(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-184752
(P2017-184752A)
(43)公開日　平成29年10月12日(2017.10.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		

審査請求 有　請求項の数 13　ＯＬ　外国語出願　（全 33 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-105855 (P2017-105855)
(22)出願日　平成29年5月29日 (2017.5.29)
(62)分割の表示　特願2014-503706 (P2014-503706)の分割
原出願日　平成24年4月2日 (2012.4.2)
(31)優先権主張番号　61/473,431
(32)優先日　平成23年4月8日 (2011.4.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　596129215
メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション
Ｍｅｒｃｋ　Ｓｈａｒｐ　＆　Ｄｏｈｍｅ　Ｃｏｒｐ．
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・０７０６５－０９０７　ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・１２６
１２６　Ｅａｓｔ　Ｌｉｎｃｏｌｎ　Ａｖｅｎｕｅ，Ｒａｈｗａｙ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ　０７０６５－０９０７　Ｕ．Ｓ．Ａ．
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｐＡＶＥＣ

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ｐＡＶＥＣプラスミド、および免疫グロブリンのようなポリペプチドの製造のためのにタンパク質を高レベルで発現させるのに有用な、プラスミドの使用方法、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するそのようなプラスミドの組換え体の製造方法を提供する。
【解決手段】制限部位を含むマルチクローニングサイトを含む線状または環状の単離されたｐＡＶＥＣプラスミド。さらに、プラスミドを切断し、該切断プラスミドの末端を、導入されるポリヌクレオチドの適合性末端に連結して、閉環状プラスミドを得ることを含む、組換えプラスミドベクターの製造方法。
【選択図】図１

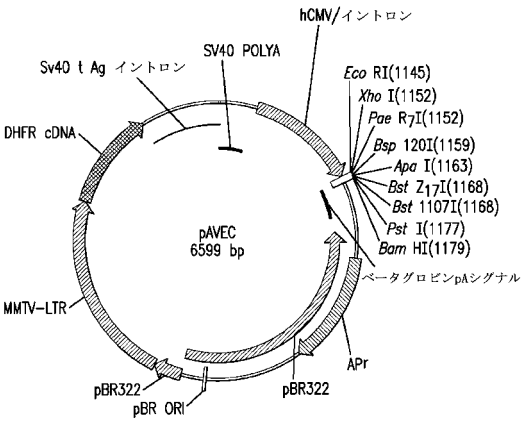


FIG.1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
制限部位：
【化１】

Bsp120I PstI

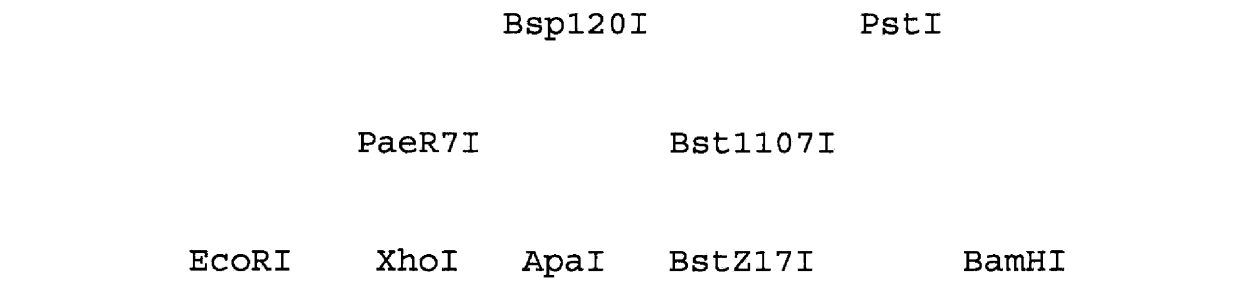
PaeR7I Bst1107I

EcoRI XhoI ApaI BstZ17I BamHI

を含むマルチクローニングサイトを含む、線状または環状である単離されたプラスミド。
【請求項２】
図１のプラスミド地図により特徴づけられる、請求項１記載のベクター。
【請求項３】
該マルチクローニングサイトが、配列番号１に記載されているヌクレオチド配列を含む、請求項１記載のベクター。
【請求項４】
配列番号２に記載されているポリヌクレオチド配列を含む、請求項１記載のベクター。
【請求項５】
請求項１記載のプラスミドを切断し、該切断プラスミドの末端を、導入されるポリヌクレオチドの適合性末端に連結して、閉環状プラスミドを得ることを含む、組換えプラスミドベクターの製造方法。
【請求項６】
該導入ポリヌクレオチドが免疫グロブリン鎖をコードしている、請求項５記載の製造方法。
【請求項７】
該免疫グロブリン鎖が、アブシキシマブ（Ａｂｃｉｘｉｍａｂ）、アダリムマブ（Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ）、アレムツズマブ（Ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、バシリキシマブ（Ｂａｓｉｌｉｘｉｍａｂ）、ベバシズマブ（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）、セツキシマブ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）、セルトリズマブ・ペゴール（Ｃｅｒｔｏｌｉｚｕｍａｂ ｐｅｇｏｌ）、ダロツズマブ（Ｄａｌｏｔｕｚｕｍａｂ）、ダクリズマブ（Ｄａｃｌｉｚｕｍａｂ）、デノスマブ（Ｄｅｎｏｓｕｍａｂ）、エクリズマブ（Ｅｃｕｌｉｚｕｍａｂ）、エファリズマブ（Ｅｆａｌｉｚｕｍａｂ）、ゲムツズマブ（Ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、イブリツモマブ・チウキセタン（Ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ ｔｉｕｘｅｔａｎ）、インフリキシマブ（Ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、ムロモナブ（Ｍｕｒｏｍｏｎａｂ）－ＣＤ３、ナタリズマブ（Ｎａｔａｌｉｚｕｍａｂ）、オマリズマブ（Ｏｍａｌｉｚｕｍａｂ）、パリビズマブ（Ｐａｌｉｖｉｚｕｍａｂ）、パニツムマブ（Ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）、ロバツムマブ（Ｒｏｂａｔｕｍｕｍａｂ）、トシツモマブ（Ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）、ＡＬＤ５１８またはトラスツズマブ（Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）からなる群から選択されるメンバーの重鎖または軽鎖であり、あるいは該免疫グロブリン鎖が、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＥＧＦ、ＥＧＦＲ、ＰＤ－１、ＴＮＦアルファ、ＴＧＦベータ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＳＬＰ、Ｎａｖ１．７、Ｎａｖ１．８、ＥＲＫ、ＭＥＫ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＩＬ－６Ｒ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ－２３ｐ１９、ＩＬ２３Ｒ、ＰＣＳＫ９、ＣＤ２０、ＲＡＮＫＬ、ＲＡＮＫ、ＣＤ３３、ＣＤ１１ａ、ＥｒｂＢ２、ＩｇＥ、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、ＨＩＶ抗原、ＨＣＶ抗原および呼吸器性シンシチウムウイルス（ＲＳＶ）抗原からなる群から選択される抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フ

ラグメントの重鎖または軽鎖である、請求項６記載の製造方法。
【請求項８】
請求項５記載の製造方法の産物である組換えプラスミドベクター。
【請求項９】
請求項１記載のベクターを含む単離された宿主細胞。
【請求項１０】
細菌細胞または哺乳類細胞である、請求項９記載の宿主細胞。
【請求項１１】
単離された宿主細胞における組換えポリペプチドの製造方法であって、該ポリペプチドの発現を可能にする条件下、請求項５記載の組換えベクターを該宿主細胞内に導入することを含む製造方法。
【請求項１２】
該ポリペプチドを精製することを更に含む、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
請求項１記載のプラスミドベクターと１以上の追加的成分とを含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１１年４月８日付け出願の米国仮特許出願第６１／４７３，４３１号（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）の利益を主張するものである。
【０００２】
発明の分野
本発明の分野は、例えば、関心のあるポリペプチドを発現させるために使用されうるプラスミドに関する。
【背景技術】
【０００３】
治療用タンパク質の商業的製造のための細胞培養は、高い経費を要する方法である。必要な設備は高くつき、研究開発および製造のコストは高い。細胞培養１リットル当たりに製造される治療用タンパク質の量を最大にする細胞培養方法の開発は、与えられた量の該タンパク質を製造するのに必要な資源を最小にするであろう。したがって、大量のタンパク質を製造する商業的に実施可能な試薬を使用することが望ましい。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
天然に存在する多数の細胞は標準的な培養条件下で所望のタンパク質を大量には産生しない。したがって、培養内の細胞に大量の治療用タンパク質を産生させる細胞培養方法の広範な研究開発が行われる必要がある。典型的には、タンパク質を高レベルで発現させるのに有用なプラスミドベクターの特定は相当な創作力を要する。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明は、一部には、例えば配列番号２のヌクレオチド配列を含む、以下の制限部位を含むマルチクローニングサイトを含む線状または環状の単離されたｐＡＶＥＣプラスミドを提供する。
【０００６】

【化１】



例えば、該プラスミドベクターは、図１のプラスミド地図により特徴づけられ、ここで、該プラスミドは、配列番号１に記載されているヌクレオチド配列を含む。ｐＡＶＥＣプラスミドベクターは環状であり、したがって自律的異所性生成能を有することが可能であり、あるいは線状であり、例えば宿主細胞の染色体ＤＮＡ内への組込みに使用可能でありうる。

【０００７】

本発明は更に、ｐＡＶＥＣプラスミドを切断し、該切断プラスミドの末端を導入ポリヌクレオチド［例えば、免疫グロブリン、例えば、アブシキシマブ（Ａｂｃｉｘｉｍａｂ）、アダリムマブ（Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ）、アレムツズマブ（Ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、バシリキシマブ（Ｂａｓｉｌｉｘｉｍａｂ）、ベバシズマブ（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）、セツキシマブ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）、セルトリズマブ・ペゴール（Ｃｅｒｔｏｌｉｚｕｍａｂ ｐｅｇｏｌ）、ダロツズマブ（Ｄａｌｏｔｕｚｕｍａｂ）（ＭＫ０６４６）、ダクリズマブ（Ｄａｃｌｉｚｕｍａｂ）、デノスマブ（Ｄｅｎｏｓｕｍａｂ）、エクリズマブ（Ｅｃｕｌｉｚｕｍａｂ）、エファリズマブ（Ｅｆａｌｉｚｕｍａｂ）、ゲムツズマブ（Ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、イブリツモマブ・チウキセタン（Ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ ｔｉｕｘｅｔａｎ）、インフリキシマブ（Ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、ムロモナブ（Ｍｕｒｏｍｏｎａｂ）－ＣＤ３、ナタリズマブ（Ｎａｔａｌｉｚｕｍａｂ）、オマリズマブ（Ｏｍａｌｉｚｕｍａｂ）、パリビズマブ（Ｐａｌｉｖｉｚｕｍａｂ）、パニツムマブ（Ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）、ロバツムマブ（Ｒｏｂａｔｕｍｕｍａｂ）、トシツモマブ（Ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）ＡＬＤ５１８およびトラスツズマブ（Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）、あるいは抗体またはその抗原結合性フラグメント（ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＥＧＦ、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＴＧＦベータ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、Ｎａｖ１．７、Ｎａｖ１．８、ＥＲＫ、ＭＥＫ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＩＬ－６、ＩＬ－６Ｒ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ－２３ｐ１９、ＩＬ－２３Ｒ、ＰＣＳＫ９、ＣＤ２０、ＲＡＮＫＬ、ＲＡＮＫ、ＣＤ３３、ＣＤ１１ａ、ＥｒｂＢ２、ＩｇＥ、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、ＨＩＶ抗原、ＨＣＶ抗原および呼吸器性シンシチウムウイルス（ＲＳＶ）抗原からなる群から選択される抗原に特異的に結合するもの）の重鎖もしくは軽鎖である免疫グロブリン鎖をコードするもの］の適合性末端に連結して、閉環状プラスミドを得ることを含む、組換えプラスミドの製造方法を含み、この場合、例えば、該導入ポリヌクレオチドは、該プラスミド内のプロモーター、例えばｈＣＭＶプロモーターに機能的に連結されている。そのような方法により製造されるいずれの組換えプラスミドも本発明の一部を構成する。

【０００８】

本発明は更に、本発明のｐＡＶＥＣプラスミドのいずれかを含む単離された宿主細胞を含む単離された宿主細胞（例えば、細菌細胞、または哺乳類細胞、例えばＣＨＯ細胞）を含む。

【０００９】

本発明はまた、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む本発明のいずれかの組換えｐＡＶＥＣプラスミドベクターを、該ポリペプチドの発現を可能にする条件下、宿主細胞内に導入し、所望により該ポリペプチドを精製することを含む、単離された宿主細胞における組換えポリペプチドの製造方法を提供し、この場合、例えば、該ポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドは、該プラスミド内のプロモーター、例えばｈＣＭＶプロモーターに機能的に連結されている。

【００１０】

更に、本発明は、本発明のｐＡＶＥＣプラスミドベクターと１以上の追加的成分とを含むキットを含む。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】ｐＡＶＥＣプラスミド地図。

【図２】ｐＡＩＬ１７Ｌプラスミド地図。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

本発明は、いずれかの細胞、例えば哺乳類細胞、細菌細胞、酵母細胞または昆虫細胞における組換えタンパク質発現に有用な発現ベクターを提供する。該ベクターは、広範な組換えタンパク質を一過性または安定に発現させるために使用されうる。該ベクターのマルチクローニングサイトは、種々の発現カセットを収容するための多数の一般的または稀有な制限部位を提供する。

【００１３】

ｐＡＶＥＣプラスミドは、図１に記載されているプラスミド地図により特徴づけられる、および／または配列番号１のヌクレオチド配列を含む若しくはそれからなるプラスミドである。該用語はまた、ｐＡＶＥＣプラスミドを切断し、該切断プラスミドの末端を導入ポリヌクレオチドの適合性末端に連結して、該導入ポリヌクレオチドを含む閉環状プラスミドを得ることを含む製造方法により製造される組換えプラスミドを含む。

【００１４】

分子生物学

本発明においては、当技術分野の技量の範囲内の通常の分子生物学、微生物学および組換えＤＮＡ技術が用いられうる。そのような技術は文献中に十分に説明されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ　＆　Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（本明細書中では「Ｓａｍｂｒｏｏｋら，１９８９」）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ ＩおよびＩＩ（Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖｅｒ編，１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（ＭＪ．Ｇａｉｔら，１９８４）；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ　＆　ＳＪ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編（１９８５））；Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ　＆　ＳＪ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編，（１９８４））；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編，（１９８６））；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６））；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら，（編），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（１９９４）を参照されたい。

【００１５】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」または「核酸分子」はＤＮＡおよびＲＮＡを含む。例えば、本発明の１つの実施形態においては、ポリヌクレオチドは環状プラスミドｐＡＶＥＣである。

【００１６】

「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」は核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）における一連のヌクレオチドであり、２以上のヌクレオチドの鎖

のいずれかを意味する。

【００１７】

発現産物、例えばＲＮＡまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン鎖）を「コード」する配列または「コード配列」は、発現されると該産物の産生をもたらすヌクレオチド配列である。

【００１８】

本明細書中で用いる「オリゴヌクレオチド」なる語は、遺伝子、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡまたは関心のある他の核酸をコードするゲノムＤＮＡ分子、ｃＤＮＡ分子またはｍＲＮＡ分子にハイブリダイズ可能でありうる、一般には３００ヌクレオチド以下（例えば、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１５０、１７５、２００、２５０または３００ヌクレオチド）の核酸を意味する。オリゴヌクレオチドは、通常、一本鎖であるが、二本鎖であることも可能である。オリゴヌクレオチドは、例えば、^{32}Ｐ－ヌクレオチド、^{3}Ｈ－ヌクレオチド、^{14}Ｃ－ヌクレオチド、^{35}Ｓ－ヌクレオチドの取り込みにより、または例えばビオチンのような標識が共有結合したヌクレオチドの取り込みにより、標識されうる。１つの実施形態においては、標識されたオリゴヌクレオチドは、核酸の存在を検出するためのプローブとして使用されうる。もう１つの実施形態においては、オリゴヌクレオチド（そのうちの一方または両方が標識されうる）は、遺伝子の完全長または断片をクローニングするための又は核酸の存在を検出するためのＰＣＲプライマーとして使用されうる。一般に、オリゴヌクレオチドは、例えば核酸合成装置により、合成的に製造される。

【００１９】

「タンパク質配列」、「ペプチド配列」もしくは「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」はタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドにおける一連の２以上のアミノ酸を意味する。

【００２０】

「タンパク質」、「ペプチド」または「ポリペプチド」は２以上のアミノ酸の連続鎖を含む。

【００２１】

「単離されたポリヌクレオチド」または「単離されたポリペプチド」なる語は、細胞において若しくは組換えＤＮＡ発現系において通常見出される他の成分またはいずれかの他の混入物から部分的または完全に分離された、それぞれ、ポリヌクレオチド（例えば、ＲＮＡもしくはＤＮＡ分子または混合重合体）またはポリペプチドを含む。これらの成分には、細胞膜、細胞壁、リボソーム、ポリメラーゼ、血清成分および外来性ゲノム配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００２２】

単離されたポリヌクレオチド（例えば、ｐＡＶＥＣ）またはポリペプチドは、好ましくは、実質的に均一な分子組成物であるが、ある程度の不均一性を伴いうる。

【００２３】

「宿主細胞」なる語は、該細胞による物質の産生、例えば、該細胞による遺伝子、ポリヌクレオチド、例えば環状プラスミド（例えば、ｐＡＶＥＣ）またはＲＮＡまたはタンパク質の発現または複製のために任意の様態で選択され、修飾され、トランスフェクトされ、形質転換され、成長され又は使用され若しくは操作される任意の生物の任意の細胞を含む。例えば、宿主細胞は、ｐＡＶＥＣプラスミドを維持しうる、そして本発明の１つの実施形態においては、該プラスミドにおけるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、例えば免疫グロブリン鎖の発現を促進しうる、哺乳類細胞または細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、あるいはいずれかの単離された細胞でありうる。哺乳類宿主細胞の例には、限定的なものではないが、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＣＨＯ－Ｋ１細胞、ＣＨＯ－ＤＸＢ－１１細胞、ＣＨＯ－ＤＧ４４細胞、ウシ乳房上皮細胞、マウスＳｅｒｔｏｌｉ細胞、イヌ腎細胞、バッファローラット肝細胞、ヒト肺細胞、マウス乳癌細胞、ラット繊維芽細胞、ウシ腎（ＭＤＢＫ）細胞、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２細

胞、ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ　５細胞、ＦＳ４細胞、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞、ＨｅＬａ細胞、乳児ハムスター腎（ＢＨＫ）細胞、アフリカミドリザル腎（ＣＯＳ）細胞、ヒト肝細胞癌（例えば、Ｈｅｐ　Ｇ２）細胞、Ａ５４９細胞などが含まれる。１つの実施形態においては、哺乳類宿主細胞はヒト宿主細胞である。哺乳類宿主細胞は、当技術分野で公知の方法により培養されうる（例えば、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　５６：２２１（１９８３），Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ　２ｎｄ　Ｅｄ．，Ｒｉｃｋｗｏｏｄ，Ｄ．およびＨａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．編，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９２）を参照されたい）。適当な大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の例には、ＤＨ１、ＤＨ５、ＤＨ５アルファ、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、ＳＵＲＥ、ＳＣＳ１１０、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ　１０およびＨＢ１０１が含まれる。本発明のもう１つの実施形態においては、本発明のｐＡＶＥＣプラスミドは宿主細胞内で異所的に維持され、および／または宿主細胞の染色体ＤＮＡ内に組込まれる。そのような宿主細胞およびその使用方法（例えば、本明細書に記載されているもの）は本発明の一部を構成する。

【００２４】

本発明のベクター、例えばｐＶＥＣは、当技術分野で公知の多数の技術のいずれかにより、例えばデキストラン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈、リポフェクション、核内への該ベクターの直接マイクロインジェクション、または与えられた宿主細胞型に適したいずれかの他の手段により、宿主細胞内に導入されうる。

【００２５】

「カセット」または「発現カセット」は、例えば一定の制限部位において、ベクター内に挿入されうる、発現産物（例えば、ペプチドまたはＲＮＡ）をコードするＤＮＡコード配列またはＤＮＡセグメントを意味する。発現カセットは、ＤＮＡコード配列に機能的に連結されたプロモーターおよび／またはターミネーターおよび／またはポリＡシグナルを含みうる。

【００２６】

一般に、「プロモーター」または「プロモーター配列」は、細胞内で（例えば、直接的に又は他のプロモーター結合タンパク質もしくは物質を介して）ＲＮＡポリメラーゼに結合しコード配列の転写を開始させうるＤＮＡ調節領域である。プロモーター配列は、一般に、その３’末端において、転写開始部位に結合しており、いずれかのレベルで転写を開始させるのに必要な最少数の塩基または要素を含むよう上流（５’方向）に伸長している。該プロモーター配列内には、転写開始部位（簡便には、例えば、ヌクレアーゼＳ１でのマッピングにより定められる）、およびＲＮＡポリメラーゼの結合をもたらすタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が存在しうる。プロモーターは、エンハンサーおよびリプレッサー配列を含む他の発現制御配列に、または発現されるべき核酸に機能的に結合または機能的に連結されていることが可能である。発現制御配列がプロモーターに機能的に結合または機能的に連結されていると言えるのは、それが該プロモーターからの発現を調節する場合である。

【００２７】

遺伝子発現を制御するために使用されうるプロモーターには以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：ＳＲαプロモーター（Ｔａｋｅｂｅら，Ｍｏｌｅｃ．ａｎｄ　Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏ．８：４６６－４７２（１９８８））、ヒトＣＭＶ最初期プロモーター（Ｂｏｓｈａｒｔら，Ｃｅｌｌ　４１：５２１－５３０（１９８５）；Ｆｏｅｃｋｉｎｇら，Ｇｅｎｅ　４５：１０１－１０５（１９８６））、マウスＣＭＶ最初期プロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター領域（Ｂｅｎｏｉｓｔら，Ｎａｔｕｒｅ　２９０：３０４－３１０（１９８１））、オルギア・シュードツガタ（Ｏｒｇｙｉａ　ｐｓｅｕｄｏｔｓｕｇａｔａ）最初期プロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１４４１－１４４５（１９８１））、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒら，Ｎａｔｕ

ｒｅ ２９６：３９－４２（１９８２））；原核生物発現ベクター、例えばβ－ラクタマーゼプロモーター（Ｖｉｌｌａ－Ｋｏｍａｒｏｆｆら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７５：３７２７－３７３１（１９７８））またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２１－２５（１９８３））；ならびに酵母または他の真菌由来のプロモーター、例えばＧＡＬ１、ＧＡＬ４またはＧＡＬ１０プロモーター、ＡＤＨ（アルコールデヒドロゲナーゼ）プロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモーターまたはアルカリホスファターゼプロモーター。

【００２８】

ウイルス長末端反復プロモーター、例えばマウス乳癌ウイルス長末端反復（ＭＭＴＶ－ＬＴＲ）（Ｆａｓｅｌら，ＥＭＢＯ Ｊ．１（１）：３－７（１９８２））、モロニーマウス肉腫ウイルス長末端反復（Ｒｅｄｄｙら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７（９）：５２３４－５２３８（１９８０））、モロニーマウス白血病ウイルス長末端反復（Ｖａｎ Ｂｅｖｅｒｅｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７（６）：３３０７－３３１１（１９８０））、ＨＩＶ ＬＴＲ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＢ１００２４５）、ウシフォーミーウイルスＬＴＲ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿００１８３１）、ＲＳＶ ５’－ＬＴＲ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号Ｋ００００８７）、ＨＩＶ－２ ＬＴＲ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿００１７２２）、トリレトロウイルスＬＴＲ（Ｊｕら，Ｃｅｌｌ ２２：３７９－３８６（１９８０））およびヒトヘルペスウイルスＬＴＲ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿００１８０６）が本発明のベクターに含まれうる。

【００２９】

他の許容されるプロモーターには、ヒトＣＭＶ５プロモーター、マウスＣＭＶプロモーター、ＥＦ１αプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、肝特異的発現のためのハイブリッドＣＭＶプロモーター（例えば、ＣＭＶ最初期プロモーターをヒトα１－アンチトリプシン（ＨＡＴ）もしくはアルブミン（ＨＡＬ）プロモーターの転写プロモーター要素に結合させることにより製造される）、または肝癌特異的発現のためのプロモーター（例えば、この場合、ヒトアルブミン（ＨＡＬ；約１０００ｂｐ）またはヒトα１アンチトリプシン（ＨＡＴ、約２０００ｂｐ）の転写プロモーター要素がヒトα１－ミクログロブリンおよびビクニン前駆体遺伝子（ＡＭＢＰ）の１４５ｂｐ長のエンハンサー要素と組合される；ＨＡＬ－ＡＭＢＰおよびＨＡＴ－ＡＭＢＰ）が含まれる。

【００３０】

また、細菌プロモーター、例えばＴ７ ＲＮＡポリメラーゼプロモーターまたはｔａｃプロモーターが、発現の制御のために使用されうる。

【００３１】

１つの実施形態においては、プロモーターはヒトＣＭＶ（ｈＣＭＶ）プロモーターである。ｈＣＭＶプロモーターは種々の哺乳類細胞型において高レベルの発現をもたらす。

【００３２】

コード配列が細胞内の転写または翻訳制御配列「の制御下にある」、「に機能的に結合されている」または「に機能的に連結されている」と言えるのは、該配列が該配列の発現を導き又は調節する場合である。例えば、遺伝子に機能的に連結されているプロモーターは、ＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡへの該コード配列のＲＮＡポリメラーゼ媒介性転写を導き、ついで該ＲＮＡは（それがイントロンを含有する場合には）スプライシングされることが可能であり、所望により、該コード配列によりコードされるタンパク質へと翻訳されうる。遺伝子に機能的に連結されたターミネーター／ポリＡシグナルはＲＮＡへの遺伝子の転写を終結させ、ＲＮＡ上へのポリＡシグナルの付加を導く。

【００３３】

「発現する」および「発現」なる語は、遺伝子、ＲＮＡまたはＤＮＡ配列内の情報が現れることを可能にする又はもたらすことを意味し、例えば、対応遺伝子の転写および翻訳に関与する細胞機能を活性化することによりタンパク質を産生させることを意味する。「

発現する」および「発現」は、ＤＮＡからＲＮＡへの、およびＲＮＡからタンパク質への転写を含む。ＤＮＡ配列は細胞内で又は細胞により発現されて、「発現産物」、例えばＲＮＡ（例えばｍＲＮＡ）またはタンパク質を生成しうる。また、該発現産物自体が該細胞により「発現される」と言われることが可能である。

【００３４】

「形質転換」なる語は細胞内への核酸の導入を意味する。導入された遺伝子または配列は「クローン」と称されうる。該導入ＤＮＡまたはＲＮＡの受容宿主細胞は「形質転換」されており、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されるＤＮＡまたはＲＮＡは、宿主細胞と同じ属もしくは種の細胞または異なる属もしくは種の細胞を含む任意の起源に由来することが可能である。当技術分野で非常によく知られている形質転換方法の例には、リポソーム運搬、エレクトロポレーション、$CaPO_4$形質転換、ＤＥＡＥ－デキストラン形質転換、マイクロインジェクションおよびウイルス感染が含まれる。

【００３５】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを含む。「ベクター」なる語は、宿主を形質転換し、所望により導入配列の発現および／または複製を促進するための、宿主細胞内へのＤＮＡまたはＲＮＡ配列の導入をもたらしうるビヒクル（例えば、プラスミド）を意味する。

【００３６】

本発明のポリヌクレオチドは発現系において発現されうる。「発現系」なる語は、ベクターにより運ばれ宿主細胞に導入されたタンパク質または核酸を適当な条件下で発現しうる宿主細胞および和合性ベクターを意味する。一般的な発現系には、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳類宿主細胞およびベクター、例えばプラスミド、コスミド、ＢＡＣ、ＹＡＣ、およびウイルス、例えばアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）が含まれる。

【００３７】

ベクター

本発明は、以下のマルチクローニングサイト：ＥｃｏＲＩ、ＸｈｏＩ、ＰａｅＲ７Ｉ、Ｂｓｐ１２０Ｉ、ＡｐａＩ、ＢｓｔＺ１７Ｉ、Ｂｓｔ１１０７Ｉ、ＰｓｔＩ、ＢａｍＨＩを含むプラスミドを提供し、これは、例えば、図１に示されているとおり、これらの制限部位間の相対的配置を含み、例えば、該マルチクローニングサイトの重複制限部位は以下のとおりに特徴づけられる。

【００３８】

【化２】



本発明の１つの実施形態においては、該マルチクローニングサイトは以下のヌクレオチド配列を含む。

【００３９】

【化３】

GAATTCTCTC GAGTGGGCCC AGTATACACT GCAGGGATCC

(配列番号：1)

本発明の１つの実施形態においては、本発明のｐＡＶＥＣプラスミドは、図１に記載されているプラスミド地図により特徴づけられる。

【００４０】

本発明の１つの実施形態においては、該プラスミドは、以下のヌクレオチド配列を含むｐＡＶＥＣである。

【００４１】

【化４】

```
       1    CTTGACTAGA GATCATAATC AGCCATACCA CATTTGTAGA GGTTTTACTT
GCTTTAAAAA
      61    ACCTCCCACA CCTCCCCCTG AACCTGAAAC ATAAAATGAA TGCAATTGTT
GTTGTTAACT
     121    TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT
TTCACAAATA
```

181 AAGCATTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT
GTATCTTATC
241 ATGTCTGGAT CGATCCAAGC TTCGAGCACC GGTGGCCCGG GCCGGTCCGA
CTAGTTACGA
301 TGTACGGGCC AGATATACGC GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT
AGTAATCAAT
361 TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC
TTACGGTAAA
421 TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA
TGACGTATGT
481 TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT
ATTTACGGTA
541 AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC
CTATTGACGT
601 CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTA TGCCCAGTAC ATGACCTTAT
GGGACTTTCC
661 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC
GGTTTTGGCA
721 GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC
TCCACCCCAT
781 TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA
AATGTCGTAA
841 CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG
TCTATATAAG
901 CAGAGCTCTC TGGCTAACTA GAGAACCCAC TGCTTACTGG CTTATCGAAA
TTAATACGAC
961 TCACTATAGC AATTGCACGT GTGGCCACAG GTAAGTTTAA AGCTCAGGTC
GAGACCGGGC
1021 CTTTGTCCGG CGCTCCCTTG GAGCCTACCT AGACTCAGCC GGCTCTCCAC
GCTTTGCCTG
1081 ACCCTGCTTG CTCAACTCTA CGTCTTTGTT TCGTTTTCTG TTCCTTTCTC
TCCACAGGCT
1141 TAAGAATTCT CTCGAGTGGG CCCAGTATAC ACTGCAGGGA TCCAGATCCC
CCTCGCTTTC
1201 TTGCTGTCCA ATTTCTATTA AAGGTTCCTT TGTTCCCTAA GTCCAACTAC
TAAACTGGGG
1261 GATATTATGA AGGGCCTTGA GCATCTGGAT TCTGCCTAAT AAAAAACATT
TATTTTCATT
1321 GCAATGATGT ATTTAAATTA TTTCTGAATA TTTTACTAAA AAGGGAATGT
GGGAGGTCAG

1381 TGCATTTAAA ACATAAAGAA ATGAAGAGGG GGATCTGTCG ACAAGCTCTA
GAGAGCTCCA
1441 TATGTGGCCA TCGCGATTAA TTAATCGCGA GCGGCCGCCA TATGTGGCCA
ACGCGTGGTA
1501 CCGGCCGGCC GCGCGCTGTA CATCCGGATG ATCAGCTGAG GGTTTAAACG
GCGCGCCTCT
1561 AGACAATTCT TGAAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCTA TTTTTATAGG
TTAATGTCAT
1621 GATAATAATG GTTTCTTAGA CGTCAGGTGG CACTTTTCGG GGAAATGTGC
GCGGAACCCC
1681 TATTTGTTTA TTTTTCTAAA TACATTCAAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
AATAACCCTG
1741 ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT
TCCGTGTCGC
1801 CCTTATTCCC TTTTTTGCGG CATTTTGCCT TCCTGTTTTT GCTCACCCAG
AAACGCTGGT
1861 GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTTACATCG
AACTGGATCT
1921 CAACAGCGGT AAGATCCTTG AGAGTTTTCG CCCCGAAGAA CGTTTTCCAA
TGATGAGCAC
1981 TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTGTT GACGCCGGGC
AAGAGCAACT
2041 CGGTCGCCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG
TCACAGAAAA
2101 GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT GCTGCCATAA
CCATGAGTGA
2161 TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC
TAACCGCTTT
2221 TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAACTCG CCTTGATCGT TGGGAACCGG
AGCTGAATGA
2281 AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGTA GCAATGGCAA
CAACGTTGCG
2341 CAAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA
TAGACTGGAT
2401 GGAGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACTTCT GCGCTCGGCC CTTCCGGCTG
GCTGGTTTAT
2461 TGCTGATAAA TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG
CACTGGGGCC
2521 AGATGGTAAG CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG
CAACTATGGA

2581 TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAGCATT
GGTAACTGTC
2641 AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTTT
AATTTAAAAG
2701 GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC
GTGAGTTTTC
2761 GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGAG
ATCCTTTTTT
2821 TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGCAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG
TGGTTTGTTT
2881 GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTTCC GAAGGTAACT GGCTTCAGCA
GAGCGCAGAT
2941 ACCAAATACT GTCCTTCTAG TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA
ACTCTGTAGC
3001 ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAGTG GCTGCTGCCA
GTGGCGATAA
3061 GTCGTGTCTT ACCGGGTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC
AGCGGTCGGG
3121 CTGAACGGGG GGTTCGTGCA CACAGCCCAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA
CCGAACTGAG
3181 ATACCTACAG CGTGAGCTAT GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA
AGGCGGACAG
3241 GTATCCGGTA AGCGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCACG AGGGAGCTTC
CAGGGGGAAA
3301 CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCGGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC
GTCGATTTTT
3361 GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG
CCTTTTTACG
3421 GTTCCTGGCC TTTTGCTGGC CTTTTGCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT
CCCCTGATTC
3481 TGTGGATAAC CGTATTACCG CCTTTGAGTG AGCTGATACC GCTCGCCGCA
GCCGAACGAC
3541 CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC GGAAGAGCGC TAGCAGCACG
CCATAGTGAC
3601 TGGCGATGCT GTCGGAATGG ACGATATCCC GCAAGAGGCC CGGCAGTACC
GGCATAACCA
3661 AGCCTATGCC TACAGCATCC AGGGTGACGG TGCCGAGGAT GACGATGAGC
GCATTGTTAG
3721 ATTTCATACA CGGTGCCTGA CTGCGTTAGC AATTTAACTG TGATAAACTA
CCGCATTAAA

3781 GCTCAGATCT GAGCTTGGGC AGAAATGGTT GAACTCCCGA GAGTGTCCTA
CACCTAGGGG
3841 AGAAGCAGCC AAGGGGTTGT TTCCCACCAA GGACGACCCG TCTGCGCACA
AACGGATGAG
3901 CCCATCAGAC AAAGACATAT TCATTCTCTG CTGCAAACTT GGCATAGCTC
TGCTTTGCCT
3961 GGGGCTATTG GGGGAAGTTG CGGTTCGTGC TCGCAGGGCT CTCACCCTTG
ACTCTTTTAA
4021 TAGCTCTTCT GTGCAAGATT ACAATCTAAA CAATTCGGAG AACTCGACCT
TCCTCCTGAG
4081 GCAAGGACCA CAGCCAACTT CCTCTTACAA GCCGCATCGA TTTTGTCCTT
CAGAAATAGA
4141 AATAAGAATG CTTGCTAAAA ATTATATTTT TACCAATAAG ACCAATCCAA
TAGGTAGATT
4201 ATTAGTTACT ATGTTAAGAA ATGAATCATT ATCTTTTAGT ACTATTTTTA
CTCAAATTCA
4261 GAAGTTAGAA ATGGGAATAG AAAATAGAAA GAGACGCTCA ACCTCAATTG
AAGAACAGGT
4321 GCAAGGACTA TTGACCACAG GCCTAGAAGT AAAAAAGGGA AAAAAGAGTG
TTTTTGTCAA
4381 AATAGGAGAC AGGTGGTGGC AACCAGGGAC TTATAGGGGA CCTTACATCT
ACAGACCAAC
4441 AGATGCCCCC TTACCATATA CAGGAAGATA TGACTTAAAT TGGGATAGGT
GGGTTACAGT
4501 CAATGGCTAT AAAGTGTTAT ATAGATCCCT CCCTTTTCGT GAAAGACTCG
CCAGAGCTAG
4561 ACCTCCTTGG TGTATGTTGT CTCAAGAAGA AAAAGACGAC ATGAAACAAC
AGGTACATGA
4621 TTATATTTAT CTAGGAACAG GAATGCACTT TTGGGGAAAG ATTTTCCATA
CCAAGGAGGG
4681 GACAGTGGCT GGACTAATAG AACATTATTC TGCAAAAACT CATGGCATGA
GTTATTATGA
4741 ATAGCCTTTA TTGGCCCAAC CTTGCGGTTC CCAGGGCTTA AGTAAGTTTT
TGGTTACAAA
4801 CTGTTCTTAA AACGAGGATG TGAGACAAGT GGTTTCCTGA CTTGGTTTGG
TATCAAAGGT
4861 TCTGATCTGA GCTCTGAGTG TTCTATTTTC CTATGTTCTT TTGGAATTTA
TCCAAATCTT
4921 ATGTAAATGC TTATGTAAAC CAAGATATAA AAGAGTGCTG ATTTTTTGAG
TAAACTTGCA

4981 ACAGTCCTAA CATTCACCTC TTGTGTGTTT GTGTCTGTTC GCCATCCCGT
CTCCGCTCGT
5041 CACTTATCCT TCACTTTCCA GAGGGTCCCC CCGCAGACCC CGGCGACCCT
CAGGTCGGCC
5101 GACTGCGGCA GCTGGCGCCC GAACAGGGAC CCTCGGATAA GTGACCCTTG
TCTCTATTTC
5161 TACTATTTGG TGTTTGTCTT GTATTGTCTC TTTCTTGTCT GGCTATCATC
ACAAGAGCGG
5221 AACGGACTCA CCATAGGGAC CAAGCTCAGA TCTGAGCTTG GGGGGGGGGA
CAGCTCAGGG
5281 CTGCGATTTC GCGCCAAACT TGACGGCAAT CCTAGCGTGA AGGCTGGTAG
GATTTTATCC
5341 CCGCTGCCAT CATGGTTCGA CCATTGAACT GCATCGTCGC CGTGTCCCAA
AATATGGGGA
5401 TTGGCAAGAA CGGAGACCTA CCCTGGCCTC CGCTCAGGAA CGAGTTCAAG
TACTTCCAAA
5461 GAATGACCAC AACCTCTTCA GTGGAAGGTA AACAGAATCT GGTGATTATG
GGTAGGAAAA
5521 CCTGGTTCTC CATTCCTGAG AAGAATCGAC CTTTAAAGGA CAGAATTAAT
ATAGTTCTCA
5581 GTAGAGAACT CAAAGAACCA CCACGAGGAG CTCATTTTCT TGCCAAAAGT
TTGGATGATG
5641 CCTTAAGACT TATTGAACAA CCGGAATTGG CAAGTAAAGT AGACATGGTT
TGGATAGTCG
5701 GAGGCAGTTC TGTTTACCAG GAAGCCATGA ATCAACCAGG CCACCTCAGA
CTCTTTGTGA
5761 CAAGGATCAT GCAGGAATTT GAAAGTGACA CGTTTTTCCC AGAAATTGAT
TTGGGGAAAT
5821 ATAAACTTCT CCCAGAATAC CCAGGCGTCC TCTCTGAGGT CCAGGAGGAA
AAAGGCATCA
5881 AGTATAAGTT TGAAGTCTAC GAGAAGAAAG ACTAACAGGA AGATGCTTTC
AAGTTCTCTG
5941 CTCCCCTCCT AAAGCTATGC ATTTTTATAA GACCATGGGA CTTTTGCTGG
CTTTAGATCG
6001 ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT
ACCTACAGAG
6061 ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT TTAAGTGTAT AATGTGTTAA
ACTACTGATT
6121 CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC TATGGAACTG ATGAATGGGA
GCAGTGGTGG

6181 AATGCCTTTA ATGAGGAAAA CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG
TGATGATGAG
6241 GCTACTGCTG ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT
AGAAGACCCC
6301 AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG
TAATAGAACT
6361 CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG GAAAAAGCTG CACTGCTATA
CAAGAAAATT
6421 ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT AGGCATAACA GTTATAATCA
TAACATACTG
6481 TTTTTTCTTA CTCCACACAG GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACTATGC
TCAAAAATTG
6541 TGTACCTTTA GCTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT
GTATAGTGC

(配列番号：2)

遺伝子

幾つかの遺伝子のいずれか（例えば、免疫グロブリン）が本発明のプラスミド内に挿入されうる。以下の標的免疫グロブリンアミノ酸配列のいずれかをコードする本発明のプラスミドは本発明の一部を構成する。本発明は、ポリヌクレオチドまたは遺伝子（例えば、免疫グロブリンをコードするもの）をｐＡＶＥＣ内に挿入するための、該過程において或るｐＡＶＥＣポリヌクレオチド配列の喪失（例えば、ベクター内への導入遺伝子の連結に適合性である制限酵素切断部位を生成するマルチクローニングサイトの一部の切り出しによるもの）を招くいずれかの方法の産物を含む。そのような方法の産物は、本明細書においては、特定の遺伝子またはポリヌクレオチドを含むｐＡＶＥＣベクターと称されうる。

【００４２】

本発明の範囲は、ｐＡＶＥＣプラスミド内にポリヌクレオチドを導入するための方法を含み、該方法は、該プラスミドを、例えばプラスミドマルチクローニングサイトにおいて、例えば１以上の制限エンドヌクレアーゼで切断し、該切断プラスミドの末端を、例えばＤＮＡリガーゼで、該導入ポリヌクレオチドの適合性末端に連結して、閉じた組換えプラスミドを得ることを含む。そのような方法の産物であるいずれの組換えプラスミドも本発明の一部である。ポリヌクレオチドの適合性末端は、ＤＮＡリガーゼにより連結されうる末端である。本発明の１つの実施形態においては、該末端は平滑または粘着末端（例えば、ＥｃｏＲ１またはＢａｍＨ１のような制限エンドヌクレアーゼによる切断により生じるもの）である。

【００４３】

本発明の１つの実施形態においては、免疫グロブリンは、以下のポリペプチドのいずれか（例えば、可変領域のみ、または可変ドメインおよび定常ドメイン）の成熟または未プロセシング形態である。

【００４４】

【化５】

19D12/15H12軽鎖(配列番号3)

MSPSQLIGFLLLWVPASRGEIVLTQVPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD
QSPKLLIKYASQSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSRLPHTFGGG
TKVEIKRT

19D12/15H12 重鎖(配列番号4)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAP
GKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARLGNF
YYGMDVWGQGTTVTVSS

19D12/15H12 軽鎖-C(LCC) (配列番号5)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
G E R V T I T C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
S G T D F T L T I S S L E A E D A
A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 軽鎖-D(LCD) (配列番号6)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
G E R V T I T C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
S G T D F T L T I S S L E A E D F
A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 軽鎖-E(LCE)(配列番号7)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P G T L S V S P
G E R A T L S C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
S G T D F T L T I S R L E P E D A
A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 軽鎖-F(LCF)(配列番号8)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P G T L S V S P
G E R A T L S C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
S G T D F T L T I S R L E P E D F
A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 重鎖-A(HCA)(配列番号9)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val
Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn
Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

19D12/15H12 重鎖-B(HCB)(配列番号10)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val

Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser

Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn

Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

Ser

国際出願公開番号ＷＯ２００３／１００００８（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

【００４５】

本発明の実施形態は、該プラスミドが２以上の免疫グロブリンを含む実施形態、例えば、該プラスミドが、本明細書に記載されている免疫グロブリンのいずれかの組合せ（例えば、重鎖Ｉｇ＃１．０および軽鎖Ｉｇ＃１．０；またはＬＣＣおよびＨＣＡ；またはＬＣＦおよびＨＣＡ；またはＬＣＣおよびＨＣＢ）を含む実施形態を含む。

【００４６】

本発明の実施形態においては、ｐＡＶＥＣプラスミドは、アミノ酸配列：

【００４７】

【化６】

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLQW YLQKPGQSPQ
51 LLIYKVSNRL YGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSHVP
101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

(配列番号：11);

を含む軽鎖免疫グロブリン；および／または、アミノ酸配列：

【００４８】

【化７】

1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSIT GGYLWNWIRQ PPGKGLEWIG
51 YISYDGTNNY KPSLKDRVTI SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARYG
101 RVFFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
151 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
201 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
251 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
351 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
401 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

(配列番号：12);

を含む重鎖免疫グロブリン；またはその可変ドメイン、または軽鎖および／もしくは重鎖のＣＤＲ（例えば、前記配列において下線で示されているもの）の１以上（例えば、３個）を含む軽鎖および／もしくは重鎖免疫グロブリンを含有する。

【００４９】

本発明の１つの実施形態においては、ｐＡＶＥＣベクターは、例えばアブシキシマブ（Ａｂｃｉｘｉｍａｂ）、アダリムマブ（Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ）、アレムツズマブ（Ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、バシリキシマブ（Ｂａｓｉｌｉｘｉｍａｂ）、ベバシズマブ（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）、セツキシマブ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）、セルトリズマブ・ペゴール（Ｃｅｒｔｏｌｉｚｕｍａｂ　ｐｅｇｏｌ）、ダロツズマブ（Ｄａｌｏｔｕｚｕｍａ

ｂ）、ダクリズマブ（Ｄａｃｌｉｚｕｍａｂ）、デノスマブ（Ｄｅｎｏｓｕｍａｂ）、エクリズマブ（Ｅｃｕｌｉｚｕｍａｂ）、エファリズマブ（Ｅｆａｌｉｚｕｍａｂ）、ゲムツズマブ（Ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、イブリツモマブ・チウキセタン（Ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ　ｔｉｕｘｅｔａｎ）、インフリキシマブ（Ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、ムロモナブ（Ｍｕｒｏｍｏｎａｂ）－ＣＤ３、ナタリズマブ（Ｎａｔａｌｉｚｕｍａｂ）、オマリズマブ（Ｏｍａｌｉｚｕｍａｂ）、パリビズマブ（Ｐａｌｉｖｉｚｕｍａｂ）、パニツムマブ（Ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）、ロバツムマブ（Ｒｏｂａｔｕｍｕｍａｂ）、トシツモマブ（Ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）、ＡＬＤ５１８またはトラスツズマブ（Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）のような抗体の軽および／または重免疫グロブリン鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。そのような抗体の配列は当技術分野で公知である。本発明の実施形態においては、ｐＡＶＥＣベクターは、抗原（例えば、いずれかの哺乳動物、例えばヒトまたはイヌまたはサルまたはラットまたはウサギまたはマウスに由来するもの）、例えば、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＥＧＦ、ＥＧＦＲ、ＰＤ－１、ＴＮＦアルファ、ＴＧＦベータ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＳＬＰ、Ｎａｖ１．７、Ｎａｖ１．８、ＥＲＫ、ＭＥＫ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＩＬ－６Ｒ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ－２３ｐ１９、ＩＬ２３Ｒ、ＰＣＳＫ９、ＣＤ２０、ＲＡＮＫＬ、ＲＡＮＫ、ＣＤ３３、ＣＤ１１ａ、ＥｒｂＢ２、ＩｇＥ、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、ＨＩＶ抗原、ＨＣＶ抗原および呼吸器性シンシチウムウイルス（ＲＳＶ）抗原のような抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの重鎖および／または軽鎖免疫グロブリン；あるいはその抗原結合性フラグメント、またはそのような抗体もしくは抗原結合性フラグメントのいずれかの可変ドメイン、またはそのような抗体もしくは抗原結合性フラグメントのいずれかの軽鎖および／もしくは重鎖のＣＤＲの１以上（例えば３個）を含む軽鎖および／もしくは重鎖免疫グロブリンを含む。本発明の１つの実施形態においては、該抗原が由来する種は軽鎖および／もしくは重鎖定常ドメインならびに／または免疫グロブリンフレームワークのものと同じ又は異なる。

【００５０】

本発明の実施形態においては、ｐＡＶＥＣベクターは、以下のものからなる群から選択されるメンバーを含む軽鎖および／または重鎖免疫グロブリンを含む：

【００５１】

【化８】

(a) アミノ酸配列：

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y
M H W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
K A T I T T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y Y C A R S
Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号：13)を含む免疫グロブリン重鎖；

(b) アミノ酸配列：

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L Y
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P A R F S G S G S
G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y Q S Y P P T F G G
G T K L E I K R A

(配列番号：14)を含む免疫グロブリン軽鎖；

(c) アミノ酸配列：

E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G

R A T L T T D T S S N T A Y L Q L F S L T S E D S A V Y F C A R S
Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号: 15)を含む免疫グロブリン重鎖;

(d) アミノ酸配列:

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L F
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S Y L A S G V P A R F S G S G S
G T S F S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H T Y P P T F G G
G T K L E I K R A

(配列番号: 16)を含む免疫グロブリン重鎖;

(e) アミノ酸配列:

E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T T S G F N I K D Y Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
K A T M T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S A D T A V Y Y C N A
Y Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号: 17)を含む免疫グロブリン重鎖;

(f) アミノ酸配列:

D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H S Y L
A W Y Q Q K Q G K S P Q F L V D N A K T L P D G V P S R F S V S G
S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C Q H F W N T P W T F G
G G T K L E I K R A

(配列番号: 18)を含む免疫グロブリン重鎖;

(g) アミノ酸配列:

E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
K A T L T T D T S S N T A Y L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R G
Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S

(配列番号: 19)を含む免疫グロブリン重鎖;

(h) アミノ酸配列:

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L
N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y S S R L H S G V P S R F S G R G
S G T D Y S L T I S T L E Q E D I A T Y F C Q Q G K T L P L T F G
A G T K L E L K R A

(配列番号: 20)を含む免疫グロブリン重鎖;

(i) アミノ酸配列:

E V Q L V D S G G G L V Q P G R S L K L S C A A S G F T F S N H D
M A W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
R F T V S R D N V K S S L H L Q M D S L T S E D T A T Y Y C A R Q
N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S

(配列番号: 21)を含む免疫グロブリン重鎖；

（j）アミノ酸配列：

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
P P T F G S G T K L E I K R A

(配列番号: 22)を含む免疫グロブリン重鎖；

（k）アミノ酸配列：

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S

(配列番号: 23)を含む免疫グロブリン重鎖；および

（l）アミノ酸配列：

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V
V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R F K G S G
S G T D F T L T I T N V Q S E D L A G F F C Q Q Y K T Y P Y T F G
G G T Q L E I K R A

(配列番号: 24)を含む免疫グロブリン軽鎖； または前記の軽鎖および／もしくは重鎖のCDRの1以上（例えば3個）を含む免疫グロブリン。

タンパク質の発現および精製

本発明のもう１つの態様は、ｐＡＶＥＣを使用する組換えタンパク質の製造方法および／または特定のポリヌクレオチドの増幅方法に関する。例えば、本発明の実施形態においては、タンパク質の発現方法は、（例えば、ｐＡＶＥＣのｈＣＭＶプロモーターのようなプロモーターに機能的に連結された）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有するｐＡＶＥＣプラスミドを含む宿主細胞（例えば、ＣＨＯ細胞）を、該プラスミドを含む宿主細胞の増殖および該組換えタンパク質の発現を可能にする適当な条件下で培養することを含む。例えば、該方法は以下の工程を含む。

【００５２】

ａ）関心のあるポリペプチド（例えば、免疫グロブリン鎖）をコードするポリヌクレオチドをｐＡＶＥＣプラスミド（例えば、配列番号１）（例えば、ｐＡＶＥＣのｈＣＭＶプロモーターのようなプロモーターに機能的に連結されているもの）内に導入する工程。

【００５３】

前記のとおり、ｐＡＶＥＣプラスミド内への該ポリヌクレオチドの導入は、例えば、該プラスミド内への導入ポリヌクレオチドの末端の連結に適合性である制限酵素切断部位を生成するためのマルチクローニングサイトの一部の切り出しによる、或るｐＡＶＥＣポリヌクレオチド配列の喪失を招きうる。

【００５４】
ｂ）関心のあるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むｐＡＶＥＣプラスミドで宿主細胞をトランスフェクトする工程。
【００５５】
該プラスミドは、異所的に自律複製要素として（例えば、該プラスミドが高コピー数、例えば、約２、３、４、５、１０、２０または５０のコピー数を有する場合）または宿主細胞染色体内に組込まれて、宿主細胞において増幅されうる。
【００５６】
ｃ）該プラスミドを含む宿主細胞の増殖および組換えタンパク質の発現を可能にする適当な条件下、細胞を培養する工程。
【００５７】
ｄ）所望により実施されうる、産生されたポリペプチドを回収する工程。
【００５８】
与えられたタンパク質を、例えば、細胞、細胞培養、または細胞が培養された培地から回収（単離および／または精製）するための方法は、当技術分野でよく知られている。非限定的な例としては、塩またはアルコール沈殿（例えば、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿）、アフィニティクロマトグラフィー（例えば、精製タグと共に用いられる）；免疫アフィニティまたはイオン交換カラム上での分画；高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）；逆相ＨＰＬＣ；シリカ上またはカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥ上のクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；等電点フォーカシング；向流分配；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；ゲル濾過（例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５を使用するもの）；およびＩｇＧのような混入物を除去するためのプロテインＡセファロースカラムにより、生物学的物質からタンパク質が単離および／または精製されうる。そのような精製方法は当技術分野でよく知られており、例えば、“Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ”，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１８２，Ｍ．Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ編，，１９９０，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹに開示されている。
【００５９】
液体水性培養内の哺乳類細胞の増殖（成長）は当技術分野でよく知られている。当技術分野で公知の哺乳類細胞培養増殖培地の例には、ＥＸ－ＣＥＬＬ　ＡＣＦ、ＣＨＯ培地（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）；後記で更に詳細に説明される）、ＤＭＥＭ、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、Ｆ－１０栄養混合物、ＲＰＭＩ培地１６４０、Ｆ－１２栄養混合物、培地１９９、イーグルＭＥＭ、ＲＰＭＩ、２９３培地およびイスコベ（Ｉｓｃｏｖｅ）培地が含まれる。
【００６０】
細胞増殖は幾つかの系のいずれかにおいて行われうる。例えば、細胞増殖は、単純なフラスコ、例えばガラス振とうフラスコにおいて行われうる。他の系には、タンクバイオリアクター、バッグバイオリアクターおよび使い捨てバイオリアクターが含まれる。タンクバイオリアクターには、典型的には、細胞を液体培地内で増殖させる金属容器（例えば、ステンレス鋼ジャケット付き容器）を含む。タンクバイオリアクターは広範な培養体積（例えば、１００Ｌ、１５０Ｌ、１００００Ｌ、１５０００Ｌ）で使用されうる。タンクバイオリアクターは、しばしば、温度制御、培地攪拌、スパージガス濃度の制御、ｐＨの制御、O_2濃度の制御、培地からのサンプルの除去、リアクター重量表示および制御、ハードウェアの清掃、ハードウェアの滅菌、全供給を送るための配管またはチューブ配置、培地の添加、ｐＨの制御、溶液の制御および気体の制御、増殖溶液内への無菌流体の送出、ならびに管理上の制御およびデータ収集のための手段を含む、細胞増殖条件を制御するための追加的な特徴を有する。タンクバイオリアクターの分類は、熱および材料（例えば、酸素および基質）を分配するためにリアクターを混合するために機械的攪拌装置（例えば、羽根車）が使用される攪拌タンクリアクターを含む。バブルカラムリアクターは、内容物を混合するために空気のみを使用する背の高いリアクターである。エアリフトリアクタ

ーはバブルカラムリアクターに似ているが、それがドラフトチューブを含有する点で異なる。ドラフトチューブは、典型的には、循環および酸素移動を改善し該リアクター内のせん断力を均等化する内部チューブである。流動床リアクターにおいては、細胞は、流体と共に移動する小粒子上に「固定化」される。該小粒子は、細胞が付着するための並びに該細胞への酸素および栄養物の高率の移動を可能にする大きな表面積をもたらす。充填床リアクターにおいては、細胞は大粒子上に固定化される。これらの粒子は液体と共には移動しない。充填床リアクターは、構築および運転が簡単であるが、閉塞および酸素移動不良を被りうる。使い捨てバイオリアクターは、使い捨て可能な１回使用のためのバイオリアクターである。しばしば、使い捨てバイオリアクターは、非使い捨てバイオリアクターに類似した特徴（例えば、攪拌系、スパージ、プローブ、出入口など）を有する。

【００６１】

ポリペプチドが細胞または組織から単離される場合には特に、１以上のタンパク質分解酵素インヒビター、例えばフェニルメタンスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）、ペファブロック（Ｐｅｆａｂｌｏｃ）ＳＣ、ペプスタチン、ロイペプチン、キモスタチンおよびＥＤＴＡをアッセイ系に加えることが好ましい。

【００６２】

幾つかの実施形態においては、関心のあるタンパク質は、「タグ」または「マーカー」と称されうる第２のポリペプチドまたはポリヌクレオチド部分を伴う。タグは、例えば、発現後のポリペプチドの精製または検出を促進するために使用されうる。例えば、発現されるべきポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの５’または３’末端におけるタグをコードするポリヌクレオチドのインフレーム挿入により、融合ポリペプチドが構築されうる。ついで本発明の発現系において融合ポリヌクレオチドが発現されうる。そのようなタグには、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ヘキサヒスチジン（Ｈｉｓ６）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）タグ、赤血球凝集素（ＨＡ）タグ、セルロース結合タンパク質（ＣＢＰ）タグおよびｍｙｃタグが含まれる。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを標識するために、検出可能なタグ、例えば^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{99m}Ｔｃ、^{123}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{68}Ｇａ、^{18}Ｆ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{113m}Ｉｎ、^{76}Ｂｒ、^{67}Ｇａ、^{99m}Ｔｃ、^{123}Ｉ、^{111}Ｉｎおよび^{68}Ｇａが使用されうる。そのような融合体を構築し使用するための方法は非常に一般的であり、当技術分野でよく知られている。

【００６３】

関心のあるポリペプチドに適した精製方法は、組換え細胞培養内の発現の際の該ポリペプチドの特性の変化に対処するための修飾を要しうる、と当業者は理解している。

【００６４】

本発明はまた、宿主細胞をｐＡＶＥＣプラスミドで形質転換することを含む、ポリヌクレオチドをｐＡＶＥＣプラスミド内に導入するための方法に関する。例えば、該方法は以下の工程を含む。

【００６５】

ａ）該ポリヌクレオチドの挿入が望まれる部位において、（例えば、制限酵素、例えば、挿入されるポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに適合性である、および該ポリヌクレオチドの後続の連結の末端に適合性である末端を生成する制限酵素を使用して）ｐＡＶＥＣプラスミドを切断する工程。挿入されるポリヌクレオチドの末端は、切断プラスミドの末端に適合性の末端を生成する制限酵素での切断を含む方法によっても生成されうる。

【００６６】

前記のとおり、ｐＡＶＥＣプラスミド内への該ポリヌクレオチドの導入は、例えば、該プラスミド内への導入ポリヌクレオチドの末端の連結に適合性である制限酵素切断部位を生成するためのマルチクローニングサイトの一部の切り出しによる、或るｐＡＶＥＣポリヌクレオチド配列の喪失を招きうる。

【００６７】

ｂ）該切断ｐＡＶＥＣの末端を、（例えば、ＤＮＡリガーゼを使用して）該ポリヌクレオチドの末端に連結して、最終的な環状組換えプラスミドを得る工程。

【００６８】

ｂ）ついで該組換えプラスミドは、該プラスミドおよび添加ポリヌクレオチドが増幅される宿主細胞内に形質転換されうる。該プラスミドは、異所的に自律複製要素として（例えば、該プラスミドが高コピー数、例えば、約２、３、４、５、１０、２０または５０のコピー数を有する場合）または宿主細胞染色体内に組込まれて、宿主細胞において増幅されうる。

【００６９】

キット

本発明のｐＡＶＥＣプラスミドベクターはキットにおいて提供されうる。本発明のキットは、該プラスミドベクターに加えて、該プラスミドベクターの利用において使用されうるいずれかの試薬を含みうる。１つの実施形態においては、該キットは、細菌および／または哺乳類宿主細胞内への該ベクターの形質転換に必要な試薬を含む。例えば、該キットは、リン酸カルシウム形質転換法のための試薬、すなわち、塩化カルシウム、バッファー（例えば、２×ＨＥＰＥＳ緩衝食塩水）および無菌蒸留水を含みうる。もう１つの実施形態においては、該キットは、ＤＥＡＥ－エキストラン形質転換のための試薬、すなわち、ＰＢＳ中のクロロキン、ＰＢＳ中のＤＥＡＥ－デキストランおよびリン酸緩衝食塩水を含む。更にもう１つの実施形態においては、該キットには、リポソーム形質転換のための試薬、すなわち、ＤＯＴＡＰ／コレステロール押出し（ｅｘｔｒｕｄｅｄ）リポソームから押出されたリポソームが含まれる。例えば、該キットはカチオン性脂質系トランスフェクション試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（リポフェクタミン）（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含みうる。

【００７０】

該キットは、本発明のベクターの細菌形質転換に必要な試薬を含みうる。例えば、該キットは形質転換コンピテント細菌（例えば、ＤＨ１、ＤＨ５、ＤＨ５α、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、ＳＵＲＥ、ＳＣＳ１１０、ＯｎｅＳｈｏｔ Ｔｏｐ１０またはＨＢ１０１）を含みうる。

【００７１】

該キットは、増殖培地、または増殖培地の調製に必要な試薬を含みうる。例えば、１つの実施形態においては、該キットは哺乳類細胞の増殖のためのウシ胎児血清またはＤＭＥＭ（ダルベッコ／フォークト変法イーグル（ハリー・イーグル）最少必須培地）を含みうる。もう１つの実施形態においては、該キットは、細菌を増殖させるための適当な抗生物質（例えば、アンピシリンまたはカナマイシン）を含有する粉末ルリアブロス培地またはルリアブロスプレートを含有しうる。

【００７２】

該キットにおいて供給される成分は適当なバイアルまたは容器（例えば、プラスチックまたはガラスバイアル）内で提供されうる。該キットは貯蔵のための適当なラベル表示、および使用のための適当な説明を含みうる。

【実施例】

【００７３】

以下の実施例は、本発明を更に詳しく説明するために記載されており、それを限定するものと解釈されるべきではない。本発明の範囲は、以下の実施例に記載されている方法の全てを含む。

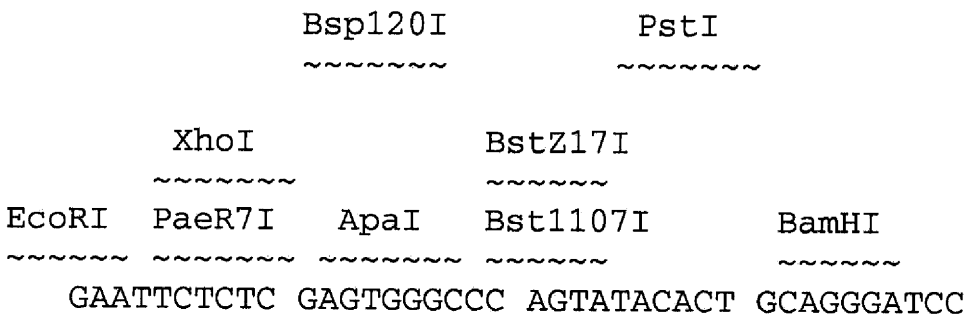
【００７４】

実施例１：ｐＡＶＥＣプラスミドの構築

マルチクローニングサイト（ＭＣＳ）の配列：

【００７５】

【化９】



(配列番号: 1)

をポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により合成した。ついでＰＣＲ産物を制限酵素ＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化した。ベクターｐＡＩＬ１７Ｌ（図２）も制限酵素ＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化した。最後に、該消化ＰＣＲ産物を該消化ベクターに連結し、ベクターｐＡＶＥＣに関して形質転換体をスクリーニングした。ついでｐＡＶＥＣにおけるマルチクローニングサイトを、該部位の完全性に関する配列決定により分析した。

【００７６】

ｐＡＩＬ１７Ｌの配列：

【００７７】

【化１０】

```
   1  GCACTA TACATC AAATAT TCCTTA TTAACC CCTTTA CAAATT AAAAAG CTAAAG GTACAC
  61  AATTTT TGAGCA TAGTTA TTAATA GCAGAC ACTCTA TGCCTG TGTGGA GTAAGA AAAAAC
 121  AGTATG TTATGA TTATAA CTGTTA TGCCTA CTTATA AAGGTT ACAGAA TATTTT TCCATA
 181  ATTTTC TTGTAT AGCAGT GCAGCT TTTTCC TTTGTG GTGTAA ATAGCA AAGCAA GCAAGA
 241  GTTCTA TTACTA AACACA GCATGA CTCAAA AAACTT AGCAAT TCTGAA GGAAAG TCCTTG
 301  GGGTCT TCTACC TTTCTC TTCTTT TTTGGA GGAGTA GAATGT TGAGAG TCAGCA GTAGCC
 361  TCATCA TCACTA GATGGC ATTTCT TCTGAG CAAAAC AGGTTT TCCTCA TTAAAG GCATTC
 421  CACCAC TGCTCC CATTCA TCAGTT CCATAG GTTGGA ATCTAA AATACA CAAACA ATTAGA
 481  ATCAGT AGTTTA ACACAT TATACA CTTAAA AATTTT ATATTT ACCTTA GAGCTT TAAATC
 541  TCTGTA GGTAGT TTGTCC AATTAT GTCACA CCACAG AAGTAA GGTTCC TTCACA AAGATC
 601  GATCTA AAGCCA GCAAAA GTCCCA TGGTCT TATAAA AATGCA TAGCTT TAGGAG GGGAGC
 661  AGAGAA CTTGAA AGCATC TTCCTG TTAGTC TTTCTT CTCGTA GACTTC AAACTT ATACTT
 721  GATGCC TTTTTC CTCCTG GACCTC AGAGAG GACGCC TGGGTA TTCTGG GAGAAG TTTATA
 781  TTTCCC CAAATC AATTTC TGGGAA AAACGT GTCACT TTCAAA TTCCTG CATGAT CCTTGT
 841  CACAAA GAGTCT GAGGTG GCCTGG TTGATT CATGGC TTCCTG GTAAAC AGAACT GCCTCC
 901  GACTAT CCAAAC CATGTC TACTTT ACTTGC CAATTC CGGTTG TTCAAT AAGTCT TAAGGC
 961  ATCATC CAAACT TTTGGC AAGAAA ATGAGC TCCTCG TGGTGG TTCTTT GAGTTC TCTACT
1021  GAGAAC TATATT AATTCT GTCCTT TAAAGG TCGATT CTTCTC AGGAAT GGAGAA CCAGGT
1081  TTTCCT ACCCAT AATCAC CAGATT CTGTTT ACCTTC CACTGA AGAGGT TGTGGT CATTCT
1141  TTGGAA GTACTT GAACTC GTTCCT GAGCGG AGGCCA GGGTAG GTCTCC GTTCTT GCCAAT
1201  CCCCAT ATTTTG GGACAC GGCGAC GATGCA GTTCAA TGGTCG AACCAT GATGGC AGCGGG
1261  GATAAA ATCCTA CCAGCC TTCACG CTAGGA TTGCCG TCAAGT TTGGCG CGAAAT CGCAGC
1321  CCTGAG CTGTCC CCCCCC CCAAGC TCAGAT CTGAGC TTGGTC CCTATG GTGAGT CCGTTC
1381  CGCTCT TGTGAT GATAGC CAGACA AGAAAG AGACAA TACAAG ACAAAC ACCAAA TAGTAG
1441  AAATAG AGACAA GGGTCA CTTATC CGAGGG TCCCTG TTCGGG CGCCAG CTGCCG CAGTCG
1501  GCCGAC CTGAGG GTCGCC GGGGTC TGCGGG GGGACC CTCTGG AAAGTG AAGGAT AAGTGA
1561  CGAGCG GAGACG GGATGG CGAACA GACACA AACACA CAAGAG GTGAAT GTTAGG ACTGTT
1621  GCAAGT TTACTC AAAAAA TCAGCA CTCTTT TATATC TTGGTT TACATA AGCATT TACATA
1681  AGATTT GGATAA ATTCCA AAAGAA CATAGG AAAATA GAACAC TCAGAG CTCAGA TCAGAA
1741  CCTTTG ATACCA AACCAA GTCAGG AAACCA CTTGTC TCACAT CCTCGT TTTAAG AACAGT
1801  TTGTAA CCAAAA ACTTAC TTAAGC CCTGGG AACCGC AAGGTT GGGCCA ATAAAG GCTATT
1861  CATAAT AACTCA TGCCAT GAGTTT TTGCAG AATAAT GTTCTA TTAGTC CAGCCA CTGTCC
1921  CCTCCT TGGTAT GGAAAA TCTTTC CCCAAA AGTGCA TTCCTG TTCCTA GATAAA TATAAT
1981  CATGTA CCTGTT GTTTCA TGTCGT CTTTTT CTTCTT GAGACA ACATAC ACCAAG GAGGTC
2041  TAGCTC TGGCGA GTCTTT CACGAA AAGGGA GGGATC TATATA ACACTT TATAGC CATTGA
2101  CTGTAA CCCACC TATCCC AATTTA AGTCAT ATCTTC CTGTAT ATGGTA AGGGGG CATCTG
2161  TTGGTC TGTAGA TGTAAG GTCCCC TATAAG TCCCTG GTTGCC ACCACC TGTCTC CTATTT
2221  TGACAA AAACAC TCTTTT TTCCCT TTTTTA CTTCTA GGCCTG TGGTCA ATAGTC CTTGCA
2281  CCTGTT CTTCAA TTGAGG TTGAGC GTCTCT TTCTAT TTTCTA TTCCCA TTTCTA ACTTCT
2341  GAATTT GAGTAA AAATAG TACTAA AAGATA ATGATT CATTTC TTAACA TAGTAA CTAATA
2401  ATCTAC CTATTG GATTGG TCTTAT TGGTAA AAATAT AATTTT TAGCAA GCATTC TTATTT
```

```
2461  CTATTT CTGAAG GACAAA ATCGAT GCGGCT TGTAAG AGGAAG TTGGCT GTGGTC CTTGCC
2521  TCAGGA GGAAGG TCGAGT TCTCCG AATTGT TTAGAT TGTAAT CTTGCA CAGAAG AGCTAT
2581  TAAAAG AGTCAA GGGTGA GAGCCC TGCGAG CACGAA CCGCAA CTTCCC CCAATA GCCCCA
2641  GGCAAA GCAGAG CTATGC CAAGTT TGCAGC AGAGAA TGAATA TGTCTT TGTCTG ATGGGC
2701  TCATCC GTTTGT GCGCAG ACGGGT CGTCCT TGGTGG GAAACA ACCCCT TGGCTG CTTCTC
2761  CCCTAG GTGTAG GACACT CTCGGG AGTTCA ACCATT TCTGCC CAAGCT CAGATC TGAGCT
2821  TTAATG CGGTAG TTTATC ACAGTT AAATTG CTAACG CAGTCA GGCACC GTGTAT GAAATC
2881  TAACAA TGCGCT CATCGT CATCCT CGGCAC CGTCAC CCTGGA TGCTGT AGGCAT AGGCTT
2941  GGTTAT GCCGGT ACTGCC GGGCCT CTTGCG GGATAT CGTCCA TTCCGA CAGCAT CGCCAG
3001  TCACTA TGGCGT GCTGCT AGCGCT CTTCCG CTTCCT CGCTCA CTGACT CGCTGC GCTCGG
3061  TCGTTC GGCTGC GGCGAG CGGTAT CAGCTC ACTCAA AGGCGG TAATAC GGTTAT CCACAG
3121  AATCAG GGGATA ACGCAG GAAAGA ACATGT GAGCAA AAGGCC AGCAAA AGGCCA GGAACC
3181  GTAAAA AGGCCG CGTTGC TGGCGT TTTTCC ATAGGC TCCGCC CCCCTG ACGAGC ATCACA
3241  AAAATC GACGCT CAAGTC AGAGGT GGCGAA ACCCGA CAGGAC TATAAA GATACC AGGCGT
3301  TTCCCC CTGGAA GCTCCC TCGTGC GCTCTC CTGTTC CGACCC TGCCGC TTACCG GATACC
3361  TGTCCG CCTTTC TCCCTT CGGGAA GCGTGG CGCTTT CTCATA GCTCAC GCTGTA GGTATC
3421  TCAGTT CGGTGT AGGTCG TTCGCT CCAAGC TGGGCT GTGTGC ACGAAC CCCCCG TTCAGC
3481  CCGACC GCTGCG CCTTAT CCGGTA ACTATC GTCTTG AGTCCA ACCCGG TAAGAC ACGACT
3541  TATCGC CACTGG CAGCAG CCACTG GTAACA GGATTA GCAGAG CGAGGT ATGTAG GCGGTG
3601  CTACAG AGTTCT TGAAGT GGTGGC CTAACT ACGGCT ACACTA GAAGGA CAGTAT TTGGTA
3661  TCTGCG CTCTGC TGAAGC CAGTTA CCTTCG GAAAAA GAGTTG GTAGCT CTTGAT CCGGCA
3721  AACAAA CCACCG CTGGTA GCGGTG GTTTTT TTGTTT GCAAGC AGCAGA TTACGC GCAGAA
3781  AAAAAG GATCTC AAGAAG ATCCTT TGATCT TTTCTA CGGGGT CTGACG CTCAGT GGAACG
3841  AAAACT CACGTT AAGGGA TTTTGG TCATGA GATTAT CAAAAA GGATCT TCACCT AGATCC
3901  TTTTAA ATTAAA AATGAA GTTTTA AATCAA TCTAAA GTATAT ATGAGT AAACTT GGTCTG
3961  ACAGTT ACCAAT GCTTAA TCAGTG AGGCAC CTATCT CAGCGA TCTGTC TATTTC GTTCAT
4021  CCATAG TTGCCT GACTCC CCGTCG TGTAGA TAACTA CGATAC GGGAGG GCTTAC CATCTG
4081  GCCCCA GTGCTG CAATGA TACCGC GAGACC CACGCT CACCGG CTCCAG ATTTAT CAGCAA
4141  TAAACC AGCCAG CCGGAA GGGCCG AGCGCA GAAGTG GTCCTG CAACTT TATCCG CCTCCA
4201  TCCAGT CTATTA ATTGTT GCCGGG AAGCTA GAGTAA GTAGTT CGCCAG TTAATA GTTTGC
4261  GCAACG TTGTTG CCATTG CTACAG GCATCG TGGTGT CACGCT CGTCGT TTGGTA TGGCTT
4321  CATTCA GCTCCG GTTCCC AACGAT CAAGGC GAGTTA CATGAT CCCCCA TGTTGT GCAAAA
4381  AAGCGG TTAGCT CCTTCG GTCCTC CGATCG TTGTCA GAAGTA AGTTGG CCGCAG TGTTAT
4441  CACTCA TGGTTA TGGCAG CACTGC ATAATT CTCTTA CTGTCA TGCCAT CCGTAA GATGCT
4501  TTTCTG TGACTG GTGAGT ACTCAA CCAAGT CATTCT GAGAAT AGTGTA TGCGGC GACCGA
4561  GTTGCT CTTGCC CGGCGT CAACAC GGGATA ATACCG CGCCAC ATAGCA GAACTT TAAAAG
4621  TGCTCA TCATTG GAAAAC GTTCTT CGGGGC GAAAAC TCTCAA GGATCT TACCGC TGTTGA
4681  GATCCA GTTCGA TGTAAC CCACTC GTGCAC CCAACT GATCTT CAGCAT CTTTTA CTTTCA
4741  CCAGCG TTTCTG GGTGAG CAAAAA CAGGAA GGCAAA ATGCCG CAAAAA AGGGAA TAAGGG
4801  CGACAC GGAAAT GTTGAA TACTCA TACTCT TCCTTT TTCAAT ATTATT GAAGCA TTTATC
4861  AGGGTT ATTGTC TCATGA GCGGAT ACATAT TTGAAT GTATTT AGAAAA ATAAAC AAATAG
4921  GGGTTC CGCGCA CATTTC CCCGAA AAGTGC CACCTG ACGTCT AAGAGA CCATTA TTATCA
4981  TGACAT TAACCT ATAAAA ATAGGC GTATCA CGAGGC CCTTTC GTCTTC AAGAAT TGTCTA
5041  GAGGCG CGCCGT TTAAAC CCTCAG CTGATC ATCCGG ATGTAC AGCGCG CGGCCG GCCGGT
5101  ACCACG CGTTGG CCACAT ATGGCG GCCGCT CGCGAT TAATTA ATCGCG ATGGCC ACATAT
5161  GGAGCT CTCTAG AGCTTG TCGACA GATCCC CCTCTT CATTTC TTTATG TTTTAA ATGCAC
5221  TGACCT CCCACA TTCCCT TTTTAG TAAAAT ATTCAG AAATAA TTTAAA TACATC ATTGCA
5281  ATGAAA ATAAAT GTTTTT TATTAG GCAGAA TCCAGA TGCTCA AGGCCC TTCATA ATATCC
5341  CCCAGT TTAGTA GTTGGA CTTAGG GAACAA AGGAAC CTTTAA TAGAAA TTGGAC AGCAAG
                    BamHI
                    ~~~~~~~
5401  AAAGCG AGGGGG ATCTGG ATCCTC CGGAGG GCCCCT TCTCCC TCTAAC ACTCTC CCCTGT
5461  TGAAGC TCTTTG TGACGG GCGAGC TCAGGC CCTGAT GGGTGA CTTCGC AGGCGT AGACTT
5521  TGTGTT TCTCGT AGTCTG CTTTGC TCAGCG TCAGGG TGCTGC TGAGGC TGTAGG TGCTGT
5581  CCTTGC TGTCCT GCTCTG TGACAC TCTCCT GGGAGT TACCCG ATTGGA GGGCGT TATCCA
5641  CCTTCC ACTGTA CTTTGG CCTCTC TGGGAT AGAAGT TATTCA GCAGGC ACACAA CAGAGG
5701  CAGTTC CAGATT TCAACT GCTCAT CAGATG GCGGGA AGATGA AGACAG ATGGTG CAGCCA
5761  CCGTAC GTTTGA TTTCCA CCTTGG TCCCCT GTCCAA AGGTGT AGGGTG TGTAAT AGCTCT
5821  GCTGAC AGTAGT ACACGC CCACAT CTTCGG CCTCCA CCCGGC TGATCT TCAGAG TGAAAT
5881  CTGTCC CAGATC CGCTGC CGCTGA ACCTGT CTGGCA CCCCGC TCTGCC GGGTGC TGGTCC
5941  AATAGA TCAGCA GCTGAG GGCTCT GCCCTG GTTTCT GCAGAT ACCAGG CCAGGT AGTTCT
```

```
6001   TCTGGT TCTCGC TGAACA GCAGGC TCTGGC TGCTCT TGCAGC TGATGC TGGCTG GCTCTC
6061   CGGGTG TCACAG GCAGGG ACAGTG GAGACT GGGTCA TCACGA TATCAC ATCTCA TGGCTG
                                                                  EcoRI
                                                                  ~~
6121   GCAGGA ACAGCA CCAGCA GCCCCA GCAGCT GCACTG GAGCCA TGGTGG CGGCGC TAGCGA
 EcoRI
 ~~~~
6181   ATTCTT AAGCCT GTGGAG AGAAAG GAACAG AAAACG AAACAA AGACGT AGAGTT GAGCAA
6241   GCAGGG TCAGGC AAAGCG TGGAGA GCCGGC TGAGTC TAGGTA GGCTCC AAGGGA GCGCCG
6301   GACAAA GGCCCG GTCTCG ACCTGA GCTTTA AACTTA CCTGTG GCCACA CGTGCA ATTGCT
6361   ATAGTG AGTCGT ATTAAT TTCGAT AAGCCA GTAAGC AGTGGG TTCTCT AGTTAG CCAGAG
6421   AGCTCT GCTTAT ATAGAC CTCCCA CCGTAC ACGCCT ACCGCC CATTTG CGTCAA TGGGGC
6481   GGAGTT GTTACG ACATTT TGGAAA GTCCCG TTGATT TTGGTG CCAAAA CAAACT CCCATT
6541   GACGTC AATGGG GTGGAG ACTTGG AAATCC CCGTGA GTCAAA CCGCTA TCCACG CCCATT
6601   GATGTA CTGCCA AAACCG CATCAC CATGGT AATAGC GATGAC TAATAC GTAGAT GTACTG
6661   CCAAGT AGGAAA GTCCCA TAAGGT CATGTA CTGGGC ATAATG CCAGGC GGGCCA TTTACC
6721   GTCATT GACGTC AATAGG GGGCGT ACTTGG CATATG ATACAC TTGATG TACTGC CAAGTG
6781   GGCAGT TTACCG TAAATA GTCCAC CCATTG ACGTCA ATGGAA AGTCCC TATTGG CGTTAC
6841   TATGGG AACATA CGTCAT TATTGA CGTCAA TGGGCG GGGGTC GTTGGG CGGTCA GCCAGG
6901   CGGGCC ATTTAC CGTAAG TTATGT AACGCG GAACTC CATATA TGGGCT ATGAAC TAATGA
6961   CCCCGT AATTGA TTACTA TTAATA ACTAGT CAATAA TCAATG TCAACG CGTATA TCTGGC
7021   CCGTAC ATCGGT AACTAG TCGGAC CGGCCC GGGCCA CCGGTG CTCGAA GCTTGG ATCGAT
7081   CCAGAC ATGATA AGATAC ATTGAT GAGTTT GGACAA ACCACA ACTAGA ATGCAG TGAAAA
7141   AAATGC TTTATT TGTGAA ATTTGT GATGCT ATTGCT TTATTT GTAACC ATTATA AGCTGC
7201   AATAAA CAAGTT AACAAC AACAAT TGCATT CATTTT ATGTTT CAGGTT CAGGGG GAGGTG
7261   TGGGAG GTTTTT TAAAGC AAGTAA AACCTC TACAAA TGTGGT ATGGCT GATTAT GATCTC
7321   TAGTCA AG
```

(配列番号 : 25)

本発明は、本明細書に記載されている具体的な実施形態により範囲において限定されるものではない。実際、本明細書に記載されているものに加えて本発明の種々の修飾が前記説明および添付図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような修飾は特許請求の範囲の範囲内に含まれると意図される。

【００７８】

本出願の全体にわたり特許、特許出願、刊行物、製品説明およびプロトコールが引用されているが、それらの開示の全体をあらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れることとする。

【図１】

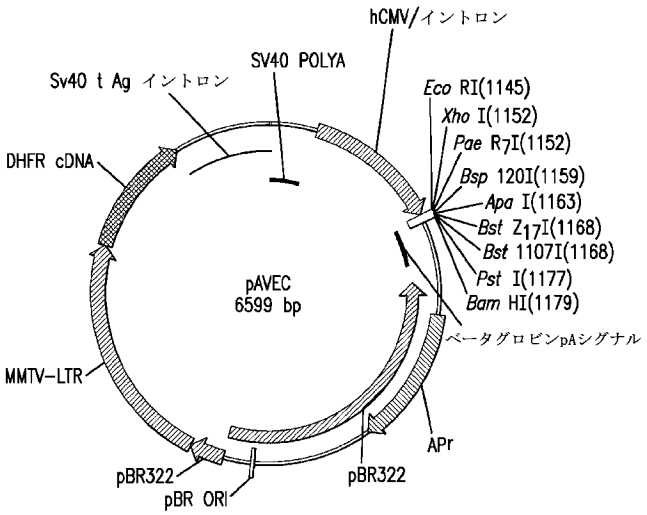


FIG.1

【図２】

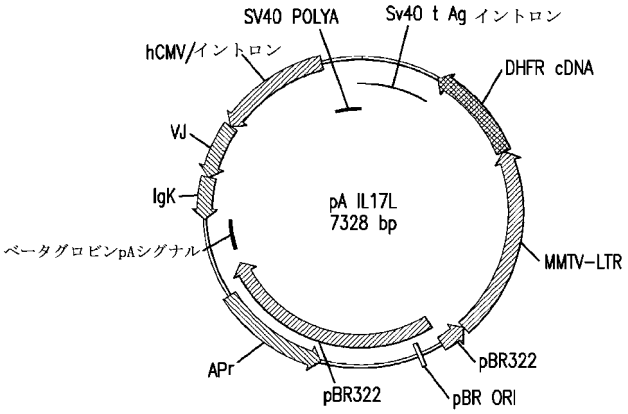


FIG.2

【配列表】
2017184752000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	

(74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
(72)発明者 サハ，デバ・ピー
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・０７０６５－０９０７、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・１２６

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CC24
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25

【外国語明細書】
2017184752000001.pdf