

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		1/68	A 4 H 0 4 5
1/68		G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	ZNA A
審査請求 未請求 予備審査請求（全 57数）			

(21)出願番号	特願2001 - 571765(P2001 - 571765)	(71)出願人	ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト スイス国、4056 バーゼル、リヒトシュト ラーセ 35
(86)(22)出願日	平成13年3月28日(2001.3.28)	(72)発明者	ビピッグ スザンヌ・デグマー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9412 2 サンフランシスコ #2 7番アヴェニュー ー 1495
(85)翻訳文提出日	平成14年9月30日(2002.9.30)	(72)発明者	ベレス ゲイバー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9430 3 パロアルト ウォルター・ヘイズ・ドラ イブ 112
(86)国際出願番号	PCT/EP01/03543	(74)代理人	弁理士 阿部 正博
(87)国際公開番号	W001/072834		
(87)国際公開日	平成13年10月4日(2001.10.4)		
(31)優先権主張番号	09/539,248		
(32)優先日	平成12年3月30日(2000.3.30)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 選択マ-カー遺伝子

(57)【要約】

本発明は、タンパク質チロシンキナーゼ受容体（MuSK-R）又は変異MuSK-R（mMuSK-R）を哺乳動物細胞、特に、ヒト細胞における選択マ-カーとして使用する方法に関する。好適なマ-カーは、シグナル形質導入ができないmMuSK-R及びシグナル領域の欠失によって細胞内ドメインが修飾されている分子である。本発明は、選択マ-カーとしてmMuSK-Rを標的細胞に導入することを含む遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法に関する。更に、MuSK-R又はmMuSK-Rを特異的に認識し結合する抗体と細胞をインキュベーションして、形質導入細胞を同定することを含む、形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下のステップ：

- (a) プロモーターに機能的に結合した変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、
 - (b) 遺伝的修飾細胞内でmMuSK-Rを発現させ、及び
 - (c) mMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、
- ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項2】 mMuSK-Rが配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載された核酸配列にコードされる配列の変異配列である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 mMuSK-RがMuSK-Rの細胞内ドメインから少なくとも150個のアミノ酸が欠失した配列である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 mMuSK-Rがキナーゼ活性部位が欠失したMuSK-R配列である、請求項1記載の方法。

【請求項5】 mMuSK-RがmMuSK-RI 又はmMuSK-RII である、請求項2記載の方法。

【請求項6】 遺伝的修飾細胞を抗体と接触させることによって同定ステップを実施する、請求項1記載の方法。

【請求項7】 ベクターによってmMuSK-Rをコードする核酸配列が哺乳動物細胞に導入される、請求項1記載の方法。

【請求項8】 ベクターがレトロウイルスベクターである、請求項6記載の方法。

【請求項9】 哺乳動物細胞が造血細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項10】 mMuSK-Rをコードする核酸が第二核酸配列を組み合わせられて導入され、該第二核酸配列は目的タンパク質をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項11】 更に、同定されたmMuSK-Rを発現する細胞を分離するステップを含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】 同定ステップによって遺伝的修飾細胞を非修飾細胞から分離

する、請求項1記載の方法。

【請求項13】プロモーターに機能的に結合した変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を含み、mMuSK-Rが配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載された配列由来か、又は配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載された配列に実質的に同一である、ベクター。

【請求項14】以下のステップ：

- (a) 筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (MuSK-R) をコードする核酸配列をヒト造血細胞内に導入し、
- (b) 該細胞内でMuSK-Rを発現させ、及び
- (c) 遺伝的修飾造血細胞を非修飾造血細胞から同定する、ことから成る、遺伝的修飾ヒト造血細胞の同定方法。

【請求項15】以下のステップ：

- (a) 変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列をヒト造血細胞集団内に導入し、
- (b) 目的タンパク質をコードする異種DNA配列をヒト造血細胞集団内に導入し、
- (c) 該細胞内でmMuSK-Rを発現させ、及び
- (d) mMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾ヒト造血細胞の同定方法。

【請求項16】目的タンパク質をコードする異種DNA配列及びmMuSK-Rをコードする核酸配列が同じベクター上において細胞に導入される、請求項14記載の方法。

【請求項17】以下のステップ：

- (a) 変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列で細胞を形質導入し、
- (b) 形質導入細胞をmMuSK-Rを特異的に認識し結合する抗体と共にインキュベートし、及び
- (c) 結合された形質導入細胞を同定する、ことから成る、形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法。

【請求項18】細胞が、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、及び脾臓フォーカスフォーミングウイルス (SFFV) から成る群に由来するレトロウイルスベクターによって形質導入される、請求項16記載の方法。

【請求項19】更に、同定された結合細胞を非結合細胞から分離するステップを含む、請求項16記載の方法。

【請求項20】更に、同定された結合細胞を増殖させるステップを含む、請求項16記載の方法。

【請求項21】以下のステップ：

- (a) 変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列であってmMuSK-Rはシグナル伝達形質導入を奏効しないものを哺乳動物細胞集団内に導入し、
 - (b) 目的タンパク質をコードする異種DNA配列を含む核酸配列を上記集団内に導入し、
 - (c) 上記細胞の成長及び増殖に好適な条件下で該哺乳動物細胞を培養し、及び
 - (d) mMuSK-Rを発現する細胞を同定することによって、目的タンパク質を発現する細胞を獲得する、
- ことから成る、目的タンパク質を発現する哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項22】受託番号PTA-1548でATCCに寄託されたハイブリドーマが産生する抗体H1によって認識されるエピトープに特異的に結合する抗体。

【請求項23】以下のステップ：

- (a) プロモーターに機能的に結合した変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、
- (b) mMuSK-Rを発現させ、
- (c) mMuSK-Rを発現する細胞を認識して結合するが、mMuSK-Rを発現を欠く細胞には結合しないモノクローナル抗体に上記細胞を接触させ、及び

(d) 上記モノクローナル抗体に結合する細胞を、上記モノクローナル抗体に結合しない細胞から分離する、
ことから成る、哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項 24】抗体が H 1、H 2、H 4、及び抗体 H 1 によって認識される細胞外ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する抗体から成る群から選択される、請求項 23 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、筋特異的チロシンキナーゼ受容体（MuSK-R）分子又は変異（突然変異）MuSK-R（mMuSK-R）を細胞選択マーカーとして使用する、遺伝的修飾哺乳動物細胞、特にヒト細胞の同定方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

原核細胞及び真核細胞を同定するために選択マーカーを使用することは良く知られている。しばしば目的とするDNA配列が細胞内に導入されても必ずしも容易に測定できる表現型に結びつくとは限らないので、このような選択マーカーの使用は非常に重要である。真核細胞、特に哺乳動物細胞の同定に使用できる選択マーカーの数は限られている。過去において、薬剤耐性を付与するような選択マーカーが使用されて来た（例えば、G-418及びハイグロマイシン）。更に最近になって、例えば、緑蛍光タンパク質（GFP）のような、蛍光活性化セルソーター（FACS）と組み合わせた選択マーカーが使用されている。或いは、細胞表面分子を認識する抗体を蛍光源（蛍光色素）と結合して目的細胞を同定することも出来る。

【0003】**【発明が解決すべき課題】**

マウスCD8、CD24及びヒト低親和性神経成長因子受容体（NGFR）等を含む幾種類かの細胞表面分子が細胞選択マーカーとして使用されて来た。以下の刊行物を参照されたし。W095/06723;W098/19540; ジョリー（Joly）他、プロ・ナツル・アカド・サイ（Pro.Natl.Acad.Sci.）80:477（1983）；レディ（Reddy）他、モル・ブレイン・レス（Mol. Brain Res.）8:137（1990）及びバレンズエラ（Valezuela）他、ニューロン（Neuron）15:573（1995）。細胞表面選択マーカーは、遺伝的修飾細胞の同定及び選択がより短時間で実施可能である点で薬剤耐性細胞マーカーに較べて有利である。更に、選択マーカーがヒトタンパク質であるような場合には、その選択マーカーを発現する細胞で処理されたヒトにいける免

疫応答を防止することができる。従って、本発明の目的は、選択マーカーとして機能する細胞表面受容体によって遺伝的に修飾された哺乳動物細胞の同定方法を提供することであり、その際に、該細胞表面受容体は選択マーカーとして機能し、該細胞表面受容体の発現パターンは制限されており、該細胞表面受容体は標的細胞内で活性ではなく、該細胞表面受容体は抗マーカー抗体で同定し選択され得るものである。この目的は、MuSK-R又はmMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞の同定方法により達成される。

【0004】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明は、プロモーターに機能的に結合した変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、遺伝的修飾細胞内でmMuSK-Rを発現させ、及び

(c) mMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法を提供する。

第一具体例として、mMuSK-RがMuSK-Rの細胞内ドメインから少なくとも150個のアミノ酸が欠失した配列である。第二具体例として、mMuSK-Rがキナーゼ活性部位が欠失したMuSK-R配列である。好適なmMuSK-Rは配列番号1 (SEQ ID No. 1) 及び配列番号2 (SEQ ID No. 2) に記載されたh MuSK-R配列に由来するものである。好ましくは、mMuSK-RがmMuSK-R I 又はmMuSK-R II である。更に別の具合例では、遺伝的修飾細胞を抗体と接触されることによって同定ステップを遂行する。別の具体例では、ベクター、好ましくはレトロウイルスベクターによってmMuSK-Rをコードする核酸配列が哺乳動物細胞に導入される。造血細胞、特に、造血幹細胞T細胞が好適な標的細胞である。

【0005】

第二の態様として、本発明は、プロモーターに機能的に結合した変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を含み、mMuSK-Rが配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載された配列由来か、又は配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載された配列に実質的に類似又は同一である、ベクターを提供する。好ましくは、mMuSK-RがmMuSK-R I 又はmMuSK-R II と命名さ

れた分子である。

【0006】

第三の態様として、本発明は、筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (MuSK-R) をコードする核酸配列をヒト造血細胞内に導入し、該細胞内でMuSK-Rを発現させ、及び、遺伝的修飾造血細胞を非修飾造血細胞から同定する、ことから成る遺伝的修飾ヒト造血細胞の同定方法を含む。

【0007】

更に別の態様として、本発明は、変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列をヒト造血細胞集団内に導入し、目的タンパク質をコードする異種DNA配列をヒト造血細胞集団内に導入し、該細胞内でmMuSK-Rを発現させ、及び、mMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る遺伝的修飾ヒト造血細胞の同定方法を提供する。好ましくは、目的タンパク質をコードする異種DNA配列及びmMuSK-Rをコードする核酸配列が同じベクター（好ましくはレトロウイルスベクター）上において細胞に導入される。

【0008】

更に別の態様として、本発明は、変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列で細胞を形質導入し、形質導入細胞をmMuSK-Rを特異的に認識し結合する抗体と共にインキュベートし、及び、結合された形質導入細胞を同定する、ことから成る形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法に関する。

【0009】

更に別の態様として、本発明は、変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列であってmMuSK-Rはシグナル伝達形質導入を奏効しないものを哺乳動物細胞集団内に導入し、目的タンパク質をコードする異種DNA配列を上記集団内に導入し、上記細胞の成長及び増殖に好適な条件下で該哺乳動物細胞を培養し、及び、mMuSK-Rを発現する細胞を同定することによって、目的タンパク質を発現する細胞を獲得する、ことから成る目的タンパク質を発現する哺乳動物細胞の同定方法を含む。

【0010】

更に別の態様として、本発明は、プロモーターに機能的に結合した変異筋特異

的チロシンキナーゼ受容体 (mMuSK-R) をコードする核酸配列を哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、mMuSK-Rを発現させ、mMuSK-Rを発現する細胞を認識して結合するが、mMuSK-Rを発現を欠く細胞には結合しないモノクローナル抗体に上記細胞を接触させ、及び、上記モノクローナル抗体に結合する細胞を上記モノクローナル抗体に結合しない細胞から分離する、ことから成る哺乳動物細胞の同定方法に関する。

【0011】

特記のない限り、本発明の実施に際して、細胞生物学、分子生物学、細胞培養、免疫学、ウイルス学、及びその他の当該技術分野における公知の技術を使用するものである。これらの技術は公知文献に開示されているが、特に、例えば、Sambrook, Fritsch, Mmaniatitis, eds., "MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL", 2nd edition (1989); Celis, J.E. "Cell Biology, A Laboratory Handbook", Academic Press, Inc. (1994); Coligan et al., "Current Protocol in Immunology", John Wiley and Sons (1991); 及び Harlow et al., "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988), Biosupplynet Source Book (1999), Cold Springs Harbor Laboratory., Horton, R.M "Methods in Molecular Biology" Vol. 15:PCR Protocols(1993) を参照されたし。

【0012】

本明細書に引用される刊行物及び公開特許明細書は、本発明が関連する技術分野の技術水準を示す為に、参照されることでその全ての開示内容が取り込まれるものである。

【0013】

特記のない限り、本明細書中の各用語は単数形及び複数形を意味する。例えば、「幹細胞」は幹細胞の複数形を含む。

【0014】

本発明の選択マーカーは変異筋特異的チロシンキナーゼ受容体 (MuSK-R) 分子又はその変異体 (mMuSK-R) である。MuSK-Rはアグリンに応答して神経筋接合部の形成を開始すると考えられている (Glass, et al., Cell 85:513 (1996))。MuSK-Rのドメイン構造は模式的に図1に示されている。MMUSK-Rは、分泌経路にタ

ンパク質を向かわせるシグナル配列又はリーダー配列を含んでなる。細胞外ドメインがシグナル配列に続いている。このドメインは数百個のアミノ酸から成り、アミノ酸残基の正確な数は様々であるが、典型的には細胞外ドメインは凡そ500個のアミノ酸を含む。細胞外ドメインは通常、細胞から細胞外環境に突き出ている受容体の一部であり、リガンド結合領域を含む。細胞外ドメインはキナーゼ受容体の最も際立った特徴である。MuSK-Rにおいては、細胞外ドメインは免疫グロブリン様(Ig様)領域が含まれている。典型的には、4つのIg様領域が見出される。しかしながら、3つの免疫グロブリン様領域を有するMuSK-Rに関する幾つかの報告もある。細胞外領域には、「C6-box」として知られている6つの連続したシステイン残基が含まれていることがある。このC6-boxの位置は、特定のMuSK-Rに応じて変化するが、或るMuSK-Rでは、ほぼアミノ酸残基373～382において見出されている。膜貫通領域は一般的に細胞膜に局在しており、疎水性残基の連なりの後に幾つかの塩基性残基が結合している。細胞内領域(「細胞質領域」と変換可能な態様で使用する)には分子の触媒部位が含まれ、細胞内に位置している。

【0015】

MuSK-Rは当業界において脱神経筋キナーゼ受容体としても知られており、DmKsとも称される(米国特許第5,656,473号、特に、配列番号16及び17参照)。MuSK-R配列は、ヒト、ラット、マウス及びツメメガエルから単離され同定されている。ヒトMuSK-Rに非常に関連しているのは、トルペド(Torpedo)チロシンキナーゼ受容体として命名されている電気エイのトルペド・カリフォルニア(Torpedo California)から単離された受容体、及びRORチロシンキナーゼ受容体である(Jennings, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2895 (1993); Masiakowski et al., J. Biol. Chem. 267:26181-26190 (1992); Valenzuela et al., Neuron, 15:573-584 (1995); Hesser et al., FEBS Letters, 442:133-137 (1999))。

【0016】

GeneBank 及び ATCC 等の公的寄託機関から入手できるその他のMuSK-Rの例として、受託番号: NM005592; AF006464; A448972; AI800924; AI700028; A

I41265; AI341122; AI302067; U34985; AA448972; 及びATCC75498 を挙げる事が出来る。上記のように、MuSK-Rは骨格筋接合部に特異的である。

【0017】

本明細書及び特許請求の範囲の中で使用される「MuSK-R」という用語は、公知のMuSK-R(DmK受容体を含む)、類似構造を有する公知のMuSK-Rのアイソフォーム又は変異体(バイリアント)、公知のMuSK-Rに機能的に類似するチロシンキナーゼ受容体、及び当業者に周知のスクリーニング技術で同定される、これまでに記載のない新規なMuSK-Rを含むものとして広義に定義される。このようなスクリーニング技術には縮重オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーの使用が含まれる。

【0018】

従って、「MuSK-R」という用語には、核酸分子を指しているときには、(a) 公知の哺乳動物細胞MuSK-Rのコード領域を含む核酸配列、(b) ストリンジェントな条件下で (a)の核酸とハイブリダイズしかつ哺乳動物細胞MuSK-Rをコードする核酸配列、及び(c) ポリヌクレオチドにコードされるMuSK-Rタンパク質の性質に有意な影響を与えない変化を核酸配列に有する縮重MuSK-Rが含まれる。このような変化として、コードされるアミノ酸に変化が生じないもの、アミノ酸配列の保存的置換を生じるもの、一つ又は幾つかのアミノ酸の欠失又は付加を生じるものがある。適当な置換は当業者には公知である。別のアミノ酸と保存的に置換されるアミノ酸残基の非限定的な例として、グリシン/アラニン、バリン/イソロイシン/ロイシン、アスパラギン/グルタミン、アスパラギン酸/グルタミン酸、セリン/スレオニン、リジン/アルギニン、フェニルアラニン/チロシンを挙げる事が出来る。MuSK-Rの性質に有意な影響を与えない如何なる保存的アミノ酸置換もこの用語に包括される。MuSK-Rには天然MuSK-Rのみならず、遺伝子工学的に得られたMuSK-Rも含まれる。

【0019】

本明細書で使用される「MuSK-R」又は「mMuSK-R」という用語には、その文脈から適当な核酸配列又はタンパク質を示しているものである。本発

明のポリヌクレオチド又は核酸はRNA又はDNAの形態であり得、DNAにはcDNA、ゲノムDNA又は合成DNAが含まれる。

【0020】

従って、「MuSK-R」という用語がポリペプチドを指しているときには、公知のMuSK-R、MuSK-Rのアイソフォーム又はバイリアント、及び機能的に等価な受容体が含まれる。機能的に等価な受容体とは、結合に対して、公知のMuSK-Rと競合するMuSK-Rである。より具体的には、機能的に等価なMuSK-Rとは、配列番号2で示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも40%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有し、リガンド又は基質結合に関して配列番号2で示されるMuSK-Rと競合することができるものである。

【0021】

本発明によれば、MuSK-R又はmMuSK-Rは、遺伝的修飾細胞を同定する選択マーカーとして使用される。このマーカーは、通常はMuSK-Rを発現しない標的細胞へ核酸構築物上で導入される。「導入」という用語は、本明細書中で広義に使用され、挿入、含有というような意味で使用される。MuSK-R又はmMuSK-Rが選択マーカーとして使用される際に、その分子はもはやシグナル活性を有していない。シグナル活性とは、一般的に、最終的に転写活性化につながる、細胞質ゾルにおける核への応答（リスポンス）経路（パスウェイ）の引き金となる活性、と定義することが出来る。シグナル活性の欠如は、(a) MuSK-Rを筋肉以外の組織又は細胞で使用する（Glass et al 85:513-523 (1996)）、又は、(b) mMuSK-Rを使用することによる。

【0022】

MuSK-Rの修飾は知られているが、MuSK-R又はmMuSK-Rを選択マーカーとして使用して遺伝的修飾細胞を同定する方法は知られていない。

【0023】

既に述べたように、MuSK-Rは筋肉組織に局在しており、機能的アグリン受容体として機能する。アグリンは、運動終板における分子再組織化を誘導することのできる神経由来因子である。従って、MuSK-Rは筋肉以外の組織にお

いて選択マーカーとして使用することが出来る。

【0024】

好適具体例において、本発明の選択マーカーはmMuSK-Rである。mMuSK-Rを含むMuSK-Rの修飾には、MuSK-Rの切断及び/又は欠失が含まれる。変異は、当業者に周知の手段により細胞外領域及び/又は細胞内領域で起こすことが出来る。この変異によって分子はシグナル活性を失う。細胞外領域は依然として抗体結合活性を有していることが好ましい。一般的には、抗体結合能力を有する、細胞外領域の最少ペプチド断片は、約15アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも50アミノ酸残基である。

【0025】

本発明における好適なMuSK-Rは、「hMuSK-R」と称される、配列番号1及び2に記載された配列である。細胞外領域はヌクレオチド1～1479にコードされ、膜貫通領域はヌクレオチド1480～1545にコードされ、そして、細胞内領域はヌクレオチド1546～2607にコードされている。その他の好適なMuSK-Rは配列番号1及び2に記載された配列に密接に関連するものである。このような密接に関連する配列は、米国特許第5,656,473、特に、番号16及び17に記載された配列である。

【0026】

MuSK-Rの変異体(mMuSK-R)は公知であり、Ape et al., Neuron 18:623-635 (1997)を参照することが出来る。本発明において、MuSK-Rに対する好適な修飾は、細胞質領域に対するもの、例えば、細胞質領域の少なくとも150、好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも250、更に好ましくは少なくとも300、最も好ましくは少なくとも350のアミノ酸が欠失したものである。好適例において、欠失は分子の切断(トランケーション)から成る。欠失又は切断は、1～19部位の範囲、好ましくは2～15部位の範囲、より好ましくは2～10部位の範囲におけるチロシンリン酸化部位の欠失を含む。更に、MuSK-Rからキナーゼ触媒部位が欠失したものを含むものであり得る。一具体例において、このキナーゼ触媒部位は配列番号2のおおよそアミノ酸残基672～691に見出すことが出来る。タンパク質が安定的に発現され

る限り、細胞質領域における欠失又は切断の数に何等制限はない。

【0027】

本発明の選択マーカーとして使用される特に好適なmMuSK-Rは、図2（配列番号2）に記載のMuSK-R配列に対する修飾である。一具体例では、MuSK-Rの細胞質領域において、少なくとも300アミノ酸が切断されている。好適な一具体例は538～869のアミノ酸配列が欠失したmMuSK-R I と呼ばれるものである。別の好適な一具体例は577～869のアミノ酸配列が欠失したmMuSK-R II と呼ばれるものである。

【0028】

細胞質領域に対する修飾に加えて、細胞外領域を修飾することも可能である。細胞外領域における修飾には、少なくとも約100、好ましくは少なくとも約150、より好ましくは少なくとも約200、更に好ましくは少なくとも約250のアミノ酸の欠失が含まれる。好ましくは、本発明の選択マーカーとして使用されるmMuSK-Rには細胞外領域における抗体結合部位は含まれるようにすべきである。

【0029】

核酸及びタンパク質において変異を生じさせるための一般的な方法は公知である。これらの方法は、MuSK-RからmMuSK-Rを作成する為に使用することが出来る、これは遺伝的修飾細胞を同定する為の選択マーカーとして有用である。ランダム及び部位特異的突然変異のいずれもMuSK-Rにおける変異を生じさせるために有効である。ランダム法は、制限エンドヌクレアーゼ部位内の配列を変えて、プラスミドにオリゴヌクレオチドリンカーを挿入し、プラスミドに損傷を与えるために化学剤を使用し、インビトロDNA合成に際して誤ったヌクレオチドを取り込ませることを含む。しかしながら、部位特異的突然変異のほうがより有益な手段であろう。特に好適な部位特異的突然変異法は、オリゴヌクレオチド特異的突然変異及びポリメラーゼ鎖反応（PCR）増幅オリゴヌクレオチド特異的突然変異である。これらの方法は当業者に公知であり、Wu, et al., Methods in Enzymology, Vol. 154: Recombinant DNA, Part E, Academic NY (1987); Landt et al., Gene 96:125-128 (1990); Kirchhoff et al., Methods Mol. Biol.

57:323-333 (1995);及び Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (上記)を参照されたい。

【0030】

選択マーカーとしてのMuSK-R 又はmMuSK-Rの有用性は、インビトロ(試験管内)、インビボ(生体内)、及びエキソビボ(生体外)で遺伝的修飾された哺乳動物細胞を同定できる能力に関連する。MuSK-R 又はmMuSK-Rはプロモーターに機能的に結合された核酸構築物の一部として標的細胞に導入されるが、好適具体例においては、本発明の選択マーカーはベクター内におかれ、標的細胞内に導入される。本明細書中で、「機能的に結合した(される)」とは、各要素がそれらの通常の機能を発揮する構造をとるようにこれら要素が配置されることを意味する。機能的に結合されるには、プロモーター又は他の調節要素はコード領域と連続している必要はない。

【0031】

選択マーカーとしてのMuSK-R 又はmMuSK-Rを含有する核酸構築物及びベクターに関して、プロモーターの選択は当業者には周知である。プロモーターは、選択マーカーで修飾される標的細胞内で遺伝子転写を指示できるような、原核細胞、真核細胞、又はウイルスのプロモーターの任意のものでかまわない。プロモーターは組織特異的プロモーター、誘導プロモーター、合成プロモーター、又は融合(ハイブリッド)プロモーターであり得る。プロモーターの非限定的例としては、ファージラムダ(PL)プロモーター、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)のようなアデノウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーターのようなサイトメガロウイルスプロモーター、MoMLVLTRのようなロングターミナルリピート(LTR)プロモーター、モロニーマウス肉腫ウイルス(MoMSV)のU3領域プロモーター、グランザイムAプロモーター、メタロチオネイン遺伝子調節配列、CD34プロモーター、CD8プロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、B19パロウイルスプロモーター、PGKプロモーター、及びラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターを挙げることが出来る。更に、Gal4プロモーター及びアルコールデ

ヒドロゲナーゼ (ADH) プロモーターのような酵母及びその他の菌類由来のプロモーター要素を使用することも出来る。これらのプロモーターは、ストラタジーン(Stratagene, La Jolla, CA) のような様々なソースから市販されている。本発明の範囲は特定のプロモーターに限定されるものではない。好適なプロモーターの例としては、MoMSV、MSCV、及びHIVの5'LTRのようなLTRプロモーター、並びにCMVプロモーターを挙げることが出来る。プロモーターに加えて、その他の発現調節配列を本発明の遺伝的修飾細胞の同定に使用する核酸構築物に挿入することが出来る。これらの調節配列としては、例えば、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、RNAポリメラーゼ結合配列、転写を誘導する配列、及び、スカフォード付着領域(SAR)のようなその他の発現調節要素を含むことが出来る

【0032】

ポリヌクレオチドが機能的に結合されるクローニング部位及びプロモーターの双方を有するベクターは当業者には周知である。このようなベクターはインビトロ又はインビボでRNAを転写することが出来、Stratagene (LaJolla, CA) 及びPromega Biotech (Madison, WI) から市販されている。このようなベクターの例として、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及び単純ヘルペスウイルスのようなウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミドベクター、菌ベクター、合成ベクター及びその他の当該技術分野で典型的に使用されている組換えビークルを挙げることが出来る。これらのベクターは様々な原核及び真核宿主における発現に関して記載されており、タンパク質の単純発現に使用することが出来る。

【0033】

非限定的な具体例として、ストラタジーン(Stratagene, La Jolla, CA)から市販されているpSG, pSV2CAT及びpXt1、並びにファルマシアから市販されているpMSG, pSVL, pBPV, 及びpSVK3を挙げることが出来る。その他のベクターとして、pCMV6b及びpCMV6cのようなpCMV哺乳動物発現ベクター(カイロン社、CA)、pSFFV-Neo及びpBluescript-SK+を挙げることが出来る。発現及び/又はインビトロ転写を最適化

するために、ポリヌクレオチドの5'及び/又は3'非翻訳部分を除去、付加又は変更して、余分で不適当な別の翻訳開始コドンの可能性のある配列、又は、転写又は翻訳レベルでの発現に干渉したり減少させるようなその他の配列を排除する必要がある場合もある。又は、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンの5'の直前に挿入して発現を増強させることも出来る。

【0034】

特に好適なベクターはレトロウイルスベクターであり、Coffin et al., "Retroviruses", (1997) Chapter 9, pp.437-473 Cold Springs Harbor Laboratory Press) を参照されたい。本発明で有用なレトロウイルスベクターは当業界において既に教示されている手順によって組換え技術によって調製することが出来る。WO94/29438, WO97/21824及び WO97/21825 にはレトロウイルスパッケージングプラスミド及びパッケージング細胞系が記載されている。一般的なレトロウイルスベクターは、マウス、鳥又は霊長類由来のレトロウイルスである。最も一般的なレトロウイルスベクターは、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) 及びマウス幹細胞ウイルス (MSCV) である。MoMLV由来ウイルスには、Mily, LINGFER, MINGFER, MND及びMINTである(Bender et al., J. Virol. 61:1639-1649 (1987); Miller et al., Biotechniques 7:98-990 (1989); Robbins, et al., J. Virol. 71:9466-9474 (1997) 及び米国特許第5,707,865)。MSCV由来のベクターとしてMSCV-Mily (Agarwal et al., J. of Virology 72:720) がある。更に、ベクターの非限定的例として、ギボンサル白血病ウイルス (GALV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (MoMSV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚幹細胞ウイルス (MESV)、脾臓フォーカスフォーミングウイルス (SFFV)、及び、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1及びHIV-2) のようなレンチウイルスを挙げることが出来る。宿主範囲、変更した細胞表面受容体などの親レトロウイルスの特定の性質を利用して、新たなベクター系が常に関連されている(C. Baum et al., Chapter 4, Gene Therapy of Cancer Cells eds., Lattime & Gerson (1998))。本発明は特定のレトロウイルスベクターに限定されるものではなく、あらゆる種類のレトロウイルスベクターを含むものである。特に好適なベクターは、2つの

長い末端繰り返し (L T R) 及びパッケージングシグナルに対応するマウスウイルスからのDNAを含む。一具体例としては、ベクターがMoMLV又はMSCV由来のベクターであり、特に、MNDである(米国特許第5,707,865号、及びNorris et al., J. of Virol. Methods, 75:161-167 (1998))。

【0035】

レトロウイルスベクター構築物の製造に際して、ウイルスgag, pol及びenv配列は通常ウイルスから除去され、外来性DNA配列を挿入するための場所を提供する。この、外来性DNA配列にコードされる遺伝子は普通、長い末端繰り返し (L T R) 内の強力なプロモーターの調節下で発現される。LTRプロモーターは好適であるが、上記のような様々なプロモーターが知られている。

【0036】

ベクター構築物の非限定的な好適例は、以下に5'又は3'に示した一般的な構造を有する。

- (a) L T R - X - I - m M u S K R - L T R ;
- (b) L T R - m M u S K R - L T R ;
- (c) L T R - m M u S K R - (I) - L T R ;
- (d) L T R - X - p m M u S K R - L T R ; 及び
- (e) L T R - X - I - m M u S K R - S A R - L T R、及び
- (f) C M V - X - p m M u S K R - L T R。

ここで、「LTR」は長い末端反復配列、「X」は目的タンパク質に対する異性遺伝子、「mMUSKR」は本発明の選択マーカー、「I」は本発明の内部リボソームエントリー部位、「SAR」はスカフォールド付着領域、及び「p」は第二プロモーター、CMVはサイトメガロウイルスプロモーターである。

【0037】

このような構築物は、もしgag, pol及びenv機能がパッケージング細胞系によって外部から (in trans) 与えられれば、ウイルス粒子内に効率良く包み込むことが出来る。即ち、ベクター構築物がパッケージング細胞に導入され、該細胞によって生産されるgag, pol及びenv蛋白質がベクターRNAと組み合わされて感染性ビリオンが生産され、それが培養培地内に分泌される。こう

して生産されたウイルスは標的細胞に感染し、そのDNA内に組み込まれるが、必須のパッケージング配列が欠けているために、感染性ウイルス粒子を生産することはない。現在使用することが出来るパッケージング細胞系の殆どは、夫々が必要なコード領域の一つを含有している別々のプラスミドでトランスフェクトされているために、複製成分ウイルスが生産される為には複数の組換え現象が必要である。別の方法では、パッケージング細胞系は既に組み込まれたプロウイルス（逆転写されたRNAのDNA形態であって、感染された細胞のゲノム内にくみこまれたもの）を有している。この場合には該細胞は感染性ウイルスを構成するのに必要な全ての蛋白質を生産するが、障害を受けているために (crippled)、それ自身のRNAをウイルスにパッケージすることが出来ない。代わりに、組換えウイルスによって生産されたRNAがパッケージされる。従って、パッケージング細胞から放出されたウイルスストックは組換えウイルスのみを含有する。レトロウイルスパッケージング細胞の非限定的例として、PA12, PA317, FLTA13, PE501, PG13, Ψ CRIP, RD114, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6), 及びPT67を挙げることが出来る (Miller et al., Mol. Cell. Biol. 6:2895 (1986); Miller et al. Biotechniques 7:980(1989); Danos et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460 (1988); Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8392 (1993); Rigg, et al., Virology 218:290-295 (1996); 及びFiner et al., Blood 83:43 (1994))。レトロウイルスベクターDNAはパッケージング細胞内に安定的又は一過性トランスフェクションによって導入され、ベクター粒子を生み出す。

【0038】

更に好適なベクターとして、アデノウイルスベクター (Frey et al., Blood 91:2781 (1998); W095/27071) 及びアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) (Chatterjee et al., Current Topics in Microbiol. And Immunol. 218:61 (1996)) を挙げることが出来る。Shenk, Chapter 6, 161-78, Breakefield et al., Chapter 8 201-235; Kroner-Lux et al., Chapter 9, 235-256 in Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds., Quesenberry et al., John Wiley & Sons, 1998 及び米国特許第5,693,531, 米国特許第5,691,176も参照されたい。アデノウイル

ス由来のベクターを使用することは、それらが非分裂細胞に感染することが出来るために或る条件下では有利であり、レトロウイルスDNAとは違って、アデノウイルスDNAは標的細胞のゲノム内に組み込まれることはない。更に、アデノウイルスベクターの外来性DNAを運搬する能力はレトロウイルスベクターよりもかなり高い。アデノ随伴ウイルスはもう一つの有用な運搬系である。これらのウイルスのDNAは非分裂細胞内に組み込まれ、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて数多くのポリヌクレオチドを異なる種類の細胞に導入することに成功している。該ベクターは造血細胞及び上皮細胞を含む異なる型の細胞に形質導入する能力を有する。

【0039】

一具体例において、構築物又はベクターは、選択マーカーとしてのmMuSK-R又はMuSK-Rをコードする核酸配列のみならず、標的細胞内に移入すべき、目的タンパク質をコードする第二の核酸配列をも含有する。好適具体例では、該核酸はDNAである。

【0040】

目的タンパク質は広義に解され、例えば、治療タンパク質、構造遺伝子、リボザイム、アンチセンス配列を挙げることが出来る。構造タンパク質又は遺伝子は完全なタンパク質又はその機能的に活性な断片でも良い。このようなタンパク質には、例えば、細胞分化を制御するもの、及び内因性遺伝子欠陥から生じる患者の疾患を補償できる治療遺伝子がある。遺伝子とは、構造コード領域を含み、特定タンパク質の正常に調節された発現に必要な情報の全てを含むものを意味する。更に、治療タンパク質又は遺伝子には、感染性物質の生産又は機能に拮抗 (antagonize) 又は中和したり、病理過程に拮抗したり、宿主の遺伝的メークアップを改善したり、又は、生着を容易にするものが含まれる。

【0041】

治療遺伝子又は遺伝子配列の具体的な例として、以下の治療に有効な遺伝子又は遺伝子配列を挙げることが出来る：アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA)、鎌状細胞貧血、リコンビナーゼ欠損症、リコンビナーゼ調節遺伝子欠損症、アンチセンス又はトランスドミナントREV遺伝子のようなHIV、又は単純ヘル

ペスチミジンキナーゼ遺伝子 (H S V - t k)。第二核酸配列は、新規な抗原、薬剤耐性遺伝子、若しくはトキシンをコードするか、又は、腫瘍細胞を特異的に殺すに有効なアポトーシスインデューサーをコードするか、又は、特異的な自殺遺伝子を含有させることも出来る。更に、治療遺伝子には、酵母遺伝子のような非ヒトの治療遺伝子であっても良い(Seo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:9167 (1998))。

【0042】

ベクター又は構築物は、目的とするタンパク質をコードする第二核酸配列に加えて、更にDNA配列を含むことが出来る。或る疾患の治療には、一つ以上の遺伝子が必要である。或いは、一つ以上の遺伝子を幾つかの共存可能な (compatible) ベクターを用いて運搬することも可能である。遺伝的欠陥に応じて、治療遺伝子には調節及び非翻訳配列を含むことが出来る。ヒト患者に対しては、治療遺伝子は一般的にはヒト由来であるが、高いホモロジー及びヒトにおいて生物学的に同一又は均等な機能を示す近い関係の種の遺伝子も、該遺伝子がレシピエントにおいて有害な免疫反応を生起しない限り、使用することが出来る。

【0043】

目的とするタンパク質又は更なるDNA配列に対するヌクレオチド配列は当業界で公知であり、又は、GenBankのような様々な配列データベースから入手可能である。任意の構造遺伝子を適合する制限酵素断片に切断して、該構造遺伝子が標的細胞内で適当に発現可能な方法でベクター内に組み込むことができることは、当業者であれば容易に認識される。

【0044】

本発明の標的細胞は、通常はM u S K - Rを発現しない哺乳動物細胞であり、このような哺乳動物の非限定的例として、ヒト、マウス、サル、家畜、競技用動物、愛玩動物 (ペット) 並びに、実験用齧歯類及び動物を挙げることが出来る。好ましくは、標的細胞はヒト細胞である。好適なヒト細胞には、肝細胞、造血細胞、神経細胞、内皮血管細胞、腫瘍細胞、及び上皮細胞がある。造血細胞は特に好適であり、この造血細胞には、造血幹細胞、赤血球、好中球、単球、血小板、肥満細胞、好酸球、好塩基球、B及びTリンパ球、NK細胞、及びこれら各細胞

系列の前駆体細胞が含まれる。造血幹細胞及びT細胞が特に好ましい。造血幹細胞(HSC)は長期間の多系列再構成(増殖)能を有する造血細胞集団と定義することが出来る。T細胞はリンパ球の一つのタイプであり、造血幹細胞から発展してきたものと考えられている。

【0045】

標的細胞、特に、造血細胞を得る方法は当業者に周知であり、ここで特に繰り返さない。造血細胞の非限定的ソースには、造血幹細胞、骨髓、胚卵黄嚢、胎児性肝臓組織、成人脾臓、及び成人抹消血及び臍帯血などの血液を挙げることに出来る(To et al., Blood 89:2233 (1997))。骨髓細胞は腸骨、胸骨、脛骨、大腿骨、脊椎、及びその他の骨空洞から得ることが出来る。

【0046】

標的細胞をその他の細胞から分離する方法は本発明にとって重要ではない。物理的分離、抗体被覆磁気ビーズを用いる磁気的分アフィニティクロマトグラフィ、及び、モノクローナ抗体と共に使用するか又はモノクローナ抗体に結合した離、細胞障害性薬剤等の様々な操作を用いることが出来る。特定の抗原の染色レベルに応じて細胞を分離する蛍光活性化セルソーター(FACS)も該操作に含まれる。これらの技術は当業者に公知であり、様々な文献、例えば、米国特許第5,061,620; 5,409,821; 5,677,136; 5,750,397 及び Yau et al., Exp. Hematol. 18:219-222 (1990)に記載されている。

【0047】

細胞分離の順序は本発明にとって重要ではない。特異的な細胞型はmMuSK-R 又はMuSK-Rによる遺伝的修飾の前又は後のいずれかで分離することが出来る。好ましくは、細胞を最初に粗く分離して、その後、陽性及び/または陰性選択する。ヒトにおいては、濃縮された造血幹細胞集団の表面抗原発現プロファイルはCD34⁺Thy-1⁺Lin⁻で同定される。その他の濃縮された表現型の非限定的例として、CD2⁻、CD3⁻、CD4⁻、CD8⁻、CD10⁻、CD14⁻、CD15⁻、CD19⁻、CD20⁻、CD33⁻、CD34⁻、CD38^{10/11}、CD45RA⁻、CD59^{+/+}、CD71⁻、CDW109⁺、グリコフォリン⁻、AC133⁺、HLA-DR^{+/+}、及びEM⁺を挙げるこ

とができる。Lin⁻細胞は、少なくとも一種類の系列特異的マーカー（CD2，CD3，CD4及びCD15、CD56等）発現の欠如に基づいて選択される。濃縮されたHSC細胞集団の分離及び同定に使用する発現マーカーの組み合わせは、様々なファクターに応じて変化し、その他の発現マーカーが利用可能になれば変わり得る。マウスHSCはkit⁺Thy-1⁺Lin⁻/Sca-1⁺（KTL5）と同定され得る。他の表現型も周知である（米国特許第5,061,620）。

【0048】

CD3は殆どのT細胞で発現しており、このような細胞は細胞表面抗原CD2，CD4及びCD8を発現できることが示されている。その他の良く知られているT細胞マーカーには、CD54RA、T細胞抗原受容体（TCR）でα、β-TCR、及びγ、δ-TCRがある。B細胞は、例えば、CD19及びCD20の発現によって選択することが出来る。骨髄細胞は、例えば、CD14、CD15及びCD16の発現によって選択することが出来る。NK細胞は、CD56及びCD16の発現によって選択することが出来る。赤血球はグリコフォリンAの発現によって選択することが出来る。神経細胞はNCAM及びLNGFRによって同定することが出来る(Baldwin et al., J. Cell Biochem. 15:502 (1996))。血管内皮細胞はVEGFR2、CD34、P-セレクチン、VCAM-1、ELAM-1及びICAM-1によって同定することが出来る(Horvathova et al., Biol. Trace. Elem. Res., 69:15-26 (1999))。当業者には、その他の表液細胞を同定するためのその他の有用なマーカーは公知である。

【0049】

一旦、標的細胞を含む集団を回収した後に、標的細胞、特に、造血細胞を分離し、この細胞を増殖を維持するに十分な増殖因子を組み合わせる含有する適当な培地中で培養する。標的細胞の培養方法は当業者には周知であり、ここでは簡潔に記載するにとどめる。任意の適当な培地を使用することができ、Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques", Wiley-Liss, Inc. (1994)を参照されたい。様々な種類のは販売業者から容易に入手することが出来る。非限定的例として、DMEM、イスコフ変性ダルベッコ培地（IM

DM), X-vivo 15、及びRPMI-1640を挙げることが出来る。調製物には、様々な種類の栄養素、増殖因子を添加することが出来る。培地に添加することも出来る化合物その他の非限定的な例として、TPO、FL、KL、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-12、IL-11、幹細胞因子、G-CSF、GM-CSF、Stl因子、MCGF、LIF、MIP-1 α 及びEPOを挙げることが出来る。これらの化合物は単独、又は任意に組み合わせて使用することが出来、好適な濃度範囲は公開文献から容易に決めることが出来る。

【0050】

培地には牛胎児血清のような血清、自家血清又は血漿を適量含有しても良いし、しなくても良い。しかしながら、細胞又は細胞集団をヒトに使用する場合には、培地は無血清又は自家血清若しくは血漿が好ましい(Lansdorp, et al., J. Exp. Med. 175:1501 (1992) 及び Petzer, et al., PNAS 93:1470 (1996))。マウス幹細胞を培養するときには、好適な非限定培地には、mIL-3、mIL-6、及びmSCFが含まれる。例えば、フィブロネクチン及び/又はRetroNectinTM(宝酒造、大津、滋賀県、日本)のような接着分子のような、その他の分子を培地に加えることも出来る。

【0051】

播種レベルは重要ではなく使用する細胞型に依存するが、一般的には造血細胞に対する播種レベルは、該細胞がCD34を発現しているときは、少なくとも1ml当たり少なくとも10個、より一般的には約100個であり、通常10⁶個未満である。

【0052】

哺乳類の幹細胞活性のインビトロアッセイには、長期間培養開始アッセイ(LTIC)及びコプレストーン領域形成アッセイ(CAFC)がある(Pettengell, et al., Blood 84:3653 (1994); Breens, et al., Leukemia 8:1095(1994); Reading, et al., Exp. Hem. 22:786 (Abst #406)(1994); Ploemacher, et al., Blood 74:2755 (1989))。CAFCにおいては、一定期間中にストローマ細胞単層の上で明瞭なクローン性伸長物(distinct clonal outgrowths: 又は、コプレストーン領域)を形成する能力に関して、プレートにまばらに播かれた細胞

集団が単純にテストされる。このアッセイによって、LTICに関連する頻度の読み出し情報が得られ、インビボアッセイ及び患者における生着を予想することが出来る。特に好適なCAFCアッセイは Young, et al., Blood 88:1619 (1996) に記載されている。フローサイトメトリーを使用して、造血細胞が発現する表面抗原に基づき様々な組織から造血細胞の部分集団を取得(サブセット)することができる。これらのアッセイを組み合わせることで造血細胞又は幹細胞をテストすることも出来る。

【0053】

本発明の一好適態様では、プロモーターに機能的に結合した選択マーカーとしてのMuSK-R又はmMuSK-Rをコードするポリヌクレオチド配列を標的細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、遺伝的修飾細胞内でMuSK-R又はmMuSK-Rを発現させ、及び、MuSK-R又はmMuSK-Rを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞、特にヒト細胞の同定方法に関する。

【0054】

最も好適な具体例では、ポリヌクレオチド配列はmMuSK-RI、 mMuSK-RII、又は配列番号1 (SEQ ID No. 1) に記載されたMuSK-R由来か、若しくは該配列と僅かに異なるだけで実質的に類似又は同一である配列をコードする。ポリヌクレオチドは、自然状態で、又は当業者に周知の方法で操作された場合に、それが転写され、及び/又は翻訳されてポリペプチド又はその断片を生産するような場合に、ポリヌクレオチドはポリペプチドを「コード」しているといわれる。MuSK-R又はその変異体を含む本発明の構築物又はベクターは遺伝的移入又はその改変法によって標的集団に導入することが出来る。

【0055】

本明細書において「遺伝的修飾」という用語は、細胞の通常のヌクレオチドへの付加、欠失、又は混乱 (disruption) を意味する。この遺伝的修飾方法は、本発明の選択マーカーをコードし、例えば、異種若しくは外来性遺伝子、又は核酸を哺乳動物標的細胞(特に、ヒト造血細胞)に移入する、任意の遺伝的修飾方法を含むものである。「遺伝的修飾」という用語の非限定的な例として、形質導入(インビボ又はエキソビボにおける、宿主又は提供者から受容者へのウイルスの

媒介による宿主DNAの移入)、トランスフェクション(単離されたウイルスDNAによる細胞への形質転換)、リポソーム媒介移入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムトランスフェクション及び当業界で周知の他の手段がある。Kriegler, M. Gene Transfer & Expression a Laboratory Manual, W. H. Freeman & Company NY (1990) を参照されたし。形質導入方法には、細胞とプロドューサー細胞との直接共培養 (Bregni, et al., (1992) Blood 80:1418-1422)、適当な増殖因子及びポリカチオンと共に又はウイルス上清単独で培養する方法 (Xu, et al., Exp. Hemat. 22:223-230(1994))がある。

【0056】

好適具体例において、標的細胞は上記のようなレトロウイルスベクターによって形質導入される。感染する宿主の範囲はウイルスのエンベロープ蛋白質によって決まる。組換えウイルスは実際に、パッケージング細胞によって提供されるenv蛋白質によって認識されるあらゆる型の細胞に感染することが出来、ウイルスゲノムを形質導入した細胞に組み込み、外来性遺伝子産物を安定的に生産する。一般的に、MoMLVのマウス同種指向性env はげっし類細胞に感染することが出来るが、両種指向性env は、げっし類、鳥類細胞、及びヒト細胞を含む幾つかの霊長類細胞に感染することが出来る。最近になって、水泡性口内炎ウイルスのGグリコプロテイン(VSV-G)がMoMLVenvタンパク質と置換された (Burns, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037(1993); 及びW092/14829)。ヒト細胞への感染が可能である異種指向性ベクターシステムも存在する。

【0057】

標的細胞が選択マーカーであるMuSK-R又はmMuSK-R、及び適宜目的タンパク質をコードする第二核酸配列で形質転換されると、選択マーカーであるMuSK-R又はmMuSK-Rを発現する該修飾細胞はいろいろな方法で同定することが出来る。本明細書中において、修飾細胞に関する「同定」という用語は、他に特記のない限り、標識し、精製し、濃縮し、単離し、又は分離することを意味する。同定は単一又は複数のステップで行うことが出来る。好適な一態様では、同定される遺伝的修飾細胞は、同一のステップで同定及び分離される。

【0058】

本発明の選択マーカーを発現する遺伝的修飾細胞を同定するために技術としては、上記のほかに、非限定的例として、抗体選択、免疫選択、ノーザンブロット又はサザンブロットによるヌクレオチド分析、ゲノムDNAのPCR増幅、ウェスタンブロットによるタンパク質分析、mRNAの逆転写及びPCRによる増幅、及び、液相DNAとの蛍光によるその場（インサイトウ：in situ）ハイブリダイゼーションによる染色体の分析であるFISH(Lawrence, et al., Science, 249 (4971): 928-932 (1990))を挙げることが出来る。

【0059】

好適な具体例では、哺乳動物細胞の同定方法は、遺伝的修飾細胞を、mMuSK-Rを発現する細胞を認識し結合するがmMuSK-Rを発現しない細胞をには結合しない抗体に接触させることを含む。この結合細胞を抗体に結合しない細胞と分離する。

【0060】

抗体は当業者に周知の方法によって得ることができ、又は、Harlow, et al., "Antibodies: A Laboratory Manual: (1988), Biosupplynet Source Book, (1999) Cold Springs Harbor Laboratory を参照することが出来る。対象となる抗原と反応するポリクローナル又はモノクローナル抗体生産細胞のいずれも製造することが出来る。本発明によれば、抗体はMuSK-R又は mMuSK-R選択マーカーの細胞外領域を認識しなければならない。より特異的には、細胞外領域の一部が、例えば、欠失のように修飾されている場合には、抗体は該mMuSK-Rの残りのアミノ酸配列のエピトープを認識しなければならない。

【0061】

特に好適な抗体は、配列番号2 (SEQ ID No. 2) に記載されたMuSK-R配列に由来するか若しくは該配列と実質的に類似するmMuSK-Rを特異的に認識し結合するモノクローナル抗体である。このような抗体は「 α - MuSK-R」と称され、これは配列番号1又は2に記載された配列に由来するか若しくは該配列と実質的に類似するmMuSK-Rに対する有意な特異性を保持するような、ネイティブ又は組換え、合成又は天然の、任意の抗体又はそのフラグメントを含むものである。

。 α - MuSK-Rの例として、実施例のセクションGに記載され、寄託されているハイブリドーマによって産生される、H 1、H 2、及びH 4を挙げる事が出来る。

【0062】

H 1、H 2、及びH 4と呼ばれる、mMuSK-RI 及びmMuSK-RII に対する抗体を産生するハイブリドーマはアメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (ATCC) (10801 University Blvd. Manassas, VA 20110) に2000年3月22日に、夫々、受託番号PTA - 1547, PTA - 1548及びPTA - 1549で寄託されている。

【0063】

選択マーカーを発現する標的細胞を同定し、更に選択するためにはH 1モノクローナル抗体が最も好ましい。更に、H 1によって認識される細胞外ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する抗体を本発明方法に使用することが出来る。

【0064】

α - MuSK-R抗体は、例えば、ゲル拡散、イムノアッセイ、免疫電気泳動、及び免疫蛍光によってインビトロでアッセイ及び同定される。遺伝的修飾細胞が標識されると、 α - MuSK-R抗体と共にインキュベートされる。

【0065】

第二抗体が蛍光色素又は免疫磁気ビーズに結合している場合には、その第二抗体を使用して、更に抗体で被覆された細胞を同定することが出来る。選択マーカーを発現する遺伝的修飾細胞はFACSなどの蛍光活性化セルソーター、又はビーズ被覆細胞を選択するための磁気 (米国特許第5,011,912) によって選択することが出来る。概略を述べると、第一の α - MuSK-Rを、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(PE)、cy - クロム(CyC)、アロフィコシアニン(APC)、トリコロール(TC)、又はテキサスレッド(TX)のような蛍光色素 (源) に結合させることが出来る。第一次抗体が蛍光源に結合していないときは、蛍光源に結合する第二次抗体をmMuSK-Rを発現する細胞を含む細胞試料に導入し、第一次抗体によって認識される。第一次抗体はmMuSK-Rに付着する。分

離は蛍光活性化セルソーターによって行うことが出来る。

【0066】

本発明方法で同定された遺伝的修飾細胞を、同定及び選択の前又は後に、該細胞を当業者に周知の方法で添加物有無にかかわらず数日又は数週間適当な培地で培養して増殖することが出来る。

【0067】

本発明方法によって得られる遺伝的に修飾された細胞は、更に、自家又は同種セッティングに使用することが出来る。そこでは、遺伝的に修飾された標的細胞、好ましくは造血細胞、最も好ましくは幹細胞又はT細胞は増殖され、例えば、骨髓移植、生着のファシリテーション（容易化）、又は免疫再構成等の遺伝治療に使用される。mMuSK-Rを含有する増殖した細胞は患者内に投入される。試料を採取し、MuSK-R又はmMuSK-R選択マーカーについて、上記のFACS分析、PCR又はFISHによりテストし、遺伝的修飾細胞の生存率を求め、更に、形質転換効率、特に、形質導入効率を評価することが出来る。

【0068】

以上これまで一般的に記載された本発明は、以下の実施例に則してより容易に理解されるように説明される。これらの実施例は本発明の或る具体例を記載する目的のみで含まれるものであって、本発明をいかなる意味でも限定するものではない。

【0069】

【実施例1】

A. ヒトMuSK-R cDNAの単離

ヒトMuSK-Rは、胎児平滑筋cDNA (Marathon cDNA, Invitron) から、MuSK-R cDNAの5' 及び3' に連結するプライマーを用いてPCRによって単離する。以下のプライマーをOperon Technologies, Inc.から入手し、MuSK-R cDNAの増幅に使用する。

【0070】

【表1】

MuSK21FN: CGT CCT GCG TGA GCC TGG ATT AAT C SEQ ID NO: 3

MuSK34FN: GCC TGG ATT AAT CAT GAG AGA GCT C SEQ ID NO: 4

MuSK2666RN: CGA GGC CTG TCT TCA ACC TTA GAC ACT CAC AGT TCC

CTC TGC SEQ ID NO: 5

【0071】

5'プライマーMuSK21FNはMuSK-Rの開始コドン前の25個のヌクレオチドをカバーする。第二の5'プライマーMuSK34FNはMuSK-Rの開始コドン(a a 1)及びその周辺配列をカバーする。3'プライマーMuSK2666RNはMuSK-Rの停止コドン及びその周辺配列をカバーする。プライマーMuSK21FN、MuSK34FN及びMuSK2666RNを使用することで、野生型MuSK-Rをコードする~2600bpのDNA断片を増幅することが出来る。

【0072】

以下のPCR反応を行った。マラソン(Marathon) cDNA (~2 ng) をアドバンテージ(Advantage) cDNA緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH=7.5, 42), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatin, 2.5 μmol dATP, 2.5 μmol dCTP, 2.5 μmol dGTP, 2.5 μmol dTTP), 1 μg プライマーMuSK21FN, 1 μg プライマーMuSK2666RN、1 μl アドバンテージcDNAポリメラーゼ、及び水(最終容積 50 μl)と混合する。PCRは以下の通り実施する。サイクル1: 94 で5分間; サイクル2-11: 94 で0.5分間、63 で1分間、68 で6分間; 及びサイクル12: 68 で10分間。

【0073】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして水100 μlに再懸濁する。

【0074】

上記PCR反応物10 μlを再度増幅する。上記PCR反応物10 μlに加えて、反応混合物は第2回目の増幅用に以下のものを含む: Pfu緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH=8.8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-10

0, 0.1 mg/ml BSA), 2.5 μ mol dATP, 2.5 μ mol dCTP, 2.5 μ mol dGTP, 2.5 μ mol dTTP, 1 μ g プライマー-MuSK34FN, 1 μ g プライマー-MuSK2666RN、5U Pfu ターボ(Turbo) ポリメラーゼ(Pyrococcus furiosus 由来) 及び水 (最終容積 50 μ l)。PCRは以下の通り実施する。サイクル13: 94 で5分間; サイクル14-43: 94 で0.5分間、62 で1分間、72 で6分間; 及びサイクル44: 72 で10分間。

【0075】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして20 μ l 水に再懸濁する。PCR反応物を1xTAEゲル上にロードする。2600bp大迄のバンドをゲルから単離し、製造業者のプロトコールに従ってSrfI制限酵素部位pPCRスクリプトAmpベクター(Stratagene; CA) 内でクローンする。得られるベクターをpPCR-スクリプトMuSK-R-wtと呼ぶ。サブクローニングしたPCR産物の正確さは制限酵素分析及び周知の配列決定方法で確認する(ヌクレオチド配列は配列番号1で示されている)。

【0076】

B. PCRによるMuSK-Rの細胞内領域における変異の作成:

プライマー-MuSK1380F、MuSK1657R及び1747Rを用いて、プラスミドpPCR-スクリプトMuSK-RからMuSK-Rの細胞内領域変異体を作成する。プライマーは以下のとおりであり、「p」はリン酸化を意味する。

【0077】

【表2】

Primer 1380F: 5' pCG GCC TGT GCC AGA CTG CCA CAT CTA G (SEQ ID NO: 6);

Primer 1657R: 5' pCG TCT AGG TGA GGG TTA CTG CTG CTG ATT CTC (SEQ ID NO: 7); and

Primer 1747R: 5' pGG TTA ACC CTA TTC AAT GTT ATT CCT TGA ATA CTC CAG (SEQ ID NO: 8).

【0078】

プライマーMuSK1380F及びMuSK1657Rを使用することによって、MuSK-Rのアミノ酸残基538-879の欠失が生じ、プライマーMuSK1380F及びMuSK1747Rを使用することによって、MuSK-Rのアミノ酸残基577-879の欠失が生じる。これら2つのMuSK-R変異体をMuSK-R Δ 538-879(MuSK-RI)及びMuSK-R Δ 577-879(MuSK-RII)名付ける。MuSK-RI及びMuSK-RIIの双方とも、MuSK-Rの細胞内領域の殆どが欠失している(図2参照)。本発明を何ら拘束するものではないが、この2つの切断により、図2に示した野生型MuSK-Rの殆どの基質結合モチーフ及びキナーゼ領域が欠失するものと考えられる。

【0079】

5'プライマーMuSK1380FはMuSK-Rのヌクレオチド1333-1410をカバーする。3'プライマーMuSK1657R及び1747Rは、MuSK-Rのアミノ酸538及び577の代わりに停止コドンを含む。プライマーMuSK1380FとプライマーMuSK1657R又は1747Rを使用することで、アミノ酸538に停止コドンを有するMuSK-Rのヌクレオチド1333-1614、又はアミノ酸577に停止コドンを有するMuSK-Rのヌクレオチド1333-1728をそれぞれ作成することが出来る。PCR反応は、~10ng hMuSK-R-wtDNA、1xPfu緩衝液、1 μ gプライマーMuSK1380F、1 μ gプライマーMuSK1657R又は1747R、2.5 μ mol dATP, 2.5 μ mol dCTP, 2.5 μ mol dGTP, 2.5 μ mol dTTP、5U Pfuターボ(Turbo)ポリメラーゼ及び水(最終容積 50 μ l)。PCRは以下の通り実施する。サイクル1:95 で5分間;サイクル2-31:95 で0.5分間、60 で1分間、72 で4分間;及びサイクル32:72 で10分間。反応はPCRマシン中で4 に冷却し、PCR反応物を1xTAEゲル上にロードする。

【0080】

2つのPCR産物MuSK-RI(nt1380-1614)及びMuSK-

R I I (n t 1 3 8 0 - 1 7 2 8) を製造業者のプロトコールに従って S r f I 制限酵素部位 p P C R スクリプト A m p ベクター (Strategene; CA) 内でクローンする。これらの構築物には M u S K の 5 ' コーディング領域 (n t 1 - 1 3 7 9) が欠けているので、この配列を p P C R - スクリプト M u S K - R - w t から制限酵素部位 NaeI 及び AatII を用いて切り出す。修飾 M u S K 配列 n t 1 - 1 6 1 4 及び n t 1 - 1 7 2 8 を有する p P C R - スクリプトをそれぞれ、p P C R - スクリプト M u S K - R I 及び p P C R - スクリプト M u S K - R I I と呼ぶ。ベクターの正確性は当業界で周知の制限酵素分析及び配列決定法により確認する。

【0081】

C . 変異 M u S K - R を含むレトロウイルスベクター及びウイルス上清の製造

野生型 M u S K - R 及び変異体 M u S K - R を p P C R - スクリプト M u S K - R - w t 、 p P C R - スクリプト M u S K - R I 、 及び p P C R - スクリプト M u S K - R I I から、NotI 及び XhoI 部位を使用して切り出し、NotI 及び XhoI で切断されたマウス白血病ウイルス (M o M L V) に基づくレトロウイルスベクター p G l a の多クローニング部位にクローニングする。これらのレトロベクターは p G l a M u S K - R 、 p G l a M u S K - R I 、 及び p G l a M u S K - R I I と名付ける。構築物を、サイトメガロウイルス (C M V) の調節下で水泡性口内炎ウイルス G - タンパク質 (V S V - G エンベロープ) を発現するエンベロープ構築物 p C i G L と共に、ヒト胚腎臓細胞 2 9 3 T (2 9 3 T 細胞) (Gary Nolan, Stanford) にコトランスフェクションする。更に、2 9 3 T 細胞にパッケージング構築物 p C i G P (C M V プロモーター調節下の M o M L V gag-pol をコードする) を C a C l ₂ 法 (Clontech; CA) によりコトランスフェクションする (W097/21825 及び Rigg et al., Virology 21:290-295 (1996))。

【0082】

ウイルス上清をトランスフェクションの 2 4 , 4 8 , 7 2 時間後に回収し、ベックマン GS-6KR 遠心分離機内で 1 2 0 0 r p m で遠心分離して粒子物質を除去し、その後直ちに細胞を形質転換するために使用するか、又は乾燥氷 / メタノール浴中で保存する。ウイルス上清をパッケージング細胞系 (セルライン) P r o

P a k - A - 6 (P P A - 6) (Systemix, Inc.) を形質導入するのに使用する。P P A - 6 セルラインは、CMV プロモーター調節下で両指向性M L Vエンベロープ及びM L Vgag-polを発現する293T細胞由来のセルラインである(Rigg et al., 上記)。形質導入に関して陽性であるP P A - 6細胞を免疫磁気ビーズ選択でソート(セクションFに記載)する。P P A - 6細胞からの上清を形質導入の2, 3および4日後に回収し、293T細胞の場合と同様に処理する。製造されるP P A - 6細胞からの上清には、両指向性エンベロープを有しヒト初代細胞及びセルラインへの形質導入に使用することのできる組換えウイルス粒子が含まれている。

【0083】

D. 組織培養及びセルライン:

以下のセルライン及び初代細胞を使用する:(a) ヒトTセルライン、C E M S S (Frederico, et al., J. Biol. Regul. Homeost Agents, 7:41-49 (1993))、(b) ヒト胚腎臓細胞293T (293T) (Pear, et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 90:8392-8396 (1993))、及び(c) P P A - 6 (Rigg, et al., 上記)。C E M S S M u S K - RセルラインはC E M S S細胞を、p G l a M u S K - R w tを用いて作られたP P A - 6上清で形質導入して作成されたものである。

【0084】

細胞は、ステリカルト(Steri-Cult) 200 インキュベーター (Forma-Scientific)内で、5%CO₂ で培養する。培養培地 (DMEM, イスコフ(Iscove)培地、R P M I)、P B S、及びピルビン酸ナトリウムはJRH BioSciences(CA) から入手する。F B SはHyclone, (Utah)、L - グルタミン、トリプシンはLife Technology (Maryland)、I T S (インシュリン、トランスフェリン及びセレン酸ナトリウム)、フィトヘマグルチニン (P H A)、及びインターロイキン2 (I L - 2) はSigma, (Missouri) から入手する。

【0085】

293T細胞及びP P A - 6細胞をD M E M、10%F B S、1%ピルビン酸ナトリウム、及び1%L - グルタミン(293T, - 6)、C E M S S細胞は; R P M I、10%F B S、及び1%ピルビン酸ナトリウムで培養する。ハイブリ

ドーマ細胞は、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）又はHT培地（イスコフ培地、10%FBS、5%ハイブリドーマクローニング因子(Igen; MD)）に、ヒポキサンチン0.5mM、アミノプテリン4μM及びチミジン16μM（HAT培地）、又はヒポキサンチン0.5mM及びチミジン16μM（HT培地）を加えたものである。

【0086】

接着細胞（293T細胞及びPPA-6細胞）を継代するために、細胞を1回PBSで洗浄し、5分間トリプシン処理し、その後、新たな組織培養フラスコ内に分割する(VWR, New Jersey)。

【0087】

E. PPA-6及びヒトTセルラインの形質導入：

293T細胞又はPPA-6細胞のいずれかから製造したウイルスの上清1-3mlを用いて、ステップ(D)からの 10^6 細胞/mlを8μg/ml硫酸プロタミン(Sigma, Missouri)と共にスピノキュレーション(spinculation)により形質導入する。スピノキュレーションは37℃で3時間、2750rpm(PPA-6及びCEMSS細胞)で実施する。PPA-6細胞は6穴プレートで形質導入する。CEMSS細胞は6ml試験管(VWR)内で形質導入する。

【0088】

F. MuSK-R I及びMuSK-R IIを発現する細胞のFACS分析、及び、免疫-磁気ビーズによる選択：

FACS分析は、FACSscan(Becton Dickinson)で実施する。以下の抗体及び試薬を用いて染色を行う。CD4-FITC(Caltag, CA)、ヨウ化プロピディウム(PI, Sigma)、ヤギ抗マウスIgG-PE(Caltag, CA)、抗マウスIgG結合磁気ビーズ(Dynal, Oslo)、抗MuSK-Rポリクローナル血清、及び、抗MuSK-Rハイブリドーマ上清(セクションG参照)。全ての抗体の力価を測定し、最適な濃度で使用する。 1×10^6 個の細胞を50μl PBS / 2% FBS中で20～60分間4℃で染色する。二次抗体を使用するときには、細胞を2ml PBS / 2% FBSで一度洗浄し、もう一度50μl PBS / 2% FBS中でインキュベートし、そして第二次抗体を添加する。FACS分析の前

に、細胞を更にPBS / 2 % FBSで一度洗浄し、遠心分離し、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のPIを含有する $500 \mu\text{l}$ PBS / 2 % FCS中に再懸濁する。FACS分析は製造者の指示に従いFACS scan (Becton Dickinson Immunocytometry Group; CA) により実施する。

【0089】

ビーズ選択によって細胞を単離するために、細胞を抗MuSK - R抗体で染色する。 $10^7 / \text{ml}$ をPBS / 2 % FBS中の $10 \mu\text{l}$ 抗MuSK - Rハイブリドーマと氷上で時々揺らしながら1時間インキュベートする。細胞をPBS / 2 % FCSで3回洗浄し、抗MuSK - R抗体を認識する抗IgG抗体結合磁気ビーズ(Dynal, Oslo)を添加する(陽性細胞当たり~5個のビーズ)。再度、細胞を氷上で1時間インキュベートする。MuSK - Rを発現する細胞がDynal磁気により10分間で陽性選択される。非結合細胞は除去され、MuSK - Rを発現する細胞が培養に提供される(ステップ(D))。

【0090】

G. MuSK - Rの細胞外領域に対するモノクローナル抗体の製造:

MuSK - Rの細胞外領域(XC)に対するモノクローナル抗体を製造するために、MuSK - R XCをPCRにて増幅し、発現構築物pSecTag2b(Invirtogen)にクローニングする。MuSK - RのXC領域のプラスミドpSecTag2bの多価クローニング部位(MCS)へのクローニングによりCMVプロモーターの調節下でXCが発現される。更に、該プラスミドは多価クローニング部位の後にmyc及び(His)₆-tag配列を有しているので、目的タンパク質(MuSK - R XC)とmyc及び(His)₆-tagの融合が生じる。MuSK - RのシグナルペプチドはIgκリーダーに置換されている(図3)。シグナルペプチドがないMuSK - Rの細胞外領域が以下のプライマーを使用するPCRによって増幅され、プライマーは以下のとおりであり、「p」はリン酸化を意味する。

【0091】

【表3】

MuSK 116FPC: 5'pCT TCC AAA AGC TCC TGT CAT CAC C

SEQ ID NO: 9 and

MuSK 1532RC: 5'pCC AGT CAT GGA GTA TGT AGG TGA GAC

SEQ ID NO: 10

【0092】

プライマーMuSK 116FPCはシグナルペプチド (nt 69 - 93) の後から配列を開始する。プライマーMuSK 1532RCは膜貫通領域開始の前の配列及び膜貫通領域の最初の2つのアミノ酸 (配列番号1のヌクレオチド1462 - 1586に対応) をカバーする。PCR反応は、~10 ng hMuSK - R - wt DNA、1 x Pfu緩衝液、2.5 μmol dATP, 2.5 μmol dCTP, 2.5 μmol dGTP, 2.5 μmol dTTP、1 μg プライマーMuSK 116FPC、1 μg プライマーMuSK 1532RC、5U Pfu ターボ(Turbo) ポリメラーゼ及び水 (最終容積 50 μl)。PCRは以下の通り実施する。サイクル1: 95 で5分間; サイクル2 - 7: 96 で0.5分間、60 で1分間、72 で6分間; サイクル8 - 27: 95 で0.5分間、58 で1分間、72 で6分間; 及びサイクル28: 72 で10分間。反応はPCRマシン中で4 に冷却し、PCR反応物をゲルで精製する。PCR断片をSecTag 2bのEcoRV部位にクローニングする。こうして、MuSK - R XCをN末端のIgκリーダー並びにC末端のmyc - 及び(His)₆ - tagのフレーム内にクローニングされる。得られるプラスミドをpSecTag - hMUSK - Rと呼ぶ。

【0093】

MuSK - R XCを発現させる為に、プラスミドpSecTag - hMUSK - RをCaCl₂法 (セクションCに記載) により293T細胞にトランスフェクトする。トランスフェクションも24時間後に、培地を新鮮なDMEM / 10% FBS又は無血清X - Vivo 15と交換する。トランスフェクションした細胞の上清を48時間及び72時間後に回収する。全部で400 mlの上清を回収し、精製するまで - 80 で凍結する。

【0094】

MuSK - R XCは組織培養上清から固定化金属アフィニティークロマトグラ

フィにより精製する。金属イオンは0.1M NiCl_2 である。カラムは1又は5mlファルシア金属HiTrapキレーティングセファロースカラムである。平衡緩衝液(緩衝液A)は、20mM Na_2HPO_4 、pH7.4、1Mグアニジン塩酸、及び1M NaCl から成り、0.2 μM セルロースアセテートフィルターを通す。溶出緩衝液(緩衝液B)は、20mM Na_2HPO_4 、pH7.4、1Mグアニジン塩酸、及び1M NaCl 、及び0.5M イミダゾールから成り、0.2 μM セルロースアセテートフィルターを通す。ファルマシアFPLCクロマトグラフィシステムを用いて、FPLC操作プログラムソフトウェア及びファルマシアP50ポンプが備わったカラムを操作する。精製は4にて実施する。

【0095】

ロードを開始する前に、ポンプに緩衝液Aを注入する。カラウを装着する前に、ロードをポンプを通して組織培養液のピンク色が連結部に見られるようにしてカラムが非平衡条件で洗浄されないようにする。

【0096】

組織培養上清は0.85M NaCl 、1M 塩化グアニジン、及び40mM イミダゾールを含有するように調整し、pHを7.4に合わせる。カラムを8%緩衝液Bで平衡化する。試料をロードし、カラムを上記条件においてカラム7容積分で洗浄する。MuSK-Rは30%緩衝液B(150mMイミダゾール)において8容積分以上で溶出される。運転の開始から画分を回収する。

【0097】

各画分をドットプロットアッセイ(Dot Blot Assay: 下記)で試験する。選択された陽性画分をウェスタンプロットアッセイ(Elisa: 下記)で試験する。陽性画分を集めて10,000 MWC0 膜(Pierce Snakeskin)にてPBSに対して透析する。透析後、光学密度を OD_{280} で測定する。試料を0.2 μM フィルターを通し、冷蔵庫されたSorvall RT6000D 内のCentricon Centriprep 30 装置で、製造者のプロトコールに従って濃縮する。

【0098】

ドットプロットアッセイ陽性試料を試験するために、各画分10 μl をニトロ

セルロースにピペットする。この膜を乾燥させ、スーパーブロックでブロックし、MuSK-Rタンパク質に対してプローブし、インディアウエスタン (India Western: 下記) に記載のように発色させる。

【0099】

ウェスタンブロットは当業者に周知の方法で実施する。材料 (試料緩衝液、運転緩衝液及びゲル) はNovex から入手する。

【0100】

ウェスタンブロット分析用に、画分当たり25 - 35 μ lを使用する。グアニジン含有画分を氷冷エタノール内で沈殿させ、氷上で15分間又は4 で一晩保存する。試料を冷蔵されたマイクロ遠心機 (TOMY) にて14,000 rpmで10分間遠心する。上清を捨て、氷冷アセトンを添加し、上記のように遠心する。ペレットを5% β -メルタカプトエタノール含有SDS試料緩衝液 (Novex) (最終容積: 50 - 70 μ l) に再懸濁する。試料を90 以上で5分間変性させ、短時間遠心し、25 - 35 μ lを4 - 20%勾配ゲルにロードする。Bio-rad湿式移動ブロッティングカセットとトリス-グリシン-メタノール移動緩衝液 (25 mM トリスマ塩基 (Trizma base)、192 mMグリシン、20%メタノール) を用いて、ゲルを0.45 μ Mニトロセルロース上に、1.4時間で移動させる。ゲルのブロッティング後に、ブロットをPierce TBS スーパーブロック中で10分間穏やかに攪拌しながらブロックする。回転プラットフォーム上で、ブロットをTBS T (50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) でそれぞれ5分間かけて2度洗浄する。Pierce India (商標) His-HRP プローブを1:5,000にTBS Tで希釈し、ブロットをこのプローブとともに室温で1時間インキュベートし、TBS Tで3回洗浄する。その後、西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 試薬 (Sigma Fast HRP非溶解性基質D4418) をブロットに添加し、ブロットを発色させる。或いは、マウス抗c-myc抗体 (Santa Cruz Biochemistry; CA) を用いて、組換えMuSK-Rタンパク質を検出する。この抗体はスーパーブロック中で1 μ g/mlの最終濃度まで希釈する。ブロットをTBS Tで3回洗浄し、ヤギ抗マウスIgG-HRP抗体 (Sigma) をスーパーブロック中1:5,000で希釈したものを添加する。ブロットを室温で

穏やかに攪拌しながら1時間インキュベートし、Sigma Fast HRP非溶解性基質を用いて上記のように発色させる。認識されたタンパク質はSDS-PAGE上を約85 kDで移動し、グリコシル化によって19 kD重くなっていると考えられる。

【0101】

組換えMuSK-Rタンパク質を3匹のBalb/cマウスに注射する。この目的のために、25-50 µgを2.25 mgアルハイドロゲル (alhydrogel) 及び100 µg MDP (ムラニルジペプチド: Pierce) を混合し (最終容積200 µl)、14日毎に5回皮下注射する。3回目及び5回目の注射の後に、FACS分析及びElisaによりMuSK-Rに対する反応性に関して3匹の血清を試験する。FACS分析には、 5×10^5 個のセルラインCEMSS及びCEMSS MuSK-Rを使用する。プレ血清及び血清の双方を1:100、1:300、1:900及び1:2700に希釈する。ラット抗マウスIgG-PE抗体を1:200の希釈で二次抗体として使用する。Elisaの為には、96穴プレートを10 µg/ml抗マウスIgG Fc (Jackson; Maine) 抗体50 µlで被覆する。プレートを様々な希釈 (1:100 ~ 1:218700) の血清とインキュベートし、その後、MuSK-Rタンパク質、及び、1:1000希釈のニッケル活性化西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP、Pierce) とインキュベートする。ニッケル活性化HRPは組換えMuSK-Rタンパク質に (His)₆-tagを介して結合する。これを発色するには、プレートをTMPペルオキシダーゼ基質 (Zymed; CA) とインキュベートする。これら双方のアッセイにおいて、一匹のマウスが天然及び組換えMuSK-Rに対して最高の反応性を示す。このマウスにPBS中のMuSK-R (200 µg) による6回目の注射でブーストを施す。注射は皮下及び静脈下で行う。1週間後に脾臓を摘出し、リンパ球をリンフォライト (Lympholite) M (Accurate Chemicals) で単離し、50%ポリエチレングリコールを用いて、骨髓腫セルラインP3X63AG8.0653と標準操作により融合させる。得られるハイブリドーマはHATバルク状で1週間培養する。リンフォライト (Lympholite) M を用いて、生存細胞を回収し、クローニング因子 (Igen) 含有HAT培地中で培養する。ハイブリ

ドーマが更に1週間増殖したら、細胞バッチの一つを10%DMSOを含有するHAT培地中に凍結保存する。もう一方の細胞バッチは、単一細胞デポジットユニットを用いるFACS sorting によって各クローンに分割する。前方および側方散乱によりPI陰性細胞をソートする。細胞をHAT培地中で2週間培養する。天然及び組換えMuSK-Rタンパク質を認識できるモノクローナル抗体に関して、上清をElisa及びFACSで試験する。IgG1、2a、2b、3、IgM、 κ 及び λ と反応する第二次抗体(Caltag, CA)を使用するElisaアッセイによって抗体のアイソタイプを同定する。

【0102】

H1、H2及びH4の3つのモノクローナル抗体が同定される。これら3つは全て、FACSアッセイにおいて、CEMSS-MuSK-Rセルライン上に発現されるMuSK-Rと反応することが出来る。H1はIgG1、 κ であり、H2はIgG1、 κ であり、H4はIgM抗体である。

【0103】

図4は、H1、H2及びH4の3つのモノクローナル抗体を用いた、CEMSS及びCEMSSMuSK-R上に発現されたhMuSK-Rを示す。H1、H2及びH4の3つのモノクローナル抗体を検出するために、抗マウスIgG抗体に結合した第二PEを使用する。図5は、非形質導入CEMSS細胞(パネルA)、及びPPA-6上清で形質導入されhMuSK-R(パネルB)又はhMuSK-RII(パネルD)を発現するCEMSS細胞におけるMuSK-Rの発現を示す。両方の集団ともに免疫磁気ビーズ選択で濃縮された(hMuSK-R(パネルC)、hMuSK-RII(パネルE))。図5に示された試験結果はモノクローナル抗体H2を使用して得られてものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】細胞質領域が欠失した野生型(WT)MuSK-R及びmMuSK-Rを模式的に表わしたものである。リーダー配列がtagとして5'末端に付加されている。

【図2】hMuSK-Rと名付けられ、配列番号1に記載の核酸配列及び配列番号2に記載のアミノ酸配列に対応するMuSK-Rを示す。シグナルペプチドは

アミノ酸残基1 - 19である。細胞外領域はアミノ酸残基20 - 493を含み、膜貫通領域はアミノ酸残基494 - 515を含み、細胞質領域はアミノ酸残基516 - 869を含む。

【図3】pSeqTag2b hMuSK - Rを模式的に表わしたものである。

【図4】H1 (B) , H2 (C) 及びH4 (D) のモノクローナル抗体を用いた、CEMSS及びCEMSSMuSK - R上に発現されたhMuSK - Rの発現を示す。

【図5】非形質導入CEMSS細胞 (A) におけるhMuSK - R (配列番号1) 、及びPPA - 6上清で形質導入されたCEMSS細胞におけるhMuSK - R (パネルB) 及びhMuSK - RII (パネルD) の発現を示す。両方の集団ともにモノクローナル抗体H2を使用して免疫磁気ビーズ選択で濃縮された (hMuSK - R (パネルC) 、hMuSK - RII (パネルE)) 。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG
 PIPPIG, SUSANNE
 VERES, GABOR
 <120> Selectable marker genes
 <130> 31193
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.0

10

<210> 1
 <211> 2607
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

20	atgagagagc	tctgcaacat	tccactggta	catattctta	ctctgggtgc	cttcagcgga	60
	actgagaaac	ttccaaaagc	tccgtgcatc	accactcctc	ttgaaacagt	ggatgcctta	120
	gttgaagaag	tggctacttt	catgtgtgca	gtggaatcct	acccccagcc	tgagatttcc	180
	tggactagaa	ataaaattct	cattaaactc	tttgacaccc	ggtacagcat	cggggagaat	240
	gggcagctcc	tcaccatcct	gagtgtggaa	gacagtgatg	atggcattta	ctgctgcacg	300
	gccaacaatg	gtgtgggagg	agctgtggag	agttgtggag	ccctgcaagt	gaagatgaaa	360
	cctaaaataa	ctcgtcctcc	cataaatgtg	aaaataatag	agggattaaa	agcagtccta	420
	ccatgtacta	caatgggtaa	tcccaaacca	tcagtgtctt	ggataaaggg	agacagccct	480
	ctcagggaaa	attcccgaat	tgcagttctt	gaatctggga	gcttgaggat	tcataacgta	540
	caaaagggaag	atgcaggaca	gtatcgatgt	gtggcaaaaa	acagcctcgg	gacagcatat	600
	tccaaagtgg	tgaagctgga	atttgaggtt	tttgccagga	tcctgcgggc	tcctgaatcc	660
	cacaatgtca	cctttggctc	ctttgtgacc	ctgcactgta	cagcaacagg	cattcctgtc	720
	cccaccatca	cctggattga	aaacggaaat	gctgtttctt	ctgggtccat	tcaagagagt	780
	gtgaaagacc	gagtgtattga	ctcaagactg	cagctgttta	tcaccaagcc	aggactctac	840
30	acatgcatag	ctaccaataa	gcattggggag	aagttcagta	ctgccaaggc	tgcagccacc	900
	atcagcatag	cagaatggag	taaaccacag	aaagataaca	aaggctactg	cgcccagtac	960
	agaggggagg	tgtgtaatgc	agtcctggca	aaagatgctc	ttgtttttct	caacacctcc	1020
	tatgcggacc	ctgaggaggc	ccaagagcta	ctgggtccaca	cggcctggaa	tgaactgaaa	1080
	gtagttagcc	cagtctgccg	gccagctgct	gaggctttgt	tgtgtaacca	catcttccag	1140
	gagtgcagtc	ctggagtagt	gcctactcct	attcccattt	gcagagagta	ctgcttggca	1200
	gtaaaggagc	tcttctgcgc	aaaagaatgg	ctggtaatgg	aagagaagac	ccacagagga	1260
	ctctacagat	cagagatgca	tttgctgtcc	gtgccaaaat	gcagcaagct	tcccagcatg	1320
	cattgggacc	ccacggcctg	tgccagactg	ccacatctag	attataacaa	agaaaacctc	1380
	aaaacattcc	caccaatgac	gtcctcaaag	ccaagtgtgg	acattccaaa	tctgccttcc	1440
40	tccctctctt	cttccctctc	tgtctcacct	acatactcca	tgactgtaat	aatctccatc	1500
	atgtccagct	ttgcaatatt	tgtgctctct	accataacta	ctctctattg	ctgccgaaga	1560
	agaaaacaat	ggaaaaataa	gaaaagagaa	tcagcagcag	taaccctcac	cacactgcct	1620
	tctgagctct	tactagatag	acttcatccc	aaccccatgt	accagaggat	gcccgtcctt	1680
	ctgaacccca	aattgctcag	cctggagtat	ccaaggaata	acattgaata	tgtgagagac	1740
	atcggagagg	gagcgttttg	aagggtgttt	caagcaaggg	caccaggctt	acttccctat	1800
	gaacctttca	ctatggtggc	agtaaagatg	ctcaaagaag	aagcctcggc	agatatgcaa	1860
	goggactttc	agagggaggc	agccctcatg	gcagaatttg	acaaccctaa	cattgtgaag	1920
	ctattaggag	tgtgtgctgt	cggaagacca	atgtgcctgc	tctttgaata	catggcctat	1980
50	ggtgacctca	atgagttcct	ccgcagcatg	tcccctcaca	cogtgtgcag	cctcagtcac	2040
	agtgacttgt	ctatgagggc	tcaggctctc	agccctgggc	ccccaccctc	ctcctgtgct	2100
	gagcagcttt	gcattgccag	gcaggtggca	gctggcatgg	cttacctctc	agaacgtaag	2160

```

tttgttcacc gagatttagc caccaggaac tgcctgggtgg gcgagaacat ggtgggtgaaa 2220
attgccgact ttggcctctc caggaacatc tactcagcag actactacaa agctaatagaa 2280
aacgacgcta tccctatccg ttggatgccca ccagagtcca ttttttataa ccgctacact 2340
acagagtctg atgtgtgggc ctatggcgtg gtcctctggg agatcttctc ctatggcctg 2400
cagccctact atgggatggc ccataggagag gtcatttact acgtgcgaga tggcaacatc 2460
ctctcctgcc ctgagaactg ccccggtggag ctgtacaatc tcatgcgtct atgttggagc 2520
aagctgcctg cagacagacc cagtttcacc agtattcacc gaattctgga acgcatgtgt 2580
gagagggcag aggggaactgt gagtgtc 2607

```

10

```

<210> 2
<211> 869
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```

```

Met Arg Glu Leu Val Asn Ile Pro Leu Val His Ile Leu Thr Leu Val
1          5          10          15
Ala Phe Ser Gly Thr Glu Lys Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr
20          20          25          30
Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met
35          40          45
Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn
50          55          60
Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn
65          70          75          80
Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile
85          90          95
Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys
30          100         105         110
Gly Ala Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile
115         120         125
Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr
130         135         140
Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro
145         150         155         160
Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg
165         170         175
Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala
40          180         185         190

Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Phe
195         200         205
Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr
210         215         220
Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val
225         230         235         240
Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser
245         250         255
50  Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu

```

					260				265				270			
	Phe	Ile	Thr	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	His
				275				280					285			
	Gly	Glu	Lys	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Ile	Ala
				290				295				300				
	Glu	Trp	Ser	Lys	Pro	Gln	Lys	Asp	Asn	Lys	Gly	Tyr	Cys	Ala	Gln	Tyr
	305					310					315				320	
	Arg	Gly	Glu	Val	Cys	Asn	Ala	Val	Leu	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Val	Phe
					325					330					335	
10	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Pro	Glu	Glu	Ala	Gln	Glu	Leu	Leu	Val
				340				345					350			
	His	Thr	Ala	Trp	Asn	Glu	Leu	Lys	Val	Val	Ser	Pro	Val	Cys	Arg	Pro
			355				360					365				
	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Cys	Asn	His	Ile	Phe	Gln	Glu	Cys	Ser	Pro
			370				375					380				
	Gly	Val	Val	Pro	Thr	Pro	Ile	Pro	Ile	Cys	Arg	Glu	Tyr	Cys	Leu	Ala
	385					390					395				400	
	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Cys	Ala	Lys	Glu	Trp	Leu	Val	Met	Glu	Glu	Lys
					405					410					415	
20	Thr	His	Arg	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ser	Glu	Met	His	Leu	Leu	Ser	Val	Pro
				420				425					430			
	Lys	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Ser	Met	His	Trp	Asp	Pro	Thr	Ala	Cys	Ala
			435				440					445				
	Arg	Leu	Pro	His	Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Phe	Pro
		450				455					460					
	Pro	Met	Thr	Ser	Ser	Lys	Pro	Ser	Val	Asp	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser
	465					470				475					480	
30	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Val	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Met	Thr	Val
					485					490					495	
	Ile	Ile	Ser	Ile	Met	Ser	Ser	Phe	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Leu	Thr	Ile
				500					505					510		
	Thr	Thr	Leu	Tyr	Cys	Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Gln	Trp	Lys	Asn	Lys	Lys
			515				520						525			
	Arg	Glu	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Leu
		530					535					540				
	Leu	Asp	Arg	Leu	His	Pro	Asn	Pro	Met	Tyr	Gln	Arg	Met	Pro	Leu	Leu
		545			550						555				560	
	Leu	Asn	Pro	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Glu	Tyr	Pro	Arg	Asn	Asn	Ile	Glu
				565						570					575	
40	Tyr	Val	Arg	Asp	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Phe	Gln	Ala
				580					585					590		
	Arg	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Glu	Pro	Phe	Thr	Met	Val	Ala	Val
			595				600						605			
	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Glu	Ala	Ser	Ala	Asp	Met	Gln	Ala	Asp	Phe	Gln
		610					615					620				
	Arg	Glu	Ala	Ala	Leu	Met	Ala	Glu	Phe	Asp	Asn	Pro	Asn	Ile	Val	Lys
					630						635				640	
	Leu	Leu	Gly	Val	Cys	Ala	Val	Gly	Lys	Pro	Met	Cys	Leu	Leu	Phe	Glu
					645					650					655	
50	Tyr	Met	Ala	Tyr	Gly	Asp	Leu	Asn	Glu	Phe	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Pro
				660					665					670		
	His	Thr	Val	Cys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Met	Arg	Ala	Gln

675 680 685
 Val Ser Ser Pro Gly Pro Pro Pro Leu Ser Cys Ala Glu Gln Leu Cys
 690 695 700
 Ile Ala Arg Gln Val Ala Ala Gly Met Ala Tyr Leu Ser Glu Arg Lys
 705 710 715 720
 Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn
 725 730 735
 Met Val Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Asn Ile Tyr Ser
 740 745 750
 10 Ala Asp Tyr Tyr Lys Ala Asn Glu Asn Asp Ala Ile Pro Ile Arg Trp
 755 760 765

 Met Pro Pro Glu Ser Ile Phe Tyr Asn Arg Tyr Thr Thr Glu Ser Asp
 770 775 780
 Val Trp Ala Tyr Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Tyr Gly Leu
 785 790 795 800
 Gln Pro Tyr Tyr Gly Met Ala His Glu Glu Val Ile Tyr Tyr Val Arg
 805 810 815
 20 Asp Gly Asn Ile Leu Ser Cys Pro Glu Asn Cys Pro Val Glu Leu Tyr
 820 825 830
 Asn Leu Met Arg Leu Cys Trp Ser Lys Leu Pro Ala Asp Arg Pro Ser
 835 840 845
 Phe Thr Ser Ile His Arg Ile Leu Glu Arg Met Cys Glu Arg Ala Glu
 850 855 860
 Gly Thr Val Ser Val
 865

<210> 3

<211> 25

30 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgctcctgcgt gagcctggat taatc

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40 <400> 4

gcctggatta atcatgagag agctc

25

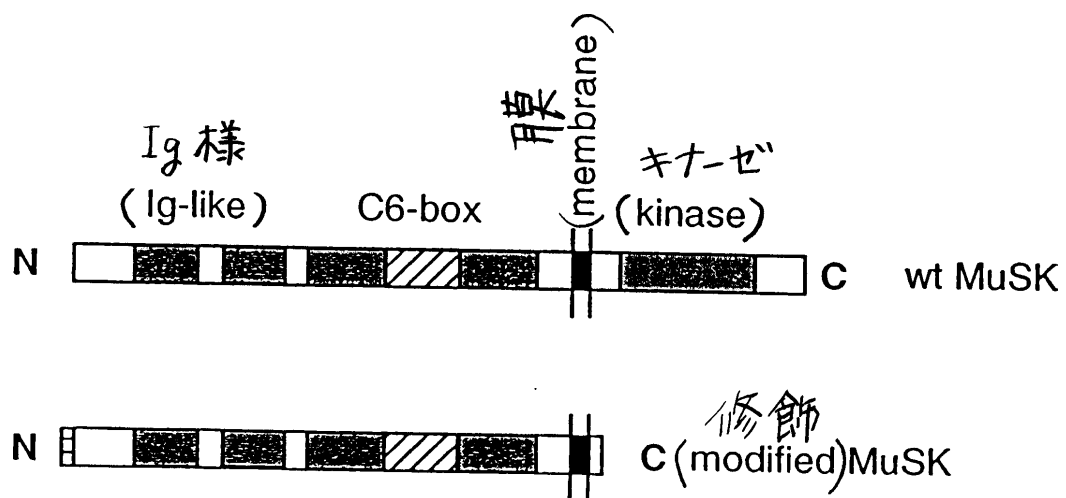
<210> 5

	<211> 42		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 5		
	cgaggcctgt cttcaacctt agacactcac agttccctct gc	42	
	<210> 6		
	<211> 27		
10	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 6		
	cggcctgtgc cagactgccca catctag	27	
	<210> 7		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 7		
	cgtctagggtg aggggttactg ctgctgattc tc	32	
	<210> 8		
	<211> 38		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	ggttaaccct attcaatggtt attccttgga tactccag	38	
30			
	<210> 9		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		

<400> 9
 cttccaaaag ctctgtcat cacc 24

 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 ccagtcacgg agtatgtagg tgagac 26

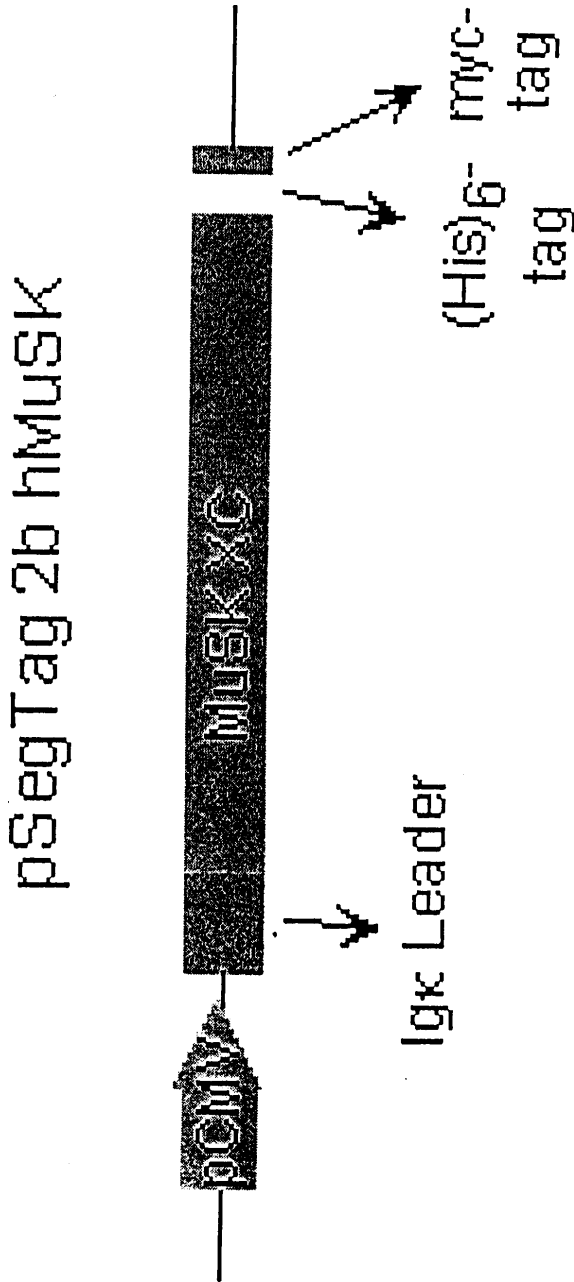
【図1】



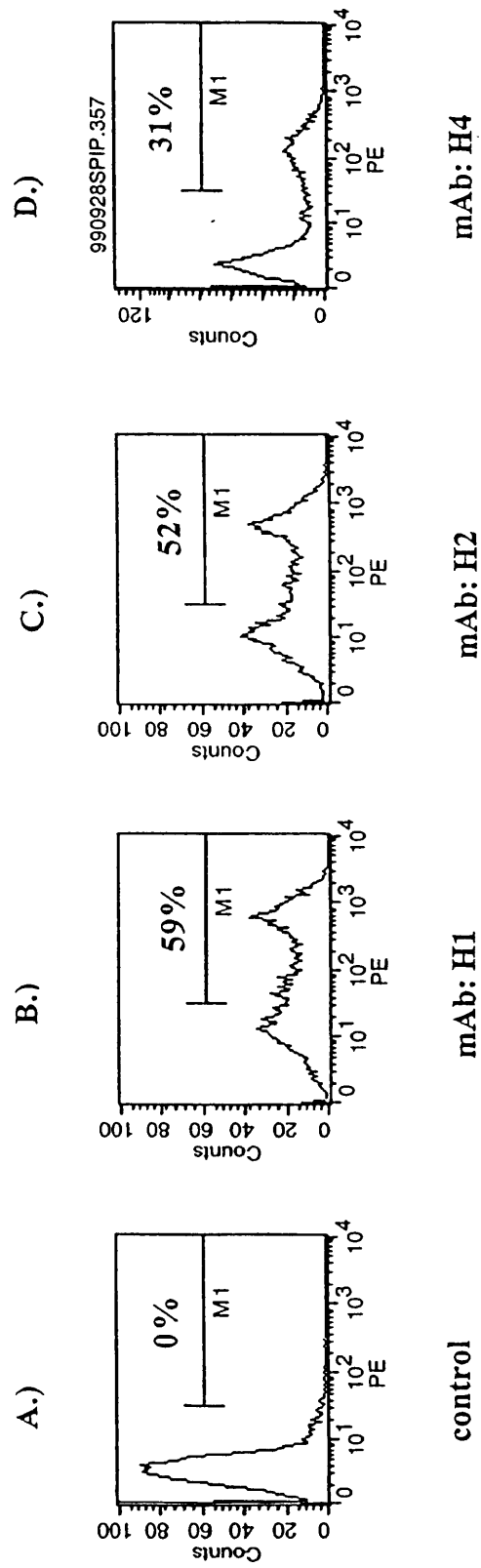
【図2】

MRELVNIPLV	HILTLVAFSG	TEKLPKAPVI	TTPLETVDAL	VEEVATFMCA	50
VESYPQPEIS	WTRNKILIKL	FDTRYSIREN	GQLLTILSVE	DSDDGIYCCT	100
ANNGVGGAVE	SCGALQVKMK	PKITRPPINV	KIIEGLKAVL	PCTTMGNPKP	150
SVSWIKGDSP	LRENSRIAVL	ESGSLRIHNV	QKEDAGQYRC	VAKNSLGTAY	200
SKVVKLEFEV	FARILRAPES	HNVTFGSFVT	LHCTATGIPV	PTITWIENG	250
AVSSGSIQES	VKDRVIDSRL	QLFITKPGLY	TCIATNKHGE	KFSTAKAAAT	300
ISIAEWSKPQ	KDNKGCAQY	RGEVCNAVLA	KDALVFLNTS	YADPEEAQEL	350
LVHTAWNELK	VVSPVCRPAA	EALLCNHIFQ	ECSPGVVPTP	IPICREYCLA	400
VKELFCAKEW	LVMEEKTHRG	LYRSEMHLLS	VPKCSKLPSM	HWDPTACARL	450
PHLDYNKENL	KTFPPMTSSK	PSVDIPNLPS	SSSSFSVSP	TYSMTVIISI	500
MSSFAIFVLL	TITTLYCCRR	RKQWKNKKRE	SAAVTLTTL	SELLLDRLHP	550
NPMYQRMPLL	LNPKLLSLEY	PRNNIEYVRD	IGEGAFGRVF	QARAPGLLPY	600
EPFTMVAVKM	LKEEASADMQ	ADFQREAAAL	AEFDNPNIVK	LLGVCAVGKP	650
MCLLFEYMA	GDLNEFLRSM	SPHTVCSLSH	SDLSMRAQVS	SPGPPPLSCA	700
EQLCIARQVA	AGMAYLSERK	FVHRDLATRN	CLVGEMVVK	IADFGLSRNI	750
YSADYYKANE	NDAIPIRWMP	PESIFYNRYT	TESDVWAYGV	VLWEIFYSYGL	800
QPYYGMAHEE	VIYYVRDGN	LSCPENCPE	LYNLMRLCWS	KLPADRPSFT	850
SIHRILERMC	ERAEGTVSV				869

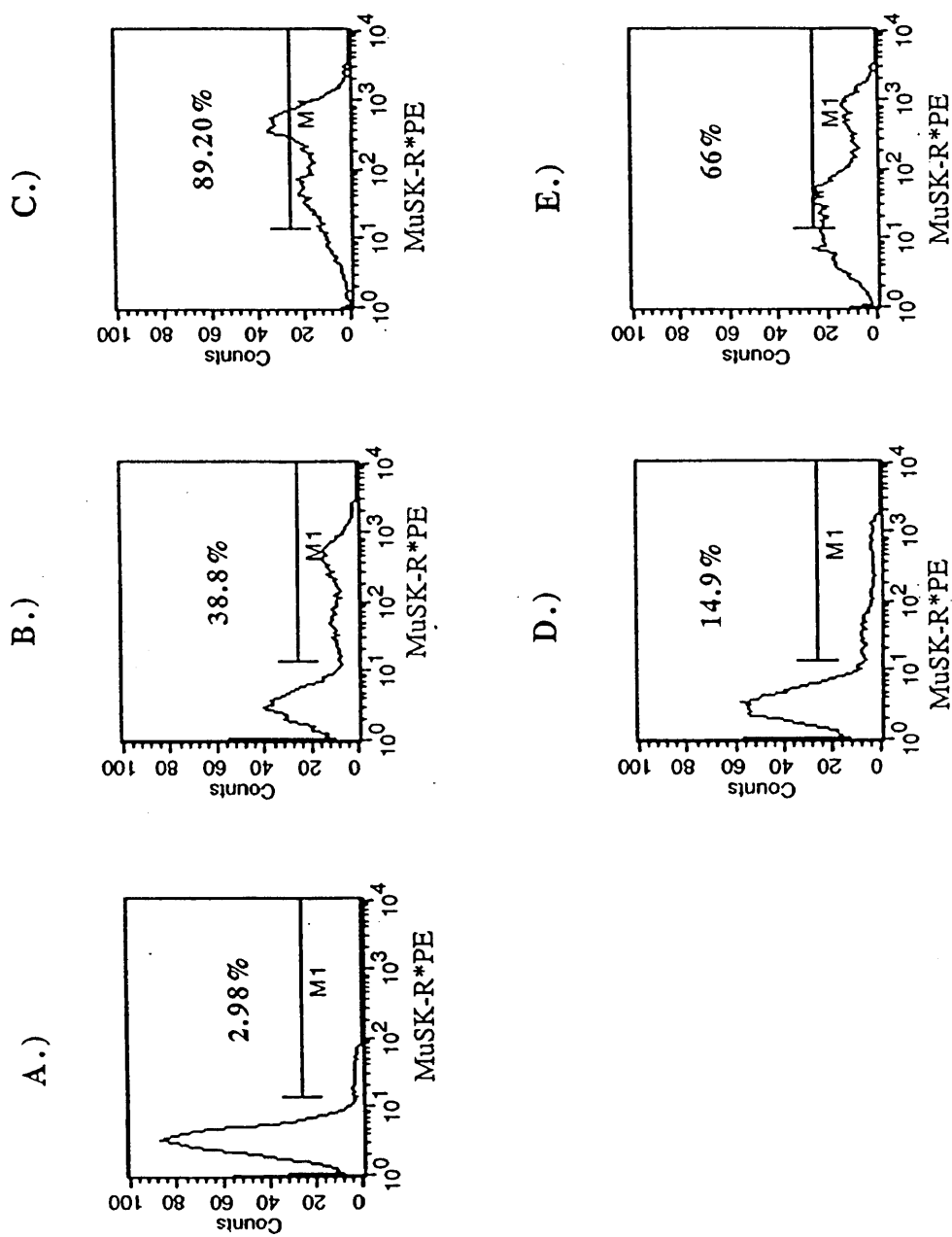
【図3】



【図4】



【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/EP 01/03543
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 G01N33/566 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHOU, H. ET AL.: "Distinct domains of MusK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 146, no. 5, 6 September 1999 (1999-09-06), pages 1133-1146, XP002175851 figure 8	1-24
Y	WO 95 06723 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;BORDIGNON CLAUDIO (IT); MAVILIO FULVIO () 9 March 1995 (1995-03-09) cited in the application page 1, last paragraph -page 2, paragraph 4 -/--	1-24
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 August 2001		10/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5016 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/EP 01/03543

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HILDINGER M ET AL: "Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking." GENE THERAPY, vol. 5, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 1222-1230, XP000990645 ISSN: 0969-7128 abstract ---	1-24
P,A	US 6 107 477 A (WHITNEY MICHAEL A ET AL) 22 August 2000 (2000-08-22) column 4, line 32 - line 40 ---	1-24
A	GLASS, D.J. ET AL.: "Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors: required role for the MuSK ectodomain?" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 94, August 1997 (1997-08), pages 8848-8853, XP002175852 the whole document ---	1-24
A	WO 99 10494 A (GENENTECH INC) 4 March 1999 (1999-03-04) page 52, line 13 -page 55 -----	22

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 22

Claim 22 lacks the essential features on which a search can be based namely the structural features of the epitope referred to. The ISA is not in a position to check all antibodies against MuSK-R for recognising the same unidentified epitope recognised by the H1 antibody.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: application No

PCT/EP 01/03543

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506723	A	09-03-1995	IT 1261847 B	03-06-1996
			CA 2170757 A	09-03-1995
			EP 0724634 A	07-08-1996
			JP 2781276 B	30-07-1998
			JP 9501569 T	18-02-1997
			US 6074836 A	13-06-2000
US 6107477	A	22-08-2000	US 5928888 A	27-07-1999
			AU 4505797 A	17-04-1998
			EP 0952976 A	03-11-1999
			WO 9813353 A	02-04-1998
WO 9910494	A	04-03-1999	AU 8831298 A	16-03-1999
			EP 1009831 A	21-06-2000

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF
, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G
M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ
, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B
Z, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE
, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, I
S, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK
, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, P
T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL
, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA63 CA04 CA06 DA03

EA02 FA02 GA11 HA14 HA15

4B063 QA18 QQ08 QQ43 QQ49 QR32

QR55 QS33 QS34

4H045 AA11 CA40 DA76 EA54 FA74

专利名称(译)	选择标记基因		
公开(公告)号	JP2003533183A	公开(公告)日	2003-11-11
申请号	JP2001571765	申请日	2001-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ピピッグスザンヌデグマー ベレスゲイバー		
发明人	ピピッグ スザンヌ・デグマー ベレス ゲイバー		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/705 C07K16/28 C12N9/12 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/569		
CPC分类号	C12N9/1205 C07K14/705 G01N33/56966		
FI分类号	C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ49 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	阿部正弘		
优先权	09/539248 2000-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及蛋白酪氨酸激酶受体 (MuSK-R) 或突变体MuSK-R (mMuSK-R) 作为哺乳动物细胞特别是人细胞中的选择标记的用途。合适的标记是不能进行信号转导的mMuSK-R, 以及其细胞内结构域已通过缺失信号区而被修饰的分子。 本发明涉及鉴定转基因哺乳动物细胞的方法, 该方法包括将mMuSK-R作为选择标记引入靶细胞。 还公开了一种对转导的哺乳动物细胞进行免疫选择的方法, 该方法包括将所述细胞与特异性识别并结合MuSK-R或mMuSK-R的抗体一起孵育以鉴定转导的细胞。