

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 540772**

( P2002 - 540772A )

(43)公表日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02		1/68	Z 4 B 0 6 3
1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	ZNA A
		審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全135数 )	

(21)出願番号 特願2000 - 606760(P2000 - 606760)

(86) (22)出願日 平成12年3月24日(2000.3.24)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月25日(2001.9.25)

(86)国際出願番号 PCT/US00/07979

(87)国際公開番号 W000/56901

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 60/125,864

(32)優先日 平成11年3月24日(1999.3.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/127,222

(32)優先日 平成11年3月31日(1999.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ボード オブ リ-ジェンツ, ザ ユニ  
バーシティ オブ テキサス システム  
BOARD OF REGENTS, T  
HE UNIVERSITY OF T  
EXAS SYSTEM

アメリカ合衆国 78701 テキサス オース  
ティン ダブリュー. セブンス ストリー  
ト 201

(72)発明者 サイケス, キャサリン エフ.  
アメリカ合衆国 テキサス 75229, ダラ  
ス, レ ジャルダン 10519

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 線状および環状発現エレメント

(57)【要約】

本発明は、線状発現エレメント ( L E E ) および環状発現エレメント ( C E E ) に関し、これらは種々の分子生物プロトコルにおいて有用である。特に、本発明は、遺伝子機能、遺伝子機能の生物学的効果、抗原、およびプロモーター機能をスクリーニングするための L E E および C E E の使用に関する。本発明はまた、タンパク質、抗体、抗原、およびワクチンを産生する方法を提供する。また、本発明は、L E E および C E E を作製する方法、ならびにそのような方法によって産生された L E E および C E E に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 プロモーターおよびオープンリーディングフレームを含む線状核酸セグメントの発現の産生または調節についてアッセイする方法であって、該方法は、以下：

a) プロモーターおよびオープンリーディングフレームを含む線状核酸セグメントを得る工程；

b) 該オープンリーディングフレーム由来のポリペプチドの発現をもたらす条件下に、該線状核酸セグメントを置く工程；ならびに

c) 該ポリペプチドの発現の産生または調節についてアッセイする工程、を包含する、方法。

【請求項2】 前記線状核酸セグメントが、ターミネーターをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記線状核酸セグメントが、化学合成によって得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記合成が、該プロモーターの、前記オープンリーディングフレームへの非共有結合を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 ターミネーターの、前記オープンリーディングフレームへの非共有結合をさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記線状核酸が、PCR（登録商標）によって得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記線状核酸が、プラスミドから切り出される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記線状核酸が細胞に置かれるが、該細胞のゲノム中に組み込まれない、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記細胞が、細胞培養中にある、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記細胞が、生物体中に含まれる、請求項9に記載の方法

。

【請求項11】 前記生物体が、哺乳動物である、請求項10に記載の方法

。

【請求項12】 前記線状核酸が、前記細胞中に注入される、請求項8に記載の方法。

【請求項13】 前記注入が、マイクロプロジェクティルボンバードメントを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記線状核酸セグメントが、無細胞発現反応に置かれる、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記ポリペプチドの発現についてアッセイする工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記オープンリーディングフレームにおいてコードされるレポーター遺伝子産物の発現をアッセイする工程を包含する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記プロモーターの機能についてアッセイする工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記プロモーターの機能についてアッセイする工程は、前記オープンリーディングフレームにおいてコードされるレポーター遺伝子産物が発現されるか否かを決定する工程を包含する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 機能がアッセイされた、2つ以上の推定プロモーターの機能を比較する工程を包含する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 核酸配列を分析する方法であって、該方法が以下：

- a) 核酸セグメントを得る工程；
- b) 前記核酸セグメントをプロモーターおよびターミネーターに結合して、線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを作製する、工程；
- c) 該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントを、該核酸セグメントによってコードされる任意の産物の発現をもたらす条件下の、無細胞発現系または細胞に提供する工程；ならびに
- d) 該核酸配列によってコードされる任意の産物の任意の発現を分析する工程、を包含する、方法。

【請求項21】 前記核酸セグメントが、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られるDNAセグメントである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記核酸セグメントが、前記プロモーターおよび前記ターミネーターに非共有結合される、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 請求項22に記載の方法であって、前記非共有結合が、以下：

a) 前記核酸セグメントを含むPCR（登録商標）産物を得る工程であって、該PCR（登録商標）産物が、ウラシルDNAグリコシラーゼを用いて、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーからの増幅によって得られ、前記プロモーターおよび前記ターミネーターが結合し得る突出部を作製する、工程；

b) プロモーターおよびターミネーターを提供する工程；ならびに

c) 該プロモーターおよび該ターミネーターを該核酸セグメントに非共有結合し、前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントを作製する、工程、によって実施される、方法。

【請求項24】 請求項23に記載の方法であって、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する該プライマーが、互いに異なる配向において前記プロモーターおよび前記ターミネーターを含み、その結果、該プロモーターおよび該ターミネーターを前記オープンリーディングフレームに非共有結合する工程が、環状発現エレメントを生じる、方法。

【請求項25】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項20に記載の方法。

【請求項26】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、請求項20に記載の方法。

【請求項27】 前記核酸配列が、オープンリーディングフレームを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項28】 前記オープンリーディングフレームの機能を分析する方法としてさらに規定される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記核酸が、ポリペプチドをコードするか否かを決定するために核酸を分析する方法としてさらに規定される、請求項20に記載の方法。

【請求項30】 前記ポリペプチドが、抗原ポリペプチドであるか否かを決

定するための方法としてさらに規定される、請求項20に記載の方法。

【請求項31】 前記ポリペプチドの生物学的特性を決定する方法としてさらに規定される、請求項20に記載の方法。

【請求項32】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、ワクチンにおける使用のために適切か否かを決定する方法としてさらに規定される、請求項20に記載の方法。

【請求項33】 1つより多い異なる核酸セグメントが単一の手順で分析される、請求項20に記載の方法。

【請求項34】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、細胞中に置かれるが、該細胞のゲノム中には組み込まれない、請求項20に記載の方法。

【請求項35】 前記細胞が、細胞培養中にある、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記細胞が、生物体中に含まれる、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記生物体が、哺乳動物である、請求36に記載の方法。

【請求項38】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、該細胞中に注入される、請求項34に記載の方法。

【請求項39】 前記注入が、マイクロプロジェクティルボンバードメントを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、無細胞発現反応に置かれる、請求項20に記載の方法。

【請求項41】 プロモーターとしての活性について核酸セグメントを分析する方法であって、該方法は以下：

- a) 推定プロモーターをコードする核酸セグメントを得る工程；
- b) 該推定プロモーターをコードする該核酸セグメントを、ポリペプチドをコードする核酸に結合して、線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを作製する工程；
- c) 該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントを、該ポリペプチドの

発現をもたらす条件下の、無細胞発現系または細胞に提供する工程；および

d) 該ポリペプチドの任意の発現を分析する工程、  
を包含する、方法。

【請求項42】 前記推定プロモーターをコードする前記核酸セグメントは、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られるDNAセグメントである、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 前記推定プロモーターをコードする前記核酸セグメントが、ポリペプチドをコードする前記核酸に非共有結合される、請求項41に記載の方法。

【請求項44】 請求項43に記載の方法であって、ここで前記非共有結合が、以下：

a) 前記推定プロモーターをコードする前記核酸セグメントを含むPCR（登録商標）産物を得る工程であって、該PCR（登録商標）産物がウラシルDNAグリコシラーゼを用いて、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーからの増幅によって得られ、ポリペプチドをコードする前記核酸が結合し得る突出部を作製する、工程；

b) ポリペプチドをコードする該核酸を提供する工程；および

c) 該推定プロモーターをコードする該核酸セグメントを、ポリペプチドをコードする該核酸に非共有結合して、前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントを作製する、工程、  
によって実施される、方法。

【請求項45】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項41に記載の方法。

【請求項46】 前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、ターミネーターをコードする核酸配列に結合される、請求項41に記載の方法。

【請求項47】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、レポーター遺伝子産物をコードする、請求項41に記載の方法。

【請求項49】 前記レポーター遺伝子産物の発現についてアッセイする工程を包含する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 推定プロモーターをコードする1つより多い異なる核酸セグメントが、単一の手順で分析される、請求項41に記載の方法。

【請求項51】 推定プロモーターをコードする1つより多い核酸を分析する工程を包含する、請求項50に記載の方法。

【請求項52】 推定プロモーターをコードする前記核酸が、ネイティブな核酸である、請求項50に記載の方法。

【請求項53】 推定プロモーターをコードする前記核酸が、ネイティブなプロモーター配列の変異により調製された、請求項50に記載の方法。

【請求項54】 推定プロモーターをコードする前記核酸が、化学合成によって調製された、請求項50に記載の方法。

【請求項55】 前記線状発現単位または前記環状発現単位が、細胞中に置かれるが、該細胞のゲノム中には組み込まれない、請求項41に記載の方法。

【請求項56】 前記細胞が細胞培養中にある、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 前記細胞が生物体中に含まれる、請求項55に記載の方法

。

【請求項58】 前記生物体が哺乳動物である、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記線状発現単位または前記環状発現単位が、前記細胞中に注入される、請求項55に記載の方法。

【請求項60】 前記注入が、マイクロプロジェクティルボンバードメントを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記線状発現単位または前記環状発現単位が、無細胞発現反応に置かれる、請求項55に記載の方法。

【請求項62】 生物学的応答をスクリーニングする方法であって、以下：

a) プロセスによって線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを得る工程であって、該プロセスは、以下：

オープンリーディングフレームを含むDNAセグメントを得る工程；

該オープンリーディングフレームをプロモーターおよびターミネーターに結合

して、線状発現エレメントを作製する工程、  
を包含する、工程；ならびに

b) 該オープンリーディングフレームによってコードされる任意の産物の発現をもたらし条件下で、該線状発現エレメントを生物体に提供し、その結果、免疫応答が該動物に産生される、工程、  
を包含する、方法。

【請求項63】 前記DNAセグメントが、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られる、請求項62に記載の方法。

【請求項64】 前記オープンリーディングフレームが、前記プロモーターおよび前記ターミネーターに非共有結合される、請求項62に記載の方法。

【請求項65】 請求項62に記載の方法であって、ここで前記非共有結合が以下：

a) 前記オープンリーディングフレームを含むPCR（登録商標）産物を得る工程であって、該PCR（登録商標）産物が、ウラシルDNAグリコシラーゼを用いて、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーからの増幅によって得られ、前記プロモーターおよび前記ターミネーターが結合し得る突出部を作製する、工程；

b) プロモーターおよびターミネーターを提供する工程；ならびに

c) 該プロモーターおよび該ターミネーターを、該オープンリーディングフレームに非共有結合して、該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントを作製する、工程、  
によって実施される、方法。

【請求項66】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、前記生物体中に注入される、請求項62に記載の方法。

【請求項67】 前記注入が、マイクロプロジェクタイトルボンバードメントを用いて実施される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項62に記載の方法。

【請求項69】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、

請求項62に記載の方法。

【請求項70】 1つより多い型の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、前記生物体に導入される、請求項62に記載の方法。

【請求項71】 分析の目的のために、抗体を産生する方法としてさらに規定される、請求項62に記載の方法。

【請求項72】 前記生物体にワクチンを投与方法としてさらに規定される、請求項62に記載の方法。

【請求項73】 前記生物体がヒトである、請求項62に記載の方法。

【請求項74】 動物にワクチンを投与方法であって、以下：

a) オープンリーディングフレームを含むDNAセグメントを得る工程、および該オープンリーディングフレームをプロモーターおよびターミネーターに結合して線状発現エレメントを作製する工程を包含するプロセスによって、線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを得る工程；ならびに

b) 該オープンリーディングフレームによってコードされる任意の産物の発現をもたらす条件下で、該線状発現エレメントを生物体に提供し、その結果、免疫応答が該動物において産生される、工程、を包含する、方法。

【請求項75】 前記オープンリーディングフレームが、前記プロモーターおよび前記ターミネーターに非共有結合される、請求項74に記載の方法。

【請求項76】 前記線状発現エレメントまたは前記環状発現エレメントが、前記生物体中に注入される、請求項74に記載の方法。

【請求項77】 前記注入が、マイクロプロジェクティルボンバードメントを用いて実施される、請求項76に記載の方法。

【請求項78】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項74に記載の方法。

【請求項79】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、請求項74に記載の方法。

【請求項80】 1つより多い型の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、前記生物体に導入される、請求項74に記載の方法。

【請求項 8 1】 複数の型の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、前記生物体に導入される、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】 前記複数の型の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、異なるポリペプチドの病原体をコードするエレメントを含む、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】 前記病原体が、ウイルス、細菌、真菌、藻類、原生動物または昆虫である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】 前記病原体が、ウイルスである、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】 ウイルスの全ての潜在的なアレルゲンをコードする個々の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、複数の型の線状発現エレメントまたは環状発現エレメント中に含まれる、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】 前記動物がヒトである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】 生物体において病原体に特異的な免疫応答を産生するのに有効なオープンリーディングフレームを選択する方法であって、以下：

a) 複数の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを調製する工程であって、該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントが、以下：

病原体由来のオープンリーディングフレームを含む複数の DNA セグメントを得る工程；ならびに

オープンリーディングフレームをプロモーターおよびターミネーターに結合し、複数の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを作製する、工程、を包含する方法によって産生される、工程；

b) 該複数の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを生物体中に導入する工程；ならびに

c) 該免疫応答を産生するのに有効である、該複数の線状発現エレメントオープンリーディングフレームまたは環状発現エレメントオープンリーディングフレームから選択される工程、を包含する、方法。

【請求項 8 8】 前記病原体が、ウイルス、細菌、真菌、藻類、原生動物ま

たは昆虫である、請求項87に記載の方法。

【請求項89】 複数の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが調製された前記病原体を用いたチャレンジに対して、前記生物体を試験し、ここで該生物体が該病原体を用いたチャレンジに対して保護される、工程、をさらに包含する、請求項87に記載の方法。

【請求項90】 保護応答を与える1つ以上の抗原が、前記生物体の免疫学的スクリーニングによって同定される、請求項89に記載の方法。

【請求項91】 前記複数の線状発現エレメントまたは環状発現エレメントが、前記動物中に注入される、請求項87に記載の方法。

【請求項92】 前記注入が、マイクロプロジェクティルボンバードメントにより達成される、請求項91に記載の方法。

【請求項93】 線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを産生する方法であって、以下：

a) オープンリーディングフレームを含むDNAセグメントを得る工程；ならびに

b) 該オープンリーディングフレームを、プロモーターおよびターミネーターに結合して、線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを作製する、工程、を包含する、方法。

【請求項94】 前記DNAセグメントが、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られる、請求項93に記載の方法。

【請求項95】 前記PCR（登録商標）反応が、デオキシウリジンを組み込んでいる相補的なストレッチを有するオリゴヌクレオチドを用いてプライムされる、請求項94に記載の方法。

【請求項96】 前記デオキシウリジンが、前記相補的なストレッチの3位ごとに組み込まれる、請求項95に記載の方法。

【請求項97】 前記オープンリーディングフレームが、前記プロモーターおよび前記ターミネーターに非共有結合される、請求項93に記載の方法。

【請求項98】 請求項97に記載の方法であって、前記非共有結合が、以下：

a) 前記オープンリーディングフレームを含むPCR(登録商標)産物を得る工程であって、該PCR(登録商標)産物が、ウラシルDNAグリコシラーゼを用いて、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーからの増幅によって得られ、前記プロモーターおよび前記ターミネーターが結合し得る突出部を作製する、工程；

b) プロモーターおよびターミネーターを提供する工程；

c) 該プロモーターおよび該ターミネーターを、該オープンリーディングフレームに非共有結合して、該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントを作製する、工程、

によって実施される、方法。

【請求項99】 前記デオキシウリジンが、前記相補的なストレッチの3位ごとに組み込まれる、請求項98に記載の方法。

【請求項100】 請求項98に記載の方法であって、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する前記プライマーが、互いに異なる配向において前記プロモーターおよび前記ターミネーターを含み、その結果、該プロモーターおよび該ターミネーターを該オープンリーディングフレームに非共有結合する工程が、環状発現エレメントを生じる、方法。

【請求項101】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項93に記載の方法。

【請求項102】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、請求項93に記載の方法。

【請求項103】 線状発現エレメントまたは環状発現エレメントであって、該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントは、以下：

a) オープンリーディングフレームを含むDNAセグメントを得る工程；および

b) 該オープンリーディングフレームを、プロモーターおよびターミネーターに結合して、線状発現エレメントまたは環状発現エレメントを作製する工程、を包含する、方法によって産生される、線状発現エレメントまたは環状発現エレメント。

【請求項104】 前記DNAセグメントが、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られる、請求項103に記載の発現エレメント。

【請求項105】 前記PCR（登録商標）反応が、デオキシウリジンを組み込んでいる相補的なストレッチを有するオリゴヌクレオチドを用いてプライムされる、請求項104に記載の発現エレメント。

【請求項106】 前記デオキシウリジンが、前記相補的なストレッチの3位ごとに組み込まれる、請求項105に記載の発現エレメント。

【請求項107】 前記オープンリーディングフレームが、前記プロモーターおよび前記ターミネーターに非共有結合される、請求項103に記載の発現エレメント。

【請求項108】 請求項107に記載の発現エレメントであって、ここで前記非共有結合が、以下：

a) 前記オープンリーディングフレームを含むPCR（登録商標）産物を得る工程であって、該PCR（登録商標）産物がウラシルDNAグリコシラーゼを用いて、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーからの増幅によって得られ、前記プロモーターおよび前記ターミネーターが結合し得る突出部を作製する、工程；

b) プロモーターおよびターミネーターを提供する工程；

c) 該プロモーターおよび該ターミネーターを、該オープンリーディングフレームに非共有結合して、該線状発現エレメントまたは該環状発現エレメントを作製する、工程、

によって実施される、発現エレメント。

【請求項109】 前記デオキシウリジンが、前記相補的なストレッチの3位ごとに組み込まれる、請求項108に記載の発現エレメント。

【請求項110】 請求項108に記載の発現エレメントであって、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する前記プライマーが、互いに異なる配向において前記プロモーターおよび前記ターミネーターを含み、その結果、該プロモーターおよび該ターミネーターを該オープンリーディングフレームに非共有結合する工程が、環状発現エレメントを生じる、発現エレメント。

【請求項111】 前記プロモーターが、真核生物プロモーターである、請求項108に記載の発現エレメント。

【請求項112】 前記ターミネーターが、真核生物ターミネーターである、請求項108に記載の発現エレメント。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

本出願は、米国仮出願第60/125,864号(1999年3月24日出願)および米国仮出願第60/127,222号(1999年3月31日出願)の優先権を主張し、それらの各々の開示は、その全体において本明細書中に参考として詳細に援用される。

**【0002】**

政府は、DARPA連邦助成金番号BAA 96-24に依じて、本発明において権利を所有する。

**【0003】****(1. 発明の分野)**

本発明は、一般に、分子生物学および機能ゲノム学の分野に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子または遺伝子成分の機能的効果または生物学的効果について遺伝子または遺伝子成分をスクリーニングする方法、および免疫応答または免疫試薬を生成する方法に関する。

**【0004】****(2. 関連技術の説明)**

ゲノム配列決定の尽力は、多くのデータを生成している。配列情報は、ヒトのみからだけではなく、植物、動物および微生物からも集められている。この豊富なデータは、現在利用可能である数百万の遺伝子を分析し、そして機能的に評価するための新規技術についての必要性を生み出した。機能ゲノム学が適用される領域の拡大するレパートリーは、進化への新しい洞察を生じ、細胞経路の統合様式を明らかにし、そして新規な薬物およびワクチンを生み出すはずである。現在の挑戦は、これらの進歩を可能にする技術を開発することである。

**【0005】**

例えば、現在、公的な領域およびさらなる計画において少なくとも30の微生物のゲノム配列が進行中である。これらのほとんどは、ヒトまたは商業動物の病原体である。1つのしばしば表明される希望は、これらの配列の知識が、これら

の病原体に対するワクチンの開発を導くことである。コンピュータ解析が有用であり得るが、よりの確なアプローチは、保護因子としてのその価値のために、動物における全ての病原体からの各々の遺伝子を機能的にスクリーニングすることである。しかし、現在の方法を使用すると、各病原体からの数千の遺伝子をクローニングし、次いでこれらから適切な試薬を調製する時間および費用が、非常にかさむ。

#### 【0006】

任意の特定の遺伝子産物の活性またはそれに対する生理学的応答を迅速かつ効果的に評価するために、プラスミドおよび細菌のクローニング手順を回避するアッセイ方法が、必要とされる。この理想的な方法はまた、配列決定計画からの多量の新規遺伝子が、生物、細胞または無細胞系において迅速にスクリーニングされることを可能にする。

#### 【0007】

(発明の要旨)

本発明は、完全な遺伝子(プロモーター、コード領域、およびターミネーター)を含む、線状(linear)発現エレメント(「LEE」)および/または環状(circular)発現エレメント(「CEE」)の産生を可能にする方法および組成物を決定した。これらのLEEおよびCEEは、細胞またはインタクトな生物に直接的に導入され、そして発現され、標準的なスーパーコイル状の複製性プラスミドからの発現レベルに匹敵する発現レベルを生じ得る。

#### 【0008】

いくつかの一般的な実施形態において、本発明は、プロモーターまたは推定プロモーターおよびORFまたは推定ORFを含む、線状または環状の核酸セグメントからの少なくとも1つのポリペプチドの発現の産生または調節についてアッセイする方法に関する。これらの方法としては、以下が挙げられ得る：a)プロモーターまたは推定プロモーターおよびペプチドをコードするORFまたは推定ORFを含む、少なくとも1つの線状または環状核酸セグメントを得る工程；b)ORFからのポリペプチドの発現を行う条件下に、核酸セグメントを配置する工程；ならびにc)ORFまたは推定ORFからのポリペプチドの発現の産生ま

たは調節についてアッセイする工程。多くの好ましい実施形態において、この核酸セグメントは、ターミネーターを含む。しかし、線状核酸セグメントが無細胞発現系においてアッセイされる適用を含むいくつかの適用において、ターミネーターは、必要とされない。いくつかの場合、この線状核酸は、PCR（登録商標）プロセスによって得られる。他の状況において、この線状核酸は、プラスミド、染色体、または核酸の他のより大きな片から切断され得；これらの場合には、核酸のより大きな片から切断された線状核酸は、代表的には、既に作動可能な関係にある、プロモーターおよびORF、ならびに多くの場合には、ターミネーターを含む。

#### 【0009】

もちろん、当業者は、プロモーターまたは推定プロモーターおよび任意のターミネーターが、代表的には、本明細書中に開示される方法または当業者に公知の方法を用いて、ORFまたは推定ORFに作動可能な関係で配置されることを理解する。

#### 【0010】

多くの場合、線状核酸セグメントは、合成によって得られる。いくつかの好ましい方法において、この合成は、ORFへのプロモーターの非共有結合を含む。例えば、この非共有結合は、以下の工程によって行われ得る：a)核酸セグメントを含むPCR（登録商標）産物を得る工程であって、このPCR（登録商標）産物が、デオキシウリジンを含む相補的なストレッチを有する少なくとも1つのプライマーから増幅させ、ウラシルDNAグリコシラーゼを用いてプロモーターが連結し得る突出部を作製することによって得られる、工程；b)プロモーターを提供する工程；およびc)このプロモーターを核酸セグメントに非共有結合させて、線状または環状発現エレメントを作製する工程。多くの場合に、ターミネーターは、同様の技術を使用して、ORFに非共有結合されるが、ORFまたは推定ORFは、ORFに組み込まれたターミネーターを有し得、その結果、ターミネーターの付加が必要とされ得ないことが可能である。いくつかの現在用いられている実施形態において、相補的なストレッチを有するプライマーは、デオキシウリジンを含む。これらのストレッチは、ウラシル-DNAグリコシラーゼ、

または別の適切な酵素を使用して、プロモーターが非共有結合し得る突出部を作製して、線状または環状発現エレメントの作製を可能にする。ORFへのターミネーターの非共有結合は、ほとんど同じ技術によって達成され得る。もちろん、他のヌクレオチド/酵素の対が、この非共有結合を行うために使用され得ること、および非共有結合の他の技術が、本発明の目的が達成される限り用いられ得ることを、当業者は理解する。いくつかの特定の実施形態において、このプライマーは、このプロモーターおよびこのターミネーターをORFに非共有結合する工程が環状発現エレメントを生じるように、互いに異なる配向 (divergent orientation) においてプロモーターおよびターミネーターを含む。

#### 【0011】

プロモーターは、本発明の目的のために機能する任意の起源のプロモーターであり得るが、いくつかの実施形態において、このプロモーターは、真核生物プロモーターである。同様に、ターミネーターは、任意の供給源のターミネーターであり得るが、いくつかの場合には、このターミネーターは、真核生物ターミネーターである。

#### 【0012】

ORF、推定ORF、またはLEEもしくはCEEに含まれる任意の他の核酸セグメントを含む核酸セグメントは、任意の種々の供給源から得られ得る。例えば、これは、プロモーターから切り出された線状核酸セグメントからPCR（登録商標）によって得られ得るか、または合成によって得られ得る。

#### 【0013】

本発明に従ういくつかの方法において、LEEまたはCEEを形成する核酸セグメントは、ORFまたは推定ORFからのポリペプチドの発現を行う条件下の細胞中に配置される。いくつかの好ましい実施形態において、線状核酸は、細胞中に配置されるが、細胞のゲノムには組み込まれない。本発明者らは、ゲノムへの組み込みが、線状核酸の発現に必要とされないことを決定した。さらに、本発明者らは、スーパーコイル状のプラスミドが遺伝子の発現に必要とされないことを決定した。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞培養物においてである

が、一方、細胞は、組織または生物全体に含まれる。全ての生物（動物、哺乳動物、魚類、鳥類、爬虫類、ヒト、ウサギ、ラット、ハムスター、マウスおよび他の細胞を含むがこれらに限定されない）が、この点に関して意図される。本発明のLEEおよびCEEは、本明細書中の他の箇所に記載される任意の技術を使用して、細胞中に配置され得る。いくつかの好ましい実施形態において、LEEまたはCEEは、細胞中に注入される。いくつかの特に好ましい実施形態において、注入は、マイクロプロジェクティルボンバードメント（microprojectile bombardment）を含む。他の実施形態において、LEEまたはCEEは、無細胞発現反応に置かれ得る。

#### 【0014】

核酸配列を分析する方法に関する種々の好ましい実施形態としては、以下が挙げられる：a) 核酸セグメントを得る工程；b) 核酸セグメントを、プロモーターおよびターミネーターに連結して、線状または環状発現エレメントを作製する工程；c) 線状または環状発現エレメントを、無細胞発現系に、または核酸セグメントによってコードされる任意の産物の発現を行う条件下の細胞に提供する工程；ならびにd) この核酸配列によってコードされる任意の産物の任意の発現を分析する工程。これらの方法に用いられる核酸セグメントは、上記の様式、および本明細書の他の箇所に記載される様式において得られ得る。同様に、プロモーターおよびターミネーターの連結は、他の箇所に記載されるように、非共有結合であり得る。いくつかの実施形態において、ここで核酸配列は、例えば、この核酸がポリペプチドをコードするか否かを決定するために、機能について分析されるORFを含む。これらの方法はまた、ORFが抗原性ポリペプチドをコードするか否かを決定すること、および/またはこのポリペプチドの生物学的特性を決定することを可能にする。例えば、線状もしくは環状発現エレメント、またはそれらの中に含まれるORFが、ワクチンにおける使用のために適切であるか否かを決定し得る。これらの方法の利点は、1よりも多い異なる核酸セグメントが、単一の手順において分析されるということである。

#### 【0015】

上記および本明細書の他の箇所で議論されるように、本発明の方法は、ORF

または推定ORFにコードされ得るポリペプチドの発現をアッセイする工程を含み得る。いくつかの好ましい実施形態において、この方法は、ポリペプチドの発現をアッセイする工程を含み；いくつかの場合、このようなアッセイする工程は、ポリペプチドの同定を含む。他の実施形態は、ORFにコードされるレポーター遺伝子産物の発現をアッセイする工程を含み得る。

#### 【0016】

なお他の特定の実施形態は、プロモーターの機能についてアッセイする工程を含む。例えば、プロモーターの機能は、ORFにコードされるレポーター遺伝子産物が、発現されるか否かを決定することによってアッセイされ得る。レポーター遺伝子は、レポーター遺伝子上流に配置された一般的なDNAプロモーターが機能的である条件下でのみ現れる容易に検出可能な表現型を、その組換え宿主に対して付与する遺伝子である。一般に、レポーター遺伝子は、細胞培養物の分析によって（例えば、細胞培養物の蛍光比色分析、放射性同位体分析、または分光測光分析によって）検出可能である、それ以外には宿主細胞によって産生されないポリペプチド（マーカートンパク質）をコードする。いくつかの実施形態において、プロモーター機能の評価は、機能がアッセイされる2以上の推定プロモーターの機能を比較する工程を包含する。この様式において、本発明は、特定の系において機能について種々のプロモーターをスクリーニングする効率的な様式を提供する。例えば、種々の供給源由来のプロモーターのライブラリーは、特定の系に対して最適なプロモーターが決定されるように評価され得る。あるいは、特定のプロモーターの種々の変異体が、プロモーター活性を有するか否かを決定するためにアッセイされ得る。このようなアッセイを行うために、標準的な分子生物学的手段を使用して、種々の線状核酸セグメント（これらの各々は、推定プロモーターまたはプロモーター、およびポリペプチドをコードするレポーター遺伝子を含む）を構築し得る。次いで、この種々の線状核酸は、レポーター遺伝子の発現について調べることによってそれらの機能の評価を可能にする系に導入され得る。

#### 【0017】

ORFまたは推定ORFの分析を可能にすることに加えて、本発明は、プロモ

ーターとしての活性について、核酸セグメントを分析する方法を提供する。この方法は、以下を包含する： a ) 推定プロモーターをコードする核酸セグメントを得る工程； b ) 推定プロモーターをコードする核酸セグメントを、ポリペプチドをコードする核酸に連結して、線状または環状発現エレメントを作製する工程； c ) 線状または環状発現エレメントを、無細胞系に、またはポリペプチドの発現を行う条件下の細胞に提供する工程；ならびに d ) ポリペプチドの任意の発現を分析する工程。例えば、プロモーターの機能は、ORFにコードされるレポーター遺伝子産物が発現されるか否かを決定することによってアッセイされ得る。レポーター遺伝子は、レポーター遺伝子上流に配置される一般的なDNAプロモーターが機能的である条件下でのみ現れる容易に検出可能な表現型を、その組換え宿主に付与する遺伝子である。一般に、レポーター遺伝子は、細胞培養物の分析によって（例えば、細胞培養物の蛍光比色分析、放射性同位体分析、または分光測光分析によって）検出可能である、それ以外には宿主細胞によって産生されないポリペプチド（マーカートンパク質）をコードする。いくつかの実施形態において、プロモーター機能の評価は、機能がアッセイされる2以上の推定プロモーターの機能を比較する工程を包含する。この様式において、本発明は、特定の系において機能について種々のプロモーターをスクリーニングする効率的な様式を提供する。例えば、種々の供給源由来のプロモーターのライブラリーは、特定の系に対して最適なプロモーターが決定されるように評価され得る。あるいは、特定のプロモーターの種々の変異体が、プロモーター活性を有するか否かを決定するためにアッセイされ得る。このようなアッセイを行うために、標準的な分子生物学的手段を使用して、種々の線状核酸セグメント（これらの各々は、推定プロモーターまたはプロモーター、およびポリペプチドをコードするレポーター遺伝子を含む）を構築し得る。次いで、この種々の線状核酸は、レポーター遺伝子の発現について調べることによってそれらの機能の評価を可能にする系に導入され得る。この様式において、プロモーターまたは推定プロモーターの機能についてアッセイし、そしてORFにコードされるレポーター遺伝子産物が発現されるか否かを決定することによって、このプロモーターまたは推定プロモーターが機能的であるか否か、および任意のこのような機能の程度を決定し得る。いくつか

の実施形態において、この方法は、2以上の推定プロモーターの機能を比較するために使用され得る。推定プロモーターをコードする1よりも多い異なる核酸セグメントが、単一の手順において分析され得ることは、有利である。推定プロモーターをコードする核酸は、例えば、ネイティブなプロモーター配列の変異によって調製されるか、または化学合成によって調製される、ネイティブな核酸であり得る。当業者は、このこれらの技術を使用して、任意の供給源からのプロモーターまたは推定プロモーターを試験および最適化し得る。

#### 【0018】

さらなる実施形態において、本発明は、生物学的応答についてスクリーニングする方法に関する。この方法は、以下を包含する：a) ORFを含むDNAセグメントを得ること；ORFをプロモーターおよびターミネーターに連結して、線状または環状発現エレメントを作製すること、を含むプロセスによって、線状または環状発現エレメントを得る工程；ならびにb) ORFによってコードされる任意の産物の発現を行う条件下で、生物に発現エレメントを提供する工程。このような場合、1よりも多い型の線状または環状発現エレメントが、生物に導入される。これらの方法は、例えば、生物学的機能が免疫応答を生じることである場合に、分析の目的のために、抗体を産生する方法を含み得る。他の実施形態において、これらの方法は、以下に記載されるように、生物をワクチン接種する方法を提供し得る。

#### 【0019】

いくつかの特定の実施形態において、本発明は、生物のワクチン接種を可能にする。これは、ORFを含むDNAセグメントを得ること、およびORFをプロモーターおよびターミネーターに連結して、線状または環状発現エレメントを作製すること、を含むプロセスによって、線状または環状発現エレメントを得る工程；ならびにc) ORFによってコードされる任意の産物の発現を行う条件下で、生物に発現エレメントを提供する工程であって、その結果、免疫応答が、動物において生じる、工程、を包含する。このようなワクチンにおいて、1よりも多い型の線状または環状発現エレメントが、1よりも多い感染性因子、癌、もしくは他の疾患に対して、または単一の感染性因子、癌、もしくは他の疾患に由来する種

々の抗原に対して指向され得る多価ワクチンを作製するために、生物に導入される。例えば、複数の型の線状または環状発現エレメントが、生物に導入され得、そして複数の型の線状または環状発現エレメントは、病原体の異なるポリペプチドをコードするエレメントを含み得る。当業者は、病原体が任意の形態の病原体であり得、いくつかの好ましい実施形態では、この病原体は、ウイルス、細菌、真菌、藻類、原生動物、節足動物、線虫、扁形動物、または植物であることを理解する。さらにより特定の実施形態において、ウイルスの全ての潜在的なアレルゲンをコードする、個々の線状または環状発現エレメントは、複数の型の線状または環状発現エレメントに含まれる。ORFはまた、当業者に公知のように、癌、または別の疾患に対するワクチン接種に有用であるポリペプチドをコードし得る。

#### 【0020】

本発明はまた、生物における病原体、癌、または他の疾患に特異的な免疫応答を生成するに効果的なORFを選択する方法を意図する。この方法は、以下を包含する：a) 病原体、癌または他の疾患由来のORFを含む複数のDNAセグメントを含む、複数の線状または環状発現エレメントを調製する工程；b) 複数の線状または環状発現エレメントを生物に導入する工程；ならびにc) 複数の線状または環状発現エレメントから、上記の免疫応答を生成するに効果的であるORFを選択する工程。このような方法はさらに、病原体を用いるチャレンジに対して上記の生物を試験する工程であって、この生物は、この病原体を用いるチャレンジに対して保護される、工程、を包含し得る。この様式において、保護応答を付与する1以上の抗原が、生物のスクリーニングによって同定され得る。

#### 【0021】

本発明はまた、線状または環状発現エレメント、ならびに線状または環状発現エレメントを産生する方法に関する。例えば、このような方法は、以下を包含し得る：a) ORF、推定ORFまたは他の配列を含むDNAセグメントを得る工程；ならびにb) このDNAセグメントを、プロモーターおよびターミネーターに連結して、線状または環状発現エレメントを作製する工程。いくつかの場合において、DNAセグメントは、PCR（登録商標）を含むプロセスから得られ、

そしていくつかの特定の実施形態において、このPCR（登録商標）反応は、デオキシウリジンを取り込んでいる相補的なストレッチを有するオリゴヌクレオチドでプライムされる。例えば、デオキシウリジンは、相補的なストレッチの第3の位置毎に取り込まれ得る。ORFは、プロモーターおよびターミネーターに非共有結合され得、そしてこの非共有結合は、本明細書の他の箇所に記載されるように行われ得る。

#### 【0022】

いくつかの特定の実施形態において、本発明は、ORFならびにこのORFに非共有結合したプロモーターおよびターミネーターを含むDNAセグメントを含む、線状または環状発現エレメントに関する。他の局面において、本発明は、上記の方法を用いて調製、アッセイまたは決定される、抗体、抗原、およびワクチンに関する。

#### 【0023】

本明細書中の明細書で使用される場合、「a」または「an」は、1以上を意味し得る。用語が「a」または「an」を含んで使用されるときには、本細書中の特許請求の範囲で使用される場合、用語「a」または「an」は、1以上を意味し得る。

#### 【0024】

（例示的な実施形態の説明）

ますます利用可能になっているゲノム配列情報は、遺伝子機能を効率的に評価し、そしてこれらの機能を研究する試薬を調製するための新規方法に対する必要性を強調している。この開示された方法および組成物は、任意のオープンリーディングフレーム（ORF）（例えば、PCR（登録商標）増幅ORF）を真核生物プロモーターおよびターミネーターに非共有結合することを可能にする。これらの迅速に連結されたフラグメントは、局所的な遺伝子発現を生じるために、動物に直接的に注射され得る。ORFは、哺乳動物プロモーターおよびターミネーター配列に単純に付着させることによって、コードされる外来タンパク質に対する抗体を生じるために、マウスに注射され得ることもまた実証されている。この技術は、多数の遺伝子を、それらの機能についてインビボで迅速にスクリーニン

グすること、またはクローニング、細菌での増殖、もしくはタンパク質精製を必要とせずに、それらに対して免疫応答を生成することを可能にする。

#### 【0025】

トランスフェクションおよび発現のための遺伝子の調製は、クローニング、次いで細菌からのプラスミド構築物の増幅および精製と同義になった。このプロセスは、時間、金銭を消費し、そして細菌での増殖に固有の偏り、毒性、および汚染リスクを有する多くの工程を含み得る。本発明者らは、これらの取り組みを合理化する2方面のストラテジーを開発した。いくつかの実施形態において、これは、以下に基づいている：1) 細菌での増殖を必要としない、生物への遺伝子発現単位の送達、ならびに2) プロモーター、遺伝子、およびターミネーターのカセット様連結。発現のビヒクルとしての、PCR（登録商標）産物、制限フラグメントまたは化学的に合成された遺伝子の効率的な使用は、通常のコローニング方法によって可能ではない規模、純度および時間枠で、遺伝子構築物を作製することを可能にする。このプロトコルは、いくつかの他の利点を有する。遺伝子が、細菌を用いることなく生成されるので、細菌増殖に伴う問題（例えば、毒性、致死性、または安定性）が、回避される。個々のPCR（登録商標）産物が、プラスミドにおいて単離され、そして増殖される、従来のクローニングとは対照的に、この方法は、増幅されたサンプル全体を導入して、それによって任意の特定のPCR（登録商標）が変異を保有するという問題を回避する。この1本のチューブでの無生物プロトコルは、ロボットによる取り扱いおよびハイスループットスクリーニングに採用され得る。最終的には、合成遺伝子は、免疫応答の惹起におけるアジュバントとして、非メチル化プリン（CpG）の利点を維持する（Satohら、1996）。

#### 【0026】

このプロトコルは、いくつかの様式において有用である。第1に、ゲノムデータベースは、生物の各遺伝子を増幅するようにオリゴが設計されることを可能にする。以下の実施例に示されるように、dU残基およびUDG酵素を使用して、付着性の配列を作製した。これは非常に効果的であり、一方、比較的高レベルのレポーター遺伝子発現もまた、酵素処理をしなくとも観察した。これは、内因性

UDGに曝すことによって、インビボでのアニーリングおよび粘着末端の連結が可能になるということであり得る。LEEは、同様のレベルの遺伝子活性で作製される、2または3のいずれかのPCR（登録商標）産物から構築する。

#### 【0027】

各ORFが作製され、選択されたプロモーターおよびターミネーターにアニーリングされ、次いで試験細胞、組織または生物に直接導入され得るか、または無細胞系に使用され得る。LEEおよびCEEは、個別に、またはプールにおいてスクリーニングされ得る。この方法に関しては、例えば、生物の全ての遺伝子が、遺伝子ワクチンとして生物（例えば、動物）に、数日間に導入され得ることが想像される。その後、この動物は、どの遺伝子が疾患に対して保護するかを決定するために、病原体でチャレンジされ得る。保護プールからの個々のLEEまたはCEEの単離が、プラスミドライブラリーについて以前に記載されたように行われ得る（Barryら、1995）。

#### 【0028】

第2の適用は、免疫学的試薬の開発においてである。LEEおよびCEEは、ORFに対する抗体を生成するために使用され得る。全ての病原体のORFに対する抗体が、生成され得、どのタンパク質が目的の任意の病原体段階に存在するかを解明するために、免疫局在分析において病原体に感染した組織をプローブするために使用され得る。同定された遺伝子産物は、優れたワクチン候補または薬物標的である。あるいは、抗体が、診断上または治療上での価値のためにスクリーニングされ得る。

#### 【0029】

第3の適用は、遺伝子産物の発現によって引き起こされる他の生理学的応答についてスクリーニングすることである。

#### 【0030】

LEEおよびCEEの第4の適用は、変化したプロモーター機能についてスクリーニングすることである。欠失または変異を含むプロモーターのライブラリーは、レポーター遺伝子に連結され、そして関連のある動物/植物の組織または細胞培養物に直接導入される。例えば、レポーター活性は、遺伝子発現レベル、細

胞型特異的発現、または処理（例えば、薬物）に対する応答をモニターするために使用され得る。このプロトコルは、組織への直接の導入のための任意の設計の発現エレメントを作製するための効率的かつ迅速な方法を可能にすることから、これは、他の適用に適用可能である。

#### 【0031】

LEEおよびCEEの第5の適用は、無細胞発現系においてであり得る。インビトロで転写/翻訳されたLEEおよびCEEは、ORFの任意のメンバーによってコードされるタンパク質を迅速かつ系統的に作製するために使用され得る。このタンパク質は、目的の機能または活性（例えば、薬物または他のタンパク質標的を結合する能力）についてスクリーニングされ得る。

#### 【0032】

##### （A．プロモーター）

本発明の特定の局面において、用いられるLEEまたはCEEは、少なくとも1つのプロモーターを含む。「プロモーター」は、転写の開始および頻度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。これは、調節タンパク質および分子（例えば、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子）が結合し得る遺伝子エレメントを含み得る。句「作動可能に配置されている（された）」、「作動可能に連結された（した）」、「制御下」、および「転写制御下」は、プロモーターが核酸配列（すなわち、ORF）の転写の開始および/または発現を制御するために、その配列に対して、正確な機能的な位置および/または配向にあることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」（これは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列をいう）とともに、使用されても、使用されなくともよい。

#### 【0033】

特定の利点は、コード核酸セグメントを、組換えプロモーターまたは異種プロモーター（これは、その天然の環境において、核酸配列に通常付随していないプロモーターをいう）の制御下に配置することによって得られる。組換えエンハンサーまたは組換えエンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列に天然に付随していないエンハンサーをいう。このようなプロモーターまたはエンハン

サーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他の原核生物細胞、ウイルス性細胞、または真核生物細胞から単離されたプロモーターおよびエンハンサー、ならびに「天然に存在しない」（すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または発現を変化させる変異を含む）プロモーターまたはエンハンサーを含み得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を化学的に産生することに加えて、配列は、本明細書中に開示される組成物（例えば、米国特許第4,683,202号および同第5,928,906号（各々は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）とともに、組換えクローニングおよび/または核酸増幅技術（PCT（登録商標）を含む）を使用して産生され得る。さらに、配列の転写および/または発現を、非核オルガネラ（例えば、ミトコンドリア、葉緑体など）内に指向する制御配列も、同様に用いられ得ることが意図される。しかし、特定の実施形態において、プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'-非コード配列を単離することによって得られ得るように、遺伝子または配列と天然に付随しているプロモーターであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」といわれる。同様に、エンハンサーは、核酸配列の下流または上流に位置する、その配列に天然に付随しているエンハンサーであり得る。

#### 【0034】

天然には、発現のために選択されたオルガネラ、細胞、組織および生物におけるDNAセグメントの発現を効率的に指向するプロモーターおよび/またはエンハンサーを用いることが、重要である。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のための、プロモーター、エンハンサー、および細胞型の組合せの使用を理解している（例えば、Sambrookら（1989）（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。用いられるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導性、および/または導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指向する適切な条件下で有用なものであり得、このことは、例えば、組換えタンパク質および/またはペプチドの大規模産生に有利である。プロモーターは、異種であっても、内因性であってもよい。

#### 【0035】

表1は、遺伝子の発現を調節するために、本発明の状況において用いられ得るいくつかのエLEMENT/プロモーターを列挙している。この表は、発現の促進に関与する全ての可能性のあるELEMENTを挙げることを意図せずに、単に、それらの例示を意図する。表2は、特定の刺激に応じて活性化され得る核酸配列の領域である、誘導性ELEMENTの非限定的な例を提供する。

【0036】

【表1】

表1 プロモターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞レセプター	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ aおよび/または DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2レセプター	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-Dra	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋肉クレアチンキナーゼ (CK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン(トランスサイレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Omitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989

(表1の続き)

表1 プロモターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
$\alpha$ -フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
T-グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
$\beta$ -グロビン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
C-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
C-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
$\alpha_1$ -アンチトリパイン (Antitrypsin)	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび/またはI型コラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース-調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット増殖ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイド A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニンI (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
血小板-由来増殖因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989

(表1の続き)

表1 プロモターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
デュシェーナ筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989

(表1の続き)

表1 プロモターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foeking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

【0037】

【表2】

TABLE 2 誘導生エレメント		
エレメント	インデューサー	参考文献
MT II	ホルボールエステル (TF A) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeal <i>et al.</i> , 1989
MMTV (マウス乳腺癌ウイルス)	糖質コルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
$\beta$ -インターフェロン	ポリ (rI)x ポリ (rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル (TP A)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメリシン (Stromelysin)	ホルボールエステル (TP A)	Angel <i>et al.</i> , 1987b

(表2の続き)

TABLE 2 誘導生エレメント		
エレメント	インデューサー	参考文献
SV40	ホルボールエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウス MX 遺伝子	インターフェロン、ニューカッスル病ウイルス	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
$\alpha$ -2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ピメンチン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス I 遺伝子 H-2kb	インターフェロン	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	EIA, SV40 ラージT 抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン (Proliferin)	ホルボールエステル-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン $\alpha$ 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

特定の実施形態において、プロモーターは、伸長因子1a (EF1a)、誘導性プロモーター (例えば、tet<sup>R</sup>)、RU486系またはメリステロン (mestosterone) 系のプロモーターであり得る。

【0038】

組織特異的プロモーターまたはエレメントの同定、およびそれらの機能の特徴付けるアッセイは、当業者に周知である。このような領域の例としては、ヒト LIMK2 遺伝子 (Nomotoら、1999)、ソマトスタチンレセプター2遺

伝子 (Krausら、1998)、マウス精巢上体レチノイン酸結合遺伝子 (Lareyreら、1999)、ヒトCD4 (Zhao-Emonetら、1998)、マウス 2 (XI) コラーゲン (Tsumakiら、1998)、D1A ドパミンレセプター遺伝子 (Leeら、1997)、インスリン様増殖因子II (Wuら、1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendroら、1996) が挙げられる。

#### 【0039】

##### (B. 終結シグナル)

本発明のLEEおよびCEEは、一般に、少なくとも1つの終結シグナルを含む。ターミネーターは、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的な終結に関与するDNA配列から構成される。従って、特定の実施形態において、RNA転写物の生成を終了する終結シグナルが、意図される。しかし、真核生物系において、ターミネーター領域はまた、ポリアデニル化部位を曝するように、新規転写物の部位特異的切断を可能にする特定のDNA配列を含み得る。これは、転写物の3'端に、約200A残基のストレッチ(ポリA)を付加するように、特殊化された内因性ポリメラーゼに合図する。このポリAテイルで改変されたRNA分子は、より安定のようであり、そしてより効率的に翻訳される。従って、真核生物が関与する他の実施形態において、そのターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、そしてそのターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進することが、より好ましい。

#### 【0040】

本発明の使用に意図されるターミネーターは、本明細書中に記載されるか、または当業者に公知である、任意の公知の転写ターミネーターを含む。このターミネーターとしては、例えば、ヒト成長ホルモンの終結配列およびポリアデニル化部位；アクチンまたはチューブリンを含むがこれらに限定されないハウスキーピング遺伝子の終結配列；あるいはウイルス性終結配列、が挙げられるがこれらに限定されない。真核生物ウイルス(例えば、SV40、MMTV、ポリオーマまたはHIV)；あるいは配列の短縮化に起因するような、転写配列または翻訳配列の欠損、が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0041】

(C・LEEおよびCEEのさらなる成分)

LEEおよびCEEはさらに、遺伝子発現に関与する少なくとも1つのさらなる調節配列エレメント、またはLEEまたはCEEの構築または分析を補助する少なくとも1つのさらなる配列エレメントを含み得る。これらのさらなるエレメントは、LEE配列またはCEE配列の発現および/または翻訳を増強または停止し得るか、遺伝子産物の免疫原性を増強し得るか、遺伝子産物を細胞内に指向し得るか、あるいはLEEまたはCEEの調製または分析を補助し得る。さらなる配列エレメントは、少なくとも1つの開始シグナル、少なくとも1つの内部リボソーム結合部位、少なくとも1つのマルチクロニング部位、少なくとも1つのスプライシング部位、少なくとも1つのマーカー(例えば、選択マーカーまたはスクリーニングマーカー)、あるいはそれらの任意の組合せを含み得るがこれらに限定されない。さらなるエレメントは、LEEまたはCEEの構築において、ORFに付加される5'配列および/または3'配列に含まれ得る。

## 【0042】

(1. 開始シグナルおよびリボソーム結合部位)

特定の実施形態において、LEEまたはCEEは、少なくとも1つの開始シグナル、および/または少なくとも1つの内部リボソーム結合部位を含み得る。特定の局面において、特定の開始シグナルは、コード配列の効率的な翻訳に必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接配列を含む。外因性翻訳制御シグナル(ATG開始コドンを含む)が、提供されることを必要とし得る。当業者は、これを容易に決定して、そして必要なシグナルを提供し得る。開始コドンは、挿入物全体の翻訳を保障するために、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム(in-frame)」でなければならないが周知である。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のいずれかであり得る。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含ませることによって増強され得る。

## 【0043】

本発明の特定の実施形態において、内部リボソーム侵入部位(IRES)の使

用は、多重遺伝子 (multigene) またはポリシストロン性メッセージを  
作製するために使用される。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存性  
翻訳のリボソームスキヤニングモデルを迂回し、そして内部部位で翻訳を開始し  
得る (PelletierおよびSonenberg、1988)。ピコナウイルスファミリーの2つのメンバー (ポリオおよび脳心筋炎) に由来するIRES  
エレメント (PelletierおよびSonenberg、1998)、なら  
びに哺乳動物のメッセージに由来するIRES (MacejakおよびSarnow、1991) が、記載されている。IRESエレメントは、異種オープンリー  
ディングフレームに連結され得る。複数のオープンリーディングフレーム (各  
々は、IRESによって分離されている) が、一緒に転写され得、ポリシストロ  
ン性メッセージを生成する。IRESエレメントによって、各オープンリーディ  
ングフレームフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに接近可能である。  
複数の遺伝子は、単一のメッセージを転写するために、単一のプロモーター/エ  
ンハンサーを使用して効率的に発現され得る (米国特許第5,925,565号  
および同5,935,819号 (本明細書中に参考として援用される) を参照の  
こと)。

#### 【0044】

(マルチクローニング部位)

特定の実施形態において、LEEまたはCEEは、少なくとも1つのマルチク  
ローニング部位を含み得る。マルチクローニング部位 (MCS) は、複数の制限  
酵素部位を含む核酸領域であり、この制限酵素のいずれかが、構築物を消化する  
標準的な組換え技術とともに使用される (Carbonelliら、1999、  
Levensonら、1998およびCocea、1997 (本明細書中に参考  
として援用される) を参照のこと)。「制限酵素消化」は、核酸分子の特定の位  
置のみで機能する酵素による、核酸分子の触媒的切断をいう。多くのこれらの制  
限酵素は、市販されている。このような酵素の使用は、当業者によって広範に理  
解される。しばしば、構築物は、外因性配列が構築物に連結されることを可能に  
するために、MCS内で切断する制限酵素を使用して、線状化またはフラグメン  
ト化される。「連結」は、2つの核酸フラグメント (これは、互いに連続してい

ても、連続していなくともよい)の間にホスホジエステル結合を形成するプロセスをいう。制限酵素および連結反応に関する技術は、組換え技術の当業者に周知である。特定の局面において、LEEまたはCEEは、サイズ分析または配列決定のために、ORFに含まれるような種々の配列を放出するように消化され得る。

#### 【0045】

##### (3. スプライシング部位)

転写されるほとんどの真核生物RNA分子は、RNAスプライシングを受けて、1次転写物からイントロンを除去する。ゲノム真核生物配列を含む構築物は、タンパク質発現のために、転写物の適切なプロセッシングを保障するようにドナースプライシング部位および/またはアクセプタースプライシング部位を必要とし得る(Chandlerら、1997(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

#### 【0046】

##### (4. 選択マーカーおよびスクリーニングマーカー)

本発明の特定の実施形態において、細胞は、本発明のLEEまたはCEE構築物を含み、細胞は、LEEまたはCEE発現構築物中にマーカーを含ませることによってインビトロまたはインビボで同定され得る。このようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を付与して、この発現構築物を含む細胞の易しい同定を可能にする。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。陽性選択マーカーは、このマーカーの存在がその選択を可能にするマーカーであり、一方、陰性選択マーカーは、その存在がその選択を妨げるマーカーである。陽性選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

#### 【0047】

通常、薬物選択マーカーの導入は、クローニングおよび形質転換体の同定を補助し、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン(zeocin)およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。条件の実行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、スクリーニングマーカー

(例えば、比色定量分析の基づくGFPまたはLacZ；蛍光に基づくGUS；および発光に基づくLUC)を含む他の型のマーカーもまた、意図される。あるいは、スクリーニング酵素(例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT))が、利用され得る。当業者はまた、おそらくFACS分析とともに、免疫学的マーカーを用いる方法を認識する。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得ない限り、重要ではないと考えられる。選択マーカーおよびスクリーニングマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

#### 【0048】

##### (5. ポリアデニル化シグナル)

真核生物発現では、転写物の終結および適切なポリアデニル化をもたらすために、少なくとも1つの転写ターミネーターおよび少なくとも1つのポリアデニル化シグナルを含み得る。ターミネーターの性質は、本発明の首尾のよい実施に重要ではないと考えられ、そして任意のこのような配列が、用いられ得る。好ましい実施形態は、SV40ターミネーターおよび/またはウシ成長ホルモンターミネーター(これらは、簡便であり、そして種々の標的細胞で十分に機能することが公知である)を含む。ターミネーターは、転写の終了の少なくとも1つの配列シグナルから構成され、そして少なくとも1つのポリアデニル化部位の付加を可能にする切断部位を含み得る。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増大し得るか、または細胞質輸送を容易にし得る。ターミネーターは、所望のメッセージレベルを達成するために、インピボで必要とされ得る。

#### 【0049】

##### (D. LEEベクターおよびCEEベクター)

特定の実施形態において、LEEまたはCEEのプロモーターおよびターミネーター配列は、ベクターの1つの型としてみなされ得る。用語「ベクター」は、核酸配列が細胞への導入のために挿入されて、その細胞中でこの核酸が発現される、キャリア核酸分子をいうために使用される。核酸配列は、「外因性」(これは、ベクターが導入されている細胞に対して外来であるか、または配列が、細胞中の配列に相同であるが、その配列が通常見出されない宿主細胞の核酸の位置に

あることを意味する)であり得る。

【0050】

用語「発現ベクター」は、転写され得る遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターをいう。いくつかの場合において、次いで、RNA分子は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合において、これらの配列は、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成において翻訳されない。発現ベクターは、種々の「制御配列」を含み得る。この制御配列は、特定の宿主生物において、作動可能に連結されたコード配列の転写および潜在的な翻訳に必要である核酸配列をいう。LEEおよびCEEの場合、プロモーターおよび/またはターミネーターを含む最小制御配列が、発現される配列に付加され得る。プロモーターおよびターミネーター、転写および翻訳を支配する他の制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、同様に他の機能を働かせ、そして以下に記載される核酸配列を含み得る。

【0051】

(E. 遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF))

LEEまたはCEEは、少なくとも1つのオープンリーディングフレーム(ORF)を含み得る。オープンリーディングフレームは、1以上のアミノ酸をコードする一連のトリヌクレオチドを含む。ORFは、終始コドン(すなわち、TAA、TAG、TGA)によって中断されない。生物から単離されたORFは、内因性のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または翻訳されないmRNAメッセージをコードし得る。しかし、多くのORFは、内因的に転写される配列をコードしない。

【0052】

本発明の好ましい局面において、ORFは、少なくとも1つの生物、またはこの生物由来の核酸を含む組換えベクターから単離される。1以上のオルガネラ(すなわち、ミトコンドリア、葉緑体)、細胞、組織または生物(ウイルスを含む)は、単離されたプロモーター、オープンリーディングフレーム(すなわち、遺伝子)、終結配列、ならびにLEEおよびCEEの構築に使用される他の配列のための供給源であり得る。核酸の単離方法は、当業者に周知である(Sambrook

ookら、1989)。他の実施形態において、ORFは、公知の遺伝子構築技術によって合成的に構築され得る(Stemmerら、1995)。

#### 【0053】

核酸ライブラリーをスクリーニングするために、スクリーニングまたは単離プロトコルは、所望のORFまたは周辺配列(単数または複数)のcDNAまたはゲノム配列にハイブリダイズするように設計されているヌクレオチドセグメントまたはプローブを利用し得る。さらに、このORFの発現されたタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに結合するように設計された抗体をプローブとして用い、適切なDNA発現ライブラリーをスクリーニングし得る。あるいは、活性アッセイが採用され得る。このようなスクリーニングプロトコルの操作は、当業者に周知であり、そして科学的文献(Sambrookら、1989、本明細書に参考として援用される)中に詳細に記載されている。さらに、本発明は、ゲノムセグメントおよびcDNA分子の単離および発現を包含するので、当業者に公知のように、適切なゲノム単離方法もまた用いられ得ることが意図される。

#### 【0054】

本明細書で用いられる「ハイブリダイズするように設計される」は、ORFまたは周辺配列と、関連する核酸配列プローブまたはプライマーとの間の予期される相同性に起因して、このORFまたは周辺配列(単数または複数)にハイブリダイズするらしい能力のために選択された配列を意味する。ORFまたは周辺配列(単数または複数)にハイブリダイズまたはそれに結合するそれらの能力を増大するために改変されたセグメントまたはプローブもまた含まれる。さらに、相同性のこれらの領域もまた、1以上の種における同じかまたは関連する遺伝子中の同じかまたは類似領域の残基と比較して、アミノ酸配列の保存性を増加するために選択および/または改変された4以上の連続するアミノ酸のアミノ酸配列を含む。

#### 【0055】

このような配列は、PCR<sup>TM</sup>のためのハイブリダイゼーションまたはオリゴヌクレオチドプライマー用のプローブとして用いられ得る。このような配列を設計することは、特定遺伝子または関連する遺伝子について、1つ以上の種における

遺伝子または関連する遺伝子のヌクレオチドの一般的保存性に対して、種々の種間の高度に保存されたヌクレオチド配列の領域の選択を含み得る。特定の遺伝子について、1つ以上の種間で保存されたアミノ酸配列の比較を用いて、この遺伝子または関連する遺伝子によりコードされるタンパク質に対して保存されている1群の4以上の連続するアミノ酸を決定し得る。次いで、ヌクレオチドプローブまたはプライマーは、アミノ酸のこの保存された配列をコードする遺伝子の領域から設計され得る。

【0056】

しかし、ランダムまたは準ランダムなプローブおよびプライマーを用いて、ORFおよび/または周辺配列にハイブリダイズまたはそれらを増幅し得る。このような特徴付けられていないORFは、本明細書に記載されているか、または当業者に公知の任意の技法を用いて、機能について配列決定されるかまたはスクリーニングされ得る。

【0057】

種々のORF、プロモーター、停止の配列および遺伝子に対する、ヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチドの配列は先に記載され、そして当業者に公知のコンピューター化されたデータベースに見出され得る。1つのこのようなデータベースは、National Center for Biotechnology InformationのGenbankおよびGenPeptデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)である。これら既知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示される手法を用いるか、または当業者に公知である任意の技法を用いて増幅および/または発現され得る。このような核酸またはアミノ酸配列を用いて、さらなる関連するORFをスクリーニングし得、そしてLEEまたはCEEを構築するために用いられる得る。

【0058】

次いで、単離されたORFを、プロモーター、停止シグナル、および/またはその他の配列成分と作動可能に連結し得、LEEまたはCEEを形成し得る。発現されたLEEまたはCEEは、本明細書に記載されるか、または当業者に公知である任意の適用可能なアッセイを用いて、転写もしくは翻訳された配列の任意

の活性もしくは性質についてインビボまたはインビトロでアッセイされ得る。

【0059】

(F.細胞)

特定の実施の形態では、プロモーター、ORF、停止配列、その他の配列が、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物から単離され得る。他の実施の形態では、少なくとも1つのLEEまたはCEEが、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物中にトランスフェクトされ得る。特定の局面では、このLEEまたはCEEのオープンリーディングフレームが転写され、そしてより詳細な局面では、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物においてタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。

【0060】

本明細書で用いられる用語「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」は、交換可能に用いられる得る。これらの用語のすべてはまた、任意およびすべての次の世代であるそれらの子孫を含む。すべての子孫は、意図的であるか、または偶発的な変異に起因して同一でなくてもよいことが理解される。異種核酸配列を発現する文脈では、「宿主」は原核生物細胞または真核生物細胞をいい、そしてそれは、ベクターによりコードされる異種遺伝子を発現し得る任意の形質転換生物を含む。宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして用いられ得るか、または用いられている。宿主細胞は、外因性核酸がこの宿主細胞中に移入または導入されるプロセスをいう。形質転換された細胞は、始原被検体細胞およびその子孫を含む。

【0061】

宿主細胞は、ORFでコードされたベクターの発現の所望の目的に依存して原核生物または真核生物由来であり得る。多くの細胞株および培養が、宿主細胞としての使用に利用可能であり、そしてそれらは、American Type Culture Collection (ATCC) から得られ得、これは、生存培養および遺伝子材料のための長期間保存のコピーとして供される組織である ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))。特定の実施の形態では、細胞は、制限されずに、少なくとも1つの皮膚、骨、ニューロン、軸索、軟骨、血管、角膜、筋肉、顔 (facia)、脳、前立腺、胸部、子宮内膜、肺、膵臓、小腸、血液、肝臓、

精巣、卵巣、頸部、結腸、皮膚、胃、食道、脾臓、リンパ節、骨髄、腎臓、末梢血、胚または腹水細胞、およびそれらのすべての癌を含む。適切な宿主は、ベクター骨格および所望の結果を基に当業者により決定され得る。ベクター発現のための宿主細胞として用いられる細菌細胞は、DH5<sup>+</sup>、JM109BL21、およびKC8、ならびにSURE（登録商標）Competent CellおよびSOLOPACK™Gold Cells（STRATAGENE（登録商標））、La Jolla）のような多くの市販の細菌宿主を含む。あるいは、E. coli LE392のような細菌細胞を、ファージウイルスのための宿主細胞として用い得る。

#### 【0062】

ベクターの複製および/または発現のための真核生物宿主細胞の例は、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、WeilHおよびPC12を含む。種々の細胞型および生物からの多くの宿主細胞が入手可能であり、そして当業者に公知である。

#### 【0063】

いくつかのLEEまたはCEEベクターは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方においてそれが発現されるようにする制御配列を採用し得る。当業者は、上記の宿主細胞のすべて維持するために、それらをインキュベートするための条件をさらに理解し得る。ベクター、ならびにベクターによりコードされる核酸およびそれらの同族体ポリペプチド、タンパク質またはペプチドの大規模産生を可能にする技法および条件もまた理解され、そして公知である。

#### 【0064】

##### （1．組織）

LEEまたはCEEで形質転換された細胞（単数または複数）は、組織中に含まれ得る。この組織は、生物の一部であり得るか、またはそれから分離され得る。特定の実施の形態では、組織は、制限されずに、皮膚、骨、ニューロン、軸索、軟骨、血管、角膜、筋肉、顔（facia）、脳、前立腺、胸部、子宮内膜、肺、膵臓、小腸、血液、肝臓、精巣、卵巣、頸部、結腸、皮膚、胃、食道、脾臓、リンパ節、骨髄、腎臓、末梢血、胚、腹水組織、メリステム細胞、花粉、葉、

葯、根、根端、絹、花、穀粒、穂、コブ(cobs)、さや(husk)、茎、およびそれらのすべての癌を含み得る。

【0065】

(2. 生物)

特定の実施の形態では、細胞または組織は、少なくとも1つの生物中に含まれ得る。特定の実施の形態では、この生物は、制限されずに、真性細菌(eubacteria)、原始細菌(archaea)、真核生物またはウイルスであり得る。

【0066】

(a. 真性細菌)

特定の実施の形態では、生物は真性細菌である。特定の実施の形態では、この真性細菌は、制限されずに、aquificales; thermotogales; thermodesulfobacterium; thermus-deinococcus群のメンバー; chloroflecales; cyanobacteria; firmicutes; leptospirillum群のメンバー; synergistes; chlorobium-flavobacteria群のメンバー; 制限されずに verrucomicrobia または chlamydia を含む、chlamydia-verrucomicrobia群のメンバー; planctomycetales; flexistipes; fibrobacter群のメンバー; spirochetes; 制限されずに proteobacteria、proteobacteria、& proteobacteria または proteobacteria を含む proteobacteria であり得る。特定の局面では、ミトコンドリアまたはクロロプラストを含む、真性細菌由来の細胞小器官が意図される。

【0067】

(b. 原始細菌)

特定の実施の形態では、生物は原始細菌(a.k.a. archaeobacteria; 例えば、methanogen、halophiles、sulfolobus)である。特定の実施の形態では、この原始細菌は、制限されずに、

korarchaeota ; 制限されずに thermophilum、pyrobaculum、thermoproteus、sulfolobus、metallospira、acidianus、thermodiscus、igneococcus、thermosphaera、desulfurococcus、staphylothermus、pyrolobus、hyperthermus または pyrodictuum を含む、crenarchaeota ; または制限されずに halobacteriales、methanomicrobiales、methanobacteriales、methanococcales、methanopyrales、archeoglobales、thermoplasmatales または thermococcales を含む、euryarchaeota であり得る。

【0068】

(c. 真核生物)

特定の実施の形態では、生物は真核生物（例えば、無性生物、植物、真菌、動物）である。詳細な実施の形態では、この真核生物は、制限されずに、microsporidia、diplomonad、oxymonad、retortamonad、parabasalid、pelobiont、entamoebae または mitochondrial 真核生物（例えば、動物、植物、真菌、stramenopile）であり得る。

【0069】

特定の実施の形態では、この mitochondrial 真核生物は、制限されずに metazoa（例えば、動物）、myxozoa、choanoflagellate、真菌（例えば、マッシュルーム、カビ、酵母、chytrid）、緑色植物（例えば、緑藻類、陸上植物）、cryptomonad、ancrymona、plasmodiophorid、rhodophyta、centrohelid heliozoa、cyanophorid、alveolate（例えば、dinoflagellate、sporozoan、ciliate）、stramenopile（例えば、褐藻、diatom、oomycete、chrysophyte）、acantharea、vamp

yrellid、thaumatomonad、telonema、sticholonche、spongomonad、ramicristate、pseudospora、pseudodendromonad、phalansterium、phaeodarean radiolaria、paramyxea、luffisphaera、leucodictyon、kathablepharid、histictona、haptophyte、ebriid、discocelis、diphylleia、eesmothoracid、cryothecomona、copromyxid、chlorarachnion、cercomonad、caecitellus、apusomonad、actinophryidまたはacanthamoebaeであり得る。

【0070】

特定の局面では、この真核生物はmetazoa（例えば、動物）である。特定の局面では、このmetazoaは、制限されずに、porifera（例えば、海綿動物）、cnidaria（例えば、クラゲ、アネモネ、サンゴ）、ctenophora（例えば、コムゼリー（comb-jelly））、arthropoda（例えば、昆虫、クモ、カニ）、annelida（例えば、体節虫（segmented worm）、pogonophora、vestimentifera、echiura、mollusca（例えば、カタツムリ、ハマグリ、イカ）、sipuncula、nemertea（例えば、紐虫）、platyhelminthes（例えば、扁形動物）、chordata（例えば、脊椎動物）、hemichordata、lophophorates、chaetognatha、echinodermata（例えば、ヒトデ、アーチン、海キューカンバ）、pseudocoelomates、placozoa、monoblastozoa、rhombozoa、orthonectidaであり得る。特定の局面では、この脊椎動物は、陸生脊椎動物（例えば、カエル、サンショウウオ、caecilian、爬虫類、哺乳動物、鳥類）または非陸生脊椎動物（例えば、サメ、レイ（ray）、ノコギリエイ、キメラ、レイひれ魚、ローブひれ魚）であり得る。さらなる局面で、この哺乳動物は、単孔類（例えば、かものはし、ハラモグラ）、mutituberculat

a、有袋類（例えば、オボサム、カンガルー）、*palaeoryctoid* または真獣類（例えば、胎盤哺乳動物）であり得る。

【0071】

特定の局面では、この真獣類は、制限されずに、貧齒類（例えば、アリクイ、ナマケモノ、アルマジロ）、*pholidota*（例えば、センザンコウ）、*lagomorpha*（例えば、ウサギ）、*glires*、*rodentia*（例えば、マウス、ラット、リス、ジネズミ、ヤマアラシ、ビーバー）、*macroscelidea*（例えば、象トガリネズミ）、霊長類（例えば、サル、キツネザル、ゴリラ、チンパンジ、ヒト）、*scandentia*（木トガリネズミ）、翼手類（例えば、コウモリ）、ヒヨケザル類（例えば、ヒヨケザル、キツネザル）、食虫動物（例えば、トガリネズミ、モグラ、ハリネズミ）、肉齒類、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ、クマ、アライグマ、イタチ、マンゲース、ハイエナ）、*condylarthra*、偶蹄類（例えば、ブタ、シカ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、カバ、ラクダ）、クジラ目（例えば、クジラ、イルカ、ネズミイルカ）、*tubulidentata*（例えば、ツチブタ）、奇蹄類（例えば、ウマ、バク、サイ）、*hyracoidea*（例えば、ハイラックス、*dassy*）、海牛類（例えば、マナティー、ジュゴン、セイウチ）、*desmostylia*、*embrythopoda*、または*proboscidea*（例えば、象）であり得る。

【0072】

特定の実施の形態では、真核生物は真菌である。真菌は、制限されずに、*chytridiomycota*（例えば、ミズカビ、*allomyces*）、*zygomycota*（例えば、パンカビ、リゾプス、ムコール）、*basidiomycota*（例えば、マッシュルーム、ラスト、スマット）または*ascomycota*（例えば、囊カビ、酵母、ペニセリウム）であり得る。

【0073】

特定の実施の形態では、この真核生物は緑色植物である。緑色植物は、制限されないで、*prasinophytes*、*chlorophyceae*、*trebouxiophyceae*、*ulvophyceae*、*chlorokyba*

les、klebsormidiales、zygnematales、streptophyta、charales、coleochaetalesまたはembryophytes(例えば、陸生植物)であり得る。特定の局面で、embryophytesは、制限されないで、marchantiomorpha(例えば、ゼニゴケ)、Anthocerotomorpha(例えば、マツモ)、bryopsida(例えば、コケ)、lycopsida(例えば、lycophyte)、equisetopsida(例えば、ホーステール、sphenophyte)、filicopsida(例えば、シダ)、spermatopsida(例えば、種子植物；開花植物、針葉樹)であり得る。特定の局面は、このspermatopsidaは、制限されないで、被子植物であり得る。被子植物は、制限されないで、ceratophyllaceae、nymphaeales、piperales、aristolociales、monocotyledons、eudicots、laurales、chloranthaceae、winteralesまたはmagnolialesであり得る。

【0074】

(d. ウイルス)

特定の実施の形態では、生物はウイルスであり得る。特定の局面では、このウイルスは、制限されないで、ssDNAウイルスまたはdsDNAウイルスを含むDNAウイルス；DNA RNA rev転写ウイルス；制限されないで -ve鎖ssRNAまたは+ve鎖ssRNAを含むdsRNAを含むがこれに制限されないRNAウイルス；または未知ウイルスであり得る。

【0075】

(G. LEEおよびCEEの産生)

本発明はさらに、LEEまたはCEEを産生する方法に関する。LEEまたはCEEを産生する方法は、一般に、ORFを含むDNAセグメントを得る工程、およびこのORFをプロモーター、ターミネーター、またはその他の分子と献血し、LEEまたはCEEを生成する工程を包含する。

【0076】

このORF、プロモーター、ターミネーターまたはさらなる核酸（単数または複数）は、本明細書に記載されるか、または当業者に公知であるような任意の方法により得られ得る。合成核酸、特に合成オリゴヌクレオチドの非制限的な例は、本明細書に参考として援用されるEP 266,032に記載のようなホスホトリエステル、ホスファイトまたはホスホルアミダイト化学および固相技法を用いるか、またはそれぞれ本明細書に参考として援用される、Froehlerら、1986、および米国特許第5,705,629号によって記載されるようなデオキシヌクレオシドH-ホスホネート中間体を經由する、インビトロの化学的合成により作成される核酸を含む。酵素的に産生される核酸の非制限的な例は、PCR™（例えば、それぞれ本明細書に参考として援用される、米国特許第4,683,202号および米国特許第4,682,195号を参照のこと）のような増幅反応における酵素、または本明細書に参考として援用される米国特許第5,645,897号に記載のオリゴヌクレオチドの合成により生成されるものを含む。生物学的に生成される核酸の非限定的な例は、細菌における組換えDNAベクターのような、生存細胞中の組換え核酸産生を含む（例えば、本明細書に参考として援用されるSambrookら、1989を参照のこと）。

#### 【0077】

特定の局面で、本発明は、単離された核酸である少なくとも1つのプロモーター、ターミネーター、ORFおよび/またはその他の核酸に関する。本明細書で用いられる用語「単離された核酸」は、1つ以上の細胞内小器官、細胞、組織または生物の総ゲノムおよび転写核酸の塊のないように単離されたか、そうでなければそれのない少なくとも1つの核酸分子をいう。特定の実施の形態では、「単離された核酸」は、脂質、タンパク質、生物学的小分子などのような細胞成分および高分子の塊のないように単離されたか、そうでなければそれのない少なくとも1つの核酸分子をいう。異なる種は、RNAまたはDNA含有ゲノムを有し得るので、用語「単離された核酸」は、「単離されたDNA」および「単離されたRNA」の両方の用語を包含する。従って、単離された核酸は、特定の種の総RNA、DNAまたはその他の核酸の塊のないように単離されたか、そうでなければそれのないRNAまたはDNA分子を含み得る。本明細書で用いられるとき、

特定の種から単離される単離された核酸は、「種特異的核酸」と呼ばれる。ヒトのような特定種から単離された核酸を称するとき、このような核酸の型は、種の名前によって同定され得る。非制限的な例では、1人以上のヒトから単離された核酸は、「単離されたヒト核酸」である。

【0078】

プロモーター、ターミネーターおよび/またはさらなる分子(すなわち、別の核酸)へのORFの連結は、共有結合もしくは非共有結合または会合であり得る。非制限的な例では、予期される非共有結合は、プロモーター、ターミネーターおよび/またはさらなる核酸を、ORF核酸と単に混合されていることであり得る。より好適な実施の形態では、プロモーター、ターミネーター、さらなる分子および/またはORFの1つ以上の末端は、プロモーター、ターミネーター、さらなる分子および/またはORFの1つ以上の末端をそれら自身かまた互いにアニリングすることを促進する相補的核酸を含む。1つ以上の核酸が二本鎖であるとき、相補的であるこの末端は、二本鎖分子からのオーバーハングする一本鎖であり得る。十分な長さおよび/または相補的アニールの一本鎖領域、および付着した成分は、細胞、組織または生物中に直接送達され得る。

【0079】

採用され得る1つの方法では、dUMP-含有テールがPCR(登録商標)プライマーの5'末端で合成される。増幅の後、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)を用いて糖と塩基との間のグリコシル結合を切断する。これは、二本鎖DNAにおける塩基対合を脱安定化し、そして結合に利用可能な5'一本鎖オーバーハングを生成する非塩基( a b a s i c ) 部位を生成する。

【0080】

LEEおよびCEEは、上記のdU法以外の任意の数の方法により作成され得る。例えば、プラスミドクローニングのためにオーバーハングを生成する方法の文献中には多くの例がある。本発明者らは、LEEを生成することで代表的に採用されるオーバーハングを生成するために以下に記載の代替法を用いた。

【0081】

例えば、非塩基ホルホルアミデートが用いられ得る。PCR(登録商標)プラ

イマーは、一本鎖/二本鎖結合部が最終PCR（登録商標）産物上にあることを所望する位置に「塩基のない」ホルホルアミダイトを含むように合成される。この「ヌクレオチド」は、糖残基を持たず、それ故、増幅の間にTaqポリメラーゼは、それがこの位置に到着するとき停止し、突出する5'末端を残す。この方法の1つの欠点は、改変されたホルホルアミダイトが不安定であり、そしてその結果この目的のために作成される全プライマーが不安定であることである。関連する方法は、dスペーサーホルホルアミダイトの使用を含む。これらは、非塩基類と同様に用いられる：一本鎖/二本鎖結合部が最終PCR（登録商標）産物上にあることを所望する特定の位置で改変されたホルホルアミダイトを含むPCR（登録商標）プライマーが構築される。この場合、非塩基部位の安定性は、塩基の位置に「塩基様」構造を挿入することにより改善された。この合成非塩基およびdスペーサー法は、それらがアニールするためにPCR（登録商標）産物（5'オーバーハング）の合成オリゴ領域を必要とする点で、非効率的でありがちである。

#### 【0082】

T4 DNAポリメラーゼを含む方法を用いてオーバーハングを生成し得る。この酵素のエキソヌクレアーゼ活性を用いて、PCR（登録商標）産物の3'末端を消化し、5'一本鎖オーバーハングを得る。消化の程度（そしてそれ故オーバーハングの長さ）は、5'末端から所望の二本鎖/一本鎖結合点まで4つのヌクレオチド塩基の1つを欠く特異的配列を備えたプライマーを設計することにより制御される。この位置で対合するヌクレオチドのみが消化の間に提供される。

#### 【0083】

LEEを作成するためにrU/RNaseAを用い得る。この方法は、概念的にはdU/UDG法と似ている。しかし、ウラシルのDNA（dU）バージョンの代わりに、PCR（登録商標）プライマー中に取り込むために、RNA分子（rU）を用い得る。これらのプライマーを、標準的なPCR（登録商標）増幅のために用いた。オーバーハングを生成するために、PCR（登録商標）産物をRNaseAに単に晒すだけであり、これは、UDGよりはるかに安価である。この方法は良好に作用するが、完全なDNAプライマーに対してRNA含有プライマ

一の不安定性における欠点を有している。

【0084】

長ノ短PCR（登録商標）プライミングを含む方法は、LEEを調製するために有用である。PCR（登録商標）産物の1つの側に2つのプライマーを設計し得、1つはテンプレート上で、他方の12 - 15ヌクレオチド上流にある。他端における通常の1つに加えた両プライマーを用いた増幅は、3つの型のアニールされた産物：2長（25%）、2短（25%）、および1長ノ1短（集団の50%）を生成した。この長ノ短産物は、一本鎖オーバーハングを備えた有用な産物である。

【0085】

適切な改変を行うことで、これら技法の各々を採用してCEEおよびLEEを作成し得る。

【0086】

一本鎖末端のアニールリングを可能にするために、好ましくは、末端は相補的であるかまたは準相補的である。核酸の相補的または準相補的配列の設計は、当業者に周知である。「相補的」または「相補物（単数または複数）」である核酸は、標準的なWatson-Crick、Hoogsteenまたは逆Hoogsteen結合相補性規則に従って塩基対合し得る核酸である。本明細書で用いる用語「相補的」または「相補物（単数または複数）」はまた、上記と同じヌレオチド比較により評価され得るように、実質的に相補的である核酸（単数または複数）をいう。用語「実質的に相補的」は、少なくとも1つの保存的核酸塩基、または1つ以上の核酸塩基が分子中に存在しない場合、たとえ一部の核酸塩基が相当物核酸塩基と塩基対合しなくても少なくとも1つの核酸鎖または二本鎖にハイブリダイズまたはアニールし得る準保存的核酸塩基を含む核酸をいう。特定の実施の形態では、「実質的に相補的」な核酸は、その中で、約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、

約99%、約100%まで、およびその中の任意の範囲の核酸塩基配列が、ハイブリダイゼーションまたはアニーリングの間に、少なくとも1つの一本鎖または二本鎖核酸分子と塩基対合し得る、少なくとも1つの配列を含む。特定の実施の形態では、用語「実質的に相補的」は、ストリンジェントな条件で少なくとも1つの核酸鎖または二本鎖にハイブリダイズし得る、少なくとも1つの核酸をいう。特定の実施の形態では、「部分的に相補的」な核酸は、低ストリンジェンシー条件中少なくとも1つの一本鎖または二本鎖核酸にハイブリダイズし得る少なくとも1つの配列を含むか、またはその中の約70%より少ない核酸塩基が、ハイブリダイゼーションまたはアニーリングの間に少なくとも1つの一本鎖または二本鎖核酸分子と塩基対合し得る少なくとも1つの配列を含む。

#### 【0087】

特定の実施の形態では、ORF、プロモーター、ターミネーターおよび/または付加的な分子の相補的または準相補的末端は、当業者により所望または設計される任意の組み合わせで、それらの末端の非共有結合的会合を促進する。従って、このORF、プロモーター、ターミネーターおよび/または付加的な分子の線状または環状構造が、非共有結合的会合を通じて予期される。他の局面では、準相補的または相補的末端は、酵素的連結を促進し得る。勿論、ORF、プロモーター、ターミネーターおよび/または付加的な分子の1つ以上の末端は、線状または環状エレメントを形成するようにアニーリングを促進するために設計され得る。あるいは、このORF、プロモーター、ターミネーターおよび/または付加的な分子は、1つの核酸として合成によってか、または生物学的に生成され得る。

#### 【0088】

好適な実施の形態では、1つ以上のORFが増幅され、次いで、標準的なプロモーターおよび/またはターミネーターに連結される(すなわち、会合され、アニールされ、および/または連結される)。例えば、大部分の遺伝子スクリーニングアッセイは、一般的なプロモーターおよび/またはターミネーターを種々のORFに、またはレポーターORFを種々のプロモーターおよび/またはターミネーターに融合することを必要とする。非制限的な例では、哺乳動物細胞中の遺

伝子をスクリーニングすることは、ORFを、真核生物プロモーターおよびターミネーターに融合することを必要とする。従って、理想的なLEE系は、代表的には、次いで標準的なプロモーターおよび/またはターミネーター配列のセットに連結され得るORFのみの増幅を含む。特定の実施の形態では、このプロモーター、ターミネーターおよび/またはORFは、1単位として増幅により産生される。

#### 【0089】

さらなる実施の形態では、すべての適用についてターミネーターが提供されることは要求されない。例えば、細胞のない発現を含む方法では、ターミネーターは必要でなくてもよい。

#### 【0090】

要求されないけれども、プロモーター、ORF、ターミネーター、LEE、またはCEEのような核酸は、ポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム遠心分離グラジエント、フィルターグラジエントまたは当業者に公知の任意の他の方法より（例えば、本明細書に参考として援用されるSambrookら、1989を参照のこと）精製され得る。

#### 【0091】

（H・LEEおよびCEE送達の方法）

本発明での使用のために、形質転換または細胞小器官、細胞、組織または生物のためのLEEまたはCEE送達の適切な方法は、プロトプラストのPEG媒介形質転換による（Omirullehら、1993）、乾燥/阻害媒介DNA取り込みによる（Potrykusら、1985）、エレクトロポレーションによる（その全体が本明細書中に詳細に援用される、米国特許第5,384,254号）、シリコンカーバイドファイバーでの攪拌による（その全体が本明細書中に詳細に援用される、Kaepplerら、1990；米国特許第5,302,523号；およびその全体が本明細書中に詳細に援用される、米国特許第5,464,765号）による、Agrobacterium-媒介形質転換による（米国特許第5,591,616号および米国特許第5,563,055号；両者は参考として本明細書に援用される）およびDNA被覆粒子の加速による（それぞ

れその全体が本明細書中に参考として詳細に援用される米国特許第5,550,318号;米国特許第5,538,877号;および米国特許第5,538,880号)などようなDNAの直接送達のように、細胞中にDNAが導入され得る実質的に任意の方法を含むと考えられる。これらのような技法の適用により、細胞小器官(単数または複数)、細胞(単数または複数)、組織(単数または複数)または生物(単数または複数)が安定または一時的に形質転換され得る。特定の実施の形態では、加速方法が好適であり、そして例えば、マイクロプロジェクトイルボンバードメントなどを含む。

#### 【0092】

##### (1. 注入)

特定の実施の形態では、LEEまたはCEEは、例えば、皮下、皮内または筋肉内のいずれかの1つ以上の注射により送達され得る。

#### 【0093】

図7Aおよび図7B中のデータは、PCR(登録商標)で生成したLEEが、注入(すなわち針注入)のようなその他のトランスフェクションプロトコルとともに用いられ得ることを示す。スーパーコイルの複製コントロールプラスミドおよびLEEベクターが、生理食塩水中の針注入により筋肉内(i.m.)に導入されたとき、非共有結合で連結されたLEEによりコードされたLUC活性が、LUCプラスミドにより産生されるその15%であった。注入の前にLEEにリガーゼを添加すると、LUC活性は、プラスミド標準の41%まで上昇した(図7B)。これに対し、リガーゼの添加は、遺伝子銃で導入されたLEEからの発現をさらに改善せず、それはプラスミド標準と同様であった(図7A)。これらの結果は、遺伝子銃は試料を皮膚細胞の内側に直接送達し(Williamsら、1991)、その一方、針はDNAをエキソヌクレアーゼがある筋肉組織の細胞外空間中に導入する(Wolffら、1990)という観察と一致する。

#### 【0094】

##### (2. エレクトロポレーション)

本発明の特定の実施の形態では、LEEまたはCEEは、エレクトロポレーションにより細胞中に導入される。エレクトロポレーションは、細胞およびDNA

の懸濁物の高電圧電気放電への曝露を含む。エレクトロポレーションによりDNAを導入することを望む場合、K r z y z e kらの方法（その全体が参考として本明細書に援用される、米国特許第5,384,253号）が特に有利である。この方法では、ペクチン分解酵素のような特定の細胞壁分解酵素を採用して、標的レシピエント細胞を非処理細胞よりエレクトロポレーションによる形質転換により感受性にする。あるいは、レシピエント細胞を機械的損傷により形質転換により感受性にする。

#### 【0095】

エレクトロポレーションを用いる真核生物細胞のトランスフェクションは、極めて首尾良くいっている。この方法で、マウスpre-Bリンパ球は、ヒト免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされ（Potterら、1984）、そしてラット肝細胞は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされた（Tur-Kaspalaら、1986）。

#### 【0096】

これには限定されないが、植物細胞のような細胞中でエレクトロポレーションにより形質転換を行うために、細胞の懸濁培養または胚形成カルスのいずれかのようなもろい組織を採用し得るか、あるいは未成熟胚またはその他の組織化された組織を直接形質転換し得る。この技法では、選択された細胞の細胞壁を、それらをペクチン分解酵素（ペクトリアーゼ）または制御された様式の機械的損傷に晒すことにより部分的に分解し得る。インタクトな細胞のエレクトロポレーションにより形質転換されたいくつかの種の例は、トウモロコシ（米国特許第5,384,253号；Rhodesら、1995；D'Halluinら、1992）、小麦（Zhouら、1993）、トマト（HouおよびLin、1996）、大豆（Christouら、1987）およびタバコ（Leeら、1989）を含む。

#### 【0097】

植物のエレクトロポレーション形質転換にプロトプラストをまた採用し得る（Bates、1994；Lazzeri、1995）。例えば、子葉由来のプロトプラストのエレクトロポレーションによるトランスジェニック大豆植物の生成

が、DhirおよびWidholmにより、国際出願公開番号WO 9217598（本明細書に参考として詳細に援用される）に記載されている。プロトプラスト形質転換が記載された種の他の例は、大麦（Lazerri、1995）、ソルガム（Battraら、1991）、トウモロコシ（Bhattacharjeeら、1997）、小麦（Heら、1994）およびトマト（Tsukada、1989）を含む。

#### 【0098】

##### （3．マイクロプロジェクティルボンバードメント）

マイクロプロジェクティルボンバードメント技法は、CEEおよびLEEを、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物中に導入する好適な方法である（米国特許第5,550,318号；米国特許第5,538,880号；米国特許第5,610,042号；およびPCT出願WO 94/09699；これらの各々はその全体が本明細書に参考として詳細に援用される）。当該分野で公知の広範な種類のマイクロプロジェクティルボンバードメント技法が存在し、その多くが本発明に適用可能である。しかし、本発明者らは、詳細な例に記載の一般的プロトコルを用いた。本明細書の詳細な例に記載の研究のいくつかでは、遺伝子を遺伝子銃で皮膚細胞中に導入した（実施例2、3、4、9、10、11および16）。

#### 【0099】

この方法では、粒子は核酸でコートされ、そして推進力により細胞中に送達され得る。例示の粒子は、タングステン、プラチナ、そして好ましくは金からなる粒子である。いくつかの例では、金属粒子上へのDNA沈殿は、マイクロプロジェクティルボンバードメントを用いるレシピエント細胞へのDNA送達には必要ではないことが意図される。しかし、粒子は、DNAでコートされるよりはむしろDNAを含み得ることが意図される。これ故、DNAでコートされた粒子は、粒子の衝撃（bombardment）によりDNA送達のレベルを増大し得るのであって、それら自身は必ずしも必要ではないことが提案される。

#### 【0100】

衝撃のために、懸濁液中の細胞は、フィルターまたは固形培養培地上に濃縮さ

れる。あるいは、未成熟胚またはその他の標的細胞が、固形培養培地上に配置され得る。衝撃を受ける細胞は、微粒子停止プレートの下適切な距離に配置される。

#### 【0101】

DNAを細胞中に送達するための方法の例示の実施形態は、制限されないで、加速によるのは、Biolistics Particle Delivery Systemであり、これは、DNAまたは細胞でコートされた粒子を、ステンレス鋼またはNytexスクリーンのようなスクリーンを通じて、例えば、懸濁液中の培養された単子葉類植物細胞のような細胞で覆われたフィルター表面上に推進するために用いられ得る。このスクリーンは粒子を分散し、その結果それらは、大きな凝集物でレシピエント細胞に送達されない。発射装置と衝撃を受ける細胞との間に介在するスクリーンが、噴出する凝集物のサイズを低減し、そして大きすぎる噴出物によるレシピエント細胞に対して与えられる損傷を低減することによって、形質転換のより高い頻度に寄与し得ると考えられる。

#### 【0102】

マイクロプロジェクタイトイルボンバードメント技法は広く適用可能であり、そして、例えば、任意の植物種のような、実際に種々の細胞、組織または生物を形質転換するために用いられ得る。マイクロプロジェクタイトイルボンバードメントにより形質転換された種の例は、トウモロコシ(PCT出願WO 95/06128)、大麦(Ritalaら、1994; Hensgensら、1993)、小麦(その全体が参考として詳細に援用される、米国特許第5,563,055号)、コメ(Hensgensら、1993)、カラスムギ(Torbetら、1995; Torbetら、1998)、ライ麦(Hensgensら、1993)、シュガーケーン(Bowerら、1992)、およびソルガム(Casasら、1993; Hagiolaら、1991)のような単子葉類種; およびタバコ(Tomesら、1990; BuisingおよびBenbow、1994)、大豆(その全体が参考として本明細書中に詳細に援用される、米国特許第5,322,783号)、ヒマワリ(Knittleら、1994)、ピーナッツ(Singhら、1997)、綿(McCabeおよびMartinell、199

3)、トマト(VanEckら、1995)、およびマメ科植物一般(その全体が参考として本明細書中に詳細に援用される)を含む多くの双子葉類を含む。

#### 【0103】

##### (4. リポソーム媒介トランスフェクション)

本発明のさらなる実施の形態では、LEEまたはCEEDは、リポソーム中に包括され得る。リポソームは、ホスホリピド二重層膜および内側の水性媒体により特徴付けられる小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒体により分離される複数の脂質層を有する。これらは、ホスホリピドが過剰の水性溶液中に懸濁されるときに自然に形成する。脂質成分は、閉鎖構造の形成前に自己再配列を行い、そして水を包括し、そして脂質二重層の間に溶質を溶解する(GhoshおよびBachhawat、1991)。意図されるのはまた、Lipofectamine(Gibco BRL)またはSuperfect(Qiagen)で複合体化された発現構築物である。

#### 【0104】

インビトロの外来DNAのリポソーム媒介核酸送達および発現は、非常に首尾良く行なわれている(NicolauおよびSene、1982; Fraleyら、1979; Nicolaurら、1987)。Wongら(1980)は、培養されたニワトリ胚、HeLaおよび肝癌細胞における外来DNAのリポソーム媒介送達および発現の実行可能性を示した。

#### 【0105】

本発明の特定の実施の形態では、リポソームは、血球凝集性ウイルス(HVJ)で複合体化され得る。これは、細胞膜との融合を容易にし、そしてリポソームに包括されたDNAの細胞侵入を促進することが示された(Kanedaら、1989)。その他の実施の形態では、リポソームは、核の非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)(Katoら、1991)と複合体化されるか、またはそれと組み合わせて採用され得る。なお別の実施の形態では、リポソームは、HVJおよびHMG-1の両方と複合体化されるか、またはそれと組み合わせて採用され得る。他の実施の形態では、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含み得る。

## 【0106】

## (5. リン酸カルシウムDEAE - デキストラン)

本発明のその他の実施の形態では、LEEまたはCEEは、リン酸カルシウム沈殿を用いて細胞中に導入される。ヒトKB細胞は、この技法を用いて、アデノウイルス5DNAでトランスフェクトされた(GrahamおよびVan Der Eb、1973)。またこの方法で、マウスL(A9)、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞がネオマイシンマーカ-遺伝子でトランスフェクトされ(ChenおよびOkayama、1987)、そしてラット肝細胞が種々のマーカ-遺伝子でトランスフェクトされた(Rippeら、1990)。

## 【0107】

別の実施の形態では、LEEまたはCEEが、DEAE - デキストラン次いでポリエチレングリコールを用いて細胞中に送達されている。この方法では、レポータープラスミドがマウスミエロームおよび赤白血病細胞中に導入された(Gopal、1985)。

## 【0108】

## (6. 直接マイクロインジクションまたは音波処理装填)

本発明のさらなる実施の形態は、直接マイクロインジクションまたは音波処理装填によるLEEまたはCEEの導入を含む。直接マイクロインジェクションは、Xenopus oocyte中に核酸構築物を導入するために用いられ(HarlandおよびWeintraub、1985)、そしてLTK-線維芽細胞は、音波装填によりチミジンキナーゼ遺伝子でトランスフェクトされた(Fechheimerら、1987)。

## 【0109】

## (7. レセプター媒介トランスフェクション)

なおさらに、標的細胞に核酸構築物を送達するために採用され得るLEEまたはCEEは、レセプター媒介送達ビヒクルである。これらは、標的細胞で生じ得るレセプター媒介エンドサイトーシスにより高分子の選択的取り込みを利用する。種々のレセプターの細胞型特異的分布を考慮して、この送達方法は、本発明に

別の程度の特異性を附加する。別の哺乳動物細胞型の意味の特異的送達は、Wu およびWuにより記載されている(1993;本明細書に参考として援用される)。

#### 【0110】

あるレセプター媒介遺伝子標的ビヒクルは、細胞レセプター特異的リガンドおよびDNA結合薬剤を含む。その他は、送達されるDNA構築物が作動可能に結合した細胞レセプター特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドが、レセプター媒介遺伝子移入に用いられ(WuおよびWu、1987;Wagnerら、1990;Peralesら、1994;Myers、EPO 0273085)、これは、この技法の作動可能性を確立する。本発明の特定の局面では、このリガンドは、EOE標的細胞集団上に特異的に発現されたレセプターに対応するように選択される。

#### 【0111】

その他の実施の形態では、細胞特異的遺伝子標的ビヒクルのDNA送達ビヒクル成分は、リポソームと組み合わせた特異的結合リガンドを含み得る。送達される核酸は、リポソーム内に収容され、そして特異的に結合するリガンドは、リポソーム膜中に機能的に取り込まれる。従って、リポソームは、標的細胞のレセプターに特異的に結合し、そして内容物を細胞に送達する。このような系は、例えば、上皮成長因子(EGF)が、EGFレセプターの上方調節を示す細胞への核酸のレセプター媒介送達に用いられる系を用いて機能的であることが示されている。

#### 【0112】

なおさらなる実施の形態では、標的化された送達ビヒクルのDNA送達ビヒクル成分はリポソーム自身であり得、それは、好ましくは、細胞特異的結合を行う1つ以上の脂質または糖タンパク質を含む。例えば、Nicolaouら(1987)は、クポソーム中に取り込まれた、ラクトシル-セラミド、ガラクトース末端アシアルガングリオシドを採用し、そして肝細胞によるインシュリン遺伝子の取り込みの増加を観察した。本発明の組織特異的形質転換構築物が同様の様式で標的細胞中に送達され得ることが予期される。

## 【0113】

## (8. 植物に関連する形質転換技法)

(a. *Agrobacterium*媒介形質転換)

*Agrobacterium*媒介移入は、植物細胞中に遺伝子を導入するために広く適用可能な系である。なぜなら、DNAを全植物組織中に導入することができ、それによってプロトプラストからのインタクトな植物の再生の必要性を回避し得るからである。植物細胞中にDNAを導入するための*Agrobacterium*媒介植物組込みベクターの使用は、当該分野で周知である。例えば、その全体が参考として本明細書中に詳細に援用される、Fraleyleら(1985)、Rogersら(1987)および米国特許第5,563,055号により記載される方法を参照のこと。

## 【0114】

*Agrobacterium*媒介形質転換は、双子葉類植物において最も効率的であり、そして*Arabidopsis*、タバコ、トマト、およびポテトを含む双子葉類の形質転換に好適な方法である。実際、*Agrobacterium*媒介形質転換は、多年に亘り、双子葉類植物に慣用的に用いられているが、単子葉類植物に適用可能になったのは最近である。*Agrobacterium*媒介形質転換技法における進歩は、今や、ほぼすべての単子葉植物に適用可能な技法にした。例えば、*Agrobacterium*媒介形質転換技法は、今や、コメ(その全体が本明細書中に参考として援用される、Hieiら、1997; Zhangら、1997; 米国特許第5,591,616号)、小麦(McCormacら、1998)、大麦(Tingayら、1997; McCormacら、1998)、およびトウモロコシ(Ishidaら、1996)に適用されている。

## 【0115】

現代の*Agrobacterium*形質転換ベクターは、*E. coli*および*Agrobacterium*中で複製し得、記載のように(Kleeら、1985)便利な操作を可能にする。さらに、*Agrobacterium*媒介遺伝子移入のためのベクターにおける最近の技術的進歩は、ベクター中の遺伝子および

制限部位の配置を改良し、種々のポリペプチドコード遺伝子を発現し得るベクターの構築を容易にした。記載のベクター (Rogersら、1987) は、挿入されたポリペプチドコード遺伝子の直接発現のために、プロモーターおよびポリアデニル化部位により隣接される便利なマルチリンカー領域を有し、そして本願の目的のために適切である。さらに、武装した (armed) および非武装 (disarmed) Ti 遺伝子の両方を含む *Agrobacterium* が、形質転換のために用いられ得る。 *Agrobacterium* 媒介形質転換が効率的である植物株では、これは選択される方法である。なぜなら、遺伝子移入の容易さおよび規定された性質のためである。

#### 【0116】

##### (b. 他の形質転換方法)

植物のプロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、およびこれらの処理の組合せに基づく方法を用いて達成され得る (例えば、以下を参照のこと: Potrykusら、1985; Lorzら、1985; Omirullehら、1993; Frommら、1986; Uchimiyaら、1986; Callisら、1987; Marcotteら、1988)。

#### 【0117】

これらの系の異なる植物系統への適用は、プロトプラストからその特定の植物系統が再生する能力に依存する。プロトプラストから穀物へ再生するための例示的な方法が記載されている (Fujimaraら、1985; Toriyaniaraら、1986; Yamadaら、1986; Abdullahら、1986; Omirullehら、1993 および米国特許第5,508,184号; これらは、具体的にそれぞれが、その全体として本明細書において参考として援用される)。穀物プロトプラストの直接取り込みの形質転換の使用の例は、以下の形質転換を含む: イネ (Ghosh-Biswasら、1994), ソルガム (Battraw および Hall, 1991), オオムギ (Lazzeri, 1995), エンバク (Zheng および Edwards, 1990) およびトウモロコシ (Omirullehら、1993)。

## 【0118】

首尾よくプロトプラストから再生し得ない植物系統を形質転換するために、DNAをインタクトな細胞もしくは組織へ導入する他の方法が利用され得る。例えば、未熟な胚または外植片からの穀物の再生が記載されるとおりに行われ得る (Vasil, 1989)。また、シリコンカーバイド繊維媒介性形質転換もまた、プロトプラスト化のあるなしで行われ得る (Kaeppler, 1990; Kaepplerら、1992; 米国特許第5,563,055号, これらは具体的にその全体が本明細書において参考として援用される)。この技術を用いた形質転換は、シリコンカーバイド繊維を細胞と共にDNA溶液中で振盪することによってなされる。DNAは、その細胞に穴があくにつれて受動的に侵入する。この技術は、例えば、単子葉穀物トウモロコシ (PCT出願WO95/06128、その全体が本明細書において具体的に援用される、Thompson) およびイネ (Nagatani, 1997) において首尾よく使用されている。

## 【0119】

## (I. 非タンパク質発現配列)

特定の実施形態において、LEEまたはCEEは、翻訳されないメッセンジャーを発現し得る。DNAは、表現型に影響を与える機能がタンパク質へとまだ翻訳されていないRNA転写物を発現する目的のために生物へと導入され得る。2つの例は、アンチセンスRNAおよびリボザイム活性を有するRNAである。両方とも、ネイティブまたは導入された遺伝子の発現を現象または除去するに置いて可能な機能を機能させ得る。しかし、以下に詳述するように、DNAは、生物の表現型を生じるように発現される必要はない。

## 【0120】

## (1. アンチセンス)

特定の局面において、LEEまたはCEEは、アンチセンスメッセンジャーを発現し得る。ORF、特に遺伝子からのものは、構築または単離され得る、これは、転写されるときに、標的化されるメッセンジャーRNAのすべてまたは部分に相補的であるアンチセンスRNAを生成する。このアンチセンスRNAは、メッセンジャーRNAのポリペプチド産物の産生を減少する。このポリペプチド産

物は、その細胞のゲノムによってコードされる任意のタンパク質であり得る。上記の遺伝子は、アンチセンス遺伝子と呼ばれる。従って、アンチセンス遺伝子は、形質転換方法によって細胞へと取り込まれて、目的の選択されたタンパク質の発現の現象を伴う新規トランスジェニック細胞または生物を生産し得る。例えば、このタンパク質は、その細胞または生物における反応を触媒する酵素であり得る。その酵素の活性の現象は、その反応の産物を減少もしくは除去し得、この産物は、脂肪酸、アミノ酸、炭水化物、核酸などのような細胞または生物において任意の酵素的に合成された化合物を含む。

#### 【0121】

あるいは、植物の形質転換のような比限定的な例において、そのタンパク質は、貯蔵タンパク質（例えば、ゼイン）または構造タンパク質であり得、そのタンパク質の発現の減少は、それぞれ、種子アミノ酸組成または植物形態学的変化における変化をもたらし得る。上記で引用される可能性は、例示の目的にのみ提供され、適用の全範囲を表さない。

#### 【0122】

##### (2. リボザイム)

他の局面において、LEEまたはCEEは、リボザイムを生産し得る。転写されるときにRNA酵素（リボザイム）を生産するORFが構築または単離され得る。このRNA酵素は、ENDリボヌクレアーゼとして作用し得、そして選択された配列を用いてRNA分子の切断を触媒する。選択されたメッセンジャーRNAの切断は、そのコードされたポリペプチド産物の生産の減少を生じ得る。これらの遺伝子を使用して、それら遺伝子を有する新規の1つ以上の細胞、組織および生物を調製し得る。トランスジェニック細胞、組織または生物は、減少したレベルのポリペプチドを有し得、これには、上記引用したポリペプチドが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0123】

リボザイムは、部位特異的に核酸を切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒ドメインを有する（KimおよびCech, 1987; Gerlachら, 1987; Forst

erおよびSymons, 1987)。例えば、大多数のリボザイムは、ホスホエステル転移反応を高い程度の特異性を持って加速し、しばしば、オリゴヌクレオチド気質におけるいくつかのホスホエステルのうち1つのみを切断する(Cechら、1981; MichelおよびWesthof, 1990; Reinhold-HurekおよびShub, 1992)。この特異性は、その基質がそのリボザイムの内部ガイド配列(「IGS」)に対する特異的塩基対合相互作用を介して化学反応の前に結合するという要件に帰結する。

#### 【0124】

リボザイム触媒は、拡散を含む配列特異的切断/連結の部分として主に観察されている(Joyce, 1989; Cechら, 1981)。例えば、米国特許第5,354,855号は、特定のリボザイムが公知のリボヌクレアーゼのものより大きく、そしてDNA制限酵素のものに近い配列特異性を有するエンドヌクレアーゼとして作用し得ることを報告する。

#### 【0125】

RNA切断反応性を有するいくつかの異なるリボザイムモチーフが記載されている(Symons, 1992)。例としては、以下を含むグループIの自己スプライスイントロンからの配列が挙げられる: タバコ輪紋病ウイルス(Prodyら、1986)、アボカド日斑(sunblotch)ウイロイド(Palukaitisら、1979)、およびルツェルン一過性線条(streak)ウイルス(ForsterおよびSymons, 1987)。これらおよび関連するウイルスからの配列は、推定された折り畳み二次構造に基づいてハンマーヘッドリボザイムといわれる。

#### 【0126】

他の適切なリボザイムは、RNA切断活性を有するRNアーゼPからの配列(Yuanら、1992, YuanおよびAltman, 1994、米国特許第5,168,053号および同第5,624,824号)、ヘアピンリボザイム構造(Berzal-Herranzら、1992; Chowriraら、1993)および型肝炎ウイルスベースのリボザイム(米国特許第5,625,047号)。RNA切断活性に指向されるリボザイムの一般的設計および最適化も詳

細に考察されている (H a s e l o f f および G e r l a c h , 1 9 8 8 , S y m o n s , 1 9 9 2 , C h o w r i r a ら、1 9 9 4 ; T h o m p s o n ら、1 9 9 5 )。

#### 【0127】

リボザイム設計における他の変数は、所定の標的RNAにおける切断部位の選択である。リボザイムは、相補性塩基対相互作用によってある部位にアニーリングすることにより所定の配列に標的化される。相同性の2つのストレッチがこの標的化に必要である。相同配列のこれらのストレッチは、上記の触媒リボザイム構造に隣接する。相同性配列の各ストレッチは、7～15ヌクレオチドの長さで変動し得る。相同性配列を規定するための唯一の要件は、標的RNAにおいて、それらが選択部位である特定の配列によって分離されることである。ハンマーヘッドリボザイムについて、その切断部位は、その標的RNAにおけるジヌクレオチドがウラシル(U)に続きアデニン、シトシンまたはウラシル(A、CまたはU)が続くことである (P e r r i m a n ら、1 9 9 2 ; T h o m p s o n ら、1 9 9 5 )。任意の所定のRNAに生じるこのジヌクレオチドの頻度は、統計学的に16のうち3つである。従って、1000塩基の所定の標的メッセンジャーRNAについて、187ジヌクレオチド切断部位が統計学的に可能である。

#### 【0128】

標的RNAの効率よい切断についてリボザイムを設計および試験することは、当業者に周知のプロセスである。リボザイムを設計および試験するための科学的方法の例は、以下により記載され: C h o w r i r a ら、(1994)および L i e b e r a n d S t r a u s s (1995)、これらは各々本明細書において参考として援用される。所定の遺伝子を下方調節するにおける使用のための作動性および好ましい配列の同定は、単に所定の配列を調製および試験する問題であり、そして当業者に公知の慣用的に実施される「スクリーニング」方法である。

#### 【0129】

##### (3. 遺伝子サイレンシングの導入)

さらなる局面において、LEEまたはCEEは、遺伝子サイレンシングを促進

するために転写され得る。遺伝子に由来するORFを導入して新規細胞、組織および生物を生産し得ることもまた可能である。これらは、同時抑制の機構によってネイティブ遺伝子産物の発現が減少している。タバコ、トマトおよびペチュニアによって以下が実証されている(Goringら、1991; Smithら、1990; Napoliら、1990; van der Krolら、1990) : ネイティブ遺伝子のセンス転写物の発現は、アンチセンスについて観察されるものと類似する様式でそのネイティブ遺伝子の発現を減少または除去する。この導入された遺伝子は、標的化されたネイティブタンパク質のすべてまたは部分をコードし得るが、その翻訳はそのネイティブタンパク質のレベルの減少を必要としないかもしれない。

#### 【0130】

##### (4. 非RNA発現配列)

さらなる実施形態において、LEEまたはCEEを使用して細胞、組織または生物をタグ化し得、または遺伝子を変異し得る。Ds、AcまたはMuのような転移可能なエレメントのものを含むDNAエレメントを導入して変異を誘発し得る。これらのDNAエレメントは、遺伝子を不活化(または活性化)するために挿入され得、それによって、特定の形質を「タグ」化し得る。この例において、その転移可能なエレメントは、タグ化された変異の不安定性を生じない。なぜなら、そのエレメントの利用は、ゲノムへ移動するその能力に依存しないからである。一旦、所望の形質がタグ化されると、PCRプライマーとして導入されたDNA配列を用いて、PCR遺伝子クローニング技術とともに用いて対応する遺伝子をクローニングし得る(Shapiro, 1983; Dellaportaら、1988)。一旦同定されると、特定の特質についてのその遺伝子全体(所望される場合、制御領域または調節領域を含む)が単離され得、クローニングされ得、および所望に応じて操作され得る。遺伝子タグ化の目的のために生物に導入されるDNAエレメントの有用性は、DNA配列から独立しており、そしてDNA配列のどの生物学的活性に依存しない(すなわち、RNAへの転写、またはタンパク質への翻訳)。DNAエレメントの唯一の機能は、遺伝子のDNA配列を破壊することである。

## 【0131】

発現されないDNA配列（新規合成配列を含む）が、細胞、組織および生物に、これらの細胞、組織および生物（特に植物およびその種子）の独占的「標識」として導入され得ることが企図される。標識DNAエレメントは、宿主細胞に対して内因性の遺伝子の機能を破壊することは必要はない。なぜなら、このDNAの唯一の機能は、細胞、組織または生物の起源を同定することであるからである。例えば、植物へ特有のDNA配列を導入し得、そしてこのDNAエレメントは、その標識された供給源から生じたものとして、細胞、植物およびこれらの細胞の子孫をすべて同定する。標識DNAの内包によって、独占的生殖細胞質またはそのようなものに由来する生殖細胞質を、標識されていない生殖細胞質から識別することが可能になる。

## 【0132】

導入され得る別の可能なエレメントは、マトリクス付着領域エレメント（MAR）である（例えば、ニワトリリゾチームAエレメント（Stief、1989）。これは、目的の発現可能遺伝子のまわりに配置されて、ゲノム（特に植物ゲノム）への取り込みの際にその遺伝子の発現全体を増加させ、そして位置依存効果を減少し得る（Stiefら、1989；Phi-Vanら、1990）。

## 【0133】

（J．植物表現型の改変のための外因性遺伝子）

本発明の特に重要な利点は、本発明が、植物細胞において選択されたタンパク質の効率よい発現のための方法および組成物を提供することである。LEEおよびCEEの構築物は、種々の植物特異的プロモーターを用いて作製され得る。植物特異的な発現のためのプロモーターは、当業者に公知であり、そして以下が挙げられるがそれらに限定されない：任意の構成的、誘導性、組織もしくは器官に特異的、または発生段階特異的な、プロモーター。これらは、特定の植物細胞において発現され得る。そのような適切なプロモーターは、Weisingら、前出において開示される。

## 【0134】

本明細書において使用するために適切なプロモーターとしては以下が挙げられ

るがそれらに限定されない： *A. tumefaciens* の T-DNA からの少なくとも 1 つの制御配列（トウモロコシ由来のマノピンシンターゼ、ノパリンシンターゼ、およびオクトピンシンターゼ；アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター）；トウモロコシからのアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター；光誘導性プロモーター（例えば、種々の種からのリブ羅斯 - ビスホスフェート - カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子およびクロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子プロモーター；ヒストンプロモーター（EP 507 698）、アクチンプロモーター；トウモロコシユビキチン I プロモーター（Christensen ら（1996）*Transgenic Res.* 5 : 213）；カリフラワーモザイクウイルスの 35 S および 19 S プロモーター；発生的に調節されるプロモーター（例えば、マウスからの *waxy* , *zein* または *bronze* のプロモーター）；ならびに合成または他の天然のプロモーターであって、誘導性または構成性のいずれかであるもの（器官特異的発現または植物の特定の発生段階での発現を示すプロモーター（例えば、米国特許第 5 , 635 , 618 号に開示された チュープリン）を含む）。

#### 【0135】

他のエレメント（例えば、イントロン、エンハンサー、終結配列など）もまた、LEE または CEE において存在し得る。これらのエレメントは、LEE または CEE 遺伝子構築の残りとは適合しなければならない。そのようなエレメントは、その遺伝子の機能に必要であっても必要でなくてもよい。しかし、それらは、転写をを行うことによってその遺伝子をよりよく発現または機能させること、mRNA の安定性などを提供し得る。そのようなエレメントは、植物には限定されないような生物において遺伝子を形質転換することを最適化する性能を入手するための所望される核酸において包含され得る。非限定的実施例において、トウモロコシ *Adhl5* 第一のイントロンは、特定の異種核酸のそのプロモーターとそのコード配列との間に配置され得る。このイントロンは、遺伝子構築物に含まれるとき、タンパク質のトウモロコシ細胞における発現を一般的に増加させることが知られる（Callis ら（1987）*Genes Dev.* 1 : 1183）。他の適切なイントロンとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：

トウモロコシの *shrunk-1* 遺伝子の少なくとも1つの第一のイントロン (Maasら (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:199); トウゴマカタラーゼ (*cat-1*) 遺伝子の第一のイントロン (Ohtaら (1990) *Plant Cell Physiol.* 31:805); ST-LSI 遺伝子のポテトカタラーゼ第二のイントロン (Vancanneytら (1990) *Mol. Gen. Genet.* 220:245); タバコ黄萎病ウイルスイントロン (Morrisら (1992) *Virology* 187:633); イネからのアクチン-1 (*act-1*) イントロン (McElroyら (1990) *Plant Cell* 2:163); およびトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) イントロン1 (Snowdenら (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:689)。しかし、遺伝子が満足行くに実施するに十分な発現は、しばしば、イントロン無しに得られ得る (Battrawら (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:527)。

#### 【0136】

異種核酸を含むLEEまたはCEEの構築物はまた、一過性ペプチドをコードする配列を含んで、異種遺伝子を植物細胞のオルガネラ (例えば、クロロプラスト) へと、その異種遺伝子によってコードされるタンパク質を駆動させ得る。そのような一過性ペプチドは、当業者には周知であり、そして単一過性ペプチド、および少なくとも2つの一過性ペプチドをコードする配列の組み合わせにより得られる複数一過性ペプチドが挙げられ得る。1つの一過性ペプチドは、米国特許第5,635,618号において開示されるOptimized Transit Peptide (最適化一過性ペプチド) であり、これは、第一のクロロプラスト一過性ペプチドをコードする第一のDNA配列、クロロプラストへと天然に駆動される成熟タンパク質のN末端ドメインをコードする第二のDNA配列、および第二のクロロプラスト一過性ペプチドをコードする第三のDNA配列を転写の方向に含む。

#### 【0137】

本発明に従って植物宿主細胞における発現のための選択されるタンパク質の選択は、形質転換の目的に依存する。穀物植物の形質転換の主要な目的の1つは、

商業的に所望される、農業的に重要な形質を植物に付加することである。そのような形質としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：除草剤抵抗性または寛容性；昆虫抵抗性または寛容性；疫病抵抗性または寛容性（ウイルス性、細菌性、真菌性、線虫）；ストレス寛容性および/または抵抗性（例えば、旱魃、熱、冷却、凍結、過剰湿度、塩ストレスおよび酸化ストレスに対する耐行性または慣用性により例示される）；収量増加；食品含量および構成；物理的外見；男性不妊；ドライダウン（dry down）；標準性；多作性；デンプン量および品質；油量および品質；タンパク質量および品質；アミノ酸組成など。種々の米国特許第がこれらの形質を付与するために使用され得るORFを記載しており、例えば、米国特許第5,550,318号、同第6,023,013号および同第6,040,497号、これらは各々本明細書において参考として援用される。

#### 【0138】

本発明の特定の実施形態において、レシピエント細胞の形質転換は、1を超える外因性（選択された）遺伝子（すなわち、ORF）を用いて行われ得る。本明細書において記載されるように、「外因性コード領域」または「選択されるコード領域」は、同一の状況において宿主ゲノムにおいて通常見出されないコード領域である。これにより、宿主ゲノムのものとは異なる種から単離され得、あるいは、宿主ゲノムから単離され得るが、変化していないネイティブ遺伝子において見出されるものとは異なる1つ以上の制御領域に作動可能に連結される。2つの外因性コード領域はまた、LEEまたはCEE構築物をコードする異なる導入遺伝子を用いるか、または2つ以上のコード配列を取り込んだ単一の構築物を用いるかのいずれかで、単一の形質転換事象において供給され得る。

#### 【0139】

（K．遺伝子ワクチン）

特定の実施形態において、少なくとも1つのLEEまたはCEEは、抗原を含むかまたは発現する。この抗原は、抗原をコードするLEEもしくはCEEで、または抗原をコードするLEEもしくはCEEトランスフェクトされたかまたは接種された動物による免疫応答を促進し得る。従って、LEEまたはCEEは、

免疫プロトコルのために有用なワクチンまたは「遺伝子ワクチン」を含み得る。この実施形態において、病原体のための抗原をコードするORF（例えば、HIV、SIV、マイコプラズマ）、寄生生物またはアレルゲン性生物が好ましい。さらに、推定抗原またはアレルゲンについてのORFは、1つ以上の真核生物の生物における免疫応答についてアッセイされ得る。

#### 【0140】

免疫の経過は、上清抗原に対する抗体についてのアッセイにより追跡され得る。このアッセイは、慣用標識により標識することによって実施され得る（例えば、放射性核種、酵素、蛍光など）。これらの技術は周知であり、そして例えば、これらの型のアッセイの例示として以下におけるような広汎な種々の特許において見出され得る：米国特許第3,791,932号；同第4,174,384号および同第3,949,064号。他の免疫アッセイが実施され得、そしてその病原体へのチャレンジからの保護のアッセイが免疫後に行われ得る。

#### 【0141】

##### （1．免疫調節因子）

免疫調節因子をワクチン中に含めて、患者の応答を増強し得ることが企図される。免疫調節因子は、精製されたタンパク質または細胞がその組成物の部分であるときにその細胞へと操作されたその発現物として含められ得る。免疫調節因子をコードする遺伝子が含められ得る。以下の節は、関心のあるものである免疫調節因子の例を列挙する。

#### 【0142】

##### （a．サイトカイン）

インターロイキンおよびサイトカイン、ならびにインターロイキンおよびサイトカインを発現するベクターは、可能なワクチン成分として企図される。インターロイキンおよびサイトカインとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：インターロイキン1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、 $\alpha$ -インターロイキン、 $\beta$ -インターロイキン、 $\gamma$ -インターロイキン、およびアンギオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン

、METH-1、METH-2、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、腫瘍壊死因子、およびそれらの組合せ。

【0143】

(a. 補因子)

補因子または補因子をコードする遺伝子は、ワクチンにおいて使用され得る。補因子の例としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：CD85、CD80、B7.1、B7.2など。

【0144】

(b. ケモカイン)

ケモカインまたはケモカインをコードするORFもまた、ワクチン成分として使用され得る。ケモカインは一般に、化学誘因剤として作用して免疫エフェクター細胞をケモカイン発現の部位へ補充する。特定の毛も回に電子を、例えば、サイトカイン遺伝子と組み合わせて発現させて、他の免疫系成分の処置の部位への補充を増強することが有利であり得る。そのようなケモカインとしては以下が挙げられる：RANTES、MCAF、MIP 1-、MIP 1-、およびIP-10。当業者は、特定のサイトカインがまた、化学誘因効果を有することが知られ、そして用語ケモカインとして分類され得ることを認識する。

【0145】

(2. アジュバント)

数年にわたり免疫プロトコルをアジュバントに使用して応答を刺激されている。いくつかのアジュバントは、抗原が提示される方法に影響を与える。例えば、免疫応答は、タンパク質抗原はミョウバンにより沈降されると増強する。抗原の乳化もまた、抗原提示の期間を延長する。他のアジュバント（例えば、細菌に由来する特定の有機分子）は、抗原上ではなく宿主に作用する。例は、ムラミルジペプチド（N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン [MDP]）、細菌ペプチドグリカン。MDPの効果は、ほとんどのアジュバント同様、十分には理解されていない。しかし、MDP刺激されたマクロファージはまた、B細胞を直接刺激するようである。従って、このアジュバントの効果は、抗原特異的ではない。しかしこれらが精製された抗原とともに投与されるとき、それらは、

その抗原に対する応答を選択的に促進するように使用され得る。

【0146】

アジュバントは、未知の抗原に対する免疫における一般的な増加を促進するように実験的に使用されてきている（例えば、米国特許第4,877,611号）。これは、癌の処置において特に試行されてきている。多くの癌について、免疫系が腫瘍細胞に対する宿主防御に参与するという無理のある証拠があるが、腫瘍特異的抗原のありそうな総数のほんの一部が今日までに同定されたと考えられている。しかし、本発明を用いて、適切なアジュバントの照射された腫瘍細胞の膜への内包は、突出した抗原の分子の同一性に拘わらず、抗腫瘍応答を増強するようである。これは、本発明の特に重要なかつ時間を節約する特徴である。

【0147】

当業者は、本発明に従って細胞性ワクチンに連結され得る種々の種類のアジュバントを認知し、そしてこれらとしては以下が挙げられる：とりわけ、アルキルリゾリン脂質（ALP）；BCG；およびビオチン（ビオチン化誘導体を含む）。

使用のために特に企図される特定のアジュバントは、グラム陰性細胞からのテイコ酸である。これらとしては、以下が挙げられる：リポテイコ酸（LTA）、リビトールテイコ酸（RTA）およびグリセロールテイコ酸（GTA）。それらの合成対応物の活性形態もまた、本発明とともに用いられ得る（Takadaら、1995a）。

【0148】

ヘモシアニンおよびヘモエリトリンもまた、本発明において使用され得る。すかし貝（KLH）からのヘモシアニンの使用が特に好ましいが、他の分子ならびに他の節足動物ヘモシアニンおよびヘモエリトリンも使用され得る。

【0149】

種々のポリサッカリドアジュバントもまた使用され得る。例えば、Yinら（1989）は、マウスの抗体応答に対して種々のpneumococcus（肺炎菌）ポリサッカリドアジュバントの使用を記載する。最適な応答を生成するかまたは他の方法でYinら（1989）において示されるように抑制を生成しな

い用量が使用されるべきである。ポリサッカリドのポリアミンの変種が特に好ましい(例えば、キチンおよびキトサン(脱アセチル化キチンを含む))。

#### 【0150】

アジュバントのさらなる好ましい群は、細菌ペプチドグリカンのムラミルジペプチド(MDP、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン)群である。ムラミルジペプチドの誘導体(例えば、アミノ酸誘導体スレオニル-MDP、および脂肪酸誘導体MTPPE)もまた企図される。

#### 【0151】

米国特許第4,950,645号は、ムラミルジペプチドの脂溶性のジサッカリド-トリペプチド誘導体を記載する。これは、ホスファジチルコリンおよびホスファチジルグリセロールから形成される人工リポソームにおいて使用することについて推奨される。これは、ヒト単球を活性化し、そして腫瘍細胞を破壊することにおいて有効であるといわれるが、一般に高用量で非毒性である。米国特許第4,950,645号およびPCT特許出願WO91/16347の化合物は、以前に、細胞キャリアとの使用について示唆されていないが、今や、本発明における使用について推奨される。

#### 【0152】

本発明において好ましいアジュバントはBCGである。BCG(バシラス・カルメット-ゲラン菌、Mycobacteriumの減弱化した株およびBCG細胞壁骨格(CWS)もまた、トレハロースジミコレートのあるなしで、本発明におけるアジュバントとして使用され得る。トレハロースジミコレートはそれ自身が使用され得る。Azumaら(1988)は、トレハロースジミコレート投与が、マウスにおけるインフルエンザウイルス感染に対する抵抗性の増強と関連することが示している。トレハロースジミコレートは、米国特許第4,579,945号において記載されるように調製され得る。

#### 【0153】

BCGは、その免疫刺激特性に起因して重要な臨床ツールである。BCGは、網膜内皮系を刺激し、ナチュラルキラー細胞を活性化し、そして造血幹細胞の増殖を増強するように作用する。BCGの細胞壁抽出物は、卓越した免疫アジュバ

ント活性を有することが証明されている。マイコバクテリアについて最近開発された分子遺伝学ツールおよび方法は、BCGへ外来遺伝子に導入する手段を提供した(Jacobsら、1987; Snapperら、1988; Hussonら、1990; Martinら、1990)。生のBCGは、肺炎を予防するために有効かつ安全な世界的に使用されるワクチンである。BCGおよび他のマイコバクテリアは、非常に有効なアジュバントであり、そしてマイコバクテリアに対する免疫応答は、広汎に研究されている。ほぼ20億の免疫によって、BCGは、ヒトにおいて安全な使用の長期記録を有する(Luelmo, 1982; Lotteら、1984)。BCGは、誕生時に与えられ得る数少ないワクチンの一つであり、BCGは、単回用量のみで長期免疫応答を発生させ、そしてBCGワクチン接種における経験を通じて世界的に分配されたネットワークが存在する。例示的BCGワクチンは、TICE(登録商標)BCGとして販売されている(Organon Inc., West Orange, NJ)。

#### 【0154】

本発明の代表的実施において、Mycobacterium bovis BCGの細胞は、当該分野において公知の方法によって増殖されそして採取される。例えば、それらは、Sauton培地においてまたはDubos培地における分散培養物を含む醗酵容器中で表面ペリクラとして増殖し得る(Dubosら、1947; Rosenthal, 1937)。すべての培養物は、約37 °Cでの14日間のインキュベーション後、採取される。ペリクラとして増殖した細胞は、白金ループを用いることにより採取され、他方、醗酵器からのものは、遠心分離または接線方向流れ濾過によって採取される。採取された細胞は、水性滅菌緩衝培地中に再懸濁される。代表的な懸濁物は、約 $2 \times 10^{10}$ 細胞/mlから約 $2 \times 10^{12}$ 細胞/mlヲ含む。この細胞懸濁物に対して、BCG細胞カバー物質を破壊する選択された酵素を含む滅菌溶液が添加される。得られる懸濁物は、例えば、攪拌してBCG生物の最大の分散を確保することによって振盪される。その後、より濃縮された細胞懸濁物が調製され、そしてその濃縮物における酵素は、代表的に水性緩衝液を用いて洗浄すること、接線方向流れの濾過のような公知の技術を使用することによって除去される。酵素なし細胞は、バイアル、アンプル

などに充填され、そして凍結乾燥された後に、凍結保護剤溶液を用いて最適な免疫学的濃縮物に調整され、BCGワクチンを得、これを、水での再構成の際に、免疫のために用意ができています。

#### 【0155】

両親媒性および表面活性薬剤（例えば、サポニンおよびQS21 (Cambridge Biotech) のような誘導體) は、本発明の免疫原を用いた使用のための好ましいアジュバントのさらに別の群を形成する。非イオン性ブロックコポリマー表面活性剤 (Rabinovichら、1994; Hunterら、1991) もまた、使用され得る。Yamamotoら (1988) に記載されるようなオリゴヌクレオチドは、別の有用な群のアジュバントである。Quil Aおよびレンチネンは、アジュバントの現在好ましいリストを補充する。薬剤の各々および以下に記載されるエンドトキシンは、アジュバントとして周知であるが、これらの化合物は、本明細書に記載されるように、標的細胞の膜へはこれまでに取り込まれていない。

#### 【0156】

本発明における使用のために好ましい1つの群のアジュバントは、脱毒性化したトキシンである（例えば、米国特許第4,866,034号にの精製した脱毒性化エンドトキシン）。これらの精製された脱毒性化したエンドトキシンは、哺乳動物におけるアジュバント応答を生成するために有効である。

#### 【0157】

脱毒性化されたエンドトキシンは、他のアジュバントと組み合わせられて、多価アジュバントを取り込んだ細胞を調製し得る。トレハロースジミコレートと脱毒性化エンドトキシンとの組合せが米国特許第4,435,386号に記載されるように企図されている。トレハロースジミコレートおよびエンドトキシン性糖脂質との脱毒性化エンドトキシンの組合せもまた企図される（米国特許第4,505,899号）。同様に、細胞壁骨格 (CWS) またはCWSおよびトレハロースジミコレートとの脱毒性化エンドトキシンとの組合せもまた、米国特許第4,436,727号、同第4,436,728号および同第4,505,900号に記載されるように企図される。単なるCWSとトレハロースジミコレートとの

組合せ（脱毒性化エンドトキシンを含まない）もまた有用であることが意図される（米国特許第4,520,019号に記載される）。

【0158】

本発明における使用のために特に好ましいアジュバントの1つの群は、DNAまたはRNAによってコードされ得るものである。そのようなアジュバントは、その抗原をコードするLEEまたはCEEにおいて、または別個のLEEもしくはCEEのベクターとして、または伝統的なプラスミドもしくは他の構築物としてコードされ得る。アジュバントをコードするこれらの核酸は、例えば、脂質もしくはリポソームを用いて直接送達され得る。抗原をコードするLEEまたはCEEはまた、脂質またはリポソームにおいてタンパク質性アジュバントとともに処方され得る。

【0159】

種々のアジュバントは、ヒトにおいて一般には使用されないものでさえなお、動物において使用され得る。ここで、例えば、抗体を惹起するか、または活性化されたT細胞を次に得ることが望まれる。そのアジュバントまたはその細胞のいずれかから生じ得る毒性または他の有害効果（例えば、非照射腫瘍細胞を用いて生じ得るようなもの）は、そのような環境とは無関係である。

【0160】

ワクチンは、注射（例えば、皮下、皮内または筋肉内）によって非経口的従来通り投与され得る。多くの場合において、多数の投与のワクチンを有することが所望され、通常6回のワクチン接種を超えず、より通常には4回のワクチン接種を超えず、そして好ましくは1回以上であり、通常は少なくともおよそ3回のワクチン接種である。ワクチン接種は、通常2から12週間の間隔で、より通常には3から5週間の間隔である。1から5年（通常3年）の間隔での周期的追加免疫が、抗体の保護レベルを維持するために所望される。

【0161】

（L．免疫学的試薬）

本発明の特定の局面において、発現されたORFに対する1つ以上の抗体を生成し得る。これらの抗体は、本明細書において以下に記載される、種々の診断ま

たは治療上の適用において使用され得る。

【0162】

本明細書において使用される用語「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEのような任意の免疫学的結合因子を広くにいうことが意図される。一般に、IgGおよび/またはIgMが好ましい。なぜなら、これらは、生理学敵情強において最も一般的な抗体であり、そしてそれらは研究室の条件で最も容易に作製されるからである。

【0163】

用語「抗体」は、抗原結合領域を有する抗体用分子をいうように使用され、そしてFab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、単鎖ドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv(単鎖Fv)などのような抗体フラグメントを包含する。種々の抗体ベースの構築物およびフラグメントを調製および用いるための技術は、当該分野において周知である(例えば、以下を参照のこと: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; これは、本明細書において参考として援用される)。

【0164】

モノクローナル抗体(MAb)は、特定の利点を有することが認識される(例えば、再現性および大規模生産)。そして、それらの使用が一般に好ましい。従って、本発明は、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ラビットおよびニワトリでさえも起源のモノクローナル抗体を提供する。試薬の調製の容易さおよび容易な入手可能性に起因して、マウスモノクローナル抗体がしばしば好ましい。

【0165】

しかし、「ヒト化」抗体もまた企図され、同じように、ヒト定常ドメインおよび/もしくは可変ドメインを有する、マウス、ラット、または他の種からのキメラ抗体、二機能性抗体、組み換えおよび操作された抗体ならびにそれらのフラグメントも企図される。その患者の歯科疾患に対する「カスタム改変」された抗体の開発のための方法も同様に公知であり、そしてそのようなカスタム改変された

抗体もまた企図される。

【0166】

モノクローナル抗体 (M A b) を生成するための方法は、一般に、ポリクローナル抗体のための株と同じ株で始められる。手短には、ポリクローナル抗体は、本発明に従う L E E または C E E の組成物で動物を免疫すること、およびその免疫された動物から抗血清を収集することによって調製される。

【0167】

広汎な動物種が、抗血清の生成のために使用され得る。代表的には、抗血清の生成のために使用される動物は、ラビット、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギである。動物の選択は、操作の容易さ、コストまたは所望される血清量に依存して決定され得る。これらは、当業者に公知である。

【0168】

また、当業者に周知であるように、特定の免疫源組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって増強され得る。適切なアジュバントとしては、以下が挙げられる：すべての受容可能な免疫刺激性化合物（例えば、サイトカイン、ケモカイン、補因子、毒素、合成組成物または L E E もしくは C E E をコードするそのようなアジュバント）。

【0169】

使用され得るアジュバントとしては以下が挙げられる：I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 7、M - 1 2、 $\gamma$ -インターフェロン、G M C S P、B C G、水酸化アルミニウム、M D P 化合物（例えば、t h u r - M D P および n o r - M D P、C G P (M T P - P E)、リピドA、およびーリン酸化リピドA (M P L)。細菌からの3つの成分、M P L、トレハロースジミコレート (T D M) および細胞壁骨格 (C W S) を2%スクアレン / T w e e n 8 0 エマルジョン中に含む R I B I が企図される。M H C 抗原でさえ使用され得る。例示的ではしばしば好ましいアジュバントとしては、以下が挙げられる：完全フロイントアジュバント（殺傷された *M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s* を含む免疫応答の非特異性刺激因子）、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバント。

## 【0170】

アジュバントに加えて、T細胞免疫を上方調節または抑制細胞活性を下方調節することが示されている生物学的応答の改変体(BRM)を同時投与することが好ましくあり得る。そのようなBRMとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：シメチジン(CIM; 1200mg/d)(Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド(CYP; 300mg/m<sup>2</sup>)(Johnson/Mead, NJ)、サイトカイン(例えば、 $\gamma$ -インターフェロン、EL-2またはIL-12あるいは免疫ヘルパー機能に関与するタンパク質(例えば、B-7)をコードする遺伝子。

## 【0171】

ポリクローナル抗体の生産において使用される免疫原組成物の量は、その免疫原の性質および免疫のために使用される動物に依存して変動する。種々の経路を使用して、免疫原を投与し得、これらには以下が含まれるがそれらに限定されない：皮下、筋肉内、皮内、上皮内、静脈内、および腹腔内。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後に、免役された動物の血液を種々の点でサンプリングすることによってモニタリングされ得る。

## 【0172】

第二の追加免疫用量(例えば、注射において提供される)もまた与えられ得る。追加免疫および滴定のプロセスは、適切な力価が達成されるまで反復される。所望されるレベルの免疫原性が得られるとき、その免疫動物から採血され得、そしてその血清が単離および格納され得、そして/あるいはその動物は、MAbを生成するために使用され得る。

## 【0173】

ラビットポリクローナル抗体の生成について、その動物は、耳静脈または代替的に心臓窃孔によって採血され得る。取り出された血液を凝固させ、次いで遠心分離して細胞全体および血餅から血清成分を分離する。その血清は、種々の適用について同様に使用され得、または他に、所望の抗体画分周知方法(例えば、別の抗体、固体支持体に結合したペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィー(または例えば、プロテインAまたはプロテインGのクロマトグラフィーを

用いる) ) によって精製され得る。

#### 【0174】

MAbは、周知の技術の使用を通じて容易に調製され得る(例えば、米国特許第4,196,265号において例示されるもの、これは、本明細書において参考として援用される)。代表的に、この技術は、適切な動物を、選択された免疫原組成物(例えば、精製されたまたは部分精製されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチドもしくはドメイン)(野生型組成物であれ、変異組成物であれ)で免疫役することを包含する。免疫組成物は、抗体生成細胞を刺激するに有効な様式で投与される。

#### 【0175】

モノクローナル抗体(MAb)を生成するための方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するための株と同じ株で始められる。マウスおよびラットのような齧歯類が好ましい動物であるが、ラビット、ヤギまたはカエルの細胞の使用もまた可能である。ラットの使用は、特定の利点を提供する(Goding, 1986, pp. 60-61)が、マウスが好ましい。ここで、BALB/cマウスが最も好ましい。なぜなら、これは、最も慣用的に使用され、そして一般に、より高いパーセントの安定な融合物を与えるからである。

#### 【0176】

その動物に、上記に一般的に記載されるように抗原を注射する。その抗原は、アジュバント(例えば、フロイントの完全または不完全のアジュバント)と混合され得る。同じ抗原またはその抗原をコードするDNAでの追加免疫投与は、およそ2週間の間隔で行う。

#### 【0177】

免疫後、抗体を生成する可能性を有する体細胞(特に、Bリンパ球(B細胞))は、MAb抗原生成プロトコルにおいて使用するために選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃体またはリンパ節から入手され得、あるいは、末梢血サンプルから入手され得る。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましい。前者については、それらが分裂中の形質芽球段階にある抗体産生細胞が豊富である供給源であるからであり、そして後者については、末梢血が容易にアクセス可能であ

るからである。

【0178】

しばしば、あるパネルの動物が免疫され、そして最も高い抗体力価の動物の脾臓が取り出され、そしてその脾臓リンパ球が、その脾臓をシリンジを用いて均質化することによって得られる。代表的に、免疫されたマウスからの脾臓は、およそ  $5 \times 10^7$  から  $2 \times 10^8$  のリンパ球を含む。

【0179】

次いで、免疫された動物からの抗体産生Bリンパ球は不死化された骨髄細胞の細胞（一般に、免疫された動物と同じ種のもの）と融合される。ハイブリドーマ生成融合手順での使用のために適切な骨髄細胞株は好ましくは、非抗体産生であり、高度の融合効率を有し、そして次いで、所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地中で増殖し得なくさせる酵素欠損を有する。

【0180】

任意の多数の骨髄細胞が使用され得、これらは当業者に公知である（Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984）が引用する）。例えば、免疫された動物がマウスである場合、以下を使用し得る：P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653、NS I/I.Ag4-1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPCII-X45-GTG1.7およびS 194/5XX0 Bul; ラットについて、以下を使用し得る：R210-RCY3, Y3-Ag 13, IR983F および4B210; ならびにヒト細胞融合物に関しては、U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 およびUC729-6はすべて有用である。

【0181】

1つの好ましいマウス骨髄細胞は、NS-1骨髄細胞株（P3-NS Ag4-1とも呼ばれる）であり、これは、NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryから、細胞株預託番号GM3573を請求することにより容易に入手可能である。使用され得る別のマウス骨髄

細胞株は、8 - アザグアニン耐性マウスのマウス骨髄細胞SP2/0非プロドューサー細胞株である。

#### 【0182】

抗体産生脾臓またはリンパ節細胞と骨髄細胞とのハイブリッドを生成するための方法は、通常、体細胞と、骨髄細胞とを2:1の比率で混合することを包含するが、その比率は、細胞膜の融合を促進する因子(単数または複数(化学的または電氣的))の存在下で、それぞれ約20:1から約1:1の間を変動し得る。Sendaiウイルスを用いた融合方法は、KohlerおよびMilstein(1975; 1976)に記載され、そしてポリエチレングリコール(PEG)(例えば、37%(v/v)PEGを用いる方法は、Gefterら、(1977)により記載される。電氣的に誘導される融合方法の使用もまた適切である(Goding pp. 71-74, 1986)。

#### 【0183】

融合手順は通常、低い頻度(約 $1 \times 10^{-6}$ から $1 \times 10^{-8}$ )で生存ハイブリッドを生成する。しかし、これは、問題を提示しない。なぜなら、生存の融合されたハイブリッドが親の融合されていない細胞(特に、通常あいまいに分化を続ける非融合骨髄細胞)からは、選択培地中で培養することによっては分化しないからである。選択培地は、一般に、組織培養培地中でヌクレオチドのデノボ合成をブロックする薬剤を含むものである。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成をブロックし、他方、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートが使用される場合、その場合は、培地はヒポキサンチンおよびチミジンをヌクレオチドの供給源として補充される(HAT培地)。アザセリンが使用される場合、その培地には、ヒポキサンチンが補充される。

#### 【0184】

好ましい選択培地はHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動し得る細胞のみがHAT培地中で生存し得る。骨髄細胞は、サルベージ経路の重要な酵素を欠損している(例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ

(H P R T)。そして、それらは、生存し得ない。B細胞は、この経路を作動し得るが、それらは、培養物中の生命スパンに限定され、そして一般に、2週間で死滅する。従って、選択培地中で生存し得る唯一の細胞は、骨髓細胞およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

#### 【0185】

この培養工程は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中の単一クローン希釈によって細胞を培養すること、続いてその個々のクローン上清(2から3週間後)その所望される反応性について試験することにより行われる。このアッセイは、感度がよく、単純でかつ迅速であるべきである(例えば、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイなど)。

#### 【0186】

次いで、選択したハイブリドーマを連続希釈し、別々の抗体産生細胞株にクローニングした。次いで、このクローンを永続的に増殖させM A bを提供させし得る。この細胞株は、2つの基本的な方法においてM A b産生のために開発され得る。第1としては、ハイブリドーマのサンプルを、もとの融合のための体細胞およびミエローマ細胞を提供するために用いられた型の組織適合性動物(例えば、同系マウス)に(しばしば、腹腔に)注入し得る。必要に応じて、動物を炭水化物、特にプリスタン(テトラメチルペンタデカン)のようなオイルでプライムし、その後注射する。注射された動物は、融合された細胞ハイブリドーマにより産生された特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発達させる。次いで、この動物の体液(例えば、血清または腹水)を取り、高濃度のM A bを獲得し得る。第2としては、個々の細胞株は、インビトロで培養され得る。ここで、M A bは、培養培地中に分泌され、ここからM A bが高濃度で容易に得られ得る。

#### 【0187】

いずれかの手段により産生されたM A bは、所望の場合、濾過、遠心分離および種々のクロマトグラフィー方法(例えば、H P L Cまたはアフィニティークロマトグラフィー)を用いて、さらに精製され得る。本発明のモノクローナル抗体

のフラグメントは、酵素（例えば、ペプシンまたはパパイン）での消化を含む方法によって、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって、そのように産生されたモノクローナル抗体から得られ得る。あるいは、本発明に包含されるモノクローナル抗体フラグメントは、自動ペプチドシンセサイザーを用いて合成され得る。

#### 【0188】

モノクローナル抗体を生成するのに、分子クローニングアプローチが用いられ得ることがまた意図される。1実施形態において、免疫した動物の脾臓から単離したRNAから、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製する。そして、抗原を発現する細胞およびコントロール細胞を用いるパニング（panning）により、適切な抗体を発現するファージミドを選択する。従来のハイブリドーマ技術を上回るこのアプローチの利点は、1回で、およそ $10^4$ 倍多い抗体が産生されそしてスクリーニングされ得ること、そしてH鎖およびL鎖の組み合わせにより新しい種が生成され、これはさらに適切な抗体を見出す機会を増大するということである。別の実施例において、無細胞系を用いてインビトロで抗原を産生するために、LEEまたはCEEが、用いられ得る。これらは、単鎖抗体ライブラリーをスキャンニングするための標的として用いられ得る。このことにより、動物の使用なしに、多くの異なる抗体が非常に迅速に同定され得る。

#### 【0189】

あるいは、本発明により包含されるモノクローナル抗体フラグメントは、自動ペプチドシンセサイザーを用いてか、またはE. coliにおける全長遺伝子または遺伝子フラグメントの発現により、合成され得る。

#### 【0190】

##### (1. 抗体結合体)

本発明はさらに、抗体結合体を形成するために少なくとも1つの因子に連結した、ORF転写メッセージおよび翻訳タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドに対する、概してモノクローナル型の、抗体を提供する。診断薬または治療薬としてのモノクローナル抗体の有効性を増大するため、少なくとも1つの所望の分

子または部分を結合させるか、共有結合させるか、または複合することが通常である。このような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクター分子またはレポーター分子であり得るがそれに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性（例えば、細胞傷害性活性）を有する分子を含む。抗体に結合したエフェクター分子の非限定的な例としては、トキシン（毒素）、抗腫瘍因子、治療酵素、放射線標識ヌクレオチド、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、1アッセイを用いて検出され得る任意の部分として規定される。抗体に結合したレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射線標識、ハプテン、蛍光標識、燐光性分子、化学発光分子、発色団、蛍光分子、光親和性分子、有色粒子、またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

#### 【0191】

十分な選択性、特異性または親和性の抗体が、抗体結合体のための基礎として使用され得る。このような特性は、当業者に公知の従来免疫学的スクリーニング方法論を用いて評価され得る。基準抗原結合部位に加えて、抗体分子における生物学的に活性な分子に対する結合のための部位としては、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞共レセプターCD4およびHIV-1エンベロープに結合し得る可変ドメイン中に存在する部位が挙げられる（Sassora、1989；Shorkira、1991；Silvermannら、1995；Clearyら、1994；Lenertら、1990；Berberianら、1993；Kreierら、1991）。さらに、可変ドメインは、抗体自己結合に関与し（Kangら、1988）、そして抗-抗体により認識されるエピトープ（イディオタイプ）を含む（Kohlerら、1989）。

#### 【0192】

抗体結合体の特定の実施例は、抗体が検出可能標識に結合するような結合体である。「検出可能標識」は、その特定の機能的特性、および/または化学的特徴、により検出され得る化合物および/またはエレメントである。その使用により、所望の場合、それが結合された抗体が、検出され、そして/またはさらに定量されることを可能にする。別のこのような実施例は、細胞傷害性薬剤または抗細

胞剤に結合した抗体を含む結合体の形成であり、そして「免疫毒素（イムノトキシン）」と呼ばれ得る。

#### 【0193】

抗体結合体は、一般に診断薬としての使用に好ましい。抗体診断薬は、一般に2つのクラスに分けられる。この2つは、インビトロ診断（例えば、種々の免疫アッセイ（イムノアッセイ））における使用のためのもの、および/またはインビボ診断プロトコールにおける使用のためのもの（一般に、「抗体指向性画像化（antibody-directed imaging）」として知られる）である。

#### 【0194】

多くの適切な画像化剤が、抗体へのその結合のための方法がそうであるように、当該分野で公知である（それぞれ、参考として本明細書において援用される、例えば、米国特許第5,021,236号；同第4,938,948号を参照のこと）。用いられる画像化部分は、常磁性造影剤；放射活性同位元素；蛍光色素；NMR - 検出可能物質；X線撮影であり得る。

#### 【0195】

常磁性造影剤の場合、例として、クロム（III）、マグネシウム（II）、鉄（III）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジミウム（III）、サマリウム（III）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルビウム（III）および/またはエルビウム（III）が挙げられるが、ガドリニウムが特に好ましい。他の状況（例えば、X線撮影）で有用なイオンとしては、限定しないが、ランタン（III）、金（III）、鉛（II）および特にビスマス（III）が挙げられる。

#### 【0196】

治療的適用および/または診断的適用のための放射性同位体の場合、アスタチン<sup>211</sup>、<sup>14</sup>炭素、<sup>51</sup>クロム、<sup>36</sup>塩素、<sup>57</sup>コバルト、<sup>58</sup>コバルト、銅<sup>67</sup>、<sup>152</sup>Eu、ガリウム<sup>67</sup>、<sup>3</sup>水素、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、インジウム<sup>111</sup>、<sup>59</sup>鉄、<sup>32</sup>リン、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、<sup>75</sup>セレン、<sup>35</sup>イオウ、テクネチウム（t

echnicium)<sup>99m</sup>、および/またはイットリウム<sup>90</sup>が挙げられ得る。<sup>125</sup>  
Iは、しばしば、特定の実施形態における用途に好ましく、そしてイットリウム<sup>90</sup>およびインジウム<sup>111</sup>はまた、しばしば、それらの低いエネルギーおよび安定性により、長期検出に好ましい。本発明の放射性標識モノクローナル抗体は、当該分野で周知の方法に従って産生され得る。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはヨウ化カリウム、ならびに化学酸化剤（例えば、次亜塩素酸ナトリウム）、または酵素酸化剤（例えば、ラクトペルオキシダーゼ）との接触によりヨウ素化され得る。本発明に従うモノクローナル抗体は、リガンド交換プロセスにより（例えば、スズ溶液を用いて過テクネチウム酸を還元し、Sephadexカラムに還元したテクネチウムをキレート化し、そしてこのカラムに抗体をアプライすることにより）、テクネチウム<sup>99m</sup>で標識され得る。あるいは、直接的標識技術が、例えば、過テクネチウム酸、還元剤（例えば、SNCL<sub>2</sub>）、緩衝溶液（フタル酸ナトリウム - カリウム溶液）、および抗体をインキュベートすることにより、用いられ得る。抗体に、金属イオンとして存在する放射性同位体を結合させるために、しばしば用いられる中間の官能基は、ジエチレントリアミン5酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン4酢酸（EDTA）である。

#### 【0197】

結合体としての使用を意図される蛍光標識としては、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー（Cascade Blue）、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート（Fluorescein Isothiocyanate）、HEX、6-JOE、オレゴングリーン（Oregon Green）488、オレゴングリーン（Oregon Green）500、オレゴングリーン（Oregon Green）514、パシフィックブルー（Pacific Blue）、REG、ローダミングリーン（Rhodamine Green）、ローダミンレッド（Rhodamine Red）、レノグラフィン（Renographin）、R

OX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン (Tetramethyl rhodamine)、および/またはテキサスレッド (Texas Red) が挙げられる。

#### 【0198】

本発明において意図される別の型の抗体結合体は、インビトロでの使用を主に意図した抗体である。ここで、この抗体は、2次結合リガンドおよび/または色素形成基質と接触する際に有色産物を生成する、酵素(酵素タグ)に連結される。適切な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋わさび)水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい2次結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジン、ならびにストレプトアビジンの化合物である。このような標識の使用は、当業者に周知であり、そして、例えば、米国特許第3,817,837号;同第3,850,752号;同第3,939,350号;同第3,996,345号;同第4,277,437号;同第4,275,149号および同第4,366,241号に記載される(これらの各々は本明細書中で参考として援用される)。

#### 【0199】

抗体に対する分子の部位特異的付着のなお別の公知の方法は、抗体のハプテンベースのアフィニティー標識との反応を含む。本質的に、ハプテンベースのアフィニティー標識は、抗原結合部位中のアミノ酸と反応して、それによりこの部位を破壊し、そして特定の抗原反応をブロックする。しかし、これは優位ではない。なぜならば、これは抗体結合体による抗原結合の損失を生じるからである。

#### 【0200】

アジド基を含む分子をまた用いて、低強度紫外線により生成される、反応性ニトレン中間体を介してタンパク質に共有結合を形成し得る(PotterおよびHalley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-アジドアナログおよび8-アジドアナログは、粗細胞抽出物におけるヌクレオチド結合タンパク質を同定するために、部位特異的フォトプローブとして用いられている(QwensおよびHalley, 1987; Athertonら, 1985)。2-アジドヌクレオチド、および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオ

チド結合ドメインをマッピングするために用いられており (Khatoonら、1989; Kingら、1989; およびDholakiaら、1989)、そして抗体結合剤として用いられ得る。

#### 【0201】

いくつかの方法は、その結合体部分に対する抗体の付着または結合体化について、当該分野で公知である。いくつかの付着方法は、例えば、抗体に結合した無水ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA); エチレントリアミン4酢酸; N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド; および/またはテトラクロロ-3,6-ジフェニルグリコウリル-3のような有機キレート剤を用いる、金属キレート複合体の使用に関する(米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号、これらの各々は本明細書中で参考として援用される)。モノクローナル抗体はまた、カップリング剤(例えば、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸)の存在下で酵素と反応され得る。蛍光マーカを有する結合体は、これらのカップリング剤の存在下か、またはイソチオシアネートとの反応により調製される。米国特許第4,938,948号において、乳癌のイメージングは、モノクローナル抗体を使用して達成され、そして検出可能なイメージング部分は、リンカー(例えば、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートを用いて抗体に結合される。

#### 【0202】

他の実施形態では、抗体結合部位を変化しない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が意図される。この方法論に従って生成される抗体結合体は、改善された寿命、特異性および感度を示すことが開示される(米国特許第5,196,066号、本明細書中で参考として援用される)。エフェクター分子またはレポーター分子の部位特異的付着(ここで、このレポーター分子またはエフェクター分子は、Fc領域における糖質残基に結合体化される)はまた、文献に開示されている(O'Shannessyら、1987)。このアプローチは、現在臨床的評価にある、診断的かつ治療的に有望な抗体を生成することが報告されてい

る。

### 【0203】

#### (2. 免疫検出法)

なおさらなる実施形態では、本発明は、生物学的成分（例えば、ORF発現メッセージ、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド）を結合する、精製する、除去する、定量する、および/またはそれ以外で一般的に検出するための免疫検出方法に関する。いくつかの免疫検出法としては、いくつかを挙げると、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロットが挙げられる。種々の有用な免疫検出法の工程は、科学文献に記載されている（例えば、Doolittle MHおよびBen-Zeev O、1999；Gulbis BおよびGaland P、1993；De Jager Rら、1993；およびNakamuraら、1987、これらの各々は本明細書中で参考として援用される）。

### 【0204】

一般に、免疫結合（immunobinding）方法は、ORF発現メッセージ、ならびに/あるいはタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを含むことが疑われるサンプルを得る工程、および本発明の方法に従って、このサンプルと第1の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体とを接触させる（場合によっては、免疫複合体の形成を可能にするに効果的な条件下で）工程を包含する。

### 【0205】

これらの方法は、ORFメッセージ、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを、オルガネラ、細胞、組織または生物体サンプルから精製するための方法を包含する。これらの例において、抗体が、抗原性のORFメッセージ、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドの成分を、サンプルから取り出す。この抗体は、好ましくは、固体支持体（例えば、カラムマトリクスの形態での）に連結され、そしてこのORFメッセージ、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドの抗原性成分を含むことが疑われるサンプル

を、この固定された抗体に適用する。所望でない成分は、カラムから洗い流され、この固定された抗体に免疫複合体化された、この溶出されるべき抗原を残す。

#### 【0206】

免疫結合方法はまた、サンプル中の抗原成分の量を検出および定量するため、ならびに結合プロセスの間に形成された任意の免疫複合体の検出および定量のための方法を包含する。ここでは、抗原を含むことが疑われるサンプルを得て、そしてこのサンプルと、このORFから産生された抗原に対する抗体とを接触させ、次いで、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出および定量する。

#### 【0207】

抗原検出の点において、分析される生物学的サンプルは、抗原を含有することが疑われる任意のサンプル（例えば、組織切片または組織試料、ホモジナイズした組織抽出物、細胞、オルガネラ、任意の上記の抗原含有組成物の分離形態および/または精製形態、あるいは細胞または組織と接触している任意の生物学的液体（血液および/または血清を含む）でさえ、のような）であるが、組織サンプルまたは組織抽出物が好ましい。

#### 【0208】

この選択された生物学的サンプルと抗体とを、免疫複合体（一次免疫複合体）の形成の形成を可能にするのに効果的な条件下かつ十分な時間の中で接触させることは、一般的には、単に、この抗体組成物をこのサンプルに添加し、そしてこの抗体が、存在する任意のORF抗原と免疫複合体を形成する（すなわち、そのORF抗原に結合する）のに十分に長い時間の中でこの混合物をインキュベートすることである。この時間の後に、サンプル-抗体組成物（例えば、組織切片、ELISAプレート、ドットプロットまたはウエスタンプロット）は、一般的に、洗浄されて、任意の非特異的に結合された抗体種を除去し、一次免疫複体内に特異的に結合された、それらの抗体だけ検出されるのを可能にする。

#### 【0209】

一般に、免疫複合体形成の検出は、当該分野で周知であり、そして多くのアプローチの適用によって達成され得る。これらの方法は、一般に、標識またはマーカ（例えば、任意のそれらの放射活性タグ、蛍光タグ、生物学的タグおよび酵

素タグ)の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、米国特許第3,817,837号;同第3,850,752号;同第3,939,350号;同第3,996,345号;同第4,277,437号;同第4,275,149号および同第4,366,241号(各々は、参照として本明細書中に援用される)が挙げられる。もちろん、当該分野で公知のような、二次結合リガンド(例えば、第2の抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配置(arrangement))の使用によって、さらなる利点を見出し得る。

#### 【0210】

検出に使用されるORF抗原抗体は、それ自体で、検出可能な標識に連結され、次いで、この標識を簡単に検出し、それによって、組成物中の一次免疫複合体の量の決定を可能にする。あるいは、一次免疫複体内に結合されている第1の抗体は、この抗体に対する結合親和性を有する第2の結合リガンドによって検出され得る。これらの場合において、この第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。この第2の結合リガンドは、しばしば、それ自体が抗体であって、従って、これは「二次」抗体と呼ばれ得る。一次免疫複合体は、この標識された二次結合リガンド(すなわち、抗体)と、二次免疫複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下および十分な時間の間で接触される。次いで、この二次免疫複合体は、一般に洗浄されて、任意の非特異的に結合された標識二次抗体(または、リガンド)を除去し、次いで、この二次免疫複合体における残った標識が、検出される。

#### 【0211】

さらなる方法は、2工程アプローチによる、一次免疫複合体の検出を包含する。抗体に対する結合親和性を有する第2の結合リガンド(例えば、抗体)を使用して、上記のように、二次免疫複合体を形成させる。洗浄後、この二次免疫複合体を、この第2の抗体に対する結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体と、再度、免疫複合体(三次免疫複合体)の形成を可能にするのに効果的な条件下および十分な時間の間で接触させる。この第3のリガンドまたは抗体は、検出可能な標識に連結され、このように形成された三次免疫複合体の検出を可能に

する。この系は、シグナル増幅を、それが所望される場合に提供し得る。

#### 【0212】

Charles Cantorによって設計された免疫検出の1つの方法は、2つの異なる抗体を使用する。第1工程のビオチン化モノクローナル抗体またはビオチン化ポリクローナル抗体は、標的抗原を検出するために使用され、そして次いで、第2工程の抗体が、この複合体化ビオチンに結合されているビオチンを検出するために使用される。この方法において、試験されるサンプルは、最初に、第1工程の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、その抗体のいくらかは、その抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、この抗体/抗原複合体は、ストレプトアビジン(またはアビジン)、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの連続溶液中でインキュベートすることによって増幅される(各工程は、さらなるビオチン部位をこの抗体/抗原複合体に付加する)。この増幅工程は、適切なレベルの増幅が達成されるまで繰り返され、この時点で、このサンプルを、ビオチンに対する第2工程の抗体を含む溶液中でインキュベートする。この第2工程の抗体は、例えば、色素原基質を使用する組織酵素学によって、その抗体/抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素で、標識される。適切な増幅によって、巨視的に観察される結合体が、生成され得る。

#### 【0213】

免疫検出の別の公知の方法は、免疫PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)方法論を利用する。このPCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と類似であるが、複数回のストレプトアビジンおよびビオチン化DNAインキュベーションに代って、このDNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体は、その抗体を放出する、低pH緩衝液または高塩緩衝液で洗浄される。次いで、この得られた洗浄溶液を使用して、適切なコントロールと共に、適切なプライマーを用いるPCR反応を行う。少なくとも理論上は、PCRの非常に大きい増幅能力および特異性を利用して、単一の抗原分子を検出し得る。

#### 【0214】

本発明の免疫検出方法は、状態(例えば、種々の疾患)の診断および予測にお

ける明白な有用性を有し、ここで、特定のORF（例えば、ウイルス感染細胞、組織または生物のウイルスORF）；癌特異的遺伝子産物などが発現される。ここで、ORF発現産物に關与する特定の疾患を含む疑いのある、生物学的サンプルおよび／または臨床的サンプルが使用される。しかし、これらの実施形態はまた、非臨床的サンプルへの適用（例えば、ハイブリドーマの選択における抗原または抗体サンプルの滴定のような）を有する。

#### 【0215】

疾患の種々の形態（例えば、癌のような）を有する患者の臨床的診断および／またはモニタリングにおいて、癌特異的ORF遺伝子産物の検出、および／または癌特異的遺伝子産物のレベルの変更が、正常な被験体由来の対応する生物学的サンプルにおけるレベルと比較して、癌を有する患者を示す。しかし、当業者に公知のように、このような臨床的診断は、この単離方法に基づいて、必ずしもなされる訳ではない。当業者は、生物マーカーの型および／または量における有意な差（これは、陽性の同定を表す）、ならびに／あるいは生物マーカーの低いレベルおよび／またはバックグラウンド変化との間の区別に非常に精通している。実際に、バックグラウンドの発現レベルがしばしば用いられ、増加した検出が、有意および／または陽性と評価される「カットオフ」を形成する。もちろん、任意の免疫検出または治療における本発明の抗体は、当業者に公知である。

#### 【0216】

##### （a．ELISA）

上記で詳述したように、最も単純なセンスおよび／または直接的なセンスにおけるイムノアッセイは、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、当該分野で公知の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および／またはラジオイムノアッセイの種々の型である。組織切片を使用する免疫組織化学的検出はまた、特に有用である。しかし、検出が、このような技術に限定されず、そして／あるいはウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS分析などがまた、使用され得ることが容易に認識される。

#### 【0217】

一つの例示的なELISAにおいて、本発明の抗ORFメッセージおよび／ま

たは抗ORF翻訳産物抗体が、タンパク質親和性を示す選択された表面（例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレートにおけるウェル）上に固定化される。次いで、抗原を含む疑いのある試験組成物（例えば、臨床的サンプル）が、ウェルに添加される。結合、および/または非特異的結合免疫複合体を取り除くための洗浄後、結合した抗原を検出し得る。検出は、一般的に、検出可能な標識に結合した別の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体の添加によって達成される。ELISAのこの型は、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第二の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体の添加によって達成され得、その後、二次抗体への結合親和性を有する第三の抗体を添加し、三次抗体は、検出可能な標識に結合する。

#### 【0218】

別の例示的なELISAにおいて、抗原を含む疑いのあるサンプルが、ウェル表面上に固定化され、そして/あるいは、次いで、本発明の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体と接触する。結合、および/または非特異的結合免疫複合体を取り除くための洗浄後、結合した抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体が検出される。第一の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体が、検出可能な標識に結合される場合、免疫複合体は、直接検出され得る。再び、この免疫複合体は、第一の抗ORFメッセージおよび/または抗ORF翻訳産物抗体への結合親和性を有する二次抗体を使用して検出され得、この二次抗体は、検出可能な標識に結合される。

#### 【0219】

抗原が固定化される別のELISAは、検出において、抗体競合の使用を含む。このELISAにおいて、抗原に対して標識された抗原がウェルに添加され、この標識によって、結合および/または検出が可能になる。次いで、未知のサンプル中の抗原の量を、コーティングされたウェルを用いたインキュベーションの間、抗原に対して標識された抗体とサンプルを混合することによって決定する。サンプル中の抗原の存在は、ウェルへの結合に利用できる抗原に対する抗体の量を減少するように作用し、従って、最終的なシグナルを減少する。これはまた、未知のサンプル中の抗原に対する抗体の検出に適しており、ここで、非標識化抗

体は、抗原でコーティングされたウェルに結合し、そしてまた、標識化抗体の結合に有効な抗原の量を減少する。

#### 【0220】

利用される型式に関係なく、ELISAは、共通の特定の特徴（例えば、コーティング、インキュベート、および結合、非特異的結合種を取り除くための洗浄、および結合した免疫複合体の検出）を有する。これらを以下に記載する。

#### 【0221】

抗原または抗体のいずれかを用いたプレートのコーティングにおいて、一般的に、一晚または特定の時間のいずれかで、抗原または抗体の溶液でプレートのウェルをインキュベートする。次いで、このプレートのウェルを、不完全に吸着された物質を取り除くために洗浄する。次いで、ウェルの任意の残りの有効な表面を、試験抗血清に関しては、抗原性に中性である非特異的タンパク質で「コーティング」する。これらとしては、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは粉乳溶液が挙げられる。このコーティングにより、固定化表面上の非特異的吸着部位のブロッキングが可能になり、従って、表面上への抗血清の非特異的結合によって引き起こされるバックグラウンドを減少する。

#### 【0222】

ELISAにおいて、直接的な手順ではなく、二次的または三次的な検出手段を使用することが、おそらくより通例である。従って、ウェルへのタンパク質または抗体の結合、バックグラウンドを減少するための非反応性物質でのコーティング、および結合しない物質を取り除くための洗浄後、固定化表面を、免疫複合体（抗原/抗体）形成に有効な条件下で、試験されるべき生物学的サンプルと接触する。次いで、免疫複合体の検出が、標識された第二の結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第三の結合リガンドと組み合わせた第二の結合リガンドまたは抗体を必要とする。

#### 【0223】

「免疫複合体（抗原/抗体）形成に有効な条件下」は、好ましくは、BSA、ウシ グロブリン（BGG）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）/ Tweenのような溶液で、抗原および/または抗体を希釈する工程を包含する条件を

意味する。これらの付加された因子はまた、非特異的バックグラウンドの減少を補助する傾向がある。

#### 【0224】

「適切な」条件はまた、インキュベーションが、有効な結合を可能にするのに十分な温度および時間であることを意味する。インキュベーション工程は、典型的には、好ましくはおよそ25 ~ 27 程度の温度で約1 ~ 2時間 ~ 4時間位であるか、または約4 位で一晩であり得る。

#### 【0225】

E L I S Aにおける全てのインキュベーション工程後、非複合体化物質を取り除くために接触表面を洗浄した。好ましい洗浄手順は、P B S / T w e e nのような溶液またはホウ酸緩衝液で洗浄する工程を包む。試験サンプルと元々結合している物質との間の特定の免疫複合体の形成および引き続き洗浄の後、非常に少量の免疫複合体の出現を決定し得る。

#### 【0226】

検出手段を提供するために、二次抗体または三次抗体は、検出を可能にするための付随する標識を有する。好ましくは、この標識は、適切な色素生産性基質と共にインキュベートする際に発色を生じる酵素であり得る。従って、例えば、一期間の間かつさらなる免疫複合体形成の発達に都合のよい条件下（例えば、P B S - T w e e nのようなP B S含有溶液中の室温での2時間のインキュベーション）で、ウレアーゼ接合抗体、グルコースオキシダーゼ接合抗体、アルカリホスファターゼ接合抗体または水素オキシダーゼ接合抗体と第1および第2の免疫複合体とを接触させるかインキュベートすることが望ましい。

#### 【0227】

標識抗体とのインキュベーションおよび引き続き非結合物質の除去のための洗浄後、例えば、色素生産性基質（例えば、ウレア、またはプロモクレゾールパープル、または2, 2' - アジノ - ジ - ( 3 - エチル - ベンズチアゾリン - 6 - スルホン酸 ( A B T S ) ) またはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 酵素標識としてのペルオキシダーゼの場合 ) ) とのインキュベーションにより、標識の量を定量した。次いで、定量化を、例えば可視スペクトル分光光度計を使用して生成された色の程度を測定するこ

とにより達成した。

【0228】

(b. 免疫組織化学)

本発明の抗体をまた、免疫組織化学(IHC)による研究のために調製された新鮮な凍結組織ブロックおよび/またはホルマリン固定しパラフィン包埋した組織ブロックの両方と共に使用し得る。これらの粒子状の検体から組織ブロックを調製する方法は、種々の予後因子の以前のIHC研究において首尾よく使用されてきた。そして/またはこの方法は、当業者に周知である(Brownら、1990; Abbondanzoら、1990; Allredら、1990)。

【0229】

簡潔には、凍結切片を、小さなプラスチックカプセル中のリン酸緩衝食塩水(PBS)中に室温にて、50ngの凍結「微粉碎した」組織を再水和すること；遠心分離により粒子をペレット化すること；粘性包埋媒体(OCT)中にそれらを再懸濁すること；そのカプセルを反転させ、そして/もしくは遠心分離により再びペレット化すること；-70のイソペンタン中でスナップ凍結すること；このプラスチックカプセルを切断し、そして/もしくは組織の凍結シリンダーを取り出すこと；クリオスタットマイクロームチャック上に組織シリンダーを固定すること；および/または25~50個の連続した切片に切断することにより、調製し得る。

【0230】

固定切片を、プラスチック微量遠心管中の50mgのサンプルの再水和；ペレット化すること；4時間の固定化のために10%ホルマリン中に再懸濁すること；洗浄すること/ペレット化すること；温かい2.5%寒天中に再懸濁すること；ペレット化すること；氷水中で冷却し寒天を硬化すること；管から組織/寒天ブロックを取り出すこと；パラフィン中にそのブロックを浸透することおよび/もしくは包埋すること；そして/または50個の連続した固定切片を切り出すことを含む同様の方法により調製し得る。

【0231】

(M. 遺伝子発現のアッセイ)

アッセイを、LEEおよびCEEからの発現の相対効率の決定のために本発明の範囲内で使用し得る。例えば、アッセイを使用して、動作可能に連結された遺伝子の比例する発現で、特定のプロモーター領域の欠失変異の効率を決定する。同様に、プロモーター領域のランダムな変異および部位特異的な変異を生成し得、そして動作可能に連結された遺伝子の発現における変異の効率をアッセイし得る。あるいは、種々の異なる調節因子、エンハンサーおよび外来遺伝子と共に使用する場合、アッセイを使用して、遺伝子発現を増強する際のプロモーター領域の機能を決定し得る。

#### 【0232】

遺伝子発現は、RNA、タンパク質、もしくはその両方の産生、またはRNAタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチド産生の結果を測定することによって決定され得る。遺伝子産物（RNAまたはタンパク質）は、当該分野で周知の方法によって単離および/または検出され得る。検出後、所定の細胞株または個体中で見られた結果を、形質転換されていないコントロール細胞株の統計学的に有意な参照群と比較し得る。あるいは、形質転換された細胞株中でのRNAまたはタンパク質生成物の産生を、プロモーター配列の種々の変異体に作動可能に連結された同じ遺伝子と比較し得る。このようにして、作動可能に連結された遺伝子の発現に対するそれらの効果によって、新規なプロモーター配列内の調節領域を同定することが可能である。

#### 【0233】

特定の実施形態において、その発現が所定のプロモーターまたは他の調節エレメントと天然にリンクしている遺伝子を使用することが所望される。例えば、前立腺特異的プロモーターは、前立腺組織中で通常発現される遺伝子に作動可能に連結され得る。あるいは、マーカー遺伝子は、プロモーター活性をアッセイするために使用され得る。例えば、選択マーカー遺伝子または特異的抗体を使用して、アッセイされるプロモーターに作動可能に連結されている選択マーカー遺伝子を含む構築物によって、組織培養細胞株または動物細胞に付与された抵抗性が定量的に決定され得る。あるいは、種々の組織培養細胞株または動物部分は、選択性因子に曝露され得、そしてこれらの部分に提供される相対的な抵抗性が定量さ

れ、それによってプロモーターの組織特異的発現の見積もりを提供する。

【0234】

スクリーニング可能マーカーは、所定の遺伝子の発現を定量するための別の効率的な手段を構成する。潜在的な任意のスクリーニング可能マーカーが発現され得、そしてそのマーカー遺伝子産物が定量され得、それによって、プロモーターがその遺伝子の発現を指向する効率の見積もりを提供する。定量は、視覚的手段、または例えば、光子計数デバイスのいずれかを使用して容易に実行され得る。

【0235】

本発明での使用のために好ましいスクリーニング可能なマーカー遺伝子は、  
- グルクロニダーゼ (GUS) である。GUS 活性の検出は、GUS 酵素のための基質として、GUS 活性を含む細胞の内部に青色の沈着を生じる 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルグルクロニド (X - gluc) を使用して、組織化学的に実行され得る。このアッセイは、詳細に記載されている (Jefferson, 1987)。次いで、青色の呈色は、視覚的に得点付けされ得、そして発現効率の見積もりがそれによって提供される。GUS 活性はまた、イムノプロット分析またはフルオロメトリック GUS 特異的アッセイによって決定され得る (Jefferson, 1987)。本発明で使用され得る他の好ましいスクリーニング可能なマーカー遺伝子は、LUC、LacZ、または種々の GFP を含む。

【0236】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために包含される。以下の実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するために本発明者らによって発見された技術を表すことが当業者によって認識されるべきであり、従って、その実施のための好ましい様式を構成すると見なされ得る。しかし、当業者は、本発明の開示を考慮して、多くの変更が特定の実施形態においてなされ得、これらは、開示されそしてなお、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果を得ることを理解する。

【0237】

本明細書中で開示されそして特許請求される組成物および方法のすべては、本

発明の開示を考慮して、過度の実験なしになされかつ遂行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態によって記載されてきたが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される方法の、組成物および方法、ならびに工程および工程の順序において、バリエーションが適用され得ることが当業者には明らかである。より具体的には、化学的および生理学的の両方で関連する特定の薬剤が、本明細書中に記載される薬剤で置換され得るが、同じかまたは類似の結果が達成されることが明らかである。当業者に明らかであるすべてのこのような類似の置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定されるように、本発明の精神、範囲および概念の中にあると見なされる。

【0238】

【表3】

### 参考文献

以下の参考文献は、本明細書中で示される例示的な手順または他の詳細を、それらの補足で提供する限り、参考として本明細書中で特に援用される。

- Abbondanzo *et al.*, *Am J Clin Pathol.* 93(5):698-702, 1990.
- Abbondanzo *et al.*, *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 12(4):480-9, 1990.
- Abdullah *et al.*, *Biotechnology*, 4:1087, 1986.
- Abel *et al.*, *Science*, 232:738-743, 1986.
- Allred *et al.*, *Arch Surg.* 125(1):107-13, 1990.
- Andersson *et al.*, "Cloning structure and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, A bile acid biosynthetic enzyme," *J. Biol. Chem.*, 264:8222-8229, 1989.
- Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
- Barkai-Golan *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 116:119-124, 1978.
- Barry *et al.*, "Production of monoclonal antibodies by genetic immunization," *Biotech.*, 16:616-620, 1994.
- Barry *et al.*, "Protection against mycoplasma infection using expression library immunization," *Nature*, 377:632-635, 1995.
- Bates, "Genetic transformation of plants by protoplast electroporation," *Mol Biotechnol.*, 2(2):135-145, 1994.
- Battraw and Hall, "Stable transformation of sorghum-bicolor protoplasts with chimeric neomycin phosphotransferase II and beta glucuronidase genes," *Theor. App. Genet.*, 82(2):161-168, 1991.
- Becker *et al.*, "Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue," *Plant J.*, 5(2):299-307, 1994.
- Berberian *et al.*, *Science*, 261:1588-1591, 1993.
- Bernal-Lugo and Leopold, *Plant Physiol.*, 98:1207-1210, 1992.
- Berzal-Herranz *et al.*, *Genes and Devel.*, 6:129-134, 1992.
- Bhattacharjee; An; Gupta, *J. Plant Bioch. and Biotech.* 6, (2):69-73. 1997.

## (表3の続き)

- Bhattacharjee; An; Gupta, *J. Plant Bioch. and Biotech.* 6, (2):69-73, 1997.
- Blackman *et al.*, *Plant Physiol.*, 100:225-230, 1992.
- Bol *et al.*, *Annu. Rev. Phytopath.*, 28:113-138, 1990.
- Bower *et al.*, *The Plant Journal*, 2:409-416, 1992.
- Bowler *et al.*, *Ann Rev. Plant Physiol.*, 43:83-116, 1992.
- Branson and Guss, *Proceedings North Central Branch Entomological Society of America*, 27:91-95, 1972.
- Broekaert *et al.*, *Science*, 245:1100-1102, 1989.
- Brown *et al.*, *J Immunol Methods*. 12;130(1):111-121, 1990.
- Buising and Benbow, "Molecular analysis of transgenic plants generated by microprojectile bombardment: effect of petunia transformation booster sequence," *Mol. Gen. Genet.*, 243:71-81, 1994.
- Buttrick *et al.*, "Behavior of genes directly injected into the rat heart *in vivo*," *Circulation Res.* 70:193-198, 1992.
- Callis *et al.*, *Genes Dev.*, 1:1183-1200, 1987.
- Campbell (ed.), *In: Avermectin and Abamectin*, 1989.
- Casas *et al.*, "Transgenic sorghum plants *via* microprojectile bombardment," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(23):11212-11216, 1993.
- Cech *et al.*, *Cell*, 27:487-496, 1981.
- Chen and Okayama, "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA," *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752, 1987.
- Chowrira *et al.*, "Four ribose 2'-hydroxyl groups essential for catalytic function of the hairpin ribozyme." *J Biol Chem.*, 268:19458-19462, 1993.
- Chowrira *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:25856-25864, 1994.
- Christou *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U S A*, 84(12):3962-3966, 1987.
- Cleary *et al.*, *Trends Microbiol.*, 4:131-136, 1994.
- Cotten *et al.*, "High efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using the endosome disruption activity of defective or inactivated adenovirus particles," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6094-6098, 1992.
- Coxson *et al.*, *Biotropica*, 24:121-133, 1992.

## (表3の続き)

- Cuozzo *et al.*, *Bio/Technology*, 6:549-553, 1988.
- Curiel, "Gene transfer mediated by adenovirus-polylysine DNA complexes," *In: Viruses in Human Gene Therapy*, J.-M.H. Vos (Ed.), Carolina Academic Press, Durham, NC, pp 179-212, 1994.
- Cutler *et al.*, *J. Plant Physiol.*, 135:351-354, 1989.
- Czapla and Lang, *J. Econ. Entomol.*, 83:2480-2485, 1990.
- Davies *et al.*, *Plant Physiol.*, 93:588-595, 1990.
- De Jager R. *et al.*, "Current status of cancer immunodetection with radiolabeled human monoclonal antibodies" *Semin Nucl Med* 23(2):165-179, 1993.
- Dellaporta *et al.*, *In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium*, 11:263-282, 1988.
- Depicker *et al.*, *Plant Cell Reports*, 7:63-66, 1988.
- D'Halluin *et al.*, "Transgenic maize plants by tissue electroporation," *Plant Cell*, 4(12):1495-1505, 1992.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Doolittle MH and Ben-Zeev O, "Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques" *Methods Mol Biol.*, 109:215-237, 1999.
- Dure *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 12:475-486, 1989.
- Erdmann *et al.*, *Mol. Jour. Gen. Micro.*, 138:363-368, 1992.
- Fechheimer *et al.*, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8463-8467, 1987.
- Fisher *et al.*, "Isolation and characterization of the human tissue-type plasminogen activator structural gene including the 5' flanking region," *J. Biol. Chem.*, 260:112223-11230, 1985.
- Fitzpatrick, *Gen. Engineering News*, 22:7, 1993.
- Forster and Symons, *Cell*, 49:211-220, 1987.
- Fraley and Fornari Kaplan, "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: potential for gene transfer," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 76:3348-3352, 1979.

## (表3の続き)

- Fromm *et al.*, "Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation," *Nature*, 319:791-793, 1986
- Fromm *et al.*, *Nature*, 312:791-793, 1986.
- Gatehouse *et al.*, *J. Sci. Food. Agric.*, 35:373-380, 1984.
- Gerlach *et al.*, *Nature* 328:802-805, 1987.
- Ghosh and Bachhawat, "Targeting of liposomes to hepatocytes," *In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu and Wu (Eds.), Marcel Dekker, New York, pp 87-104, 1991.
- Ghosh-Biswas *et al.*, "Transgenic Indica rice (*Oryza sativa L.*) plants obtained by direct gene transfer to protoplasts," *J. Biotechnol.*, 32(1):1-10, 1994.
- Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures," *Mol. Cell. Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Goring *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88:1770-1774, 1991.
- Graham and Van Der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Guerrero *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 15:11-26, 1990.
- Gulbis B and Galand P, "Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review" *Hum Pathol* 24(12):1271-1285, 1993.
- Gupta *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:1629-1633, 1993.
- Hagio *et al.*, "Stable transformation of sorghum cell cultures after bombardment with DNA coated microprojectiles," *Plant Cell Rep.*, 10(5):260-264, 1991.
- Hammock *et al.*, *Nature*, 344:458-461, 1990.
- Harland and Weintraub, "Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA," *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Harlow and Lane, *In: Antibodies: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Haseloff and Gerlach, *Nature*, 334:585-591, 1988.
- He *et al.*, *Plant Cell Reports*, 14 (2-3):192-196, 1994.
- Hemenway *et al.*, *The EMBO J.*, 7:1273-1280, 1988.

## (表 3 の 添 加)

- Hensgens *et al.*, "Transient and stable expression of gusA fusions with rice genes in rice, barley and perennial ryegrass," *Plant Mol. Biol.*, 22(6):1101-1127, 1993.
- Hiei *et al.*, "Transformation of rice mediated by agrobacterium tumefaciens," *Plant Mol. Biol.*, 35(1-2):205-218, 1997.
- Hilder *et al.*, *Nature*, 330:160-163, 1987.
- Hou and Lin, *Plant Physiology*, 111:166, 1996.
- Ikeda *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169:5615-5621, 1987.
- Ishida *et al.*, "High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*," *Nat Biotechnol.*, 14:745-50, 1996.
- Joyce, *Nature*, 338:217-244, 1989.
- Kaasen *et al.*, *J. Bacteriology*, 174:889-898, 1992.
- Kaeppler *et al.*, "Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells," *Theor. Appl. Genet.*, 84(5-6):560-566, 1992.
- Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, "Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver," *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kang *et al.*, *Science*, 240:1034-1036, 1988.
- Karsten *et al.*, *Botanica Marina*, 35:11-19, 1992.
- Kato *et al.*, "Expression of hepatitis  $\beta$  virus surface antigen in adult rat liver," *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, "Long-term episomal gene delivery in human lymphoid cells using human and avian adenoviral-assisted transfection," *Biotechniques*, 17(6):1110-1117, 1994.
- Khatoun *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- Kim and Cech, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Klee *et al.*, *Bio-Technology*, 3(7):637-642, 1985.
- Knittel *et al.*, *Plant Cell Reports*, 14(2-3):81-86, 1994.
- Kohler *et al.*, *Methods Enzymol.*, 178:3, 1989.
- Koster and Leopold, *Plant Physiol.*, 88:829-832, 1988.

## (表 39 年 五)

- Kreier *et al.*, *Infection, Resistance and Immunity*, Harper & Row, New York, (1991)).
- Laqueyrierie *et al.*, "Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex," *Infection and Immunity*, 63:4003-4010, 1995.
- Lazzeri, "Stable transformation of barley *via* direct DNA uptake. Electroporation- and PEG- mediated protoplast transformation," *Methods Mol. Biol.*, 49:95-106, 1995.
- Lee and Saier, *J. of Bacteriol.*, 153-685, 1983.
- Lee *et al.*, *Korean J. Genet.*, 11(2):65-72, 1989.
- Lenert *et al.*, *Science*, 248:1639-1643, 1990.
- Levings, *Science*, 250:942-947, 1990.
- Lieber and Strauss, *Mol. Cell. Biol.*, 15: 540-551, 1995.
- Long *et al.*, "Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant," *Biochemistry*, 23:4828-4837, 1984.
- Loomis *et al.*, *J. Expt. Zoology*, 252:9-15, 1989.
- Lorz *et al.*, *Mol Gen Genet*, 199:178-182, 1985.
- Maas *et al.*, "Preparation and transformation of monocot protoplasts," *Methods Cell Biol.*, 50:383-399, 1995.
- Marcotte *et al.*, *Nature*, 335:454, 1988.
- Mariani *et al.*, *Nature*, 347:737-741, 1990.
- McCabe and Martinell, *Bio-Technology*, 11(5):596-598, 1993.
- McCormac *et al.*, *Euphytica*, v. 99 (1) p. 17-25 :. 1998.
- Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990.
- Mundy and Chua, *The EMBO J.*, 7:2279-2286, 1988.
- Murdock *et al.*, *Phytochemistry*, 29:85-89, 1990.
- Nagatani *et al.*, "DNA delivery into rice cells and transformation using silicon carbide whiskers," *Biotech. Tech.*, 11(7):471-473, 1997.
- Nakamura *et al.*, 1987.
- Napoli *et al.*, *Plant Cell*, 2:279-289, 1990.

(表 3 9 续 1)

- Nicolau and Sene, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells: dependence of the transfer efficiency upon the type of liposomes used and the host cell cycle stage," *Biochem. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, "Liposomes as carriers for *in vivo* gene transfer and expression," *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nisson *et al.*, "Rapid and efficient cloning of Alu-PCR products using uracil DNA glycosylase," *PCR® Methods and Applications*, 1:120-123, 1991.
- Omirulleh *et al.*, "Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize." *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens & Haley, *J. Biol. Chem.*, 259:14843-14848, 1987.
- Palukaitis *et al.*, *Virology*, 99:145-151, 1979.
- PCT 出願 WO 92/17598
- PCT 出願 WO 94/09699
- PCT 出願 WO 95/06128
- Perales *et al.*, "Gene transfer *in vivo*: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perlak *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88:3324-3328, 1991.
- Perriman *et al.*, *Gene*, 113:157-163, 1992.
- Phi-Van *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:2302-2307, 1990.
- Piatkowski *et al.*, *Plant Physiol.*, 94:1682-1688, 1990.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Potter & Haley, *Meth. in Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Potter *et al.*, "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Prody *et al.*, *Science*, 231:1577-1580, 1986.
- Reed *et al.*, *J. Gen. Microbiology*, 130:1-4, 1984.

## (表3の続き)

- Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992.
- Rensburg *et al.*, *J. Plant Physiol.*, 141:188-194, 1993.
- Rhodes *et al.*, "Transformation of maize by electroporation of embryos," *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131, 1995.
- Rippe *et al.*, "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Ritala *et al.*, "Fertile transgenic barley to particle bombardment of immature embryos," *Plant Mol. Biol.*, 24(2):317-325, 1994.
- Rogers *et al.*, *Methods Enzymol.*, 153:253-277, 1987.
- Sambrook *et al.*, *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Ch. 7, 7.19-7.29, 1989.
- Sanford *et al.*, "An improved, helium-driven biolistic device," *Technique J. Methods Cell Molec. Biol.*, 3:3-16, 1991.
- Sasso *et al.*, *J. Immunol.*, 142:2778-2783, 1989.
- Sato *et al.*, "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization," *Science*, 273:352-354, 1996.
- Shagan and Bar-Zvi, *Plant Physiol.*, 101:1397-1398, 1993.
- Shapiro, *In: Mobile Genetic Elements*, 1983.
- Shimoni *et al.*, "A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat," *J. Biol. Chem.*, 272:15488-15495, 1997.
- Shorki *et al.*, *J. Immunol.*, 146:936-940, 1991.
- Silvermann *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 96:417-426, 1995.
- Singsit *et al.*, "Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer," *Transgenic Res.*, 6:169-76, 1997.
- Smith *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 224:447-481, 1990.
- Stemmer *et al.*, *Gene*, 164:49-53, 1995.
- Stougaard, *The Plant Journal*, 3:755-761, 1993.

## (表3の続き)

- Takumi and Shimada, "Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues," *Genes Genet. Sys.*, 72:63-69, 1997.
- Tang *et al.*, "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response," *Nature*, 356:152-154, 1992.
- Tarczynski *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:1-5, 1992.
- Tarczynski *et al.*, *Science*, 259:508-510, 1993.
- Thillet *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:12500-12508, 1988.
- Thompson *et al.*, "Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers: A review," *Euphytica*, 85(1-3):75-80, 1995.
- Thompson *et al.*, *Euphytica*, 85(1-3):75-80, 1995.
- Tingay *et al.*, *The Plant Journal* v. 11 (6) p. 1369-1376. 1997.
- Tomes *et al.*, "Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves," *Plant Mol. Biol.*, 14:261-8, 1990
- Torbet *et al.*, "Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures," *Crop Science*, 38:226-231, 1998.
- Torbet *et al.*, "Use of paromomycin as a selective agent for oat transformation," *Plant Cell Reports*, 14:635-640, 1995.
- Toriyama *et al.*, *Theor Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- Tsukada *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 30(4)599-604, 1989.
- Tur-Kaspa *et al.*, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- 米国特許第 5,354,855 号
- 米国特許第 3,817,837 号
- 米国特許第 3,850,752 号
- 米国特許第 3,939,350 号
- 米国特許第 3,996,345 号
- 米国特許第 4,275,149 号
- 米国特許第 4,277,437 号
- 米国特許第 4,366,241 号

(表 39 年表 1)

米国特許第 4,472,509 号  
米国特許第 4,938,948 号  
米国特許第 5,021,236 号  
米国特許第 5,168,053 号  
米国特許第 5,196,066 号  
米国特許第 5,268,526 号  
米国特許第 5,302,523 号  
米国特許第 5,322,783 号  
米国特許第 5,384,253 号  
米国特許第 5,464,765 号  
米国特許第 5,500,365 号  
米国特許第 5,508,184 号  
米国特許第 5,538,877 号  
米国特許第 5,538,880 号  
米国特許第 5,550,318 号  
米国特許第 5,563,055 号  
米国特許第 5,591,616 号  
米国特許第 5,610,042 号  
米国特許第 5,624,824 号  
米国特許第 5,625,047 号  
米国特許第 5,689,052 号  
米国特許第 5,780,709 号  
米国特許第 6,040,497 号

Uchimiya *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.

Van der Krol *et al.*, *Plant Cell*, 2:291-99, 1990.

Van Eck *et al.*, *Plant Cell Reports*, 14(5):299-304, 1995.

Vasil *et al.*, *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.

Vernon and Bohnert, *The EMBO J.*, 11:2077-2085, 1992.

(表3の続き)

- Wagner *et al.*, *Science*, 260:1510-1513, 1990.
- Watrud *et al.*, In: *Engineered Organisms and the Environment*, 1985.
- Williams, Johnston, Riedy, DeVitt, McElligott, Sanford, "Direct transformation of skin and liver tissue in the living mouse," *Proc. Natl. Acad., USA*, 88:2726-2730, 1991.
- Wolff *et al.*, "Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*," *Science*, 246:1464-1468, 1990.
- Wolter *et al.*, *The EMBO J.*, 4685-4692, 1992.
- Wong *et al.*, "Appearance of  $\beta$ -lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer," *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, "Receptor-mediated *in vitro* gene transfections by a soluble DNA carrier system," *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Xiang and Guerra, *Plant Physiol.*, 102:287-293, 1993.
- Xie *et al.*, "Study of Mechanisms of Electric Field-Induced DNA Transfection V. Effects of DNA Topology on Surface Binding, Cell Uptake, Expression, and Integration into Host Chromosomes of DNA in the Mammalian Cell," *Biophysical Journal*, 65:1684-1689, 1993.
- Xu *et al.*, *Plant Physiol.*, 110:249-257, 1996.
- Yamada *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 4:85, 1986.
- Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 33:217-224, 1992.
- Yuan and Altman, *Science*, 263:1269-1273, 1994.
- Yuan *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:8006-8010, 1992.
- Zhang *et al.*, "Agrobacterium-mediated transformation of elite indica and japonica rice cultivars," *Mol. Biotechnol.*, 8(3):223-231, 1997.
- Zheng and Edwards, "Expression of resistance to barley stripe mosaic virus in barley and oat protoplasts," *J. Gen. Virol.*, 71:1865-1868, 1990.
- Zhou *et al.*, *Plant Cell Reports*, 12(11):612-616, 1993.

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書中に示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、1以上のこれらの図面を参照することによって、より良好に理解され得る。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> SYKES, KATHRYN F.  
 JOHNSTON, STEPHEN A.

<120> LINEAR AND CIRCULAR EXPRESSION ELEMENTS

<130> UTSD:557P

<140> UNKOWN  
 <141> 2000-03-24

<150> 60/127,222  
 <151> 1999-03-31

<150> 60/125,864  
 <151> 1999-03-24

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
 <211> 15  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 1  
 acuacuacua cuacu 15

<210> 2  
 <211> 15  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 2  
 aguaguagua guagu 15

<210> 3  
 <211> 14  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 3  
 augaugauga ugau 14

```

<210> 4
<211> 15
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        Primer

<400> 4
acuacuacua cuacu                                15

<210> 5
<211> 14
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        Primer

<400> 5
aucaucauca ucac                                14

```

## 【図面の簡単な説明】

### 【図 1】

マウスにおける、PCR（登録商標）で増幅したルシフェラーゼ遺伝子の送達および発現。耳を、空のプラスミドである pCMVi (0.33 μg)、ルシフェラーゼプラスミドである pCMViLUC (0.33 μg)、またはルシフェラーゼをコードするモル当量の PCR（登録商標）産物 (0.17 μg) でボンバードした。c.LEE.LUC = マイクロプロジェクトイルに直接ロードされた粗産物； f.p.LEE.LUC = フィルター精製産物； g.p.LEE.LUC アガロースゲル精製産物； no Taq = Taqポリメラーゼなしで調製されたフィルター精製サンプル。活性を、耳に導入された 1.0 g プラスミドまたは 0.5 μg PCR（登録商標）産物あたりのルーメン × 10<sup>6</sup> としてプロットする。ルーメンを、4 以上のボンバードされた耳から測定し、次いで平均化する。標準誤差を規定する。

### 【図 2】

別々の遺伝子成分から LEE を構築するための方法を示す図。

### 【図 3】

非共有結合したプロモーターおよび ORF は、レポーター活性を生じる。耳を、示された DNA（いくつかの略語を、図 1 に記載している）でボンバードした

。no UDG = UDG前処置なしに送達されるUDG感受性産物；no dU = 標準的なプライマーで増幅されたプロモーターおよびLUC産物；CMVi = プロモーター産物のみ；LUC = レポーター産物のみ（導入した発現エレメントのトポロジーを、図3の下に示す）；Pr = プロモーター；ORF = オープンリーディングフレーム、X = 産物なし。活性を、図1に記載のように報告する。

#### 【図4】

3分子LEEは、ルシフェラーゼ遺伝子活性をインビボで効率的に生成する。bi - LEE . LUC ( - T ) = プロモーターおよびLUCを保有し、ターミネーターを含まない、2つの連結したPCR（登録商標）産物；tri - LEE . LUC = プロモーター、ORF、およびターミネーターを保有する、3つの連結したPCR（登録商標）産物。いくつかの略語を、図3に記載する。導入した発現エレメントのトポロジーを、図4の下に示す。ORF ( - T ) = ターミネーターを含まないLUC ORF；T = ターミネーター。活性を、図1に記載されるように報告する。

#### 【図5】

AATをコードする2分子LEEの導入は、マウスにおいて、この試験抗原をコードするプロモーターから生じた力価に匹敵する力価で、特異的な抗体を生成する。マウスを、1  $\mu$ gのpCMVi、1  $\mu$ g pCMViAAT、または0.5  $\mu$ g bi - LEE . AATのいずれかで微粒子銃によって免疫した。血清を回収して、そして1 : 1000希釈にてELISAで試験した。導入されたDNAのトポロジーを、以下のグラフに示す。個体および群の平均を、標準誤差とともにプロットする。

#### 【図6】

組織培養物におけるプラスミドによりコードされる遺伝子の発現と比較した、LEEにコードされる遺伝子の発現。プラスミドpCMViは、空のベクターであり、pCMViLUCは、ルシフェラーゼ(LUC)をコードする標準的なプラスミドであり、そしてLEE . LUC DNAは、線状発現エレメントである。

#### 【図7A】

LEEは、微粒子銃により、針注入によって、および脂質に媒介される取り込みによって、動物に送達され得る。bi-LEE・LUCの遺伝子銃送達は、共有結合していても、共有結合していなくとも、同様の遺伝子発現を引き起こす。

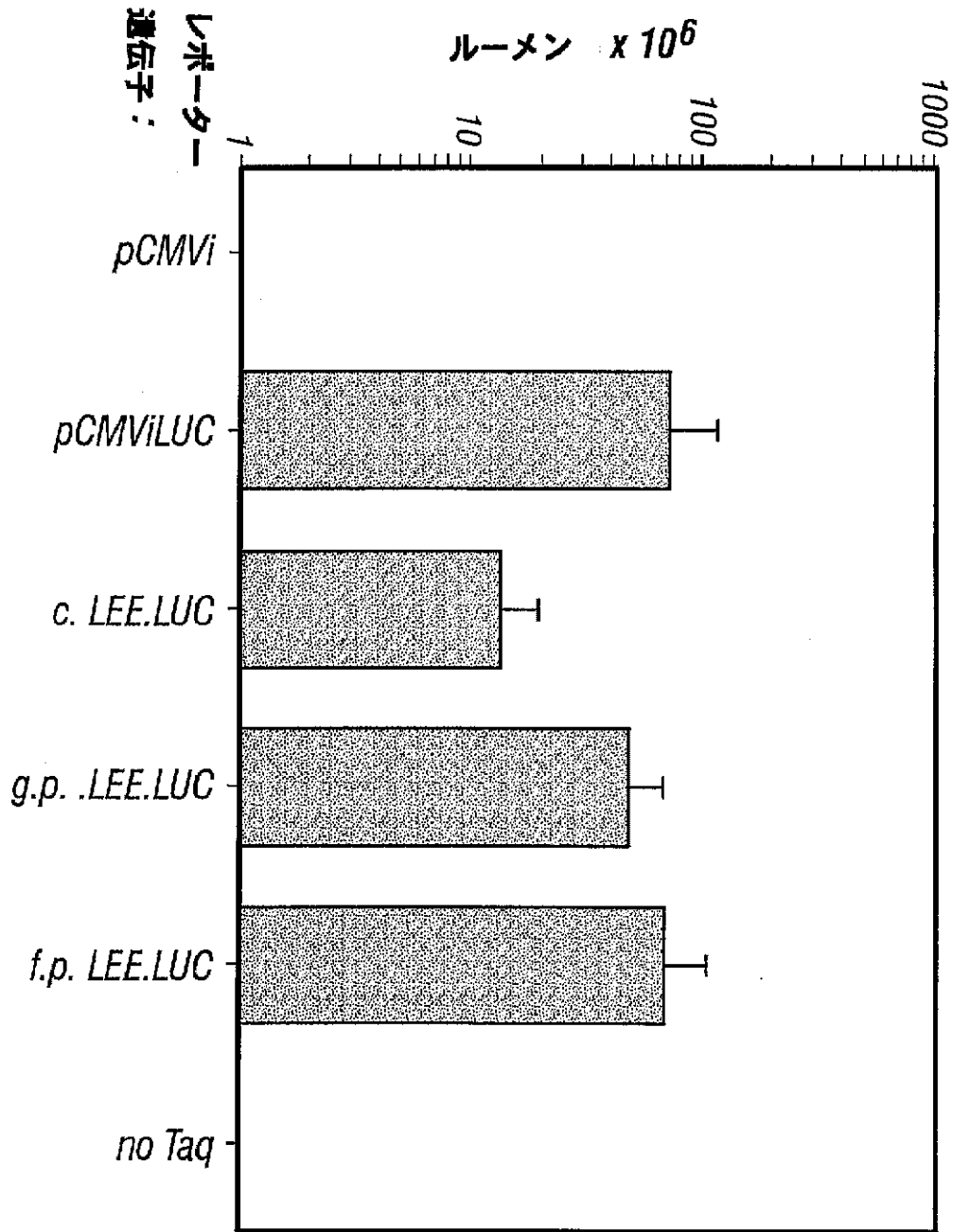
【図7B】

LEEは、微粒子銃により、針注入によって、および脂質に媒介される取り込みによって、動物に送達され得る。LEEの針での送達は、インビトロ連結によって改善され得る。耳( $\times 10^6$ )と筋肉( $\times 10^4$ )サンプルとの間の読み出しのX軸スケールにおける100倍の差異に留意すること。活性を、図1と同様に報告する。-lig = アニールしているが、インビトロで連結していない。+lig = インビボ導入の前に、リガーゼで30分間処理している。

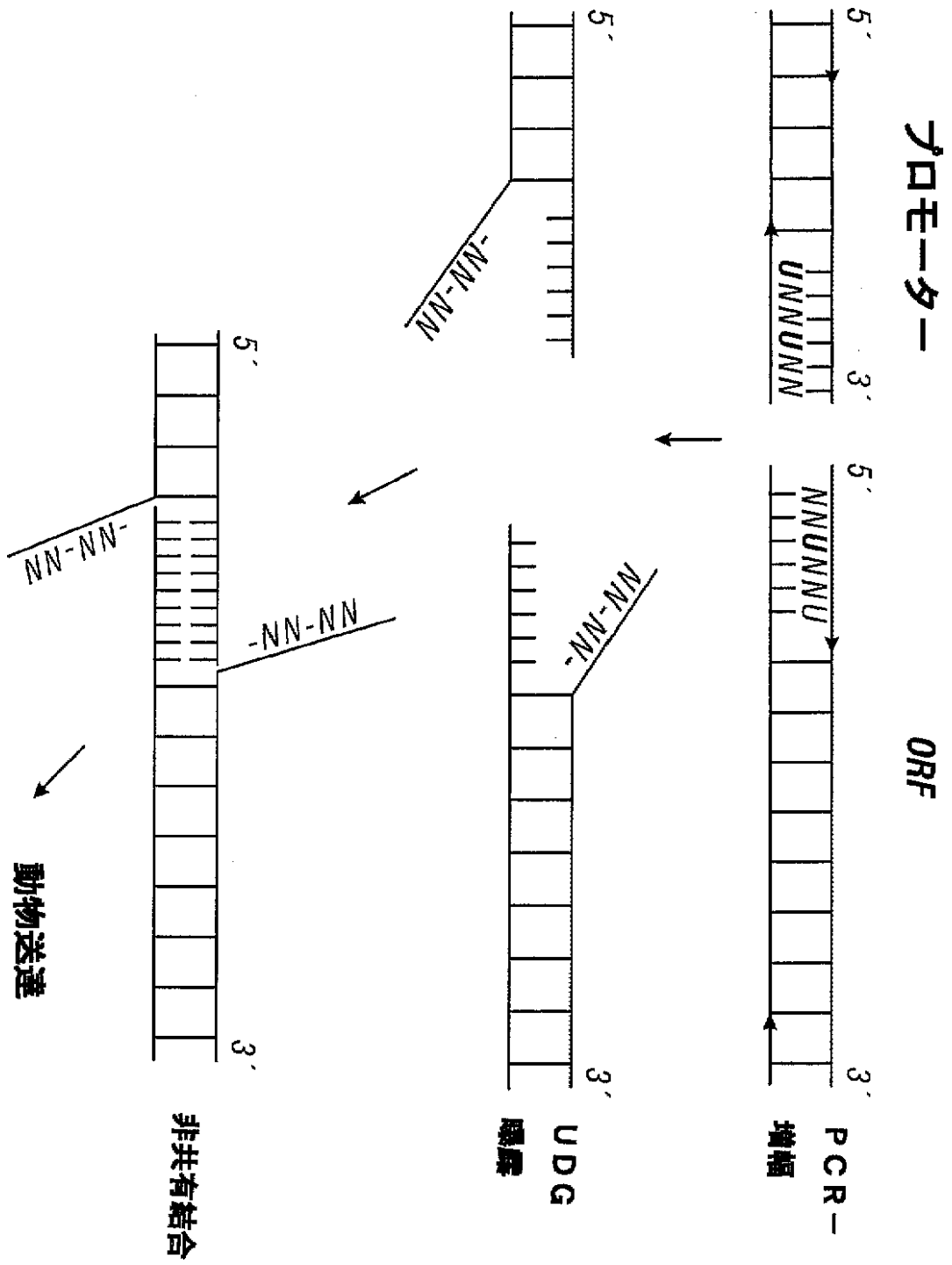
【図7C】

LEEは、微粒子銃により、針注入によって、および脂質に媒介される取り込みによって、動物に送達され得る。WEH1組織培養細胞へのbi-LEE・LUCのリポソーム送達は、LUCをコードするプラスミドpCMV・LUCの送達よりも高いレベルのルシフェラーゼ活性を生じる。この実験を、トランスフェクション(Superfect, Qiagen)の18時間後に、二連において測定されるルーメン測定器で、3回行った。

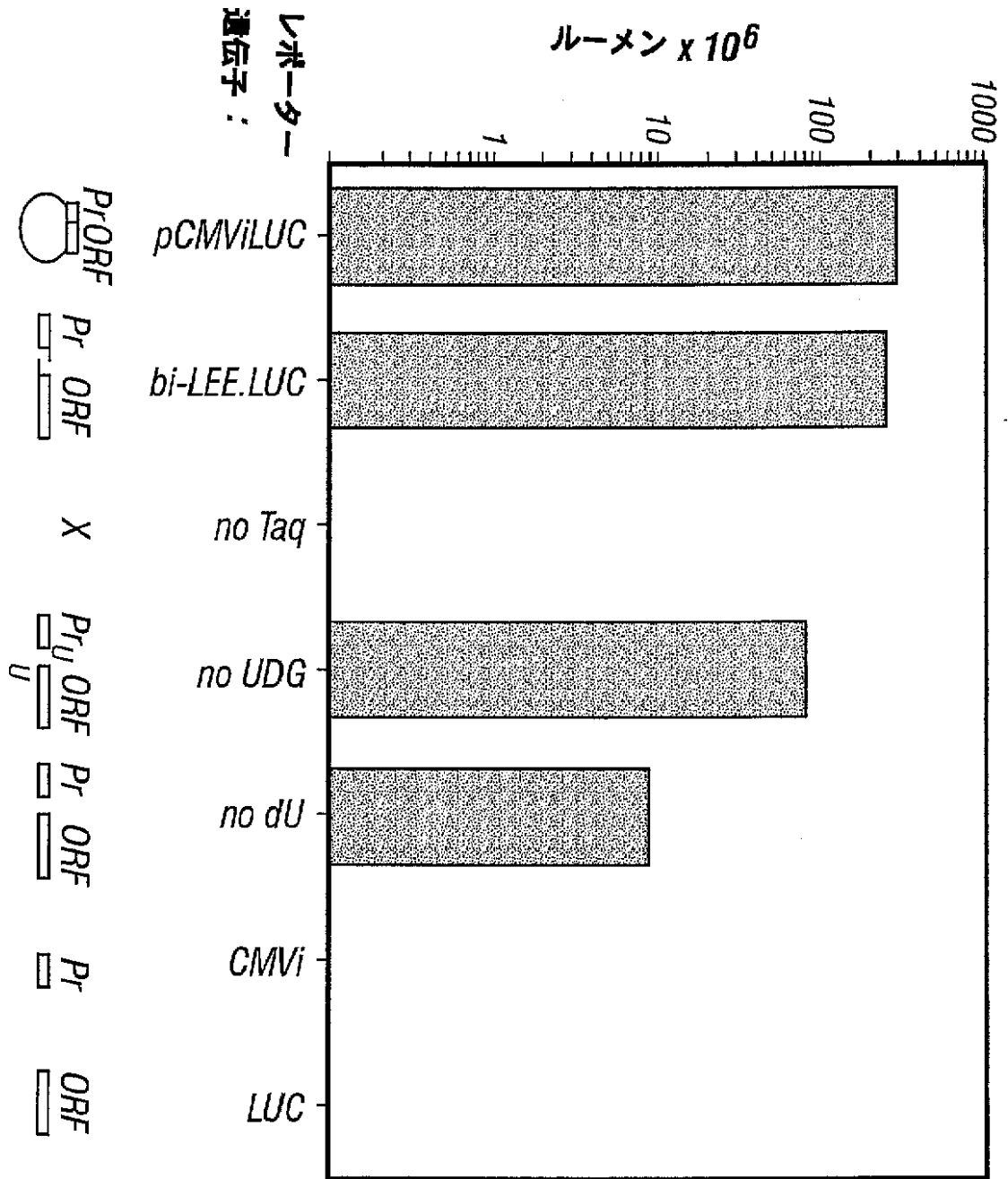
【図1】



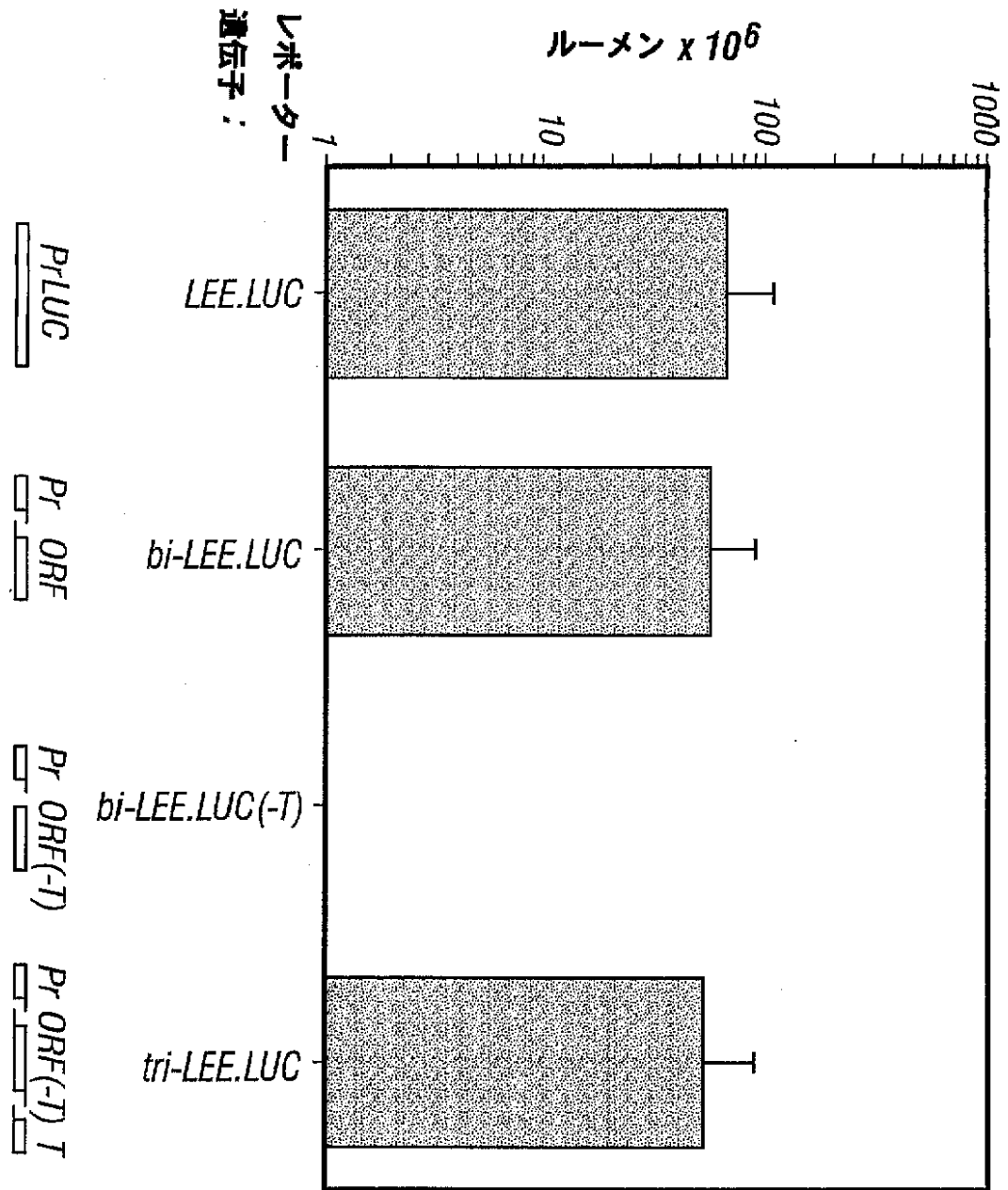
【図2】



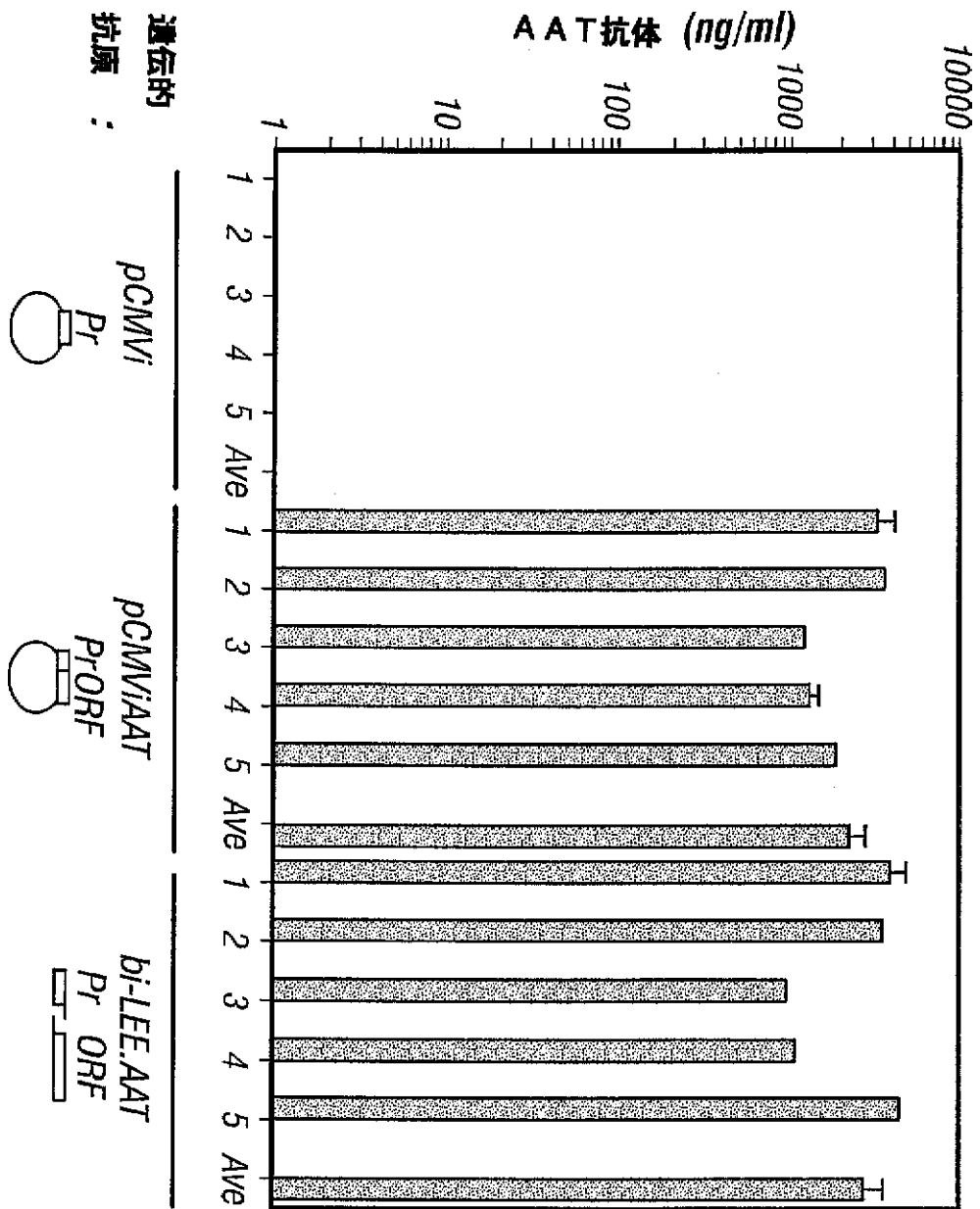
【図3】



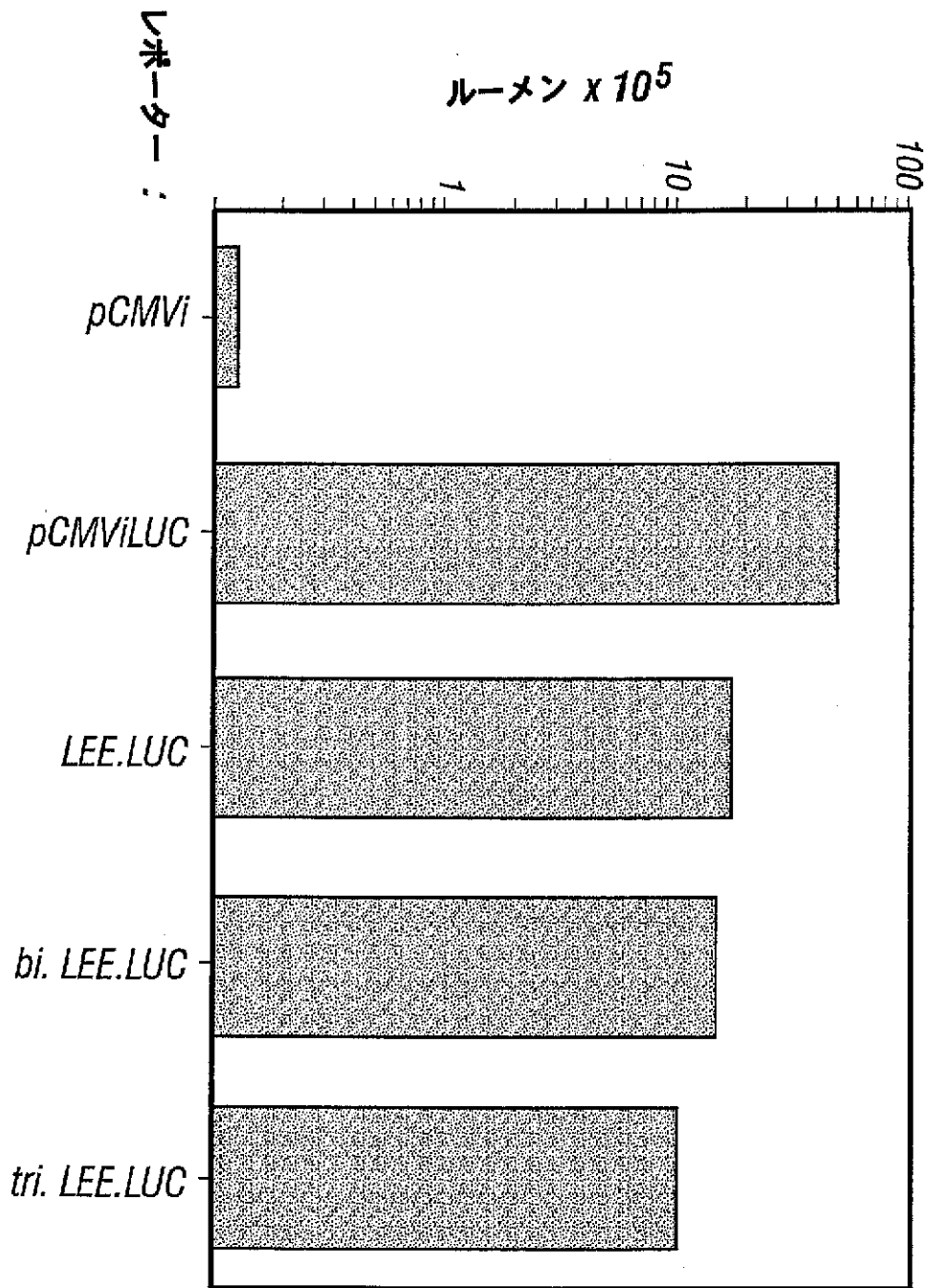
【図4】



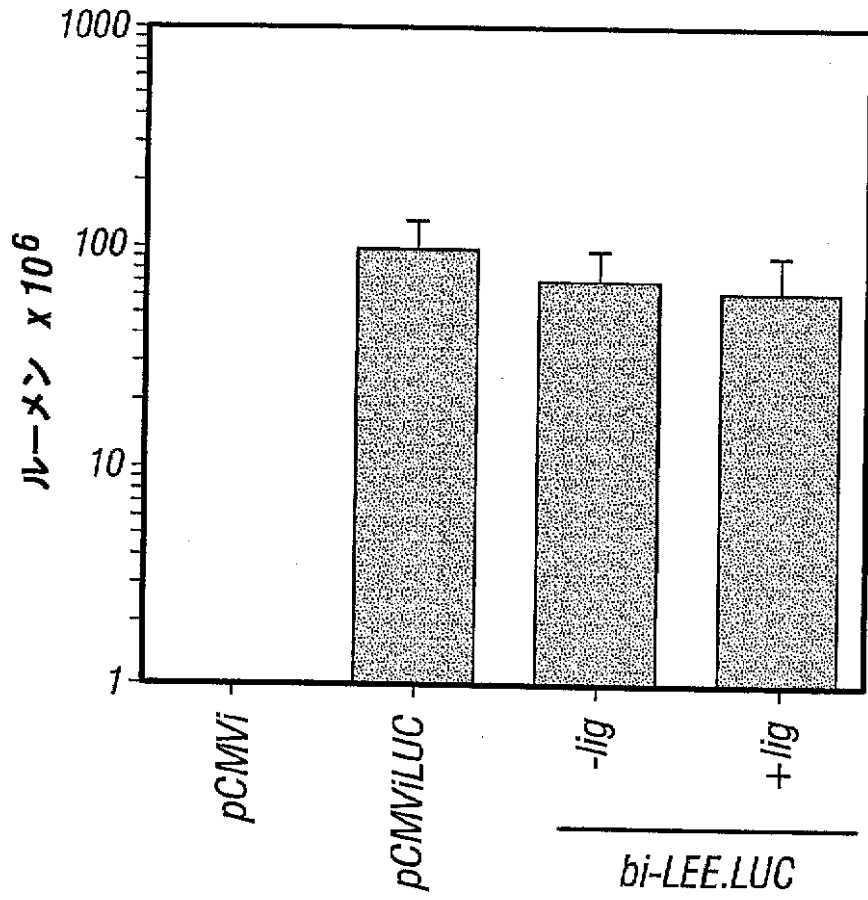
【图 5】



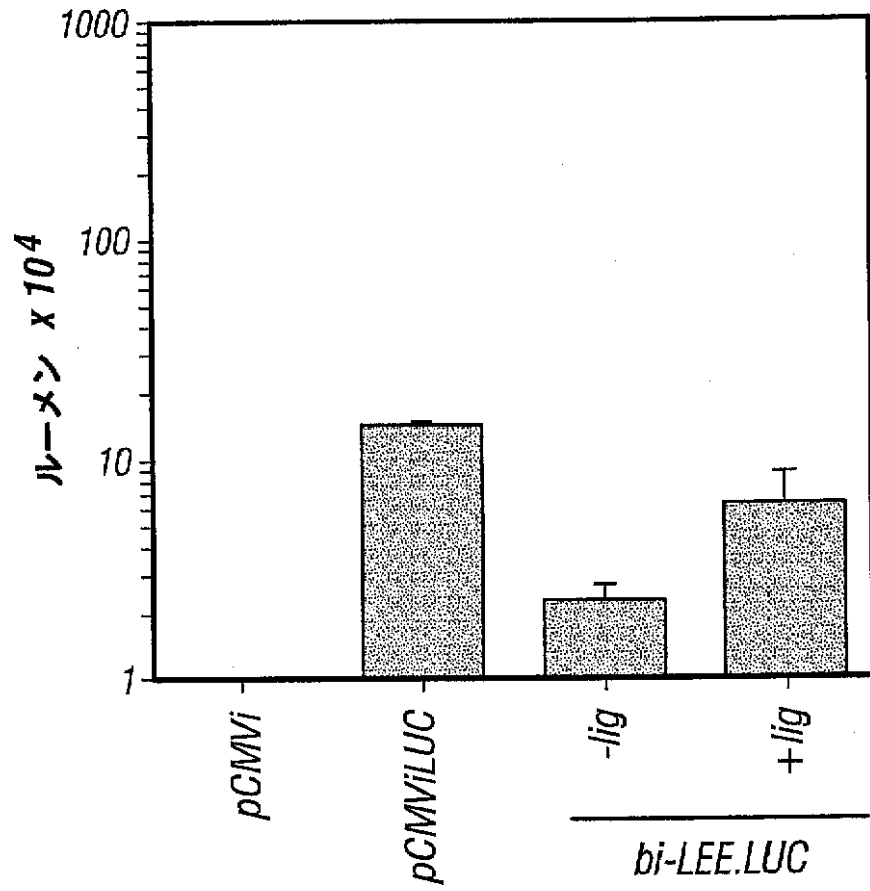
【図6】



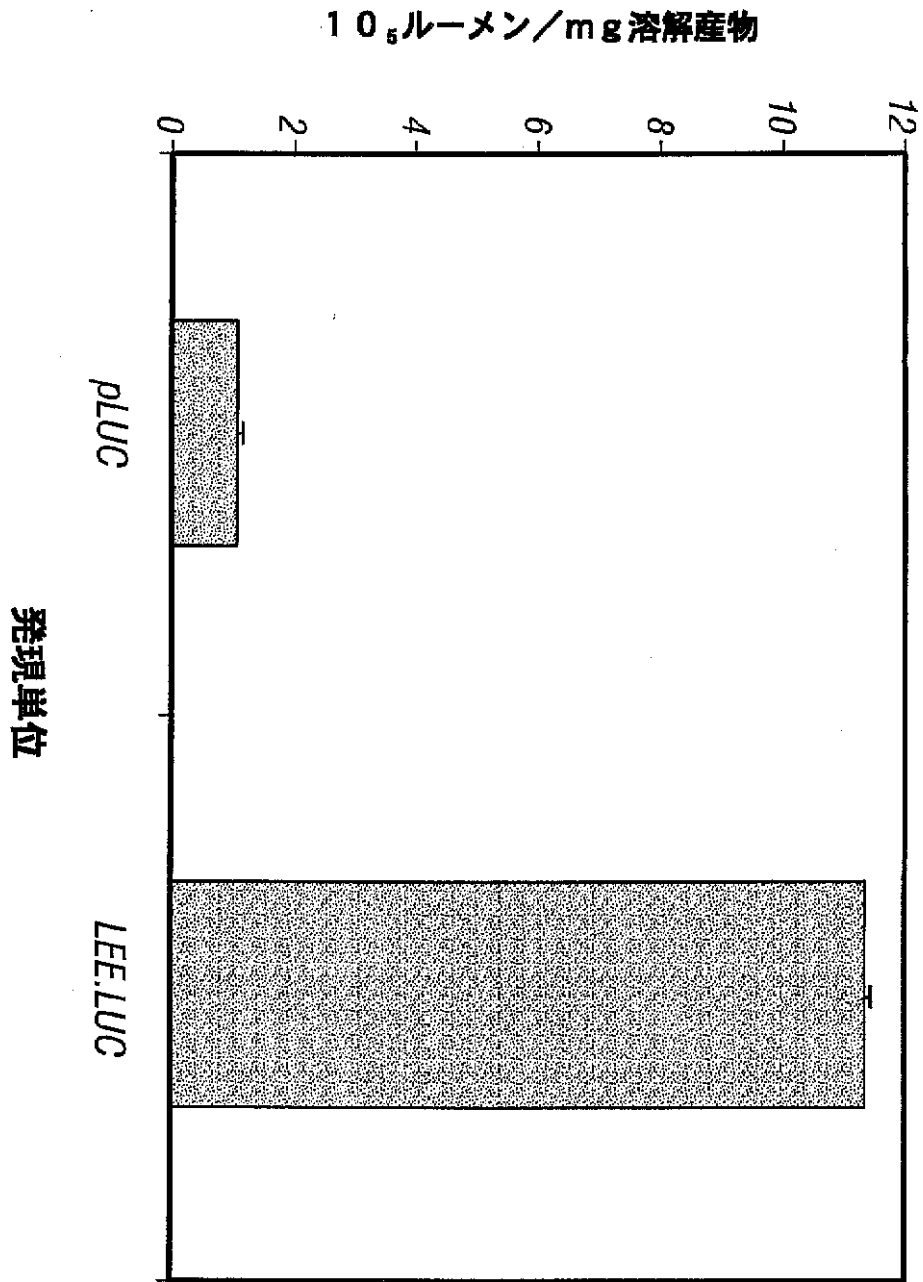
【図7A】



【図7B】



【図7C】



## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Internat. Application No. PCT/US 00/07979
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/79 C12N15/63 C12N15/64 G01N33/50 G01N33/52 G01N33/53 C12N15/82		
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 C12N 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) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AYOUB RASHTCHIAN ET AL: "URACIL DNA GLYCOSYLASE-MEDIATED CLONING OF POLYMERASE CHAIN REACTION-AMPLIFIED DNA: APPLICATION TO GENOMIC AND cDNA CLONING" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, US, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 206, no. 1, 1 October 1992 (1992-10-01), pages 91-97, XP000311343 ISSN: 0003-2697	1,2,4-6, 8,20-24, 27-29, 31, 34-36, 93-100, 103-110
Y	the whole document	62-83, 86-92
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> 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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October 2000		Date of mailing of the international search report 11. 10. 00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Holtorf, S

8

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/07979
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAIN K C ET AL: "UNIVERSAL PROMOTER FOR GENE EXPRESSION WITHOUT CLONING EXPRESSION-PCR" BIOTECHNIQUES, vol. 10, no. 3, 1991, pages 366-368, 370, 372, 374, XP000938371 ISSN: 0736-6205	1,6,14, 15
Y	the whole document	62-83, 86-92
	---	
X	SWITZER WM. ET AL.: "Rapid screening of open reading frames by protein synthesis with an in vitro transcription and translation assay." BIOTECHNIQUES, 1995 FEB;18(2):244-8, XP002146008 the whole document	1,6,14, 15
	---	
X	CASSATA G. ET AL.: "Rapid expression screening of Caenorhabditis elegans homeobox open reading frames using a two-step polymerase chain reaction promoter-gfp reporter construction technique." GENE 1998 MAY 28;212(1):127-35, XP002146009 the whole document	41,42, 45-52
	---	
A	NISSON PE. ET AL.: "Rapid and efficient cloning of Alu-PCR products using uracil DNA glycosylase." PCR METHODS APPL 1991 NOV;1(2):120-3, XP000912209 cited in the application	
	---	
A	JOHNSTON STEPHEN ALBERT ET AL: "Genetic to genomic vaccination." VACCINE, vol. 15, no. 8, 1997, pages 808-809, XP002146012 ISSN: 0264-410X	
	---	
P,X	SYKES KF. ET AL.: "Linear expression elements: a rapid, in vivo, method to screen for gene functions [see comments]" NAT BIOTECHNOL 1999 APR;17(4):355-9, XP002146013  the whole document	1-6,8, 10,11, 13,15, 20-34, 36,37, 39, 62-72, 74-83, 87-112
	---	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/07979

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FELGNER, P.L. AND LIANG, X.: "debugging expression screening" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 17, April 1999 (1999-04), pages 329-330, XP002146014  the whole document -----	1-6,8, 10,11, 13,15, 20-34, 36,37, 39, 62-72, 74-83, 87-112

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US 00/07979
**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 72, 74-86 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ジョンストン, ステファン エイ.  
 アメリカ合衆国 テキサス 75229, ダラス,  
 レ ジャルダン 10519

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA31 CA04 FA02  
 FA07 GA12 HA17  
 4B063 QA01 QA08 QA13 QQ43 QQ49  
 QQ79 QR32 QR48 QR62 QS25  
 QX02

專利名称(译)	線性和圓形表达元素		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002540772A</a>	公开(公告)日	2002-12-03
申請号	JP2000606760	申請日	2000-03-24
申請(專利权)人(译)	校董局，得克萨斯大学体系		
[标]发明人	サイケスキヤサリンエフ ジョンストンステファンエイ		
发明人	サイケス, キャサリン エフ. ジョンストン, ステファン エイ.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12N15/63 C12N15/64 C12N15/82 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6897 C12N15/63 C12N15/64 C12N15/82		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA20 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/GA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QQ43 4B063/QQ49 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX02		
優先权	60/125864 1999-03-24 US 60/127222 1999-03-31 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本發明涉及線性表达元件 ( LEE ) 和環形表达元件 ( CEE ) ，其在各種分子生物學方案中有用。特別地，本發明涉及LEE和CEE在篩選基因功能，基因功能，抗原和启动子功能的生物學作用中的用途。本發明還提供了產生蛋白質，抗体，抗原和疫苗的方法。本發明還涉及製造LEE和CEE的方法，以及通過這種方法生產的LEE和CEE。

プロモーター/エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞レセプター	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ a および/または DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-インターフェロン	Goodburn <i>et al.</i> , 1988; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodburn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2レセプター	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII β	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-Dra	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋肉クレアチンキナーゼ (CK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン(トランスサイレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Omiz <i>et al.</i> , 1987
マトロチオネイン(MTI)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989