

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3797974号

(P3797974)

(45) 発行日 平成18年7月19日(2006.7.19)

(24) 登録日 平成18年4月28日(2006.4.28)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A O 1 K 67/027 (2006.01)
 C O 7 K 14/47 (2006.01)
 C O 7 K 16/04 (2006.01)
 C O 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A O 1 K 67/027
 C O 7 K 14/47
 C O 7 K 16/04
 C O 7 K 16/18

請求項の数 68 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-570676 (P2002-570676)
 (86) (22) 出願日 平成13年11月16日(2001.11.16)
 (65) 公表番号 特表2005-504507 (P2005-504507A)
 (43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/043128
 (87) 国際公開番号 W02002/070648
 (87) 国際公開日 平成14年9月12日(2002.9.12)
 審査請求日 平成16年1月28日(2004.1.28)
 (31) 優先権主張番号 09/714, 185
 (32) 優先日 平成12年11月17日(2000.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/256, 458
 (32) 優先日 平成12年12月20日(2000.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503178244
 ヘマテック、エルエルシー
 アメリカ合衆国 06881 コネチカッ
 ト州、ウエストポート、リバーサイド ア
 ヴェニュー 33
 (73) 特許権者 000253503
 麒麟麦酒株式会社
 東京都中央区新川二丁目10番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クローン化トランスジェニック有蹄動物における異種 (ヒト) 免疫グロブリンの発現

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

再配列を経て1つ以上のヒト免疫グロブリン(Ig)分子を発現するヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子の全体、またはその一部、をコードする1つ以上の核酸を含み、かつウシ、ヒツジおよびヤギからなる群より選択されることを特徴とするトランスジェニック有蹄動物

【請求項2】

前記核酸がヒトのものである、請求項1に記載の有蹄動物。

【請求項3】

ヒト抗体をコードする核酸を含む、請求項1に記載の有蹄動物。

【請求項4】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項3に記載の有蹄動物。

【請求項5】

前記Ig鎖または抗体が血清および/または乳汁中に発現される、請求項1に記載の有蹄動物。

【請求項6】

前記核酸が染色体断片に含まれている、請求項1に記載の有蹄動物。

【請求項7】

前記染色体断片が人工染色体 HAC (FERM BP-7582) である、請求項6に記載の有蹄動物。

10

20

【請求項 8】

前記染色体断片が人工染色体 HAC (FERM BP-7581) である、請求項 6 に記載の有蹄動物。

【請求項 9】

前記核酸が有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される、請求項 6 に記載の有蹄動物。

【請求項 10】

前記核酸が当該有蹄動物の染色体に組み込まれている、請求項 1 に記載の有蹄動物。

【請求項 11】

前記核酸が、V 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1 つ以上のヌクレオチドにより、J 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離している未再配列抗体軽鎖核酸セグメントを含む、請求項 3 に記載の有蹄動物。 10

【請求項 12】

前記核酸が、(i) V 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1 つ以上のヌクレオチドにより、D 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離しているか、かつ/または、(ii) D 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1 つ以上のヌクレオチドにより、J 遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離している、未再配列抗体重鎖核酸セグメントを含む、請求項 3 に記載の有蹄動物。

【請求項 13】

ウシである、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の有蹄動物。 20

【請求項 14】

内因性 Ig 遺伝子の発現を低減する突然変異を該内因性 Ig 遺伝子上に含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の有蹄動物。

【請求項 15】

内因性抗体の発現を低減する突然変異を該内因性抗体をコードする遺伝子上に含む、請求項 14 に記載の有蹄動物。

【請求項 16】

前記突然変異が機能性 IgM 重鎖の発現を低減する、請求項 14 に記載の有蹄動物。

【請求項 17】

前記突然変異が機能性 IgM 重鎖の発現を喪失させる、請求項 16 に記載の有蹄動物。 30

【請求項 18】

前記突然変異が機能性 Ig 軽鎖の発現を低減する、請求項 14 に記載の有蹄動物。

【請求項 19】

前記突然変異が機能性 Ig 軽鎖の発現を喪失させる、請求項 18 に記載の有蹄動物。

【請求項 20】

前記突然変異が機能性 IgM 重鎖および機能性 Ig 軽鎖の発現を低減する、請求項 14 に記載の有蹄動物。

【請求項 21】

前記突然変異が機能性 IgM 重鎖および機能性 Ig 軽鎖の発現を喪失させる、請求項 20 に記載の有蹄動物。 40

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の有蹄動物に由来する細胞であって、再配列を経て 1 つ以上のヒト Ig 分子を発現することが可能なヒト Ig 遺伝子の全体、またはその一部、をコードする 1 つ以上の核酸を含む、前記細胞。

【請求項 23】

前記核酸がヒト抗体をコードする、請求項 22 に記載の細胞。

【請求項 24】

前記核酸が染色体断片に含まれている、請求項 22 に記載の細胞。

【請求項 25】

前記染色体断片が人工染色体 HAC (FERM BP-7582) または HAC (FERM BP-7581) である、請求項 2 4 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

前記核酸が有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される、請求項 2 4 に記載の細胞。

【請求項 2 7】

前記核酸が当該細胞の染色体に組み込まれている、請求項 2 2 に記載の細胞。

【請求項 2 8】

前記核酸がヒトのものである、請求項 2 2 に記載の細胞。

【請求項 2 9】

当該細胞が胎仔繊維芽細胞である、請求項 2 2 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

10

【請求項 3 0】

当該細胞が B 細胞である、請求項 2 2 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 1】

当該細胞が B 細胞であって、再配列されたヒト Ig 分子を発現するものである、請求項 2 2 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 2】

前記有蹄動物がウシである、請求項 2 2 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 3】

内因性 Ig 重鎖および/もしくは軽鎖の発現を低減する突然変異を該内因性 Ig 重鎖および/もしくは軽鎖をコードする核酸上に含む、請求項 2 2 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

20

【請求項 3 4】

前記突然変異がナンセンス変異または欠失変異である、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 に記載の細胞と骨髓腫細胞との融合により形成されたハイブリドーマ。

【請求項 3 6】

(a) 1 つ以上の目的の抗原を、ヒト抗体遺伝子座をコードする核酸を有する請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の有蹄動物に投与するステップであって、該遺伝子座中の核酸セグメントが再配列を経て該抗原に特異的な抗体の産生をもたらす、ステップ; および
(b) 該有蹄動物から該抗体を回収するステップ
を含む、抗体の製造方法。

30

【請求項 3 7】

前記核酸がヒトのものである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗体の軽鎖がヒト核酸によりコードされている、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗体の重鎖がヒト核酸によりコードされている、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記有蹄動物がウシである、請求項 3 6 に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

前記抗体がモノクローナルである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記抗体がポリクローナルである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記抗体を前記有蹄動物の血清または乳汁から回収する、請求項 3 6 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

ヒト抗体遺伝子座をコードする核酸を有する請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の有蹄動物から、ヒト抗体を回収することを含み、該遺伝子座中の核酸セグメントが再配列を

50

経てヒト抗体の産生をもたらす、抗体の製造方法。

【請求項 4 5】

前記核酸がヒトのものである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記抗体の軽鎖がヒト核酸によりコードされている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記抗体の重鎖がヒト核酸によりコードされている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記有蹄動物がウシである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記抗体がモノクローナルである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記抗体がポリクローナルである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記抗体を前記有蹄動物の血清または乳汁から回収する、請求項 4 4 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

(a) 有蹄動物由来の細胞、該細胞由来のクロマチン塊、または該細胞由来の核を、卵母細胞に挿入するステップであって、該細胞が、再配列を経て 1 つ以上のヒト Ig 分子を発現するヒト Ig 遺伝子の全体、またはその一部、をコードする 1 つ以上の核酸を含み、かつ内因性抗体重鎖および/もしくは軽鎖の発現を低減する第 1 の突然変異を該内因性抗体重鎖および/もしくは軽鎖核酸上に含む、前記ステップ；ならびに

(b) 該卵母細胞または該卵母細胞から形成された胚を、該卵母細胞または該胚から胎仔を発生させる条件下で宿主有蹄動物の子宮に移入するステップを含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック有蹄動物の作製方法。

【請求項 5 3】

(a) 1 つ以上のヒト核酸を有する有蹄動物由来の細胞、該細胞由来のクロマチン塊、または該細胞由来の核を卵母細胞に挿入するステップであって、該ヒト核酸はヒト Ig 遺伝子の全体または一部をコードし、該遺伝子は B 細胞中で再配列を経て 1 つ以上のヒト Ig 分子を発現することができる、ステップ；および

(b) 該卵母細胞または該卵母細胞から形成される胚を、該卵母細胞または該胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に導入するステップを含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック有蹄動物の作製方法。

【請求項 5 4】

前記胎仔が生存能力のある仔に発育する、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

選択可能マーカーをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ前記内因性抗体重鎖または軽鎖核酸と少なくとも 98% の配列同一性を有する 1 つ以上の核酸に作用可能に連結されたプロモーターを有するカセットを含む核酸を該細胞に挿入することにより、該カセットが該抗体重鎖または軽鎖核酸の一方の内因性対立遺伝子に組み込まれる方法により、前記細胞を調製する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

(a) 第 1 の選択可能マーカーをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ前記抗体重鎖または軽鎖核酸と少なくとも 98% の配列同一性を有する第 1 の核酸に作用可能に連結された第 1 のプロモーターを有する第 1 のカセットを含む核酸を該細胞に挿入することにより、該第 1 のカセットが該抗体重鎖または軽鎖核酸の第 1 の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第 1 のトランスジェニック細胞を生成するステップ；および

(b) 該第 1 の選択可能マーカーとは異なる第 2 の選択可能マーカーをコードする核酸に

10

20

30

40

50

作用可能に連結され、かつ該抗体重鎖または軽鎖核酸と少なくとも98%の配列同一性を有する第2の核酸に作用可能に連結された第2のプロモーターを有する第2のカセットを含む核酸を該第1のトランスジェニック細胞に挿入することにより、該第2のカセットが該抗体重鎖または軽鎖核酸の第2の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第2のトランスジェニック細胞を生成するステップ

を含む方法により、前記細胞を製造する、請求項52に記載の方法。

【請求項57】

さらに、

(c)前記胚、前記胎仔、または該胎仔から生成した仔から、細胞を単離するステップ；

(d)該細胞中の内因性抗体重鎖および/または軽鎖核酸に第2の突然変異を導入するステップ；

(e)該細胞、該細胞由来のクロマチン塊、または該細胞由来の核を、卵母細胞に挿入するステップ；ならびに

(f)該卵母細胞または該卵母細胞から形成された胚を、該卵母細胞または該胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に移入するステップ

を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項58】

前記核酸がヒト抗体をコードする、請求項52または53に記載の方法。

【請求項59】

前記核酸が染色体断片に含まれている、請求項52または53に記載の方法。

【請求項60】

前記染色体断片が人工染色体 HAC (FERM BP-7582) または HAC (FERM BP-7581) である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記核酸が有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される、請求項59に記載の方法。

【請求項62】

前記核酸が前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項52または53に記載の方法。

【請求項63】

前記有蹄動物がウシである、請求項52または53に記載の方法。

【請求項64】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項58に記載の方法。

【請求項65】

前記免疫グロブリン鎖または抗体が血清および/または乳汁中に発現される、請求項52または53に記載の方法。

【請求項66】

請求項1～21のいずれか1項に記載の有蹄動物を所望の抗原で免疫して、抗血清を採取することを含む、ポリクローナルヒト免疫グロブリン(Ig)を含む有蹄動物抗血清を製造する方法。

【請求項67】

請求項1～21のいずれか1項に記載の有蹄動物を所望の抗原で免疫して、乳汁を採取することを含む、ポリクローナルヒトIgを含む有蹄動物乳汁を製造する方法。

【請求項68】

前記有蹄動物がウシである、請求項66または67に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、再配列を経て多種多様な抗体分子を発現する異種抗体遺伝子座の一部または全体を含む、遺伝子改変された有蹄動物(ungulate)である。特に、異種抗体遺伝子はヒトに由来するものであり得る。さらに、本発明は、内因性抗体遺伝子の発現が低減してい

10

20

30

40

50

るかまたは喪失した有蹄動物を提供する。有蹄動物（例えばウシ）における遺伝子改変は、核移植と分子技術の組合せを用いて行う。これらのクローン化トランスジェニック有蹄動物により、例えば治療薬として、診断薬として、および精製目的用の用途を有する、異種ポリクローナル抗体（特にヒト抗体）の補充可能かつ理論的に無限の供給が得られる。

【背景技術】

【0002】

1890年、北里柴三郎およびEmil Behringは、驚くべき実験結果を報告した。すなわち、彼らは、免疫動物から血清を得て、それを非免疫動物に注射することにより、免疫を一方の動物から他方の動物に移すことができることを実証した。この画期的な実験は、受動免疫法を臨床的治療法に取り入れる基盤を築いた。今日、受動免疫法のためにヒト免疫グロブリン（Ig）を調製および使用することは、標準的な医学的療法である。米国だけでも、ヒトIgに対して年間14億ドルの市場があり、毎年16トンを超えるヒト抗体が静注抗体療法のために使用されている。これに匹敵するレベルの消費が、産業先進国の経済に存在し、発展途上国において需要が急速に成長すると予想され得る。現在、受動免疫のためのヒト抗体はヒトドナーのプールした血清から得ている。これは、治療的および予防的用途のために利用可能なヒト抗体の量に先天的に限界があることを意味する。既に需要は供給を上回っており、深刻な量不足が慢性化している。

10

【0003】

ヒトIgの供給不足に伴ういくつかの問題を克服するために、様々な技術が開発されてきた。例えば、組織培養で組換え法によりヒトIgを生成することは常套手段である。特に、CHO発現系中でヒトIgを組換え発現することは周知であり、治療のために現在使用されているいくつかのヒト免疫グロブリン（Ig）およびキメラ抗体を生成するために目下利用されている。

20

【0004】

未再配列ヒト免疫グロブリン遺伝子を保持するマウスが、ヒト抗体（例えば、モノクローナル抗体）の生成のために開発されている（例えば、W098/24893；W096/33735；W097/13852；W098/24884；W097/07671（EP 0843961）；米国特許第5,877,397号；米国特許第5,874,299号；米国特許第5,814,318号；米国特許第5,789,650号；米国特許第5,770,429号；米国特許第5,661,016号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,625,126号；米国特許第5,569,825号；および米国特許第5,545,806号を参照のこと）。

30

【0005】

さらに、W000/10383（EP 1106061）は、ヒト染色体断片を改変し、マイクロセル融合を介して該断片をある種の細胞に導入することを記載している。

【0006】

さらにW001/35735は、ウシIgM重鎖ノックアウトを記載している。

【0007】

1998年12月15日にMeadeらに発行された米国特許第5,849,992号、および1998年10月27日にMeadeらに発行された米国特許第5,827,690号は、乳房上皮細胞中で抗体の発現をもたらすプロモーターの制御下でヒトIg遺伝子を発現したトランスジェニック動物（マウス、ヒツジ、ブタ、ウシおよびヤギが挙げられる）の乳汁中にモノクローナル抗体が産生することを記載している。この結果、原則的に、このような動物（例えばウシ）の乳汁中に抗体が発現される。

40

【0008】

しかし、既に報告されたものにも関わらず、血流中で所望の種の抗体（特にヒトIg）、特にポリクローナル抗体を生成し、所望の抗原に対して特異的な多数の異なる抗体を生成する、改善された方法および向上したトランスジェニック動物（特にウシ）が非常に望ましい。特に、（ウシ等の）有蹄動物におけるヒトIgの生成は、（1）ウシは大量の抗体を生成できる、（2）ウシはヒトその他の病原体で免疫感作できる、および（3）ウシはヒト抗原に対するヒト抗体を作るのに使用できるため、特に有利である。大量のポリクローナル抗体が利用可能になれば、感染性疾患の治療および予防、免疫系のモジュレーション、

50

ヒト細胞（癌細胞等）の除去、ならびに特定のヒト分子のモジュレーションのために有利であろう。ヒトIgは既にマウスでは発現されているが、ヒトIgがウシその他の有蹄動物において断片的に（fractionally）再配列され発現されるか否かは予測できない。なぜなら、抗体遺伝子の構造、抗体産生メカニズムおよびB細胞機能が異なるからである。特に、マウスと異なり、ウシおよびヒツジは免疫生理学がヒトと異なる（Lucierら, J. Immunol. 161:5438, 1998; Parngら, J. Immunol. 157:5478, 1996; およびButler, Rev. Sci. Tech. 17:43, 2000）。例えば、ウシおよびヒツジにおける抗体遺伝子の多様化は、ヒトおよびマウスのように遺伝子再配列によるよりも、遺伝子変換（gene conversion）による。また、ヒトおよびマウスにおいてB細胞は当初骨髄中に局在するが、ウシおよびヒツジにおいてはB細胞は回腸パイエル板（ileal Peyer's patch）中に位置する。従って、本発明以前は、ウシ（または他の有蹄動物）B細胞系統においてヒト免疫グロブリン遺伝子座の免疫グロブリン再配列および多様化が生じるか否かを予測することは、不可能でなくとも、困難であった。また、ウシが、内因性Igの不在下でまたはヒト抗体による干渉があっても生存可能であるか（すなわち正常な免疫機能を発揮するか）否かを予測することも不可能であった。例えば、ヒトIgを発現しているウシB細胞が、ウシの回腸パイエル板に正確に移動するか否かは確実ではない。なぜならヒトにおいてはこのようなことは起きないからである。また、補体活性化、サイトカイン放出の誘導および抗原除去を仲介するヒトFc受容体機能が、ウシの系において正常であるか否かも明確ではない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

本発明の目的は、再配列して、ヒトまたは他種のIg遺伝子座を発現するトランスジェニック有蹄動物（例えば、トランスジェニックウシ）を作製することである。これは、ヒトIg遺伝子を含むヒト染色体断片を安定して導入することにより、内因性Igに加えてまたはその代わりにヒトまたは他の種のIgを生成するB細胞を有する、トランスジェニック有蹄動物（例えばウシ）を生成するように実施されることが好ましい。これはまた、異種免疫グロブリン鎖または異種抗体をコードする核酸を、有蹄動物の染色体に組み込むことによっても実施され得る。本発明のさらなる目的は、内因性Igの発現が低減しているかまたはノックアウトされたトランスジェニック有蹄動物（例えば、トランスジェニックウシ）を生成することである。例えば、ナンセンスまたは欠失突然変異を、内因性免疫グロブリン鎖または抗体をコードする核酸に導入してもよい。

30

【0010】

本発明のより具体的な目的は、軽鎖遺伝子座の定常領域エキソンおよび/または μ 定常領域エキソンがノックアウトされて、別の種（好ましくはヒト）の免疫グロブリンをコードする遺伝子座を含む人工染色体を安定して取り込んだ、トランスジェニック有蹄動物（例えば、トランスジェニックウシ）を作製することである。

【0011】

本発明のより具体的な目的は、軽鎖遺伝子座の内因性定常領域エキソンおよび/または重鎖遺伝子座の μ 定常領域エキソンがノックアウトされて、異種重鎖および軽鎖Ig遺伝子を含む人工染色体（好ましくはヒト重鎖および軽鎖Ig遺伝子座を含むヒト染色体）が安定して導入されて、別の種（好ましくはヒト）のIgを産生するが、自身の内因性Igは産生しないトランスジェニック有蹄動物を生じる核移植および相同組換え手順を用いて、クローン化有蹄動物（例えば、クローン化ウシ）を作製することである。

40

【0012】

本発明の別の目的は、内因性IgM重鎖遺伝子の一方または両方の対立遺伝子が突然変異した（例えば、相同組換えにより破壊された）、有蹄動物（例えば、ウシ）体細胞または胚性幹（ES）細胞（好ましくは繊維芽細胞またはB細胞、より好ましくはオス体細胞）を作製することである。本発明の関連する目的は、内因性IgM重鎖遺伝子座の一方または両方の対立遺伝子が突然変異した（例えば、相同組換えにより破壊された）、クローン化有蹄動物（例えば、ウシ）胎仔および子孫を作製することである。

50

【0013】

さらに本発明の別の目的は、IgM重鎖遺伝子の一方の対立遺伝子が突然変異した（例えば、相同組換えにより破壊された）、有蹄動物（例えば、ウシ）体細胞またはES細胞（好ましくは繊維芽細胞またはB細胞）、例えば、メスまたはオス体細胞を作製することである。

【0014】

本発明の関連する目的は、内因性重鎖IgM遺伝子の一方の対立遺伝子が突然変異した（例えば、相同組換えにより破壊された）、クローン化（有蹄動物、例えばウシ）胎仔または子孫を作製することである。

【0015】

本発明のさらに別の目的は、突然変異（例えば、内因性IgMの一方の対立遺伝子の破壊、またはIg軽鎖の一方の対立遺伝子の破壊）をそれぞれ含むオスおよびメス有蹄動物（例えば、ウシ）を交配させることにより、あるいは連続した相同組換えにより、オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ロックアウト（MおよびF Hemi H/L）胎仔および有蹄動物の仔（ungulate calves）を作製することである。

【0016】

本発明のさらに別の目的は、連続した相同組換えにより、または上記オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ロックアウト（MおよびF Hemi H/L）の交配により、IgM遺伝子の両方の重鎖対立遺伝子が破壊され、かつIg軽鎖の両方の対立遺伝子が破壊された、ホモ接合ロックアウト（Homo H/L）胎仔を作製することである。

【0017】

本発明の別の特定の目的は、非有蹄動物Igまたはそれらの重鎖および軽鎖の機能性発現のために必要な遺伝子を含む核酸（例えば、人工染色体）を挿入することである。これらのIgは、これらのIgまたはIg鎖をコードする核酸を、HomoまたはHemi H/L有蹄動物（例えば、ウシ）体細胞（好ましくは繊維芽細胞）に導入し、その核酸（例えば、ヒト人工染色体DNA）が生殖細胞系に伝達されたクローン化有蹄動物（例えば、クローン化ウシ）を作製することにより産生されるヒトIgであるのが好ましい。

【0018】

本発明のさらに別の目的は、Ig発現をもたらす遺伝子を含む人工染色体（好ましくはヒト人工染色体（HAC））を上記ホモ接合ロックアウト（Homo H/L）細胞に導入し、核移植により、免疫感作に应答して非有蹄動物Ig（好ましくはヒトIg）を発現し、親和性成熟を経る有蹄動物（例えば、ウシ）を作製することである。

【0019】

本明細書で使用する「人工染色体」とは、選択可能マーカーの追加、クローニング部位の追加、1つ以上のヌクレオチドの欠失、1つ以上のヌクレオチドの置換等の人工的な改変を有する哺乳動物染色体またはその断片を意味する。「ヒト人工染色体（HAC）」とは、1つ以上のヒト染色体から生成した人工染色体を意味する。人工染色体は、宿主細胞中で宿主細胞の内因性染色体とは独立に維持することができる。この場合、HACは内因性染色体と共に安定して複製し、かつ分離されている。あるいはまた、宿主細胞の内因性染色体に転座していてもよいし、または挿入されてもよい。2つ以上の人工染色体を、宿主細胞に同時または逐次的に導入することができる。例えば、ヒト第14染色体（Ig重鎖遺伝子を含む）、ヒト第2染色体（Ig鎖遺伝子を含む）およびヒト第22染色体（Ig鎖遺伝子を含む）から誘導される人工染色体を導入することができる。あるいはまた、異種Ig重鎖遺伝子およびIg軽鎖遺伝子の両方を含む人工染色体（HACまたはHAC等）を導入してもよい。重鎖遺伝子座と軽鎖遺伝子座は、異なる染色体腕上（セントロメアの異なる側）にあるのが好ましい。さらに別の好適な実施形態では、HACの全体の大きさは、約10、9、8または7メガ塩基以下である。

【0020】

本発明のさらに別の目的は、導入された核酸（例えば、人工染色体、好ましくはヒトIg重鎖および軽鎖遺伝子を含むヒト人工染色体（HAC））上に担持されたIg遺伝子を含みか

10

20

30

40

50

つ発現するトランスジェニック有蹄動物（例えば、トランスジェニックウシ）から誘導される、受動免疫法のためのヒトその他のIgの供給源を提供することである。本発明において、これらの核酸（例えば、HAC）としては、ヒト染色体の自然に配置されたセグメント（ヒト染色体断片）、または人工的に工学処理されたヒト染色体断片を含む（すなわち、ヒトゲノムに対して再配列された）人工染色体がある。

【0021】

本発明のさらに別の目的は、上記トランスジェニック有蹄動物（例えば、トランスジェニックウシ）由来のB細胞を用いてハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を製造することである。

【0022】

本発明のさらに別の目的は、ポリクローナルヒトIgを含む有蹄動物抗血清または乳汁を製造することである。このようなヒトIg（好ましくはヒトIgG）は、ヒトにおける疾患の治療または予防のために、静注用免疫グロブリン（IVIg）として使用できる。ポリクローナルヒトIgは、目的の抗原に対して反応性であることが好ましい。

【0023】

本発明のさらに別の目的は、1つ以上の内因性遺伝子に1つ以上の突然変異を有するトランスジェニック有蹄動物を作製することである。トランスジェニック有蹄動物は、細胞、細胞由来のクロマチン塊、または細胞由来の核を卵母細胞に挿入することにより作製する。細胞は内因性遺伝子中に、その細胞により自然には発現されない第1の突然変異を有する。卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、該卵母細胞または胚が胎仔に発達する条件下で、宿主有蹄動物の子宮に移入する。胎仔は生存可能な仔に発育するのが好ましい。他の好適な実施形態では、選択可能なマーカーをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ突然変異させる内因性遺伝子と実質的な配列同一性を有する1つ以上の核酸に作用可能に連結されたプロモーターを有するカセットを含む核酸を挿入することにより、該カセットが遺伝子の一方の内因性対立遺伝子に組み込まれることによって、第1の突然変異が細胞に導入される。他の好適な実施形態で突然変異が細胞に導入するには、第1の選択可能マーカーをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ突然変異される内因性遺伝子と実質的な配列同一性を有する第1の核酸に作用可能に連結された第1のプロモーターを有する第1のカセットを含む核酸を細胞に挿入することにより、遺伝子の第1の内因性対立遺伝子に第1のカセットが組み込まれて第1のトランスジェニック細胞が生成する。第2の選択可能マーカーをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ遺伝子と実質的な配列同一性を有する第2の核酸に作用可能に連結された第2のプロモーターを有する第2のカセットを含む核酸を、第1のトランスジェニック細胞に挿入する。この第2の選択可能マーカーは第1の選択可能マーカーとは異なっており、第2のカセットは遺伝子の第2の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第2のトランスジェニック細胞が生成する。さらに別の好適な実施形態では、胚、胎仔、または胎仔から生成した仔から細胞を単離し、該細胞の遺伝子に別の突然変異を導入する。次いで、得られた細胞、細胞由来のクロマチン塊、または細胞由来の核を用いて、第2ラウンドの核移植を実施して、2つ以上の突然変異を有するトランスジェニック有蹄動物を作製する。突然変異は、遺伝子の同じまたは異なる対立遺伝子に存在するか、または異なる遺伝子に存在する。好適な実施形態では、突然変異される細胞は、繊維芽細胞（例えば、胎仔繊維芽細胞）である。突然変異される内因性遺伝子は、繊維芽細胞中で活性でない内因性プロモーターに作用可能に連結されていることが好ましい。他の好適な実施形態では、突然変異される内因性遺伝子に作用可能に連結した内因性プロモーターは、GAPDH等の内因性ハウスキーピング遺伝子に作用可能に連結した内因性プロモーターと比べて活性が80、70、60、50、40、30、20、10%未満である。プロモーター活性は、遺伝子にコードされるmRNAまたはタンパク質のレベルを測定するアッセイ等の任意の標準的なアッセイを用いて測定され得る（例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, volume 2, p. 11.13.1-11.13.3, John Wiley and Sons, 1995を参照）。このトランスジェニック有蹄動物作製方法は、ドナー細胞（すなわち、核移植のために使用される遺伝子材料の供給源である細胞）中で発現されない遺伝子

10

20

30

40

50

を突然変異させられるという利点を有する。

【課題を解決するための手段】

【0024】

従って、本発明は、再配列を経て1つを上回る異種Ig分子を発現する異種免疫グロブリン(Ig)遺伝子の全体または一部をコードする1つ以上の核酸を有するトランスジェニック有蹄動物を特徴とする。好適な実施形態では、異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、実質的にヒトのものである。核酸は、ヒト抗体またはポリクローナル抗体等の異種抗体をコードするのが好ましい。様々な実施形態で、Ig鎖または抗体は、血清および/または乳汁中に発現される。他の実施形態では、核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれる。さらに別の実施形態では、核酸は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される。

10

【0025】

さらに別の実施形態では、核酸は、有蹄動物の染色体に組み込まれる。さらに別の実施形態では、核酸は、V遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1つ以上のヌクレオチドにより、J遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離している、未再配列抗体軽鎖核酸セグメントを含む。さらに別の実施形態では、核酸は、(i) V遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1つ以上のヌクレオチドにより、D遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離されている、および/または(ii) D遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1つ以上のヌクレオチドにより、J遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離されている、未再配列抗体重鎖核酸セグメントを含む。さらに別の好適な実施形態では、有蹄動物は、内因性Ig遺伝子、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子、プリオン遺伝子、および/またはJ鎖遺伝子の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有する。他の好適な実施形態では、有蹄動物は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

20

【0026】

別の態様では、本発明は、内因性抗体の発現を低減させる突然変異を有するトランスジェニック有蹄動物を特徴とする。突然変異は、機能性IgM重鎖の発現を低減するか、または機能性IgM重鎖の発現を実質的に喪失させるのが好ましい。他の好適な実施形態では、突然変異は、機能性Ig軽鎖の発現を低減するか、または機能性Ig軽鎖の発現を実質的に喪失させる。さらに別の好適な実施形態では、突然変異は、機能性IgM重鎖および機能性Ig軽鎖の発現を低減するか、または機能性IgM重鎖および機能性Ig軽鎖の発現を実質的に喪失させる。有蹄動物は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子にも突然変異を有するのが好ましい。他の好適な実施形態では、有蹄動物は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。別の好適な実施形態では、有蹄動物は、再配列を経て1つを上回る異種Ig分子を発現する異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする1つ以上の核酸を有する。異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、実質的にヒトのものであることが好ましい。他の好適な実施形態では、核酸は、別の属に由来する抗体(例えば、ヒト抗体)等の異種抗体またはポリクローナル抗体をコードする。様々な実施形態では、Ig鎖または抗体は血清中に発現される。他の実施形態では、核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。さらに他の実施形態では、核酸は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される。さらに他の実施形態では、核酸は、有蹄動物の染色体に組み込まれる。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

30

40

【0027】

本発明はまた、本発明の有蹄動物のいずれかから得られる細胞、または本発明のいずれかの有蹄動物の作製に有用な細胞を提供する。

【0028】

従って、別の態様では、本発明は、B細胞中で再配列を経て1つ以上の異種Ig分子を発現することが可能な異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする1つ以上の核酸を有する

50

有蹄動物細胞を特徴とする。異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、異種抗体をコードするのが好ましい。様々な実施形態で、核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。さらに他の実施形態では、核酸は、有蹄動物細胞で宿主染色体とは独立に維持される。さらに他の実施形態では、核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。別の実施形態では、核酸は実質的にヒトのものである。異種抗体は、ヒト抗体等の、別の属に由来する抗体であることが好ましい。細胞は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有することが好ましい。他の好適な実施形態では、細胞は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。有蹄動物細胞の例としては、胎仔繊維芽細胞およびB細胞が挙げられる。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

10

【0029】

別の態様では、本発明は、Ig重鎖および/または軽鎖をコードする核酸中に突然変異を有する有蹄動物細胞を特徴とする。好適な実施形態では、細胞は、IgM重鎖またはIg軽鎖の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有する。突然変異の例としては、ナンセンス変異および欠失変異が挙げられる。細胞は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有することが好ましい。他の好適な実施形態では、細胞は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。好適な実施形態では、細胞は、B細胞中で再配列を経て1つ以上の異種Ig分子を発現することが可能な異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする1つ以上の核酸も有する。異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、実質的にヒトのものである、および/または別の属に由来する抗体(例えば、ヒト抗体)等の異種抗体をコードすることが好ましい。様々な実施形態において、核酸は染色体断片に含まれ、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立して維持される。好適な染色体断片としては、HACおよびHACが挙げられる。さらに他の実施形態では、核酸は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される。さらに他の実施形態では、核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。有蹄動物細胞の例としては、胎仔繊維芽細胞およびB細胞が挙げられる。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

20

【0030】

別の態様では、本発明は、本発明の有蹄動物B細胞と骨髄細胞との融合により形成されるハイブリドーマを特徴とする。ハイブリドーマは、ヒト抗体等の異種抗体を分泌することが好ましい。

30

【0031】

本発明はまた、本発明の有蹄動物を用いた抗体の製造方法を提供する。このような方法のひとつでは、1つ以上の目的の抗原を、異種抗体遺伝子座をコードする1つ以上の核酸を有する有蹄動物に投与する。遺伝子座中の核酸セグメントは、再配列を経て、抗原に特異的な抗体を生成する。その抗体を有蹄動物から回収する。様々な実施形態で、異種抗体遺伝子座をコードする核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。染色体断片は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持されることが好ましい。他の実施形態では、核酸は、有蹄動物の染色体に組み込まれる。核酸は、実質的にヒトのものであることが好ましい。他の好適な実施形態では、抗体の軽鎖および/または抗体の重鎖がヒト核酸にコードされている。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。特定の抗原に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、様々な用途を有する。例えば、細菌またはウイルス等の病原体微生物の感染に対する予防または治療用組成物中の成分として使用し得る。様々な実施形態において、抗体は、有蹄動物の血清又は乳汁から回収する。好適な実施形態では、有蹄動物は、内因性抗体の発現を低減する突然変異、機能性IgM重鎖の発現を低減する突然変異、または機能性Ig軽鎖の発現を低減する突然変異を有する。有蹄動物は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有することが好ましい。他の好適な実施形態では、有蹄動物は、ヒトJ鎖等の外因性

40

50

J鎖をコードする核酸を有する。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

【0032】

関連する態様において、本発明は、別の抗体製造方法を特徴とする。本方法では、異種抗体遺伝子座をコードする核酸を有する有蹄動物から異種抗体を回収する。遺伝子座中の核酸セグメントは、再配列を経て異種抗体を生成する。様々な実施形態において、異種抗体遺伝子座をコードする核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。特定の実施形態では、核酸は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される。さらに他の実施形態では、核酸は、有蹄動物の染色体に組み込まれる。核酸は実質的にヒトのものであることが好ましい。特定の実施形態では、抗体の軽鎖および/または抗体の重鎖がヒト核酸にコードされている。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。特定の実施形態において、特異的な抗原で有蹄動物を免疫感作すること無く生成させたIgG抗体等のポリクローナル抗体は、ヒト血清から得られるIVIg(静注用免疫グロブリン)の治療代用品として使用される。様々な実施形態において、抗体は有蹄動物の血清または乳汁から回収する。有蹄動物は、内因性抗体の発現を低減する突然変異、機能性IgM重鎖の発現を低減する突然変異、または機能性Ig軽鎖の発現を低減する突然変異を有することが好ましい。有蹄動物は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有することが好ましい。他の好適な実施形態では、有蹄動物は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

10

20

【0033】

本発明はまた、トランスジェニック有蹄動物の作製方法も提供する。これらの方法は、所望の突然変異または所望の異種核酸を有するトランスジェニック有蹄動物を作製するのに使用し得る。

【0034】

このような態様の1つで、本発明は、細胞、細胞由来のクロマチン塊、または細胞由来の核を卵母細胞に挿入することを含むトランスジェニック有蹄動物の作製方法を特徴とする。この細胞は、内因性抗体重鎖および/または軽鎖核酸中に第1の突然変異を有する。卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に導入する。胎仔は生存可能な仔に発育するのが好ましい。トランスジェニック有蹄動物の作製に使用される細胞は、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖をコードする内因性核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有することが好ましい。他の好適な実施形態では、細胞は、ヒトJ鎖等の外因性J鎖をコードする核酸を有する。他の実施形態では、細胞は、B細胞中で再配列を経て1つ以上の異種Ig分子を発現することができる異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする1つ以上の核酸を有する。異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、異種抗体をコードするのが好ましい。さらに他の実施形態では、核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。異種抗体は、ヒト抗体等、別の属に由来する抗体であることが好ましい。特定の実施形態では、核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。他の特定の実施形態では、染色体断片は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立に維持される。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

30

40

【0035】

上記態様の様々な実施形態において、本方法は、胚、胎仔または胎仔より生成した子孫から細胞を単離すること、ならびに該細胞中の内因性抗体重鎖および/または軽鎖核酸に第2の突然変異を導入することを含む。細胞、細胞由来のクロマチン塊または細胞由来の核を卵母細胞に導入し、該卵母細胞または該卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に導入する。

【0036】

上記態様の他の実施形態では、選択可能マーカーをコードする核酸に作用可能に連結さ

50

れ、かつ抗体重鎖または軽鎖核酸と実質的な配列同一性を有する1つ以上の核酸に作用可能に連結されたプロモーターを含むカセットを有する核酸を細胞に挿入することを含む方法によって、トランスジェニック有蹄動物の作製のために使用される細胞を調製する。カセットは、抗体重鎖または軽鎖核酸の一方の内因性対立遺伝子に組み込まれる。

【0037】

他の実施形態では、第1の選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ抗体重鎖または軽鎖核酸と実質的な配列同一性を有する第1の核酸に作用可能に連結された第1のプロモーターを含む第1のカセットを有する核酸を前記細胞に挿入することにより細胞を調製する。この第1のカセットは抗体重鎖または軽鎖核酸の第1の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第1のトランスジェニック細胞を生成する。

10

【0038】

この第1のトランスジェニック細胞に、第2の選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ抗体重鎖または軽鎖核酸と実質的な配列同一性を有する第2の核酸に作用可能に連結された第2のプロモーターを含む第2のカセットを有する核酸を挿入する。この第2の選択可能マーカは第1の選択可能マーカと異なる。第2のカセットは抗体重鎖または軽鎖核酸の第2の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第2のトランスジェニック細胞を生成する。

【0039】

さらに別の態様では、本発明は、トランスジェニック有蹄動物の別の作製方法を特徴とする。本方法では、1つ以上の異種核酸を有する細胞を卵母細胞に挿入する。異種核酸は、異種Ig遺伝子の全体または一部をコードし、該遺伝子は、B細胞中で再配列を経て1つを上回る異種Ig分子を発現することが可能である。卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で、宿主有蹄動物の子宮に移入する。胎仔は、生存可能な仔に発育することが好ましい。異種Ig遺伝子の全体または一部をコードする核酸は、異種抗体をコードすることが好ましい。他の好適な実施形態では、抗体はポリクローナル抗体である。さらに他の好適な実施形態では、免疫グロブリン鎖または抗体は、血清および/または乳汁中に発現される。様々な実施形態において、核酸は、HACまたはHAC等の染色体断片に含まれている。核酸は、有蹄動物細胞中で宿主染色体とは独立して維持することができ、または細胞の染色体中に組み込まれ得る。核酸は、実質的にヒトのものであることが好ましい。他の実施形態では、異種抗体は、ヒト抗体等、別の属に由来する抗体である。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギであることが好ましい。

20

30

【0040】

さらに別の関連する態様では、本発明は、トランスジェニック有蹄動物の別の作製方法を特徴とする。本方法では、細胞、細胞由来のクロマチン塊または細胞由来の核を卵母細胞に導入する。この細胞は、この細胞により自然には発現されない内因性遺伝子中に第1の突然変異を有する。卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に導入する。胎仔は、生存可能な仔に発育することが好ましい。突然変異を有する遺伝子は、抗体、 κ -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンタンパク質またはJ鎖をコードするのが好ましい。別の好適な実施形態では、トランスジェニック有蹄動物の作製に使用する細胞が胎仔繊維芽細胞等の繊維芽細胞である。

40

【0041】

上記方法の様々な実施形態において、細胞を調製するには、選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ前記遺伝子と実質的な配列同一性を有する1つ以上の核酸に作用可能に連結されたプロモーターを含むカセットを有する核酸を細胞に挿入する。これにより、該カセットが遺伝子の一方の内因性対立遺伝子に組み込まれる。他の実施形態では、細胞を生成するのに、第1の選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ前記遺伝子と実質的な配列同一性を有する第1の核酸に作用可能に連結された第1のプロモーターを含む第1のカセットを有する核酸を細胞に挿入することによ

50

り、第1のカセットが遺伝子の第1の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第1のトランスジェニック細胞が生成する。この第1のトランスジェニック細胞に、第2の選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ前記遺伝子と実質的な配列同一性を有する第2の核酸に作用可能に連結された第2のプロモーターを含む第2のカセットを有する核酸を挿入する。この第2の選択可能マーカは、第1の選択可能マーカと異なる。第2のカセットが遺伝子の第2の内因性対立遺伝子に組み込まれて、第2のトランスジェニック細胞を生成する。

【0042】

上記態様の他の実施形態では、本方法は、第2の突然変異をトランスジェニック有蹄動物に導入することも含む。これらの実施形態では、胚、胎仔、または胎仔より生成した仔から細胞を単離し、該細胞中の内因性遺伝子に第2の突然変異を導入する。細胞、細胞由来のクロマチン塊、または細胞由来の核を卵母細胞に挿入し、この卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で、宿主有蹄動物の子宮に導入する。

10

【0043】

本発明の有蹄動物は、目的の抗体を含む抗血清または乳汁を製造するのに使用できる。このような態様の1つでは、本発明は、ポリクローナルヒト免疫グロブリンを有する有蹄動物抗血清を特徴とする。抗血清は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギに由来することが好ましい。別の好適な実施形態では、Igは、所望の抗体に対するものである。

【0044】

さらに別の態様では、本発明は、ポリクローナルヒトIgを有する有蹄動物乳汁を特徴とする。乳汁は、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヤギに由来することが好ましい。別の好適な実施形態では、Igは、所望の抗体に対するものである。

20

【0045】

本発明の様々な態様の好適な実施形態では、重鎖は μ 重鎖であり、軽鎖は κ または λ 軽鎖である。他の好適な実施形態では、異種免疫グロブリン鎖または抗体をコードする核酸は、未再配列形態である。異種免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック有蹄動物に目的の抗原を投与し、目的の抗原に応答する抗体を生成させることが好ましい。他の好適な実施形態では、1つを上回るクラスの異種抗体が、有蹄動物によって生成される。様々な実施形態では、1つを上回る異なる異種Igまたは抗体が、有蹄動物によって生成される。好ましい核移植法では、本発明の細胞、細胞由来のクロマチン塊、または細胞由来の核を除核または有核卵母細胞に挿入し、その卵母細胞または卵母細胞から形成される胚を、卵母細胞または胚から胎仔が発生する条件下で宿主有蹄動物の子宮に導入する。

30

【0046】

本発明の様々な態様の他の好適な実施形態では、有蹄動物は、内因性 β -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンおよび/またはJ鎖核酸の一方または両方の対立遺伝子に突然変異を有する。この突然変異は、内因性 β -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素、ガラクトシル(1,3)ガラクトースエピトープ、プリオンタンパク質および/またはJ鎖の発現を低減するかまたは喪失させるものが好ましい。さらに他の好適な実施形態では、有蹄動物は、ヒトJ鎖核酸等の異種J鎖核酸を含む。有蹄動物は、ヒトJ鎖を含むヒトIgAまたはIgM分子を産生することが好ましい。本発明の様々な実施形態では、内因性有蹄動物核酸を突然変異するのに使用する核酸(例えば、選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ突然変異させる遺伝子と実質的な配列同一性を有する核酸に作用可能に連結されたプロモーターを含むノックアウトカセット)は、ウイルスベクター(アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター等)に含まれていない。例えば、核酸は、細胞のウイルス感染を伴わないトランスフェクションまたはリポフェクション等の標準的な方法を用いて有蹄動物細胞に挿入するプラスミドまたは人工染色体に含ませ得る。さらに別の実施形態では、内因性有蹄動物核酸を突然変異させるのに使用する核酸(例えば、選択可能マーカをコードする核酸に作用可能に連結され、かつ突然変異させる遺伝子と実質的な配列同一性を有する核酸に作用可能に連結されたプロモ

40

50

ーターを含むノックアウトカセット)は、ウイルスベクター(アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター等)に含まれる。本実施形態によれば、ウイルスベクターを含むウイルスを用いて有蹄動物を感染させ、ウイルスベクターの一部または全体を有蹄動物細胞に挿入する。

【0047】

有蹄動物の例として、ウマ目(奇蹄類Perissodactyla)およびウシ目(偶蹄類Artiodactyla)のメンバー(ウシ(Bos)属のあらゆるメンバー等)が挙げられる。他の好適な有蹄動物としては、ヒツジ、オオツノヒツジ、ヤギ、野牛、カモシカ、雄牛、ウマ、ロバ、ラバ、シカ、ヘラジカ、水牛、ラクダ、ラマ、アルパカ、ブタおよびゾウが挙げられる。トランスジェニック有蹄動物は、任意の他の哺乳動物由来の抗体等、別の属に由来する免疫グロブリン鎖または抗体を発現することが好ましい。

10

【0048】

本明細書で使用する場合、「配列前または未再配列形態の核酸」とは、V(D)J組換えを経ていない核酸を意味する。好適な実施形態では、抗体軽鎖のV遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントが、1つ以上のヌクレオチドにより、J遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離されている。抗体重鎖のV遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントは、1つ以上のヌクレオチドにより、D遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離されていること、および/または抗体重鎖のD遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントは、1つ以上のヌクレオチドにより、J遺伝子セグメントをコードする全ての核酸セグメントから分離されていることが好ましい。未再配列形態の核酸は、実質的にヒトのものであることが好ましい。他の好適な実施形態では、核酸は、ヒト由来の天然型核酸の対応する領域と、少なくとも70、80、90、95または99%同一である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

上記したように、本発明は、場合によって内因性Ig発現がノックアウトされていてもよく、別の種(好ましくはヒト)の機能性抗体の産生のために必要な遺伝子を含む核酸(好ましくは人工染色体)が安定して導入されているトランスジェニック有蹄動物(好ましくはトランスジェニックウシ)の作製に関する。これにより、内因性抗体を産生しないが、代わりに別の種の抗体を産生するトランスジェニック動物を得ることができる。任意の非内因性抗体(ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ラットまたはモルモット抗体が挙げられるがこれらに限定されない)を製造することができる。ヤギにおけるヒトモノクローナル抗体の生成が既に報告されているが、これは、ウシ、血清(serum)、または内因性抗体を発現しないいずれかの有蹄動物においては達成されていない。さらに、生殖細胞系(未再配列)重鎖または軽鎖遺伝子の挿入、これらの遺伝子の再配列、および多様化した抗体の発現は、トランスジェニック有蹄動物では行われていない。このような有蹄動物が生存できるか否かは予想できない。なぜなら、ヒトIgが機能性に発現されるか、または十分な量で発現されて十分な免疫応答をもたらすか否かが不確かであるからである。また、ヒト染色体が、トランスジェニック有蹄動物において安定して維持されるか否かも不確かである。さらにまた、有蹄動物(例えば、ウシ)B細胞が、ヒトまたは他の非内因性Igを発現または正しく再配列できるか否かは不確かである。

30

40

【0050】

本手法の好適な実施形態では、異種免疫グロブリン産生は、本質的に、核移植、相同組換え技術、および異種Ig遺伝子座全体を担持する人工染色体の導入を組み合わせて使用することにより達成される。より具体的には、本方法では、IgM重鎖遺伝子の一方または両方の対立遺伝子、および場合によりIg軽鎖遺伝子の一方または両方の対立遺伝子のターゲット破壊をするのが好ましい。ただし、異種抗体産生は野生型動物(すなわち、Igノックアウトをもたない動物)によっても実施することができる。遺伝子ノックアウトは、相同組換えを連続して行い、その後の別の交配手順によって起こすことができる。好適な実施形態では、まず、適切な相同組換えベクターを用いて、組織培養で、オスまたはメ

50

ス有蹄動物（例えば、ウシ）胎仔繊維芽細胞のIgM重鎖遺伝子の一方の対立遺伝子のターゲッティング破壊を起こす。胎仔繊維芽細胞を使用することは、一部の他の体細胞よりも好ましい。なぜなら、これらの細胞は、組織培養で増殖および遺伝子操作し易いからである。しかし、胎仔繊維芽細胞の使用は、本発明において必須ではなく、実際に他の細胞系に置き換えても同等の結果が得られうる。

【0051】

当然のことながら、本方法では、ターゲッティングIgM重鎖対立遺伝子と相同な領域を有するDNA構築物を構築して、この構築物が有蹄動物ゲノム中のIgM重鎖対立遺伝子へ組み込まれた際にその発現を破壊するようにする。このようなIgM対立遺伝子のターゲッティング破壊を行うためのベクターの一例は、以下の実施例に記載する。これに関して、ターゲッティング部位において相同組換えをもたらすベクターの構築方法は、当業者に周知である。さらに、この場合、適切なベクターの構築は、特に、他の有蹄動物（以下参照）由来の免疫グロブリン遺伝子の配列と同様に、ウシIgM重鎖およびIg軽鎖遺伝子の配列が既知であるということ を考慮すると、当該分野の技術レベル内にある。相同組換えを容易にするために、IgM遺伝子の相同組換えおよび不活性化を生じるのに使用するベクターはそれぞれ、有蹄動物IgM重鎖およびIg軽鎖遺伝子と実質的な配列同一性を示すDNAの部分を含む。これらの配列は、相同組換えおよびターゲッティング欠失または不活性化を容易にするために、ターゲッティング遺伝子座と、好ましくは少なくとも98%の配列同一性、より好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有し、さらに好ましくは同遺伝子型である。

【0052】

通常、構築物は、IgM重鎖遺伝子および/またはIg軽鎖遺伝子が有効に破壊された所望の相同組換え体（例えば、繊維芽細胞）の選択に役立つマーカー遺伝子を含むことが好ましい。マーカー遺伝子の例としては、数ある中で、抗生物質耐性マーカー、薬剤耐性マーカーおよびグリーン蛍光タンパク質が挙げられる。好適な構築物を図2Aに示し、この構築物を作製するのに使用する出発材料を図3Aおよび図3Bに示す。プロモーターに作用可能に連結された正の選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）を挟む、内因性免疫グロブリン遺伝子と相同な2つの領域を含む他の構築物は、標準的な分子生物学的技術を用いて作製することができ、本発明の方法において使用できる。

【0053】

図2Aおよび図3Cに示す μ ノックアウト構築物は、「C- μ エキソン1~4」と称されるウシ免疫グロブリン重鎖定常領域をコードするエキソン、および「TMエキソン」と称される膜貫通ドメインをコードする2つのエキソンを除去するように設計された。

【0054】

このベクターを構築するために、「1」と称した領域、すなわち、ゲノム μ 重鎖ウシ配列由来のXbaI-XhoI断片を、酵素XbaIおよびXhoIで予め切断した市販のDNAベクターpBluescript (Stratagene, LaJolla, California) にサブクローニングした。この断片をクローン化した後では、約3.5 KbのNotI断片を挿入するのに用いるNotI制限酵素認識配列がXbaI部位に隣接していた。この断片は、以下にさらに記載するネオマイシン耐性マーカを含む。所望であれば、他の μ ノックアウト構築物を、別の有蹄動物品種、種または属由来のゲノム μ 重鎖配列（例えば、Genbank受託番号U63637として寄託された、スイス牛/ホルスタイン交雑に由来する μ 重鎖配列）を用いて構築できる。

【0055】

断片「1」およびネオマイシン耐性マーカを連結してpBluescriptに入れた後、ネオマイシン耐性マーカの隣にSacI部位が残存していた。新しい構築物をSacIで直線化し、DNAポリメラーゼを用いて、SacI消化により生じた付着末端を充填することで平滑末端に変換した。

【0056】

「2」と称した断片を、XhoI-BstI1071断片として単離し、DNAポリメラーゼを用いて、XhoIおよびBstI1071酵素により生じた付着末端を充填することで平滑末端断片に変換した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

終了後、最終的な構築物は、領域 2、ネオマイシン耐性マーカーおよび領域 1 をそれぞれ含んでいた。

【 0 0 5 8 】

ウシ繊維芽細胞のトランスフェクションのために、構築物を、制限酵素KpnIで消化し（図中 2 つのKpnI部位が示されている）、そのDNA断片を相同組換えに使用した。

【 0 0 5 9 】

ネオマイシン耐性構築物は、以下のように組み立てた。「pSTneoB」と称される構築物（Katoら, Cell Struct. Funct. 12:575, 1987; Japanese Collection of Research Biologicals (JCRB) 寄託番号: VE039) は、コード領域の上流にあるSV40プロモーターおよびTKエンハンサーの制御下でネオマイシン耐性遺伝子を含むように設計された。コード領域の下流には、SV40ターミネーター配列が存在する。neoカセットを、XhoI断片として、「pSTneoB」から切り出した。標準的な分子生物学的技術を用いて断片の端部を平滑末端に変換した後、平滑末端断片を、ベクターpBS246 (Gibco/Life Technologies) 中のEcoRV部位にクローン化した。この部位は、loxP部位に挟まれている。「pLoxP-STNeoR」と称した新しい構築物を、 μ ノックアウトDNA構築物を作製するために使用した。この構築物の所望の断片は、元々pBS246クローニングベクター中に存在していたloxP部位およびNotI部位に挟まれている。loxP-neo-loxPを含む所望のNotI断片を、免疫グロブリン μ 定常領域エキソンを置き換えるために使用した。ネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に連結したSV40プロモーターはネオマイシン耐性遺伝子の転写を活性化し、所望のNotI断片が μ 定常領域エキソンと入れ替わった細胞を、それらの獲得した抗生物質耐性に基づいて選択することができる。

【 0 0 6 0 】

IgM重鎖対立遺伝子が有効に破壊された細胞系を得た後、これを核移植ドナーとして使用して、クローン化有蹄動物胎仔（例えば、クローン化ウシ胎仔）を作製し、最終的に、一方のIgM重鎖対立遺伝子が破壊された胎仔または動物を作製する。その後、それから誘導された体細胞（例えば、繊維芽細胞）を用いて第 2 ラウンドの遺伝子ターゲティング破壊を実施することができ、異なる選択可能マーカーを含む同様のベクターを用いて、第 2 のIgM重鎖対立遺伝子が不活性化された細胞を作製する。

【 0 0 6 1 】

第 1 のターゲティング遺伝子破壊と同時に、同様にオスまたはメス供給源のものであり得る第 2 の有蹄動物（例えば、ウシ）体細胞系も遺伝子改変することが好ましい。操作される第 1 の細胞系がオスの場合、メス細胞系を改変することが好ましい。逆に、操作される第 1 の細胞系がメスの場合、オス細胞系を選択することが好ましい。この場合も、操作される細胞は有蹄動物（例えば、ウシ）胎仔繊維芽細胞を含むことが好ましい。

【 0 0 6 2 】

好適な実施形態では、メス胎仔繊維芽細胞を遺伝子改変して、Ig 軽鎖遺伝子の一方の対立遺伝子のターゲティング破壊を導入する。本方法は、有蹄動物（例えば、ウシ）Ig 軽鎖に相同な領域、および選択可能マーカーを有するベクターを用いて同様に実施される。この場合のDNA構築物は、組み込みおよび内因性Ig軽鎖との相同組換えの際に、ターゲティングIg 軽鎖遺伝子の破壊（不活性化）が生じるように設計される。

【 0 0 6 3 】

所望のターゲティング破壊を有するメス繊維芽細胞系を選択した後、核移植のためのドナー細胞として同様に利用するか、またはこのような細胞系から得たDNAを核移植のドナーとして使用する。

【 0 0 6 4 】

あるいはまた、この細胞を、第 2 ラウンドの相同組換えに供して、第 1 の対立遺伝子を破壊するのに使用したものと同様であるが、異なる選択可能マーカーを含むDNA構築物を用いて、第 2 のIg 軽鎖を不活性化してもよい。

【 0 0 6 5 】

発明の背景で論じたように、核移植を行う方法、特にクローン化ウシおよびクローン化トランスジェニックウシの作製法は既に報告されており、Sticeらに発行され、University of Massachusettsに譲渡された米国特許第5,995,577号に記載されている。あるいはまた、WO 95/16670 ; WO 96/07732 ; WO 97/0669 ; またはWO 97/0668に開示される核移植技術（まとめてRoslin法と呼ぶ）を使用してもよい。Roslin法は、増殖期のドナー細胞ではなく静止期の細胞を使用する点で、University of Massachusetts法とは異なる。上記特許は全て、参照により全体的に本明細書に援用される。これらの核移植手順により、クローン化トランスジェニックウシの仔（例えば、Ig軽鎖遺伝子および/またはIgM遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子のターゲッティング破壊を含む仔）を作製するのに使用できるトランスジェニッククローン化胎仔が作製される。このような細胞系を作製したら、これらを利用して、オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウト（MおよびF Hemi H/L）胎仔および仔を作製することができる。さらに、これらの技術は、トランスジェニックウシを作製するための使用のみに限定されない。上記技術は、他の有蹄動物の核移植のためにも使用できる。

【0066】

核移植の後、有蹄動物を交配させるか、または先に記載した相同ターゲッティングベクターを用いた二次遺伝子ターゲッティングにより、所望の動物を作製することができる。

【0067】

先に記載したように、本発明のさらなる目的は、オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウトを作製することを含んでおり、このようなヘミ接合ノックアウトは既に記載した細胞系を用いて作製される。これは上記方法に従って作製した仔を交配させることによって行うことができるが、この場合は、IgM重鎖遺伝子の対立遺伝子が破壊された仔を、Ig軽鎖の対立遺伝子が破壊された別の仔と交配させる。あるいはまた、上記手順により作製した仔から得られる細胞を操作することによる二次遺伝子ターゲッティングによって行ってもよい。これは、IgM重鎖遺伝子の対立遺伝子またはIg軽鎖の対立遺伝子の相同組換えターゲッティング破壊により行う。オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウト（MおよびF Hemi H/L）を含む細胞系が生成したら、これを使用して、そのようなノックアウトを含む胎仔または仔ウシを作製する。上述したように、これは、交配または二次遺伝子ターゲッティングにより行われる。

【0068】

オスおよびメス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウトが得られたら、これらの動物に由来する細胞を利用して、ホモ接合ノックアウト（Homo H/L）胎仔を作製することができる。この場合も、遺伝子ターゲッティングを繰り返すかまたは交配によって行う。本質的に、交配を用いる場合、オス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウトを、メス重鎖および軽鎖ヘミ接合ノックアウトと交配させ、ホモ接合ノックアウトを含む仔を選択する。あるいはまた、上述したヘミ接合ノックアウト由来の細胞を組織培養で操作して、IgMまたはIg軽鎖（ ）遺伝子の他方の対立遺伝子をノックアウトしてもよい。二次遺伝子ターゲッティングはより迅速に結果が得られるので、特にウシ等の有蹄動物の妊娠期間が比較的長いことを考えると、交配より好ましいかもしれない。

【0069】

ホモ接合ノックアウト（Homo H/L）が得られたら、これらを利用して、ヒト等の特定の種の抗体を産生するための遺伝子（好ましくは遺伝子座全体）を含む所望の核酸を導入する。WO 97/07671（EP 0843961）およびWO 00/10383（EP 1106061）に開示されているようなヒト人工染色体を使用することが好ましい。これらのヒト人工染色体は、対応日本国特許第30300092号にも記載されている。これらの出願は両方とも、参照により全体的に本明細書に援用される。また、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有し発現する人工ヒト染色体の構築は、Shenら、Hum. Mol. Genet. 6(8):1375-1382 (1997) ; Kuroiwaら、Nature Biotechnol. 18(10):1086-1090 (2000) ; およびLoupertら、Chromosome 107(4):255-259 (1998) に開示されている（全て参照により全体的に本明細書に援用される）。ヒト人工染色体はまた、異種抗体遺伝子を野生型動物細胞に導入するためにも利用され得る。これは、上記

10

20

30

40

50

方法を用いて達成できる。人工染色体を動物細胞（特に、胎仔繊維芽細胞）に導入することは、本明細書に記載するように、マイクロセル融合により行うことができる。

【0070】

ヒト人工染色体を使用する代わりに、免疫グロブリン遺伝子をコードする核酸を、YACベクター、BACベクターまたはコスミドベクターを用いて染色体に組み込んでもよい。異種Ig遺伝子を含むベクター（W098/24893、W096/33735、W097/13852、W098/24884）は、エレクトロポレーション、リポフェクション、YACベクターを含む酵母スフェロプラストとの融合等の公知方法を用いて、胎仔繊維芽細胞に導入することができる。さらに、異種Ig遺伝子を含むベクターを、胎仔繊維芽細胞の内因性Ig遺伝子座にターゲティングさせて、異種Ig遺伝子の導入および内因性Ig遺伝子の破壊を同時に行うことができる。

10

【0071】

異種免疫グロブリン遺伝子をコードする核酸の組み込みは、Lonbergらによる特許（前掲）に記載されているように行うこともできる。異種免疫グロブリン遺伝子を宿主有蹄動物の染色体に挿入するために使用する「ノックイン」構築物では、1つ以上の免疫グロブリン遺伝子および抗生物質耐性遺伝子が、構築物でトランスフェクトされる細胞型において活性なプロモーターと作用可能に連結され得る。例えば、構成的に活性な、誘導可能な、または組織特異的なプロモーターを使用して、組み込まれた抗生物質耐性遺伝子の転写を活性化して、トランスフェクトされた細胞をその獲得した抗生物質耐性に基づいて選択することができる。あるいはまた、Ig遺伝子および抗生物質耐性遺伝子を含むノックインカセットがプロモーターに作用可能に連結していないノックイン構築物を使用してもよい。この場合、ノックインカセットが内因性プロモーターの下流に組み込まれた細胞は、内因性プロモーターの制御下で生じる抗生物質耐性マーカーの発現に基づいて選択することができる。これらの選択された細胞を、本明細書に記載の核移植法に使用して、異種免疫グロブリン遺伝子が宿主染色体に組み込まれたトランスジェニック有蹄動物を作製することができる。

20

【0072】

同様の方法論を使用して、異なる種（数ある種の中でも特にイヌ、ネコ、他の有蹄動物、非ヒト霊長類等）のIgの発現のための遺伝子を含む人工染色体を製造し挿入することが可能である。上述したように、また当該技術分野で公知のように、異なる種の免疫グロブリン遺伝子は、異なる種にわたり実質的な配列相同性を示すことが周知である。

30

【0073】

挿入された人工染色体（例えば、ヒト人工染色体）が細胞系（例えば、ウシ胎仔繊維芽細胞）に安定して導入されたと判断したら、それを核移植のドナーとして利用する。この決定はPCR法により行い得る。また、ホモ接合ノックアウトを含み、さらに核酸（ヒト人工染色体等）が安定して導入された動物が同様に得られる。核酸（例えば、ヒト人工染色体）を安定して取り込んだ仔ウシを得た後、それらの動物を試験して、それらが免疫感作および親和性成熟に応答してヒトIg遺伝子を発現するか否かを決定する。

【0074】

上記手順全体の改変も行うことができる。例えば、異種Ig遺伝子をまず導入し、次いで内因性Ig遺伝子を不活性化してもよい。さらに、異種Ig遺伝子を保持する動物を、内因性Ig遺伝子が不活性化された動物と交配してもよい。本発明で利用する手法を上述してきたが、利用する技術を以下により詳細に記載する。これらの例は、本発明を例示するために提供するもので、限定するものと解釈されるべきではない。特に、以下の実施例は、トランスジェニックウシに焦点を当てているが、記載されている方法はあらゆるトランスジェニック有蹄動物を作製し試験するために使用され得る。

40

【0075】

ヒトIgを発現するトランスジェニック有蹄動物を作製するためのノックアウト手順

上述のように、本発明は、Homo H/L胎仔または仔ウシの作製に関する。本手法は図1に要約してある。図には3つのスキームの概要を示してある。第1のスキームでは再生胎仔細胞系における連続ノックアウトを利用する。この手法は技術的に最も難しく、リスクレ

50

ベルが最も高いが、上記したように育種手法よりも結果が速く得られる可能性がある。他の2つのスキームでは動物の育種を利用する。第2のスキームでは、オスおよびメス細胞系においてそれぞれ、重鎖および軽鎖遺伝子の単一ノックアウトのみが必要である。このスキームは細胞系の再生を利用せず、技術的には最も簡単な手法であるが、終了するまでに最も時間がかかる。スキーム3はスキーム1と2の中間にある。全てのスキームにおいて、Homo H/Lノックアウト仔ウシの生存および維持は困難である可能性があるため、Homo H/L胎仔のみを作製する。必要であれば、受動免疫療法を使用してHomo H/Lノックアウト仔ウシの生存率を高めることもできる。

【0076】

実験設計

本発明では、ヘミ接合オス重鎖ノックアウト (M Hemi H) およびヘミ接合メス軽鎖ノックアウト (F Hemi L) を作製し、これらのターゲッティング欠失体から40日齢胎仔を作製することが好ましい。胚由来の細胞を回収し、M Hemi H細胞において軽鎖遺伝子座の一方の対立遺伝子をターゲッティングし、F Hemi L細胞において重鎖遺伝子座の一方の対立遺伝子をターゲッティングして、HおよびL遺伝子座の両方のヘミ接合欠失を有する細胞 (Hemi H/L) を得る。これらの細胞を使用して40日齢胎仔を誘導し、これから繊維芽細胞を単離する。

【0077】

M Hemi H/L繊維芽細胞を他のH鎖対立遺伝子でターゲッティングしてM Homo H/Hemi Lを作製し、F Hemi H/Lを他方のL鎖対立遺伝子でターゲッティングしてF Homo L/Hemi Hを作製する。ホモ接合欠失体を作製するためには、より高い薬剤濃度を使用してホモ接合ターゲッティングを促進する。しかし、この手法が上手くいかず、育種が必要となり得る可能性もある。選択カセットのcre/loxターゲッティングを利用する一例では、同じ選択系を1つを上回るターゲッティング欠失に対して使用することが可能である。これらの繊維芽細胞をクローニングし、40日齢胎仔を回収し、繊維芽細胞を単離する。このクローニングで得られた胎仔細胞をターゲッティングして、HまたはL遺伝子座のいずれかのホモ接合欠失を生じさせて、M Homo H/LおよびF Homo H/L胎仔繊維芽細胞を得る。これらの繊維芽細胞をクローニングし、40日齢胎仔を回収し、繊維芽細胞を単離する。次いで、これらのHomo H/L胎仔繊維芽細胞を、場合によっては育種手順を用いて、HACの取り込みに使用する。

【0078】

ライブラリー構築

胎仔繊維芽細胞を使用してゲノムライブラリーを構築する。ターゲッティング構築物がクローニングに使用する細胞と同遺伝子型であることが重要であることが報告されているが、本発明において必須ではない。例えば、同遺伝子型、実質的に同遺伝子型、または非同遺伝子型構築物を使用して、内因性免疫グロブリン遺伝子に突然変異を生成することができる。1つの可能性のある方法では、他のウシ品種と比べて近親交配が遺伝的に高レベルなホルスタイン牛を使用する。本発明者らは、異なる動物間で、免疫グロブリン遺伝子中の多形を全く検出していない。これは、配列相同性が高く、非同遺伝子型構築物でのターゲッティングが上手くいくことを示唆している。

【0079】

1つのオス細胞系および1つのメス細胞系から、「クローニング可能性 (clonability)」試験を行うと同時にライブラリーを構築する。このプロセスの終了時に、ライブラリーが生成し、多数の異なる胎仔細胞系が試験され、クローニングの目的に最良なものとして1つの細胞系が選択されると想定される。ゲノムライブラリーは、胎仔繊維芽細胞から単離した高分子量DNAを用いて構築する。DNAを大きさで分画し、20~23 Kbの高分子量DNAをファージベクター Zapまたは Fixに挿入する。本発明者らは、Stratagene調製ライブラリーを用いて素晴らしい成功を収めた。従って、DNAを単離し、大きさで選択したDNAをライブラリー調製のためにStratageneに送付する。ウシ重鎖および軽鎖を含むクローンを単離するために、放射能標識IgM cDNAおよび放射能標識軽鎖cDNAを使用する。さらに、

10

20

30

40

50

軽鎖遺伝子座を欠失する必要がある場合には軽鎖ゲノムクローンを単離する。胎仔細胞ライブラリーをそれぞれ、ウシ重鎖および軽鎖を含むクローンについてスクリーニングする。約105~106プラークをスクリーニングすることで、重鎖または軽鎖遺伝子座のいずれかを含むクローンを単離できると見込まれる。単離したら、両方の遺伝子座をpBluescriptにサブクローニングし、制限マッピングを行う。ホルスタインにおけるこれらの遺伝子座の制限マップを図2Bに示す(Knightら, J Immunol 140(10):3654-9, 1988)。さらに、得られたクローンのマップを作成し、ターゲッティング構築物を組み立てるために使用する。

【0080】

ターゲッティング構築物の作製

重鎖および軽鎖遺伝子を単離したら、構築物を作製する。IgM構築物は、IgM定常領域膜ドメインを欠失することにより作製される。Rajewskyおよび共同研究者らによりマウスで示されているように、IgMの膜ドメインの欠失はB細胞発達をブロックする。なぜなら、表面IgMは継続的なB細胞発達のために必要なシグナルであるからである(Kitamuraら, Nature 350:423-6)。従って、ホモ接合IgMウシはB細胞を欠く。本方法においては、機能性Igを欠く動物の生仔出生(live birth)は必要ないため、問題にはならない。しかし、必要であれば、受動免疫療法を使用して、ヒトIg遺伝子座が導入される最後のステップまで動物の生存を改善してもよい。

【0081】

IgM重鎖対立遺伝子のノックアウトをもたらすために使用するターゲッティング構築物の一例を図2Aに示す。重鎖については、膜IgMドメインを、loxP部位に挟まれたネオマイシンカセットと置き換える。付着膜ドメインは、neoカセットと共にスプライシングされ、その膜ドメインはloxP部位のすぐ5'側に挿入されたTAGストップコドンをもつようになり、その結果、膜ドメインの不活化を確実にすることができる。これを、約5~6キロ塩基の3'染色体DNAを有するターゲッティング構築物の5'端に配置する。

【0082】

薬剤濃度を高めることで、IgM重鎖または軽鎖のいずれかの第2の対立遺伝子の欠失が可能にならない場合は、cre/lox系(Sauer, 1998, Methods 14:381-392に概要が記載されている)を使用して選択可能マーカーを欠失させる。以下に記載するように、cre/lox系は、選択可能マーカーのターゲッティング欠失を可能にする。必要であれば、全ての選択可能マーカーをloxP配列で挟んで、これらのマーカーを欠失し易くする。

【0083】

軽鎖構築物は、ウシ 鎖定常領域(例えば、Genbank受託番号AF396698に見られる 軽鎖定常領域、または任意の他の有蹄動物 軽鎖定常領域)、およびloxP部位に挟まれたピューロマイシン耐性遺伝子カセットを含んでおり、ウシ遺伝子をloxP部位に挟まれたピューロマイシンカセットと置き換える。定常領域遺伝子の3'側にある約5~6キロ塩基のDNAが、ピューロマイシン耐性遺伝子の3'側で置き換えられる。必要であれば、ピューロマイシン耐性遺伝子は、5'および3'端部の両方においてloxP部位を担持して、欠失を可能にする。有蹄動物抗体遺伝子間の高度な相同性により、Genbank受託番号AF396698中のウシ 軽鎖配列は、様々な有蹄動物に由来するゲノム 軽鎖配列にハイブリダイズすることが予想され、従って、様々な有蹄動物 軽鎖ゲノム配列を単離するために標準的な方法で使用できる。これらのゲノム配列を、本明細書に記載する方法等の標準的な方法において使用して、任意の有蹄動物中の内因性 軽鎖を不活性化するためのノックアウト構築物を作製し得る。

【0084】

軽鎖ノックアウト構築物は、図3Gに示すウシ 軽鎖配列、または任意の他の有蹄動物 軽鎖配列を使用して同様に構築し得る。このウシ 軽鎖は、様々な有蹄動物からゲノム 軽鎖配列を単離するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用し得る。これらのゲノム配列を、本明細書に記載する方法等の標準的な方法において使用して、任意の有蹄動物中の内因性 軽鎖を不活性化するためのノックアウト構築物を作製し得る。

10

20

30

40

50

【0085】

場合によっては、さらに別の有蹄動物遺伝子を突然変異または不活性化してもよい。例えば、内因性有蹄動物IgJ鎖遺伝子をノックアウトして、ヒトに投与する本発明の抗体中の有蹄動物IgJ鎖遺伝子の潜在的な抗原性を抑制することができる。ターゲティングベクターの構築のためには、Genbank受託番号U02301に見られるウシIgJ鎖領域のcDNA配列を使用することができる。このcDNA配列をプローブとして用いて、RPC1-42 (Oakland, CAのBACPAC)等のBACライブラリーからウシIgJ鎖のゲノム配列を単離するか、または任意の他の有蹄動物からJ鎖のゲノム配列を単離してもよい。さらに、ヒトJ鎖コード配列を、本発明の有蹄動物に導入して、ヒトIgAおよびIgM分子を機能性発現させてもよい。ヒトJ鎖のcDNA配列は、Genbank受託番号AH002836、M12759およびM12378から入手可能である。この配列は、本明細書に記載するような標準的な方法を用いて有蹄動物胎仔繊維芽細胞に挿入し得る。例えば、HAC、YACベクター、BACベクター、コスミドベクターまたはノックイン構築物中のヒトJ鎖核酸を、内因性有蹄動物染色体に組み込むか、または内因性有蹄動物染色体から独立して維持させてもよい。得られたトランスジェニック有蹄動物細胞を、本明細書に記載する核移植法に使用して、機能性有蹄動物J鎖の発現を低減するかまたは喪失させる突然変異を有し、かつヒトJ鎖を発現する異種核酸を含む所望の有蹄動物を作製してもよい。

10

【0086】

さらに、有蹄動物 α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を突然変異させて、 α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素によって生成するガラクトシル(α -(1,3)ガラクトースエピトープの発現を低減または喪失させてもよい。本発明の有蹄動物により産生されるヒト抗体がこの糖質エピトープにより改変されると、これらのグリコシル化抗体は、治療薬としてヒトに投与された場合、この糖質エピトープと反応するレシピエント中の抗体により不活性化されるかまたは除去され得る。この糖質エピトープに対する可能な免疫応答を排除するためには、ウシ α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の配列を用いて、ノックアウト構築物を設計し、有蹄動物中のこの遺伝子を不活性化するとよい (Genbank受託番号J04989; Joziassera, J. Biol. Chem. 264(24):14290-7, 1989)。このウシ配列、または米国特許第6,153,428号および同第5,821,117号に開示されているブタ α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ配列を用いて、様々な有蹄動物からゲノム α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ配列を得て、ガラクトシル(α -(1,3)ガラクトースエピトープの発現が低減したかまたは喪失した他の有蹄動物を作製してもよい。

20

30

【0087】

所望であれば、有蹄動物プリオン遺伝子を突然変異させるか、不活性化して、感染リスク(ウシ海綿状脳症(BSE)等)の可能性を低くしてもよい。ターゲティングベクターの構築のためには、ウシプリオン遺伝子のゲノムDNA配列を用いるとよい (Genbank受託番号AJ298878)。あるいはまた、このゲノムプリオン配列を用いて、他の有蹄動物からゲノムプリオン配列を単離してもよい。プリオン遺伝子を、標準的な方法(本明細書に記載するような方法、またはヒツジの α -(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子またはプリオン遺伝子をノックアウトするために示唆されている方法(Denningら, Nature Biotech. 19: 559-562, 2001)等)を使用して、不活性化してもよい。

40

【0088】

各遺伝子座の第2の対立遺伝子をターゲティングする際に、第1の選択可能マーカが細胞中に残っている場合には、異なる選択可能マーカを含む新しいターゲティング構築物を組み立てる必要があるかもしれない。表1に示すように、様々な選択法が利用可能かつ比較でき、適切な選択系を選ぶことができる。最初は、薬剤濃度を上げて(例えば、薬剤濃度を二倍にして)、第2の対立遺伝子をターゲティングする。これが上手くいかない場合には、新しいターゲティング構築物を採用し得る。

【0089】

様々な方法論を用いて、上記した追加の突然変異または遺伝子不活性化を本発明の有蹄動物に取り込むことができる。各々所望の突然変異についてトランスジェニック有蹄動物

50

細胞系が生成したら、交雑育種を用いて、これらの追加の突然変異を本発明の有蹄動物に取り込むことができる。あるいはまた、これらの追加の突然変異を有する胎仔繊維芽細胞を、内因性Ig遺伝子をノックアウトするため、および/または異種Ig遺伝子を導入するための出発材料として用いてもよい。また、内因性Ig遺伝子中にノックアウト突然変異を有する、および/または異種Ig遺伝子を含む胎仔繊維芽細胞を、これらの追加の突然変異または不活性化のための出発材料として使用することができる。

【0090】

Ig遺伝子座のターゲッティング欠失

ターゲッティング構築物を、例えばエレクトロポレーションにより、胚繊維芽細胞に導入する。適切な抗生物質を使用して、ターゲッティングベクターを取り込んだ細胞を選択する。使用した薬剤に耐性なクローンを選択して培養する。次いで、これらのクローンを、ガンシクロビルでのネガティブ選択に供し、適切に組み込まれたクローンを選択する。あるいはまた、薬剤選択で生き残ったクローンをPCRで選択する。適切にターゲッティングされたクローンを見つけるために、少なくとも500~1000のクローンをスクリーニングする必要があると推定される。本発明者らの推測は、IgM重鎖定常領域の膜ドメインをターゲッティングすると、300のneo耐性クローンのうち約1つが正確にターゲッティングされるというKitamuraの知見 (Kitamuraら, Nature 350:423-6, 1991) に基づいている。従って、クローンを、96ウェルプレート中で10クローンずつのグループにプールして、10クローンのプールを、目的とするターゲッティングクローンについてスクリーニングすることが考えられる。陽性が同定されたら、プールしたクローンから単離した単一のクローンをスクリーニングする。この方法により、ターゲッティングクローンの同定が可能になるはずである。

【0091】

繊維芽細胞は培養において移動するため、1枚の皿につき約10を上回るクローンが生成する場合には、個々のクローンを区別するのは難しい。さらに、高効率トランスフェクションを伴うクローン増殖のための方法を開発してもよい。希釈クローニング等のいくつかの適当な方法が使用できる。

【0092】

薬剤耐性マーカーのCre/Lox切除

上述したように、例示のターゲッティング構築物は、cre/lox系を用いてマーカーを効率的に欠失し易くするために、loxP部位に挟まれた選択可能マーカーを含有している。ターゲッティングベクターを担持する胎仔繊維芽細胞を、エレクトロポレーションを介してCre含有プラスミドでトランスフェクトする。最近発表されたGFPcre融合遺伝子を含むCreプラスミド[Gagneten S.ら, Nucleic Acids Res 25:3326-31 (1997)]を使用してもよい。これにより、Creタンパク質を含む全てのクローンの迅速な選択が可能になる。これらの細胞は、FACSソーティング、または顕微鏡操作を介したグリーン蛍光発光細胞の手操作による回収のいずれかにより、選択される。緑色の細胞は、活発に転写されるCreリコンビナーゼを担持し、つまり、薬剤耐性マーカーを欠失していると期待される。Cre発現について選択した細胞をクローニングし、PCR分析を介して薬剤耐性マーカーの欠失についてクローンを分析する。切除されたと判断された細胞を小さいクローンにまで培養し、2つに分割し、1つのアリコートを選択培地中で試験して、薬剤耐性遺伝子が確実に欠失されたことを確認する。他のアリコートは、次のラウンドのターゲッティング欠失に使用する。

。

【表1】

表1：選択可能マーカーおよび選択のための薬剤

遺伝子	薬剤
Neo ^r	G418 ¹
Hph	ハイグロマイシンB ²
Puro	ピューロマイシン ³
Ecogpt	ミコフェノール酸 ⁴
Bsr	ブラストサイジンS ⁵
HisD	ヒスチジノール ⁶
DT-A	ジフテリア毒素 ⁷

10

【0093】

表1注

1 Southern PJ, Berg P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1:327-41.

2 Santerre RF, Allen NE, Hobbs JN Jr, Rao RN, Schmidt RJ. 1984. Expression of prokaryotic genes for hygromycin B and G418 resistance as dominant-selection markers in mouse L cells. *Gene* 30:147-56.

20

3 Wirth M, Bode J, Zettlmeissl G, Hauser H. 1988. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene* 73:419-26.

4 Drews RE, Kolker MT, Sachar DS, Moran GP, Schnipper LE. 1996. Passage to nonselective media transiently alters growth of mycophenolic acid-resistant mammalian cells expressing the escherichia coli xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene: implications for sequential selection strategies. *Anal Biochem* 235:215-26.

5 Karreman C. 1998. New positive/negative selectable markers for mammalian cells on the basis of Blasticidin deaminase-thymidine kinase fusions. *Nucleic Acids Res* 26:2508-10.

30

6 Hartman SC, Mulligan RG. 1988. Two dominant-acting selectable markers for gene transfer studies in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8047-51.

7 Yagi T, Nada S., Watanabe N, Tamemoto H, Kohmura N, Ikawa Y, Aizawa S. 1993. A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal Biochem* 214:77-86.

【0094】

他の有蹄動物の免疫グロブリン遺伝子を改変するためのターゲティング法の適用

他の有蹄動物の免疫グロブリン遺伝子を改変するために、3つの主要領域を含むようにターゲティングベクターを設計した。第1の領域は、ターゲティングの遺伝子座に相同である。第2の領域は、そのターゲティング遺伝子座の一部と特異的に置き換わる薬剤選択マーカーである。第3の領域は、第1の領域と同様にターゲティング遺伝子座に相同であるが、野生型ゲノムにおいて第1の領域と隣接していない。ターゲティングベクターと所望の野生型遺伝子座との相同組換えにより、ターゲティングベクター中で相当する2つの相同領域間の遺伝子座配列が欠失され、該配列が薬剤耐性マーカーで置き換えられる。好適な実施形態では、2つの相同領域の合計の大きさが約6キロ塩基であり、ターゲティング遺伝子座の一部と置き換わる第2の領域の大きさは約2キロ塩基である。このターゲティング法は、原核生物細胞からヒト細胞まで幅広い種に対して概して有用である。使用する各ベクターの特異性は、遺伝子ターゲティング手順のために選択される遺伝子座、およびこの方法で使用する配列にある。この手法は、全ての有蹄動物（ヤ

40

50

ギ (*Capra hircus*)、ヒツジ (*Ovis aries*)、ブタ (*Sus scrofa*)、およびウシ (*Bos taurus*) が挙げられるがこれらに限定されない) に使用できる。

【0095】

有蹄動物の細胞中の特定の遺伝子をターゲティングするためにエレクトロポレーションを使用することも、有蹄動物において広く使用され得る。本明細書に記載する一般手順は、他の有蹄動物のゲノムにターゲティング突然変異を導入するために適応できる。エレクトロポレーション条件 (電圧および容量) を変更して、他の有蹄動物から得るトランスフェクタントの数を最適化してもよい。さらに、ウシ中の重鎖遺伝子座をターゲティングとして本発明で使用した方法 (すなわち、除去されるエキソンを直に挟む領域に相同な領域を含むベクターを用いて、全てのコードエキソンおよび介在配列を除去すること) は、他の有蹄動物においても同等に使用できる。例えば、ヒツジ (*Ovis aries*) の免疫グロブリン重鎖遺伝子座に対して広範な分析が行われており、ヒツジ遺伝子座は構造および配列の両方の点でウシ遺伝子座と極めて類似性が高い (Genbank受託番号Z71572、Z49180 ~ Z49188、M60441、M60440、AF172659 ~ AF172703)。再配列ヒツジ免疫グロブリン鎖について報告された多数のcDNA配列に加えて、重鎖5'エンハンサー (Genbank受託番号Z98207)、3' μ スイッチ領域 (Z98680) および5' μ スイッチ領域 (Z98681) を含めて重鎖遺伝子座についてのゲノム配列情報が報告されている。重鎖のヒツジ分泌形態についての完全mRNA配列は、受託番号X59994として寄託されている。この寄託物は、対応するウシ配列と高い相同性がある4つのコードエキソンの配列全体を含んでいる。

10

【0096】

ヒツジ遺伝子座についての情報をGenbankから入手し、ウシ配列と高い相同性を有する領域を決定するためにPCR分析用に使用するプライマーを設計するのに使用した。非同遺伝子型DNAを用いてウシ細胞をターゲティングしたため、ヒツジ配列と高い相同性を有する領域の発見を、ウシ品種間で類似の配列保存性が存在する可能性が高いことの指標として用いた。ウシおよびヒツジ免疫グロブリン遺伝子座の配列および構造が類似していることから、ウシ免疫グロブリン遺伝子座を除去するために使用したターゲティング法は、ヒツジの系に上手く適用できることが予想され得る。さらに、ブタ (*Sus scrofa*、受託番号S42881) およびヤギ (*Capra hircus*、受託番号AF140603) についての既存の情報は、これらの種の両方の免疫グロブリン遺伝子座も、本ターゲティング法を利用するのに十分な程度のウシ遺伝子座に対する類似性を有することを示す。

20

30

【0097】

HAC挿入のための手順

原則的に、ヒト人工染色体配列 (#14fg.、#2fg.および#22fg.) を含むオスおよびメスウシ胎仔繊維芽細胞系を入手、選択および使用して、これらの系統からクローン化仔ウシを作製する。

【0098】

例えば、ヒト第14染色体から誘導したHAC (Ig重鎖遺伝子を含む「#14fg」)、ヒト第2染色体から誘導したHAC (Ig鎖遺伝子を含む「#2fg」)、およびヒト第22染色体 (Ig鎖遺伝子を含む「#22fg」) から誘導したHACを、同時にまたは逐次的に導入することができる。

40

【0099】

オス#14fg.動物とメス#2fg.および#22fg.動物とを交配させ、子孫を評価することで、これらの染色体断片の伝達を試験する。伝達が成功したら、2つの系統を交配させて、3つ全ての染色体断片を含む系統を作製する。また、#14fg.、#2fg.および#22fg.染色体断片を、Homo H/L胎仔細胞に挿入して、クローン化仔ウシまたはHomo H/L仔ウシとの交雑トランスジェニックHAC仔ウシを作製するために使用してもよい。あるいはまた、他のHAC (HACまたは HAC等) を、実施例2に記載のように導入するか、または任意の他の染色体移入方法を用いて導入してもよい。

【0100】

論理的根拠

50

HACの生殖細胞系伝達は、HACをIgノックアウト動物に導入するため、および動物を生成集団として増殖させるために有用であろう。生殖細胞系を介したHACの増殖で懸念されるのは、減数分裂の間の染色体物質の不完全な対合である。しかし、生殖細胞系伝達は、Tomizukaら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722, 2000) が示したように、マウスにおいて成功している。

【0101】

図1Aにまとめた方法は、#14fg.をオス細胞系統に挿入し、#2fg.および#22fg.をそれぞれメス細胞系に挿入することから構成される。HACを保持する仔ウシを作製し、メスおよびオスの両方を介して生殖細胞系伝達を試験することができる。得られる子孫の一部(約25%)は、重鎖および軽鎖HACの両方を含むであろう。さらに交雑させることにより、3つの染色体断片全てを含む仔ウシ系統が得られるであろう。これらの動物を、先に記載したように胎仔細胞から生成したHomo H/L動物との交雑に使用する。

10

【0102】

実験設計

細胞系の最初のスクリーニングから細胞を得る。これらは、ホルスタインであっても、または上で使用したものと異なった系統であってもよい。これにより、集団中で可能な限りの遺伝多様性を維持しながらの交雑が可能になる。次いで、HACを細胞系に導入し、陽性細胞系の選択を行う。選択された細胞系を核移植に使用して、仔ウシを作製する。12月齢から始めて、精液および卵子を回収し、受精させ、レシピエント動物に移す。DNAマーカー分析および核型分析のために細胞サンプルを取る。出生時から始めて、血液サンプル

20

【0103】

上記したように、上記実験において開発された手順を用いて、HACはHomo H/L細胞系にも導入される。

【0104】

ヒトIg発現についての試験

この実験のゴールは、オスHomo H細胞およびクローン化胎仔を作製し、ヒトIgHおよびヒトIgL遺伝子座を含む1つ以上のHAC(HAC#14fg.および#22fg.等)をHomo H細胞に挿入して仔ウシを作製し、免疫感作および親和性成熟に应答するヒトIgの発現を試験することである。これは、以下のように行う。

30

【0105】

実験設計

先に記載したように作製したHemi H細胞から、Homo H細胞を作製する。抗生物質選択または第2の挿入により二重ノックアウトを生成する。先に記載したようにHACをこれらの細胞に導入する。核移植により仔ウシを作製する。HACを保持する仔ウシの試験は、出生後直ぐに開始し、(1)ヒトIg発現、(2)免疫感作への应答、(3)親和性成熟、および(4)子孫へのHACの伝達、について評価することを含む。

【0106】

動物から採血し、ELISA、RT-PCRまたはFACS分析によりヒト重鎖および軽鎖発現の存在についてアッセイすることで、ヒトIg発現をモニターする。動物がヒトIgを産生すると判断したら、アジュバントに入った破傷風トキソイドで動物を免疫感作する。免疫感作後、週に1度動物から採血し、ELISAまたはFACSにより抗原に対する应答を決定し、免疫感作前に回収した予備採血分と比較する。初回免疫感作の1ヵ月後、動物を水性形態の抗原で二次免疫感作する。二次免疫感作の1週間後、動物から採血し、ELISAまたはFACSにより抗原に対する应答を測定し、予備採血分と比較する。ELISAまたはFACSアッセイにより、ほとんどの抗体力価、および産生した重鎖アイソタイプの測定が可能になる。このデータにより、抗体力価の増加、およびクラススイッチングの発生を判断できる。平均親和性の推定値も測定して、抗原に対する应答の間に親和性成熟が生じるか否かを決定する。

40

【0107】

上述したようにトランスジェニックウシを得た後、それらを利用して、トランスジェニ

50

ックIgを製造する（好ましくはヒトであるが、例えば、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、他の有蹄動物（ヒツジ、ブタ、ヤギ等）、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の他の種のものでもあり得る）。上記したように、Ig遺伝子は種の間で保存されていることが知られている。

【0108】

異種抗体を含むトランスジェニック抗血清および乳汁

ウシ（または他の有蹄動物）は、内因的に曝露されるあらゆる抗原または外因的に投与される抗原に対するトランスジェニック抗血清を産生する。例えば、抗原を有蹄動物に投与して、該抗原（病原体（例えば、細菌、ウイルス、原生動物、酵母または菌類）、腫瘍抗原、受容体、酵素、サイトカイン等の抗原が挙げられる）に反応する所望の抗体を産生させることができる。抗体産生のための病原体の例としては、肝炎ウイルス（例えばC型肝炎）、免疫不全ウイルス（例えばHIV）、ヘルペスウイルス、パルボウイルス、エンテロウイルス、エボラウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、ワクシニアウイルス、ストレプトコッカス（例えば、肺炎球菌）、ヘモフィルス（Haemophilus）（例えば、インフルエンザ菌）、ナイセリア（例えば、髄膜炎菌）、ジフテリア菌、ヘモフィルス（例えば、Haemophilus pertussis）、クロストリジウム（例えば、ボツリヌス菌）、スタフィロコッカス、シュードモナス（例えば、緑膿菌）、および呼吸器合胞体ウイルス（RSV）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0109】

1つ以上の病原体を、トランスジェニック有蹄動物に投与して、特定の疾患の予防、安定化または治療のために有用な超免疫血清を生成させてもよい。例えば、子供の呼吸器感染に関連する病原体を、トランスジェニック有蹄動物に投与して、これらの病原体（例えば、肺炎球菌、インフルエンザ菌、および/または髄膜炎菌）と反応する抗血清を生成させることができる。これらの病原体は、有蹄動物に投与する前に、場合により、（例えば、熱、またはホルムアルデヒド等の化学物質に曝すことにより）それらの毒性を低くするように処理されてもよい。

20

【0110】

幅広いスペクトルのIgを製造するために、様々な病原体（例えば、複数の細菌および/またはウイルス病原体）をトランスジェニック有蹄動物に投与してもよい。この超免疫血清を用いて、哺乳動物（例えば、ヒト）における感染を予防、安定化または治療することができ、特に遺伝性または後天性免疫不全を患う哺乳動物を治療するために有用である。

30

【0111】

さらに、本発明により製造された抗体を用いて、免疫系を抑制（例えば、神経障害を治療するため）、ならびに特定のヒト細胞を除去し、また特定の分子をモジュレートしてもよい。例えば、抗イディオタイプ抗体（すなわち、他の抗体を阻害する抗体）、およびT細胞、B細胞またはサイトカインと反応する抗体は、自己免疫疾患または神経障害（例えば、炎症による神経障害）を治療するのに有用であり得る。これらの抗体は、抗原を投与されていないトランスジェニック有蹄動物から得られるか、またはB細胞、T細胞もしくはサイトカイン（例えば、TNF）等の抗原を投与されたトランスジェニック有蹄動物から得られる。

40

【0112】

抗原を投与されていないトランスジェニック有蹄動物が産生するトランスジェニック抗血清を用いて、ヒトポリクローナル抗体（好ましくはヒトIgG分子）を含む医薬を製造してもよい。これらのヒト抗体は、静注用免疫グロブリン（IVIg）治療薬として、ヒトから単離された抗体の代わりに使用され得る。

【0113】

トランスジェニック抗血清は、場合により、1つ以上の目的の抗原と反応する抗体について富化され得る。例えば、Ausubelら（Current Protocols in Molecular Biology, volume 2, p. 11.13.1-11.13.3, John Wiley and Sons, 1995）に記載されるような標準的な技術を用いて、抗血清を精製してもよい。好適な精製方法としては、抗原または抗体で被

50

覆されたビーズを用いた沈降法、アフィニティークロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィー、磁気ビーズアフィニティー精製 (affinity purification)、およびプレート結合抗原でのパンニング法が挙げられる。さらに、トランスジェニック抗血清を、1つ以上の目的の抗原と接触させて、抗体/抗原複体の大きさの増大に基づき、抗原と結合する抗体を非結合抗体と分けてもよい。プロテインAおよび/またはプロテインGも、IgG分子を精製するために使用され得る。内因性抗体の発現が失われていない場合、プロテインAおよび/またはヒトIg軽鎖 に対する抗体 (Pharminogen) を用いて、所望のヒト抗体を、内因性有蹄動物抗体または有蹄動物/ヒトキメラ抗体と分けてもよい。プロテインAは、ウシIg重鎖よりもヒトIg重鎖に対してより高い親和性を有し、2つのヒト重鎖を含む所望のIg分子を、1つまたは2つの有蹄動物重鎖を含む他の抗体と分けるために使用できる。ヒトIg軽鎖 に対する抗体を用いて、2つのヒトIg 鎖を有する所望のIg分子を、1つまたは2つの有蹄動物Ig軽鎖を有するものと分けてもよい。追加的または代替的に、有蹄動物Ig重鎖または軽鎖に特異的な1つ以上の抗体をネガティブ選択ステップで使用して、1つまたは2つの有蹄動物重鎖および/または軽鎖を含むIg分子を除去してもよい。

10

【0114】

得られる抗血清自体を、抗原に対する受動免疫法に使用してもよい。あるいはまた、抗血清は、診断的、予防的または精製の (例えば、抗原の精製を実現する) 用途を有する。

【0115】

あるいはまた、抗血清投与後、トランスジェニックウシからB細胞を単離して、ハイブリドーマ調製に使用してもよい。例えば、標準的技法を用いて、トランスジェニック有蹄動物に由来するB細胞を、骨髄腫と融合して、目的のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる (Mocikat, J. Immunol. Methods 225:185-189, 1999 ; Jonakら, Hum. Antibodies Hybridomas 3:177-185, 1992 ; Srikumaranら, Science 220:522, 1983)。好ましいハイブリドーマとしては、トランスジェニック有蹄動物と同じ属または種の哺乳動物に由来するB細胞と骨髄腫との融合により生成されるものが挙げられる。他の好ましい骨髄腫は、Balb/Cマウスまたはヒトに由来するものである。この場合、特定の抗原に対する異種モノクローナル抗体を作るハイブリドーマが得られる。例えば、この技術を用いて、病原体に特異的な、(特定の人工染色体に依存して)ヒト、ネコ、イヌ等のモノクローナル抗体を製造することができる。所望の性質 (すなわち、増強した結合親和性、アビディティー) を有する抗体を産生するハイブリドーマの選択方法は、周知である。

20

30

【0116】

あるいはまた、トランスジェニック有蹄動物由来のB細胞を遺伝子改変して、癌遺伝子 (ras、myc、abl、bcl2もしくはneu等) を発現させてもよいし、またはトランスフォーミングDNAもしくはRNAウイルス (エプスタインバーウイルスもしくはSV40ウイルス等) に感染させてもよい (Kumarら, Immunol. Lett. 65:153-159, 1999 ; Knightら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:3130-3134, 1988 ; Shammahら, J. Immunol. Methods 160:19-25, 1993 ; GustafssonおよびHinkula, Hum. Antibodies Hybridomas 5:98-104, 1994 ; Kataokaら, Differentiation 62:201-211, 1997 ; Chatelutら, Scand. J. Immunol. 48:659-666, 1998)。得られる不死化B細胞を使用して、理論的には無限の量の抗体を製造することもできる。またIgは有蹄動物の乳汁にも分泌されるため、有蹄動物乳汁も異種抗体の供給源として使用できる。

40

【0117】

本発明を十分に記載してきたが、以下の実施例を、本発明のさらなる例示として追加的に提供する。

【実施例】

【0118】

実施例1：ウシIgMノックアウト

以下の手順を用いて、免疫グロブリン重鎖 (μ) 遺伝子座の一方の対立遺伝子が相同組換えにより破壊されているウシ繊維芽細胞系を作製した。 μ 遺伝子座 (IgM重鎖遺伝子に

50

対応)のエキソン1~4を除去し、ネオマイシン耐性遺伝子のコピーで置き換えることにより、IgMノックアウトをもたらすためのDNA構築物を作製した。この構築物を使用して、核移植法で上手く使用されるネオマイシン耐性細胞系を得て、これらの細胞系に由来する胚盤胞をレシピエントウシに移植した。さらに、これらの胚盤胞のいくつかをPCR法を用いて試験して、 μ 遺伝子座においてターゲティング挿入が適切に生じたことを確認した。得られた細胞系の一部から核移植法により得た胚盤胞により、ヘテロ接合IgM-KO胎仔を妊娠していることが示された。さらに、単一のIgM重鎖(μ)ノックアウトを含むオスおよびメス細胞系の両方を作製した。これらの細胞系からクローニングされた動物を交配させることにより、 μ のコピーの両方が不活性化された子孫が得られることが予測される。以下、これらの手順をより詳細に述べる。

10

【0119】

DNA構築物

本明細書中に記載した全てのトランスフェクションに使用したDNAは以下のように作製した。4つの主要エキソン(膜貫通ドメインエキソンを除く)であるCH1~4は、下流(CH4)端部のXhoI制限部位と、上流(CH1)端部のXbaI部位との間に挟まれている。トランスフェクション法に使用した構築物は、XhoI部位の下流にある1.5 kbのゲノム配列、およびXbaI部位の上流にある3.1 Kbのゲノム配列から構成した(図3Dおよび3E)。これらの配列を、マサチューセッツの酪農用ホルスタイン牛集団の1匹から、本明細書に記載するようにして単離した。ネオマイシン耐性マーカーを、3.5 Kb断片に載せてこれらの2つの断片の間に挿入し、元のゲノム配列に由来するCH1~4を元々含む2.4 KbのDNAと置き換えた。ベクターの骨格はpBluescriptII SK+(Stratagene)であった。8.1 Kbのインサートを精製し、ウシ胎仔繊維芽細胞のトランスフェクションに使用した。この構築物を図3A~3Cに示す。他の相同領域を含む、および/または別の抗生物質耐性遺伝子を含む他の μ ノックアウト構築物を、標準的方法を使用して構築し、内因性 μ 重鎖遺伝子を突然変異させるのに使用してもよい。

20

【0120】

トランスフェクション/ノックアウト手順

市販の試薬であるSuperfectトランスフェクション試薬(Qiagen, Valencia, CA, USA)カタログ番号301305を用いて、胎仔ウシをトランスフェクトした。

【0121】

HematechのKansas施設において、疾患試験を受けたオスシャロレイ(Charlais)牛からウシ繊維芽細胞を作製し、HematechのWorcester分子生物学研究所に送付して、記載する全ての実験に使用した。任意の他の有蹄動物品種、属または種も、ドナー細胞(例えば、繊維芽細胞等の体細胞)の供給源として使用できる。ドナー細胞を遺伝子改変して、機能性内因性Igの発現を低減するかまたは喪失させる突然変異を含むようにする。

30

【0122】

ウシ胎仔繊維芽細胞の培養のために使用した培地は以下の成分から構成した。すなわち、500 ml MEM(Bio-Whittaker #12-169F)、50 mlウシ胎仔血清(Hy-Clone#A-1111-D)、2 ml抗生物質/抗真菌剤(Gibco/BRL#15245-012)、1.4 ml 2-メルカプトエタノール(Gibco/BRL #21985-023)、5.0 ml L-グルタミン(Sigma Chemical #G-3126)および0.5 ml 酒石酸チロシン(Sigma Chemical #T-6134)であった。

40

【0123】

トランスフェクションの前日、顕微鏡検査で判断される目標集密度を40~80%として、細胞を60 mm組織培養皿に播種した。

【0124】

トランスフェクト当日、無血清/抗生物質不含培地に入れて合計容量を150 μ lにした5 μ gのDNAを、20 μ lのSuperfectトランスフェクション試薬と混合し、室温にて5~10分間放置して、DNA-Superfect複合体を形成した。複合体が形成される間、トランスフェクトするウシ繊維芽細胞を含む60 mm組織培養皿から培地を除去し、4 mlのリン酸緩衝生理食塩水で細胞を一度濯いだ。1 mlの増殖培地を170 μ l DNA/Superfect混合液に添加し、すぐ

50

に60 mm皿に入った細胞に移した。細胞を、38.5 °C、50%二酸化炭素中で、2.5時間インキュベートした。DNA/Superfect複合体と共に細胞をインキュベートした後、培地を吸引除去し、細胞を4 ml PBSで4回洗浄した。5 mlの完全培地を添加し、培養液を一晩、38.5 °C、5% CO₂中でインキュベートした。次いで、細胞をPBSで1回洗浄し、37 °Cにて1 mlのPBS中0.3%トリプシンで、顕微鏡観察で判断して細胞がプレートから離れるまでインキュベートした。各60 mm皿から得た細胞を、24ウェル組織培養プレート(41.7 µl/ウェル)の24のウェルに分注した。1 mlの組織培養培地を各ウェルに添加し、プレートを、38.5 °Cにて24時間、および5% CO₂下で24時間インキュベートした。

【0125】

全てのトランスフェクション手順の間、DNAを含まないSuperfect/PBS混合液を用いて偽(sham)トランスフェクションを行った。なぜなら、これらの細胞はいずれもネオマイシン耐性遺伝子を含まず、組織培養培地にG418を添加した後に全ての細胞が死滅すると思われたからである。これは、DNAを受容した細胞の正の選択のための陰性対照の役割を果たした。

10

【0126】

24時間のインキュベーション後、各ウェルに、400 µg G418を含む1 mlの組織培養培地をさらに添加し、最終的なG418濃度を200 µg/mlとした。7日間のG418選択のために、細胞をインキュベーターに戻した。その間、トランスフェクトおよび偽トランスフェクションプレートの両方を、細胞死についてモニターし、7日間にわたり、偽トランスフェクションのウェルの大部分が生存細胞をほとんどまたは全く含まず、DNAを受容した細胞を含むプレートは卓越した細胞増殖を示した。

20

【0127】

7日間の選択期間後、90~100%の集密度にあるウェルから得た細胞を、0.2 mlのPBS中0.3%トリプシンを用いて剥がし、増殖させるために35 mm組織培養プレートに移して、少なくとも50%の集密度になるまでインキュベートした。この時点で、細胞を、0.6 mlのPBS中0.3%トリプシンでトリプシン処理した。各35 mm組織培養プレートから、0.6 ml細胞懸濁液のうちの0.3 mlを、さらに増殖させるために、12.5 cm²組織培養フラスコに移した。残った0.3 mlは、35 mm皿に再播種し、約50%の最小限の集密度が得られるまでインキュベートした。この時点で、これらのプレートから得た細胞を、PCR分析用のDNA抽出のために処理した。各系統のフラスコは、これらの分析を終えるまでインキュベーターに入れたままにし、所望のDNA組込みを含まない場合には打ち切るか、または今後の核移植および凍結保存のために保存した。

30

【0128】

ターゲティング組込みのスクリーニング

上述したように、DNA構築物を含むトランスフェクタントをスクリーニングするためのDNA供給源は、分析する一連の細胞の入った35 mm組織培養皿とした。DNAを以下のように調製し、Lairdらにより発表された手順を採用した(Lairdら, "Simplified mammalian DNA isolation procedure", Nucleic Acids Research, 19:4293)。簡単に言うと、DNAを以下のように調製した。以下の成分で、細胞溶解緩衝液を調製した。すなわち、100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)、5 mM EDTA(pH 8.0)、0.2%ドデシル硫酸ナトリウム、200 mM NaCl、および100 µg/mlプロテイナーゼKであった。

40

【0129】

各35 mm組織培養皿から培地を吸引し、0.6 mlの上記緩衝液と置き換えた。皿を再度インキュベーターに3時間入れたところ、この間に細胞溶解とタンパク質消化が起こった。このインキュベーションの後、溶解産物を、1.5 ml微量遠心管に移し、0.6 mlのイソプロパノールを添加して、DNAを沈降させた。試験管を激しく反転振とうし、室温に3時間放置し、その後、DNA沈降物を、微量遠心機中で13,000 rpmにて10分間かけて沈降させた。各試験管の上清を捨て、ペレットを70%エタノールで一度濯いだ。70%エタノールを吸引除去し、DNAペレットを空気乾燥した。乾燥したら、各ペレットを30~50 µlのTris(10 mM)-EDTA(1 mM)緩衝液(pH 7.4)に再懸濁させ、一晩水和・可溶化させた。5~7 mlの

50

各DNA溶液を、それぞれのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 手順に使用した。

【0130】

2つの別々のPCR法を使用して、トランスフェクタントを分析した。第1の手順は、トランスフェクションに使用するDNA内に位置する部位にアニールすると予測される2つのプライマーを使用した。第1のプライマー配列は、DNA構築物のネオマイシン耐性カセットと相同で、第2の配列は約0.5 Kb離れたところに位置し、0.5 Kbの短いPCR生成物を生じた。特に、プライマー-Neo1 (5'-CTT GAA GAC GAA AGG GCC TCG TGA TAC GCC-3'、配列番号42) およびIN2521 (5'-CTG AGA CTT CCT TTC ACC CTC CAG GCA CCG-3'、配列番号43) を使用した。このPCR反応のために、Qiagen PCRキットを用いた。PCR反応混合液は、各プライマーを1 pmole、5 mlの10×反応緩衝液、10 μlのQ溶液、5 μlのDNA、および1 μlのdNTP溶液を含んでいた。H₂Oで、反応混合液を合計容量50 μlにまでした。94 °Cにて2分間の開始変性インキュベーションにより、PCR増幅を行った。次いで、94 °Cにて45秒、60 °Cにて45秒および72 °Cにて2分間のインキュベーションにより、変性、アニーリングおよび増幅を30サイクル行った。次いで、反応混合液を、72 °Cにて5分間、そして混合液がPCR装置から除かれるまで4 °Cにて、インキュベートした。あるいはまた、細胞のゲノムに組み込まれるノックアウト構築物の領域に相同な任意の他のプライマーを、標準的PCR反応において、適切な反応条件下で使用して、G418選択で生き残る細胞がDNA構築物の組込みの結果として耐性であったことを確認してもよい。

【0131】

少ない割合のトランスフェクタントしか、所望の位置 (μ 遺伝子座) にDNA組込みを含まないことが予測されるため、別のプライマー対を用いて、導入されたDNAがトランスフェクタントのゲノムに存在することだけではなく、所望の位置に組み込まれたことを確認した。適切な組込みを検出するためのPCR手順は、DNA構築物のネオマイシン耐性カセット内に位置する1つのプライマー、および (相同領域が、トランスフェクションに使用したDNA構築物に含まれる領域の外側にあるため) DNAがIgM遺伝子座の適切な部位に組み込まれた場合にのみ1.8 Kb離れてアニールすると予測される1つのプライマーを用いて行った。このプライマーは、DNA構築物が所望の位置に組み込まれた場合に、DNA構築物中で相当する配列に直に隣接するDNA配列にアニールするように設計した (DNA構築物内に存在する領域内にあり、かつゲノムにおいて隣接する領域内にある遺伝子座のDNA配列は予め決定した)。特に、プライマー-Neo1およびOUT3570 (5'-CGA TGA ATG CCC CAT TTC ACC CAA GTC TGT C-3'、配列番号44) をこの分析に用いた。このPCR反応を、第1のPCR反応について上述したようにQiagen PCRキットを用いて行って、ターゲティング構築物の細胞への組み込みを確認した。あるいはまた、このPCR分析は、任意の適切な反応条件下で、細胞のゲノムに組み込まれるノックアウト構築物の領域と相同な任意の他のプライマー、および組込み部位の上流または下流にある細胞のゲノム中の領域に相同な任意の他のプライマーを用いて行ってよい。

【0132】

これらの方法を用いて、135の個々の35 mmプレートを、DNA構築物の適切な遺伝子座へのターゲティング組込みについてスクリーニングした。このうち8プレートのDNAが、適切にターゲティングされたDNA構築物を含むと判断され、このうち3つを核移植手順において使用するために選択した。これらの細胞系は「8-1C」、「5-3C」および「10-1C」と称した。レシピエントウシへの導入に使用しない残った胚盤胞は、追加のPCR分析に供するDNAを抽出するために使用した。この分析は、トランスフェクトされた系統の初回スクリーニングにも使用したプライマーでのnested PCR法を用いて実施した。

【0133】

上記したように、μ 遺伝子座のエキソン1~4を除去するように設計された遺伝子ターゲティング構築物を用いて、3つの細胞系を生成した。これらの系統は全て、PCRに基づく試験により、ターゲティング挿入について陽性と試験され、核移植に使用した。これらの核移植で残った胚盤胞を、適切にターゲティングされた構築物を試験するPCRによりスクリーニングした。以下の陽性胚盤胞の頻度が得られた：

10

20

30

40

50

細胞系8-1C： 6/8
細胞系10-1C： 2/16
細胞系5-3C： 0/16

【0134】

妊娠40日目において、超音波検査により合計11の妊娠が検出されたが、60日目までに7胎子が死んでいた。残った4胎子を処理して、新しい胎子繊維芽細胞を再生し、残った器官を使用して、PCR分析用の小組織サンプルを作製した。分析の結果は以下の通りである：

系統8-1C： 2胎子、PCRにより1胎子がターゲティング挿入について陽性
系統10-1C： 1胎子、PCRにより1胎子がターゲティング挿入について陽性
系統5-3C： 1胎子、PCRにより1胎子がターゲティング挿入について陰性

10

【0135】

驚くべきことに、ターゲティング挿入について陽性と試験された10-1C胚盤胞の頻度はたった2/16だったにも関わらず、この細胞系から得た唯一の生存60日齢胎子はPCRで判断したところ陽性であった。8-1C由来の陽性胎子も得られた。全ての組織サンプルのDNAのサザンブロット分析を実施して、構築物が、一方の端部においてのみ正確にターゲティングされているのではなく（これは元の構築物に存在する短い相同領域のPCRにより判断）、他方の端部においても正確にターゲティングされていることを確認した。これまでの結果に基づき、2つの独立した組込み事象から、2つの重鎖ノックアウト胎子が生成したと考えられる。また、これらの胎子は、2つの異なる系統から誘導されているため、少なくとも一方は、両端部において構築物を正しく組み込んでいる可能性が高い。サザンブロット分析により、ターゲティング構築物の両端部の適切なターゲティングを確認した後、さらなる核移植を行って、追加の胎子を作り、出産させた。

20

【0136】

核移植および胚移植

K/O細胞系（8-1-C（18））で核移植を行い、8つの胚を作製した。このバッチから得た合計6つの胚を、Trans Ova Genetics（「TOG」、Iowa）の疾患を患っていない3匹のレシピエントに移植した。

【0137】

凍結胚を、疾患を患っていない10匹のレシピエントに移植して、疾患を患っていないメス繊維芽細胞系を得た。35～40日目に妊娠を確認後、胎子回収を予定した。

30

【0138】

妊娠診断および胎子回収

ノックアウト胎子細胞由来のクローン化胚を移植された18匹のレシピエントの妊娠状態を、超音波検査により調べた。結果を以下にまとめる。

【表2】

表2. μ 重鎖ノックアウトドナー細胞を用いた、40日目における妊娠

クローンID	移植したレシピエントの数	40日目における妊娠(%)
8-1-0C	5	4 (80)
10-1-C	6	4 (67)
5-3-C	5	3 (60)
合計	16	11 (69)

40

【0139】

妊娠診断

ノックアウト細胞由来のクローン化胚（8-1C）を移植した3匹のレシピエントの妊娠状態を調べた。1匹は妊娠しておらず、残りの2匹は1ヵ月後に再確認する必要があった。

【0140】

胎子回収および細胞系の樹立

50

40日目においてK/O胚で11匹の妊娠体を得た。60日目で、4匹の生存胎仔を取り出した。4匹全てから細胞系を樹立し、後に使用するために凍結保存した。また、胎仔由来の組織サンプルを回収および急速冷凍 (snap freeze) し、PCR/サザンブロット分析のためにHematech分子生物学研究所に送付した。

【0141】

4つの細胞系の全てがオスであった。メス細胞系を確保するために、Trans Ova Geneticsにおいて疾患を患っていないレシピエントで確立された妊娠55日目の妊娠体から回収した胎仔(6)から細胞系を樹立し、後にK/O細胞を樹立するために凍結保存した。最近、 μ ノックアウトを含むメス細胞系の存在が確認された。このメス細胞系を用いて、オス細胞系から生成する動物と交配され得るクローン化動物を作製して、二重 μ ノックアウトを含むものについて子孫をスクリーニングしてもよい。

10

【0142】

実施例2：HACの導入

追加の実験を行い、免疫グロブリン重鎖(μ)および軽鎖が、単独または組み合わせられて、ウシ宿主により産生され得ることを実証した。さらに、これらの実験は、免疫グロブリン鎖が再配列し、ポリクローナル血清が得られたことを実証した。これらの手順において、免疫グロブリン発現遺伝子を、ヒト人工染色体を用いて、ウシ繊維芽細胞に導入した。次いで、繊維芽細胞を核移植のために利用し、胎仔を得て、抗体産生について分析した。これらの手順および結果は以下により詳細に記載する。

【0143】

HAC構築物

先に記載された染色体クローニング系(Kuroiwaら, Nature Biotech. 18:1086-1090, 2000)を用いてヒト人工染色体(HAC)を構築した。簡単に言うと、HACを構築するために、loxP配列がHCF2遺伝子座に組み込まれた、先に報告したヒト第22染色体断片(hChr22)を、テロメア配列挿入による染色体トランケーション(Kuroiwaら, Nucleic Acid Res., 26: 3447-3448, 1998)によりAP000344遺伝子座でトランケートした。次に、AP000344遺伝子座でトランケートされた上記hChr22断片(hCF22)を含むDT40細胞クローンを、安定かつ生殖細胞系伝達性のヒトミニクロモソームSC20ベクターを含むDT40細胞クローン(「Rクローン」と称する)と融合させることにより、細胞ハイブリッドを形成した。SC20ベクターは、loxP配列を、S20断片のRNR2遺伝子座に挿入することにより作製された。SC20断片は、ヒトIg重鎖遺伝子の領域全体を含むヒト第14染色体から誘導される天然の断片である(Tomizukaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722, 2000)。得られたDT40細胞ハイブリッドは、両方のhChr断片を含んでいた。DT40ハイブリッドを、Creリコンビナーゼ発現ベクターでトランスフェクトして、hCF22とSC20ベクター間のCre/loxP仲介型染色体転座を誘導した。nested PCRを用いて安定トランスフェクタントを分析して、HCF2およびAP000344遺伝子座により規定される2.5メガ塩基のhChr22領域の、SC20ベクターのloxPクローニング部位へのクローニングを確認した。次いで、HACを含むと予想されるPCR陽性細胞を、コードされるグリーン蛍光タンパク質の蛍光に基づくFACSソーティングにより単離した。ソートされた細胞を、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)分析にもかけて、2.5メガ塩基のhChr22インサートを含むHACの存在を確認した。

20

30

40

【0144】

同様に、この染色体クローニング系を用いてHACも構築した。hChr22断片を、AP000344遺伝子座でトランケートし、次に、DT40細胞中での相同組換えにより、loxP配列をAP000553遺伝子座に組み込んだ。次いで、得られた細胞を、SC20ミニクロモソームベクターを含むRクローンと融合させた。細胞ハイブリッドを、Cre発現ベクターでトランスフェクトして、Cre/loxP仲介型染色体転座を生じさせた。AP000553およびAP000344遺伝子座により規定される、1.5メガ塩基のhChr22インサートを含むHACの生成を、PCRおよびFISH分析により確認した。

【0145】

HACおよびHACのin vivoでの機能性を、これらのHACを含むキメラマウスの作製に

50

より評価した。これらのHACをマウス胚性幹 (ES) 細胞に個々に導入し、次いでこれを、標準的な手順 (特開2001-142371号; 2000年5月11日出願) を用いたキメラマウスの作製に使用する。得られたマウスは、高度なキメラ率 (85~100%の毛色) を有しており、これらのHACを含むES細胞の高レベルな多分化能、およびこれらのHACの *in vivo* での分裂安定性を示した。さらに、HACは、HACキメラマウスの生殖細胞系を介して次の仔に伝達され、このHACの減数分裂安定性が実証された。

【0146】

これらのHACを保持するニワトリDT40細胞は、ブタペスト条約に基づき、2001年5月9日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (〒305-8566茨城県つくば市東1-1-1中央第6、日本) に寄託した。寄託番号は以下の通りである。HAC (FERM BP-7582)、HAC (FERM BP-7581)、およびSC20断片 (FERM BP-7583)。これらのHACを保持するニワトリDT40細胞はまた、台湾のFood Industry Research and Development Institute (FIRDI) にも寄託した。寄託番号および日付は以下の通りである。すなわち、HAC (CCRC 960144; 2001年11月9日)、HAC (CCRC 960145; 2001年11月9日)、およびSC20断片 (細胞系をSC20 (D) の名称で寄託; CCRC 960099; 1999年8月18日)。

【0147】

HAC中の2.5メガ塩基 (Mb) hChr22インサートは、以下のGenbank受託番号で示すBACコンティグ (contig) から構成されている。すなわち、AC002470、AC002472、AP000550、AP000551、AP000552、AP000556、AP000557、AP000558、AP000553、AP000554 AP000555、D86995、D87019、D87012、D88268、D86993、D87004、D87022、D88271、D88269、D87000、D86996、D86989、D88270、D87003、D87018、D87016、D86999、D87010、D87009、D87011、D87013、D87014、D86991、D87002、D87006、D86994、D87007、D87015、D86998、D87021、D87024、D87020、D87023、D87017、AP000360、AP00361、AP000362、AC000029、AC000102、U07000、AP000343、およびAP000344。HAC中の1.5 Mb hChr22インサートは、以下のBACコンティグから構成される。すなわち、AP000553、AP000554、AP000555、D86995、D87019、D87012、D88268、D86993、D87004、D87022、D88271、D88269、D87000、D86996、D86989、D88270、D87003、D87018、D87016、D86999、D87010、D87009、D87011、D87013、D87014、D86991、D87002、D87006、D86994、D87007、D87015、D86998、D87021、D87024、D87020、D87023、D87017、AP000360、AP00361、AP000362、AC000029、AC000102、U07000、AP000343、およびAP000344 (Dunhamら, Nature 402:489-499, 1999)。

【0148】

ウシ胎仔繊維芽細胞の作製

ウシ胎仔繊維芽細胞を作製するために、45~60日齢の胎仔を、オスおよびメス両親の系図が連続する3世代について記録された、Trans Ova (Iowa) で飼育された疾患試験済みホルスタイン牛またはジャージー牛から回収した。回収した胎仔は、一次胎仔繊維芽細胞の作製のために、HematechのWorcester分子生物学部門まで、保冷剤 (wet ice) に載せて輸送した。到着後、胎仔を、組織培養フード内の非組織培養グレードの100 mmプラスチック製ペトリ皿に移した。滅菌ピンセットおよびハサミを用いて、胚外膜および臍帯を胎仔から取り除いた。胎仔を、新しいプラスチック製ペトリ皿に移した後、頭部、四肢および内臓を取り除いた。除臓した胎仔を、以下からなる約10 mlの胎仔濯ぎ溶液を含む第3のペトリ皿に移した。すなわち、Ca²⁺およびMg²⁺を含む125 ml 1×ダルベッコ-PBS (D-PBS) (Gibco-BRL、カタログ番号14040)、0.5 ml酒石酸チロシン (8 mg/ml、Sigma、カタログ番号T-3397)、2 mlペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma、カタログ番号P-3539)、および1 mlのファンギゾン (Gibco-BRL、カタログ番号15295-017) (混合し、0.2 μmナイロンフィルターユニット [Nalgene、カタログ番号150-0020] を通して濾過した) であった。

【0149】

胎仔を、胎仔濯ぎ溶液でさらに3回洗浄し、血液の痕跡を除去し、50 ml組織培養円錐管に移し、滅菌メスで小片に細かく刻んだ。組織切片を、Ca²⁺およびMg²⁺を含まない1×D-PBS (Gibco-BRL、カタログ番号14190) で1回洗浄した。組織切片が試験管の底に沈ん

10

20

30

40

50

だ後、上清を除去し、約30 mlの細胞解離緩衝液 (Gibco-BRL、カタログ番号13151-014) と置き換えた。試験管を何回か反転させて混合し、組織培養インキュベーター中で38.5 /5% CO₂にて20分間インキュベートした。組織が試験管の底に沈んだ後、上清を除去し、等容量の新しい細胞解離緩衝液と置き換えた。組織および細胞解離緩衝液の混合液を、24 mm先を丸めたスピン棒 (spin bar) を含む滅菌75 mlトリプシン処理用ガラスフラスコ (Wheaton Science Products、カタログ番号355393) に移した。フラスコを38.5 /5% CO₂ 組織培養インキュベーターに移し、磁気攪拌プレート上に置き、約20分間の効率的な混合を可能にするのに十分な速度で攪拌した。フラスコを、組織培養フードに移し、組織切片を沈めた後、上清を除去し、1,200 rpmにて5分間の遠心分離により解離細胞を回収した。細胞ペレットを、以下から構成される小容量の完全繊維芽細胞培養培地中に再懸濁した。すなわち、440 ml MEM (BioWhittaker、カタログ番号12-169F)、50 ml照射ウシ胎仔血清、5 ml GLUTAMAX-1補助物質 (supplement) (Gibco-BRL、カタログ番号25050-061)、5 mlペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma、カタログ番号P-3539)、1.4 ml 2-メルカプトエタノール (Gibco-BRL、カタログ番号21985-023) (ウシ胎仔血清を除く全ての成分を混合し、0.2 μmナイロンフィルターユニット [Nalgene、カタログ番号151-4020]を通して濾過した) であった。そして、氷上で保存した。解離プロセスをさらに3回、各ステップの間に30 mlの細胞解離溶液を添加して、繰り返した。細胞をプールし、完全繊維芽細胞培地中で洗浄し、23および26ゲージ針、そして最後に70 μm細胞濾過器 (B-D Falcon、カタログ番号352350) に順番に通して、1つの細胞懸濁液を生成した。トリパンブルー (0.4%溶液、Sigma、カタログ番号T-8154) の存在下で血球計において数えることにより、細胞密度および生存率を決定した。

【0150】

一次繊維芽細胞を、38.5 /5% CO₂にて、完全繊維芽細胞培地中で、T75 cm²組織培養フラスコ当たり1×10⁶ 生存細胞の細胞密度で増殖させた。3日間の培養後または細胞が集密状態に達する前に、フラスコを1×D-PBS (Ca²⁺およびMg²⁺を含まない) で一度濯ぎ、10 mlの細胞解離緩衝液と5~10分間室温にてインキュベートすることにより繊維芽細胞を回収した。細胞の剥離は、倒立顕微鏡を使用して目でモニターした。このステップにおいて、上下にピペティングすることにより細胞塊が確実にバラバラになるように注意した。洗浄および定量後、遺伝子ターゲティング実験で使用するための解離した繊維芽細胞が用意できた。これらの細胞は、長期保存のために凍結保存することもできた。

【0151】

HACのウシ胎仔繊維芽細胞への導入

ミクロセル仲介型染色体移入 (MMCT) (Kuroiwaら Nature Biotech. 18:1086-1090, 2000) を使用して、HACおよび HACを、DT40細胞ハイブリッドからチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に移した。HACを含むCHOクローン (「D15クローン」) を、10% FBS (Gibco)、1 mg/mlのG418および0.2 mg/mlのハイグロマイシン Bを補足したF12 (Gibco) 培地中で、37 および5% CO₂にて、培養した。D15クローンを、12のT25フラスコにおいて増殖させた。集密度が80~90%に到達したとき、コルセミド (Sigma) を、最終濃度を0.1 μg/mlとして培地に添加した。3日後、培地を、10 μg/mlのサイトカラシン B (Sigma) を補足したDMEM (Gibco) と交換した。フラスコを、60分間、8,000 rpmにて遠心分離にかけて、ミクロセルを回収した。ミクロセルを、8 μm、5 μmおよび3 μmフィルター (Costar) に通して精製し、その後DMEM培地に再懸濁させた。これらのミクロセルを、以下に記載するように、ウシ繊維芽細胞との融合のために使用した。

【0152】

ウシ胎仔繊維芽細胞を、10% FBS (Gibco) を補足した -MEM (Gibco) 培地中で、37 および5% CO₂にて培養した。繊維芽細胞を、T175フラスコ中で増殖させた。集密度が70~80%に達したとき、0.05%トリプシンで、細胞をフラスコから剥離した。繊維芽細胞を、DMEM培地で2回洗浄し、その後ミクロセル懸濁液上にかぶせた。ミクロセル-繊維芽細胞懸濁液を、5分間、1,500 rpmにて遠心分離した後、PEG1500 (Roche) を製造元のプロトコールに従ってこのペレットに添加して、ミクロセルをウシ繊維芽細胞と融合させた。

融合後、融合細胞を、6つの24ウェルプレートに植え付け、10%FBSを補足したMEM培地中で、24時間培養した。次いで、培地を、0.7 mg/mlのG418を含む培地と交換した。G418抗生物質の存在下での約2週間の培養後、G418耐性の融合細胞を選択した。これらのG418耐性クローンを、以下に記載する核移植に使用した。

【0153】

同様に、CHOクローン C13由来の HACを、MMCTにより、ウシ胎仔繊維芽細胞に移入した。選択したG418耐性クローンを、核移植のために使用した。

【0154】

核移植、活性化および胚培養

核移植手順は、本質的に既に記載されているようにして実施した (Cibelliら, Science 1998: 280:1256-1258)。in vitro成熟卵母細胞を、成熟後18~20時間 (hpm) で除核し、紫外光 (UV) 下でのビスベンズイミド (Hoechst 33342, Sigma) 標識化により、染色体の除去を確認した。これらの細胞質体-ドナー細胞対 (couplet) を、2.4 kV/cmの単一の電気パルスを20μ秒間用いて (Electrocell manipulator 200, Genetronics, San Diego, CA)、融合させた。3~4時間後、合計移植対 (couplet) の25%をランダムなサブセットとして取り、移植された核のビスベンズイミド標識化により融合を確認した。30 hpmにて、再構築した卵母細胞および対照を、カルシウムイオノホア (5μM) で4分間 (Cal Biochem, San Diego, CA)、そしてACM培養培地に入った10μgシクロヘキシミドおよび2.5μgサイトカラシンD (Sigma) で6時間、先に記載されているように (Linら, Mol. Reprod. Dev. 1998:49:298-307; Presicceら, Mol. Reprod. Dev. 1994:38:380-385) 活性化した。活性化の後、卵子を、HEPES緩衝化ハムスター胚培養培地 (HECM-Hepes) 中で5回洗浄し、0.2 mlの胚試験鉍油 (Sigma) で覆われた、照射マウス胎仔繊維芽細胞および0.5 mlの胚培養培地を含む4ウェル組織培養プレートに入れて培養した。25~50の胚を各ウェルに入れ、38.5℃にて、周囲雰囲気中5% CO₂下で、インキュベートした。4日目に、10% FCSを、培養培地に添加した。

【0155】

胚移植

7および8日目に核移植胚盤胞を、6および7日目に同期化した未出産メスレシピエントにそれぞれ移植した。ルタリス (Lutalyse) (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, MI) を1回注射した後、発情期を検出することで、レシピエント動物を同期化した。胚移植の30日後および60日後に、レシピエントを、超音波検査により受胎産物の存在について検査し、その後30日ごとに、直腸触診により270日目まで検査した。これらのウシ胎仔におけるHACの保持は、表3にまとめてあり、以下の節においてより詳細に記載する。

【表3】

表3. ウシ胎仔におけるHAC保持のまとめ

HAC	細胞 クローン	レシピエント /胎仔番号	NT日	回収日	胎仔齢	HAC保持	
						H	L
△△	4-12	5580	2/14	4/13	58	+	+
△△	2-14	5848	2/15	4/13	57	-	-
△△	4-12	5868A	2/14	6/13	119	+	+
△△	4-12	5868B	2/14	6/13	119	+	+
△△	4-12	5542A	2/14	5/16	91	+	+
△△	4-12	5542B	2/14	5/16	91	+	+
△△	4-12	5174	2/14	5/16	91(異常)	検出されず	検出されず
△△	4-12	6097	2/14	未回収	160(7/24)	検出されず	検出されず
△	4-8	6032	1/31	3/30	58	+	+
△	2-13	5983	2/2	3/30	56	-	-
△	4-2	5968	2/2	3/30	56	+	+
△	2-22	6045	2/2	3/30	56	+	+
△	4-8	5846	1/31	4/20	79	-	-
△	2-13	6053	2/2	4/27	84	+	-
△	4-2	5996	2/1	4/20	77	+	-

10

【0156】

ヒト第14染色体の断片を含むHACの導入

SC20断片、ヒト第14染色体断片 (Ig重鎖遺伝子を含む「hchr.14fg」) を、上述したのと実質的に同じようにして、胎仔繊維芽細胞に導入した。任意の他の標準的な染色体移入方法を使用して、このHAC、またはヒトIg遺伝子を含む別のHACを、ドナー細胞に挿入してもよい。得られるドナー細胞を、上述したような技術等の標準的な核移植技術において用いて、HACを有するトランスジェニック有蹄動物を作製することができる。

20

【0157】

hchr.14fgを含む細胞からクローン胚を移植した28匹のレシピエントの妊娠状況を、超音波検査により調べた。結果を表4にまとめた。

【表4】

表4. hchr.14fg を含むドナー細胞を用いた、40日目における妊娠

クローンID	移植されたレシピエントの数	40日目における妊娠(%)
2-1	08	03(38)
4-2	10	00(00)
4-1	05	00(00)
4-1	03	01(33)
2-1	02	01(50)
合計	28	05(18)

30

【0158】

妊娠率は、予想よりも低かった。これは、胚移植中の極端で異常に暑い気候に起因すると考えられる。

【0159】

図27に示すように、HACを担持する胚の妊娠率は、非トランスジェニッククローン妊娠体と等しいようである。HAC仔ウシを担持する1匹のレシピエントは、最近、生存した健康な仔ウシを産んだ。他は数ヶ月先に産まれる。

【0160】

HACウシ胎仔中のヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現の実証

クローン化 HAC-トランスジェニックウシ胎仔を、様々な妊娠日数において取り出し、

40

50

ヒト免疫グロブリン遺伝子座の存在、再配列および発現について分析した。これらの胎仔の1匹の脾臓ならびに非リンパ系組織（肝臓および脳）からRT-PCRにより得られたゲノムDNAおよびcDNAの分析は、HACの存在、再配列および発現を示していた。

【0161】

HAC胎仔中のヒト重鎖および/または軽鎖の存在

ヒト重鎖および軽鎖がHAC胎仔に保持されているか否かを決定するため、肝臓DNAをHAC胎仔から単離し、PCRにより、ヒト重鎖および軽鎖をコードするゲノムDNAの存在について分析した。

【0162】

ゲノム重鎖DNAを検出するために、以下のプライマーを使用した。すなわち、VH3-F 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3'（配列番号1）およびVH3-R 5'-CTTGTGCTACTCCCATCACT-3'（配列番号2）であった。軽鎖DNAの検出のために使用したプライマーは、IgL-F 5'-GGAGACCACCAAACCCTCCAAA-3'（配列番号3）およびIgL-R 5'-GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT-3'（配列番号4）であった。PCR反応混合液は、18.9μlの水、3μlの10×Ex Taq緩衝液、4.8μlのdNTP混合液、10 pmolフォワードプライマーおよび10 pmolリバースプライマー、1μlのゲノムDNA、ならびに0.3μlのEx Taqを含んでいた。反応混合液を以下の条件下でインキュベートすることにより、38サイクルのPCRを行った。すなわち、85℃にて3分間、94℃にて1分間、98℃にて10秒間、56℃にて30秒間、および72℃にて30秒間である。

【0163】

図5に示すように、胎仔#5968、6032および6045はそれぞれ、ヒト重鎖（ μ ）および軽鎖（ κ ）遺伝子座の両方を含んでいた。胎仔#5996は、ヒト重鎖遺伝子座のみを含んでいた。胎仔#5983は、ヒト重鎖を含んでおらず、ヒト軽鎖を含んでいなかった可能性がある。胎仔#5846は、いずれのヒト配列も含んでいなかった。従って、胎仔#5983および5846は、HACを保持していなかった可能性がある。これらの結果は、HACが、ウシにおいて妊娠58日目まで安定して保持され得ることを示唆している。

【0164】

HAC胎仔#5996におけるヒトC μ エキソンの存在

C μ 3およびC μ 4の部分を含むmRNA転写産物に特異的なプライマーを使用して、HACが存在し、胎仔#5996のヒト μ 遺伝子座の定常領域をコードする転写産物を発現しているか否かを決定した。

【0165】

このヒト μ 重鎖のゲノム定常領域のRT-PCR分析のために、プライマー「CH3-F1」（5'-acacacatgatgacagcgtgac-3'、配列番号5）および「CH4-R2」（5'-gtggcagcaagtagacatcg-3'、配列番号6）を用いて、350塩基対のRT-PCR生成物を得た。このPCR増幅は、95℃にて5分間の開始変性インキュベーションにより行った。次いで、95℃にて1分間、59℃にて1分間および72℃にて2分間のインキュベーションにより、変性、アニーリングおよび増幅を35サイクル行った。次いで、反応混合液を、72℃にて10分間インキュベートした。以下に記載するように（図7）、プライマー17LおよびP9を用いて、再配列ウシ重鎖を検出した。内部対照として、プライマー「GAPDHフォワード」（5'-gtcatcatctctgccccttctg-3'、配列番号7）および「GAPDHリバース」（5'-aacaacttcttgatgtcatcat-3'、配列番号8）を用いて、GAPDH RNAのレベルを検出した。このGAPDH RNAの増幅のために、サンプルを、95℃にて5分間インキュベートし、その後、95℃にて1分間、55℃にて1分間および72℃にて2分間のインキュベーションを35サイクル行った。ついで、混合液を、72℃にて7分間インキュベートした。

【0166】

この分析は、胎仔#5996の脾臓のRT-PCR分析によって、対照ヒト脾臓cDNA（レーン4）およびHACキメラマウスから得たcDNA（レーン5）を用いて生成した増幅産物に合致するバンド（レーン3）が生成したことを示した（図6）。非リンパ系組織（ウシ肝臓（レーン1）またはウシ脳（レーン2））においては、このようなバンドは検出されなかった。これらの組織が、RT-PCRを支援する能力を有することは、ハウスキーピング遺伝子GADP

Hの増幅が、肝臓（図6のレーン10）および脳（図7のレーン6）の両方において上手くいったことから示された。

【0167】

妊娠77日目までのウシ重鎖遺伝子座の再配列

HAC胎仔#5996を試験して、免疫グロブリン重鎖遺伝子座再配列に必要な組換え系の発現および活性化に必要な発達プロセスを経たか否かを決定した。この分析のために、標準RT-PCR分析を行い、 μ -VH再配列体をコードするmRNA転写産物の存在を検出した。胎仔#5996の脾臓、肝臓および脳から単離したRNAを、プライマー「17L」（5'-ccctcctctttgtgctgtca-3'、配列番号9）および「P9」（5'-caccgtgctctcatcgatg-3'、配列番号10）を用いて、RT-PCRにより分析した。PCR反応混合液を、95℃にて3分間インキュベートし、その後、以下の条件を使用して、変性、アニーリングおよび増幅を35サイクル行った。すなわち、95℃にて1分間、58℃にて1分間および72℃にて2分間である。次いで、反応混合液を72℃にて10分間インキュベートした。

10

【0168】

図7のレーン5は、再配列ウシ重鎖の増幅について予測される大きさ（450塩基対）の生成物が得られたことを示す。この生成物は、再配列ウシ重鎖転写産物に対応する配列を含むことが知られている対照ウシ $C\mu$ 重鎖cDNA（レーン7）の位置と同じ位置に移動した。予測どおり、再配列重鎖は、現発達時点では、脾臓（レーン5）において発現したが、脳（レーン2）および肝臓（レーン3）では不在であった。

【0169】

HAC胎仔#5996中のヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現

ヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現は、 $C\mu$ およびVH領域の部分を含むDNAのセグメントが増幅することにより実証された。 $C\mu$ （ $C\mu 1$ ）およびVH（VH3-30）の部分を含むRNA転写産物に特異的なプライマーを用いて、再配列ヒト $C\mu$ -VDJ配列を含むRNA転写産物が存在するか否かを決定した（図8）。

20

【0170】

このRT-PCR分析のために、プライマー「 $C\mu 1$ 」（5'-caggtgcagctggtggagtctgg-3'、配列番号11）および「VH3-30」（5'-caggagaaagtgatggagtc-3'、配列番号12）を用いて、450塩基対のRT-PCR生成物を得た。このRT-PCRは、反応混合液を、95℃にて3分間インキュベートし、その後、95℃にて30分間、69℃にて30分間および72℃にて45分間でのインキュベーションを40サイクル、ならびに72℃にて10分間のインキュベーションを1サイクル行うことにより、行った。次いで、同じプライマーで、95℃にて3分間のインキュベーションを1サイクル、95℃にて1分間、59℃にて1分間、72℃にて1分間のインキュベーションを40サイクル、そして、72℃にて10分間のインキュベーションを1サイクル行うことにより、このRT-PCR生成物を再増幅した。内部対照として、上述したようにGAPDHのRT-PCR増幅を行った。

30

【0171】

図8中のゲルは、胎仔#5996由来の脾臓のRT-PCR分析により、ヒト脾臓cDNA（レーン4）またはHACキメラマウス脾臓cDNA（レーン1）を用いて生成した増幅産物と合致するバンド（レーン5）が生成したことを示す。ウシ肝臓（レーン2）またはウシ脳（レーン3）においては、このようなバンドは検出されなかった。陽性対照として、GADPH RNA（レーン8および9）の増幅は、これらの組織がRT-PCRを支援する能力を有することを示した。

40

【0172】

胎仔#5996におけるヒト重鎖領域の再配列および発現は、プライマーCH3-F3（5'-GGAGACCACCAAACCTCCAAA-3'、配列番号13）およびCH4-R2（5'-GTGGCAGCAAGTAGACATCG-3'、配列番号14）を用いたRT-PCR分析によっても実証された。これらのPCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times Ex Taq緩衝液、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのcDNA、および0.3 μ lのEx Taqを含んでいた。以下の条件下で反応混合液をインキュベートすることにより40サイクルのPCRを行った。す

50

なわち、85 にて3分間、94 にて1分間、98 にて10秒間、60 にて30秒間、および72 にて30秒間である。

【0173】

図9のレーン6および7に示すように、胎仔#5996の脾臓由来の増幅配列は、2つの陽性対照(ヒト脾臓(レーン8)および HACキメラマウス脾臓(レーン9)に由来するサンプル)に由来するスプライシングされた定常領域断片と同じ大きさであった。予測したように、正常マウス脾臓およびウシ脾臓に由来する陰性対照は、増幅配列を含まなかった(レーン1および2)。胎仔#5996の肝臓および脳由来のサンプルは、スプライシングされたヒト μ 重鎖定常領域断片と同じ大きさのスプライシングされ増幅された配列を含まなかったが、RNAサンプルを汚染するゲノムDNAから誘導されたスプライシングされていないゲノム断片の増幅配列は含んでいた(レーン3、4および5)。

10

【0174】

HAC胎仔におけるヒト重鎖遺伝子座のVDJ再配列

RT-PCR分析は、HAC胎仔#5996における重鎖遺伝子座中でのVDJ再配列をさらに実証するためにも行った。第1の反応のためにプライマーC μ -1(5'-CAGGAGAAAGTGATGGAGTC-3'、配列番号15)、第2の反応のためにプライマーC μ -2(5'-AGGCAGCCAACGGCCACGCT-3'、配列番号16)、そして両方の反応のためにプライマーVH3-30.3(5'-CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'、配列番号17)を用いて、nested RT-PCRを行った。RT-PCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times Ex Taq緩衝液、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのcDNA、および0.3 μ lのEx Taqを含んでいた。

RT-PCRは、第1の反応について以下の条件下で38サイクル行うことにより行った。すなわち、85 にて3分間、94 にて1分間、98 にて10秒間、65 にて30秒間、および72 にて30秒間であった。第2の反応については、38サイクルを以下の条件下で行った。すなわち、プライマーVH3-30.3およびC μ -2(5'-AGGCAGCCAACGGCCACGCT-3'、配列番号16)を用いて、85 にて3分間、94 にて1分間、98 にて10秒間、65 にて30秒間、および72 にて30秒間であった。

20

【0175】

図10のレーン6および7に示すように、胎仔#5996の脾臓のRT-PCR分析は、レーン8および9の陽性対照と同じ大きさの重鎖バンドを生成した。胎仔#5996の肝臓および脳由来のサンプルは、いくらかの汚染再配列DNAを含んでいた(レーン3および5)。レーン1および2の陰性対照は、正しくない大きさのバンドを生成した。

30

【0176】

配列決定による HAC再配列の確認

HAC胎仔#5996の脾臓由来のRNAの逆転写により得たcDNAを、再配列ヒト μ に特異的なプライマーで増幅し、アガロースゲル上を移動させた。C μ 1-VH3-30プライマー対での増幅により生成したバンドをゲルから切り出した。増幅したcDNAをバンドから回収し、クローニングした。再配列ヒト μ についてPCR陽性である得られたクローンから得たDNAを、精製および配列決定した(図11A)。

【0177】

この HAC胎仔由来の配列は、20を超える既知のヒト重鎖配列に対して95%を上回る相同性を有する。例えば、ヒト抗肺炎球菌抗体の μ 鎖は、この配列の領域に97%の相同性を有する(図11B)。

40

【0178】

再配列ヒト重鎖由来の追加の配列も、プライマーC μ -1およびVH3-30.3を用いた胎仔#5996の脾臓のRT-PCR分析、その後のプライマーC μ -2およびVH3-30.3を用いた再増幅により得た。CHROMA SPINカラム(CLONETECH)を用いてRT-PCR生成物を精製し、pCR2.1 TAクローニングベクター(Invitrogen)に製造元のプロトコールに従ってクローニングした。Dye Terminator配列決定反応(ABI Applied System)を、BigDye Terminator反応混合液(3 μ l)、鋳型プラスミド(200 ng)、およびC μ -2プライマー(1.6 pmol)からなる10 μ l容量の反応混合液中で行った。配列決定反応を、ABI3700シーケンサーを使用して行った

50

。この分析のために、以下の条件下で25サイクルを行った。すなわち、96 にて1分間、96 にて10秒間、55 にて5秒間、および60 にて4分間であった。

【0179】

少なくとも2つの再配列ヒト重鎖転写産物（VH3-11/D7-27/JH3/C μ およびVH3-33/D6-19/JH2/C μ （図12Aおよび図12B））が同定された。これらの結果は、ヒト μ 重鎖遺伝子座のVDJ再配列が、胎仔#5996の脾臓中の HACにおいて生じることを立証している。同じ胎仔に由来する2以上の再配列重鎖配列の同定も、 HAC胎仔が多様なヒト免疫グロブリン配列を産生する能力を有することを実証する。

【0180】

HAC胎仔におけるヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の再配列および発現

10

HACが染色体移入（transchromosomal）されたウシ胎仔繊維芽細胞から誘導されたクローン胎仔を、様々な妊娠日数にあるレシピエントウシから取り出した。HAC担持ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の存在および再配列について、胎仔を分析した。これらの組織に由来するゲノムDNAの調査から、一部の胎仔におけるヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の存在が示された。これらの胎仔の脾臓から誘導されたcDNAの調査から、これらの胎仔の一部における免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の再配列および発現が示された。FACS分析も、2匹の胎仔における脾臓リンパ球の表面上のヒト軽鎖タンパク質の発現を実証した。

【0181】

HAC胎仔におけるヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の存在

20

HAC胎仔が、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座を保持しているか否かを判断するために、58日齢胎仔#5580、57日齢胎仔#5848、ならびに91日齢胎仔#5442Aおよび5442Bの肝臓由来のゲノムDNAに対してPCR分析を行った。重鎖遺伝子座を検出するために使用したPCRプライマーは、VH3-F（5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3'、配列番号18）およびVH3-R（5'-CTTGTGCTACTCCCATCACT-3'、配列番号19）、そして軽鎖を検出するために使用したプライマーは、IgL-F（5'-GGAGACCACCAAACCTCCAAA-3'、配列番号20）およびIgL-R（5'-GAGAGTTGCAGAA GGGTYGACT-3'、配列番号21）であった。PCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times Ex Taq緩衝液、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのゲノムDNA、および0.3 μ lのEx Taqを含んでいた。以下の通り38サイクルのPCRを行った。すなわち、85 にて3分間、94 にて1分間、98 にて10秒間、56 30 にて30秒間、および72 にて30秒間であった（図13および図14）。

【0182】

図13および図14に示すように、陽性対照の58日齢胎仔#5580は、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の両方を含んでいた。さらに、91日齢胎仔#5442Aおよび5442Bも、重鎖および軽鎖遺伝子座の両方を含んでいた（図14）。対照的に、胎仔#5848は、いずれのヒト遺伝子座も含んでおらず、 HACを含んでいなかった可能性がある。これらの結果は、 HACが、ウシにおいて妊娠91日目まで安定して保持され得ることを示唆した。

【0183】

HAC胎仔#5442Aにおけるヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現

40

RT-PCRを使用して、 HAC胎仔#5542Aにおける再配列ヒト重鎖RNA転写産物の発現を検出した。使用したRT-PCRプライマーは、CH3-F3（5'-GGAGACCACCAAACCTCCAAA-3'、配列番号22）およびCH4-R2（5'-GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT-3'、配列番号23）であった。RT-PCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times Ex Taq緩衝液、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのcDNA、および0.3 μ lのEx Taqを含んでいた。以下の通り、40サイクルのRT-PCRサイクルを行った。すなわち、85 にて3分間、94 にて1分間、98 にて10秒間、60 にて30秒間、および72 にて30秒間であった。

【0184】

図15のレーン4および5は、陽性対照サンプルと大きさが近い、胎仔#5442Aの脾臓由

50

来のスプライシングされ増幅された μ 重鎖定常領域配列を含んでいた。これらの結果は、胎仔#5442Aが、その脾臓において、再配列 μ 重鎖転写産物を発現したことを示す。RNAサンプル中で汚染されたゲノムDNAから増幅されたスプライシングされていないゲノム配列の領域においては曖昧なバンドも見られた。胎仔#5442Aの肝臓および脳由来の対照サンプルは、増幅再配列重鎖配列について予想していた大きさのバンドを生成しなかった。

【0185】

HAC胎仔#5868Aにおけるヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現

RT-PCRを行って、妊娠119日目の HAC胎仔(胎仔#5868A)の脾臓における再配列ヒト重鎖RNA転写産物の発現を検出した。この分析のために使用したプライマーは、VH30-3(5'-caggtgcagctggtagtctgg-3'、配列番号24)およびCM-1(5'-caggagaaagtgatggagtc-3'、配列番号25)であった。さらに、プライマー「GAPDH up」(5'-gtcatcatctctgcccttctg-3'、配列番号26)および「GAPDH down」(5'-aacaacttcttgatgtcatcat-3'、配列番号27)を用いて、GAPDH対照転写産物を増幅した。このPCR分析のために、反応混合液を、95にて5分間インキュベートし、その後、95にて1分間、58にて1分間および72にて2分間インキュベートすることで変性、アニーリングおよび増幅を複数サイクル行った。次いで、混合液を72にて10分間インキュベートした。

【0186】

図16のレーン3は、HAC胎仔#5868Aのこの分析で生成したRT-PCR生成物を含む。このRT-PCR生成物は、再配列ヒト重鎖(470塩基対)の増幅について予測していた大きさで、ゲルにおいて、再配列ヒト重鎖転写産物に対応する配列を含むことが知られている対照cDNAと同じ位置に移動した。対照として、HAC胎仔5868A胎仔脾臓cDNAおよび正常ウシcDNAサンプルの両方が、GAPDHプライマーで増幅された場合に生成物を生成し、cDNAが増幅を支援する能力を有することを実証した(レーン7および8)。

【0187】

HAC胎仔#5442Aおよび5442Bにおけるヒト 遺伝子座の再配列および発現

ヒト の部分を含む転写産物の増幅に特異的なプライマーを用いて、再配列ヒト 軽鎖遺伝子座由来のRNA転写産物を検出した。

【0188】

図17に示すRT-PCRについては、プライマーC 1(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTGATCAG-3'、配列番号28)、C 2-3(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTTATGAG-3'、配列番号29)およびC 7(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTTACGAG-3'、配列番号30)の等モル混合液を、プライマーV 1 LEA1(5'-CCCCAAGCTTRCCKGSTYYCCTCTCCTC-3'、配列番号31)と共に使用した。RT-PCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times Ex Taq緩衝液、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのcDNA、および0.3 μ lのEx Taqを含んでいた。RT-PCR条件は以下の通りであった。すなわち、85にて3分間、94にて1分間、98にて10秒間、60にて30秒間、および72にて1分間を40サイクルであった。

【0189】

図18に示すように、このRT-PCR分析は、プライマーV 3LEA1(5'-CCCCAAGCTTGCCTGGACCCCTCTCTGG-3'、配列番号32)、V 3JLEAD(5'-ATCGGCAAAGCTTGGACCCCTCTCTGGCTCAC-3'、配列番号33)、V BACK4(5'-CCCCAAGCTTCTCGGCGCTTGTCTTAC-3'、配列番号34)の等モル混合液、ならびにプライマーC 1(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTGATCAG-3'、配列番号35)、C 2-3(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTTATGAG-3'、配列番号36)およびC 7(5'-GGGAATTCGGGTAGAAGTTCCTTACGAG-3'、配列番号37)の等モル混合液を用いても行った。RT-PCR反応条件は、図7について上述したのと同じであった。

【0190】

図17のレーン6および7、ならびに図18のレーン4および5は、陽性対照バンドと大きさが似ている胎仔#5442Aの脾臓由来のRT-PCR生成物を含んでおり、この胎仔における再配列軽鎖RNA転写産物の存在を示した。胎仔#5442B由来の脾臓サンプルは、写真では目に見えない適切な大きさの非常に弱いバンドを生成した。このRT-PCR生成物は、胎仔#544

2Bも、その脾臓において再配列軽鎖免疫グロブリン転写産物を発現したことを示す。予想通り、胎仔#5442Aおよび5442Bの脳由来のサンプルは、ヒト再配列 軽鎖転写産物を発現しなかった。

【0191】

HAC胎仔#5868Aにおけるヒト 遺伝子座の再配列および発現

再配列ヒト 軽鎖遺伝子座由来のRNA転写産物を、 HAC胎仔#5868Aにおいても検出した。この分析のために、ヒト の部分を含む転写産物の増幅に特異的なプライマーを用いて、再配列ヒト 遺伝子座の部分にコードする転写産物の HACコード発現を検出した。プライマーVL1 LEA1 (5'-cccccaagccttRccKgStYYcctctcctc-3'、配列番号38)、ならびにプライマーCL1 (5'-gggaattcgggtagaagtcactgatcag-3'、配列番号39)、CL2-3 (5'-ggg aattcgggtagaagtcacttatgag-3'、配列番号40) およびCL7 (5'-gggaattcgggtagaagtcactta cgag-3'、配列番号41) の等モル混合液をこの分析のために使用した。このRT-PCR反応のために、反応混合液を、95 にて5分間インキュベートし、次いで、95 にて1分間、60 にて1分間および72 にて2分間インキュベートすることで変性、アニーリングおよび増幅を複数サイクル行った。次いで、混合液を72 にて10分間インキュベートした。

【0192】

この分析は、 HAC#5868A (図19のレーン4) 由来の脾臓cDNAが、TCマウス脾臓cDNA (レーン6) 陽性対照と同じ大きさのRT-PCR生成物を生成したことを実証した。 HAC #5868A由来の脳または肝臓cDNA (それぞれレーン2および3) のいずれを使用しても、このようなRT-PCR生成物は検出されなかった。プライマー「GAPDH up」および「GAPDH down」を用いたハウスキーピング遺伝子GAPDHの増幅が上手くいったことで (レーン8および10)、これらの組織がそれぞれRT-PCRを支援する能力を有することが示された。

【0193】

配列決定による HAC再配列の確認

胎仔#5442A由来の脾臓サンプルに対して、プライマーC 1、C 2-3およびC 7の等モル混合液をプライマーV 1LEA1と共に、またはプライマーV 3LEA1、V 3JLEADおよびV BA CK4の等モル混合液、ならびにプライマーC 1、C 2-3およびC 7の等モル混合液を用いて、RT-PCR分析を行った。PCR生成物を、CHROMA SPINカラム (CLONETECH) を用いて精製し、pCR2.1 TAクローニングベクター (Invitrogen) に製造元のプロトコールに従ってクローニングした。Dye Terminator配列決定反応 (ABI Applied System) を、等モル混合液中のC 1、C 2-3およびC 7プライマーを用いて実施した。96 にて1分間、96 にて10秒間、55 にて5秒間および60 にて4分間を25サイクル行った。10μl反応混合液は、BigDye Terminator反応混合液 (3μl)、鋳型プラスミド (200 ng)、ならびにC 1、C 2-3およびC 7プライマー (1.6 pmol) を含んでいた。反応混合液は、ABI 3700シーケンサーを用いて分析した。

【0194】

少なくとも2つの再配列ヒト 軽鎖転写産物が同定された (V1-17/JL3/C およびV2-13/JL2/C)。これらの結果は、ヒト 軽鎖遺伝子のVJ再配列が胎仔#5442Aの脾臓中のHACにおいて生じることを実証している (図20および21)。

【0195】

HAC胎仔#5442Aおよび5442Bにおけるヒト 軽鎖およびウシ重鎖の発現のFACS分析

HAC胎仔#5442Aおよび5442B由来の脾臓リンパ球を、ヒト 軽鎖およびウシ重鎖タンパク質の発現について分析した。これらの細胞を、フィコエリトリン標識化抗ヒト 抗体と (図22Cおよび図22D)、FITC標識化抗ウシIgM抗体と (図22Dおよび22H)、または抗体無しで (図22A、図22B、図22Eおよび図22F)、4 にて20分間反応させた。その後、細胞を、2% FCSを加えたPBSで2回洗浄し、FASCaliburセルソーター上で分析した。電子的にゲートを設定するために、非抗体対照を用いて、抗体と反応した細胞のパーセンテージを計算した。これらのパーセンテージは、各ヒストグラムの下に表示している。胎仔#5442A (図22A~22D) および胎仔#5442B (図22E-22H) は、ヒト 軽鎖タンパク質およびウシ重鎖タンパク質の両方を発現した。

10

20

30

40

50

のために、この最終ベクターをNotIで直線化した。

【0201】

エレクトロポレーションによる遺伝子ターゲティング、およびトランスフェクト繊維芽細胞の薬剤選択

エレクトロポレーションのために、限られた数の集団倍加を経た 1×10^7 ウシ胎仔繊維芽細胞（例えば、実施例2に記載のように、HACまたはHACトランスジェニック胎仔から得た繊維芽細胞）の単一細胞懸濁液を、1200 rpmにて5分間遠心分離し、0.8 mlの無血清-MEM培地に再懸濁させた。再懸濁細胞を、0.4 cmエレクトロポレーションキュベット（Invitrogen、カタログ番号P460-50）に移した。次に、制限酵素で直線化した遺伝子ターゲティングベクターDNAを $30 \mu\text{g}$ 加え、1 mlピペットを用いてキュベットの中身を混合し、その後室温にて2分間インキュベーションステップを行った。キュベットを、Gene Pulser IIエレクトロポレーションシステム（Biorad）のショックチャンパーに入れ、1000ボルトおよび $50 \mu\text{F}$ にてエレクトロポレーションした。キュベットを、組織培養フードに素早く移し、エレクトロポレーションした細胞を、約30 mlの完全繊維芽細胞培地にピペットで入れた。細胞を、30の100 mm組織培養皿（Corning、カタログ番号431079）に等しく分配し、緩やかに回して細胞を均一に行き渡らせ、 $38.5 \text{ } / 5\% \text{ CO}_2$ にて16~24時間インキュベートした。吸引により培地を除去し、選択した選択薬剤を含む完全繊維芽細胞培地で置き換えた。培地は2日ごとに替え、合計7~14日間の間続けた。薬剤選択プロセスの間、相当するプレートを目でモニターして、細胞死およびコロニー形成を調べた。遺伝子ターゲティングベクターの不在下でエレクトロポレーションした繊維芽細胞を含み、薬剤選択プロセスの間にコロニーを生成しないはずの陰性対照プレートを用意した。

【0202】

薬剤耐性繊維芽細胞コロニーの採取および細胞の増殖

薬剤耐性コロニーは、薬剤選択ステップ（通常、7~14日間）の終了後、肉眼で見え、すぐにも増殖用の48ウェル組織培養プレートに移せる状態である。この移すプロセスを助けるために、個々のコロニーについて、組織培養プレートの底に色ペン（Sharpie）で丸をつけた。コロニーを含む組織培養プレートを、 $1 \times \text{D-PBS}$ （ Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない）で2回洗浄し、次いで、1プレートにつき細胞解離緩衝液の1:5希釈液を5 ml添加した。室温にて3~5分間のインキュベーションステップの後、個々のコロニーが組織培養皿の底から剥がれ始める。コロニーが剥離する前に、P200ピペットメン（pipetmen）およびエアロゾルバリアーピペットチップ（200または $250 \mu\text{l}$ ）を用いて、48ウェル組織培養プレートの単一のウェルに個々に移した。移した後、上下にピペッティングすることによりコロニーを完全に解離させ、1 mlの完全繊維芽細胞培地を添加した。細胞が確実に薬剤耐性となるように、48ウェルステージにわたり薬剤選択を続けた。移したコロニーを、 $38.5 \text{ } / 5\% \text{ CO}_2$ にて培養し、倒立顕微鏡を用いて目でモニターした。2~7日後、集密状態に達したウェルを、 $1 \times \text{D-PBS}$ （ Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない）で2回洗浄し、0.2 mlの細胞解離緩衝液を添加することでウェルの底から剥がし、その後室温にて5分間インキュベーションステップを行った。剥離後、P1000ピペットメンおよびエアロゾルピペットチップ（ $1000 \mu\text{l}$ ）を用いて、上下にピペッティングすることにより細胞をさらに解離させる。解離した繊維芽細胞の約75%を、24ウェル組織培養プレートの個々のウェルに移し、後続するPCR分析のためにさらに増殖させ、残りの25%は、第2の24ウェルプレートの単一のウェルに移して増殖させ、最終的に体細胞核移植実験に使用する。元の細胞の75%を含むプレート中の細胞が集密状態近くまで増殖したら、そのクローンからDNAを単離して遺伝子分析する。

【0203】

DNA調製

遺伝子分析のためにDNAを単離するのに使用する手順は、Lairdら、Nucleic Acids Research, 1991, Volume 19, No. 15を応用する。具体的には、24ウェルプレートの1つのウェルにおいて特定のクローンがほぼ集密状態になったら、そのウェルから培養培地を吸引し、付着細胞をPBSで2回洗浄する。PBSを吸引除去し、0.2 ml緩衝液と置き換えて、細胞

10

20

30

40

50

を溶解し、単離しようとするDNA由来の余分なタンパク質を消化する。この緩衝液は、100 mM Tris-HCl (pH 8.5)、5 mM EDTA、0.2 % SDS、200 mM NaClおよび100 μg/mlプロテイナーゼKからなる。24ウェルプレートを組織培養インキュベーターに、最低3時間戻して、DNAを放出させ、タンパク質を消化させる。この手順の粘性産物を、1.5 ml微量遠心管に移し、0.2 mlのイソプロパノールを添加して、DNAを沈降させる。遠心分離により沈降物を回収し、70%エタノールでDNAペレットを濯ぎ、通気乾燥後、10 mM Tris (pH 8) および1 mM EDTAを含む25~50 μlの緩衝液にペレットを再懸濁させる。このDNAを、クローンのPCR分析に使用する。

【0204】

クローンのスクリーニング

2つの異なる手法(両方ともポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を採用する)を用いてクローンをスクリーニングする。本節において記載する全ての手法が、任意の他の遺伝子をターゲットングするために応用でき、唯一の違いは遺伝子分析に使用するプライマーの配列である。

【0205】

第1の手法によれば、2つの別々のプライマー対を使用して、安定したトランスフェクション生成物を個々に増幅する。一方のプライマー対は、組込み部位に関係なく、クローンのゲノム中にターゲットングベクターが存在するのを検出するために使用する。プライマーは、両方ともターゲットングベクター中に存在するDNA配列にアニールするように設計する。このPCR反応由来のPCR生成物の強度は、ゲノムに組み込まれたターゲットングベクターのコピー数と相関させ得る。従って、1コピーのターゲットングベクターしか含まない細胞は、PCR反応により低い強度のバンドしか得られない。他方のプライマー対は、所望の遺伝子座に組み込まれたベクターのコピーのみを検出するように設計する。この場合、一方のプライマーは、ターゲットングベクター内でアニールするように設計し、他方のプライマーは、ターゲットングベクターに存在しない、標的遺伝子座に特異的な配列にアニールするように設計する。この場合、ターゲットングベクター中に存在しない部位のすぐ隣にターゲットングベクターが組み込まれている場合のみに、PCR生成物が検出されることにより、所望のターゲットング事象を示す。生成物が検出された場合には、そのクローンを核移植に使用する。

【0206】

ネオマイシン耐性重鎖ノックアウト構築物のために、プライマーNeo1(5'-CTT GAA GAC GAA AGG GCC TCG TGA TAC GCC-3'、配列番号42)、およびIN2521(5'-CTG AGA CTT CCT TTC ACC CTC CAG GCA CCG-3'、配列番号43)を用いて、組込み位置に関係なく、細胞におけるターゲットングベクターの存在を検出する。プライマーNeo1およびOUT3570(5'-CGA TGA ATG CCC CAT TTC ACC CAA GTC TGT C-3'、配列番号44)を用いて、μ重鎖遺伝子座に組み込まれたターゲットング構築物のコピーのみを特異的に増幅する。

【0207】

ネオマイシン耐性重鎖ノックアウト構築物の組込みを分析するこれらのPCR反応のために、Qiagen PCRキットを使用する。PCR反応混合液は、1 pmoleの各プライマー、5 μlの10×反応緩衝液、10 μlのQ溶液、5 μlのDNAおよび1 μlのdNTP溶液を含む。反応混合液を、H₂Oで合計容量50 μlにする。このPCR増幅は、94 °Cにて2分間の開始変性インキュベーションにより行う。次いで、94 °Cにて45秒間、60 °Cにて45秒間および72 °Cにて2分間のインキュベーションにより、変性、アニーリングおよび増幅を30サイクル行う。次いで、反応混合液を、72 °Cにて5分間、そして混合液がPCR装置から除去されるまで4 °Cにてインキュベートする。

【0208】

別の手法では、単一のプライマーセットを使用して、標的遺伝子座を増幅し、PCR生成物の大きさを正しいターゲットングの診断に用いる。一方のプライマーは、ターゲットングベクターに存在しない遺伝子座の領域にアニールするように設計され、他方のプライマーは、ターゲットングベクターに存在するが野生型遺伝子座にも存在する部位にア

10

20

30

40

50

ニールするように設計する。この場合、ゲノム中の所望でない部位に組み込まれたターゲットベクターは検出されない。ターゲットベクターにより欠失される領域は、その場所に挿入される薬剤選択マーカーとは大きさが異なるため、生成物の大きさは、増幅する遺伝子座が野生型遺伝子型のものかまたは標的遺伝子型のものかに左右された。ターゲットベクターの正しくない挿入を含むか、または全く挿入を含まないクローンからのDNAの増幅は、野生型遺伝子座について予測される大きさを有する単一のPCR生成物を生じる。正しくターゲット（「ノックアウト」）された対立遺伝子を含むクローンからのDNAの増幅は、2つのPCR生成物を生じる（1つは、野生型対立遺伝子の増幅を示し、もう1つは、野生型対立遺伝子中の一部の配列が、（置換する配列と長さが異なる）薬剤耐性マーカーに置き換わったために予測可能な大きさに変わったものを示す）。

10

【0209】

ピューロマイシン耐性重鎖ノックアウト構築物のために、プライマー Shortend (5'-CTG AGC CAA GCA GTG GCC CCG AG-3'、配列番号45)、および Longend (5'-GGG CTG AGA CTG GGT GAA CAG AAG GG-3'、配列番号46)を使用した。このプライマー対は、野生型重鎖遺伝子座、およびピューロマイシン構築物により適切にターゲットされた遺伝子座の両方を増幅する。2つのバンドの大きさの差は約0.7 Kbである。短いバンドの存在は、適切なターゲットを示す。

【0210】

ピューロマイシン耐性重鎖ノックアウト構築物の組込みを分析するこのPCR反応のために、Promega Master Mixキットを使用する。PCR反応混合液は、1 pmoleの各プライマー、2.5 μlのDNAおよび25 μlの2×Promega Master Mixを含む。反応混合液を、H₂Oで合計容量50 μlにする。このPCR増幅は、94 °Cにて2分間の開始変性インキュベーションにより行う。次いで、94 °Cにて45秒間、60 °Cにて45秒間および72 °Cにて2分間のインキュベーションにより、変性、アニーリングおよび増幅を30サイクル行う。次いで、反応混合液を、72 °Cにて5分間、そして混合液がPCR装置から除去されるまで4 °Cにてインキュベートする。

20

【0211】

第1ラウンドの核移植

免疫グロブリン遺伝子が不活性化されている選択した繊維芽細胞を、実施例2に記載したように核移植に用いて、内因性免疫グロブリン遺伝子に突然変異を含み、異種免疫グロブリン遺伝子をコードするHACを含むトランスジェニック有蹄動物を作製することができる。あるいはまた、標準的な方法を用いて核移植を行い、選択したトランスジェニック繊維芽細胞から得た核またはクロマチン塊（すなわち、膜に覆われていない1つ以上の染色体）を、除核した卵母細胞（米国特許出願第60/258,151号；2000年12月22日出願）に挿入してもよい。これらの方法は、内因性 (1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、プリオンおよび/またはJ鎖核酸が突然変異された細胞にも使用できる。

30

【0212】

第2ラウンドの突然変異誘発および核移植

所望であれば、細胞（例えば、胎仔繊維芽細胞）を、第1ラウンドの核移植で生成したトランスジェニック有蹄動物から得てもよい。さらなるラウンドの遺伝子ターゲットングを上述のように行って、第1のラウンドのターゲットングで不活性化された遺伝子の第2の対立遺伝子を不活性化することができる。あるいはまた、別の免疫グロブリン（例えば、μ重鎖、軽鎖、軽鎖もしくはJ鎖）、(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはプリオン遺伝子を、本ラウンドのターゲットングで不活性化してもよい。この第2ラウンドのターゲットングのためには、高濃度の抗生物質を使用するか、または異なる抗生物質耐性マーカーを有するノックアウト構築物を使用し得る。抗生物質耐性細胞は、上述したように選択できる。選択された細胞を上述したように第2ラウンドの核移植に使用して、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子に2つの突然変異を含み、そして異種免疫グロブリン遺伝子をコードするHACを含むトランスジェニック有蹄動物を作製することができる。あるいはまた、選択した抗生物質耐性細胞をまず処理して、以下に記載するようにG1期細胞を単離して、それを第2ラウンドの核移植に使用してもよい。

40

50

【0213】

核移植用にG1細胞を単離するために、単離の24時間前に、 5.0×10^5 細胞を、10 mlのMEM+FCSを含む100 mm組織培養プレート上に植え付ける。翌日、プレートをPBSで洗浄し、単離の1～2時間前に培養培地を換える。次いで、プレートを、Vortex-Genie 2 (Fisher Scientific, Houston, TX, 中速度) 上で30～60秒間振とうして、培地を除去し、1000 Gで5分間遠心し、ペレットを250 μ lのMEM+FCS中に再懸濁させる。次いで、細胞間橋が付着した新しく分裂した細胞二倍体 (cell doublet) を (これらの細胞は初期G1にあるため) 選択する。この単離手順は、「振り払い (shake off)」法と称する。

【0214】

実施例4： -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性が低減したトランスジェニック有蹄動物 10

-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子座の一方の対立遺伝子が突然変異したウシ繊維芽細胞系を、相同組換えにより作製した。 -ガラクトシルトランスフェラーゼノックアウト細胞を作製するためのDNA構築物を使用し、ピューロマイシン耐性遺伝子 (puro、実施例3に記載) および転写終結カセット (STOP) を、触媒ドメインを含むエキソン9に挿入することにより、機能性完全長 -ガラクトシルトランスフェラーゼmRNAの転写を防いだ。従って、得られる未熟 -ガラクトシルトランスフェラーゼ転写産物は触媒ドメインを欠く。DNA構築物 (すなわち、 -ガラクトシルトランスフェラーゼK0ベクター) を、3つの独立したウシ繊維芽細胞系にエレクトロポレーションし、次いで、ピューロマイシン耐性コロニーを単離した。PCR分析によれば、いくつかのコロニーでエキソン9領域において相同組換えが生じた。こうして、 -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子座の一方の対立遺伝子が突然変異されたウシ繊維芽細胞系が生成した。所望であれば、同じノックアウトベクターおよびより高濃度の抗生物質を (ホモ接合ノックアウト細胞を選択するために) 用いるか、または別のノックアウトベクターを異なる抗生物質耐性遺伝子と共に用いて、第2の対立遺伝子を突然変異させてもよい。本方法を他の有蹄動物由来の細胞に適用し、本明細書に記載する核移植法に使用するトランスジェニック細胞を作製して、本発明のトランスジェニック有蹄動物を作製してもよい。

【0215】

これらの方法は、さらに以下に記載する。

【0216】

-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼK0ベクターの構築

-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼK0ベクターを以下のように作製した (図23)。
-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のエキソン9周辺のゲノムDNAを単離するために、以下のプライマー対5'-gatgatgtctccaggatgcc-3' (配列番号61) および5'-gacaagcttaatatccgcagg-3' (配列番号62) を用いたPCRにより、DNAプローブを増幅した。このプローブを用いて、ウシゲノム ファージライブラリーをスクリーニングし、7つの陽性 ファージクローンを同定した。オスシャロレイ牛繊維芽細胞由来のDNAを含む1つのクローンを、制限マッピングによりさらに分析した。エキソン9を含むNotI - XhoIゲノム断片をpBluescriptII SK (-) にサブクローニングし、puroおよびSTOPカセットの両方を、触媒ドメインの5'側にあるNotI - XhoIゲノム断片のAvil部位に挿入した。ジフテリアトキシン遺伝子 (DT-A, Gibco) もベクター構築物に付加して、ターゲティングカセットが非相同的に組み込まれた細胞を殺した。

【0217】

トランスフェクション/ノックアウト手順

標準的なエレクトロポレーションプロトコルを用いて、以下のように3つの胎仔繊維芽細胞系 (2つはオスジャージー牛由来のもの、1つはメスジャージー牛のもの) をトランスフェクトした。ウシ胎仔繊維芽細胞を培養するために使用した培地は、500 ml MEM (Gibco, 12561-049)、50 ml ウシ胎仔血清 (Hy-Clone # ABL13080)、5 ml ペニシリン-ストレプトマイシン (SIGMA)、および1 ml 2-メルカプトエタノール (Gibco/BRL #21985-023) を含んでいた。トランスフェクション前日、顕微鏡検査で判断する目標集密度を80～10

10

20

30

40

50

0%として、細胞をT175組織培養フラスコに播種した。トランスフェクション当日、約107個のウシ繊維芽細胞をトリプシン処理し、MEM培地で1回洗浄した。細胞を800 μ lのMEMに再懸濁した後、30 μ gのDNAを細胞懸濁液に添加し、ピペティングによりよく混ぜた。細胞-DNA懸濁液を、エレクトロポレーションキュベットに移し、1,000Vおよび50 μ Fにてエレクトロポレーションした。その後、エレクトロポレーションした細胞を、血清を補足したMEM培地と共に、20の24ウェルプレート上に植え付けた。48時間の培養後、培地を、1 μ g/mlのピューロマイシンを含む培地と置き換え、細胞を2~3週間培養してピューロマイシン耐性細胞を選択した。選択後、100%に近い集密度に達した全てのコロニーを選び、ゲノムDNAをコロニーから抽出して、PCRにより所望の相同組換え事象についてスクリーニングした。

10

【0218】

ターゲッティング組込みについてのスクリーニング

上述したように、PUREGENE DNA単離キット(Gentra SYSTEMS)を製造元のプロトコールに従って使用して、ゲノムDNAを各24ウェルから個別に抽出した。各ゲノムDNAサンプルを、20 μ lの10 mM Tris-Cl (pH 8.0) および1 mM EDTA (EDTA) に再懸濁させた。以下のプライマー対5'-aagaagagaaaggtagaagacccaaggac-3' (配列番号63) および5'-cctgggtatagacaggtgggtattgtgc-3' (配列番号64) を使用して、PCRによるスクリーニングを行った。一方のプライマーの配列は、-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼK0ベクター中に位置し、他方のプライマーの配列はターゲッティング内因性遺伝子座中の組込まれたベクターのすぐ外側に位置する(図23)。従って、予想されるPCR生成物は、K0ベクターが相

20

【0219】

PCR反応混合液は、18.9 μ lの水、3 μ lの10 \times LA PCR緩衝液II (Mg^{2+} 添加)、4.8 μ lのdNTP混合液、10 pmolのフォワードプライマー、10 pmolのリバースプライマー、1 μ lのゲノムDNA、および0.3 μ lのLA Taqを含んでいた。以下の条件下で反応混合液をインキュベートすることにより、40サイクルのPCRを行った。すなわち、85 $^{\circ}$ Cにて3分間、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、98 $^{\circ}$ Cにて10秒間、および68 $^{\circ}$ Cにて15分間であった。PCR後、反応混合液を電気泳動により分析した。予測した大きさのPCR生成物を生成したピューロマイシン耐性クローンを選択した(図23)。こうして、-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子座の一方の対立遺伝子がK0ベクターにより突然変異されているウシ繊維芽細胞系がうまく生

30

【0220】

実施例5：内因性遺伝子を突然変異させるためにアデノ随伴ウイルスを用いるトランスジェニック有蹄動物の別の作製方法

細胞のゲノム中に存在する標的配列の特異的な置き換えのためにアデノ随伴ウイルス(AAV)を使用することができる(Inoueら, Mol. Ther. 3(4):526-530, 2001; Hirataら, J. Virol. 74(10):16536-42, 2000; Inoueら, J. Virol. 73(9):7376-80, 1999; およびRussellら, Nat. Genet. 18(4):325-30, 1998)。遺伝子ターゲッティング率は、より慣用的な遺伝子ターゲッティング手法と比べて非常に効率的である。AAVは、幅広い宿主範囲および組織特異性(ウシおよびヒト皮膚繊維芽細胞の両方に対する特異性を含む)を有する。従って、AAVを用いて、内因性免疫グロブリン(例えば、 μ 重鎖、 κ 重鎖、 λ 重鎖もしくはJ鎖)、-(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼまたはプリオン遺伝子中に1つ以上の突然変異を含むトランスジェニック有蹄動物細胞を作製することができる。次に、これらのトランスジェニック細胞を、本明細書に記載する核移植方法に用いて、本発明のトランスジェニック有蹄動物を作製することができる。

40

【0221】

AAVを使用することにより、ウシ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の相同組換えが、従来の遺伝子ターゲッティング法(すなわち、エレクトロポレーションおよびリポフェクション法)を使用して以前に得られたものよりも高い頻度で生じた。第1ラウンドの遺伝子ターゲッティング実験では、AAVベクターを介してDNAが導入された73の安定した形質導入体の

50

うち、適切にターゲティングされた繊維芽細胞クローンが5つ得られた。

【0222】

これらの実験は以下の通りに実施した。

【0223】

AAVノックアウトベクター

AAV構築物は、外来配列の単純な挿入、または内因性配列のAAVベクター中に存在する新しい配列による置き換えにより、遺伝子を破壊することができる。図24は、ウシ免疫グロブリン重鎖 μ 定常領域の4つのコードエキソンの全てが、2822塩基対のBamHI-XhoI断片上に存在するAAV構築物を示す。市販のベクターpMC1Neoに存在するネオマイシン耐性マーカーを含む1.16 Kb断片を、ホルスタイン牛由来の μ 重鎖遺伝子座のエキソン4に存在するSacII部位に挿入した。この遺伝子座は、実施例1に記載したノックアウトベクターを作製するために単離されたファージクローンに含まれているものであった。AAVベクターを作製するために、 μ 重鎖遺伝子座中のSacII部位を充填して平滑末端とし、次いでこれを平滑末端SalIリンカー(New England Biolabs)にライゲートした。その後、ネオマイシン耐性遺伝子を含むpMC1NeoのXhoI断片を、SalIリンカーを介して、この遺伝子座に付加されたSalI部位にライゲートした。このライゲーションは、XhoIおよびSalI制限部位が互換性のある端部を有するために実施可能である。このノックアウトベクターにより、内因性 μ 重鎖遺伝子へのネオマイシン耐性遺伝子の破壊的挿入が生じ、 μ 重鎖遺伝子が不活性化される。この遺伝子不活性化は、内因性 μ 遺伝子座の領域を欠失させることなく生じる。

10

20

【0224】

ターゲティングの間にエキソン3および4を内因性遺伝子座から除去して、これらの2つのエキソンをネオマイシン耐性遺伝子の機能性コピーで置き換えるように別のベクターを設計した(図25)。この構築物は、メスジャージー牛由来のゲノムDNAのPCR増幅により作製した。具体的には、以下のプライマーを用いて、3'相同領域を増幅した。すなわち、XbaI制限部位を付加する5'GGGGTCTAGAgcagacactacactgatgggcccttgggcc3'(配列番号65)、およびHindIII制限部位を付加する5'GGGGAAGCTTcgtgtccctggctcctgtctgacacag3'(配列番号66)である。5'相同領域は、XhoI制限部位を付加するプライマー5'GGGGCTCGAGgtcggcgaaggatggggggaggtg3'(配列番号67)、およびKpnI制限部位を付加する5'GGGGGTACcgctgggctgagctgggcagagtggg3'(配列番号68)で増幅した。これらのプライマー配列中の大文字で示すヌクレオチドは、 μ 重鎖遺伝子座にはアニールしないヌクレオチドであるが、その後のサブクローニングステップを容易にする制限部位を付加するためにプライマーに含まれる。最初の4つのグアニンは、プライマーの最端部から制限部位を分離するために付加されている。なぜなら、制限酵素は、プライマーの最端部にある部位を内部部位と同じようにはうまく切断しないからである。5'相同領域は1.5 Kbの長さであり、エキソン1および2を含む。5'相同領域はまた、エキソン3の最初の25ヌクレオチドを含んでいて、エキソン3のスプライス受容部位を維持する。スプライス受容部位は、エキソン3がスプライシングに使用されるようにして、エキソン1および2が下流膜貫通ドメインにスプライシングすることで異常な膜結合生成物を形成する可能性を防止する。3'相同領域は、1.24 Kbの長さで、エキソン4のすぐ下流にある領域を含む。

30

40

【0225】

図24に示す構築物については、ターゲティングカセットを、Ryanら(J. of Virology 70:1542-1553, 1996)が報告したウイルス長末端反復(LTR)配列を含むAAVベクターに、標準的な方法により挿入した。TtetA2パッケージング細胞系を先に記載されたように用いて(InoueおよびRussell, 1998, J. Virol. 72:7024-7031, 1998)、AAVベクターをキャプシドにパッケージングし、先に記載されたように精製した(Zolotukhinら, Gene Therapy, 6:973-985, 1999)。図25に示す構築物については、上記方法または任意の他の標準的な方法を用いて、ターゲティングカセットを、Ryanらが記載したAAVベクターまたは任意の他のAAVベクター(Stratagene製の市販ベクター等)に挿入して、ベクターを含むウイルスを作製することができる。

50

【0226】

形質導入手順

メスジャーギー牛由来の繊維芽細胞を、48ウェル組織培養プレートの1つのウェルに、1ウェルにつき40,000細胞で播種し、完全培地中で38.5 °Cおよび5% CO₂下にて、細胞がウェルの底表面に付着するまで培養した。細胞が付着したら、培地を除去し、図24に示すベクターの感染多重度(MOI)を500~20,000粒子/細胞として、AAV粒子を含む0.2 mlの新しい培地と置き換えた。MOIは、得られるコロニー数および薬剤選択期間中のこのコロニーの間隔を判断した試験的な実験に基づき選択した。プレートを一晩インキュベートした。このインキュベーションの後、形質導入ウェルをカルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSで濯ぎ、トリプシンまたは上記細胞解離緩衝液のいずれかを使用してウェルから剥離した。剥離した細胞をゆるやかにピペティングすることで均一な細胞懸濁液を得、ウェル中の細胞を10の100 mm組織培養皿に再度分配した。皿を完全培地と共に一晩インキュベートした。

10

【0227】

この100 mm皿のインキュベーションの後、培地を、350 µg/mlの濃度でG418を含む選択培地と置き換えた。皿表面上でコロニーが肉眼で見えるようになるまで、選択培地を2~3日ごとに取り換えた。この時点で、個々のコロニーを採取し、それぞれの容器に移した。

【0228】

コロニーを含む領域には、組織培養皿の外面に印をつけた。全てのコロニーに丸をつけた後、プレートから培地を吸引除去し、プレートをカルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSで3回洗浄した。洗浄後、1×トリプシンの1:25希釈液でプレートを溢れさせ、コロニーがプレートの表面から目に見えて剥離し始めるまで、室温にて放置した。プレートは静止した状態で保って、剥離したコロニーがプレートの別の場所へ浮遊するのを防いだ。ピペットチップを用いて、細胞凝集体を、50 mlの容量で採取し、ピペットチップの中身を24ウェル組織培養プレートの1つのウェルに移した。全てのコロニーを移した後、G418を含む完全培地を添加し、単離したクローンを集密状態近くまで増殖させた。

20

【0229】

個々のウェルがほぼ集密状態になったとき、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSで2回洗浄した。0.2 mlの細胞解離緩衝液を使用して、細胞を剥離した。この細胞懸濁液のうち、20 µlを新しい24ウェルプレートに写し、残った細胞は、2.0 mlの完全培地を添加した後に、元の24ウェルプレートの表面に再付着させた。元のプレートを100%の集密度までインキュベートした。新しいプレートは、後のウシクロニング手順のために、適切にターゲティングされた細胞の供給源としての役割を果たす。

30

【0230】

元の24ウェルプレートのウェルが100%の集密度に達したとき、培地を除去し、細胞をPBSで1回洗浄した。PBSを除去し、Lairdら(Nucleic Acids Res. 19:4293, 1991)を応用した細胞溶解緩衝液で置き換えた。簡単に言うと、200 mM NaCl、100 mM Tris-HCl (pH 8.5)、5 mM EDTA、0.2% SDSおよび100 µg/mlプロテイナーゼKを含む0.2 mlの溶解緩衝液を、ウェルに添加した。プレートをインキュベーターに3時間から一晩の間戻した。次いで、粘性細胞溶解産物を微量遠心管に移した。等容量のイソプロパノールを添加してDNAを沈降させた。微量遠心機中で10分間スピンの後、上清を捨て、ペレットを0.5 mlの70%エタノールで1回洗浄した。エタノールを除去した後、DNAペレットを通気乾燥させ、35 mlのTE緩衝液(10 mM Tris (pH 8) および1 mM EDTA)に再懸濁させた。3 µlのアリコートでPCR分析に使用した。

40

【0231】

PCR分析

AAV粒子が形質導入された薬剤耐性クローン由来のDNAサンプルを、PCR分析を用いて、ベクターの適切なターゲティングについてスクリーニングした。このスクリーニング法では、薬剤選択マーカーをコードするDNA内にアニールする一方のプライマー、および標

50

的遺伝子座内にアニールするが、AAVターゲティング粒子に存在する配列の外側にアニールする別のプライマーを使用する。PCR生成物は、AAVターゲティングDNAが、内因性ゲノムの所望の位置に組み込まれた場合にのみ検出される。

【0232】

これらのAAV粒子を用いた単一のターゲティング実験から得た結果を、図26に示す。この分析に基づくと、73の個別のクローンのうち5つが、適切にターゲティングされたベクターDNAを含んでいた。

【0233】

本方法はまた、図25に示すAAVベクター、または任意の他の適切なアデノウイルスもしくはアデノ随伴ウイルスベクターと共に使用され得る。所望であれば、単離したコロニー中で、異なる抗生物質耐性遺伝子（すなわち、ネオマイシン耐性遺伝子以外の遺伝子）を有するAAVベクターを形質導入することで、第2の μ 重鎖対立遺伝子を突然変異させることができる。その結果生じるホモ接合ノックアウト細胞を選択するために、感染細胞を、対応する抗生物質の存在下で培養する。あるいはまた、単離したコロニーに、ネオマイシン耐性遺伝子を含むAAVベクターを形質導入して、高濃度の抗生物質（すなわち、ヘテロ接合ノックアウト細胞は殺すが、ホモ接合ノックアウト細胞は殺さない抗生物質濃度）の存在下で培養できる。

【0234】

他の実施形態

以上の説明から、本明細書に記載した本発明を変更および改変して様々な用途および状況に応用できることが明らかであろう。このような実施形態も本発明の範囲内にある。

【0235】

本明細書中で引用した文献はすべて、個々の文献または特許出願をそれぞれ特定のかつ個別に援用したのと同様に、援用によりその内容が本明細書にふくまれているものとする。

【図面の簡単な説明】

【0236】

【図1-A】図1Aは、Igノックアウトおよびヒト人工染色体を含むウシを作製するのに使用する手順の概要である。図1A中の時系列は、Igノックアウトベクターを調製しノックアウト細胞を生成するのに予測される18ヶ月、ノックアウト細胞から胎仔を生成する2ヶ月、その後のノックアウトを行うための9ヶ月、仔ウシが産まれるまでの9ヶ月の妊娠期、仔ウシから胚が生成するまでの12ヶ月、およびHAC導入を行うための6ヶ月に基づく。図1Aおよび図1B中、「Homo」はホモ接合を示し、「Hemi」はヘミ接合を示し、「H」は重鎖を示し、「L」は軽鎖を示し、「HAC」はヒト人工染色体を示し、「HAC1」はいずれかのHACを示し、「HAC2」は第2のHACを示す。

【図1-B】図1Bは、内因性Ig遺伝子中に突然変異を含み、HACまたはHACを含むウシを作製するのに使用する方法的概要である。図1B中の時系列に関して、オスおよびメスノックアウト細胞を単離するのに、1週に250のコロニー、3ヶ月間に合計3,000のコロニーがスクリーニングされると考えられる。1,500コロニー当たり1つ以上のノックアウトコロニーが生成すると仮定する。ホモ接合ノックアウト有蹄動物は、(1)核移植の前に第2のIg突然変異を単離ノックアウト細胞に導入するか、(2)第2のIg突然変異を、第1ラウンドの核移植から生成した胚、胎仔（例えば、妊娠約60日目の胎仔）もしくは仔から得た細胞に導入し、得られたホモ接合細胞を第2ラウンドの核移植のドナー細胞として使用するか、または(3)ヘミ接合有蹄動物を交配させること、により作製し得る。

【図2-A】図2Aは、本発明による μ (IgM重鎖)ノックアウト構築物を示す。

【図2-B】図2Bは、ホルスタイン牛由来の免疫グロブリン遺伝子座の制限マップである。

【図3-A】図3Aは、図3Cに示した μ ノックアウトDNA構築物を作製するのに使用した構築物「pSTneoB」の概略図である。

【図3-B】図3Bは、図3Cに示した μ ノックアウトDNA構築物を作製するのに使用し

10

20

30

40

50

た、構築物「pLoxP-STneoB」の概略図である。

【図3 - C】 μ ノックアウトDNA構築物を示す。

【図3 - D】図3 Dは、 μ ノックアウト構築物中の第1の相同領域として使用したゲノムウシ μ 重鎖遺伝子座の1.5 kb領域のポリヌクレオチド配列である(配列番号:47)。

【図3 - E】図3 Eは、 μ ノックアウト構築物中の第2の相同領域として使用したゲノムウシ μ 重鎖遺伝子座の3.1 kb領域のポリヌクレオチド配列である(配列番号:48)。この配列において、「n」はそれぞれ任意のヌクレオチドを示すか、ヌクレオチドが無いことを示す。連続する「n」ヌクレオチドの領域は、ポリヌクレオチド配列が決定されていない約0.9~1.0 kbの領域を表す。

【図3 - F】図3 Fは、ピューロマイシン耐性ウシ μ 重鎖ノックアウト構築物の概略図である。 10

【図3 - G】図3 Gは、ウシ軽鎖cDNAのポリヌクレオチド配列である(配列番号:60)。この配列の全体または一部は、軽鎖ノックアウト構築物に使用し得る。さらに、この軽鎖は、軽鎖ノックアウト構築物に使用されるゲノム軽鎖配列を単離するのに使用し得る。

【図4】図4は、HACおよびHACの構築の概略図である。

【図5】図5は、HAC胎仔中のヒト重鎖および軽鎖をコードするゲノムDNAの存在を示すアガロースゲルの写真である。

【図6】図6は、妊娠77日目のHAC胎仔(胎仔#5996)中のヒトC μ エキソン3および4の発現を示すアガロースゲルの写真である。 20

【図7】図7は、HAC胎仔#5996中の内因性ウシ重鎖の再配列を示すアガロースゲルの写真である。

【図8】図8は、HAC胎仔#5996中の再配列ヒト重鎖の発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図9】図9は、HAC胎仔#5996中のヒト重鎖遺伝子座由来のスプライシングされた定常領域の発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図10】図10は、HAC胎仔#5996中の再配列ヒト重鎖の発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図11 - A】図11 Aは、HAC胎仔#5996由来の再配列ヒト重鎖転写産物のポリヌクレオチド配列である(配列番号:49)。 30

【図11 - B】図11 Bは、この配列(「Query(問合せ)」)のある領域と、ヒト抗肺炎球菌抗体(「Subject(対象)」)との配列アライメントである(それぞれ配列番号:50および51)。HAC胎仔#5996由来の問合せ配列については、ヒト抗肺炎球菌抗体配列の対応するヌクレオチドと異なるヌクレオチドのみを示してある。

【図12 - A】図12 Aは、HAC胎仔#5996由来の再配列ヒト重鎖転写産物の追加のポリヌクレオチド配列(配列番号:52)、およびその推定アミノ酸配列(配列番号:53)である。

【図12 - B】図12 Bは、HAC胎仔#5996由来の再配列ヒト重鎖転写産物の追加のポリヌクレオチド配列(配列番号:54)、およびその推定アミノ酸配列(配列番号:55)である。 40

【図13】図13は、HAC胎仔#5580が、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の両方を含むことを実証するアガロースゲルの写真である。

【図14】図14は、HAC胎仔#5442Aおよび5442Bが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の両方を含むことを実証するアガロースゲルの写真である。

【図15】図15は、HAC胎仔#5442A中のヒト重鎖遺伝子座に由来するスプライスマ定常領域の発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図16】図16は、HAC胎仔#5868A中のヒト重鎖遺伝子座の再配列および発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図17】図17は、HAC胎仔#5442Aおよび5442B中のヒトIg 遺伝子座の再配列および発現を示すアガロースゲルの写真である。 50

【図18】図18は、HAC胎仔#5442A中のヒトIg 遺伝子座の再配列および発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図19】図19は、HAC胎仔#5868A中のヒトIg 遺伝子座の再配列および発現を示すアガロースゲルの写真である。

【図20】図20は、HAC胎仔#5442A由来の再配列ヒト軽鎖転写産物のポリヌクレオチド配列、および対応する推定アミノ酸配列である(それぞれ、配列番号56および57)。

【図21】図21は、HAC胎仔#5442A由来の再配列ヒト軽鎖転写産物の別のポリヌクレオチド配列、および対応する推定アミノ酸配列である(それぞれ、配列番号58および59)。

【図22】図22A~Hは、HAC胎仔#5442A(図22A~図22D)および5442B(図22E~図22H)によるヒト軽鎖およびウシ重鎖タンパク質の発現のFACS分析のグラフである。これらの胎仔の脾臓由来のリンパ球を、フィコエリトリン標識化抗ヒト抗体と(図22Cおよび図22D)、FITC標識化抗ウシIgM抗体と(図22Dおよび図22H)、または抗体無しで(図22A、図22B、図22Eおよび図22F)反応させ、FASCalibur細胞ソーター上で分析した。抗体の1つで標識化された細胞のパーセンテージは、各ヒストグラムの下に表示している。

【図23】図23は、ピューロマイシン耐性遺伝子および転写終結配列を、ウシ細胞中の内因性(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子に挿入するために使用する、(1,3)-ガラクトシルトランスフェラーゼノックアウトベクターの概略図である。

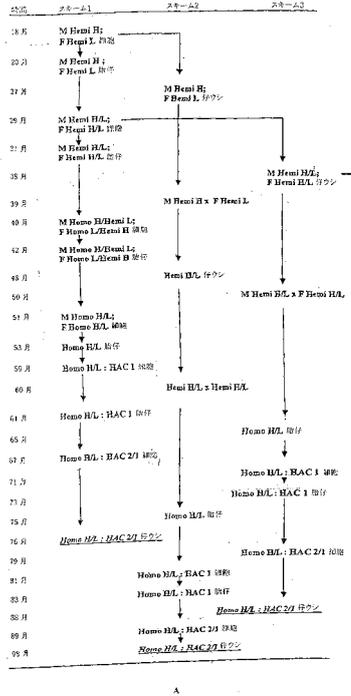
【図24】図24は、AAVターゲティングベクターの骨格として使用された、エキソン2、3および4を含むBamHI-XhoI断片の概略図である。ネオマイシン耐性マーカーを、エキソン4に挿入して、遺伝子座の挿入突然変異に使用した。その後適切なターゲティングの確認のために使用したPCRプライマーのアニリング部位の位置を示してある。

【図25】図25は、内因性ウシIgH配列を除去するために設計されたアデノ随伴ウイルス構築物の構造の概略図である。

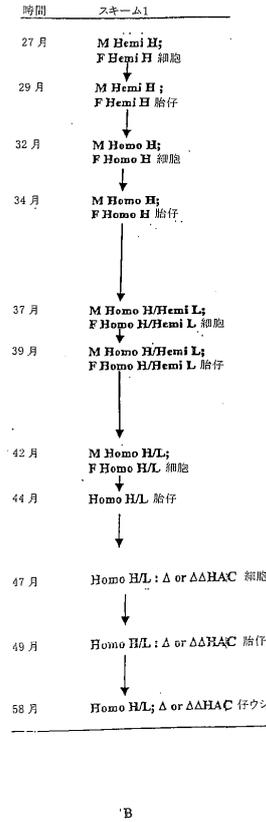
【図26】図26は、適切なターゲティング事象のために個々に形質導入されたクロンのPCR分析を示すアガロースゲルの写真である。この実験において使用したベクターは、図24に示す。適切なターゲティングを示すPCR生成物は、*印を付けた。

【図27】図27は、HAC担持胚について妊娠率をまとめて示す表である。

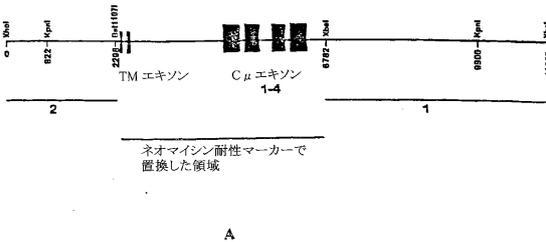
【 図 1 - A 】



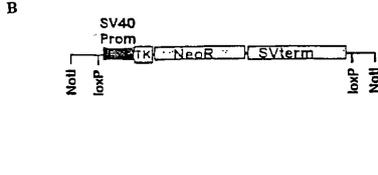
【 図 1 - B 】



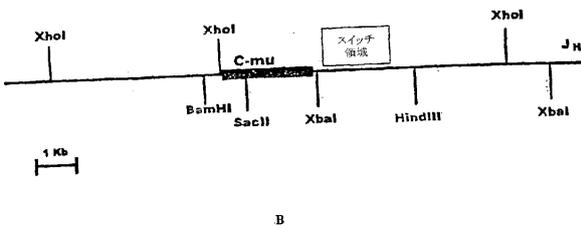
【 図 2 - A 】



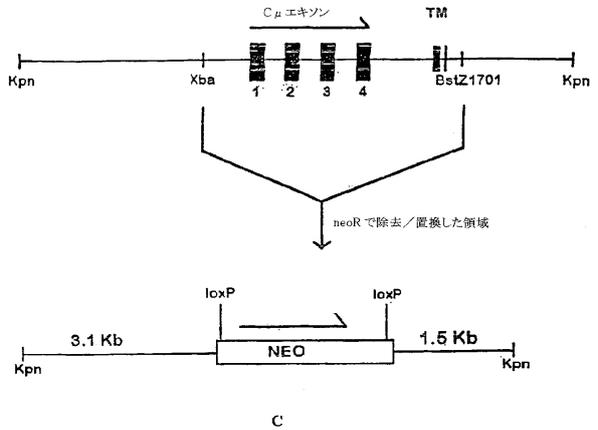
【 図 3 - B 】



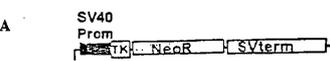
【 図 2 - B 】



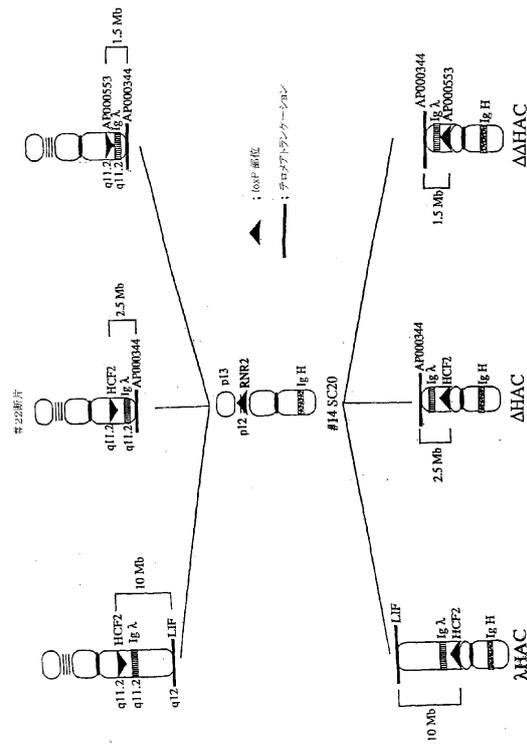
【 図 3 - C 】



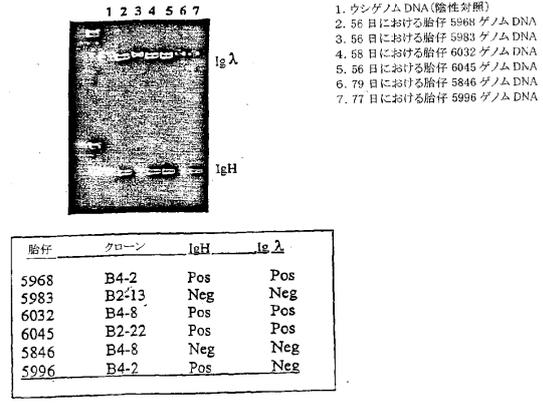
【 図 3 - A 】



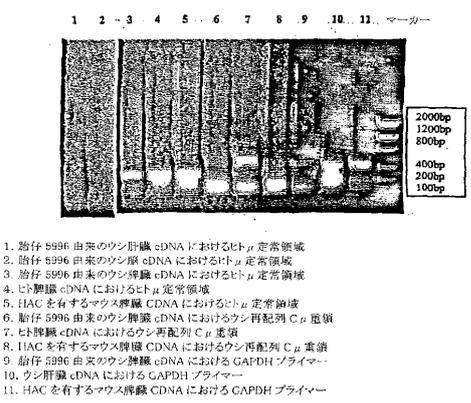
【 図 4 】



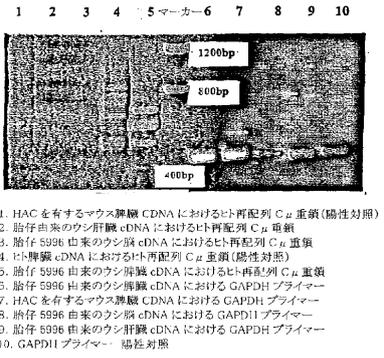
【 図 5 】



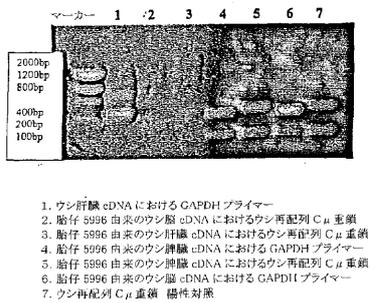
【 図 6 】



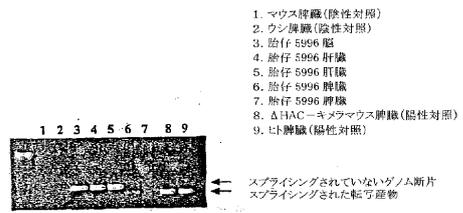
【 図 8 】



【 図 7 】



【 図 9 】



【 10 】



- 1. マウス脾臓 (陰性対照)
- 2. ウシ脾臓 (陰性対照)
- 3. 胎仔 5996 脳
- 4. 胎仔 5996 肝臓
- 5. 胎仔 5996 脾臓
- 6. 胎仔 5996 脾臓
- 7. 胎仔 5996 脾臓
- 8. ΔHAC-キメラマウス脾臓 (陽性対照)
- 9. ヒト脾臓 (陽性対照)

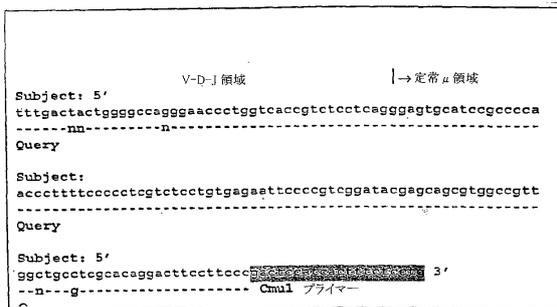
【 11 - A 】

A 配列番号49



【 11 - B 】

B 配列番号50及び51



【 12 - B 】

配列番号54及び55

5' CTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT
V E S G G G L V Q P G R S L R L S C

GCA GCG TCA GGA TTC ACC TTC AGG AAC TTT GGC ATG CAC TGG GTC CGC GAG GCT
A A S G F T F R N F G M H W V R Q A
VH3-39

CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG ACA GTT ATA TGG TAT GAC GGA AGT AAT CAA
P G K G L E W V T V I W Y D G S N Q

TAC TAT ATA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG
Y Y I D S V K G R F T I S R D N S K

AAC ATG TTG TAT CTG CAA ATG AAC ACC CTG AGA GCC GAG GAT ACG GCT GTG TAT
N M L Y L Q M N S L R A B D T A V Y

TAC TGT GCG AGA GAT CGC AAT GGC CTG AAG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC
Y C A R D R N G L K Y F D L W G R G
D5-19 ? N addition 152

ACC CTG GTC ACT GTC TCA TCA GGG AGT GCA TCC GCT CCA AXC CTT TR' C' C'
T L V T V S S G S A S A P T L F P L
Cp

GTC TCC TGT GAG AAT TCC CCG TCG GAT ACG AGC Y
V S C E N S P S D T S

【 13 】



胎仔	クローン	IgH	Igλ
5580	412	Pos	Pos
5848	214	Neg	Neg

- 1. ウシゲノム DNA (陰性対照)
- 2. 胎仔 5580 ゲノム DNA (Igλ)
- 3. 胎仔 5580 ゲノム DNA (Igλ)
- 4. 胎仔 5848 ゲノム DNA (Igλ)
- 5. 胎仔 5848 ゲノム DNA (Igλ)
- 6. 陽性対照 (ヒトゲノム DNA)
- 7. ウシゲノム DNA (陰性対照)
- 8. 胎仔 5580 ゲノム DNA (IgH)
- 9. 胎仔 5580 ゲノム DNA (IgH)
- 10. 胎仔 5848 ゲノム DNA (IgH)
- 11. 胎仔 5848 ゲノム DNA (IgH)
- 12. 陽性対照 (ヒトゲノム DNA)

【 12 - A 】

配列番号52及び53

10 19 28 37 46 55
5' GGA GCC TTG GTC AAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
G G L V K P G G S L R L S C A A S G

64 73 82 91 100 109
TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC ATG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG
F T F S D Y Y M S W I R Q A P G K G

118 127 136 145 154 163
CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGT GCT AGT ACC ATA TAC TAC GCA GAC
L E W V S Y J S S G S T I Y Y A D

VH3-11
172 181 190 199 208 217
TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT
S V K G R F T I S R D N A K N S L Y

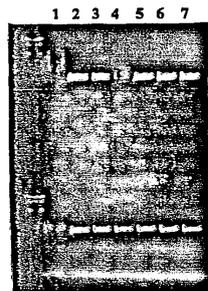
226 235 244 253 262 271
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT CTG TAT TAC TGT GCG AGA
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R

280 289 307 316 325
ATA ACT GGG GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT
I T G D A F D I W G Q G T M V T V S
D7-27 J33

334 343 352 361 370 379
TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC CTT TCC CCG CTC GTC TCC TGT GAG AAT TCC
S G S A S A P T L F P L V S C E N S

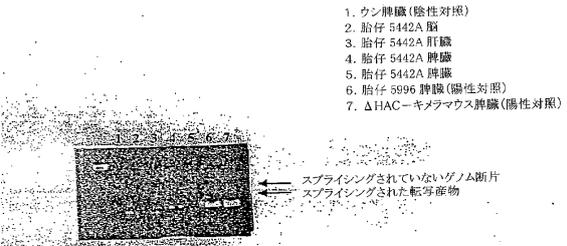
388
CCG TCG GAT ACG AGC Y
P S D T S

【 14 】



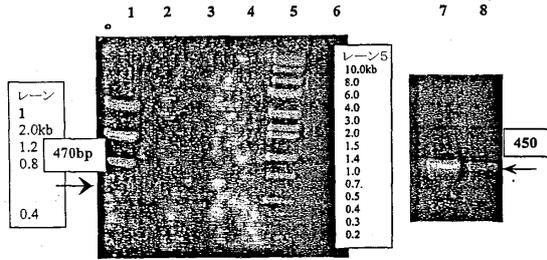
- 1. ウシゲノム DNA (陰性対照)
- 2. 胎仔 5442A ゲノム DNA (91 日)
- 3. 胎仔 5442A ゲノム DNA (91 日)
- 4. 胎仔 5442B ゲノム DNA (91 日)
- 5. 胎仔 5442B ゲノム DNA (91 日)
- 6. 胎仔 5968 ゲノム DNA (56 日; 陽性対照)
- 7. ヒトゲノム DNA (陽性対照)

【 15 】



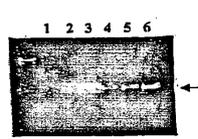
- 1. ウシ脾臓 (陰性対照)
- 2. 胎仔 5442A 脳
- 3. 胎仔 5442A 肝臓
- 4. 胎仔 5442A 脾臓
- 5. 胎仔 5442A 脾臓
- 6. 胎仔 5996 脾臓 (陽性対照)
- 7. ΔHAC-キメラマウス脾臓 (陽性対照)

【 図 16 】



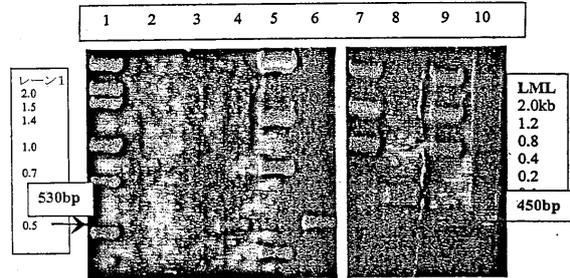
1. 低分子量マーカー 2.0, 1.2, 0.8, 0.4, 0.2 及び 0.1kb
2. 正常ウシ脾臓 cDNA 陰性対照
3. Δ ΔHAC 5868A 脾臓 cDNA
4. 空
5. Hi Lo
10.0, 6.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.4, 1.0, 0.7, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1kb
6. Te マウス HAC 脾臓 cDNA 陽性対照
7. 5868A 脾臓 cDNA 由来の GAPDH 産物
8. 正常ウシ脾臓 cDNA 由来の GAPDH 産物

【 図 18 】



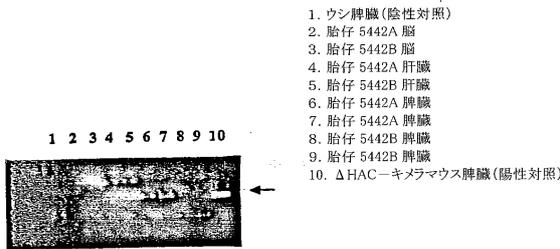
1. ウシ脾臓 (陰性対照)
2. 胎仔 5442A 脳
3. 胎仔 5442A 肝臓
4. 胎仔 5442A 脾臓
5. 胎仔 5442A 脾臓
6. Δ HAC-キメラマウス脾臓 (陽性対照)

【 図 19 】



1. Hi-Lo 分子量; 2.0, 1.5, 1.4, 1.0, 0.7, 0.5kb
2. Δ ΔHAC 5868A 胎仔脳 cDNA
3. Δ ΔHAC 5868A 胎仔肝臓 cDNA
4. Δ ΔHAC 5868A 胎仔脾臓 cDNA
5. 低分子量マーカー
6. Te マウス HAC 脾臓 cDNA 陽性対照 (530bp)
7. 低分子量マーカー
8. GAPDH Δ ΔHAC 5868A 脳 cDNA
9. 低分子量マーカー
10. GAPDH Δ ΔHAC 5868A 肝臓 cDNA

【 図 17 】



1. ウシ脾臓 (陰性対照)
2. 胎仔 5442A 脳
3. 胎仔 5442B 脳
4. 胎仔 5442A 肝臓
5. 胎仔 5442B 肝臓
6. 胎仔 5442A 脾臓
7. 胎仔 5442A 脾臓
8. 胎仔 5442B 脾臓
9. 胎仔 5442B 脾臓
10. Δ HAC-キメラマウス脾臓 (陽性対照)

【 図 20 】

配列番号 56 及び 57

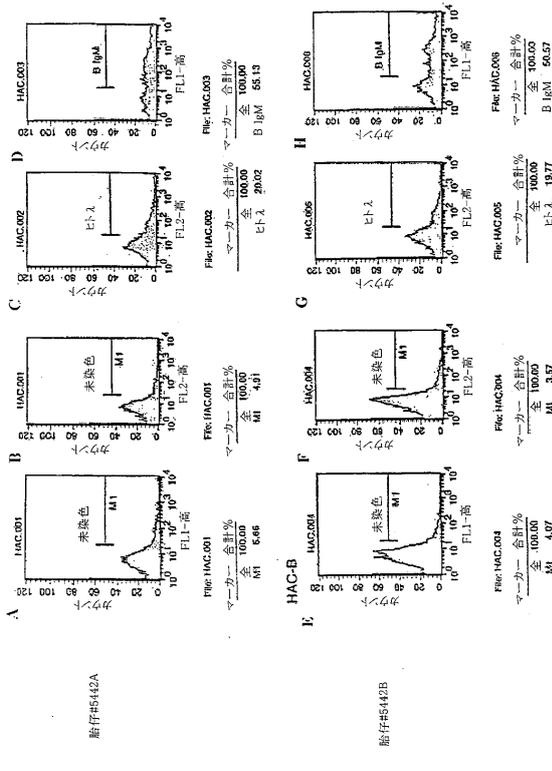
5' ACC CTC CTC ACT CAC TGT GCA GGG TTC TGG GCC CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA
T L T H C A G S W A Q S V L T Q P
CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC
P S A S G T P G Q R V T I S C S G S
AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT TAT GTA TAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA AGG
S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T
GCC CCC AAA CTC ATC TAT AGG AAT AAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC
A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D
CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC AGT GGG CTC
R F S G S K S G T S A S L A I S G L
CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AGT
R S E D E A D Y Y C A A W D S L S
GGT CTT TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC
G L F G G T K L T V L G Q P K A A
CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCA CCC TCC TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC
P S V T L F P P S S E L Q A N K A
ACA CTG GTG 3'
T L V

【 図 21 】

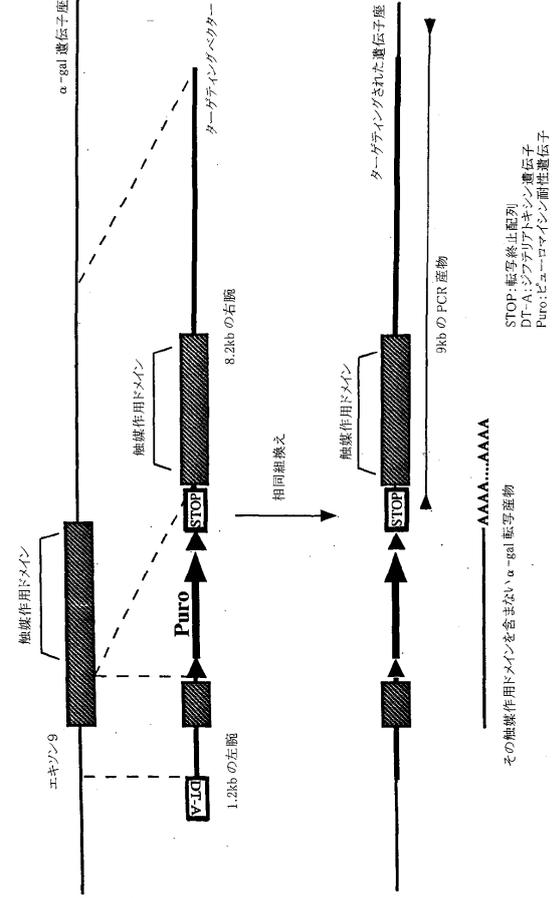
配列番号 58 及び 59

5' AGT TGG ACC CCT CTC TGG CTC ACT CTC TTC ACT CTT TGC ATA GGT TCT
S W T P L W L T L F T L C I G S
GTG GTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
V V S S E L T Q D P A V S V A L G Q
ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG
T V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W
TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC
Y Q Q K P G Q A P V L V I Y G K N N
CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT
R P S G I P D R F S G S S G N T A
TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC
S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N
TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT CTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC
S R D S S G N H L V F G G G T K L T
GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCA CCC TCC TCT
V L G Q P K A A P S V T L F P P S S
GAG CAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG 3'
E L Q A N K A T L V
C A

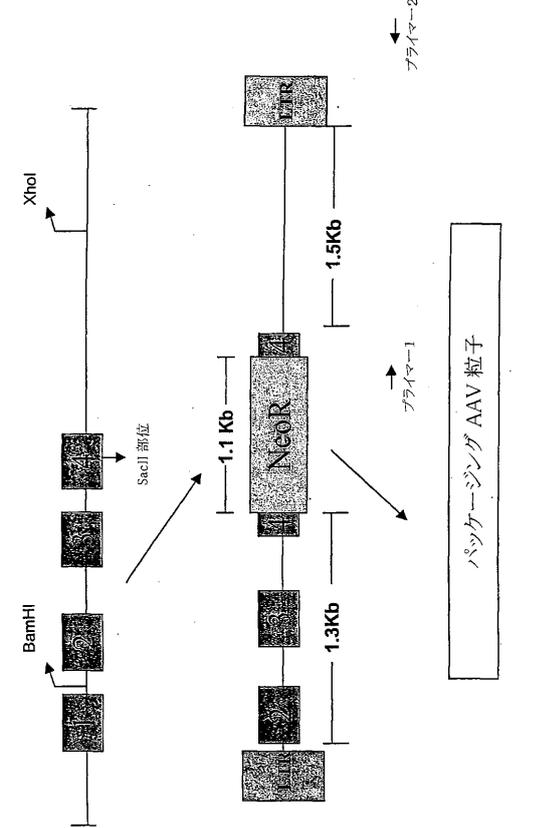
【 2 2 】



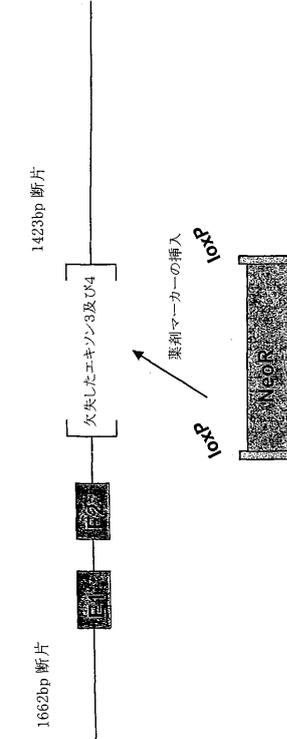
【 2 3 】



【 2 4 】



【 2 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(31)優先権主張番号 60/311,625
 (32)優先日 平成13年8月9日(2001.8.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 FERM BP-7581
 微生物の受託番号 FERM BP-7582
 微生物の受託番号 FERM BP-7583

早期審査対象出願

(72)発明者 ロブル, ジェイムス, エム.
 アメリカ合衆国 01007 マサチューセッツ州, ベルカータウン, オールド エンフィールド
 ロード 196

(72)発明者 ゴールズビー, リチャード, エー.
 アメリカ合衆国 01054 マサチューセッツ州, レベレット, デポト ロード 54

(72)発明者 フェルグソン, ステイシー, イー.
 アメリカ合衆国 01602 マサチューセッツ州, ウォールセスター, アpartment ナンバ
 ー1, インスティテュート ロード 190

(72)発明者 黒岩 義巳
 アメリカ合衆国 57108 サウス ダコタ州, スー フォールズ, エス. グレンビュー 50
 15

(72)発明者 富塚 一磨
 日本国群馬県高崎市八島町110-1 アールエム2高崎 401

(72)発明者 石田 功
 日本国神奈川県伊勢原市串橋352-6

(72)発明者 オズボーン, バーバラ, エー.
 アメリカ合衆国 01054 マサチューセッツ州, レベレット, デポト ロード 54

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第97/007671(WO, A1)
 国際公開第99/060108(WO, A1)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000年 1月18日, Vol.97, No.2, pp.722-727
 Biochim. Biophys. Acta., 1999年, Vol.1455, pp.403-418
 Current Opinion in Immunology, 1999年, Vol.11, pp.527-531
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999年 3月, Vol.96, pp.3987-3992
 J. Immunol., 1998年, Vol.161, pp.5438-5444

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 CA(STN)