

(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2003 - 522525

(P2003 - 522525A)

(43)公表日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/15		33/50	Z 4 B 0 6 3
33/50		33/53	D
33/53			M

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 81数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 538537(P2001 - 538537)

(86)(22)出願日 平成12年11月17日(2000.11.17)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月20日(2002.5.20)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/11474

(87)国際公開番号 W001/036659

(87)国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)

(31)優先権主張番号 60/166,594

(32)優先日 平成11年11月19日(1999.11.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/444,038

(32)優先日 平成11年11月19日(1999.11.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト  
スイス国、4056 バーゼル、リヒトシュト  
ラーセ 35

(72)発明者 ビピッグ・スザンヌ・デグマー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9412  
2 サンフランシスコ #2 第7アヴェニュー  
ー 1495

(72)発明者 ベレス・ゲイバー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9430  
3 パロアルト ウォルターヘイズドライブ  
112

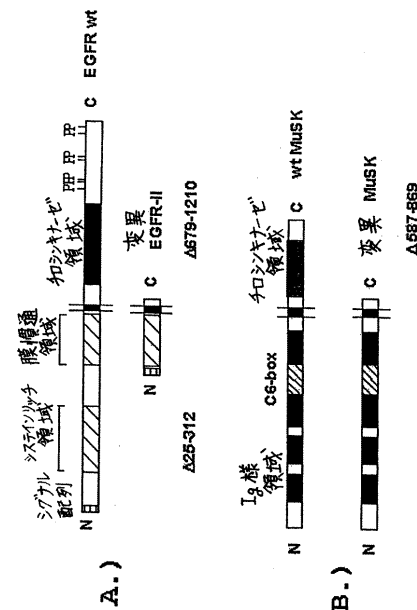
(74)代理人 弁理士 阿部 正博

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞表面選択マーカー遺伝子

(57)【要約】

本発明は、変異(突然変異)タンパク質チロシンキナーゼ受容体(PTKR)を哺乳動物細胞における選択マーカーとして使用する遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法に関する。特に好適な変異(突然変異)PTKR選択マーカーは変異上皮増殖因子受容体(EGFR)ファミリーメンバー、及び変異筋特異的キナーゼ受容体(MUSK-R)ファミリーメンバーである。更に、変異EGFRをコードする核酸配列を哺乳動物細胞内にレトロウイルスによって形質導入し、形質導入細胞を変異EGFRを特異的に認識し結合するマークされた抗体と共にインキュベートし、及びマークされた形質導入細胞を同定することから成る、形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法に関する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】以下のステップ：

- (a) 発現調節配列に機能的に結合した変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体 (PTKR) をコードする核酸配列を細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し (ここで、変異PTKRは、細胞内領域及び細胞外領域に修飾を含むか、又は、あらゆる神経成長因子受容体 (NGFR) 以外でありかつ細胞内領域に修飾を含む)、
  - (b) 遺伝的修飾細胞内で変異PTKRを発現させ、及び
  - (c) 変異PTKRを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、
- ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項2】変異PTKRが変異上皮増殖因子受容体 (EGFR) ファミリーメンバー及び変異筋特異的キナーゼ受容体 (MuSK-R) ファミリーメンバーから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】変異EGFRファミリーメンバーが、EGFR1-I及びEGFR1-IIと命名された配列から適宜選択される変異EGFR1である、請求項2記載の方法。

【請求項4】変異MuSK-Rが、mMuSK-RI及びmMuSK-RIIと命名された配列から選択される、請求項2記載の方法。

【請求項5】変異PTKRの細胞内領域が切り取られ、及びその細胞外領域も適宜切り取られている、前記いずれか一項に記載の方法。

【請求項6】変異EGFR又は変異MuSK-Rをコードする核酸配列をベクター内に含有させ、該ベクターを細胞内に導入することによって、導入ステップを実施する、請求項2記載の方法。

【請求項7】ベクターがレトロウイルスベクターである、請求項6記載の方法。

【請求項8】遺伝的修飾細胞と、変異PTKRを認識し結合する抗体とを接触させることによって、同定ステップを実施する、請求項1記載の方法。

【請求項9】同定ステップにおいて、遺伝的修飾細胞を非遺伝的修飾細胞から分離する、請求項1記載の方法。

【請求項10】更に、同定された変異PTKRを発現する細胞を分離するステップを含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】細胞がヒト細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項12】細胞が、造血細胞、肝細胞、内皮細胞、及び平滑筋細胞から成る群から選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】細胞が造血細胞である、請求項11記載の方法。

【請求項14】造血細胞が幹細胞又はT細胞である、請求項13記載の方法

。

【請求項15】ベクターに異種遺伝子が更に含有された、請求項6記載の方法。

【請求項16】以下のステップ：

(a) 変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体 (PTKR) ファミリーメンバーをコードする核酸配列をベクター内に含有させ (ここで、該PTKRは、細胞内領域及び細胞外領域に修飾を含むか、又は、あらゆる神経成長因子受容体 (NGFR) 以外でありかつ細胞内領域に修飾を含む)、該ベクターを哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、

(b) 遺伝的修飾細胞内で変異PTKRを発現させ、及び

(c) 変異PTKRを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、

ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項17】変異PTKRが、EGFR (好ましくはEGFR1-I又はEGFR1-II) 及びMUSK-R (好ましくはmMUSK-RI又はmMUSK-RII) から選択される、請求項16記載の方法。

【請求項18】ベクターがレトロウイルスベクターである、請求項16記載の方法。

【請求項19】ベクターに異種遺伝子が更に含有された、請求項16記載の方法。

【請求項20】以下のステップ：

(a) 発現調節配列に機能的に結合したタンパク質チロシンキナーゼ受容体 (PTKR) ファミリーメンバーをコードする核酸配列を哺乳動物細胞内にレトロウ

ウイルスによって形質導入し(ここで、該PTKRは、細胞内領域及び細胞外領域に修飾を含むか、又は、あらゆる神経成長因子受容体(NGFR)以外でありかつ細胞内領域に修飾を含む)、

(b) 形質導入細胞を変異PTKRを特異的に認識し結合するマークされた抗体と共にインキュベートし、及び

(c) マークされた形質導入細胞を同定する、

ことから成る、形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法。

【請求項21】細胞がヒト細胞又は造血細胞である、請求項20記載の方法

【請求項22】変異PTKRが、EGFR(好ましくはEGFR1-I又はEGFR1-II)及びMUSK-R(好ましくはmMUSK-RI又はmMUSK-RII)から選択される、請求項20記載の方法。

【請求項23】細胞が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)、マウス胚幹細胞ウイルス(MESV)、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)、及び脾臓フォーカスフォーミングウイルス(SFFV)から成る群に由来するレトロウイルスベクターによって形質導入される、請求項20記載の方法。

【請求項24】細胞がレンチウイルスに由来するベクターによって形質導入される、請求項20記載の方法。

【請求項25】更に、同定されたマークされた形質導入細胞をマークされていない細胞から分離するステップを含む、請求項20記載の方法。

【請求項26】更に、マークされた形質導入細胞を増大させるステップを含む、請求項20記載の方法。

【請求項27】以下のステップ:

(a) 発現調節配列に機能的に結合した変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体(PTKR)ファミリーメンバー及び目的とするタンパク質をコードするDNA配列を含む核酸をコードする核酸を哺乳動物細胞内に導入し(ここで、変異PTKRは、細胞内領域及び細胞外領域に修飾を含むか、又は、あらゆる神経成長因子受容体(NGFR)以外でありかつ細胞内領域に修飾を含む)、

(b) 得られた哺乳動物細胞を培養し、及び

(c) 変異PTKRを発現する細胞を同定して目的とするタンパク質を発現する細胞を得る、

ことから成る、目的とするタンパク質を発現する哺乳動物細胞の同定方法。

【請求項28】変異PTKRが、EGFR（好ましくはEGFR1-I又はEGFR1-II）及びMuSK-R（好ましくはmMuSK-R I又はmMuSK-R II）から選択される、請求項27記載の方法。

【請求項29】ステップ(a)において変異PTKRをコードする核酸及び目的とするタンパク質をコードする核酸がレトロウイルスベクターに導入される、請求項27記載の方法。

【請求項30】好ましくはmMuSK-R I又はmMuSK-R IIである、細胞質領域内が切り取られた変異筋特異的キナーゼ受容体（MuSK-R）ファミリーメンバー。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、変異（突然変異）タンパク質チロシンキナーゼ受容体（PTKR）、特に、変異上皮増殖因子受容体（EGFR）ファミリーメンバー又は変異筋特異的キナーゼ（MuSK）ファミリーメンバーを、細胞選択マーカーとして使用する、遺伝的修飾細胞の同定方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

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

**【0003】****【発明が解決すべき課題】**

CD8、CD24及びヒト低親和性神経成長因子受容体（NGFR）等を含む幾種類かの細胞表面分子が細胞選択マーカーとして使用されて来た。以下の刊行物を参照されたし。W095/06723;W098/19540; ジョリー (Joly) 他、プロ・ナツル・アカド・サイ (Pro.NatI.Acad.Sci.) 80:477 (1983); 及びレディ (Reddy) 他、モル・ブレイン・レス (Mol. Brain Res.) 8:137 (1990)。これら細胞表面分子のいくつかはそれらの細胞内の領域（ドメイン）に変異があり、それらのリガンドに結合した際に分子のシグナル（シグナリング）を回避するようになっている。しかしながら、リガンドの結合によって、細胞内の変異した分子のあるも

のはヘテロ又はホモ二量体、若しくは三量体を形成することがある。細胞内に新たに導入された分子が内因（性）受容体とヘテロ二量体を形成するようなことがあれば、優勢なネガティブ効果が生起する可能性がある。本発明は、内因受容体とヘテロ二量体を形成しない細胞表面マーカーを提供するものである。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、発現調節配列に機能的に結合した変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体（PTKR）をコードする核酸配列を細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、遺伝的修飾細胞内で変異PTKRを発現させ、及び、変異PTKRを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法を提供するものである。好適な第一具体例として、変異PTKRは、変異上皮増殖因子受容体（EGFR）ファミリーメンバー、又は、MuSKファミリーメンバー、特に、変異EGFR1、更には変異EGFR1-I及びEGFR1-IIと命名された配列である。第二具体例として、変異PTKR、特に変異EGFRをコードする核酸配列をベクター内に含有させ、該ベクターを細胞内に導入することによって、導入ステップを実施する。更に、一具体例として、哺乳動物細胞がヒト細胞であり、特に、造血細胞、肝細胞、内皮血管細胞、及び平滑筋細胞であり、更に好適には、造血細胞である。更に別の具体例では、変異PTKRマーカー配列を含むベクター又は構築物に異種（外来性）遺伝子が含有される。更に別の具体例では、遺伝的修飾細胞と、変異PTKRを認識し結合する抗体とを接触させることによって同定ステップを実施する。又、別の具体例では、同定ステップにおいて遺伝的修飾細胞を非遺伝的修飾細胞から分離する。

#### 【0005】

第二の態様として、本発明は、発現調節配列に機能的に結合した変異上皮増殖因子受容体（EGFR）ファミリーメンバーをコードする核酸配列をベクター内に含有させ、該ベクターを哺乳動物細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、遺伝的修飾細胞内で変異EGFRを発現させ、及び、変異EGFRを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法を提供する。好適な一具体例では、EGFRはEGFR1-I又はEGFR1-II

Iであり、ベクターがレトロウイルスベクターである。

【0006】

第三の態様として、本発明は、発現調節配列に機能的に結合した変異上皮増殖因子受容体 (EGFR) ファミリーメンバーをコードする核酸配列を哺乳動物細胞内にレトロウイルスによって形質導入し、形質導入細胞を変異EGFRを特異的に認識し結合するマークされた抗体と共にインキュベートし、及び、マークされた形質導入細胞を同定する、ことから成る、形質導入哺乳動物細胞の免疫選択方法に係る。好適な一具体例において、細胞はヒト細胞、特に、造血細胞である。別の具体例では、細胞が、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、及び脾臓フォーカスフォーミングウイルス (SFFV) から成る群に由来するレトロウイルスベクターによって形質導入される。更に別の具体例では、細胞がレンチウイルスに由来するベクターによって形質導入される。更に別の具体例では、同定されたマークされた形質導入細胞をマークされていない細胞から分離するステップを含む。更に別の具体例では、マークされた形質導入細胞を増大させるステップを含む。

【0007】

第四の態様として、本発明は、発現調節配列に機能的に結合した変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体 (PTKR) をコードする核酸及び目的とするタンパク質をコードする核酸を哺乳動物細胞内に導入し、得られた哺乳動物細胞を培養し、及び、変異PTKRを発現する細胞を同定して目的とするタンパク質を発現する細胞を得る、ことから成る、目的とするタンパク質を発現する哺乳動物細胞の同定方法に係る。

【0008】

特記のない限り、本発明の実施に際して、細胞生物学、分子生物学、細胞培養、免疫学、ウイルス学、及びその他の当該技術分野における公知の技術を使用するものである。これらの技術は公知文献に開示されているが、特に、例えば、Sambrook, Fritsch, Mmaniatitis, eds., "MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL", 2<sup>nd</sup> edition (1989); Celis, J.E. "Cell Biology, A Laboratory Handb

ook”, Academic Press, Inc. (1994); Coligan et al., “Current Protocol in Immunology”, John Wiley and Sons (1991); 及び Harlow et al., “Antibodies: A Laboratory Manual” (1988), Biosupplynet Source Book (1999), Cold Springs Harbor Laboratory.を参照されたし。

#### 【0009】

様々な刊行物、特許及び公開特許明細書が引用される。これらの開示内容は、本発明が関連する技術分野の技術水準をより完全に記載する為に、引用されることで本明細書の開示内容に取り込まれるものである。

#### 【0010】

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

#### 【0011】

本発明の選択マーカーは変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体 (PTKR) 分子である。PTKR分子はポリペプチドリガンドによって活性化され、その触媒領域 (ドメイン) において密接に関連する。それらはI型膜貫通タンパク質であり、そのN末端は細胞外にあり、単一の膜伸展 (スパニング) 領域を有する (van der Geero et al., Annu. Rev. Cell Biol. 10:251 (1991))。本明細書において、「PTKR」には以下のサブファミリーが含まれるが、これらに限定されるものではない。即ち、アグリンに応答して神経筋接合部の形成を開始すると考えられているMUSK-R (Glass, et al., Cell 85:513 (1996))、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、インシュリン受容体 (INSR)、神経成長因子受容体 (NGFR)、繊維芽細胞増殖因子 (FGFR) 及びEPHである。これらの各サブファミリーは様々なメンバーから成り立っている。PDGFRファミリーには、PDGFRレセプター、PDGFRレセプター、SCF受容体 (c-Kit)、CSF-1受容体 (c-Fms)、Flk2 (Flt3)、FLT1 (Quek1)、Flk1 (KDR) 及びFLT4 (Quk2) が含まれる。INSFサブファミリーには、インシュリン受容体、IGF-1受容体、IRR、ROS及びLtkが含まれる。NGFRサブファミリーには、NGFR受容体 (TrkA)、TrkB及びTrkCが

含まれる。EGFRサブファミリーには、EGFR1、EGFR2、EGFR3、及びEGFR4が含まれる。当業者にはこれらメンバーの別の名前が知られている。例えば、EGFR1は、EGFR、HER、c-ErbB及びErbB-1としても知られている。EGFR2は、HER2、Neu及びErbB-2としても知られている。EGFR3は、HER3及びErbB-3としても知られている。EGFR4は、HER4及びErbB-4としても知られている(Urlich, Schlessinger, Cell, 61:203-212 (1990))。

#### 【0012】

本発明の変異PTKRにはPTKR分子における修飾が含まれ、その結果、該受容体は対応する未修飾(野生型)のシグナル(シグナリング)活性をもはや有していない。本発明を記述するに際して、「野生型PTKR」には、天然のPTKRのみならず、タンパク質チロシンキナーゼ受容体分子特性に有意な影響を与えないようなDNA配列における変化を受けた遺伝的に修飾されたPTKRも含有される。このような変化には、コードされるアミノ酸配列を変えないもの、アミノ酸配列の保存的置換を生じるもの、一つ又は数種類のアミノ酸の欠失又は付加を生じさせるものが含まれる。適当な置換は当業者には公知である。保存的に置換することの出来るアミノ酸残基の例としては、グリシン/アラニン、バリン/イソロイシン/ロイシン、アスパラギン/グルタミン、アスパラギン酸/グルタミン酸、セリン/スレオニン、リジン/アルギニン、フェニルアラニン/チロシンを挙げることが出来る。

#### 【0013】

野生型PTKR分子の修飾には欠失、切断(トランケーション)等がある。より特異的には、本発明の変異PTKRには、細胞質領域における修飾を有しておりシグナル活性を欠くものが含まれる。シグナル活性とは、一般的に、最終的に転写活性化につながる、細胞質ゾルにおける核への応答(リスポンス)経路(パスウェイ)の引き金となる活性、と定義することが出来る。本発明の変異PTKRには細胞外領域における修飾も含まれる。しかしながら、細胞外領域は抗体との結合能力を保持していることが好ましい。一般的に、抗体との結合能力を有する細胞外領域の最少ペプチド断片は約15アミノ酸残基であり、より好ましくは

少なくとも50アミノ酸残基である。

【0014】

好適具体例において、選択マーカーPTKRはEGFRファミリーの変異メンバーである。EGFRファミリーのメンバーは全体的な形態が類似しており、アミノ酸配列に顕著な関連性が見られる。このファミリーのメンバーは上記に列記したものに限らず、単一の膜貫通領域、約100~200アミノ酸残基から成る2つのシステインリッチ領域、及び単一のチロシンキナーゼ領域というような共通の特徴を有する新規なメンバーも含まれる。更に、EGFRファミリーのメンバーはEGFRファミリーのその他のメンバーとヘテロ二量体を形成することが出来る。

【0015】

好適な変異EGFRファミリーのメンバーはEGFR1である。これは、例えば、上皮増殖因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)及びアンフィレグリンを含む数多くのリガンドに対して、高親和性を有する受容体である。多くのEGFR配列が同定されており、EMBL/GenBank Accession Numbers: X00588/X06370 (Ullrich, et al., Nature 309:418 (1984)); K01885/K02047 (Lin et al., Science 224:843 (1984)); K03193 (Merlino, et al., Mol. Cell. Biol 5:1722 (1985)); X00663(Xu, et al., Nature 309:806 (1984)); AC006977; M38425 (Simmen, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:125 (1984))及びM20386 (Lax, et al. Mol. Cell. Biol. 8:1970 (1988))を参照することが出来る。幾つかのEGFRは脊椎動物種以外にも見出されており、例えば、EMBL/GenBank Accession Numbers:K03054を有するショウジョウバエを挙げる事が出来る(Livneh, et al., Cell 40:599(1985))。

【0016】

野生型EGFRの領域構造の模式図を図1に示した。EGFRは分泌経路にこのタンパク質を向かわせるシグナルペプチドを有している。細胞外領域はこのシグナルペプチドに続く。この領域は数百アミノ酸から成る。細胞外領域は、通常細胞から細胞外の環境に突き出ている受容体の一部を意味し、EGFRでは明確なCys残基を有している。膜貫通領域は一般的には細胞膜に局在化し、疎水性

残基が連なっておりその後に幾つかの塩基性残基がある。細胞質領域（「細胞内領域」ともいう）は当該分子の触媒部位を含み、細胞内に位置する。この領域は基質結合部位、及び調節チロシン及びスレオニンリン酸化部位が含まれている。

#### 【0017】

E G F Rファミリーメンバーの修飾、特に、E G F R 1の変異は公知である。W03/05148 にはE G F R 1の3つの変異が開示されている。その内の一つ（HER721A）はE G F R 1の細胞質領域のアミノ酸721番目における点突然変異であり、リジンがアラニンに置換されている。二番目の変異(HERCD-533)は細胞内領域が欠失しているが膜貫通領域は残っているような分子のC末端を含んでいる。三番目の変異(HERCD-566) は、C末端の566個のアミノ酸が欠失しており、細胞内領域及び膜貫通領域のいずれも欠けている。3つE G F R切断形が幾つかの悪性腫瘍で検出されている。I型（E G F R v I I I）は大きな細胞外領域（アミノ酸6-273）が欠失しており、E G Fに結合することが出来ない(Moscattello, D.K. et al., Oncogene 13:85 (1996))。I I型は、細胞外領域I Vに83個のアミノ酸（520-603）のインフレーム欠失を有しているが、E G F及びT G F 結合を阻害しない(Humphrey, P.A., et al., Biophys. Res. Commun. 178:1413 (1991))。I I I型は、細胞外領域I I及びI I Iに267個のアミノ酸（29-296）のインフレーム欠失を有しており、これらの欠失によりリガンド結合が阻害される(Humphrey, P.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4207 (1990))。

#### 【0018】

上記のような具体的な修飾（これらのものには限らないが）がE G F Rファミリーメンバーについて知られているが、このような変異E G F Rファミリーメンバーを哺乳動物細胞における選択マーカーとして使用する例はこれまでに知られていない。本発明によれば、P T K R分子、特に、E G F R分子に対する好適な修飾として、細胞質領域に対するもの、例えば、細胞質領域の少なくとも150、好ましくは少なくとも250、より好ましくは少なくとも400、更に好ましくは少なくとも500のアミノ酸が欠失したものである。好適例において、欠失は分子の切断から成る。切断（トランケーション）には1～15部位の範囲にお

けるチロシンリン酸化部位の欠失及びキナーゼ触媒部位の欠失を含むものであり得る。しかしながら、本発明において選択マーカーとして有用な変異EGFRは1以上で15未満のチロシンリン酸化部位の欠失を含むものでも良い。更に、このような修飾には、細胞質領域の少なくとも50個のアミノ酸の欠失のようなインフレーム欠失も含まれる。このような欠失はタンパク質チロシンキナーゼ活性の欠失を含むものであり得る。特に好適な選択マーカー配列は、対応する野生型分子から細胞質領域の少なくとも400、好ましくは500個のアミノ酸が欠失している、変異したEGFR1、EGFR2、及びEGFR3分子である。

#### 【0019】

本発明における好適な変異EGFR分子は変異EGFR1である。特に、好ましいのは、図2及び3（配列番号1及び2）に示された、EGFR1由来の修飾配列である。このEGFR1分子において、細胞外領域はヌクレオチド1～1935にコードされ、膜貫通領域はヌクレオチド1938～2004にコードされ、そして、細胞内領域はヌクレオチド2007～3630にコードされている。好適な変異EGFR1マーカーの一例はEGFR1-Iと命名されており、細胞質領域の679～1210番目のアミノ酸が欠失している（図2参照）。

#### 【0020】

選択マーカーPTKRの第二の好適例は、MuSK-Rファミリーの変異メンバーである。MuSK-Rにはタンパク質を分泌経路に向かわせるシグナル配列又はリーダー配列が含まれている。シグナル配列に続いて細胞外領域があり、この領域は数百のアミノ酸からなり、その数は様々であるが、典型的には約500個のアミノ酸である。細胞外領域は、通常細胞から細胞外の環境に突き出ている受容体の一部であり、リガンド結合領域を有している。細胞外領域はキナーゼ受容体の最も際立った特徴の一つである。MuSK-Rにおいては、細胞外領域は免疫グロブリン様(Ig-like)領域を含む。典型的には、4つの免疫グロブリン様領域が発見されている。しかしながら、3つの免疫グロブリン様領域を有するMuSK-Rに関する幾つかの報告もある。細胞外領域には、「C6-box」として知られている6つの連続したシステイン残基が含まれていることがある。このC6-boxの位置は、特定のMuSK-Rに応じて変化するが、或

るM u S K - Rでは、ほぼアミノ酸残基373～382において見出されている。膜貫通領域は一般的に細胞膜に局在しており、疎水性残基の連なりの後に幾つかの塩基性残基が結合している。細胞内領域(「細胞質領域」と変換可能な態様で使用する)には分子の触媒部位が含まれ、細胞内に位置している。

#### 【0021】

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

#### 【0022】

GeneBank及びATCC等の公的寄託機関から入手できるその他のM u S K - Rの例として、受託番号: NM005592; AF006464; A448972; A1800924; A1700028; A141265; A1341122; A1302067; U34985; AA448972; 及びATCC75498を挙げることが出来る。上記のように、M u S K - Rは骨格筋接合部に特異的である。

#### 【0023】

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

#### 【0024】

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

#### 【0025】

従って、「MuSK-R」という用語がポリペプチドを指しているときには、公知のMuSK-R、MuSK-Rのアイソフォーム又はバイリアント、及び機能的に等価な受容体が含まれる。機能的に等価な受容体とは、結合に対して、公知のMuSK-Rと競合するMuSK-Rである。より具体的には、機能的に等価なMuSK-Rとは、配列番号8で示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも40%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有し、リガンド又は基質結合に関して図6に示されるようなMuSK-Rと競合することができるものである。

#### 【0026】

本発明によれば、変異MuSK-Rは、遺伝的修飾細胞を同定する選択マーカーとして使用される。このマーカーは、通常はMuSK-Rを発現しない標的細胞の核酸構築物上に導入される。「導入」という用語は、本明細書中で広義に使用され、挿入、含有というような意味で使用される。変異MuSK-Rが選択マ

ーカーとして使用される際に、その分子はもはやシグナル活性を有していない。シグナル活性とは、一般的に、最終的に転写活性化につながる、細胞質ゾルにおける核への応答（リスポンス）経路（パスウェイ）の引き金となる活性、と定義することが出来る。シグナル活性の欠如は、(a) MuSK - Rを筋肉以外の組織又は細胞で使用する事(Glass et al 85:513-523 (1996))、又は、(b) 変異MuSK - Rを使用することによる。

【0027】

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

【0028】

既に述べたように、MuSK - Rは筋肉組織に局在しており、機能的アグリン受容体として機能する。アグリンは、運動終板における分子再組織化を誘導することのできる因子である。従って、MuSK - Rは筋肉以外の組織において選択マーカーとして使用することが出来る。

【0029】

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

【0030】

本発明における好適なMuSK - Rは、「hMuSK - R」と称される、配列番号7及び8に記載された配列である。細胞外領域はヌクレオチド1～1479にコードされ、膜貫通領域はヌクレオチド1480～1545にコードされ、そして、細胞内領域はヌクレオチド1546～2607にコードされている。その他の好適なMuSK - Rは配列番号7及び8に記載された配列に密接に関連するものである。このような密接に関連する配列は、米国特許第5,656,473、特に、番号16及び17に記載された配列である。

## 【0031】

MuSK-Rの変異体は公知であり、Ape et al., Neuron 18:623-635 (1997)を参照することが出来る。本発明において、MuSK-Rに対する好適な修飾は、細胞質領域に対するもの、例えば、細胞質領域の少なくとも150、好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも250、更に好ましくは少なくとも300、最も好ましくは少なくとも350のアミノ酸が欠失したものである。好適例において、欠失は分子の切断(トランケーション)から成る。欠失又は切断は、1~19部位の範囲、好ましくは2~15部位の範囲、より好ましくは2~10部位の範囲におけるチロシンリン酸化部位の欠失を含む。更に、MuSK-Rからキナーゼ触媒部位が欠失したものを含むものであり得る。一具体例において、このチロシンリン酸化部位は配列番号8のおおよそアミノ酸残基672~691に見出すことが出来る。タンパク質が安定的に発現される限り、細胞質領域における欠失又は切断の数に何等制限はない。

## 【0032】

本発明の選択マーカーとして使用される特に好適な変異MuSK-Rは、図6(配列番号8)に記載のMuSK-R配列に対する修飾である。一具体例では、MuSK-Rの細胞質領域において、少なくとも300アミノ酸が切断されている。好適な一具体例は538~869のアミノ酸配列が欠失したmMuSK-R Iと呼ばれるものである。別の好適な一具体例は577~869のアミノ酸配列が欠失したmMuSK-R IIと呼ばれるものである。

## 【0033】

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

## 【0034】

べつの好適具体例において、変異PTKR、特に、選択マーカーとして有用な

変異EGFR又は変異MUSK-Rには、上記のような細胞質領域及び細胞外領域の双方における修飾が含まれる。これによって、変異PTKRと内因性受容体とのヘテロ二量体の形成が避けられるものと期待される。

【0035】

細胞外領域における修飾には、少なくとも約100、好ましくは少なくとも約150、より好ましくは少なくとも約200、更に好ましくは少なくとも約250のアミノ酸が欠失したものである。一具体例において、修飾は一般的に約100個のアミノ酸によって特徴付けられる一つのシステインリッチ領域の除去を含むものである。特に好適な選択マーカーは、細胞質領域における切断のみならず細胞外領域における少なくとも200好ましくは250のアミノ酸の欠失を有する、変異EGFR1、変異EGFR2及び変異EGFR3である。上記のように、好ましくは、本発明の選択マーカーとして使用される変異MUSK-Rには細胞外領域における抗体結合部位は含まれるようにすべきである。

【0036】

より特異的には、細胞外領域及び細胞質領域の双方が修飾されている好適な変異EGFR分子は図2（配列番号1及び2）に示されたWT EGFR1由来の配列である。特に好適なものは、図2（配列番号2）における細胞外領域のアミノ酸配列25～313及び細胞質領域のアミノ酸配列679～1210が欠失したEGFR1-IIである。

【0037】

本明細書で使用される「変異PTKR」、「変異EGFR」又は「変異MUSK-R」選択マーカーは、文脈に応じて、ヌクレオチド又はタンパク質を意味する。本発明のポリヌクレオチドはRNA又はDNAの形態であり得、DNAはcDNA、ゲノムDNA又は合成DNAを含む。

【0038】

核酸及びタンパク質において変異を生じさせるための一般的な方法は公知である。これらの方法は、本発明の選択マーカーとして有用な変異PTKR、特に、変異EGFRファミリーメンバーを作成するために使用することが出来る。当業者であれば、EGFRファミリーメンバーを含むPTKR分子はGenBank等の様々

な配列データベースのようなソースから取得することが出来る。ランダム及び部位特異的突然変異のいずれも野生型 P T K R における変異を生じさせるために有効である。ランダム法は、制限エンドヌクレアーゼ部位内の配列を変えて、プラスミドにオリゴヌクレオチドリンカーを挿入し、プラスミドに損傷を与えるために化学剤を使用し、インビトロ DNA 合成に際して誤ったヌクレオチドを取り込ませることを含む。しかしながら、部位特異的突然変異のほうがより有益な手段であろう。特に好適な部位特異的突然変異法は、オリゴヌクレオチド特異的突然変異及びポリメラーゼ鎖反応 ( P C R ) 増幅オリゴヌクレオチド特異的突然変異である。これらの方法は当業者に公知であり、Wu, et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 154: Recombinant DNA, Part E, Academic NY (1987); Landt et al., *Gene* 96:125-128 (1990); Kirchhoff et al., *Methods Mol. Biol.* 57:323-333 (1995); Herlitze, et al., *Gene* 91:143-147 (1990); Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (上記) 及び *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, Inc. Canada (1998) を参照されたい。

#### 【0039】

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

#### 【0040】

ポリヌクレオチドが機能的に結合されるクローニング部位及びプロモーターの双方を有するベクターは当業者には周知である。このようなベクターはインビトロ又はインビボで RNA を転写することが出来、Stratagene (LaJolla, CA) 及び Promega Biotech (Madison, WI) から市販されている。このようなベクターの例と

して、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及び単純ヘルペスウイルスのようなウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミドベクター、菌ベクター、合成ベクター及びその他の当該技術分野で典型的に使用されている組換えビークルを挙げる事が出来る。これらのベクターは様々な原核及び真核宿主における発現に関して記載されており、タンパク質の発現に使用することが出来る。

#### 【0041】

好適具体例においては、ベクターには、発現調節配列に機能的に結合された、本発明の選択マーカーをコードする核酸配列が含まれる。適当な調節配列は標的細胞に基づき当業者が適宜選択することが出来る。発現調節配列（調節配列）には、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、RNAポリメラーゼ結合配列、転写を誘導する配列、及び、スカフォード付着領域（SAR）のようなその他の発現調節要素を含むことが出来る。

#### 【0042】

プロモーターは原核又は真核細胞プロモーターのいずれでもかまわない。更に、プロモーターは組織特異的プロモーター、誘導プロモーター、合成プロモーター、又は融合（ハイブリッド）プロモーターであり得る。プロモーターの非限定的例としては、ファージラムダ（PL）プロモーター、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）のようなアデノウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーターのようなサイトメガロウイルスプロモーター、MoMLV LTRのようなロングターミナルリピート（LTR）プロモーター、モロニー Maus 肉腫ウイルス（MoMSV）のU3領域プロモーター、グランザイムAプロモーター、メタロチオネイン遺伝子調節配列、CD34プロモーター、CD8プロモーター、チミジンキナーゼ（TK）プロモーター、B19パロウイルスプロモーター、及びラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーターを挙げる事が出来る。更に、Gal4プロモーター及びアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）プロモーターのような酵母及びその他の菌類由来のプロモーター要素を使用することも出来る。これらのプロモーターは、ストラタジーン(Str

atagene, La Jolla, CA) のような様々なソースから市販されている。本発明の範囲は特定のプロモーターに限定されるものではない。

【0043】

ベクターには更にカルボキシル末端アミノ酸の3'に位置するポリアデニル化シグナルを含むことが出来る。クローニング部位に機能的に結合されたポリヌクレオチド及びプロモーターの双方を含むベクターは当業者に公知である。このようなベクターは、インビトロ又はインビボでRNAを転写することが出来、市販されている。非限定的な具体例として、ストラタジーン(Stratagene, La Jolla, CA)から市販されているpSG, pSV2CAT及びpXt1、並びにファルマシアから市販されているpMSG, pSVL, pBPV, 及びpSVK3を挙げることが出来る。その他のベクターとして、pCMV6b及びpCMV6cのようなpCMV哺乳動物発現ベクター(カイロン社、CA)、pSFFV-Neo及びpBluescript-SK+を挙げることが出来る。発現及び/又はインビトロ転写を最適化するために、ポリヌクレオチドの5'及び/又は3'非翻訳部分を除去、付加又は変更して、余分で不適当な別の翻訳開始コドンの可能性のある配列、又は、転写又は翻訳レベルでの発現に干渉したり減少させるようなその他の配列を排除する必要がある場合もある。又は、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンの5'の直前に挿入して発現を増強させることも出来る。

【0044】

特に好適なベクターはレトロウイルスベクターであり、Coffin et al., "Retroviruses", (1997) Chapter 9, pp.437-473 Cold Springs Harbor Laboratory Press) を参照されたい。本発明で有用なレトロウイルスベクターは当業界において既に教示されている手順によって組換え技術によって調製することが出来る。W094/29438, W097/21824及びW097/21825にはレトロウイルスパッケージングプラスミド及びパッケージング細胞系が記載されている。一般的なレトロウイルスベクターは、マウス、鳥又は霊長類由来のレトロウイルスである。最も一般的なレトロウイルスベクターは、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)及びマウス幹細胞ウイルス(MSCV)である。MoMLV由来ウイルスには、LMily, LINGFER, MINGFER, MND及びMINTである(Bender

et al., J. Virol. 61:1639-1649 (1987); Miller et al., Biotechniques 7:98-990 (1989); Robbins, et al., J. Virol. 71:9466-9474 (1997) 及び米国特許第5,707,865)。更に、ベクターの非限定的例として、ギボンサル白血病ウイルス (GALV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚幹細胞ウイルス (MESV)、脾臓フォーカスフォーミングウイルス (SFFV)、及び、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1 及び HIV-2) のようなレンチウイルスを挙げることが出来る。宿主範囲、変更した細胞表面受容体などの親レトロウイルスの特定の性質を利用して、新たなベクター系が常に開発されている (C. Baum et al., Chapter 4, Gene Therapy of Cancer Cells eds., Lattime & Gerson (1998))。本発明は特定のレトロウイルスベクターに限定されるものではなく、あらゆる種類のレトロウイルスベクターを含むものである。特に好適なベクターは、2つの長い末端繰り返し (LTR) に対応するマウスウイルスからの DNA、及びパッケージングシグナルを含む。一具体例としては、ベクターが MoMLV 又は MSCV 由来のベクターである。別の好適例ではベクターは MND である。

#### 【0045】

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

#### 【0046】

このような構築物は、もし gag, pol 及び env 機能がパッケージング細胞系によって外部から (in trans) 与えられれば、ウイルス粒子内に効率良く包み込むことが出来る。即ち、ベクター構築物がパッケージング細胞に導入され、該細胞によって生産される gag, pol 及び env 蛋白質がベクター RNA と組み合わされて感染性ビリオンが生産され、それが培養培地内に分泌される。こうして生産されたウイルスは標的細胞に感染し、その DNA 内に組み込まれるが、必須のパッケージング配列が欠けているために、感染性ウイルス粒子を生産する

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

#### 【0047】

更に好適なベクターとして、アデノウイルスベクター (Frey et al., Blood 91:2781 (1998); W095/27071) 及びアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) (Chatterjee et al., Current Topics in Microbiol. And Immunol. 218:61 (1996)) を挙げる事が出来る。Shenk, Chapter 6, 161-78, Breakefield et al., Chapter 8 201-235; Kroner-Lux et al., Chapter 9, 235-256 in Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds., Quesenberry et al., John Wiley & Sons, 1998 及び米国特許第5,693,531, 米国特許第5,691,176も参照されたい。アデノウイルス由来のベクターを使用することは、それらが非分裂細胞に感染することが出来るために或る条件下では有利であり、レトロウイルスDNAとは違って、アデノ

ウイルスDNAは標的細胞のゲノム内に組み込まれることはない。更に、アデノウイルスベクターの外来性DNAを運搬する能力はレトロウイルスベクターよりもかなり高い。アデノ随伴ウイルスはもう一つの有用な運搬系である。これらのウイルスのDNAは非分裂細胞内に組み込まれ、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて数多くのポリヌクレオチドを異なる種類の細胞に導入することに成功している。該ベクターは造血細胞及び内皮細胞を含む異なる型の細胞に形質導入する能力を有する。

【0048】

ベクターには、W096/13598 及びW099/47691 (ペンシルバニア大学)、W098/21345 (ジェネラルホスピタル)、米国特許第5965441 (ジェネラルホスピタル)、又はW099/58700 (アライドジーンセラピー) に記載されているような、アデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターとのハイブリッドベクターも含まれ、これらの文献の開示内容は本明細書中に取り込まれるものである。

【0049】

一具体例において、構築物又はベクターは、選択マーカースとしての変異PTKR又は変異EGFRをコードする核酸配列のみならず、標的細胞内に移入すべき異性遺伝子をコードする核酸配列をも含有する。好適具体例では、核酸はDNAである。「異性(ヘテロロガス)又は外来性」という用語は、遺伝子配列のような核酸配列に関して使用するときには、特定の細胞又はベクターに通常は関連がなく、構築物又はベクターにプロモーターの調節下に適当に挿入されて遺伝的修飾される標的細胞内で発現することのできる配列を意味する。異性遺伝子は本発明の選択マーカースの5'又は3'に位置することが出来る。

【0050】

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

- (a) LTR - X - I - M - LTR ;
- (b) LTR - M - LTR ;
- (c) LTR - M - (I) - X - LTR ;
- (d) LTR - X - pM - LTR ;及び

(e) LTR - X - I - M - SAR - LTR。

ここで、「LTR」は長い末端反復配列、「X」は所望のタンパク質に対する異性遺伝子、「M」は本発明の選択マーカ、「I」は本発明の内部リボソームエントリー部位、「SAR」はスカフォールド付着領域、及び「p」は第二プロモーター、好ましくはCMV又はPGKプロモーターである。

【0051】

遺伝子、コード配列、又は特定のタンパク質をコードする配列は、適当な調節配列の制御下に置かれたときに、インビトロ又はインビボでポリペプチドに転写及び翻訳される核酸分子である。異種遺伝子は発現を希望する如何なるものでも良い。異種遺伝子の非限定的例として、治療タンパク質、構造遺伝子、リボザイム、アンチセンス配列を挙げることが出来る。異種遺伝子は完全なタンパク質又はその機能的に活性な断片でも良い。このようなタンパク質には、例えば、細胞分化を制御するもの、及び内因性遺伝子欠陥から生じる患者の疾患を補償できる治療遺伝子がある。更に、治療タンパク質又は遺伝子には、感染性物質の生産又は機能に拮抗 (antagonize) 又は中和したり、病理過程に拮抗したり、宿主の遺伝的メークアップを改善したり、又は、生着を容易にするものが含まれる。

【0052】

治療遺伝子又は遺伝子配列の具体的な例として、以下の治療に有効な遺伝子又は遺伝子配列を挙げることが出来る：アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA)、鎌状細胞貧血、リコンビナーゼ欠損症、リコンビナーゼ調節遺伝子欠損症、アンチセンス又はトランスドミナントREV遺伝子のようなHIV、又は単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk)。異種遺伝子は新規な抗原若しくは薬剤耐性遺伝子をコードするか、又は、腫瘍細胞を特異的に殺すに有効なトキシン若しくはアポトーシスインデューサーをコードするか、又は、造血細胞に対して特異的な自殺遺伝子を含有させることも出来る。更に、異種遺伝子には、酵母遺伝子のような非ヒトの治療遺伝子であっても良い(Seo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:9167 (1998))。

【0053】

ベクター又は構築物は、目的とするタンパク質をコードする第一異種遺伝子に

加えて、第二異種遺伝子を含むことが出来る。或る疾患の治療には、一つ以上の遺伝子が必要である。或いは、一つ以上の遺伝子を幾つかの共存可能な (compatible) ベクターを用いて運搬することも可能である。遺伝的欠陥に依りて、治療遺伝子には調節及び非翻訳配列を含むことが出来る。ヒト患者に対しては、治療遺伝子は一般的にはヒト由来であるが、高いホモロジー及びヒトにおいて生物学的に同一又は均等な機能を示す近い関係の種の遺伝子も、該遺伝子がレシピエントにおいて有害な免疫反応を生起しない限り、使用することが出来る。

#### 【0054】

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

#### 【0055】

本発明の標的細胞は哺乳動物細胞であり、この非限定的例として、ヒト、マウス、サル、チンパンジー、牛、羊、豚、やぎ、及び馬等の家畜、競技用動物、イヌ、猫などの愛玩動物 (ペット) 並びに、ラット、マウス、モルモット等の実験用齧歯類及び動物を挙げることが出来る。好ましくは、標的細胞はヒト細胞である。好適なヒト細胞には、肝細胞、造血細胞、平滑筋細胞、神経、内皮血管細胞、腫瘍細胞、及び上皮細胞がある。造血細胞は特に好適であり、この造血細胞には、造血幹細胞、赤血球、好中球、単球、血小板、肥満細胞、好酸球、好塩基球、B及びTリンパ球、NK細胞、及びこれら各細胞系列の前駆体細胞が含まれる。造血幹細胞及びT細胞が特に好ましい。造血幹細胞 (HSC) は長期間の多系列再構成 (増殖) 能を有する造血細胞集団と定義することが出来る。T細胞はリンパ球の一つのタイプであり、造血幹細胞から発展してきたものと考えられている。T細胞には、細胞障害性T細胞、ヘルパーT細胞、誘導T細胞及びサプレッサーT細胞等の数多くの型がある。

#### 【0056】

標的細胞、特に、造血細胞を得る方法は当業者に周知であり、ここで特に繰り返

返さない。造血細胞の非限定的ソースには、造血幹細胞、骨髓、胚卵黄囊、胎児性肝臓組織、成人脾臓、及び成人抹消血及び臍帯血などの血液を挙げることも出来る(To et al., Blood 89:2233 (1997))。骨髓細胞は腸骨、胸骨、脛骨、大腿骨、脊椎、及びその他の骨空洞から得ることが出来る。

【0057】

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

【0058】

細胞分離の順序は本発明にとって重要ではない。特異的な細胞型は変異PTKRによる遺伝的修飾の前又は後のいずれかで分離することが出来る。好ましくは、細胞を最初に粗く分離して、その後、陽性及び/または陰性選択する。ヒトにおいては、濃縮された造血幹細胞集団の表面抗原発現プロファイルはCD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>で同定される。その他の濃縮された表現型の非限定的例として、CD2<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>、CD7<sup>-</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD10<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD15<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD20<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>10/11</sup>、CD45、CD59<sup>+/+</sup>、CD71<sup>-</sup>、CDW109<sup>+</sup>、グリコフォリン<sup>-</sup>、AC133<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+/+</sup>、及びEM<sup>+</sup>を挙げる事ができる。Lin<sup>-</sup>細胞は、少なくとも一種類の系列特異的マーカー(CD2, CD3, CD4及びCD15、CD56等)発現の欠如に基づいて選択される。濃縮されたHSC細胞集団の分離及び同定に使用する発現マーカーの組み合わせは、様々なファクターに応じて変化し、その他の発現マーカーが利用可能になれば変わり得る。

【0059】

ヒトCD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>に類似する特性を有するマウスHSCはkit<sup>+</sup>Thy-1.1<sup>lo</sup>Lin<sup>-/lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>(KTLS)と同定され得る。他の表現型も周知である。CD34発現をThy-1の選択に結びつけると、約5%未満の系列関連細胞(lineage committed cells)しか含まない細胞を含む組成物を得ることができる(米国特許第5,061,620)。

#### 【0060】

CD3は殆どのT細胞で発現しており、このような細胞は細胞表面抗原CD2、CD4及びCD8を発現できることが示されている。CD45も有用なT細胞マーカーである。最も良く知られているT細胞マーカーはT細胞抗原受容体(TCR)である。現在、2つの型のTCR、 $\alpha$ -TCR、及び $\beta$ -TCRが定義されている。B細胞は、例えば、CD19及びCD20の発現によって選択することが出来る。骨髄細胞は、例えば、CD14、CD15及びCD16の発現によって選択することが出来る。NK細胞は、CD56及びCD16の発現によって選択することが出来る。赤血球はグリコフォリンの発現によって選択することが出来る。神経細胞はNCAM及びLNGFRによって同定することが出来る(Baldwin et al., J. Cell Biochem. 15:502 (1996))。血管内皮細胞はVEGFR2、CD34、P-セレクチン、VCAM-1、ELAM-1及びICAM-1によって同定することが出来る(Horvathova et al., Biol. Trace. Elem. Res., 69:15-26 (1999))。当業者には、その他の表液細胞を同定するためのその他の有用なマーカーは公知である。

#### 【0061】

一旦、標的細胞を含む集団を回収した後に、標的細胞、特に、造血細胞を分離し、この細胞を増殖を維持するに十分な増殖因子を組み合わせる含有する適当な培地中で培養する。標的細胞の培養方法は当業者には周知であり、ここでは簡潔に記載するにとどめる。任意の適当な培地を使用することができ、これらは販売業者から容易に入手することが出来る。播種レベルは重要ではなく使用する細胞型に依存するが、一般的には造血細胞に対する播種レベルは、該細胞がCD34を発現しているときは、少なくとも1ml当たり少なくとも10個、より一般的には約100個であり、通常10<sup>6</sup>個未満である。

## 【0062】

様々な種類の培地（固体又は液体）を使用することが出来る。非限定的例として、DMEM、イスコフ変性ダルベッコ培地（IMDM）、X-vivo15（無血清）、及びRPMI-1640を挙げることが出来る。これらは、例えば、様々な販売元から市販されている。調製物には、様々な種類の栄養素、増殖因子、サイトカインを添加することが出来る。培地には牛胎児血清のような血清、自家血清又は血漿を適量含有しても良いし、しなくても良い。しかしながら、細胞又は細胞集団をヒトに使用する場合には、培地は無血清又は自家血清若しくは血漿が好ましい（Lansdorp, et al., J. Exp. Med. 175:1501 (1992) 及び Petzer, et al., PNAS 93:1470 (1996)）。更に、Freshney, R.I., “Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques”, Wiley-Liss, Inc. (1994) を参照されたし。

## 【0063】

培地に添加することも出来る化合物その他の非限定的な例として、TPO、FL、KL、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-12、IL-11、幹細胞因子、G-CSF、GM-CSF、St1因子、MCGF、LIF、MIP-1 及びEPOを挙げることが出来る。これらの化合物は単独、又は任意に組み合わせて使用することが出来、好適な濃度範囲は公開文献から容易に決めることが出来る。マウス幹細胞を培養するときには、好適な非限定培地には、mIL-3、mIL-6、及びmSCFが含まれる。例えば、フィブロネクチン及び/又はRetroNectin™（宝酒造、大津、滋賀県、日本）のような接着分子のような、その他の分子を培地に加えることも出来る。

## 【0064】

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

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

#### 【0065】

本発明の一好適態様では、発現調節配列に機能的に結合した選択マーカーとしての変異タンパク質チロシンキナーゼ受容体(PTKR)をコードする核酸配列を細胞内に導入して遺伝的修飾細胞を形成し、遺伝的修飾細胞内で変異PTKRを発現させ、及び、変異PTKRを発現する遺伝的修飾細胞を同定する、ことから成る、遺伝的修飾哺乳動物細胞の同定方法に関する。好適具体例では、選択マーカーは変異上皮増殖因子受容体(EGFR)ファミリーメンバーであり、特に、変異EGFR1が好ましく、更にEGFR1-I及びEGFR1-IIが好ましい。ポリヌクレオチド又は核酸はポリペプチドを「コード」しており、自然状態で、又は当業者に周知の方法で操作された場合に、転写され、及び/又は翻訳されてポリペプチド又はその断片を生産する。本発明の変異PTKRを含む構築物又はベクターは遺伝的修飾又は遺伝的移入によって標的集団に導入することが出来る。

#### 【0066】

本明細書において「遺伝的修飾」という用語は、細胞の通常のヌクレオチドへの付加、欠失、又は混乱(disruption)を意味する。この遺伝的修飾方法は、本発明の選択マーカーをコードし、例えば、異種又は外来性遺伝子を含む核酸配列を哺乳動物標的細胞に導入する、任意の遺伝的修飾方法を含むものである。これらの方法は一般的に公知である。「導入」という用語は、広義に使用され、例えば、挿入も含まれる。「遺伝的修飾」の非限定的な例として、形質導入(インビボ又はエキソビボ)における、宿主又は提供者から受容者へのウイルスの媒介によ

る宿主DNAの移入)、トランスフェクション(単離されたウイルスDNAによる細胞にの形質転換)、リポソーム媒介移入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムトランスフェクション及び当業界で周知の他の手段がある。形質導入方法には、細胞とプロデューサー細胞との直接共培養 (Bregni, et al., (1992) Blood 80:1418-1422)、適当な増殖因子及びポリカチオンと共に又はウイルス上清単独で培養する方法 (Xu, et al., Exp. Hemat. 22:223-230) 及びスピノキュレーション (spinoculation) がある。

#### 【0067】

好適具体例において、本発明の変異PTKR、特に変異EGFRマーカーは、上記のようなレトロウイルスベクターによって標的細胞に形質導入される。感染する宿主の範囲はウイルスのエンベロープ蛋白質によって決まる。組換えウイルスは実際に、パッケージング細胞によって提供されるenv蛋白質によって認識されるあらゆる型の細胞に感染することが出来、ウイルスゲノムを形質導入した細胞に組み込み、外来性遺伝子産物を安定的に生産する。一般的に、MoMLVのマウス同種指向性envはげっし類細胞に感染することが出来るが、両種指向性envは、げっし類、鳥類細胞、及びヒト細胞を含む幾つかの霊長類細胞に感染することが出来る。レトロウイルス系で使用できる両種指向性パッケージング細胞系は当業界で公知であり、市販されている。その非限定的例として、PA12, PA317, CRIP, 及びFLYA13を挙げることが出来る (Miller et al. Mol. Cell. Biol. 5:431-437(1985); Miller et al. Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902(1986); Danos et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464(1988))。最近になって、水泡性口内炎ウイルスのGグリコプロテイン(VSV-G)がMoMLVenvタンパク質と置換された (Burns, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037(1993); 及びW092/14829)。ヒト細胞への感染が可能である異種指向性ベクターシステムも存在する。

#### 【0068】

標的細胞が選択マーカーである変異PTKR、及び適宜異種遺伝子を含むヌクレオチド配列で形質転換されると、選択マーカーPTKRを発現する該修飾細胞はいろいろな方法で同定することが出来る。本明細書中において、修飾細胞に関

する「同定」という用語は、他に特記のない限り、標識し、精製し、濃縮し、単離し、又は分離することを意味する。同定は単一又は複数のステップで行うことが出来る。

#### 【0069】

好適な具体例では、本発明の選択マーカーを発現する遺伝的修飾細胞は、該選択マーカーを特異的に認識し結合する抗体、特に、変異EGFRを認識する抗体によって同定することが出来る。この種類の抗体は、O'Rourke, et al., *Oncogene*, 16:197-1207 (1998) に記載されている。更に、第二次抗体が蛍光源又は免疫磁気ビーズに結合している場合には、この第二次抗体を使用して更に、抗体で被覆された細胞を同定ないし選択することが出来る。ついで、選択マーカーを発現する遺伝的修飾細胞を、フローサイトメトリーを使用して選択するか、又は磁気被覆細胞は磁石を使用して選択する。

#### 【0070】

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

#### 【0071】

上記の各方法は本明細書中では詳細に記載しない。それらは当業者には周知である。簡潔に述べれば、抗体は周知の方法によって得ることができ、又は、Harlow, et al., "Antibodies: A Laboratory Manual: (1988), Biosupplynet Source Book, (1999) Cold Springs Harbor Laboratory を参照することが出来る。対象となる抗原と反応するポリクローナル又はモノクローナル抗体生産細胞のい

ずれも製造することが出来る。本発明によれば、抗体は変異PTKR選択マーカーの細胞外領域を認識しなければならない。より特異的には、細胞外領域の一部が、例えば、欠失のように修飾されている場合には、抗体は該変異PTKRの残りのアミノ酸配列のエピトープを認識しなければならない。

#### 【0072】

EGFRに対するモノクローナル抗体は市販されている。例えば、カリピオケム(CA)、ファーミンゲン(CA)、ベクトンディキソン(CA)、及びアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)(ヴァージニア)。抗体は、例えば、ゲル拡散、イムノアッセイ、免疫電気泳動、及び免疫蛍光によってインビトロでアッセイ及び同定される。遺伝的修飾細胞が標識されると、変異受容体に対する抗体と共にインキュベートされる。

#### 【0073】

遺伝的修飾細胞は、抗体、蛍光活性化セルソーター(FACS)のようなフローサイトメトリー又はビーズ選択(米国特許第5,011,912)を使用して物理的に分離される。

#### 【0074】

FACSでは変異PTKRを認識する抗体を用いて、PTKRを発現する細胞を同定する。この一次抗体はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(PE)、cy-クロム(CyC)、アロフィコシアニン(APC)、トリコール(TC)、又はテキサスレッド(TX)のような蛍光源に結合させることが出来る。第一次抗体が蛍光源に結合していないときは、蛍光源に結合する第二次抗体を変異PTKRを発現する細胞を含む細胞試料に導入し、第一次抗体によって認識される。第一次抗体は変異PTKRに付着する。第二次抗体は第一次抗体に結合し、この第二次抗体を有する細胞は蛍光を発する。分離は蛍光活性化セルソーターによって行うことが出来る。

#### 【0075】

変異PTKR、及び適宜目的とするタンパク質をコードする第二核酸配列を発現する遺伝的修飾標的細胞を、同定及び選択の前又は後に、該細胞を当業者に周知の方法で添加物有無にかかわらず数日又は数週間適当な培地で培養して増殖す

ることが出来る(Freshney, Celis, 及び Coligan 上記)。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

【実施例1】

A. ヒトEGFR cDNAの単離

ヒトEGFR cDNAは、大腸アデノカルシノーマSW480セルライン(Marathon cDNA Clontech (CA); Leibowitz, et al., CancerResearch 36:4562-4569 (1976)) から得られたcDNAからPCRによって単離する。以下のプライマーをLife Technologies (MD) から入手し、そこに記載の方法で使用する。

【0079】

【表1】

5' Primers:  
 EGFR1 CTA GGC TAG CAT GCG ACC CTC CGG GAC GGCC SEQ ID NO. 3  
 EGFR2 CTC TGC CCG GCG AGT CGG GCT GAC AGC TAT GAG ATG GAG GAA SEQ ID  
 NO. 4

3' Primers:  
 EGFR3 TTC CTC CAT CTC ATA GCT GTC AGC CCG ACT CGC CGG GCA GAG SEQ ID  
 NO. 5  
 EGFR2220R GGA TAT CCT ACG TGC GCT TCC GAA CGA TGT G SEQ ID NO. 6

## 【0080】

B. EGFR1-Iの製造

SW480大腸アデノカルシノーマセルラインcDNAから、EGFR細胞内欠失変異体(図2及び3)を製造するために、プライマーEGFR1及びEGFR2220Rを使用する。図2の配列のアミノ酸残基679-1210を欠失させ、このEGFR変異体をEGFR1-Iと命名する。

## 【0081】

5'プライマーEGFR1はEGFRの開始コドンのカバーする。3'プライ

マーEGFR2220Rは配列番号2(図2)のアミノ酸679の代わりに停止コドンを含む。プライマーEGFR1及びEGFR2220Rを用いることで、アミノ酸残基679-1210が欠失したEGFR配列を増幅することができる。

#### 【0082】

以下のPCR反応を行った。マラソン(Marathon) cDNA (~0.5ng) をアドバンテージ(Advantage) cDNA緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH=7.5, 42 ), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% Gelatin, 2.5 μmol dATP, 2.5 μmol dCTP, 2.5 μmol dGTP, 2.5 μmol dTTP), 0.01 OD260 プライマーEGFR1及び0.01 OD260EGFR2220R、1 μlアドバンテージcDNAポリメラーゼ(Life Technologies; MD)、5U Pfuターボ(Turbo)ポリメラーゼ(Pyrococcus furiosus 由来) (Promega; WI) 及び水(最終容積 50 μl) と混合する。PCRは以下の通り実施する。サイクル1: 95 で5分間; サイクル2-15: 95 で1分間、60 で1分間、68 で4分間; 及びサイクル16: 68 で10分間。

#### 【0083】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして50 μl 水に再懸濁する。

#### 【0084】

上記PCR反応物1 μlを再度増幅し、上記PCR反応物1 μlに加えて、反応混合物は第2回目の増幅用に以下のものを含む: Pfu緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH=8.8), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 % Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 2.5 μmol dATP, 2.5 μmol dCTP, 2.5 μmol dGTP, 2.5 μmol dTTP, 0.01 OD260 プライマーEGFR1及び0.01 OD260EGFR2220R、5U Pfuターボ(Turbo)ポリメラーゼ(Pyrococcus furiosus 由来) (Promega; WI) 及び水(最終容積 50 μl)。PCRは以下の通り実施する。サイクル17: 95 で5分間; サイクル18-48: 95 で1分間、60 で1分間、72 で4分間; 及びサイクル49: 72 で10分間。

#### 【0085】

反応はPCRマシン中で4℃に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして20 µl 水に再懸濁する。PCR反応物を1×TAEゲル上にロードする。約2200 bp大のバンドをゲルから単離し、製造業者のプロトコールに従ってSrfI制限酵素部位pPCRスクリプトAmpベクター(Strategene; CA) 内でクローンする。得られるベクターをpPCR-スクリプト(Scr ipt)EGFR1-Iと呼ぶ。サブクロニングしたPCR産物の正確さは制限酵素分析及び周知の配列決定方法で確認する。

#### 【0086】

##### C. EGFR1-I Iの製造

EGFR1-I Iは細胞内領域にEGFR1-Iと同じ欠失(679の代わりに停止コドン)を含む。更に、図2(配列番号2)に示したEGFRの細胞外領域においてアミノ酸25-312が欠失している。その結果、EGFRの細胞外領域においてシグナルペプチドであるアミノ酸1-24がアミノ酸313と融合している。EGFRの細胞外領域を欠失させる為に、以下詳細に記載するプロトコールを用いる。White, ed. Methods in Molecular Biology, Chapter 25(1993)も参照されたし。この方法は「オーバーラップ伸長による遺伝子スプライシング(Gene SOEing)」として当業者に知られている(図4)。

#### 【0087】

プライマーペアEGFR1/EGFR3及びEGFR2/EGFR2220Rを用いて2つのPCR産物(a)及び(b)を増幅する。プライマーEGFR3はアミノ酸313-319のヌクレオチド配列に融合するアミノ酸18-24をコードする。EGFR1/EGFR3プライマーを使用して、アミノ酸313-319に融合するアミノ酸1-24をコードするPCR産物を製造する。

#### 【0088】

プライマーEGFR2はプライマーEGFR3と同じアミノ酸を逆方向でコードするものである。プライマーEGFR2220Rはアミノ酸679の代わりに停止コドンを含む。上記Bセクションにおいて記載したように、これによってアミノ酸678の後の細胞内領域が欠失する。

## 【0089】

これら2つのプライマーペアを用いて、アミノ酸18-24及びアミノ酸313-319をコードする配列にオーバーラップする2つのPCR産物(a)及び(b)が得られる(図4 第1PCR反応)。

## 【0090】

第二番目のPCR反応において、プライマーEGFR1及びEGFR2220Rを中間PCR産物(a)及び(b)と共に使用する。これらの中間PCR産物を混合し、変性し、そしてアニールすると、2つのPCR産物の鎖の一つはそれらの3'末端でオーバーラップし、もう一方のプライマーとして機能して変異産物を生み出す。その後、変異PCR産物(c)をプライマーEGFR1及びEGFR2220Rを用いて増幅する。得られるPCR産物は、停止コドンを679に有し野生型EGFRのアミノ酸313-678と野生型EGFRのアミノ酸1-24が融合したEGFR1-IIをコードする(図4)。

## 【0091】

PCR反応は以下のとおりである。第一PCR反応:a) 0.01 OD260 プライマーEGFR1及び0.01 OD260 EGFR3及びb) 0.01 OD260 プライマーEGFR2及び0.01 OD260 EGFR2220Rを、マラソン(Marathon) cDNA (~0.4 ng)、1xアドバンテージcDNAポリメラーゼ緩衝液(上記B)、1 µlアドバンテージcDNAポリメラーゼ、2.5 µmol dATP, 2.5 µmol dCTP, 2.5 µmol dGTP, 2.5 µmol dTTP、5U Pfuポリメラーゼ(Promega) 及び水(最終容積 50 µl)と混合する。PCRは以下の通り実施する。サイクル1:94 で5分間; サイクル2-16:94 で0.5分間、60 で1分間、68 で7分間; 及びサイクル17:68 で10分間。

## 【0092】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして50 µl 水に再懸濁する。

## 【0093】

上記PCR反応物(a)及び(b)各5 µlを再度増幅する。各PCR反応物に加

えて、反応混合物は第2回目の増幅用に以下のものを含む： a) 0.01 OD260 プライマー E G F R 1 及び 0.01 OD260 E G F R 3 及び b) 0.01 OD260 プライマー E G F R 2 及び 0.01 OD260 E G F R 2 2 2 0 R 1 x Pfu 緩衝液, 2.5  $\mu$ mol dATP, 2.5  $\mu$ mol dCTP, 2.5  $\mu$ mol dGTP, 2.5  $\mu$ mol dTTP, 5U Pfuポリメラーゼ (Promega; WI) 及び水 (最終容積 50  $\mu$ l)。PCRは以下の通り実施する。サイクル 18 : 94 で5分間 ; サイクル 19 - 49 : 94 で0.5分間、60 で1分間、72 で6分間 ; 及びサイクル 50 : 72 で10分間。

#### 【0094】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたPCR産物をフェノール/クロロホルムで抽出し、0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして20  $\mu$ l水に再懸濁する。

#### 【0095】

第二番目のPCR反応において、PCR反応物 (a) 及び(b)を等量で混合し、プライマー E G F R 1 及び E G F R 2 2 2 0 R を用いてPfuターボポリメラーゼ (Stratagene) で再増幅する。PCR混合はサイクル 18 - 50 と同じである。PCRは以下の通り実施する。サイクル 1 : 95 で5分間 ; サイクル 2 - 32 : 95 で1分間、60 で1分間、72 で4分間 ; 及びサイクル 33 : 72 で10分間。PCR反応物を上記ゲル上にロードする。1200 bp までのバンドをゲルから単離する。製造業者のプロトコールに従って S r f I 制限酵素部位 p PCR スクリプト A m p ベクター (Stratagene; CA) 内でクローンする。得られるベクターを p PCR - スクリプト E G F R 1 - I I と呼ぶ。サブクロニングしたPCR産物の正確さは制限酵素分析及び周知の配列決定方法で確認する。

#### 【0096】

#### D. 変異 E G F R を含むレトロウイルスベクター及びウイルス上清の製造

p PCR - スクリプト E G F R 1 - I 及び p PCR - スクリプト E G F R 1 - I I から、制限部位 NotI 及び XhoI でそれぞれ切り出した E G F R 1 - I 及び E G F R 1 - I I 配列を、NotI 及び XhoI で切断されたマウス白血病ウイルス (M o M L V) に基づくレトロウイルスベクター p G l a (GTI, Maryland) ? (pGla

変異配列 - IRES-神経増殖因子受容体 (NGFR) の多価クローニング部位にクローニングする。これらのレトロベクターは pG1aEGFR1 - I 及び pG1aEGFR1 - II と名付ける。

【0097】

構築物を、サイトメガロウイルス (CMV) の調節下で水泡性口内炎ウイルス G - タンパク質 (VSV - Gエンベロープ) を発現するエンベロープ構築物 pCiGL と共に、ヒト胚腎臓細胞 293T (293T細胞) にコトランスフェクションする。更に、293T細胞にパッケージング構築物 pCiGP (CMV プロモーター調節下の MoMLVgag-pol をコードする) を CaCl<sub>2</sub>法 (Clontech; CA) によりコトランスフェクションする (W097/21825 及び Rigg et al., Virology 21:290-295 (1996))。

【0098】

ウイルス上清をトランスフェクションの 24, 48, 72 時間後に回収し、ベックマンGS-6KR 遠心分離機内で 1200 rpm で遠心分離して粒子物質を除去し、その後直ちに細胞を形質転換するために使用するか、又は乾燥氷/メタノール浴中で保存する。ウイルス上清をパッケージング細胞系 (セルライン) ProPak - A - 6 (PPA - 6) (Systemix, Inc.) を形質導入するのに使用する。PPA - 6セルラインは、CMV プロモーター調節下で両指向性MLVエンベロープ及びMLVgag-polを発現する293T細胞由来のセルラインである。PPA - 6細胞を免疫磁気ビーズ選択でソートするか、又は、細胞が発現するEGFRが少量である場合には、以下に記載するFACS sortingにより細胞をソートする。PPA - 6細胞からの上清を形質導入の2, 3および4日後に回収し、293T細胞の場合と同様に処理する。製造されるPPA - 6細胞からの上清には、両指向性エンベロープを有しヒト初代細胞及びセルラインへの形質導入に使用することのできる組換えウイルス粒子が含まれている。

【0099】

E. 組織培養及びセルライン:

以下のセルライン及び初代細胞を使用する: (a) ヒトTセルライン、CEMSS (Frederico, et al., J. Biol. Regul. Homeost Agents, 7:41-49 (1993))、

(b) ヒト胚腎臓細胞 293T (293T) (Pear, et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 90:8392-8396 (1993))、及び(c) PPA-6 (Pear, et al., 上記)。ヒト初代T細胞は、フィコール勾配遠心を用いてヒト血液から単核細胞画分を分離して得る (Noble 及びCutts, Can. Vet. J. 8:110-111 (1967)、及びBoyle 及びChow, Transfusion 9:151-155 (1969))。スタンフォード血液バンクから入手したヒト血液 (バッフィーコート Pietersz, et al., Vox Sang 49:81-85 (1985) Pietersz, et al., Blut. 54:201-206 (1987)) をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で1:1に希釈する。50ml試験管内で15mlの血液を21mlのフィコール (Ficoll) (Isoprep; Robbins Scientific, CA) の上に載せる。室温においてベックマンGS-6KR 遠心分離機内で1700ppmにて30分間の勾配をかけ、ブレーキを使用しないで停止させる。末梢血単核細胞 (PBMC) はリンフォプレップ (Lymphoprep) の境界から回収する。

#### 【0100】

得られるPBMCは第二回目のフィコール勾配上で精製され、残存する赤血球細胞を除去する。PBMCを組織培養フラスコ内の以下のPBMC用培地で37、5%CO<sub>2</sub>下で1時間インキュベートし、マクロファージ等の接着性細胞を組織培養フラスコに付着させる。非接着性細胞 (T/B/NK細胞) を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞を精製する。細胞 (2 × 10<sup>8</sup>) を300µlの抗CD4抗体と共に4 で1時間インキュベートする。細胞をPBSで3回洗浄し、1 × 10<sup>8</sup>個の抗マウスIgG結合免疫磁気ビーズ (Dyna1. 0slo) と4 で1時間インキュベートする。細胞とDyna1磁石上で10分間インキュベートすることによって、抗CD4抗体及び二次抗体結合ビーズに結合したCD4<sup>+</sup>細胞が陽性 (ポジティブ) 選択される。非結合細胞を除去した後に、残存細胞を磁気から取り、培養 (下記) におく。通常、ビーズは細胞上に10日までは残る。

#### 【0101】

CD34<sup>+</sup>細胞はG-CSF可動性末梢血 (MPB) からIsolex 300SA又は300I (Baxter, IL) (Systemix, CA) を用いて単離する。細胞は約80-90%の純度である。

#### 【0102】

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

#### 【0103】

細胞をDMEM、10%F B S、1%ピルビン酸ナトリウム、及び1%L - グルタミン ( 2 9 3 T , - 6 ) ; R P M I、10%F B S、1%ピルビン酸ナトリウム、及び1%L - グルタミン ( C E M S S ) ; イスコフ培地、10%F B S、及び1%L - グルタミン、1%I T S ( 0 . 5mg/ml ストック)、1%MEMビタミン ( ヒトP B M C ) で培養する。C D 4<sup>+</sup>T細胞は10 - 12日毎に1 - 2 μ g / m l P H A、照射フィーダー細胞及び40U/ml I L - 2で刺激する。

#### 【0104】

照射フィーダー細胞は以下のように調製する。P B M Cを上記のように単離し、3500radで照射する。この細胞を、6000radを照射したB細胞リンパ腫JYと10 : 1の割合で混合する(Barbosa, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:7549-7553 (1984))。

#### 【0105】

休止状態のT細胞を得るために、刺激後4 - 5日にT細胞を20U/ml I L - 2を含有する新鮮な培地に移す。C D 3 4<sup>+</sup>細胞はXビボ15、50ng/ml トロンボポイエチン (TPO; R&D Systems, MN)、100ng/ml f l t - 3リガンド ( F L )、100ng/ml スチール因子 ( S F , Systemix, Inc.) 中で増殖させる。

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

#### 【0106】

F . P P A - 6、ヒトTセルライン、初代T細胞、及び、C D 3 4<sup>+</sup>細胞の形質

導入:

293T細胞又はPPA-6細胞のいずれかから製造したウイルスの上清1-3mlを用いて、ステップ(E)からの $10^6$ 細胞/mlを $8\mu\text{g/ml}$ 硫酸プロタミン(Sigma, Missouri)と共にスピノキュレーション(sp inoculation)により形質導入する。スピノキュレーションは37で3時間、3000rpm(CD34<sup>+</sup>細胞、PPA-6)、又は2750rpm(ヒトTセルライン、CEMSS)で実施する。PPA-6細胞は6穴プレートで形質導入する。非接着性細胞は6ml試験管(VWR)内で形質導入する。ヒトT細胞及びCD34<sup>+</sup>細胞は形質導入の2日前に、それぞれ、PHA/IL-2又はTPO/FL/SFで活性化する。

## 【0107】

G. EGFR1-I及びEGFR1-IIを発現する細胞のFACS分析、FACS sorting、及び、免疫-磁気ビーズによる選択:

以下の抗体及び試薬を用いて染色を行う。CD4-FITC(Caltag, CA)、抗CD34-APC(Becton Dickinson, NJ)、Thy-1-PE(Becton Dickinson, NJ)、ヨウ化プロピディウム(PI, Sigma)、非共役(conjugated)抗EGFR抗体(GR01)(Calbiochem; CA)、ヤギ抗マウスIgG-PE/FITC(Caltag, CA)、ヤギ抗マウスIgG2a-PE/FITC(Caltag, CA)、抗マウスIgG結合磁気ビーズ(Dynal, Oslo)。抗体及び免疫ビーズは製造者のプロトコールに従い使用する。 $1 \times 10^6$ 個の細胞を $50\mu\text{l}$  PBS/2% FBS中で20~60分間4で染色する。二次抗体を使用するときには、細胞を $2\text{ml}$  PBS/2% FBSで一度洗浄し、もう一度 $50\mu\text{l}$  PBS/2% FBS中でインキュベートし、そして第二次抗体を添加する。FACS分析の前に、細胞を更にPBS/2% FBSで一度洗浄し、遠心分離し、 $1\mu\text{g/ml}$ のPIを含有する $500\mu\text{l}$  PBS/2% FCS中に再懸濁する。FACS分析は製造者の指示に従いFACSscan(Becton Dickinson Immunocytometry Group; CA)により実施する。

## 【0108】

マーカー遺伝子である、EGFR1-I及びEGFR1-IIを発現する細胞

は以下のようにソートする。  $2 \times 10^7 / \text{ml}$  PBS / 2% FBSの細胞を抗EGFR抗体（少なくとも  $1 \mu\text{l}$  抗体 /  $10^7$  細胞；GR01）で染色する。細胞をPBS / 2% FBSで二度洗浄し、抗EGFR抗体を認識する、蛍光源（FITC, PE）共役ラット抗マウスIgG抗体（ $5 \mu\text{l} / 10^6$  細胞）とインキュベートする。細胞は更にPIで染色し、死滅細胞と生存細胞を識別する。  $1 \times 10^6$  細胞 / mlにつき、EGFR陽性及びPI陰性細胞についてソートする。これは、製造者の指示に従い、FACSstar Plus（Becton Dickinson Immunocytometry Group; CA）により実施する。

#### 【0109】

ビーズ選択によって細胞を単離するために、細胞を抗EGFR抗体で染色する。  $10^7 / \text{ml}$  をPBS / 2% FBS中の  $10 \mu\text{l}$  抗EGFR抗体（GR01）と氷上で時々揺らしながら1時間インキュベートする。細胞をPBS / 2% FCSで3回洗浄し、抗EGFR抗体を認識する抗IgG抗体結合磁気ビーズ（Dyna1, Oslo）を添加する（陽性細胞当たり～5個のビーズ）。再度、細胞を氷上で1時間インキュベートする。EGFRを発現する細胞がDyna1磁気により10分間で陽性選択される。非結合細胞は除去され、EGFRを発現する細胞が培養に提供される（ステップ（E））。

#### 【0110】

図5は、PPA-6細胞から製造した上清で形質導入した後のEGFR1-ICD34<sup>+</sup>細胞の発現を示す。初代ヒトT細胞はPPA-6上清で形質導入され、免疫磁気ビーズで選択され、FACSstar Plusでソートされる（データしめさず）。細胞は16%から92%まで濃縮される。

#### 【0111】

##### 【実施例2】

##### A. ヒトMuSK-R cDNAの単離

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

## 【0112】

【表2】

MuSK21FN: CGT CCT GCG TGA GCC TGG ATT AAT C	SEQ ID NO: 9
MuSK34FN: GCC TGG ATT AAT CAT GAG AGA GCT C	SEQ ID NO: 10
MuSK2666RN: CGA GGC CTG TCT TCA ACC TTA GAC ACT CAC AGT TCC CTC TGC	SEQ ID NO: 11

## 【0113】

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

## 【0114】

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

## 【0115】

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

## 【0116】

上記PCR反応物10 μlを再度増幅する。上記PCR反応物10 μlに加えて、反応混合物は第2回目の増幅用に以下のものを含む: Pfu緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH=8.8), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 % Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 2.5 μmol dATP, 2.5 μmol dCTP, 2.5 μmol dGTP, 2.5 μmol dTTP, 1 μg プライマー-MuSK21FN, 1 μg プライマー-MuSK2666RN、5U Pfu ターボ(Turbo) ポリメラーゼ(Pyrococcus furiosus 由来) 及び水(最終容積 50 μl)。PCRは以下の通り実施する。サイクル13: 94 で5分間; サイクル14 - 43: 94 で0.5分間、62 で1分間、72 で6分間; 及びサイクル44: 72 で10分間。

## 【0117】

反応はPCRマシン中で4 に冷却し、次に増幅されたcDNAを0.3 M 酢酸ナトリウム中でエタノール沈殿させる。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして20 μl 水に再懸濁する。PCR反応物を1xTAEゲル上にロードする。2600 bp大迄のバンドをゲルから単離し、製造業者のプロトコールに従ってSrfI制限酵素部位pPCRスクリプトAmpベクター(Strateg

ene; CA) 内でクローンする。得られるベクターを pPCR - スクリプトMuSK - R - wt と呼ぶ。サブクロニングしたPCR産物の正確さは制限酵素分析及び周知の配列決定方法で確認する(ヌクレオチド配列は配列番号7で示されている)。

【0118】

B. PCRによるMuSK - Rの細胞内領域における変異の作成:

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

【0119】

【表3】

Primer 1380F: 5' pCG GCC TGT GCC AGA CTG CCA CAT CTA G (SEQ ID NO: 12);  
 Primer 1657R: 5' pCG TCT AGG TGA GGG TTA CTG CTG  
 CTG ATT CTC (SEQ ID NO: 13)  
 Primer 1747R: 5' pGG TTA ACC CTA TTC AAT GTT ATT  
 CCT TGA ATA CTC CAG (SEQ ID NO: 14).

### 【0120】

プライマーMuSK1380F及びMuSK1657Rを使用することによって、MuSK-Rのアミノ酸残基538-879の欠失が生じ、プライマーMuSK1380F及びMuSK1747Rを使用することによって、MuSK-Rのアミノ酸残基577-879の欠失が生じる。これら2つのMuSK-R変異体をMuSK-R 538-879 (MuSK-R I) 及びMuSK-R 577-879 (MuSK-R II) 名付ける。MuSK-R I及びMuSK-R IIの双方とも、MuSK-Rの細胞内領域の殆どが欠失している(図6参照)。本発明を何ら拘束するものではないが、この2つの切断により、図6に示した野生型MuSK-Rの殆どの基質結合モチーフ及びキナーゼ領域が欠失するものと

考えられる。

#### 【0121】

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

#### 【0122】

2つのPCR産物MuSK-RI(nt1380-1614)及びMuSK-RII(nt1380-1728)を製造業者のプロトコールに従ってSrfI制限酵素部位pPCRスクリプトAmpベクター(Stratagene; CA)内でクローンする。これらの構築物にはMuSKの5'コーディング領域(nt1-1379)が欠けているので、この配列をpPCR-スクリプトMuSK-R-wtから制限酵素部位NaeI及びAatIIを用いて切り出す。修飾MuSK配列nt1-1614及びnt1-1728を有するpPCR-スクリプトをそれぞれ、pPCR-スクリプトMuSK-RI及びpPCR-スクリプトMuSK-RIIと呼ぶ。ベクターの正確性は当業界で周知の制限酵素分析及び配列決定法により確認する。

#### 【0123】

C. 変異MuSK-Rを含むレトロウイルスベクター及びウイルス上清の製造

野生型MuSK-R及び変異体MuSK-RをpPCR-スクリプトMuSK-R-wt、pPCR-スクリプトMuSK-RI、及びpPCR-スクリプトMuSK-RIIから、NotI及びXhoI部位を使用して切り出し、NotI及びXhoIで切断されたマウス白血病ウイルス(MoMLV)に基づくレトロウイルスベクターpGlaの多クローニング部位にクローニングする。これらのレトロベクターはpGlaMuSK-R、pGlaMuSK-RI、及びpGlaMuSK-RIIと名付ける。これらの構築物を使用して実施例1に記載したように、ウイルス上清を製造する。

【0124】

D. 組織培養及びセルライン：

実験は実施例1に記載の方法と同じ方法で行う。

【0125】

E. PPA-6及びヒトTセルラインの形質導入：

実験は実施例1に記載の方法と同じ方法で行う。

【0126】

F. MUSK-RI及びMUSK-RIIを発現する細胞のFACS分析、及び、免疫-磁気ビーズによる選択：

実施例1で挙げられた抗体に加えて、抗MuSK-Rポリクローナル血清、抗MuSK-Rハイブリドーマ上清(以下のセクションG参照)を使用してフローサイトメトリー及び免疫磁気ビーズ選択を行う。

【0127】

ビーズ選択によって細胞を単離するために、細胞を抗MuSK-R抗体で染色する。このために、細胞 $10^7$ /mlをPBS/2%FBS中の1-3ml抗MuSK-Rハイブリドーマ上清と氷上で時々振りながら1時間インキュベートする。細胞をPBS/2%FCSで3回洗浄し、抗MuSK-R抗体を認識する抗IgG抗体結合磁気ビーズを添加する(陽性細胞当たり~5個のビーズ)。再度、細胞を氷上で1時間インキュベートする。MuSK-Rを発現する細胞がDyna1磁気により10分間で陽性選択される。非結合細胞は除去され、MuSK-R

を発現する細胞が培養に提供される（ステップ（D））。

【0128】

G. MuSK-Rの細胞外領域に対するモノクローナル抗体の製造：

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

【0129】

【表4】

MuSK 116FPC: 5' pCT TCC AAA AGC TCC TGT CAT CAC C SEQ ID NO: 15  
MuSK 1532RC: 5' pCC AGT CAT GGA GTA TGT AGG TGA GAC SEQ ID NO: 16

### 【0130】

プライマーMuSK116FPCはシグナルペプチド(nt69-93)の後から配列を開始する。プライマーMuSK1532RCは膜貫通領域開始の前の配列及び膜貫通領域の最初の2つのアミノ酸(配列番号7のヌクレオチド1462-1586に対応)をカバーする。PCR反応は、~10 µg hMuSK-R-wt DNA、1 x Pfu緩衝液、2.5 µmol dATP、2.5 µmol dCTP、2.5 µmol dGTP、2.5 µmol dTTP、1 µg プライマーMuSK116FPC、1 µg プライマーMuSK1532RC、5U Pfu ターボ(Turbo) ポリメラーゼ及び水(最終容積 50 µl)。PCRは以下の通り実施する。サイクル1:95 で5分間; サイクル2-7:96 で0.5分間、60 で1分間、72 で6分間; サ

イクル8 - 27 : 95 で0 . 58分間、58 で1分間、72 で6分間 ; 及びサイクル28 : 72 で10分間。反応はPCRマシン中で4 に冷却し、PCR反応物をゲルで精製する。PCR断片をSecTag 2bのEcoRV部位にクローニングする。こうして、MusK - R XCをN末端のIg リーダー並びにC末端のmyc - 及び(His)<sub>6</sub> - tagのフレーム内にクローニングされる。得られるプラスミドをpSecTag - hMUSK - Rと呼ぶ。

#### 【0131】

MusK - R XCを発現させる為に、プラスミドpSecTag - hMUSK - RをCaCl<sub>2</sub>法(セクションCに記載)により293T細胞にトランスフェクトする。トランスフェクションも24時間後に、培地を新鮮なDMEM / 10%FBS又は無血清X - Vivo15と交換する。トランスフェクションした細胞の上清を48時間及び72時間後に回収する。全部で400mlの上清を回収し、精製するまで-80 で凍結する。

#### 【0132】

MusK - R XCは組織培養上清から固定化金属アフィニティークロマトグラフィにより精製する。金属イオンは0 . 1M NiCl<sub>2</sub>である。カラムは1又は5mlファルシア金属HiTrapキレーティングセファロースカラムである。平衡緩衝液(緩衝液A)は、20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7 . 4、1Mグアニジン塩酸、及び1M NaClから成り、0 . 2µMセルロースアセテートフィルターを通す。溶出緩衝液(緩衝液B)は、20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7 . 4、1Mグアニジン塩酸、及び1M NaCl、及び0 . 5M イミダゾールから成り、0 . 2µMセルロースアセテートフィルターを通す。ファルシアFPLCクロマトグラフィシステムを用いて、FPLC操作プログラムソフトウェア及びファルシアP50ポンプが備わったカラムを操作する。精製は4にて実施する。

#### 【0133】

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

## 【0134】

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

## 【0135】

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

## 【0136】

ドットブロットアッセイ陽性試料を試験するために、各画分10 μlをニトロセルロースにピペットする。この膜を乾燥させ、スーパーブロックでブロックし、MuSK-Rタンパク質に対してプローブし、インディアウェスタン(India Western: 下記)に記載のように発色させる。

## 【0137】

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

## 【0138】

ウェスタンブロット分析用に、画分当たり25 - 35 μlを使用する。グアニジン含有画分を氷冷エタノール内で沈殿させ、氷上で15分間又は4で一晩保存する。試料を冷蔵されたマイクロ遠心機(TOMY)にて14,000 rpmで10分間遠心する。上清を捨て、氷冷アセトンを添加し、上記のように遠心する。ペレットを5%メルタカプトエタノール含有SDS試料緩衝液(Novex)(最終容積: 50 - 70 μl)に再懸濁する。試料を90以上で5分間変性させ、短時間遠心し、25 - 35 μlを4 - 20%勾配ゲルにロードする。Bi

orad湿式移動プロットングカセットをトリス-グリシン-メタノール移動緩衝液(25 mM トリスマ塩基 (Trizma base)、192 mMグリシン、20%メタノール)を用いて、ゲルを0.45 μMニトロセルロース上に、1.4時間で移動させる。ゲルのプロットング後に、プロットをPierce TBS スーパーブロック中で10分間穏やかに攪拌しながらブロックする。回転プラットフォーム上で、プロットをTBS T (50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) でそれぞれ5分間かけて2度洗浄する。Pierce India (商標) His-HRP プローブを1:5,000にTBS Tで希釈し、プロットをこのプローブとともに室温で1時間インキュベートし、TBS Tで3回洗浄する。その後、西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)試薬(Sigma Fast HRP非溶解性基質D4418)をプロットに添加し、プロットを発色させる。或いは、マウス抗c-myc抗体(Santa Cruz Biochemistry; CA)を用いて、組換えMuSK-Rタンパク質を検出する。この抗体はスーパーブロック中で1 μg/mlの最終濃度まで希釈する。プロットをTBS Tで3回洗浄し、ヤギ抗マウスIgG-HRP抗体(Sigma)をスーパーブロック中1:5,000で希釈したものを添加する。プロットを室温で穏やかに攪拌しながら1時間インキュベートし、Sigma Fast HRP非溶解性基質を用いて上記のように発色させる。認識されたタンパク質はSDS-PAGE上を約85 kDで移動し、グリコシル化によって19 kD重くなっていると考えられる。

#### 【0139】

組換えMuSK-Rタンパク質を3匹のBalb/cマウスに注射する。この目的のために、25-50 μgを2.25 mgアルハイドロゲル(alhydrogel)及び100 μgMDP(ムラニルジペプチド:Pierce)を混合し(最終容積200 μl)、14日毎に5回皮下注射する。3回目及び5回目の注射の後に、FACS分析及びElisaによりMuSK-Rに対する反応性に関して3匹の血清を試験する。FACS分析には、 $5 \times 10^5$ 個のセルラインCEMSS及びCEMSSMuSK-Rを使用する。プレ血清及び血清の双方を1:100、1:300、1:900及び1:2700に希釈する。ラット抗マウスIgG-PE抗体を1:200の希釈で第二次抗体として使用する。Elisaの為には

、96穴プレートに10 µg/ml抗マウスIgG Fc (Jackson; Maine) 抗体50 µlで被覆する。プレートを様々な希釈(1:100~1:218700)の血清とインキュベートし、その後、MuSK-Rタンパク質、及び、1:1000希釈のニッケル活性化西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP、Pierce)とインキュベートする。ニッケル活性化HRPは組換えMuSK-Rタンパク質に(His)<sub>6</sub>-tagを介して結合する。これを発色するには、プレートをTMPペルオキシダーゼ基質(Zymed; CA)とインキュベートする。これら双方のアッセイにおいて、一匹のマウスが天然及び組換えMuSK-Rに対して最高の反応性を示す。このマウスにPBS中のMuSK-R(200 µg)による6回目の注射でブーストを施す。注射は皮下及び静脈下で行う。1週間後に脾臓を摘出し、リンパ球をリンフォライト(Lympholite) M (Accurate Chemicals) で単離し、50%ポリエチレングリコールを用いて、骨髄腫セルラインP3X63AG8.0653と標準操作により融合させる。得られるハイブリドーマはHATバルク状で培養する。リンフォライト(Lympholite) M を用いて、生存細胞を回収し、クローニング因子(Igen)含有HAT培地中で培養する。ハイブリドーマが更に1週間増殖したら、細胞バッチの一つを10%DMSOを含有するHAT培地中に凍結保存する。もう一方の細胞バッチは、単一細胞デポジットユニットを用いるFACS sorting によって各クローンに分割する。前方および側方散乱によりPI陰性細胞をソートする。細胞をHAT培地中で2週間培養する。天然及び組換えMuSK-Rタンパク質を認識できるモノクローナル抗体に関して、上清をElisa及びFACSで試験する。IgG1、2a、2b、3、IgM、及び と反応する第二次抗体(Caltag, CA)を使用するElisaアッセイによって抗体のアイソタイプを同定する。

#### 【0140】

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

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG  
 VERES, GABOR  
 PIPPIG, SUSANNE  
 <120> selectable cell surface marker genes  
 <130> 4-31192  
 10 <150> us 60/166594  
 <151> 1999-11-19  
 <150> us 09/539248  
 <151> 2000-03-30  
 <160> 16  
 <170> PatentIn version 3.

<210> 1  
 <211> 3633  
 20 <212> DNA  
 <213> EGFR  
 <400> 1

	atgcgaccct	ccgggacggc	cggggcagcg	ctcctggcgc	tgctggctgc	gctctgcccg	60
	gcgagtcggg	ctctggagga	aaagaaagt	tgccaaggca	cgagtaacaa	gctcacgcag	120
	ttgggcactt	ttgaagatca	ttttctcagc	ctccagagga	tgttcaataa	ctgtgaggtg	180
	gtccttggga	atgttgaaat	tacctatgtg	cagaggaatt	atgatctttc	cttcttaaag	240
	accatccagg	aggtggctgg	ttatgtcctc	attgccctca	acacagtgga	gcgaattcct	300
	ttggaaaacc	tgcatgatcat	cagaggaat	atgtactacg	aaaattccta	tgcttagca	360
	gtcttatcta	actatgatgc	aaataaaacc	ggactgaagg	agctgcccac	gagaaattta	420
30	caggaaatcc	tgcatggcgc	cgtgcggttc	agcaacaacc	ctgcccctgtg	caactggag	480
	agcatccagt	ggcgggacat	agtcagcagt	gactttctca	gcaacatgtc	gatggacttc	540
	cagaaccacc	tgggcagctg	ccaaaagtgt	gatccaagct	gtcccacatg	gagctgctgg	600
	ggtgcaggag	aggagaactg	ccagaaactg	accaaactca	tctgtgcccc	gcagtgtctc	660
	gggcgctgcc	gtggcaagtc	ccccagtgac	tgctgccaca	accagtgtgc	tgcaaggctgc	720
	acaggcccc	gggagagcga	ctgcctggtc	tgccgcaaat	tccgagacga	agccacgtgc	780
	aaggacacct	gccccccact	catgctctac	aaccaccaca	cgtaccagat	ggatgtgaac	840
	cccaggggca	aatacagctt	tggtgccacc	tgctggaaga	agtgtccccg	taattatgtg	900
	gtgacagatc	acggctcgtg	cgctccagcc	tggtggggccg	acagctatga	gatggaggaa	960
	gacggcgtcc	gcaagtgtaa	gaagtgcgaa	gggccttgcc	gcaaagtgtg	taacggaata	1020
40	ggtattggty	aatttaaaga	ctcactctcc	ataaatgcta	cgaatattaa	acacttcaaa	1080
	aactgcacct	ccatcagtyg	cgatctccac	atcctgcccg	tgccatttag	gggtgactcc	1140
	ttcacacata	ctcctcctct	ggatccacag	gaactggata	ttctgaaaac	cgtaaaggaa	1200
	atcacagggt	ttttgctgat	tcaggcttyg	cctgaaaaca	ggacggacct	ccatgccttt	1260
	gagaacctag	aatcatacag	cggcaggacc	aagcaacatg	gtcagttttc	tcttgcaatc	1320
	gtcagcctga	acataacatc	cttgggatta	cgctccctca	aggagataag	tgatggagat	1380
	gtgataatth	caggaaacaa	aaatttgytc	tatgcaataa	caataaactg	gaaaaaactg	1440
	tttgggacct	ccggtcagaa	aaccaaactt	ataagcaaca	gaggtgaaaa	cagctgcaag	1500
	gccacaggcc	aggtctgcca	tgctctgtgc	tccccgagg	gctgctgggg	cccggagccc	1560
	agggactgcy	tctcttgccg	gaatgtcagc	cgaggcaggg	aatgctggya	caagtgcaag	1620
50	cttctggagg	gtgagccaag	ggagttygtg	gagaactctg	agtgcataca	gtgccaccca	1680
	gagtgcctgc	ctcaggccat	gaacatcacc	tgcaacaggac	ggggaccaga	caactgtatc	1740
	cagtgtgccc	actacattga	cggccccacc	tgctgcaaga	cctgccccgc	aggagtcatg	1800
	ggagaaaaca	acaccctggt	ctggaagtac	gcagacgccc	gcatgtgtgt	ccacctgtgc	1860
	catccaaact	gcacctacgg	atgcactggy	ccaggtctty	aaggctgtcc	aacgaatggy	1920

	cctaagatcc	cgcccatcgc	cactgggatg	gtgggggccc	tcctcttgct	gctgggtgtg	1980
	gccttgggga	tcggcctctt	catgcgaagg	cgccacatcg	ttcgggaagcg	cacgctgctg	2040
	aggctgctgc	aggagaggga	gcttgtggag	cctcttacac	ccagtggaga	agctcccaac	2100
	caagctctct	tgaggatctt	gaaggaaact	gaattcaaaa	agatcaaagt	gctgggctcc	2160
	ggtgcttctg	gcacgggtga	taagggactc	tggatcccag	aaggtgagaa	agttaaaatt	2220
	cccgtcgtca	tcaaggaatt	aagagaagca	acatctccga	aagccaacaa	ggaatcctc	2280
	gatgaagcct	acgtgatggc	cagcgtggac	aacccccacg	tgtccgcct	gctgggcatc	2340
	tgctcaccct	ccaccgtgca	actcatcagc	cagctcatgc	ccttcggctg	cctcctggac	2400
10	tatgtccggg	aacacaaaga	caatattggc	tcccagtagc	tgctcaactg	gtgtgtgcag	2460
	atcgaaaagg	gcatgaacta	cttggaggag	cgctcgttgg	tgcaaccgca	cctggcagcc	2520
	aggaacgtac	tggtgaaaac	accgcagcat	gtcaagatca	cagatcttgg	gctggcctaa	2580
	ctgctgggtg	cggaagagaa	agaataccat	gcagaaggag	gcaaagtgcc	tatcaagtgg	2640
	atggcattgg	aatcaatttt	acacagaatc	tatacccacc	agagtgatgt	ctggagctac	2700
	ggggtgaccg	tttgggagtt	gatgaccttt	ggatccaagc	catatgacgg	aatccctgcc	2760
	agcgagatct	cctccatcct	ggagaaagga	gaacgcctcc	ctcagccacc	catatgtacc	2820
	atcgatgtct	acatgatcat	ggtcaagtgc	tggatgatag	acgcagatag	tcgccccaaag	2880
	ttccgtgagt	tgatcatcga	attctccaaa	atggcccagc	acccccagcg	ctacctgtgc	2940
	atccaggggg	atgaaagaat	gcatttgcca	agtcctacag	actccaactt	ctaccgtgcc	3000
20	ctgatggatg	aagaagacat	ggacgacgtg	gtggatgccc	acgagtagct	catcccacag	3060
	cagggtctct	tcagcagccc	ctccacgtca	cggactcccc	tcttgagctc	tctgagtcca	3120
	accagcaaca	attccaccgt	ggcttgcaat	gatagaaatg	ggctgcaaag	ctgtcccctc	3180
	aaggaagaca	gcttcttgca	gcgatacagc	tcagacccca	cagggcgcct	gactgaggac	3240
	agcatagacg	acaccttctt	cccagtgctt	gaatacataa	accagtccgt	tccccaaaag	3300
	cccgtggctc	ctgtgcagaa	tctctgtctat	cacaatcagc	ctctgaaccc	cgcgcccagc	3360
	agagaccac	actaccagga	ccccacagc	actgcagtgg	gcaacccccg	gtatctcaac	3420
	actgtccagc	ccacctgtgt	caacagcaca	ttcgacagcc	ctgcccactg	ggcccagaaa	3480
	ggcagccacc	aaattagcct	ggacaaccct	gactaccagc	aggacttctt	tccccaggaa	3540
	gccaagccaa	atggcatctt	taagggtctc	acagctgaaa	atgcagaata	cctaagggtc	3600
30	gcgcccacaaa	gcagtgaatt	tattggagca	tga			3633

<210> 2  
 <211> 1210  
 <212> PRT  
 <213> EGFR  
 <400> 2

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

	His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu	
	145	150 155 160
	Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met	
	165	170 175
	Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro	
	180	185 190
	Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln	
	195	200 205
10	Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg	
	210	215 220
	Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys	
	225	230 235 240
	Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp	
	245	250 255
	Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro	
	260	265 270
	Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly	
	275	280 285
20	Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His	
	290	295 300
	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu	
	305	310 315 320
	Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val	
	325	330 335
	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn	
	340	345 350
	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp	
	355	360 365
30	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr	
	370	375 380
	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu	
	385	390 395 400
	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp	
	405	410 415
	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln	
	420	425 430
	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu	
	435	440 445
40	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser	
	450	455 460
	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu	
	465	470 475 480
	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu	
	485	490 495
	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro	
	500	505 510
	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn	
	515	520 525
50	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly	
	530	535 540
	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro	
	545	550 555 560
	Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro	
	565	570 575



	Asp Val	Val Asp	Ala Asp	Glu Tyr	Leu Ile	Pro Gln	Gln Gly	Phe	
	1010			1015			1020		
	Phe Ser	Ser Pro	Ser Thr	Ser Arg	Thr Pro	Leu Leu	Ser Ser	Leu	
	1025			1030			1035		
	Ser Ala	Thr Ser	Asn Asn	Ser Thr	Val Ala	Cys Ile	Asp Arg	Asn	
	1040			1045			1050		
	Gly Leu	Gln Ser	Cys Pro	Ile Lys	Glu Asp	Ser Phe	Leu Gln	Arg	
	1055			1060			1065		
10	Tyr Ser	Ser Asp	Pro Thr	Gly Ala	Leu Thr	Glu Asp	Ser Ile	Asp	
	1070			1075			1080		
	Asp Thr	Phe Leu	Pro Val	Pro Glu	Tyr Ile	Asn Gln	Ser Val	Pro	
	1085			1090			1095		
	Lys Arg	Pro Ala	Gly Ser	Val Gln	Asn Pro	Val Tyr	His Asn	Gln	
	1100			1105			1110		
	Pro Leu	Asn Pro	Ala Pro	Ser Arg	Asp Pro	His Tyr	Gln Asp	Pro	
	1115			1120			1125		
	His Ser	Thr Ala	Val Gly	Asn Pro	Glu Tyr	Leu Asn	Thr Val	Gln	
	1130			1135			1140		
20	Pro Thr	Cys Val	Asn Ser	Thr Phe	Asp Ser	Pro Ala	His Trp	Ala	
	1145			1150			1155		
	Gln Lys	Gly Ser	His Gln	Ile Ser	Leu Asp	Asn Pro	Asp Tyr	Gln	
	1160			1165			1170		
	Gln Asp	Phe Phe	Pro Lys	Glu Ala	Lys Pro	Asn Gly	Ile Phe	Lys	
	1175			1180			1185		
	Gly Ser	Thr Ala	Glu Asn	Ala Glu	Tyr Leu	Arg Val	Ala Pro	Gln	
	1190			1195			1200		
	Ser Ser	Glu Phe	Ile Gly	Ala					
	1205			1210					
30	<210>	3							
	<211>	31							
	<212>	DNA							
	<213>	primer							
	<400>	3							
	ctaggctagc	atgcgaccct	ccgggacggc	c					31
40	<210>	4							
	<211>	42							
	<212>	DNA							
	<213>	primer							
	<400>	4							
	ctctgcccgg	cgactcgggc	tgacagctat	gagatggagg	aa				42
50	<210>	5							
	<211>	39							
	<212>	DNA							
	<213>	primer							
	<400>	5							
	ttcctccatc	tcatagctag	ccgactcgc	cgggcagag					39

<210> 6  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 6  
 ggatataccta cgtgcgcttc cgaacgatgt g

31

10 <210> 7  
 <211> 2607  
 <212> DNA  
 <213> MuSK  
 <400> 7

atgagagagc tCGTcaacat tccactggta catattctta ctctggttgc cttcagcgga 60  
 actgagaaac ttccaaaagc tcctgtcatc accactcctc ttgaaacagt ggatgcctta 120  
 gttgaagaag tggctacttt catgtgtgca gtggaatcct acccccagcc tgagatttcc 180  
 tggactagaa ataaaattct cattaactc tttgacacc ggtacagcat cggggagaat 240  
 caaaaggaag atgcaggaca gtatcgatgt gtggcaaaaa acagcctcgg gacagcatat 300  
 gccacaacat gtgtgggagg agctgtggag agttgtggag ccctgcaagt gaagatgaaa 360  
 20 cctaaaataa ctcgctcctcc cataaatgtg aaaataatag agggattaaa agcagtccta 420  
 ccatgtacta caatgggtaa tcccaacca tcagtgtcct ggataaaggg agacagccct 480  
 ctcaaggaaa attcccgaat tgcagttctt gaatctggga gcttgaggat tcataacgta 540  
 atgcaggag atgcaggaca gtatcgatgt gtggcaaaaa acagcctcgg gacagcatat 600  
 tccaaagtgg tgaagctgga atttgaggtt tttgocagga tcctgcgggc tcctgaatcc 660  
 cacaatgtca cctttggctc ctttgtgacc ctgactgta cagcaacagg cattcctgtc 720  
 cccaccatca cctggattga aaacggaaat gctgtttcct ctgggtccat tcaagagagt 780  
 gtgaaagacc gagtgattga ctcaagactg cagctgttta tcaccaagcc aggactctac 840  
 acatgcatag ctaccaataa gcatggggag aagttcagta ctgccaagcc tgacagccacc 900  
 atcagcatag cagaatggag taaaccacag aaagataaca aaggctactg cgcccagtac 960  
 30 agaggggagg tgtgtaatgc agtccctggca aaagatgctc ttgtttttct caacaacctc 1020  
 tatgcggaacc ctgaggaggcc ccaagagcta ctggtccaca cggcctggaa tgaactgaaa 1080  
 gtagtgagcc cagtctgccg gccagctgct gaggttttgt tgtgtaacca catcttccag 1140  
 gtagtgcagtc ctggagtagt gcctactcct attcccattt gcagagagta ctgctggca 1200  
 gtaaaggagc tcttctgycg aaaagaatgg ctggtaatgg aagagaagac ccacagagya 1260  
 ctctacagat ccgagatgca tttgtgttcc gtgccaaaat gcagcaagct tcccagcatg 1320  
 cattgggacc ccacggcctg tgccagactg ccacatctag attataacaa agaaaaccta 1380  
 aaaacattcc caccaatgac gtctcaaaag ccaagtgtgg acattccaaa tctgccttcc 1440  
 tctcctctct cttccttctc tgtctcactc acatactcca tgactgtaat aatctccatc 1500  
 atgtccagct ttgcaatatt tgtgcttctt accataacta ctctctattg ctgocgaaga 1560  
 40 agaaaacaat ggaaaaataa gaaaagagaa tcagcagcag taacctcac cacactgcct 1620  
 tctgagctct tactagatag acttcatccc aaccccatgt accagaggat gccgctcctt 1680  
 ctgaaccca aattgctcag cctggagtat ccaaggaata acattgaata tgtgagagac 1740  
 atcggagagg gagcgtttgg aaggggtgtt caagcaaggg caccaggctt acttccctat 1800  
 gaacctttca ctatgggtgc agtaaagatg ctcaaagaag aagcctcggc agatatzcaa 1860  
 gcggactttc agagggaggc agccctcatg gcagaatttg acaaccctaa cattgtgaag 1920  
 ctataggag tgtgtgctgt cgggaagcca atgtgcctgc tctttgaata catggcctat 1980  
 ggtgacctca atgagttcct ccgcagcatg tcccctcaca ccgtgtgcag cctcagtcac 2040  
 agtgacttgt ctatgagggc tcaggtctcc agccctgggc ccccaccctt ctctgtgtct 2100  
 gagcagcttt gcattgccag gcaggtggca gctggcatgg cttacctctc agaacgtaag 2160  
 50 tttgttcacc gagatttagc caccaggaac tgccctgggtg gcgagaacat ggtggtgaaa 2220  
 attgccgact ttggcctctc caggaacatc tactcagcag actactacaa agctaatagaa 2280  
 aacgacgcta tccctatccg ttggatgcca ccagagtcca tttttataa ccgctacact 2340  
 acagagtctg atgtgtgggc ctatggcgtg gtcctctggg agatcttctc ctatggcctg 2400  
 cagccctact atgggatggc ccatgaggag gtcatttact acgtgcgaga tggcaacatc 2460

```

ctctcctgcc ctgagaactg ccccgctggag ctgtacaatc tcatgcgtct atgttggagc 2520
aagctgcctg cagacagacc cagtttcacc agtattcacc gaattctgga acgcatgtgt 2580
gagagggcag aggggaactgt gagtgtc 2607

```

```

<210> 8
<211> 869
<212> PRT
<213> MuSK
<400> 8
10
Met Arg Glu Leu Val Asn Ile Pro Leu Val His Ile Leu Thr Leu Val
1 5 10 15
Ala Phe Ser Gly Thr Glu Lys Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr
20 20 25 30
Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met
35 40 45
Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn
50 55 60
Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn
20 65 70 75 80
Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile
85 90 95
Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys
100 105 110
Gly Ala Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile
115 120 125
Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr
130 135 140
30
Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro
145 150 155 160
Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala
180 185 190
Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Phe
195 200 205
Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr
210 215 220
40
Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val
225 230 235 240
Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser
245 250 255
Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu
260 265 270
Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His
275 280 285
Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala
290 295 300
50
Glu Trp Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr
305 310 315 320
Arg Gly Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe
325 330 335
Leu Asn Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val
340 345 350

```

	His	Thr	Ala	Trp	Asn	Glu	Leu	Lys	Val	Val	Ser	Pro	Val	Cys	Arg	Pro	
			355					360					365				
	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Cys	Asn	His	Ile	Phe	Gln	Glu	Cys	Ser	Pro	
			370				375					380					
	Gly	Val	Val	Pro	Thr	Pro	Ile	Pro	Ile	Cys	Arg	Glu	Tyr	Cys	Leu	Ala	
						390					395				400		
	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Cys	Ala	Lys	Glu	Trp	Leu	Val	Met	Glu	Glu	Lys	
					405					410					415		
10	Thr	His	Arg	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ser	Glu	Met	His	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	
				420					425					430			
	Lys	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Ser	Met	His	Trp	Asp	Pro	Thr	Ala	Cys	Ala	
				435				440						445			
	Arg	Leu	Pro	His	Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Phe	Pro	
						455						460					
	Pro	Met	Thr	Ser	Ser	Lys	Pro	Ser	Val	Asp	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	
						470					475				480		
	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Val	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Met	Thr	Val	
					485					490					495		
20	Ile	Ile	Ser	Ile	Met	Ser	Ser	Phe	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Leu	Thr	Ile	
				500					505					510			
	Thr	Thr	Leu	Tyr	Cys	Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Gln	Trp	Lys	Asn	Lys	Lys	
				515				520						525			
	Arg	Glu	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Leu	
							535					540					
	Leu	Asp	Arg	Leu	His	Pro	Asn	Pro	Met	Tyr	Gln	Arg	Met	Pro	Leu	Leu	
						550					555				560		
	Leu	Asn	Pro	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Tyr	Pro	Arg	Asn	Asn	Ile	Glu		
					565					570					575		
30	Tyr	Val	Arg	Asp	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Phe	Gln	Ala	
				580					585					590			
	Arg	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Glu	Pro	Phe	Thr	Met	Val	Ala	Val	
				595				600					605				
	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Glu	Ala	Ser	Ala	Asp	Met	Gln	Ala	Asp	Phe	Gln	
				610			615					620					
	Arg	Glu	Ala	Ala	Leu	Met	Ala	Glu	Phe	Asp	Asn	Pro	Asn	Ile	Val	Lys	
						630					635				640		
	Leu	Leu	Gly	Val	Cys	Ala	Val	Gly	Lys	Pro	Met	Cys	Leu	Leu	Phe	Glu	
					645						650				655		
40	Tyr	Met	Ala	Tyr	Gly	Asp	Leu	Asn	Glu	Phe	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Pro	
				660					665					670			
	His	Thr	Val	Cys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Met	Arg	Ala	Gln	
				675				680						685			
	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Pro	Leu	Ser	Cys	Ala	Glu	Gln	Leu	Cys		
				690			695					700					
	Ile	Ala	Arg	Gln	Val	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Ser	Glu	Arg	Lys	
						710						715			720		
	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Asn	
					725					730					735		
50	Met	Val	Val	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Asn	Ile	Tyr	Ser	
				740					745					750			
	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Asn	Glu	Asn	Asp	Ala	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	
				755				760					765				
	Met	Pro	Pro	Glu	Ser	Ile	Phe	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp	
				770			775						780				



	<210> 14		
	<211> 38		
	<212> DNA		
	<213> primer		
	<400> 14		
	ggttaaccct attcaatggt attccttggga tactccag		38
10	<210> 15		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> primer		
	<400> 15		
	cttccaaaag ctctgtcat cacc		24
20	<210> 16		
	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> primer		
	<400> 16		
	ccagtcattgg agtatgtagg tgagac		26

### 【図面の簡単な説明】

【図1】Aは野生型(WT)EGFR分子及び2つの変異EGFR：細胞質領域からアミノ酸が欠失したEGFR1-I及び細胞質領域及び細胞外領域の両方からアミノ酸が欠失したEGFR1-IIの模式的に表わす。Bは野生型及び変異MuSKを示す。

【図2】野生型(WT)EGFR1分子及び配列番号2に対応する。シグナルペプチドはアミノ酸残基1-24である。細胞外領域はアミノ酸残基25-645を含み、膜貫通領域はアミノ酸残基646-668を含み、細胞質領域はアミノ酸残基669-1210を含み、スレオニンリン酸化部位はアミノ酸残基678である。

【図3A】図2のアミノ酸配列をコードする野生型(WT)EGFR1のフレオチド配列であり、配列番号1に対応する。

【図3B】図2のアミノ酸配列をコードする野生型(WT)EGFR1のフレオチド配列であり、配列番号1に対応する。

【図3C】図2のアミノ酸配列をコードする野生型(WT)EGFR1のフレオチド配列であり、配列番号1に対応する。

【図4】図2及び図3に示したEGFR配列の細胞外及び細胞内領域において欠

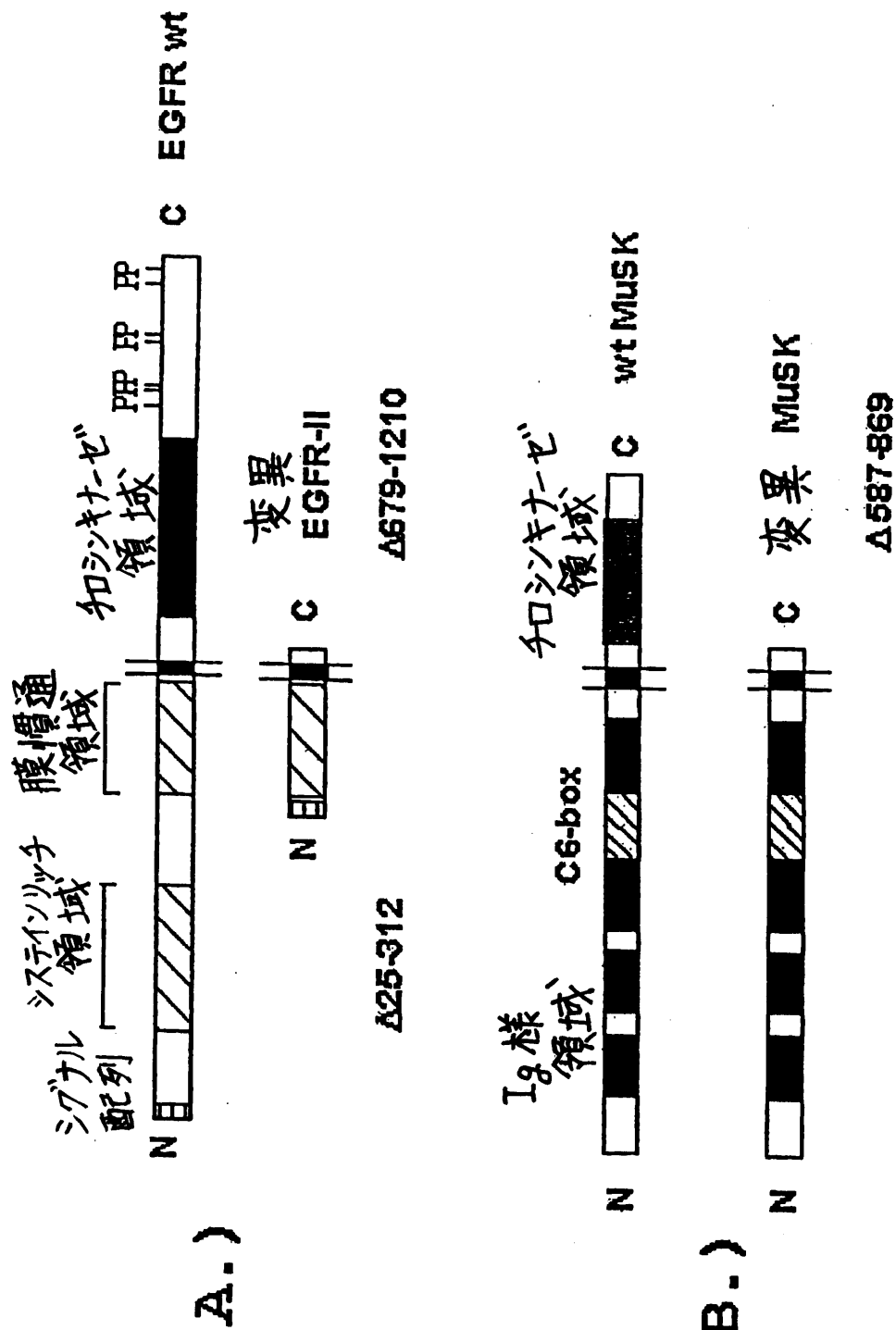
失を生じさせる一般的なスキームを示す。

【図5】PPA-6細胞から得られた上清で形質導入されて後の初代T細胞及びCD34<sup>+</sup>細胞上のEGFR1 IIの発現を示す。パネルAは非形質導入細胞、パネルBは形質導入後の発現、及びパネルCはT細胞上の変異EGFR発現に関する免疫磁気ビーズ選択後の発現に対応する。パネルDは非形質導入、及びパネルEはCD34<sup>+</sup>細胞の発現に対応する。

【図6】hMuSK-Rと名付けられたMuSK-Rを表わし、配列番号7で示されるヌクレオチド配列及び配列番号8で示されるアミノ酸配列に対応する。

【図1】

FIG. 1



## 【図2】


MRPSGTAGAA	LLALLAALCP	ASRALEEKKV	CQGTSNKLTQ	LGTFEDHFLS	50
LQRMFNCEV	VLGNLEITYV	QRNYDLSFLK	TIQEVAGYVL	IALNTVERIP	100
LENLQIIRGN	MYYENSYALA	VLSNYDANKT	GLKELPMRNL	QEILHGAVRF	150
SNNPALCNVE	SIQWRDIVSS	DFLSNMSMDF	QNHGSCQKC	DPSCPNGSCW	200
GAGEENCQKL	TKIICAQQCS	GRCRGKSPSD	CCHNQCAAGC	TGPRESCLV	250
CRKFRDEATC	KDTCPPMLY	NPTTYQMDVN	PEGKYSFGAT	CVKKCPRNYV	300
VTDHGSCVRA	CGADSYEMEE	DGVRKCKKCE	GPCRKVCNGI	GIGEFKDSLS	350
INATNIKHFK	NCTSISGDLH	ILPVAFRGDS	FTHTPPLDPQ	ELDILKTVKE	400
ITGFLLIQAW	PENRTDLHAF	ENLEIIRGRT	KQHGQFSLAV	VSLNITSLGL	450
RSLKEISDGD	VIISGNKNLC	YANTINWKKL	FGTSGQTKI	ISNRGENSCK	500
ATGQVCHALC	SPEGCWGPEP	RDCVSCRNVS	RGRECVKCN	LLEGEPREFV	550
ENSECQCHP	ECLPQAMNIT	CTGRGPDNCI	QCAHYIDGPH	CVKTCGAGVM	600
GENNTLVWKY	ADAGHVCHLC	HPNCTYGCTG	PGLEGCPNG	PKIPSIATGM	650
VGALLLLLVV	ALGIGLFMRR	RHIVRKRTL	RLLQERELVE	PLTPSGEAPN	700
QALLRILKET	EFKKIKVLGS	GAFGTVYKGL	WIPEGEKVKI	PVAIKELREA	750
TSPKANKEIL	DEAYVMASVD	NPHVCRLGI	CLTSTVQLIT	QLMPFGCLLD	800
YVREHKDNIG	SQYLLNWCVQ	IAKGMNYLED	RRLVHRDLAA	RNVLVKTPQH	850
VKITDFGLAK	LLGAEKEYH	AEGGKVPKW	MALESILHRI	YTHQSDVWSY	900
GVTVWELMTF	GSKPYDGIPA	SEISSILEKG	ERLPQPPICT	IDVYMIMVKC	950
WMIDADSRPK	FRELIIEFSK	MARDPQRYLV	IQDERMHL	SPTDSNFYRA	1000
LMDEEDMDDV	VDAEYLIPQ	QGFSSPSTS	RTPLLSSLSA	TSNNSTVACI	1050
DRNGLQSCPI	KEDSFLQRY	SDPTGALTED	SIDDTFLPVP	EYINQSVPKR	1100
PAGSVQNPVY	HNQPLNPAPS	RDPHYQDPHS	TAVGNPEYLN	TVQPTCVNST	1150
FDSPAHWAQK	GSHQISLDNP	DYQODFFPKE	AKPNGIFKGS	TAENAEYLRV	1200
APQSSEFIGA					1210

FIG. 2

## 【図3A】


ATGCGACCCT	CCGGGACGGC	CGGGGCAGCG	CTCCTGGCGC	TGCTGGCTGC	50
GCTCTGCCCCG	GCGAGTCGGG	CTCTGGAGGA	AAAGAAAGTT	TGCCAAGGCA	100
CGAGTAACAA	GCTCACGCAG	TTGGGCACTT	TTGAAGATCA	TTTTCTCAGC	150
CTCCAGAGGA	TGTTCAATAA	CTGTGAGGTG	GTCCTTGGGA	ATTTGGAAAT	200
TACCTATGTG	CAGAGGAATT	ATGATCTTTC	CTTCTTAAAG	ACCATCCAGG	250
AGGTGGCTGG	TTATGTCCCTC	ATTGCCCTCA	ACACAGTGGA	GCGAATTCCT	300
TTGGAAAACC	TGCAGATCAT	CAGAGGAAAT	ATGTACTACG	AAAATTCCTA	350
TGCCTTAGCA	GTCTTATCTA	ACTATGATGC	AAATAAAACC	GGACTGAAGG	400
AGCTGCCCAT	GAGAAATTTA	CAGGAAATCC	TGCATGGCGC	CGTGCGGTTT	450
AGCAACAACC	CTGCCCTGTG	CAACGTGGAG	AGCATCCAGT	GGCGGGACAT	500
AGTCAGCAGT	GACTTTCTCA	GCAACATGTC	GATGGACTTC	CAGAACCACC	550
TGGGCAGCTG	CCAAAAGTGT	GATCCAAGCT	GTCCCAATGG	GAGCTGCTGG	600
GGTGCAGGAG	AGGAGAACTG	CCAGAAACTG	ACCAAATCA	TCTGTGCCCA	650
GCAGTGCTCC	GGGCGCTGCC	GTGGCAAGTC	CCCCAGTGAC	TGCTGCCACA	700
ACCAGTGTGC	TGCAGGCTGC	ACAGGCCCCC	GGGAGAGCGA	CTGCCTGGTC	750
TGCCGCAAT	TCCGAGACGA	AGCCACGTGC	AAGGACACCT	GCCCCCCT	800
CATGCTCTAC	AACCCACCA	CGTACCAGAT	GGATGTGAAC	CCCAGGGCA	850
AATACAGCTT	TGGTGCCACC	TGCGTGAAGA	AGTGTCCCCG	TAATTATGTG	900
GTGACAGATC	ACGGCTCGTG	CGTCCGAGCC	TGTGGGGCCG	ACAGCTATGA	950
GATGGAGGAA	GACGGCGTCC	GCAAGTGTA	GAAGTGCGAA	GGGCCTTGCC	1000
GCAAAGTGTG	TAACGGAATA	GGTATTGGTG	AATTTAAAGA	CTCACTCTCC	1050
ATAAATGCTA	CGAATATTAA	ACACTTCAA	AACTGCACCT	CCATCAGTGG	1100
CGATCTCCAC	ATCCTGCCGG	TGGCATTAG	GGGTGACTCC	TTCACACATA	1150
CTCCTCCTCT	GGATCCACAG	GAAC TGATA	TTCTGAAAAC	CGTAAAGGAA	1200
ATCACAGGGT	TTTTGCTGAT	TCAGGCTTGG	CCTGAAAACA	GGACGGACCT	1250
CCATGCCTTT	GAGAACCTAG	AAATCATACG	CGGCAGGACC	AAGCAACATG	1300
GTCAGTTTTT	TCTTGCAATC	GTCAGCCTGA	ACATAACATC	CTTGGGATTA	1350
CGCTCCCTCA	AGGAGATAAG	TGATGGAGAT	GTGATAATTT	CAGGAAACAA	1400

FIG. 3A

【 3 B】

AAATTTGTGC	TATGCAAATA	CAATAAACTG	GAAAAAACTG	TTTGGGACCT	1450
CCGGTCAGAA	AACCAAAATT	ATAAGCAACA	GAGGTGAAAA	CAGCTGCAAG	1500
GCCACAGGCC	AGGTCTGCCA	TGCCTTGTGC	TCCCCCGAGG	GCTGCTGGGG	1550
CCCGGAGCCC	AGGGACTGCG	TCTCTTGCCG	GAATGTCAGC	CGAGGCAGGG	1600
AATGCGTGGA	CAAGTGCAAG	CTTCTGGAGG	GTGAGCCAAG	GGAGTTTGTG	1650
GAGAACTCTG	AGTGCATACA	GTGCCACCCA	GAGTGCCCTG	CTCAGGCCAT	1700
GAACATCACC	TGCACAGGAC	GGGGACCAGA	CAACTGTATC	CAGTGTGCCC	1750
ACTACATTGA	CGGCCCCAC	TGCGTCAAGA	CCTGCCCGGC	AGGAGTCATG	1800
GGAGAAAACA	ACACCCTGGT	CTGGAAGTAC	GCAGACGCCG	GCCATGTGTG	1850
CCACCTGTGC	CATCCAAACT	GCACCTACGG	ATGCACTGGG	CCAGGTCTTG	1900
AAGGCTGTCC	AACGAATGGG	CCTAAGATCC	CGTCCATCGC	CACTGGGATG	1950
GTGGGGGCC	TCCTCTTGCT	GCTGGTGGTG	GCCCTGGGGA	TCGGCCTCTT	2000
CATGCGAAGG	CGCCACATCG	TTCGGAAGCG	CACGCTGCGG	AGGCTGCTGC	2050
AGGAGAGGGA	GCTTGTGGAG	CCTCTTACAC	CCAGTGGAGA	AGCTCCCAAC	2100
CAAGCTCTCT	TGAGGATCTT	GAAGGAAACT	GAATTCAAAA	AGATCAAAGT	2150
GCTGGGCTCC	GGTGCCTTCG	GCACGGTGTA	TAAGGGACTC	TGGATCCAG	2200
AAGGTGAGAA	AGTTAAAATT	CCCGTCGCTA	TCAAGGAATT	AAGAGAAGCA	2250
ACATCTCCGA	AAGCCAACAA	GGAAATCCTC	GATGAAGCCT	ACGTGATGGC	2300
CAGCGTGGAC	AACCCCCACG	TGTGCCGCCT	GCTGGGCATC	TGCCTCACCT	2350
CCACCGTGCA	ACTCATCACG	CAGCTCATGC	CCTTCGGCTG	CCTCCTGGAC	2400
TATGTCCGGG	AACACAAAGA	CAATATTGGC	TCCCAGTACC	TGCTCAACTG	2450
GTGTGTGCAG	ATCGCAAAGG	GCATGAACTA	CTTGGAGGAC	CGTCGCTTGG	2500
TGCACCGCGA	CCTGGCAGCC	AGGAACGTAC	TGGTGAAAAC	ACCGCAGCAT	2550
GTCAAGATCA	CAGATTTTGG	GCTGGCCAAA	CTGCTGGGTG	CGGAAGAGAA	2600
AGAATACCAT	GCAGAAGGAG	GCAAAGTGCC	TATCAAGTGG	ATGGCATTGG	2650
AATCAATTTT	ACACAGAATC	TATACCCACC	AGAGTGATGT	CTGGAGCTAC	2700
GGGGTGACCG	TTTGGGAGTT	GATGACCTTT	GGATCCAAGC	CATATGACGG	2750
AATCCCTGCC	AGCGAGATCT	CCTCCATCCT	GGAGAAAGGA	GAACGCCTCC	2800

FIG. 3B

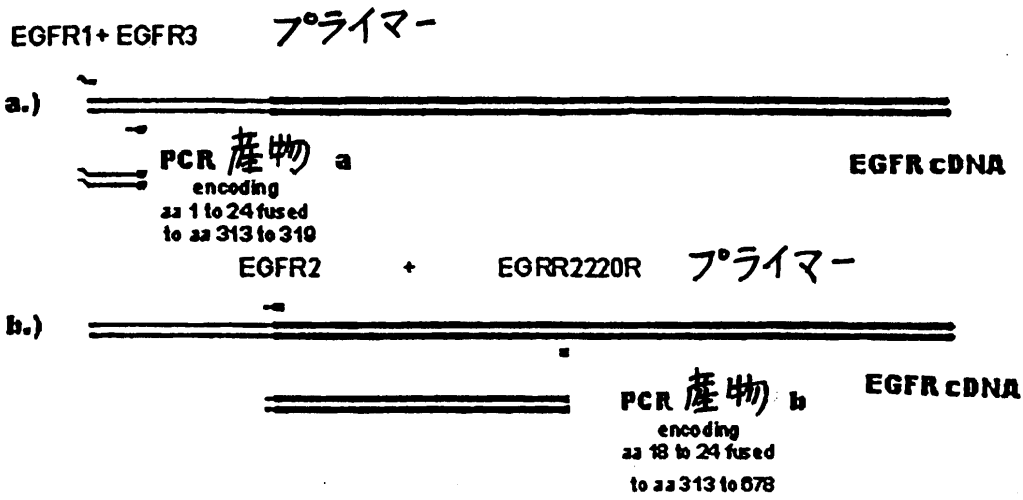
【 3 C】

CTCAGCCACC	CATATGTACC	ATCGATGTCT	ACATGATCAT	GGTCAAGTGC	2850
TGGATGATAG	ACGCAGATAG	TCGCCCAAAG	TCCCGTGAGT	TGATCATCGA	2900
ATTCTCCAAA	ATGGCCCGAG	ACCCCCAGCG	CTACCTTGTC	ATTCAGGGGG	2950
ATGAAAGAAT	GCATTTGCCA	AGTCC'TACAG	ACTCCA'ACTT	CTACCGTGCC	3000
CTGATGGATG	AAGAAGACAT	GGACGACGTG	GTGGATGCCG	ACGAGTACCT	3050
CATCCCACAG	CAGGGCTTCT	TCAGCAGCCC	CTCCACGTCA	CGGACTCCCC	3100
TCC'TGAGCTC	TCTGAGTGCA	ACCAGCAACA	ATTCACCGT	GGCTTG'CATT	3150
GATAGAAATG	GGCTGCAAAG	CTGTCCCATC	AAGGAAGACA	GCTTCTTGCA	3200
GCGATACAGC	TCAGACCCCA	CAGGCGCCTT	GACTGAGGAC	AGCATAGAGC	3250
ACACCTTCCT	CCCAGTGCCT	GAATACATAA	ACCAGTCCGT	TCCCAA'AAAG	3300
CCCGCTGGCT	CTGTGCAGAA	TCCTGTCTAT	CACAATCAGC	CTCTGA'ACCC	3350
CGCGCC'CAGC	AGAGACCCAC	ACTACCAGGA	CCCCACAGC	ACTGCAGTGG	3400
GCAACCCCGA	GTATCTCAAC	ACTGTCCAGC	CCACCTGTGT	CAACAGCACA	3450
TTCGACAGCC	CTGCCCACTG	GGCCCAGAAA	GGCAGCCACC	AAATTAGCCT	3500
GGACAACCCT	GACTACCAGC	AGGACTTCTT	TCCCAAGGAA	GCCAAGCCAA	3550
ATGGCATCTT	TAAGGGCTCC	ACAGCTGAAA	ATGCAGAATA	CCTAAGGGTC	3600
GCGCCACAAA	GCAGTGAATT	TATTGGAGCA	TGA		3630

FIG. 3C

【図4】

第1 PCR 反応



第2 PCR 反応

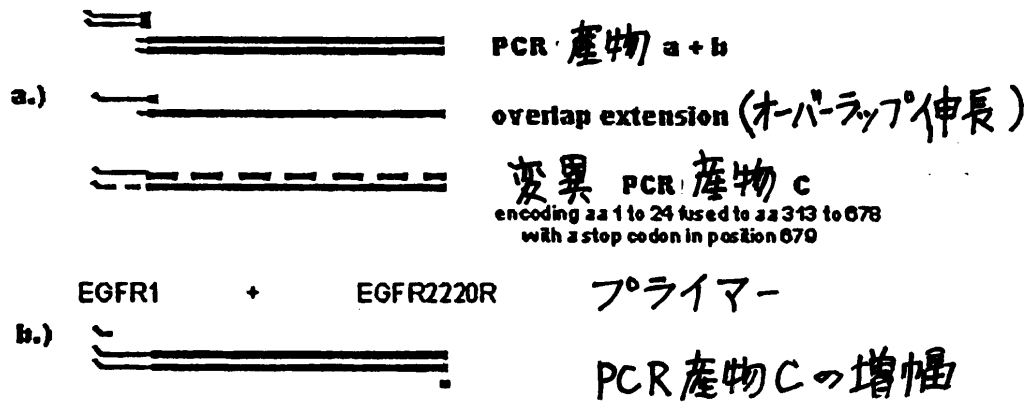


FIG. 4

【图5】

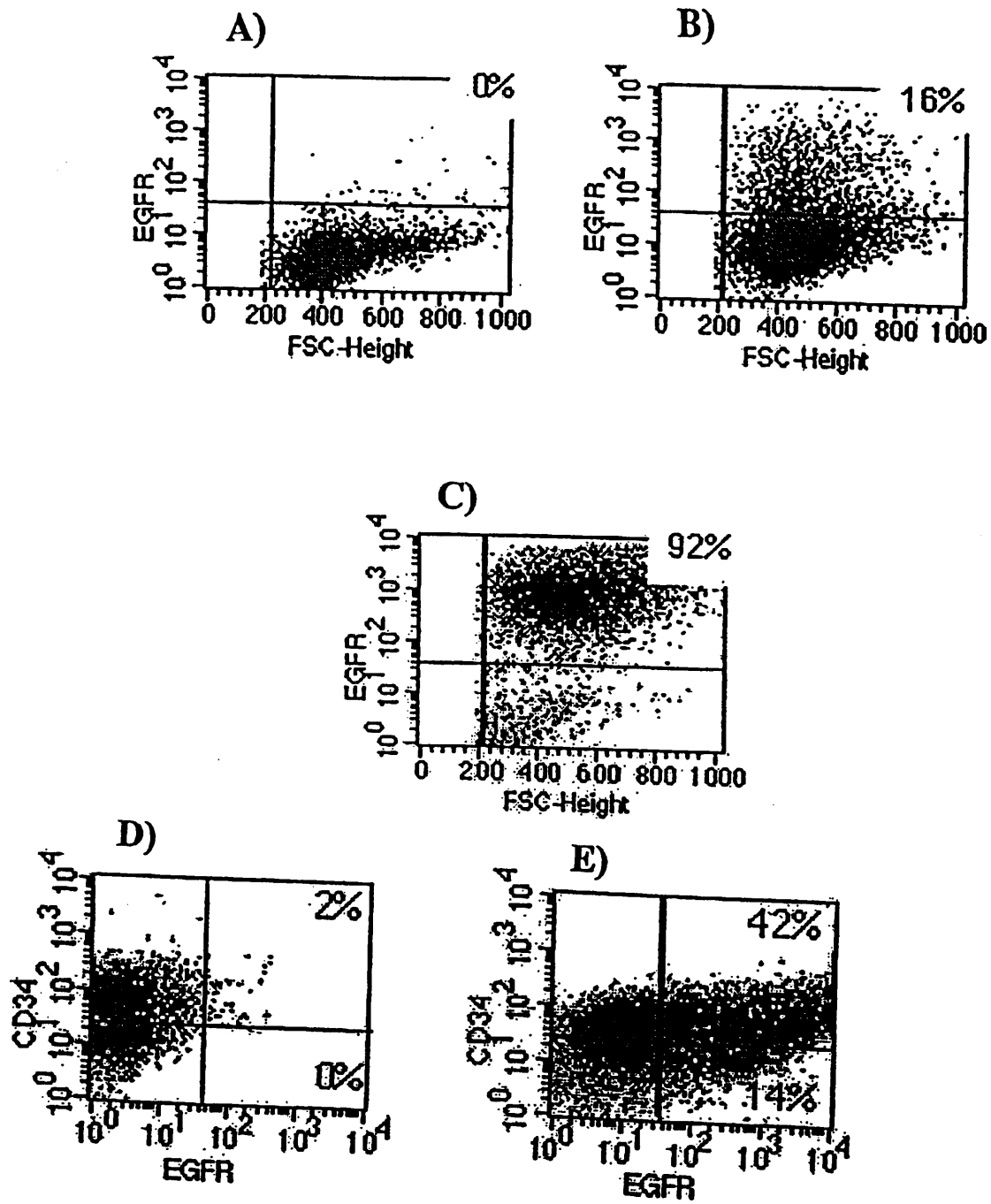


FIG. 5

## 【図6】

MRELVNIPLV	HILTLVAFSG	TEKLPKAPVI	TTPLETVDAL	VEEVATFMCA	50
VESYPQPEIS	WTRNKILIKL	FDTRYSIREN	GQLLTILSVE	DSDDGIYCCT	100
ANNGVGGAVE	SCGALQVKMK	PKITRPPINV	KIIEGLKAVL	PCTTMGNPKP	150
SVSWIKGDSP	LRENSRIAVL	ESGSLRIHNV	QKEDAGQYRC	VAKNSLGTAY	200
SKVVKLEFEV	FARILRAPES	HNVTFGSFVT	LHCTATGIPV	PTITWIENGN	250
AVSSGSIQES	VKDRVIDSRL	QLFITKPGLY	TCIATNKHGE	KFSTAKAAAT	300
ISIAEWSKPO	KDNKGYCAQY	RGEVCNAVLA	KDALVFLNTS	YADPEEAQEL	350
LVHTAWNELK	VVSPVCRPAA	EALLCNHIFQ	ECSPGVVPTP	IPICREYCLA	400
VKELFCAKEW	LVMEEKTHRG	LYRSEMHLLS	VPKCSKLPSM	HWDPTACARL	450
PHLDYNKENL	KTFPPMTSSK	PSVDIPNLPS	SSSSSFSVSP	TYSMTVIISI	500
MSSF AIFVLL	TITTL YCCRR	RKQWK NKRE	SAAVTLTLP	SELLLDRLHP	550
NPMYQRMPLL	LNP KLLSLEY	PRNNIEYVRD	IGEGAFGRVF	QARAPGLLPY	600
EPFTMVAVKM	LKEEASADMQ	ADFQREAAALM	AEFDNPNIVK	LLGVCAVGKP	650
MCLLFEYMAY	GDLNEFLRSM	SPHTVC SLSH	SDLSMRAQVS	SPGPPPLSCA	700
EQLCIARQVA	AGMAYLSERK	FVHRDLATRN	CLVGENMVVK	IADFGLSRNI	750
YSADYYKANE	NDAIPIRWMP	PESIFYNRYT	TESDVWAYGV	VLWEIFSYGL	800
QPYYGMAHEE	VIYYVRDGNI	LSCPENC PVE	LYNLMRLCWS	KLPADRPSFT	850
SIHRILERMC	ERAEGTVSV				869

FIG. 6

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inventor's Application No. PCT/EP 00/11474
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HILDINGER M ET AL: "Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking." GENE THERAPY, vol. 6, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 1222-1230, XP000990645 ISSN: 0969-7128 abstract	1,8-14, 16, 18-21, 23-27,29
A	WO 95 06723 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;BORDIGNON CLAUDIO (IT); MAVILIO FULVIO (I) 9 March 1995 (1995-03-09) cited in the application page 1, last paragraph -page 2, paragraph 4	1,8-14, 16, 18-21, 23-27,29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" 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 principles 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 25 June 2001		Date of mailing of the international search report 18.09.2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/11474

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	US 6 107 477 A (WHITNEY MICHAEL A ET AL) 22 August 2000 (2000-08-22)  column 4, line 32 - line 40 -----	1,8-14, 16, 18-21, 23-27,29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/11474**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:
  
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:

see additional sheet

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.:

see further information sheet invention 1

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/EP 00/11474

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,9-14,16,18-21, 23-27, 29 all in part, 8 entirely.

Method of identifying genetically modified mammalian cells involving expression and detection of a marker which is a protein-tyrosine kinase receptor that is mutated at both the intra-, and the extra-cellular domains.

2. Claims: 1, 2, 5-29 all in part, 3 entirely

Method of identifying genetically modified mammalian cells involving expression and detection of a marker which is a protein-tyrosine kinase receptor belonging to the epidermal growth factor receptor family and which is mutated at least at the intracellular domain.

3. Claims: 1,2,5-7,9-29 all in part, 4 and 30 entirely

Method of identifying genetically modified mammalian cells involving expression and detection of a marker which is a protein-tyrosine kinase receptor belonging to the muscle specific tyrosine kinase receptor (MuSK-R) family and which is mutated at least at the intracellular domain.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/11474

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テームト(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(31)優先権主張番号 09/539,248  
(32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, 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, MZ, 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

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50  
CB01 DA12 DA13 DA14 DA36  
FB02 FB03  
4B024 AA15 BA63 CA04 DA03 EA02  
GA11 HA14 HA15  
4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ79 QR55  
QS33

专利名称(译)	细胞表面选择标记基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003522525A</a>	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2001538537	申请日	2000-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ピピッグスザンヌデグマー ベレスゲイバー		
发明人	ピピッグスザンヌ・デグマー ベレス・ゲイバー		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/705 C12N9/12 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C12N9/1205 C07K14/705 C12N9/12 G01N33/56966		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA15 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QS33		
代理人(译)	阿部正弘		
优先权	60/166594 1999-11-19 US 09/444038 1999-11-19 US 09/539248 2000-03-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及使用突变蛋白酪氨酸激酶受体 (PTKR) 作为哺乳动物细胞中的选择标记来鉴定基因修饰的哺乳动物细胞的方法。特别优选的突变体 (突变体) PTKR选择标记是突变体表皮生长因子受体 (EGFR) 家族成员和突变体肌肉特异性激酶受体 (MuSK-R) 家族成员。此外,通过逆转录病毒将编码突变型EGFR的核酸序列转导至哺乳动物细胞中,将转导的细胞与特异性识别并结合突变型EGFR的标记抗体和标记转导物一起温育。鉴定细胞,包括对转导的哺乳动物细胞进行免疫选择的方法,该方法包括:

