwirt wird Target-Loci aufweisen, die Allele umfassen, die zumindest im Wesentlichen insofern identisch sein sollten, als dass das Markergen an derselben Position in beiden Allelen integriert ist. Zusätzlich sollten irgendwelche Veränderungen als Ergebnis der homologen Rekombination im ersten Schritt ebenfalls in beiden Allelen vorhanden sein. Auf diese Weise kann eine symmetrische „Doppel-knock-out"-Integration, die eine oder mehrere Veränderungen am Target-Locus umfassen. kann, oder dergleichen erzielt werden.

[0031] Die Homozygoten könne weiterer genetischer Modifikation unterzogen werden. Beispielsweise könnte erwünscht sein, eine zusätzliche genetische Fähigkeit in die homozygoten Wirte einzuführen, wobei die endogenen Allele funktionsuntüchtig gemacht worden sind, um diese durch eine andere genetische Fähigkeit zu substituieren, zu ersetzen oder den Wirt mit einer anderen genetischen Fähigkeit auszustatten. Beispielsweise könnte erwünscht sein, Human-Immunglobuline in einem kleinen Wirten, wie z. B. einer Maus oder einem Kaninchen, zu produzieren. Indem man zuerst die für die Leicht- und Schwerketten kodierenden endogenen Gene durch Knock-out inaktiviert, kann man dann Gene aus den Human-Loci einführen, wobei diese Gene für die Human-Leicht- und Schwerketten kodieren und zur Umordnung in Reaktion auf eine Immunisierung des Wirten fähig sind, um Human-Immunglobulinproteine zu produzieren. Beispielsweise kann man die J-Regionen durch Knock-out inaktivieren, was die Expression der Immunglobulin-Untereinheiten verhindert.

[0032] Es kann erwünscht sein, das Markergen nach der Homogenotisierung zu entfernen. Durch Einführen eines Konstrukts, das im Wesentlichen dieselbe homologe DNA, möglicherweise erweiterte Sequenzen umfasst, wobei der Markergen-Teil des ursprünglichen Konstrukts entfernt ist, könnte man möglicherweise eine homologe Rekombination mit dem Target-Locus zu erzielen. Durch Verwenden einer Kombination von Markergenen zur Integration, wobei eines davon eine positive Selektion und das andere eine negative Selektion bereitstellt, im Entfernungsschritt würde man gegen die Zellen selektieren, die die Markergene beibehalten. Zweckdienliche Markergene zur negativen Selektion umfassen das Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen, dessen Anwesenheit die Empfindlichkeit gegen Nucleosid-Analoga, wie z. B. Acyclovir und Gancyclovir bewirkt.

[0033] In Rinder- oder Schaf-Wirten könnte erwünscht sein, das Rinder- oder Schaf-Protein durch Human-Protein zu ersetzen. In Nutztieren könnte erwünscht sein, Veränderungen einzuführen, welche verbesserte Produkte liefern oder ein verbessertes Wachstum des Wirts bewirken. Wo Nutztiere aufgrund bestimmter Allen zu Erkrankungen neigen, könnte man die Allele verändern, um die Anfälligkeit für die Erkrankung zu vermindern.

[0034] Wirte von Interesse umfassen Primaten, die nicht Menschen sind, Schaf, Rind, Pferd, Hund, Katze, Lagomorpha, Maus usw.

[0035] Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung und schränken die Erfindung nicht ein.

Experimenteller Teil

Beispiel I

[0036] Vier gesonderte Gene, G-Protein-Untereinheiten α_{i2} und α_{i3}, T-Zellenrezeptor (TRC)-α, Herzmyosin-Schwerkette (MYHC-B) mittels positiver/negativer Selektion dem Targeting unterzogen (Mansour et al., Nature 336, 348–352 (1988)). In allen Fällen wurde ein Targeting-Konstrukt hergestellt, das das von der Promotorregion des Phosphoglycerat-Kinase- (PKG-) Gens angetriebene Neomycin-Resistenzgen (neo) enthielt. Die PGK-neo-Sequenz unterbrach eine Exon, was eine detektierbare Änderung des Restriktionsenzymverdaumusters des Gens erzeugte.

[0037] In allen Fällen wurde das PGK-TK-Phosphoglycerat-Kinase-Promotor-Thymidin-Kinase-Gen außerhalb der Homologieregionen insertiert. A) Die Produktion des α_{i2}-Target-Konstrukts ist früher von Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7036–7040 (1991), beschrieben worden. B) Der α_{i3}-Genklon wurde wie für das α_{i2}-Gen beschrieben isoliert. Ein Hind III-Sal I-Fragment wurde in Bluescript SK (+) (Stratagene) subkloniert. Das Konstrukt enthielt das PGK-neo-Gen, das Exon 1 an einer Ncol-Stelle am Translationsstart ATG unterbrach. C) Ein 5,6 kbp-Fragment des Maus-TCR-α-Gens, das alle 4 Konstantregion-Exons enthielt, wurde aus dem genomischen Klon λ*1.2 in Bluescript SK II (+) subkloniert (Ausubel et al., Curr. Proto. in Mol. Biol., John Wiley and Sons, New York, 1988). Das Fragment erstreckt sich von einer künstlichen EcoRI-Stelle 5' der

Xba I-Stelle zur Xhol-Stelle. Die EcoRI-Stelle zwischen den Exons 3 und 4 wurde durch Verdau mit EcoRI, Abstumpfen mit Klenow und anschließende Ligation deletiert. Das erste Konstantregion-Exon wurde an einer einzigartigen EcoRV-Stelle durch die Insertion von PGK-neo unterbrochen. D) Ein 7,5 kbp- (SalI-EcoRI-) Abschnitt des Myhc-B-Gens, das sich von ungefähr Exon 10 bis ungefähr Exon 24 erstreckt, wurde aus einer Balb/c-Genombibliothek (Clontech) kloniert, wobei die Identität durch Sequenzierung bestätigt wurde. Ein Targeting-Konstrukt wurde durch Unterbrechen des Gens an einer einzigartigen Nd I-Stelle in Exon 14 hergestellt.

[0038] ES-Zellen (Linie CCE, erhalten von E. Robertson, Columbia University oder CCI.2, erhalten von A. Bradley, Baylor University) wurden kultiviert, transfiziert und auf homologe Rekombination wie früher beschrieben gescreent (Mortensen, supra (1991)). Mehrere als heterozygot für homologe Rekombination identifizierte Zelllinien wurden für 14–28 Tage vermehrt. Die Zelllinien wurden dann ausplattiert, für 24 Stunden kultiviert und dann bei verschiedenen Konzentrationen G418 selektiert. DNA aus den überlebenden Klonen wurden mittels Southern-Blot auf Abwesenheit des endogenen Gens analysiert.

Tabelle 1. Verlust der Heterozygotie in ES-Zelllinien

Gen (Elternlinie	Zell-linie	Anzahl ausplat-tierter Zellen*	[G418] (mg/ml) 1.0-1.5 Anzahl Kolonien	1.0-1.5 % Homozygoten (analysierte Anzahl)	2.0 Anzahl	2.0 % Homozygoten (analysierte Anzahl)
α_{i2} (CCE)	17E10	2×10^4	23	100% (2)	2	0% (2)
	18D3	2×10^4	175	12% (26)	40	ND#
α_{i3} (CC1.2)	32-32	1×10^5	100	53% (17)	17	88% (17)
	32-28	1×10^6	27	4% (28)	0	
TCR-α (CCE)	1A4	5×10^5	37	43% (23)	9	44% (9)
Myhc-b(CC1.2)	6-6	5×10^5			54	24% (54)
	6-22	5×10^5	76	7% (76)	2	50% (2)

*Effizienz der Ausplattierung 40-80%
ND - nicht ermittelt

[0039] Es wurde eine Southern-Blot-Analyse von DNA aus den in hohen G418-Konzentrationen isolierten Klonen durchgeführt. DNA wurde an 1%igen Agarosegelen fraktioniert, auf Genescreen übertragen und wie früher beschrieben hybridisiert (Ausubel, supra (1988)). In allen Fällen wurde eine Bande für das homologe Rekombinationsprodukt beobachtet, und zwar für α_{i2} eine 13,6 kb-Bande, für α_{i3} eine 6,5-Bande, für TCR-α eine 2,0-Bande und für Myhc-B eine 7,1-Bande. Die β-Herzmyosin-Sonde kreuzreagierte mit dem Myhc-A-(α-Herzmyosin-Schwerketten-) Gen, was in 2 Banden resultierte, die in jeder Spur zugegen waren.

[0040] Um die Häufigkeit von homozygoten Mutanten-ES-Zellen ermitteln, die hohe G418-Konzentrationen überlebten, wurden 4 einzelne heterozygote Subklone durch Ausplattieren Trypsin-dispergierter 17E10-Zellen bei hoher Verdünnung isoliert. Jeder dieser Subklone und die ursprünglichen 17E10-Klone wurde zu 5×10^5 Zellen/100 mm-Platte ausplattiert, bei hohen G418-Konzentrationen selektiert und die überlebenden Klone wie in Tabelle 1 analysiert. Die Ausplattierungseffizienz ohne G418 war 42%.

Tabelle 2. Häufigkeit homozygoter Mutanten-ES-Zellen, die hohe G418-Konzentrationen überlebten

	[G418] (mg/ml)				
	1.0		2.0		
Subklon von 17E10	Anzahl an Kolonien	% Homozygoten (analysierte Anzahl)	Anzahl an Kolonien	% Homozygoten (analysierte Anzahl)	Scheinbare Anzahl an Kolonien#
1	143	75% (20)	28	94% (18)	114.4
2	152	92% (24)	52	95% (19)	139.3
3	44	22% (9)	0		9.8
4	40	95% (21)	5	100% (4)	38.1
Mittelwert +/-S.D.					75.4† ±61.4

*Berechnet aus (Anteil an Homozygoten bei 1 mg/ml)x(Gesamtanzahl an Kolonien)

† Eine geschätzte Mutationsrate pro Zellgeneration von 1,3 x 10^{-5} wurde aus der Anzahl an Generationen seit Wiederklonierung (unter der Annahme einer Generationszeit von 14,2 Stunden) und dem Anteil an Homozygoten [(Anteil an Homozygoten)/((Anzahl ausplattierter Zellen)xAusplattierungseffizienz)] gemäß der Gleichung Rate = (Anteil an Homozygoten)/(Anzahl an Generationen seit Klonierung) berechnet. Die Zellen wurden für 16 Tage (27 Generationen) nach Ausplattieren bei hoher Verdünnung kultiviert. Massenkulturen aus dem ursprünglichen Klon wurden parallel dazu selektiert und lieferten 241, 261, 228 und 262 Kolonien je 100 mm-Platte, die >90% Homozygoten enthielten (18 analysiert).

Beispiel II

Inaktivierung der Maus-Ig-Schwerketten-J-Gene in ES-Zellen

Konstruktion des Inaktivierungsvektors

[0041] Ein 6,1 kb-EcoRI-Fragment, das die Maus-Immunglobulin-Schwerketten-J-Region-Gene und flankierende Sequenzen enthielt und aus einer Balb/c-Mausembryo-Genombibliothek kloniert und in pUC18 (pJH) insertiert war, wurde mit XhoI und NaeI verdaut, um ein Fragment von ungefähr 2,3 kbp, das die vier J-Gene enthielt (siehe Karte 2A), zu deletieren. Ein XhoI-BamHI-Fragment von ungefähr 1,1 kbp, das an der BamHI-Stelle abgestumpft war und ein vom Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen- (HSV-tk-) Promotor angetriebenes Neomycin-Resistenzgen und den Polyoma-Enhancer enthielt, wurde aus pMV1 Neo isoliert (Thomas und Capecchi, Cell 51, 503–512 (1987)). Dieses Fragment wurde in das XhoI-NaeI-deletierte pJH insertiert, um den Inaktivierungsvektor (pmHδJ, siehe Karte 2B) zu bilden, in dem die Transkriptionsorientierung des Neomycin- und der Schwerketten-Gene dieselbe ist. Dieses Plasmid wurde durch NdeI-Verdau von der Transfektion in die ES-Zellen linearisiert. Die Sequenzen, die das homologe Rekombinationsereignis antreiben, sind Fragmente von ungefähr 2,8 kbp und ungefähr 1,1 kbp. die 5' bzw. 3' zum Neomycingen lokalisiert sind.

Kultivierung, Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

[0042] Die ES-Zelllinie E14TG2a (Koller und Smithies, PNAS USA 86, 8932–8935 (1989)) wurde an Mitomycin C-behandelten embryonalen Fibroblasten-Feederschichten wie beschrieben (Koller und Smithies, PNAS USA 86, 8932–8935 (1989)) kultiviert. ES-Zellen wurde trypsinisiert, in HEPES-Puffer (pH 7,05; 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,7 mM Na_2HPO_4, 21 mM HEPES, pH 7,1) in einer Konzentration von 2×10^7/ml resuspendiert und in Gegenwart von 50 µg/ml des linearisierten Inaktivierungsvektors elektroporiert. Die Elektroporation wurde mit einem BioRad Gene Pulser bei 240 Volt und 500 µF Kapazität durchgeführt. 5×10^6 elektroporierte Zellen wurden auf Mitomycin-C-behandelte Fibroblasten in 100 mm-Schalen in Gegenwart von Dulbecco's modified Eagle's-Medium (DMEM) ausplattiert, das mit 15% Fötalrinderserum und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol ergänzt war. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Elektroporation durch 200 µg/ml G418 enthaltendes Medium ersetzt. G418-resistente ES-Kolonien, die sich 12–14 Stunden nach der Elektroporation bildeten, wurden mit ausgezogenen Kapillarpipetten zur Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) entnommen. Die Hälfte jeder entnommenen Kolonie wurde in einen einzelnen Napf einer 24-Napf-Platte übertragen, die bereits mit Mitomycin C-behandelten Feederzellen beimpft waren. Die anderen Hälften wurden zu je vier Pools vereinigt und in Eppendorf-Röhrchen übertragen, die 0,3 ml PBS enthielten, und es wurden Zelllysate wie von Joyner et al. (Nature 338, 153–155 (1989)) beschrieben zur PCR-Analyse hergestellt. Die PCR-Reaktion umfasste 5-20 µl des Zelllysats, 1 µM jedes Primers, 1,5 U Taq-Polymerase und 100 µM dNTPs. Die PCR-Amplifikation setzte 45 Zyklen unter Verwendung eines Thermocyclers (Perkin-Elmer Cetus) mit 1 Minuten Aufschmelzen bei 94°C, 2 Minuten Annelieren bei 55°C und 3 Minuten Extension bei 72°C ein. Die beiden Priming-Oligonucleotide sind ACGGTATCGCCGCTCCCGAT (seq. 1) und AGTCACTGTAAAGACTTCGGGTA (Seq.-ID Nr. 2), die ungefähr 120 Basen 5' der BamHI-Stelle des Neomyingens bzw. den im Maus-Schwerketten-Gen lokalisierten Sequenzen ungefähr 160 Basen 3' der Insertionsstelle entsprechen. Die erfolgreiche homologe Rekombination liefert ein Fragment von ungefähr 1,4 kbp. 20 µl des Reaktionsgemisches wird an 1%igen Agarosegelen der Elektrophorese unterzogen, mit Ethidiumbromid gefärbt und auf Nylonmembranen (Gene Screen) übertragen. Die Filter wurden mit einem ^{32}P-markierten EcoRI-PstI-Fragment von ungefähr 1,4 kbp sondiert, das in der Maus-Schwerkette 3' der Insertionsstelle befindet (siehe Karte 2). Für die weitere Analyse wurde genomische DNA aus ES-Zellen hergestellt, mit Restriktionsenzymen wie von den Herstellern empfohlen verdaut und die Fragmente an 1%igen Agarosegelen getrennt. DNA wurde auf Nylonmembranen (Gene Screen) übertragen und mit dem ^{32}P-markierten Fragment wie oben beschrieben sondiert.

Analyse G418-resistenter ES-Kolonien

[0043] Im ersten Experiment detektierte die PCR-Analyse der gepoolten Kolonien ein positives PCR-Signal der erwarteten Größe (ungefähr 1,4 kbp) aus 34 Pools, die 136 G418-resistente Kolonien repräsentieren. Die vier einzelnen Kolonien, die zu diesem positiven Pool beisteuerten, wurden einzeln mittels PCR analysiert und es wurde ein positiver Klon, ES33D5, identifiziert. Eine ähnliche Analyse von 540 G418-resistenten Kolonien, die im zweiten Experiment erhalten wurden, lieferte 4 zusätzlich positive Klone (ES41-1), ES61-1, ES65-1, ES110-1).

[0044] Um die Targeting-Zerstörung einer der Kopien der J-Gene zu verifizieren (das Gen ist autosomal und folglich in zwei Kopien vorhanden), wurden die PCR-positiven Klone vermehrt und genomische DNA hergestellt, mit HindIII oder mit Sacl verdaut und mittels Southern-Analyse wie beschrieben unter Verwendung der EcoRI-PstI-Sonde analysiert.

[0045] Der Ersatz der J-Gene durch Insertion des Neomycingens durch ein homologes Rekombinationsereignis lieferte ein mit der EcoRI-PstI-Sonde detektierbares HindIII-Fragment, das ungefähr 1,9 kbp länger war als das äquivalente Fragment im nativen Locus, und zwar aufgrund des Verlusts von zwei in der deletierten J-Genregion befindlichen Hind-III-Stellen (siehe Karte 2C). Die Southern-Analyse von jedem der 5 positiven Klone mittels HindIII-Verdau ergab ein Muster, das darauf hinwies, dass eine der beiden Kopien der Schwerketten-J-Gene zerstört worden ist. Drei markierte Fragmente wurden detektiert: ein Fragment (ungefähr 760 bp), dessen Größe mit jenem in unbehandelten Zellen vorhandenen bei gleicher Intensität identisch war, ein Fragment (ungefähr 2,3 kbp), dessen Größe mit jenem in unbehandelten Zellen identisch war, jedoch im PCR-positiven Klon eine verminderte Intensität aufwies, und ein zusätzliches Fragment von ungefähr 4,2 kbp, der vorhergesagten Größe für ein homologes Rekombinationsereignis, das nur in den PCR-positiven Klonen vorhanden war. In ähnlicher Weise bewirkt der Ersatz der J-Gene durch das Neomycingen durch ein homologes Rekombinationsereignis den Verlust einer Sacl-Stelle und das Auftreten eines mit der EcoRI-PstI-Sonde detektierbaren Fragments, das ungefähr um 570 bp kleiner als das äquivalente Fragment im nativen Locus ist (siehe Karte 2C). Die Southern-Analyse der Klone mittels Sacl-Verdau ergab das erwartete Muster von einem nativen und einem Target-Allel: Fragment von ungefähr 4,0 kbp, dessen Größe mit dem in unbehandelten Zellen detektierten identisch war, jedoch in den 5 positiven Klonen eine verminderte Intensität aufwies, und ein zusätzliches Fragment von ungefähr 3,4 kbp, der vorhergesagten Größe für ein gezieltes homologes Rekombinati-

onsereignis, das nur in den identifizierten Klonen vorhanden war. Die nochmalige Hybridisierung der Southern-Blots mit einer Sonde für das Neomycingen zeigt, dass nur die 4,2 kbp- und 3,4 kbp-Fragmente, die aus dem HindIII- bzw. dem SacI-Verdau resultieren, an die Sonde hybridisierten, wie durch das Targeting-Ereignis hervorgesagt wurde.

Inaktivierung von Maus-Immunglobulin-Schwerketten-J-Genen in Mäusen

Injektion von Target-ES-Zellen in Maus-Blastozyten und Erzeugung chimärer Nachkommen

[0046] Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) erworben. Dreieinhalb Tage alte C57B/6-Balstozyten wurden aus 4–5 Wochen alten überovulierenden Weibchen wie von Koller et al., supra (1989), beschrieben erhalten. ES-Zellen wurden trypsinisiert, einmal mit frischem DMEM-Medium gewaschen und auf ungefähr 1×10^6/ml in M2-Medium verdünnt. Ungefähr 5 µl Zellen wurden einem 150 µl-Tropfen M2-Medium, das die Blastozyten enthielt, unter Paraffinöl zugesetzt. Zehn bis fünfzehn Zellen wurden in das Blastozöl jeder Blastozyte injiziert. Sechs bis neun ES-Zellen enthaltende Blastozyten wurden wieder in das Uterushorn von C57BL/6 × DBA F1-scheinträchtigen Weibchen eingebracht, die 2,5 Tage vorher mit vasektomierten Männchen gepaart worden waren. Von den injizierten Blastozyten hergeleitete Jungtiere wurden im Allgemeinen 14–18 Tage später geboren. Der Beitrag der ES-Zellen zur Nachkommenschaft wurde visuell durch Untersuchung der Fellfarbe der Jungtiere beurteilt. Die Blastozyten wurden aus C57BL/6-Mäusen erhalten, die eine kräftige schwarze Farbe aufweisen. Die ES-Zelllinie, die elterliche Linie, aus der die Target-Zelllinien hergeleitet waren, wurde aus 129/01a-Mäusen isoliert. Dieser Mausstamm ist cremefarben, der kombinierten Wirkung von drei Farbgenen, dem dominanten A^w-Allel am Agouti-Locus, dem rezessiven rosaäugig-abgeschwächten Allel am p-Locus und dem rezessiven C^{ch}-Allel am C-Locus. Nachkommen, in denen die ES-Zellen sich an der Bildung des Tiers beteiligten, hatten ein Fell, dass braune und cremefarbene Haare enthielt. Die ES-Zelllinie ES41-1, die die inaktivierte Maus-Immunglobulin-Schwerkette trug, wurde in C57BL/6-Maus-Blastozyten wie oben beschrieben injiziert. Sechs der 18 überlebenden Jungtiere wiesen einen hohen Grad von Fellfarbenchimärismus auf (70–90%). Die PCR-Analyse von aus chimären neugeborenen Jungtieren isolierter DNA aus einem Weibchen, das mit inaktivierten ES-Zellen injizierten Blastozyten implantiert war, wies darauf hin, dass der mutierte Immunglobulin-Schwerketten-Locus in einer Reihe von Organen, wie z. B. Milz, Thymus, Niere, Leber, Gehirn und Haut vorhanden war.

Homogenotisierung inaktivierter Ig-Schwerketten-J-Gene in ES-Zellen

[0047] Die Schwerketten-J-Gen-Target-ES-110-1-Zelllinie wurde an Feederzellen in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro 100 mm-Platte in Gegenwart von 1.400 µg/ml G418 ausplattiert. Sieben der überlebenden Klone wurden vermehrt und die genomische DNA wurde mittels Southern-Analyse auf Abwesenheit des endogenen Ig-Schwerketten-J-Gens analysiert. Die Southern-Analyse durch Sac I-Verdau zeigte an, dass einer der Klone, ES DK-207, den nativen Ig-Schwerketten-Locus verloren hatte. Hybridisierung desselben Blots mit einer Xho I-Nae I-Sonde, die die gesamte J-Genregion umspannt, detektierte keinerlei Fragmente im ES DK207-Genom, was darüber hinaus den Verlust des nativen Ig-Schwerketten-Allels anzeigt.

Erzeugung chimärer Mäuse, die homogenotisierte Schwerketten-Target-B-Zellen tragen

[0048] ES DK207-Zellen wurde in Maus-Blastozyten injiziert und chimäre Mäuse wurden wie oben beschrieben erzeugt. Darauf hin wurden chimäre Mäuse erhalten, wovon sieben 40–70% Fellfarbenchimärismus aufwiesen, was die ES-Zellen-Beteiligung in diesen Mäusen anzeigt.

[0049] Die Mäuse wurden verwendet, um die Wirkung der Deletion der J-Gene aus beiden Schwerketten-Allelen auf die Fähigkeit der B-Zellen zu ermitteln, sich zu differenzieren und Antikörper zu exprimieren. Die Analyse von aus einem dieser Chimären, DK334-1, hergeleiteten Peripherblutlymphozyten zeigte an, dass sich ungefähr 10% der Lymphozyten vom Mausstamm herleiten, aus dem die ES-Zellen stammten, nämlich dem 129-Sv\O1a-Stamm. Dies wurde mit Ly9a-Antikörpern ermittelt, die an Zellen aus Stamm 129, nicht jedoch an Zellen aus Stamm C57B/6 binden. Die Abwesenheit reifer B-Zellen, die aus Stamm 129 stammten, wurde den Nachweis mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung etabliert, dass den Lymphozyten aus Stamm 129 die Oberflächenantigene $CD45R^{bright}$ und IgM^a fehlten. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass wegen der Deletion der J-Region in beiden Allelen der Ig-Schwerkette die Entwicklung der B-Zellen in von ES DK207 hergeleiteten Lymphozyten gehemmt ist.

[0050] Es ist aufgrund der obigen Ergebnisse erwiesen, dass die gegenständliche Verfahrensweise einen wirksamen Weg bereitstellt, Homozygotie in zwei oder mehreren Allelen in einem Wirt zu erzeugen, wo es erwünscht ist, die Eigenschaft eines oder mehrerer Allele zu verändern. Auf diese Weise kann die beiden in einem diploiden Wirten vorhandenen Allele durch Knock-out inaktivieren, damit dieselbe Sequenz vorliegt, wäh-

rend nach wie vor eine ausreichende Häufigkeit erhalten wird, um die Isolierung der gewünschten Homozygoten zu ermöglichen. Das gegenständliche Verfahren kann in einer Vielzahl von Anwendungen verwendet werden, und zwar in transgenen Tieren, bei der Modifizierung der in einer Wirtszellen vorhandenen Oberflächenproteine, um die Immunogenität zu vermindern oder zu verstärken, und dergleichen.

[0051] Obgleich die vorangehende Erfindung illustrativ und anhand von Beispielen zum Zwecke der Klarheit und Verständlichkeit recht ausführlich beschrieben worden ist, ist für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung angesichts der Lehren dieser Erfindung offensichtlich, dass daran gewisse Änderungen und Modifizierungen vorgenommen werden können, ohne vom beabsichtigten Schutzumfang der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Cell Genesys Inc.

The President and Fellows of Harvard College

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Homogenisierung von Gen-Targeting-Ereignissen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: Bertram I. Rowland

(B) STRASSE: 4 Embarcadero Center, Suite 3400

(C) STADT: San Francisco

(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 94111

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn, Veröff.-Nr. 1.0, Versions-Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) EINREICHDATUM: 02. Februar 1993

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) INFORMATIONEN BEZÜGLICH ANWALT/VERTRETER

(A) NAME: Rowland, Bertram I.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 20.015

(C) ZULASSUNGSNUMMER: FP-55841/BIR

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

(A) TELEFON: (415) 781-1989

(B) TELEFAX: (415) 398-3249

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 1:

ACGGTATCGC CGCTCCCGAT 20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 2:

AGTCACTGTA AAGACTTCGG GTA 23

Patentansprüche

1. Verfahren zum Modifizieren von eukaryotischen Zellen, so dass sie an einem Ziellocus homozygot sind, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
das Einführen eines Konstrukts in Wirtszellen, wobei das Konstrukt ein Markergen umfasst, das von Regionen mit Homologie zum Ziellocus flankiert ist, um ein Zellgemisch zu erzeugen, das modifizierte Zellen umfasst, in denen das Konstrukt homolog mit einem einzigen Ziellocus rekombiniert ist, worin das Markergen ein nicht amplifizierbares Gen ist, das den modifizieren Zellen die Fähigkeit verleiht, sich in einem selektiven Medium bevorzugt zu vermehren;
das Selektieren von Zellen, die das Konstrukt umfassen, anhand des Markergens, indem die Zellen in selektivem Medium mit einer ersten Menge an Selektionsmittel gezüchtet werden und lebensfähige Zellen auf homologe Rekombination analysiert werden, um eine im Wesentlichen reine Population modifizierter Zellen bereitzustellen, die an einem oder mehreren Zielloci homologe Rekombination erfahren haben;
das Aussetzen der Population modifizierter Zellen gegenüber einer Menge an Selektionsmittel, die größer als die erste Menge ist, wodurch ein Rekombinationsereignis stattfindet, um Zellen bereitzustellen, die bezüglich des Markergens am Ziellocus homozygot sind; und
das Isolieren der homozygoten Zellen.

2. Verfahren zum Modifizieren von Säugetierzellen, so dass sie an einem Ziellocus homozygot sind, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
das Einführen eines Konstrukts in Säugetier-Wirtszellen, wobei das Konstrukt ein Markergen umfasst, das von Regionen mit Homologie zum Ziellocus flankiert ist, um ein Zellgemisch zu erzeugen, das modifizierte Zellen umfasst, in denen das Konstrukt homolog mit einem einzigen Ziellocus rekombiniert ist, worin das Markergen ein Antibiotikaresistenzgen ist, das den modifizierten Zellen die Fähigkeit verleiht, sich in einem selektiven Medium bevorzugt zu vermehren;
das Selektieren von Zellen, die das Konstrukt umfassen, anhand des Markergens, indem die Zellen in selektivem Medium mit einer ersten Menge an Antibiotikum gezüchtet werden und lebensfähige Zellen bezüglich homologer Rekombination analysiert werden, um eine im Wesentlichen reine Population modifizierter Zellen bereitzustellen, die an einem oder mehreren Zielloci homologe Rekombination erfahren haben;
das Expandieren der reinen Population modifizierter Zellen;
das Aussetzen der expandierten Population modifizierter Zellen gegenüber einer Menge an Antibiotikum, die größer als die erste Menge ist, wodurch ein Rekombinationsereignis stattfindet, um Zellen bereitzustellen, die bezüglich des Markergens am Ziellocus homozygot sind; und
das Isolieren der homozygoten Zellen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Markergen ein Antibiotikaresistenzgen ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, worin das Antibiotikaresistenzgen ein Neomycinresistenzgen ist.

5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Markergen von zumindest 50 bp mit Sequenzhomologie zum Ziellocus flankiert ist.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die homologe Sequenz ausgehend von der Ziellocussequenz mutiert ist.

7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ziellocus ein Oberflächenmembranproteinlocus ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die Zellen nichtmenschliche ES-Zellen sind und wobei das Verfahren weiters das Injizieren einer der Zellen in eine nichtmenschliche Blastozyste umfasst, die in einem nichtmenschlichen weiblichen Wirt ausgereift wird, um heterozygote Nachkommenschaft zu erhalten.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin die ES-Zelle eine Mäuse-ES-Zelle ist.

10. Verfahren zum Bereitstellen einer kultivierten Säugetierzelle, die eine homozygote Unterbrechung an einem Ziellocus enthält, der zwei Kopien desselben endogenen Gens umfasst, worin das Verfahren das Kultivieren einer Zelle umfasst, die nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erhalten wurde.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen