

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4290423号
(P4290423)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
請求項の数 17 (全 171 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-534508 (P2002-534508)	(73) 特許権者 000001029 協和発酵キリン株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(86) (22) 出願日 平成13年10月5日(2001.10.5)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2001/008804	(74) 代理人 100105647 弁理士 小栗 昌平
(87) 国際公開番号 W02002/031140	(74) 代理人 100105474 弁理士 本多 弘徳
(87) 国際公開日 平成14年4月18日(2002.4.18)	(74) 代理人 100108589 弁理士 市川 利光
審査請求日 平成16年10月4日(2004.10.4)	(72) 発明者 神田 豊 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗 酵工業株式会社 東京研究所内
(31) 優先権主張番号 特願2000-308526 (P2000-308526)	(72) 発明者 佐藤 光男 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗 酵工業株式会社 東京研究所内
(32) 優先日 平成12年10月6日(2000.10.6)	最終頁に続く
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

(54) 【発明の名称】 抗体組成物を生産する細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を低下または欠失させたCHO細胞であつて、かつN-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であつて、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であり、且つ親株であるCHO細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞。

【請求項2】

抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求項1に記載のCHO細胞。

【請求項3】

フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に結合していない糖鎖である、請求項1または2に記載のCHO細胞。

【請求項 4】

抗体分子のクラスが I g G である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞。

【請求項 5】

細胞内糖ヌクレオチド G D P - フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞。

(a) G D P - マンノース 4 , 6 - デヒドラターゼ (G D P - m a n n o s e 4 , 6 - d e h y d r a t a s e , G M D) ;

(b) G D P - ケト - 6 - デオキシマンノース 3 , 5 - エピメラーゼ , 4 - レダクターゼ (G D P - k e t o - 6 - d e o x y m a n n o s e 3 , 5 - e p i m e r a s e , 4 - r e d u c t a s e , F x) ;

(c) G D P - ベータ - L - フコース ピロフォスホリラーゼ (G D P - b e t a - L - f u c o s e p y r o p h o s p h o r y l a s e , G F P P) .

【請求項 6】

G M D が、以下の (a) または (b) である D N A がコードする蛋白質である、請求項 5 に記載の C H O 細胞。

(a) 配列番号 6 5 で表される塩基配列からなる D N A ;

(b) 配列番号 6 5 で表される塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ G M D 活性を有する蛋白質をコードする D N A .

【請求項 7】

G M D が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 5 に記載の C H O 細胞。

(a) 配列番号 7 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 7 1 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ G M D 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 7 1 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性 を有するアミノ酸配列からなり、かつ G M D 活性を有する蛋白質。

【請求項 8】

F x が、以下の (a) または (b) である D N A がコードする蛋白質である、請求項 5 に記載の C H O 細胞。

(a) 配列番号 4 8 で表される塩基配列からなる D N A ;

(b) 配列番号 4 8 で表される塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ F x 活性を有する蛋白質をコードする D N A .

【請求項 9】

F x が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 5 に記載の C H O 細胞。

(a) 配列番号 7 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 7 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ F x 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 7 2 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性 を有するアミノ酸配列からなり、かつ F x 活性を有する蛋白質。

【請求項 10】

G F P P が、以下の (a) または (b) である D N A がコードする蛋白質である、請求項 5 に記載の C H O 細胞。

(a) 配列番号 5 1 で表される塩基配列からなる D N A ;

(b) 配列番号 5 1 で表される塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ G F P P 活性を有する蛋白質をコードする D N A .

【請求項 11】

G F P P が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、

請求項 5 に記載の C H O 細胞。

- (a) 配列番号 7 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 7 3 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ G F P P 活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号 7 3 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ G F P P 活性を有する蛋白質。

【請求項 1 2】

N - グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素が - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞。

10

【請求項 1 3】

- 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である D N A がコードする蛋白質である、請求項 1 2 に記載の C H O 細胞。

- (a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる D N A ；
- (b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする D N A 。

【請求項 1 4】

- 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) 、 (b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 1 2 に記載の C H O 細胞。

20

- (a) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 1 5】

酵素の活性が、以下の (a) 、 (b) 、 (c) 、 (d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞。

30

- (a) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N - グリコシド結合糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

【請求項 1 6】

少なくとも N - グリコシド結合糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞。

40

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の C H O 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

(技術分野)

本発明は、種々の疾患に有用な抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク

50

質などの抗体分子の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該抗体組成物、およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

(背景技術)

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域(以下、CDRと表記する)移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域(以下、V領域と表記する)がヒト以外の動物の抗体で、定常領域(以下、C領域と表記する)がヒト抗体である抗体である。ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト抗体のCDRをヒト以外の動物の抗体のCDRと置換した抗体である。

【0003】

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒトIgGクラスの抗体が主として利用されている[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒトIgGクラスの抗体は、更にIgG1、IgG2、IgG3、IgG4の4種類のサブクラスに分類されている。IgGクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性(以下、ADCC活性と表記する)や補体依存性細胞障害活性(以下、CDC活性と表記する)については、これまでに多数の研究が行われ、ヒトIgGクラスでは、IgG1サブクラスの抗体が最も高いADCC活性、CDC活性を有していることが報告されている[ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒトIgG1サブクラスの抗体である。

【0004】

ヒトIgG1サブクラスの抗体のADCC活性及びCDC活性の発現には、抗体Fc領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター(以下、FcRと表記する)及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及びC領域の第2番目のドメイン(以下、C2ドメインと表記する)内のいくつかのアミノ酸残基の重要性[ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー(Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]の他、C2ドメインに結合している糖鎖の重要性[ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]が示唆されている。

【0005】

糖鎖に関しては、ボイド(Boyd)らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)或いはマウスミエローマNS0細胞(NS0細胞)で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H(ヒトIgG1サブクラス)を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖のADCC活性、CDC活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することでCDC活性のみが影響を受け、約50%程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)]。また、ライフリー(Lifely)らは、CHO細胞、NS0細胞或いはラットミエローマY0細胞で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H(ヒトIgG1サブクラス)の糖鎖の分析及びADCC活性を測定した結果、Y0細胞由来のCAMPATH-1Hが最も高いADCC活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置するN-アセチルグルコ

10

20

30

40

50

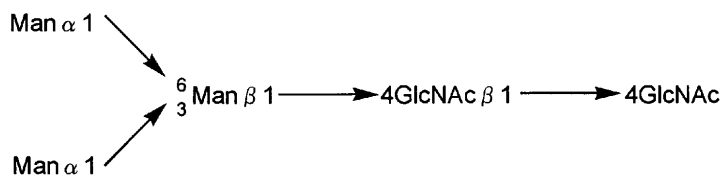
サミン（以下、GlcNAcとも表記する）が重要であることを示唆した〔グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342〕。これらの報告は、ヒトIgG1サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとはい難い。

【0006】

糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖（N-グリコシド結合糖鎖）とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖（O-グリコシル結合糖鎖）の2種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、様々な構造を有しているが〔生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年）〕、いずれの場合も以下の構造式（I）に示す基本となる共通のコア構造を有することが知られている。

【0007】

【化1】



構造式（I）

【0008】

アスパラギンと結合する糖鎖の末端が還元末端、反対側が非還元末端と呼ばれている。N-グリコシド結合糖鎖には、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあることが知られている。

抗体IgG分子のFc領域には、2個所のN-グリコシド型の糖鎖結合部位が存在しており、血清中のIgGでは、通常、この部位に、シアル酸やバイセクティングのN-アセチルグルコサミンの付加の程度が少ない複数本の枝を持つコンプレックス型糖鎖が結合している。このコンプレックス型糖鎖の非還元末端でのガラクトースの付加および還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られている〔バイオケミストリー (Biochemistry), 36, 130, 1997〕。

このような糖鎖の構造は、糖鎖遺伝子、すなわち、糖鎖を合成する糖転移酵素と糖鎖を分解する糖分解酵素の遺伝子によって規定されていると考えられている。

【0009】

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖タンパク質は、小胞体（以下、ERと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ER内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-DoIとも表記する）と呼ばれる -イソプレレン単位を20個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸にN-アセチル-グルコサミンが転移されGlcNAc-P-P-DoIとなり、続いてもう1個GlcNAcが転移されGlcNAc-GlcNAc-P-P-DoIとなる。次いで、マンノース（以下、Manとも表記する）が5個転移され $(\text{Man})_5-(\text{GlcNAc})_2-\text{P-P-DoI}$ に、さらに、Manが4個、グルコース（以下、Glcとも表記する）が3個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(\text{Glc})_3-(\text{Man})_9-(\text{GlcNAc})_2-\text{P-P-DoI}$ がで

きる。この14個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニン配列を持ったポリペプチドへER内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸(P-P-DoI)は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、3個のGlcと1ないし2個のManがER上で除去され、この除去には-1,2-グルコシダーゼI、-1,3-グルコシダーゼIIおよび-1,2-マンノシダーゼIが関与することが知られている。

【0010】

ER上でトリミングを受けた糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加するN-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン1-ホスホジエステル-N-アセチルグルコサミンダーゼおよび-マンノシダーゼIが存在し、Man残基を5個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型のN-グリコシド結合糖鎖の最初の外側のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素I(GnTI)、2個のManを除去する-マンノシダーゼII、外側から2個目のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素II(GnTII)、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースを付加する-1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体トランス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けてN-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

一般的に、医薬への応用が考えられているヒト化抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞を宿主細胞として用い製造されているが、上述したように、抗体のエフェクター機能には糖鎖構造が極めて重要な役割を担っていること、宿主細胞によって発現された糖タンパク質の糖鎖構造に違いが観察されることから、より高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能な宿主細胞の開発が望まれている。

【0011】

生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、1)糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤の応用、2)突然変異体の選択、3)糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の導入などの方法が試みられている。以下に、それら具体的例を述べる。

糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤としては、N-グリコシド結合糖鎖の前駆体であるコアオリゴ糖形成の最初のステップであるGlcNAc-P-P-DoIの形成を選択的に阻害するツニカマイシン、グリコシダーゼIの阻害剤であるカスタノスペルミンやN-メチル-1-デオキシノジリマイシン、グルコシダーゼIIの阻害剤であるプロモコンヅリトール、マンノシダーゼIの阻害剤である1-デオキシノジリマイシンや1,4-ジオキシ-1,4-イミノ-D-マンニトール、マンノシダーゼIIの阻害剤であるスワンソニンなどが知られている。糖転移酵素の特異的な阻害剤としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnTV)などに対する基質のデオキシ誘導体が知られている[グライコバイオロジーシリーズ2 糖鎖の細胞における運命(講談社サンエンティフィック)永井克孝・箱守仙一朗・木幡陽編(1993)]。また、1-デオキシノジリマイシンはコンプレックス型糖鎖の合成を抑え、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖の割合を増加させることが知られている。実際に、これら阻害剤を培地に添加することでIgGの糖鎖構造が変化し、抗原結合性などが変化することが報告されている[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 26, 1113 (1989)]。

【0012】

糖鎖の修飾に係わる酵素の活性に関する突然変異体は、主に、レクチン耐性株として選択され取得されている。例えば、WGA(T. vulgaris由来のwheat-germ agglutinin)、ConA(C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC(R. communis由来の毒素)、L-PHA(P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA(L. culinaris由来のlentil agglutinin)、PSA(P. sativum由来のPea lectin)などのレクチンを用い、様々な糖鎖構造を有するCHO細胞変異株がレクチン耐性株として取得されている[ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・

10

20

30

40

50

ジェネティクス (Somatic Cell Mol.Genet.), 12, 51 (1986)].

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットの β -ガラクトシド-2,6-シヤリルトランスフェラーゼをCHO細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13848, 1989].

【0013】

また、ヒトの β -ガラクトシド-2- α -フコシルトランスフェラーゼをマウスL細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース(以下、Fucとも表記する)が付加されたH抗原(Fuc 1-2Gal 1-)の発現が確認されている [サイエンス(Science), 252, 1668, 1991]。さらに、ユマナ(Umana)らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置するN-アセチルグルコサミンの付加が抗体のADCC活性に重要であるとの知見に基づき、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnTIII)を発現させたCHO細胞を作製し親株との比較を行っている。親株のCHO細胞ではGnTIIIの発現が観察されておらず [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 261, 13370, 1984]、作製したGnTIII発現CHO細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べ16倍高いADCC活性を有していることを確認している [グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995): W099/54342]。またこの際、ユマナ(Umana)らは、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnTV)の遺伝子を導入したCHO細胞も作製しており、GnTIIIまたはGnTVの過剰発現はCHO細胞に対して毒性を示すことを報告している。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

(発明の開示)

このように、生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とは言い難いため試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、真に重要な糖鎖構造の特定には至っていない。従って、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼす糖鎖構造の同定と、そのような糖鎖構造の付加が可能な宿主細胞の開発が医薬開発の上で求められている。

本発明は、抗体分子の糖鎖構造を制御することが可能な、抗体組成物を生産する宿主細胞、ADCC活性が高い抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該製造方法で製造された抗体組成物を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の(1)~(61)に関する。

【0016】

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞。

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に結合していない糖鎖である、(1)に記載のCHO細胞。

(3) 抗体分子のクラスがIgGである、(1)または(2)に記載のCHO細胞。

(4) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した(1)~(3)のいずれか1項に記載のCHO細胞。

10

20

30

40

50

(5) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、(4)に記載のCHO細胞。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
- (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

【0017】

(6) GMDが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

10

(7) GMDが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号71で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号71で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。

(8) Fxが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

20

- (a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0018】

(9) Fxが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号72で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質 ;
- (c) 配列番号72で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質。

30

(10) GFPPが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0019】

(11) GFPPが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(5)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号73で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号73で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質 ;
- (c) 配列番号73で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質。

40

(12) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素が-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(4)に記載のCHO細胞。

【0020】

(13) -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(12)に記載のCHO細胞。

50

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
 (b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(14) -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(12)に記載のCHO細胞。

- (a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
 (b) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
 (c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

10

(15) 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、(4)~(14)のいずれか1項に記載のCHO細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
 (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
 (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
 (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
 (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

【0021】

20

(16) 少なくともN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(4)~(15)のいずれか1項に記載のCHO細胞。

(17) 親株であるCHO細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(4)~(16)のいずれか1項に記載のCHO細胞。

(18) 抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(17)に記載のCHO細胞。

(19) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に結合していない糖鎖である、(18)に記載のCHO細胞。

30

【0022】

(20) (1)~(19)のいずれか1項に記載のCHO細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(21) (20)に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(22) CHO細胞が産生するN-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物。

40

【0023】

(23) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

(24) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、(23)に記載の細胞。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)；
 (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase)；
 (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

50

(25) GMDが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(26) GMDが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号71で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号71で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。

【0024】

(27) Fxが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFxを有する蛋白質をコードするDNA。

(28) Fxが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号72で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号72で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質。

(29) GFPPが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0025】

(30) GFPPが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号73で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号73で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号73で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質。

(31) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素が-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(23) に記載の細胞。

(32) -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び(d) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(31) に記載の細胞。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0026】

10

20

30

40

50

(33) -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(31) に記載の細胞。

- (a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

10

(34) 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、(23) ~ (33) のいずれか1項に記載の細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

20

(35) 少なくともN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(23) ~ (34) のいずれか1項に記載の細胞。

【0027】

(36) (23) ~ (35) のいずれか1項に記載の細胞が、下記の (a) ~ (i) からなる群から選ばれる細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

30

(37) (23) ~ (36) のいずれか1項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

(38) 抗体分子のクラスがIgGである、(37) 記載の細胞。

【0028】

(39) (37) または(38) 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

40

(40) 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(39) に記載の方法。

(41) (39) または(40) に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

【0029】

(42) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(43) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子またはN-グリ

50

コシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、(42)記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(44) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、(42)または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase) 。

【0030】

(45) GMDが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(44)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。(a) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNA ;

(b) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(46) Fxが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(44)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。(a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA ;

(b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(47) GFPPが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、(44)に記載の細胞。

(a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA ;

(b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0031】

(48) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素が -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(42)または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(49) -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(48)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA ;

(b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA ;

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA ;

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0032】

(50) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、(42)~(49)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

【0033】

(51) (42)~(50)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(52) 抗体分子のクラスがIgGである、(51)に記載の方法。

(53) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られ

10

20

30

40

50

る抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(51)または(52)に記載の方法。

(54) (51) ~ (53)のいずれか1項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(55) (21)、(22)、(41)または(54)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(56) 医薬が、腫瘍を伴なう疾患、アレルギーを伴なう疾患、炎症を伴なう疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴なう疾患または細菌感染を伴なう疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、(55)に記載の医薬。

【0034】

(57) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)からなる群から選ばれる蛋白質。 10

(a) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号71で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号72で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号73で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(f) 配列番号73で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質； 20

(g) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(h) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(i) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(j) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【0035】

(58) (57)記載の蛋白質をコードするDNA。 30

(59) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)からなる群から選ばれるDNA。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA；

(b) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA；

(c) 配列番号65で表される塩基配列を含むDNA；

(d) 配列番号48で表される塩基配列を含むDNA；

(e) 配列番号51で表される塩基配列を含むDNA。

(60) 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれるゲノムDNA。

(a) 配列番号3で表される塩基配列を含むゲノムDNA；

(b) 配列番号67で表される塩基配列を含むゲノムDNA；

(c) 配列番号70で表される塩基配列を含むゲノムDNA。 40

(61) (58) ~ (60)のいずれか1項に記載のDNA全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

【0036】

【発明の実施の形態】

本発明の抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巢組織由来のCHO細胞であればいかなるCHO細胞も包含される。 50

本発明において、抗体分子とは、抗体のFc領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc領域を含む融合タンパク質などをあげることができる。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

【0037】

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0038】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、クラスあるいはサブクラスのものを用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、クラスあるいはサブクラスのものを用いることができる。

【0039】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝

10

20

30

40

50

子に挿入することによりFab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることによってヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

【0040】

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスがIgGのヒト抗体が好ましい。

抗体の断片とは、上記抗体のFc領域を含んだ断片を意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

Fc領域を含む融合タンパク質とは、抗体のFc領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどのタンパク質とを融合させた物質を意味する。

【0041】

本発明において、抗体分子のFc領域に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、そのN-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）をあげることができる。

抗体分子のFc領域には、N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、前記構造式(1)で示されるコア構造を有するいかなる糖鎖も含まれるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。

【0042】

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物（以下、本発明の抗体組成物と称する）とは、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する糖鎖から構成されていてもよい。

本発明において、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全てのN-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、該フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに結合していない糖鎖を意味する。具体的には、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖のN-アセチルグルコサミンの6位に結合していな

10

20

30

40

50

い糖鎖があげられる。

【0043】

本発明の抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは20%以上、より好ましくは25%以上、さらに好ましくは30%以上、特に好ましくは40%以上、最も好ましくは50%以上である抗体組成物は、高いADCC活性を有する。抗体濃度が低下すれば、それに伴ってADCC活性が低下するが、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上の場合、抗体濃度が低くても高いADCC活性を獲得することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法23 糖タンパク質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)]によって分析することによっても決定することができる。

【0044】

本発明において、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞とは、チャイニーズハムスター(Chinese hamster; *Cricetulus griseus*)の卵巣組織から樹立された株化細胞であればいかなる細胞も包含される。その具体的な例としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl.

Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p883-900)等の文献に記載されているCHO細胞をあげることができる。また、ATCC(The American Type Culture Collection)に登録されているCHO-K1株(ATCC CCL-61)、DUXB11株(ATCC CRL-9096)、Pro-5株(ATCC CRL-1781)や、市販のCHO-S株(Lifetechnologies社 Cat#11619)、あるいはこれら株を様々な培地に馴化させた亜株なども具体的な例としてあげることができる。

【0045】

本発明において、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に係わる酵素とは、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に影響を与える酵素のことを意味する。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースは、de novoの合成経路あるいはSalvage合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべて細胞内GDP-フコースの合成に係わる酵素に包含される。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースのde novoの合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-mannose 4,6-dehydratase (GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ; 以下、GMDと表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase (GDP-ケト-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4-リダクターゼ; 以下、Fxと表記する)などがあげられる。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースのSalvage合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスフォリラーゼ; 以下、GFPPと表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ)などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵

10

20

30

40

50

素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

【 0 0 4 6 】

本発明において、GMDとしては、

下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(c) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号71で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質 10

(e) 配列番号71で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GMDのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号65で表される塩基配列を有するDNA、配列番号65で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

【 0 0 4 7 】

本発明において、Fxとしては、

下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、 20

(a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(c) 配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号72で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質

(e) 配列番号72で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質 30

等があげられる。

また、Fxのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号48で表される塩基配列を有するDNA、配列番号48で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

【 0 0 4 8 】

本発明において、GFPPとしては、

下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA 40

または、

(c) 配列番号73で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号73で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質

(e) 配列番号73で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GFPPのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号51で表される塩基配列を有するDNA、配列番号51で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる

。

【 0 0 4 9 】

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合する反応に影響を与える酵素を意味する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する反応に関与する酵素としては、具体的には、-1,6-フコシルトランスフェラーゼや-L-フコシダーゼなどがあげられる。

10

また、上述のN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

【 0 0 5 0 】

本発明において、-1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

20

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

30

(i) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

【 0 0 5 1 】

また、-1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

40

【 0 0 5 2 】

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、2、48、51または65で表される塩基配列を有するDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組

50

成は、150 mM塩化ナトリウム、15 mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989(以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997(以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、2、48、51または65で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0053】

本発明において、配列番号23、24、71、72または73で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、2、65、48または51で表されるDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

また、本発明において、___-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有するためには、それぞれ配列番号23、24、71、72または73で表されるアミノ酸配列とBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。

【0054】

本発明のCHO細胞としては、上述の酵素活性が低下または欠失した細胞があげられる。

上述の酵素活性が低下または欠失した細胞としては、すなわち、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に参与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に参与する酵素の活性が親株より低下または欠失した細胞を包含する。このような細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法
などがあげられる。

ここで、レクチンに耐性である株は、ある一定濃度のレクチンを含む培地中で培養した場合に、親株に比べて統計的な有意差を伴って少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好

10

20

30

40

50

ましくは5倍以上生存率に差が生じる性質を獲得する株を選択することで取得することができる。また、レクチンを含む培地中で培養した場合に、ある一定の生存率、例えば80%の生存率、で培養可能なレクチンの濃度が、親株に比べ少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20倍以上の濃度となる株を選択することも取得することができる。

【0055】

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)等をあげることができる。

10

【0056】

本発明のCHO細胞は、上記の目的とする酵素活性を低下または欠失させる手法を施す前の親株であるCHO細胞が生産する抗体組成物より、ADCC活性が高い抗体組成物を生産することができる。

また、本発明のCHO細胞は、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が20%未満である抗体組成物よりもADCC活性が高い抗体組成物を生産することができる。

20

【0057】

本発明において親株としては、例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下していない細胞があげられる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を低下または欠失させるような処理を施していない細胞が用いられる。

【0058】

本発明において、ADCC活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体Fc領域とエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

30

【0059】

本発明は、また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖修飾に関与する酵素の活性が、遺伝子工学的な手法により低下した細胞(以下、本発明の宿主細胞と略記する)に関する。本発明の宿主細胞は、ADCC活性が高い抗体組成物を生産するための宿主細胞として有用である。

40

【0060】

本発明の宿主細胞としては、抗体分子を発現できる宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。その例として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞の具体的な例としては、後述の3.に記載のものがあげられる。特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3 HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/

50

O-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0061】

1. 本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

(1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素としては、具体的には、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ、-L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

【0062】

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学、12, 239, (1993)、バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097, (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.), 5, 1083, (1995)、細胞工学, 13, 255, (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886

(1999)等に記載されたアンチセンス法又はリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードするcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

【0063】

調製したあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

【0064】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿

10

20

30

40

50

主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

本発明の宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。

【0065】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3.に記載の発現ベクターがあげられる。

10

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

【0066】

20

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座3 糖質I,糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学,別冊,実験プロトコルシリーズ,グライコバイオロジー実験プロトコル,糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

30

【0067】

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

40

【0068】

DNAの調製方法

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞、各種宿主細胞から全RNA又はmRNAを調製する。調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミ

50

ンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードするDNAを取得することができる。

【0069】

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のごとくヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法[メソツズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法[アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)]などがあげられる。

また、全RNAからpoly(A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)などがあげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia社)などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0070】

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit(STRATAGENE社)を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express[STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II(STRATAGENE社)、gt10、gt11[ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、TriplEx(Clontech社)、ExCell(Pharmacia社)、pT7T318U(Pharmacia社)、pcD2[モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]およびpUC18[ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

【0071】

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'[STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600[ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088[サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090[サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]およびEscherichia coli JM105[ジーン(Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

このcDNAライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法[ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996);

10

20

30

40

50

遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社) (1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

【 0 0 7 2 】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に特異的なデジェネレティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコルズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

10

【 0 0 7 3 】

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはA B I P R I S M 3 7 7 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

20

該遺伝子断片DNAをプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

【 0 0 7 4 】

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することもできる。

30

【 0 0 7 5 】

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはA B I P R I S M 3 7 7 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

40

決定したcDNAの塩基配列をもとに、B L A S T等の相同性検索プログラムを用いて、GeneBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

【 0 0 7 6 】

50

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号48、51または65に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または2に記載の塩基配列があげられる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

10

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

【0077】

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) やUniversal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを単離することもできる。

20

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

30

【0078】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した5~150塩基、好ましくは5~60塩基、より好ましくは10~40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴヌクレオチド) または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

40

【0079】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体 (以下、オリゴヌクレオチド誘導体という) 等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド

50

核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

【0080】

10

(b) 相同組換え法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

20

【0081】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

30

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

【0082】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞があげられる。

40

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載の「ゲノムDNAの調製方法」などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

【0083】

50

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング 第2版)やPCR法[ピーシーアール・プロトコルズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)]等があげられる。

【0084】

(c) RDO方法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO(RNA-DNA oligonucleotide)法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

【0085】

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「DNAの調製方法」などがあげられる。

【0086】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「ゲノムDNAの調製方法」などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)]等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー(Pharmacia社製)等を用いて解析することで該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0087】

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に
10
関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記1の(1)の(a)に記載の、導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の1の(5)に記載の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の5または後述の6に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができ
20
る。

【0088】

RDOのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386, (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285, (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462, (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829, (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768, (1999); ヌクレック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323, (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43, (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555, (2000)等の記載に従って設計することができる。
30

【0089】

(d) RNAi方法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。
40

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する。

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi 遺伝子のコンストラクトを設計する。

【0090】

該RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3 . に記載の宿主細胞があげられる。

【0091】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3 . に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3 . に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

【0092】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載されたDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

【0093】

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RNAi遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502, (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999); セル(Cell), 95, 1017, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959, (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70, (2000)]等の記載に従って設計することができる。

【0094】

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.), 25, 35, (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿入された外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

【0095】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

【0096】

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ、-L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体を作製について具体的に以下に述べる。

【0097】

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸(133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン)が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている(Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれ

10

20

30

40

50

の変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDの結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD(配列番号65)では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

【0098】

本発明の宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子(以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する)を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

【0099】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3.に記載の発現ベクターがあげられる。

【0100】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

【0101】

(3) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ、-L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0102】

方法としては、1)突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2)突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3)突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

【0103】

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版(朝倉書店)日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法をあげることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体をあげることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。

【0104】

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術[バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術[Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)]等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素として

10

20

30

40

50

は、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0105】

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51, (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)等をあげることができる。

【0106】

具体的には、1 μ g/ml ~ 1 mg/mlの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日 ~ 2週間、好ましくは1日 ~ 1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

上記方法で得られる株としては、例えば、後述の実施例14(2)で取得したCHO/CCR4-LCA株Nega-13 (FERM BP-7756)があげられる。

【0107】

2. 本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の、抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に係る酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの1位にフコースの6位が結合する糖鎖修飾に関する酵素の遺伝子を標的として、1.に記載の手法を用いて作製した本発明の胚性幹細胞、受精卵細胞、植物カルス細胞より、例えば以下のように作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関する酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

【0108】

具体的には、染色体上の細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関する酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法 [例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等]により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコ

10

20

30

40

50

ースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

【0109】

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

10

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

【0110】

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

20

作製したカルスを、公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンドズ・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じてオーキシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

【0111】

3. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと略す)等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

30

抗体分子の全長cDNAを調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

40

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を、遺伝子工学的な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。

【0112】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有

50

しているものが用いられる。

cDNAは、上記1の(1)の(a)に記載のDNAの調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)等をあげることができる。

【0113】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF1プロモーター、CUP1プロモーター等をあげることができる。

10

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスボロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*等をあげることができる。

【0114】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[メソッズ・エンザイモロジー(*Methods. Enzymol.*), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法[ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(*J. Bacteriology*), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*), 75, 1929 (1978)]に記載の方法等をあげることができる。

20

【0115】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8(フナコシ社より市販)、pAGE107[特開平3-22979; サイトテクノロジー(*Cytotechnology*), 3, 133, (1990)]、pAS3-3[特開平2-227075]、pCDM8[ネイチャー(*Nature*), 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp(Invitrogen社)、pREP4(Invitrogen社)、pAGE103[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(*J. Biochemistry*), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

30

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0116】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637(特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

40

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(*Cytotechnology*), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法[特開平2-227075]、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法[マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法[特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法[バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法(羊土社)横田崇・新井賢

50

一編(1994)]、ウイルスベクター法[マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

【0117】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

10

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111(ともにInvitrogen社)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

【0118】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21[カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5(Invitrogen社)等を用いることができる。

20

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

30

【0119】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)[特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法[特開昭60-251887]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法[日本特許第2606856、日本特許第2517813]等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc領域と他のタンパク質との融合タンパク質発現等を行うことができる。

40

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

【0120】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養

50

する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0121】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含みする糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0122】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0123】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0124】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [ヴェウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオリジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地 [発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0125】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、ExCell 400、ExCell 405(いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 6 】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5 ~ 9、20 ~ 40 の条件下で3 ~ 60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

10

【 0 1 2 7 】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

20

【 0 1 2 8 】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

30

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

【 0 1 2 9 】

40

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等をあげることができる。

50

この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである カゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0130】

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養，20 (1994)；組織培養，21 (1995)；トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology)，15，45 (1997)〕に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

10

【0131】

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学(株)製)等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

20

【0132】

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

30

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質などをあげることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

【0133】

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖(H鎖)及び軽鎖(L鎖)C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

40

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域(以下、hC₁と表記する)及びヒト抗体のL鎖のC領域(以下、hC₂と表記する)等があげられる。

ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

【0134】

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組込み発現

50

できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

10

【 0 1 3 5 】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ(以下、タンデム型と表記する)のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

20

【 0 1 3 6 】

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

30

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【 0 1 3 7 】

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

40

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる

50

方法などがあげられる。

【 0 1 3 8 】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、zap II (Stratagene社製)、gt10、gt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

10

【 0 1 3 9 】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

20

【 0 1 4 0 】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する；モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

30

【 0 1 4 1 】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシークエンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

40

【 0 1 4 2 】

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Inter

50

est), US Dept. Health and Human Services, 1991]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖及びL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]と比較することによって見出すことができる。

【0143】

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖及びL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0144】

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRを移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖及びL鎖のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

【0145】

次に、選択したヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、10塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項3の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0146】

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子の上流に、本項3の(5)で構築したヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項3の(5)でヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

【0147】

(7) ヒト化抗体の安定的生産

本項3の(4)及び(6)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と称す)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエロマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエロマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエロマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエロマYB2/0細胞、1.に記載本発明の宿主細胞等があげられる。

【0148】

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate(以下、G418と表記する; SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地(日水製薬社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL302培地(JRH社製)、IMDM培地(GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地(GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清(以下、FBSと表記する)等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0149】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる[アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動[以下、SDS-PAGEと表記する; ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]やウエスタンブロットティング法[アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Lab

10

20

30

40

50

oratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等で測定することができる。

【0150】

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、前記1.に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

10

【0151】

4. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能はを測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

20

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

【0152】

5. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

30

【0153】

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置(BioLC)を用いる方法があげられる。BioLCはHPAEC-PAD(high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection)法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)]によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法[アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 55(1), 283-284 (1991)]に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジンで蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

40

【0154】

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、二次元糖鎖マップ法[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989年)]により行うことができる。二次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれ

50

プロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

【 0 1 5 5 】

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン（以下、PAと略記する）による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) , 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製) 、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) , 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

10

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

【 0 1 5 6 】

6 . 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であり、高いADCC活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記5 . に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

20

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications) , Wiley-Liss, Inc. , (1995) ; 酵素免疫測定法 , 第3版 , 医学書院 (1987) ; 改訂版 , 酵素抗体法 , 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay) 、VIA (Viroimmunoassay) 、EIA (Enzymeimmunoassay) 、FIA (Fluoroimmunoassay) 、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

30

【 0 1 5 7 】

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来のwheat-germ agglutinin) 、ConA (C. ensiformis 由来のconcanavalin A) 、RIC (R. communis 由来の毒素) 、L-PHA (P. vulgaris 由来のleukoagglutinin) 、LCA (L. culinaris 由来のlentil agglutinin) 、PSA (P. sativum 由来のPea lectin) 、AAL (Aleuria auranti a Lectin) 、ACL (Amaranthus caudatus Lectin) 、BPL (Bauhinia purpurea Lectin) 、DSL (Datura stramonium Lectin) 、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin) 、EBL (Elderberry Balk Lectin) 、ECL (Erythrina cristagalli Lectin) 、EEL (Euonymus europaeus Lectin) 、GNL (Galanthus nivalis Lectin) 、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin) 、HPA (Helix pomatia Agglutinin) 、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin) 、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin) 、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin) 、MAL (Maackia amurensis Lectin) 、MPL (Maclura pomifera Lectin) 、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin) 、PNA (Peanut Agglutinin) 、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin) 、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin) 、RCA (Ricinus communis Agglutinin) 、STL (Solanum tuberosum Lectin) 、SJA (Sophora japonica Agglutinin) 、SBA (Soybean Agglutinin) 、UEA (Ulex europaeus Agglutinin) 、VVL (Vicia villosa Lectin) 、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin) があげられる。

40

【 0 1 5 8 】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合して

50

いる糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) をあげることができる。

【0159】

7. 本発明の抗体分子の利用

本発明の抗体組成物は高い抗体依存性細胞障害活性を有する。高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウイルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

10

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常抗腫瘍剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常抗腫瘍剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス(Science), 280, 1197, 1998]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

【0160】

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それらの疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

20

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を抑えることにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

30

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。

【0161】

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗GD2抗体 (Ohta et al., Anticancer Res., 13, 331-336, 1993)、抗GD3抗体 (Ohta et al., Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993)、抗GM2抗体 (Nakamura et al., Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗HER2抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗CD52抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗MAGE抗体 (Jungbluth et al., British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗HM1.24抗体 (Ono et al., Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Ogata et al., Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗FGF8抗体 (Matsuzaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8受容体抗体 (Kuo et al., J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗PSMA抗体 (Murphy et al., J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Presta et al., Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997)、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Kanno et al., Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

40

50

【0162】

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン6抗体 (Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン6受容体抗体 (Sato et al., Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン5抗体 (Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 (Bird et al., Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン4受容体抗体 (Jung et al., J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Tempest et al., Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Amrani et al., Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗CCR4抗体 (Campbell et al., Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (Peri et al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (Wu et al., J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) などがあげられる。循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては抗Gp11b/IIIa抗体 (Co et al., J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Ferns et al., Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (Shulman et al., J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997)、抗血液凝固因子抗体 (Peter et al., Circulation, 101, 1158-1164, 2000) などがあげられる。

10

【0163】

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗gp120抗体 (Tugarinov et al., Structure, 8, 385-395, 2000)、抗CD4抗体 (Schulze-Koops et al., J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗CCR4抗体、抗ペロ毒素抗体 (Karmali et al., J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) などがあげられる。

20

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所 (現：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター) 等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

30

【0164】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

40

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0165】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

50

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 μ g/kg~20mg/kgである。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[*キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー*(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); *キャンサー・リサーチ*(Cancer Research), 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

【0166】

【実施例】

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

(発明を実施するための最良の形態)

実施例1. 抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChiLHGM4の構築

抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体(以下、抗GD3キメラ抗体と表記する)のL鎖の発現ベクターpChi641LGM4 [*ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ*(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]を制限酵素MluI(宝酒造社製)とSalI(宝酒造社製)で切断して得られるL鎖cDNAを含む約4.03kbの断片と動物細胞用発現ベクターpAGE107 [*サイトテクノロジー*(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]を制限酵素MluI(宝酒造社製)とSalI(宝酒造社製)で切断して得られるG418耐性遺伝子及びスプライシングシグナルを含む約3.40kbの断片をDNA Ligation Kit(宝酒造社製)を用いて連結、大腸菌HB101株[*モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル*(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989]を形質転換してプラスミドpChi641LGM40を構築した。

【0167】

次に、上記で構築したプラスミドpChi641LGM40を制限酵素ClaI(宝酒造社製)で切断後、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いて平滑末端化し、更にMluI(宝酒造社製)で切断して得られるL鎖cDNAを含む約5.68kbの断片と抗GD3キメラ抗体のH鎖の発現ベクターpChi641HGM4 [*ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ*(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]を制限酵素XhoI(宝酒造社製)

で切断後、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いて平滑末端化し、更にMluI(宝酒造社製)で切断して得られるH鎖cDNAを含む約8.40kbの断片をDNA Ligation Kit(宝酒造社製)を用いて連結、大腸菌HB101株[*モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル*(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989]を形質転換して抗GD3キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChi641LHGM4を構築した。

【0168】

2. 抗GD3キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例1の1項で構築した抗GD3キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChi641LHGM4

を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗GD3キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

【0169】

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

抗GD3キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4の5 μ gを4 \times 10⁶細胞のラットミエローマYB2/0細胞 [ATCC CRL-1662、J.V. Kilmarin et al., J. Cell. Biol. 93, 576-582 (1982)] ヘレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10) [FBS (GIBCO BRL社製)を10%含むRPMI1640培地] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37[°]C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

10

【0170】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHF R遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、DHFRの阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTXと表記する; SIGMA社製) を50nM含むRPMI1640-FBS(10) 培地に1~2 \times 10⁵細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に2mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37[°]Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例9に示す^{-1,6-}フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

20

このようにして得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン7-9-51は平成11年4月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) (現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6)) にFERM BP-6691として寄託されている。

30

【0171】

(2) CHO/DG44細胞を用いた生産細胞の作製

抗GD3キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4の4 μ gを1.6 \times 10⁶細胞のCHO/DG44細胞[G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] ヘレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mlのIMDM-FBS(10) [FBSを10%、HT supplement (GIBCO BRL社製) を1倍濃度で含むIMDM培地] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37[°]C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

40

【0172】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHF R遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを10nM含むIMDM-dFBS(10) 培地 [透析牛胎児血清 (以下、dFBSと表記する; GIBCO BRL社製)を10%含むIMDM培地] に1~2 \times 10⁵細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (岩城硝子社製) に0.5mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37[°]Cで1~2週間培養して、10nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については

50

、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nMに上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを100nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行った。尚、実施例9に示す-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

【0173】

(3) マウスミエローマNS0細胞を用いた生産細胞の作製

抗GD3キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4の5 μ gを4 \times 10⁶細胞のマウスミエローマNS0細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133, 199 10]により導入後、40mlのEX-CELL302-FBS(10)[FBSを10%、L-グルタミン(以下、L-Glnと表記する; GIBCO BRL社製)を2mM含むEX-CELL302培地]に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

【0174】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHF 20 R遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを50nM含むEX-CELL302-dFBS(10)培地(dFBSを10%、L-Glnを2mM含むEX-CELL302培地)に1~2 \times 10⁵細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート(Greiner社製)に2mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むEX-CELL 302-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行った。尚、実施例9に示す-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写 30物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

【0175】

3. 抗体のGD3に対する結合活性の測定(ELISA法)

抗体のGD3に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmolのGD3を10 μ gのジパルミトイルフォスファチジルコリン(SIGMA社製)と5 μ gのコレステロール(SIGMA社製)とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の20 μ l(40pmol/ウェルとなる)を96ウェルのELISA用のプレート(Greiner社製)の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン(以下、BSAと表記する; SIGMA社製)を含むPBS(以下、1%BSA-PBSと表記する)を100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20(和光純薬社製)を含むPBS(以下、Tween-PBSと表記する)で洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム]の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液(以下、同様)]を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度(以下、OD415と表記する)を測定した。

【0176】

4. 抗GD3キメラ抗体の精製

10

20

30

40

50

(1) YB2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例1の2項 (1) で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをBSAを0.2%、MTXを200nM、トリヨードチロニン (以下、T3と表記する; SIGMA社製) を100 nMの濃度で含むHybridoma-SFM培地に 3×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、2.0Lスピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて50rpmの速度で攪拌培養した。37 °Cの恒温室内で10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、YB2/0-GD3キメラ抗体と名付けた。

【 0 1 7 7 】

(2) CHO/DG44細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例1の2項 (2) で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを3mM、脂肪酸濃縮液 (以下、CDLCと表記する; GIBCO BRL社製) を0.5%、プルロニックF68 (以下、PF68と表記する; GIBCO BRL社製) を0.3%の濃度で含むEX-CELL302培地に 1×10^6 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm²フラスコ (Greiner社製) に50mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °Cで4日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3キメラ抗体と名付けた。

【 0 1 7 8 】

(3) NS0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例1の2項 (3) で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを2mM、G418を0.5mg/ml、MTXを200nM、FBSを1%の濃度で含むEX-CELL302培地に 1×10^6 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm²フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °Cで4日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、NS0-GD3キメラ抗体 (302) と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンをG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に 3×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm²フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °Cで10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、NS0-GD3キメラ抗体 (GIT) と名付けた。

【 0 1 7 9 】

(4) SP2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

特開平5-304989 (EP533199) に記載の抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン (KM-871 (FERM BP-3512)) をG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に 3×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm²フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °Cで8日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、SP2/0-GD3キメラ抗体と名付けた。

【 0 1 8 0 】

5. 精製した抗GD3キメラ抗体の解析

上記実施例1の4項で得られた各種動物細胞で生産、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体の各4µgを公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, 1970] に従ってSDS-PAGEし、分子量及び精製度を解析した。その結果を第1図に示した。第1図に示したように、精製した各抗GD3キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150キログルトン (以下、Kdと表記する) の単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量 (H鎖: 約49Kd、L鎖: 約23Kd、分子全体: 約144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合 (以下、S-S結合と表記する) が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つ

10

20

30

40

50

L鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、各抗GD3キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

【 0 1 8 1 】

実施例2．抗GD3キメラ抗体の活性評価

1．抗GD3キメラ抗体のGD3に対する結合活性 (ELISA法)

上記実施例1の4項で得られた5種類の精製抗GD3キメラ抗体のGD3 (雪印乳業社製) に対する結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。第2図は、添加する抗GD3キメラ抗体の濃度を变化させて結合活性を検討した結果である。第2図に示したように、5種類の抗GD3キメラ抗体は、ほぼ同等のGD3に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NS0-GD3キメラ抗体 (302) とNS0-GD3キメラ抗体 (GIT) の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

10

【 0 1 8 2 】

2．抗GD3キメラ抗体のin vitro細胞障害活性 (ADCC活性)

上記実施例1の4項で得られた5種類の精製抗GD3キメラ抗体のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

20

【 0 1 8 3 】

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

【 0 1 8 4 】

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

30

【 0 1 8 5 】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の50 μl (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を100 μl (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる) 添加した。更に、各種抗GD3キメラ抗体を各最終濃度0.0025~2.5 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を β -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式 (II) により求めた。

40

【 0 1 8 6 】

【数1】

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100 \quad (\text{II})$$

【 0 1 8 7 】

その結果を第3図に示した。第3図に示したように、5種類の抗GD3キメラ抗体のうち、YB 2/0-GD3キメラ抗体が最も高いADCC活性を示し、次いでSP2/0-GD3キメラ抗体、NS0-GD3キメラ抗体、CH0-GD3キメラ抗体の順に高いADCC活性を示した。培養に用いた培地の異なるNS0-GD3キメラ抗体 (302) とNS0-GD3キメラ抗体 (GIT) では、それらのADCC活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体のADCC活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体のFc領域の構造の差に起因していることが推定された。

【 0 1 8 8 】

実施例3．抗ヒトインターロイキン5レセプター 鎖ヒト型CDR移植抗体の作製

1．抗ヒトインターロイキン5レセプター 鎖ヒト型CDR移植抗体の安定生産細胞の作製

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗ヒトインターロイキン5レセプター 鎖ヒト型CDR移植抗体 (以下、抗hIL-5R CDR移植抗体と表記する) の発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗hIL-5R CDR移植抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の5 µgを4 × 10⁶細胞のラットミエローマYB2/0細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, 1990]により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10) に懸濁し、96ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に200 µl/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5R CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

【 0 1 8 9 】

培養上清中に抗hIL-5R CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを50nM含むRPMI1640-FBS(10) 培地に1~2 × 10⁵細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に2mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 °Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗hIL-5R CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗hIL-5R CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗hIL-5R CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例9に示す -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。このようにして得られた抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンNo.3は平成11年4月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) (現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6)) にFERM B P-6690として寄託されている。

【 0 1 9 0 】

(2) CHO/dhfr-細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の4 μ gを1.6 $\times 10^6$ 細胞のCHO/dhfr-細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mlのIMDM-FBS(10)に懸濁し、96ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5R CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

【0191】

培養上清中に抗hIL-5R CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを10nM含むIMDM-dFBS(10)培地に1~2 $\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (岩城硝子社製) に0.5mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cで1~2週間培養して、10nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、500nMに上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを500nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗hIL-5R CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例9に示す -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

【0192】

(3) マウスミエローマNSO細胞を用いた生産細胞の作製

ヤラントン (Yarranton) らの方法 [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)] に従い、WO97/10354に記載の抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0上の抗体H鎖及びL鎖cDNAを用いて抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターを作製し、NSO細胞を形質転換し、抗hIL-5R CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例9に示す -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として用いた。

【0193】

2. 抗体のhIL-5R に対する結合活性の測定 (ELISA法)

抗体のhIL-5R に対する結合活性は以下のようにして測定した。

WO97/10354に記載の抗hIL-5R マウス抗体KM1257をPBSで10 μ g/mlの濃度に希釈した溶液の50 μ lを96ウェルのELISA用のプレート (Greiner社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、4 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。反応後、1%BSA-PBSを100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、WO97/10354に記載の可溶性hIL-5R を1%BSA-PBSで0.5 μ g/mlの濃度に希釈した溶液を50 μ l/ウェルで加え、4 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型CDR移植抗体の各種希釈溶液を50 μ l/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0194】

3. 抗hIL-5R CDR移植抗体の精製

(1) YB2/O細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項 (1) で得られた抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に3 $\times 10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm²フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cで8日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィ

ー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R CDR移植抗体は、YB2/0-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

【0195】

(2) CHO/dhfr-細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項(2)で得られた抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを3mM、CDLCを0.5%、PF68を0.3%の濃度で含むEX-CELL302培地に 3×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、4.0Lスピナーボトル(岩城硝子社製)を用いて100rpmの速度で攪拌培養した。37℃の恒温室内で10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R CDR移植抗体は、CHO/d-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

10

【0196】

(3) NS0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項(3)で得られた抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをヤラントン(Yarranton)らの方法[バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 169(1992)]に従い、培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R CDR移植抗体は、NS0-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

【0197】

4. 精製した抗hIL-5R CDR移植抗体の解析

20

上記実施例3の3項で得られた各種動物細胞で生産、精製した3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体の各4 μ gを公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]

に従ってSDS-PAGEし、分子量及び精製度を解析した。その結果を第4図に示した。第4図に示したように、精製した各抗hIL-5R CDR移植抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150Kdの単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量(H鎖: 約49Kd、L鎖: 約23Kd、分子全体: 約144Kd)

とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のS-S結合が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告[アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]と一致し、各抗hIL-5R CDR移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ、精製されたことが確認された。

30

【0198】

実施例4. 抗hIL-5R CDR移植抗体の活性評価

1. 抗hIL-5R CDR移植抗体のhIL-5R に対する結合活性(ELISA法)

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗hIL-5R CDR移植抗体のhIL-5R に対する結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。第5図は、添加する抗hIL-5R CDR移植抗体の濃度を变化させて結合活性を検討した結果である。第5図に示したように、3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体は、ほぼ同等のhIL-5R に対する結合活性を示した。この結果は実施例2の1項の結果と同様に、抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。

40

【0199】

2. 抗hIL-5R CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性(ADCC活性)

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗hIL-5R CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

【0200】

(1) 標的細胞溶液の調製

50

WO97/10354に記載のhIL-5R 鎖及び 鎖を発現しているマウスT細胞株CTLL-2(h5R) をRPMI1640-FBS(10) 培地で培養し、 1×10^6 細胞/0.5mlとなるように調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37 °Cで1.5時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4 °Cで30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

【 0 2 0 1 】

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 9×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【 0 2 0 2 】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の50 μ l（ 1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を100 μ l（ 9×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は90:1となる）添加した。更に、各種抗hIL-5R CDR移植抗体を各最終濃度0.001 ~ 0.1 μ g/mlとなるように加え、37 °Cで4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を β -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は前記式（II）により求めた。

【 0 2 0 3 】

その結果を第6図に示した。第6図に示したように、3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体のうち、YB2/0-hIL-5RCDR抗体が最も高いADCC活性を示し、次いでCHO/d-hIL-5RCDR抗体、NS0-hIL-5RCDR抗体の順に高いADCC活性を示した。以上の結果は実施例2の2項の結果と同様に、抗体のADCC活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、2種類のヒト化抗体のいずれの場合もYB2/0細胞で生産した抗体が最も高いADCC活性を示したことから、YB2/0細胞を用いることにより、ADCC活性の高い抗体を製造できることが明らかとなった。

【 0 2 0 4 】

3. 抗hIL-5R CDR移植抗体のin vivoにおける活性評価

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗hIL-5R CDR移植抗体のin vivoにおける活性を評価するため、以下に示す方法に従い、カニクイザルのhIL-5誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を検討した。

カニクイザルに初日よりhIL-5（調製方法はWO97/10354に記載）を1 μ g/kgで1日1回、計14回背部皮下より投与した。各種抗hIL-5R CDR移植抗体を0日のhIL-5の投与1時間前に0.3mg/kgで静脈内に単回投与した。抗体非投与群をコントロールとして用いた。抗体投与群は各群3頭（No.301、No.302、No.303、No.401、No.402、No.403、No.501、No.502、No.503）、抗体非投与群は2頭（No.101、No.102）

のカニクイザルを用いた。投与開始の7日前より投与後42日目まで経時的に約1mlの血液を伏在静脈または大腿静脈より採取し、1 μ lの末梢血中の好酸球数を測定した。その結果を第7図に示した。第7図に示したように、YB2/0-hIL-5RCDR抗体を投与した群では、血中好酸球の増加が完全に抑制された。一方、CHO/d-hIL-5RCDR抗体の投与群では、1頭で完全な抑制作用が認められたものの、2頭ではその抑制作用は不十分であった。NS0-hIL-5RCDR抗体の投与群では、完全な抑制作用は認められず、その効果は不十分であった。

【 0 2 0 5 】

以上の結果は、抗体のin vivo活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なるこ

とを示している。更に、抗hIL-5R CDR移植抗体ではそのin vivo活性の高さは、実施例4の2項で述べたADCC活性の高さと正の相関が認められたことから、その活性発現には、ADC C活性の高さが極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、ADCC活性の高い抗体は、ヒトの各種疾患の臨床においても有用であることが期待される。

【0206】

実施例5. ADCC活性を高める糖鎖の解析

1. 2-アミノピリジン標識糖鎖 (PA化糖鎖) の調製

本発明のヒト化抗体を塩酸による酸加水分解にてシアル酸を除去した。塩酸を完全に除去した後、ヒドラジン分解により糖鎖をタンパク質から切断した [メソヅ・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)]。蛍光標識した糖鎖 (PA化糖鎖) を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム (Pharmacia社製) を用いて不純物と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖とした。

【0207】

2. 精製抗hIL-5R CDR移植抗体のPA化糖鎖の逆相HPLC分析

上記実施例5の1項の方法で実施例3で作製された各種抗hIL-5RCDR抗体についてPA化糖鎖を行った後、CLC-ODSカラム (Shimadzu社製) による逆相HPLC分析を行った。過剰量の-L-フコシダーゼ (ウシ腎由来、SIGMA社製) をPA化糖鎖に添加して消化を行い (37℃、15時間)、逆相HPLCで分析した (第8図)。アスパラギン結合糖鎖は30分間から80分間の範囲に溶出することをTaKaRa社製PA化糖鎖スタンダードを用いて確認した。-L-フコシダーゼ消化によって、逆相HPLCの溶出位置が移動する糖鎖 (48分間から78分間に溶出される糖鎖) の全体に占める割合を計算した。結果を第1表に示す。

【0208】

【表1】

第1表	
抗体の生産細胞	α -1,6-フコース結合糖鎖 (%)
YB2/0	47
NS0	73

【0209】

YB2/0細胞で生産させた抗hIL-5RCDR移植抗体は約47%、NS0細胞で生産させた抗hIL-5RCDR移植抗体は約73%がNグリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合した糖鎖 (以下、「 α -1,6-フコースを持つ糖鎖」とも表記する) であった。よって、YB2/0細胞で生産した抗体は、NS0細胞で生産した抗体と比較してN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースが結合していない糖鎖 (以下、単に、「 α -1,6-フコースを持たない糖鎖」と表記する) の割合が α -1,6-フコースを持たない糖鎖が多かった。

【0210】

3. 精製抗hIL-5R CDR移植抗体の単糖組成分析

トリフルオロ酢酸による酸加水分解により、YB2/0細胞、NS0細胞およびCHO/d細胞で生産した抗hIL-5R CDR移植抗体の糖鎖を単糖に分解し、BioLC (Dionex社製) を用いて単糖組成分析を行った。

N-グリコシド結合糖鎖のうち、コンプレックス型では、1本の糖鎖におけるマンノース数は3であるため、マンノースを3として計算した場合の各単糖の相対比を第2表に示す。

【0211】

10

20

30

40

50

【表 2】

第 2 表

抗体の生産細胞	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	ADCC 活性 (%)*
YB2/0	0.60	4.98	0.30	3.00	42.27
NS0	1.06	3.94	0.66	3.00	16.22
CHO/dhfr-	0.85	3.59	0.49	3.00	25.73
CHO/dhfr-	0.91	3.80	0.27	3.00	25.73

*抗体濃度 0.01 μ g/ml

10

【 0 2 1 2 】

フコースの相対比は、YB2/0 < CHO/d < NS0であり、本結果でもYB2/0細胞で生産した抗体の糖鎖はフコース含量が最も低かった。

【 0 2 1 3 】

4. CHO/dhfr-細胞生産抗体の糖鎖解析

CHO/dhfr-細胞で生産した精製抗hII-5R CDR移植抗体からPA化糖鎖を調製し、CLC-ODSカラム（島津社製）を用いて逆相HPLC分析を行った（第9図）。第9図において、溶出時間35～45分間がフコースを持たない糖鎖、45～60分間がフコースを持つ糖鎖であった。CHO/dhfr-細胞で生産した抗hII-5R CDR移植抗体は、マウスミエローマNS0細胞で生産させた抗体と同様に、ラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗体よりもフコースを持たない糖鎖の含量が少なかった。

20

【 0 2 1 4 】

実施例6. 高ADCC活性抗体の分離

フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、ラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗hII-5R CDR移植抗体の分離を行った。HPLCは島津社製LC-6Aを用い、流速は1ml/分、カラム温度は室温で行った。50mMトリス-硫酸緩衝液（pH7.3）で平衡化し、精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を注入後、0.2M α -メチルマンノシド（ナカライテスク社製）の直線濃度勾配（60分間）にて溶出した。抗hII-5R CDR移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分離した。非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R に対する結合活性を測定すると、同様の結合活性を示した（10A図）。ADCC活性を測定すると、非吸着画分の方が吸着画分の一部よりも高い（100～1000倍）ADCC活性を示した（10B図）。さらに、非吸着画分、吸着画分の一部からPA化糖鎖を調製し、CLC-ODSカラム（島津社製）を用いて逆相HPLC分析を行った（第11図）。非吸着画分は主としてフコースのない糖鎖をもつ抗体であり、吸着画分の一部は主としてフコースがある糖鎖もつ抗体であった。

30

【 0 2 1 5 】

実施例7. -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗GD3キメラ抗体の活性評価

1. -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗GD3キメラ抗体の調製

実施例1の2項（1）に記載した方法に従って、抗GD3キメラ抗体を生産するYB2/0細胞由来の形質転換クローンを得た。それぞれのYB2/0細胞由来の形質転換クローンより抗体を調製し、それぞれをロット1、ロット2、ロット3とした。抗GD3キメラ抗体ロット1、ロット2、ロット3の糖鎖分析を、実施例11の（6）の方法に従って行った結果、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ50%、45%、29%であった。以下、これらの試料を、抗GD3キメラ抗体（50%）、抗GD3キメラ抗体（45%）、抗GD3キメラ抗体（29%）と表記する。

40

また、実施例1の2項（2）で調製したCHO/DG44細胞由来の抗GD3キメラ抗体の糖鎖分析を実施例11の（6）の方法に従って行った結果、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、7%であった。以下、本試料を抗GD3キメラ抗体（7%）と表記する。

【 0 2 1 6 】

50

さらに、抗GD3キメラ抗体（45%）と抗GD3キメラ抗体（7%）を用い、抗GD3キメラ抗体（45%）:抗GD3キメラ抗体（7%）=5:3および1:7の割合で混合した。これらの試料を、実施例11の（6）の方法に従って糖鎖分析を行った結果、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が24%および13%（分析値）であった。これらを以下、抗GD3キメラ抗体（24%）、抗GD3キメラ抗体（13%）と表記する。

第12図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

【0217】

2. GD3に対する結合活性の評価（ELISA法）

実施例7の1項で調製した-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる6種類の抗GD3キメラ抗体のGD3（雪印乳業社製）に対する結合活性は、実施例1の3項に示すELISA法により測定した。その結果、第13図に示したように、6種類の抗GD3キメラ抗体は、いずれも同等のGD3に対する結合活性を示し、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

【0218】

3. ヒトメラノーマ細胞株に対するADCC活性の評価

抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361（ATCC CRL1424）に対するADCC活性は、以下のようにして測定した。

【0219】

(1) 標的細胞溶液の調製

ヒトメラノーマ細胞株G-361の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7M Bq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を5mL加え、 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

【0220】

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（AXIS SHIELD社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20分間）して単核球層を分離した。培地で3回遠心分離（1200rpm、5分間）して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

【0221】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の50 μL （ 1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで上記（2）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を100 μL （ 2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる）添加した。さらに、抗GD3キメラ抗体を各最終濃度0.0005~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量を β -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、ヒトエフェクター細胞溶液の代わりに1mol/Lの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性（%）は前記式（II）により求めた。

【0222】

第14図および第15図には、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる6種類の抗GD3キメラ抗体の各種濃度（0.0005~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）におけるADCC活性を2名の健常人ドナー（A、B）のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第14図および第15図に示したように、抗GD3キメラ抗体のADCC活性は、いずれの抗体濃度においても-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC活

10

20

30

40

50

性は低下する。抗体濃度が0.05 µg/mlでは、-1,6-フコースを持たない糖鎖が24%、29%、45%および50%のADCC活性はほぼ同様の高い活性を示したが、-1,6-フコースを持たない糖鎖が20%未満の抗体である、13%および7%では、ADCC活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

【0223】

実施例8. -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗CCR4キメラ抗体の活性評価

1. 抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞の作製

WO01/64754記載の抗CCR4キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpKANTEX2160を用いて抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

【0224】

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

10 µgの抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を 4×10^6 細胞のラットミエローマYB2/0細胞 (ATCC CRL1662) ヘレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mLのHybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAAラボラトリーズ社製) を5%含むHybridoma-SFM培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製)

に200 µL/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を1mg/mLになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例8の2項記載のELISA法により測定した。

【0225】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を1mg/mL、DHFRの阻害剤であるMTX (SIGMA社製) を50nM含むHybridoma-SFM-FBS(5) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に1mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例8の2項記載のELISA法により測定した。

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を上昇させ、最終的にMTXを200nMの濃度で含むHybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行い、得られたクローン化株をKM2760#58-35-16と名付けた。尚、実施例9に示す -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

【0226】

(2) CHO/DG44細胞を用いた生産細胞の作製

抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160の4 µgを 1.6×10^6 細胞のCHO/DG44細胞ヘレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mlのIMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS (インビトロジェン社製) を10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を1倍濃度で含むIMDM培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に100 µL/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析FBSを10%で含むIMDM培地) に培地交換し、1~2週間培養した。HT非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の発現量を実施例8の2項記載のELISA法により測定した。

【0227】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTXを50nM含むIMDM-dFBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (岩城硝子社製) に0.5

10

20

30

40

50

mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を200nMに上昇させ、最終的にMTXを200nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は5-03株と名付けた。

【0228】

2. 抗体CCR4部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA法)

抗CCR4キメラ抗体が反応し得るヒトCCR4細胞外領域ペプチドとして化合物1 (配列番号25) を選択した。ELISA法による活性測定に用いるため、以下の方法でBSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mgのBSAを含むPBS溶液900 mLに、100mlの25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシリクアシッドN-ヒドロキシサクシニミドエステル] (シグマ社製)-DMSO溶液をvortexしながら滴下し、30分間ゆっくりと攪拌した。25 mL PBSで平衡化したNAP-10カラムなどのゲルろ過カラムに反応液1mLをアプライし、1.5mLのPBSで溶出させた溶出液をBSA-SMCC溶液とした (A₂₈₀測定からBSA濃度を算出)。次に、0.5 mgの化合物1に250mL PBSを加え、次いで250mL DMFを加えて完全に溶解させた後、前述のBSA-SMCC溶液 (BSA換算1.25mg) をvortex下で添加して3時間ゆっくり攪拌した。反応液をPBSに対して4倍、一晚透析し、最終濃度0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 mmフィルターでろ過した後BSA-化合物1溶液とした。

【0229】

96穴のEIA用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを0.05 µg/mL、50 µl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 µL/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS (以下、Tween-PBSと表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を50 µL/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで6000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG () 抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 µL/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 µL/ウェルに加えて発色させ、20分後に5%SDS溶液を50 µL/ウェル加えて反応を停止した。その後OD415を測定した。実施例8の1項で得られた抗CCR4キメラ抗体は、CCR4に対する結合活性を示した。

【0230】

3. 抗CCR4キメラ抗体の精製

(1) YB2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例8の1項 (1) で得られた抗CCR4キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローンKM2760#58-35-16を200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を5%の濃度で含むHybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に2 × 10⁵細胞/mlとなる様に懸濁し、スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて37℃の恒温室内でFed-Batch攪拌培養した。8-10日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A (ミリポア社製) カラム及びゲルろ過法を用いて、抗CCR4キメラ抗体を精製した。精製した抗CCR4キメラ抗体をKM2760-1と名づけた。

【0231】

(2) CHO/DG44細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例8の1項 (2) で得られた抗CCR4キメラ抗体を生産する形質転換細胞株5-03株をIMDM-dFBS(10)培地中で、182cm²フラスコ (Greiner社製) にて5%CO₂インキュベーター内で37℃にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25mlのPBSバッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301培地 (JRH社製) を35ml注入した。5%CO₂インキュベーター内で37℃にて7日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CCR4キメラ抗体を精製した。精製した抗CCR4キメラ抗体はKM3060と名付けた。

KM2760-1およびKM3060のCCR4に対する結合活性を実施例8の2項記載のELISAにより測定した結果、同等の結合活性を示した。

10

20

30

40

50

【0232】

4. 精製した抗CCR4キメラ抗体の解析

本実施例1項で得られた各種動物細胞で生産、精製した2種類の抗CCR4キメラ抗体の各4 µgを公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227,680, 1970] に従ってSDS-PAGEし、分子量及び製精度を解析した。精製した各抗CCR4キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150Kdの単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量 (H鎖: 約49Kd、L鎖: 約23Kd、分子全体: 約144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のS-S結合が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告 [アンティボ
10
ディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、抗CCR4キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

【0233】

5. -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗CCR4キメラ抗体の調製

実施例8の3項 (1) で調製した、YB2/0細胞由来の抗CCR4キメラ抗体KM2760-1と、実施例8の3項 (2) で調製した、CHO/DG44細胞由来の抗CCR4キメラ抗体KM3060の糖鎖分析を、
20
実施例11の (6) の方法に従って行った。 -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、KM2760-1は87%、KM3060は8%であった。以下、これらの試料を、抗CCR4キメラ抗体 (87%)、抗CCR4キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗CCR4キメラ抗体 (87%) と抗CCR4キメラ抗体 (8%) を用い、抗CCR4キメラ抗体 (87%):抗CCR4キメラ抗体 (8%) = 1:39、16:67、22:57、32:47、42:37の割合で混合した。これらの試料を実施例11の (6) の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。 -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ9%、18%、27%、39%、46%であった。以下、これらの試料を抗CCR4キメラ抗体 (9%)、抗CCR4キメラ抗体 (18%)、抗CCR4キメラ抗体 (27%)、抗CCR4キメラ抗体 (39%)、抗CCR4キメラ抗体 (46%) と表記する。

第16図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。 -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2回の結果を平均した値を用いた。
30

【0234】

6. CCR4部分ペプチドに対する結合活性の評価 (ELISA法)

実施例8の5項で調製した -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる6種類の抗CCR4キメラ抗体のCCR4部分ペプチドに対する結合活性は実施例8の2に記載の方法に従って測定した。

その結果、第17図に示したように、6種類の抗CCR4キメラ抗体は、いずれも同等のCCR4に対する結合活性を示し、 -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

【0235】

7. ヒトCCR4高発現細胞株に対するADCC活性の評価
40

抗CCR4キメラ抗体のヒトCCR4高発現細胞であるCCR4/EL-4細胞 (W001/64754) に対するADCC活性は、以下のようにして測定した。

【0236】

(1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754に記載のヒトCCR4を発現しているCCR4/EL-4細胞の 1.5×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を5.55MBq当量加えて37 °Cで1時間30分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4 °Cで30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を7.5mL加え、 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

【0237】
50

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血60mLを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を0.6mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（AXIS SHIELD社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20分間）して単核球層を分離した。培地で3回遠心分離（1400rpm、5分間）して洗浄後、培地を用いて 5×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

【0238】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の50 μ L（ 1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで上記（2）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を100 μ L（ 5×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は50:1となる）添加した。さらに、抗CCR4キメラ抗体を各最終濃度0.0001～10 μ g/mLとなるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量を β -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに1mol/Lの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性（%）は前記式（II）により求めた。

【0239】

第18図および第19図には、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗CCR4キメラ抗体の各種濃度（0.001～10 μ g/mL）におけるADCC活性を2名の健常人ドナー（A、B）のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第18図および第19図に示したように、抗CCR4キメラ抗体のADCC活性はいずれの抗体濃度においても α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC活性は低下する。抗体濃度が0.01 μ g/mlでは、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が27%、39%および46%のADCC活性はほぼ同様の高い活性を示したが、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が20%未満の抗体では、ADCC活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

【0240】

実施例9．宿主細胞株における α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の転写物の定量

(1) 各種細胞株由来一本鎖cDNAの調製

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（dhfr）を欠損したチャイニーズハムスター卵巢由来CHO/DG44細胞およびラットミエローマYB2/0細胞より、以下の手順で一本鎖cDNAを調製した。

CHO/DG44細胞を10% ウシ胎児血清（Life Technologies社製）および1倍濃度のHT supplement（Life Technologies社製）を添加したIMDM培地（Life Technologies社製）に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で接着細胞培養用T75フラスコ（Greiner社製）に15ml播種した。また、YB2/0細胞を10% ウシ胎児血清（Life Technologies社製）、4mmol/l L-GLN（Life Technologies社製）を添加したRPMI1640培地（Life Technologies社製）に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ（Greiner社製）に15ml播種した。これらを37℃の5%CO₂インキュベーター内で培養し、培養1日目、2日目、3日目、4日目および5日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収後、RNAeasy（QIAGEN社製）により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

【0241】

全RNAを45 μ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase（Promega社製）1 μ l、付属の10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor（Promega社製）0.5 μ lをそれぞれに添加して、37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy（QIAGEN社製）により全RNAを再精製し、50 μ lの滅菌水に溶解した。

得られた各々の全RNA3 μ gに対し、SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis（Life Technologies社製）を用いて添付の説明書に従い、オリ

10

20

30

40

50

ゴ (dT) をプライマーとした20 μ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。各宿主細胞由来 -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8ともいう)、-アクチンのクローニングには該反応液の1倍濃度液を、競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量には該反応液の50倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで-80 で保管した。

【0242】

(2) チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片の取得

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片の取得は、以下の手順で行った (第20図)。

まず、ヒトFUT8のcDNA [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 121, 626, (1997)] およびブタFUT8のcDNA [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 271, 27810, (1996)] に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号4および配列番号5に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養2日目のCHO細胞由来cDNAおよびYB2/0細胞由来cDNAを各々1 μ lを含む25 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号4および配列番号5)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、94 で1分間の加熱の後、94 で30秒間、55 で30秒間、72 で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72 で10分間加熱する条件で行った。

【0243】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片979bpをGENECLE AN Spin Kit (BIO 101社製) を用いて精製し、滅菌水10 μ lで溶出した (以下、アガロースゲルからのDNA断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 4 μ lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株をコーエンらの方法

[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた6クローンから、公知の方法 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って各々プラスミドDNAを単離した。

【0244】

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー-377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 (配列番号6および7に示す) のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、各プラスミドをCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1と称す。

【0245】

(3) チャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチンcDNAの取得

チャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチンの取得は、以下の手順で行った (第21図)。

まず、チャイニーズハムスター -アクチンゲノム配列 (GenBank, U20114) およびラット -アクチンゲノム配列 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 11, 1759 (1983)] より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号8に示す) および翻訳終止コドンを含む各配列特異的リバースプライマー (配列番号9および配列番号10に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼKOD (東洋紡績社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養2日目のCHO細胞由来cDNAおよびYB2/0細胞由来cDNA 1 μ lを含む25 μ lの反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl₂、0.4 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライ

マー（配列番号8および9、または配列番号8および10）、5% DMSO] を調製し、PCRを行った。PCRは、94 で4分間の加熱の後、98 で15秒間、65 で2秒間、74 で30秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行った。

【0246】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1128bpを精製した。このDNA断片に対し、MEGALABEL（宝酒造社製）を用いて、添付の説明書に従いDNA5'末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、滅菌水10μlに溶解した。

一方、プラスミドpBluescriptII KS(+) 3μg（Stratagene社製）をNEBuffer 2（New England Biolabs社製）35μlに溶解し、16単位の制限酵素EcoRV（宝酒造社製）を加えて37 で3時間消化反応を行った。該反応液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35μlおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5μlを添加して65 で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 100μlに溶解した。

【0247】

上記で得たチャイニーズハムスターcDNA由来増幅断片およびラットcDNA由来増幅断片（1192bp）4μl、プラスミドpBluescriptII KS(+)由来のEcoRV-EcoRV断片（約3.0Kb）1μl、Ligation High（東洋紡績社製）5μlを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377（Parkin Elmer社製）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Parkin Elmer社製）を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、チャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチン各cDNAのORF全長配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、各プラスミドをCHAc-pBSおよびYBAC-pBSと称す。

【0248】

(4) FUT8スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内のFUT8遺伝子由来mRNA転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。FUT8定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1のうち、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。以下にその詳細を説明する。

【0249】

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミドCHFT8-pCR2.1 2μgをNEBuffer 2（New England Biolabs社製）40μlに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37 で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBFT8-pCR2.1 2μgをNEBuffer 2（New England Biolabs社製）40μlに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37 で3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 各cDNA部分断片を含むEcoRI-EcoRI断片（約1Kb）がプラスミドCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1より分離されたことを確認した。各反応液より、1μg/ml パン酵母由来t-RNA（SIGMA社製）を用いて0.02fg/μl、0.2fg/μl、1fg/μl、2fg/μl、10fg/μl、20fg/μl、100fg/μlの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のスタンダードとした。

【 0 2 5 0 】

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部コントロールの調製は次のように行った (第22図)。DNAポリメラーゼKOD (東洋紡績社製) を用いて、CHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1 5ngを含む25 μ lの反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl₂、0.4 μ mol/l 遺伝子特異的プライマー (配列番号11および12)、5% DMSO] を調製し、PCRを行った。PCRは、94 で4分間の加熱の後、98 で15秒間、65 で2秒間、74 で30秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行った。PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約4.7Kbを精製した。該DNA断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従いDNA5'末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、滅菌水50 μ lに溶解した。上記で得たDNA断片 (約4.7Kb) 5 μ lおよびLigation High (東洋紡績社製) 5 μ lを混合し、16 で30分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

10

【 0 2 5 1 】

該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。各プラスミドDNAに対しDNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列Scal-HindIII間203bpが欠失したことを確認した。得られた各プラスミドをCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1と称す。

20

次にプラスミドCHFT8d-pCR2.1 2 μ gをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 40 μ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBFT8d-pCR2.1 2 μ gをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 40 μ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 で3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8部分断片の内部塩基配列203bpが欠失した断片を含むEcoRI-EcoRI断片 (約800bp) がプラスミドCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1より分離されたことを確認した。各反応液より、1 μ g/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製) を用いて2fg/ μ lの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部コントロールとした。

30

【 0 2 5 2 】

(5) -アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の -アクチン遺伝子由来mRNA転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチン各cDNAのORF全長をpBluescriptII KS(+)に組み込んだプラスミドであるCHAc-pBSおよびYBac-pBSを、前者は制限酵素HindIIIおよびPstIで、後者は制限酵素HindIIIおよびKpnIで、各々切断し直鎖化したDNAを用いた。 -アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBSおよびYBac-pBSのうち、チャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られたCHAc-pBSおよびYBac-pBSを、前者は制限酵素HindIIIおよびPstIで、後者は制限酵素HindIIIおよびKpnIで、切断し直鎖化したDNAを用いた。以下にその詳細を説明する。

40

【 0 2 5 3 】

チャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミドCHAc-pBS 2 μ gをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 40 μ lに溶解し、25単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) および20単位のPstI (宝酒造社製) を加えて37 で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBac-pBS 2 μ gをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 40 μ lに溶解し、25単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) および24単位のKpnI (宝酒造社製) を加えて37 で3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチン各cDNA ORF全長を含むHindIII-PstI断片

50

およびHindIII-KpnI断片(約1.2Kb)がプラスミドCHAc-pBSおよびYBAc-pBSより分離されたことを確認した。各反応液より、1µg/mlパン酵母由来t-RNA(SIGMA社製)を用いて2pg/µl、1pg/µl、200fg/µl、100fg/µl、20fg/µlの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター-アクチンおよびラット-アクチンのスタンダードとした。

【0254】

チャイニーズハムスター-アクチンおよびラット-アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った(第23図)。CHAc-pBS 2µgを100ng/µl BSA(New England Biolabs社製)を含むNEBuffer 3(New England Biolabs社製) 100µlに溶解し、10単位の制限酵素DraIII(New England Biolabs)を加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用い、添付の説明書に従ってDNA末端の平滑化を行った後、反応液を2等分した。まず一方の反応液には、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35µlおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.5µlを添加し、65°Cで30分間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水10µlに溶解した。残る他方の反応液は0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター-アクチンORF部分断片を含む約1.1KbのDNA断片を精製した。

【0255】

上記で得た脱リン酸化DraIII-DraIII断片 0.5µl、約1.1KbのDraIII-DraIII断片 4.5µl、Ligation High(東洋紡績社製) 5µlを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。各プラスミドDNAに対しDNAシーケンサー377(Parkin Elmer社製)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Parkin Elmer社製)を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター-アクチンDraIII-DraIII間180bpが欠失したことを確認した。本プラスミドをCHAc-pBSと称す。

【0256】

また、ラット-アクチンDraIII-DraIII間180bpが欠失したプラスミドをCHAc-pBSと同様の工程を経て作製した。本プラスミドをYBAc-pBSと称す。

次にプラスミドCHAc-pBS 2µgをNEBuffer 2(New England Biolabs社製) 40µlに溶解し、25単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製)および20単位のPstI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBAc-pBS 2µgをNEBuffer 2(New England Biolabs社製) 40µlに溶解し、25単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製)および4単位のKpnI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター-アクチンおよびラット-アクチン各cDNA ORF全長の内部塩基配列180bpが欠失した断片を含むHindIII-PstI断片およびHindIII-KpnI断片(約1.0Kb)がプラスミドCHAc-pBSおよびYBAc-pBSより分離されたことを確認した。各反応液より、1µg/mlパン酵母由来t-RNA(SIGMA社製)を用いて200fg/µlの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター-アクチンおよびラット-アクチンの内部コントロールとした。

【0257】

(6) 競合的PCRによる転写量の定量

本項(4)で作製したFUT8内部コントロールDNAおよび本項(1)で得た宿主細胞株由来cDNAを鋳型として競合的PCRを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内のFUT8の転写産物の定量値を算出した。一方、-アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来cDNA合成反応の効率の目安として、-アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、本項(5)で作製した-アクチン内部コントロールDNAおよび本項(1)で得た宿主細胞株由来cDNAを鋳型としてPCRを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の-アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する

FUT8の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項(2)で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 ORF部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット(配列番号13および14に示す)を設計した。

【0258】

次に、本項(1)で得た各宿主細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液5μlおよび内部コントロール用プラスミド5μl(10fg)を含む総体積20μlの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l上記遺伝子特異的プライマー(配列番号13および14)、5%DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94で3分間の加熱の後、94で1分間、60で1分間、72で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

10

また、各宿主細胞株由来cDNAに代えて、本項(4)で得たFUT8スタンダードプラスミド5μl(0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg)を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。

-アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項(3)で得たチャイニーズハムスター -アクチンおよびラット -アクチンORF全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット(前者を配列番号15および配列番号16に、後者を配列番号17および配列番号18に示す)をそれぞれ設計した。

【0259】

次に、本項(1)で得られた各宿主細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液5μlおよび内部コントロール用プラスミド5μl(1pg)を含む総体積20μlの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l上記遺伝子特異的プライマー(配列番号15および配列番号16、または配列番号17および配列番号18)、5%DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94で3分間の加熱の後、94で30秒間、65で1分間、72で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。

20

また、各宿主細胞株由来cDNAに代えて、本項(5)で得た -アクチンスタンダードプラスミド5μl(10pg、5pg、1pg、500fg、100fg)を添加した系でPCRをそれぞれ行い、 -アクチン転写量の検量線作製に用いた。

【0260】

【表3】

30

第3表

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ (bp)	
		ターゲット	コンペティター
FUT8	F: 5' -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R: 5' -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
β-actin (チャイニーズハムスター)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGAAAAGAGC-3'	789	609
β-actin (ラット)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609

40

*F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

【0261】

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7μlを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度

50

のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

【0262】

ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を第24図に示した。培養期間を通じてCHO細胞株はYB2/0細胞株の10倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第4表に β -アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じてYB2/0細胞株のFUT8転写量が β -アクチンの0.1%前後であるのに対し、CHO細胞株は0.5%~2%であった。

以上の結果より、YB2/0細胞株のFUT8転写産物量はCHO細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

【0263】

【表4】

第4表

細胞株	培養日数				
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

【0264】

実施例10. 抗ガングリオシドGD3キメラ抗体生産細胞株における β -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の転写物の定量

(1) 各種生産細胞株由来一本鎖cDNAの調製

抗ガングリオシドGD3キメラ抗体生産細胞DCHI01-20株および61-33株より、以下の手順で一本鎖cDNAを調製した。DCHI01-20株は、実施例1第2項 (2) 記載のCHO/DG44細胞由来の形質転換クローンである。また61-33株は、YB2/0由来の形質転換細胞7-9-51株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

【0265】

DCHI01-20株を3mmol/l L-GLN (Life Technologies社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies社製) および0.5% 脂肪酸濃縮液 (Life Technologies社製) を添加したEXCELL302培地 (JRH BIOSCIENCES社製) に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。また、61-33株を0.2% ウシ血清アルブミンフラクションV (Life Technologie社製) (以下、BSAと略記する) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。これらを37℃の5%CO₂インキュベーター内で培養し、培養1日目、2日目、3日目、4日目および5日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN社製) により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

【0266】

全RNAを45 μ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 μ l、付属の10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 μ lをそれぞれに添加して、37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解

した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50 μ lの滅菌水に溶解した。

得られた全RNA 3 μ gに対し、SUPERSCRIPTTMPreamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした20 μ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。該反応液を水で50倍希釈し、使用するまで-80 で保管した。

【 0 2 6 7 】

(2) 競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量

本項 (1) で得た抗体生産細胞株由来cDNAに対し、実施例9 (6) に準じて競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内のFUT8遺伝子由来のmRNA転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例9 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のcDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

FUT8定量の内部コントロールとしては、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られた実施例9 (4) で調製したCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

【 0 2 6 8 】

本項 (1) で得た各生産細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5 μ lおよび内部コントロール用プラスミド5 μ l (10fg) を含む総体積20 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l FUT8遺伝子特異的プライマー (配列番号13および14)、5% DMSO] で、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いてPCRを行った。PCRは、94 で3分間の加熱の後、94 で1分間、60 で1分間、72 で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

また、各生産細胞株由来cDNAに代えて、FUT8スタンダードプラスミド5 μ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1 μ g/mlパン酵母由来t-RNA (SIGMA社製) を用いた。

一方、 α -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来cDNA合成反応の効率の目安として、 α -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

【 0 2 6 9 】

α -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例9 (3) で調製したチャイニーズハムスター α -アクチンおよびラット α -アクチンのcDNAのORF全長をpBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドであるCHAc-pBSおよびYBAc-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

α -アクチン定量の内部コントロールとしては、チャイニーズハムスター α -アクチンおよびラット α -アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られた実施例9 (5) で調製したCHAc-d-pBSおよびYBAc-d-pBSを、制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

【 0 2 7 0 】

上記で得た各生産細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5 μ lおよび内部コントロール用プラスミド5 μ l (1pg) を含む総体積20 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l α -アクチン特異的プライマー (配列番号17および18)、5% DMSO] で、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いてPCRを行った。PCRは、94 で3分間の加熱の後、94 で30秒間、65 で1分間、72 で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来cDNAに代えて、 α -アクチンスタンダードプラスミド10pg、5pg、1pg、500fg、100fgを添加した系でPCRをそれぞれ行い、 α -ア

10

20

30

40

50

クチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製) を用いた。

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

【0271】

PCR後の溶液のうち、7 μl を1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメージャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

第5表に α -アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0細胞由来抗体生産株61-33のFUT8転写量が α -アクチンの0.3%以下であるのに対し、CHO細胞由来抗体生産株DCH101-20は0.7~1.5%であった。この結果より、YB2/0細胞由来抗体生産株のFUT8転写産物量はCHO細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

【0272】

【表5】

第5表

細胞株	培養日数				
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
DCH101-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

【0273】

実施例11. マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製
(1) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 発現プラスミドの構築

10%ウシ胎児血清 (Life Technologie社製) を含むIMDM培地 (Life Technologie社製) で継代培養したマウスミエロマNS0細胞 (理化学研究所セルバンク, RCB0213) 1×10^7 個に対し、RNAeasy (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い全RNAを抽出した。全RNAを45 μl の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 μl 、付属の10 \times DNase buffer 5 μl 、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 μl を添加して、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50 μl の滅菌水に溶解した。得られた全RNAのうち3 μg に対し、SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした20 μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。

マウスFUT8 cDNAの取得は以下の手順で行った (第25図)。

【0274】

まず、マウスFUT8のcDNA配列 (GenBank, AB025198) より、翻訳開始コドンを含む配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号19に示す) および翻訳終止コドンを含む配列特異的なリバースプライマー (配列番号20に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述のNS0細胞由来cDNA 1 μl を含む25 μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4% DMSO、0.5 $\mu\text{mol/l}$

上記特異的プライマー（配列番号19および配列番号20）を調製し、PCRを行った。PCRは、94 で1分間の加熱の後、94 で30秒間、55 で30秒間、72 で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72 で10分間加熱する条件で行った。

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1728bpを精製した。このDNA断片4 μ lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製)の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた6クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

【0275】

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、マウスFUT8のORF全長配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した（そのDNA配列を配列番号2に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号24に示す）。尚、本配列には、前述のGenBank上に登録されたマウスFUT8配列とはアミノ酸置換を伴う3塩基の不一致があった。以下、本プラスミドをmfFUT8-pCR2.1と称す。

【0276】

続いて、マウスFUT8 ORF全長配列を含むプラスミドpBSmfFUT8の構築を以下のように行った（第26図）。まず、プラスミドpBluescriptII KS(+) 1 μ gを (Stratagene社製) をNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) 20単位を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 μ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ lを添加して65 で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水10 μ lに溶解した。

一方、プラスミドmfFUT8-pCR2.1 1 μ gを (Stratagene社製) をNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウスFUT8 cDNA ORF全長を含む約1.7KbのDNA断片を精製した。

【0277】

上記で得たプラスミドpBluescriptII KS(+) 由来のEcoRI-EcoRI断片 (2.9Kb) 1 μ l、プラスミドmfFUT8-pCR2.1由来のEcoRI-EcoRI断片 (1.7Kb) 4 μ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ lを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pBSmfFUT8と称す。

上記pBSmfFUT8およびpAGE249を用いて、マウスFUT8発現ベクターpAGEmfFUT8の構築を以下の手順で行った（第27図）。pAGE249は、pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 269, 14730 (1994)] の誘導体であり、pAGE248よりジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) 発現ユニットを含むSphI-SphI断片 (2.7Kb) を除去したベクターである。

【0278】

pAGE249 1 μ gをUniverseI BufferH (宝酒造社製) 50 μ lに溶解し、20単位の制限酵素SalI (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 μ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ lを添加して65 で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 μ lに溶解し

10

20

30

40

50

た。

【0279】

一方、pBSmfFUT8 1 μ gをUniversel Buffer H (宝酒造社製) 50 μ lに溶解し、20単位の制限酵素SalI (New England Biolabs社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウスFUT8 cDNA ORF全長を含む約1.7KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpAGE249由来のBamHI-SalI断片 (6.5Kb) 1 μ l、プラスミドpBSmfFUT8由来のBamHI-SalI断片 (1.7Kb) 4 μ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ lを混合し、16 $^{\circ}$ Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pAGEmfFUT8と称す。

【0280】

(2) マウス -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

本項 (1) で構築したマウスFUT8発現ベクターpAGEmfFUT8を61-33株へ導入し、FUT8遺伝子の安定的発現株を取得した。上記61-33株は、抗ガングリオシドGD3キメラ抗体を高生産するYB2/0細胞由来の形質転換細胞7-9-51株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター, FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

【0281】

プラスミドpAGEmfFUT8の61-33株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミドpAGEmfFUT8 30 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 600 μ lに溶解し、100単位の制限酵素FspI (New England Biolabs社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しエタノール沈殿法を行い、回収した線状化プラスミドを1 μ g/ μ l水溶液とした。次に、61-33株をK-BS緩衝液 (137mmol/l KCl, 2.7mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 1.5mmol/l KH₂PO₄, 4.0mmol/l MgCl₂) に懸濁して2 \times 10⁷個/mlとし、細胞懸濁液200 μ l (4 \times 10⁶個) を上記線状化プラスミド 10 μ l (10 μ g) と混和した。細胞-DNA混和液をGene Pulser Cuvette (電極間距離2mm) (BIO-RAD社製)へ移した後、細胞融合装置Gene Pulser (BIO-RAD社製)を用いてパルス電圧0.2KV、電気容量250 μ Fの条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を5%ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) 10mlに混和し、浮遊細胞用96穴プレート (Greiner社製) に100 μ lずつ分注した。5%CO₂、37 $^{\circ}$ Cの条件下で24時間培養した後、培養上清50 μ lを除去し、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5%ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2%BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) を100 μ lずつ分注した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら3週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性を示す14株を取得した。

【0282】

一方、pAGEmfFUT8の母骨格ベクターであるプラスミドpAGE249を61-33株へ導入することにより、ネガティブコントロール株を作製した。上述の手順で、制限酵素FspIにより線状化したプラスミドpAGE249 10 μ gをエレクトロポレーション法を用いて61-33株 4 \times 10⁶cellsへ遺伝子導入した。該細胞を5%ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) 15mlに混和した後、浮遊細胞用T75フラスコ (Greiner社製)に移し入れ、5%CO₂、37 $^{\circ}$ Cの条件下で24時間培養した。培養後、800rpmで4分間の遠心分離を行い、上清の半量 (7.5ml) を除去した後、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5%ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2%BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridom

a-SFM培地 (Life Technologie社製) 7.5mlを添加して懸濁し、浮遊細胞用T75フラスコ (Greiner社製) に移し入れた。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら3週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性株を取得した。

【0283】

(3) マウス -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株における該遺伝子発現量の解析

本項 (2) で作製した61-33株由来マウスFUT8過剰発現株14株より任意に選択した6株およびネガティブコントロール株に対し、競合的RT-PCRを用いてFUT8発現量の比較を行った。

上記過剰発現株を0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2%BSA (Life Technologie社製) を添加したHybridoma a-SFM培地 (Life Technologie社製) に懸濁し、 3×10^5 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した後、生細胞 1×10^7 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い全RNAを抽出した。全RNAを45μlの滅菌水に溶解し、RQ1 Rnase-Free DNase (Promega社製) 0.5U/μl、付属の10×DNase buffer 5μl、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5μlを添加して37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50μlの滅菌水に溶解した。

【0284】

得られた全RNA2.5μgに対し、SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした20μlの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。該反応液を水で50倍希釈し、実施例9 (6) に準じて競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量に供した。

各発現株内のFUT8遺伝子由来のmRNA転写量の定量は、以下の手順で行った。FUT8転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例9 (2) で調製したラットFUT8のcDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

FUT8定量の内部コントロールとしては、実施例9 (4) で調製した、ラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

【0285】

上記で得た各発現株由来のcDNA溶液の50倍希釈液5μlおよび内部コントロール用プラスミド5μl (10fg) を含む総体積20μlの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/lラットFUT8遺伝子特異的プライマー (配列番号13および14)、5% DMSO] で、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

また、各発現株由来cDNAに代えて、FUT8スタンダードプラスミド 5μl (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1μg/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製) を用いた。

一方、-アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各発現株由来cDNA合成反応の効率の目安として、-アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

【0286】

-アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例9 (3) で調製したラット -アクチンのcDNAのORF全長をpBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドであるYBac-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた

10

20

30

40

50

。 -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例9 (5) で調製したラット -アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られたYBAcd-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

上記で得た各発現株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5 μ lおよび内部コントロール用プラスミド5 μ l (1pg) を含む総体積20 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l ラット -アクチン特異的プライマー (配列番号17および18)、5% DMSO] で、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いてPCRを行った。PCRは、94 で3分間の加熱の後、94 で30秒間、65 で1分間、72 で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。

【0287】

また、各発現株由来cDNAに代えて、 -アクチンスタンダードプラスミド10pg、5pg、1pg、500fg、100fgを添加した系でPCRをそれぞれ行い、 -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1 μ g/mlパン酵母由来t-RNA (SIGMA社製) を用いた。

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7 μ lを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

【0288】

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

第28図に -アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4の3株およびpAGE249導入株は、FUT8転写量が -アクチン転写量の0.3 ~ 10%であり、FUT8転写量が比較的低い株であった。一方、mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7の3株は、FUT8転写量が -アクチン転写量の20 ~ 40%であり、FUT8発現量が比較的高い株であった。

【0289】

(4) マウス -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の精製

本項 (2) で得たFUT8遺伝子過剰発現株6株およびネガティブコントロール株1株を、200 nmol/l MTX、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、および0.2% BSA (Life Technologie社製) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T225フラスコ (IWAKI社製) 3本に計100ml各々播種した。これらを37 の5%CO₂インキュベーター内で7~9日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度 (各々30%以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し3000rpm、4 の条件で10分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4 の条件で1時間の遠心分離を行った後、0.22 μ m孔径150ml容PES Filter Unit (NALGENE社製) を用いて濾過した。

【0290】

0.8cm径のカラムにProsep-A HighCapacity (bioPROCESSING社製) を厚さ2cmで充填し、0.1mol/lクエン酸緩衝液 (pH3.0) 10mlおよび1mol/lグリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH8.6) 10mlで順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清 各100mlをカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH8.6) 50 mlで洗浄した。洗浄後、0.1mol/lクエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5mlを用いてProsep-Aに吸着

10

20

30

40

50

した抗体の溶出を行い、溶出液を500 μ lずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 100 μ lと混合して中和した。BCA法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む2画分 (計1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて4 で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22 μ m孔径Millex GV (MILLIPORE社製) を用いて滅菌濾過した。

【0291】

(5) マウス -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体のin vitro細胞傷害活性 (ADCC活性)

本項 (4) で精製した抗GD3抗体のin vitro細胞傷害活性を評価するため、GD3陽性細胞であるヒトメラノーマ培養細胞株G-361 [理化学研究所セルバンク, RCB0991] を用いてADCC活性を測定した。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie社製) を含むRPMI1640培地 (Life Technologie社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養したG-361細胞 1×10^6 個をRPMI1640-FBS(10) 500 μ lに懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 3.7MBqを添加して37 度で30分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpmで5分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞をRPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁した。この洗浄操作を3回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で30分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁することにより、 2×10^5 個/mlの標的細胞懸濁液を調製した。

【0292】

一方、健常人の静脈血 30mlを採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mlを加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30mlと混合した。混合後、各10mlをそれぞれLymphoprep (NYCOMED PHARMA AS社製) 4ml上に穏やかに重層し、室温下200rpmで30分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30mlに懸濁した。室温下1200rpmで15分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞をRPMI1640-FBS(10) 20mlに懸濁した。この洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2×10^6 個/mlのエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96穴U字底プレート (Falcon社製) の各穴に標的細胞懸濁液を50 μ lずつ (1×10^4 個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を100 μ lずつ (2×10^5 個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を20:1とした。次に10M クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて、本項 (4) で得た各種抗GD3抗体より0.01 μ g/ml、0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/mlの希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに50 μ l添加することにより、終濃度0.0025 μ g/ml、0.025 μ g/ml、0.25 μ g/ml、2.5 μ g/mlとした。5%CO₂、37 度の条件下で4時間反応させた後、プレートに対し1200rpmで5分の遠心分離を行った。各穴の上清50 μ lを12mm径RIAチューブ (IWAKI社製) に分取し、MINAX- オートガンマーカウンター5550 (PACKRD社製) を用いて解離⁵¹Cr量の測定を行った。

【0293】

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えてRPMI1640-FBS(10) 150 μ lを添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離⁵¹Cr量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて1規定 塩酸 100 μ lおよびRPMI1640-FBS(10) 50 μ lを添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離⁵¹Cr量の値を求めた。これらの値を用いて実施例2の2項(3)記載の式(II)により、ADCC活性を求めた。

第29図に各種抗GD3抗体のG-361細胞に対するADCC活性を示した。第28図においてFUT8発現量が低かったmfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4の3株は、ネガティブコントロールであるpAGE249株導入株と同等の高いADCC活性を示した。一方、第28図においてFUT8発現量が高かったmfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7の3株は、CHO細胞より取得した抗GD3抗体と同等の低いADCC活性を示した。以上の結果より、宿主細胞のFUT8発現量を調節することにより、産生抗体のADCC活性を調節し得ることが示された。

【0294】

(6) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の糖鎖解析

本項 (4) で精製した抗GD3抗体の糖鎖解析を行った。mfFUT8-6、pAGE249株導入株が産生する抗体のヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。減圧留去することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸を加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J.Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群 (PA化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム (Pharmacia社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖群とした。次に、CLC-ODSカラム (Shimadzu社製) を用いて、精製PA化糖鎖群の逆相HPLC分析を行った (第30図)。ピーク面積から計算すると、mfFUT8-6の α -1,6-フコースのない糖鎖含量は10%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は90%であった。pAGE249の α -1,6-フコースのない糖鎖含量は20%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は80%であった。以上の結果から、FUT8遺伝子を過剰発現させることにより、産生抗体の α -1,6-フコース結合糖鎖含量が増加することがわかった。

【0295】

第30図は、mfFUT8-6、pAGE249導入株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。第30A図にmfFUT8-6、第30B図にpAGE249の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液Aとしてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液Bとしてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5% 1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

【0296】

【表6】

時間 (分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B (%)	0	60	60	0	0

【0297】

第30図と第31図で示した (i) ~ (ix) のピークは、以下の構造を示す。

【0298】

【化2】

10

20

30

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約2Kbを精製した。このDNA断片4 μ lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製)の説明書に従ってプラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた8クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入cDNAが、CHO細胞FUT8のORF全長を含む配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、本プラスミドをCHfFUT8-pCR2.1と称す。決定したCHO細胞FUT8 cDNAの塩基配列を配列番号1に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号23に示した。

【0303】

(2) CHO細胞 -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) ゲノム配列の取得

本項 (1) で取得したCHO細胞FUT8 ORF全長cDNA断片をプローブとして用い、CHO-K1細胞由来 -ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE社製) よりモレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 等に記載の公知のゲノムスクリーニングの方法に従いCHO細胞FUT8ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、CHO細胞FUT8 cDNAの開始コドンを含むAfaI-Sau3AI断片 (約280bp) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうちXbaI-XbaI断片 (約2.5Kb) およびSacI-SacI断片 (約6.5Kb) を選択してpBluescriptII KS(+) (Stratagene社製) へ各々挿入した。

【0304】

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む上流イントロン約2.5Kbの配列を、SacI-SacI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む下流イントロン約6.5Kbの配列を各々コードすることを確認した。以下、XbaI-XbaI断片を含むプラスミドをpFUT8fgE2-2、SacI-SacI断片を含むプラスミドをpFUT8fgE2-4と称す。決定したCHO細胞FUT8のエクソン2を含むゲノム領域の塩基配列 (約9.0Kb) を配列番号3に示した。

【0305】

実施例13. -1,6-フコース転移酵素遺伝子を破壊したCHO細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

CHO細胞 -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン2を含むゲノム領域を欠失したCHO細胞を作製し、該細胞が生産する抗体のADCC活性を評価した。

【0306】

1. チャイニーズハムスター -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン2ターゲティングベクタープラスミドpKOFUT8Puroの構築

(1) プラスミドploxPPuroの構築

以下の手順でプラスミドploxPPuroを構築した (第33図)。

プラスミドpK0SelectPuro (Lexicon社製) 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素AclI (New England Biolabs社製) を加えて37で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約1.5KbのDNA断片を精製した。

一方、特開平11-314512に記載のプラスミドploxP 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素AclI (New England Biolabs社製) を加えて37で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約2.0KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpK0SelectPuro由来のAscl-Ascl断片 (約1.5Kb) 4.5 μ l、プラスミドploxP由来のAscl-Ascl断片 (約2.0Kb) 0.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuroと称す。

【0307】

(2) プラスミドpKOFUT8gE2-1の構築

実施例12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-2を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-1を構築した (第34図)。

プラスミドpFUT8fgE2-2 2.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SacI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約1.5KbのDNA断片を精製した。

【0308】

一方、プラスミドLITMUS28 (New England Biolabs社製) 1.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SacI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-2由来のEcoRV-SacI断片 (約1.5Kb) 4.5 μ l、プラスミドLITMUS28由来のEcoRV-SacI断片 (約2.8Kb) 0.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-1と称す。

【0309】

(3) プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築

本項 (2) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-1を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-2を構築した (第35図)。

プラスミドpKOFUT8gE2-1 2.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約1.5KbのDNA断片を精製した。

【0310】

一方、プラスミドploxPPuro 1.0 μ gを、NEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素HpaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5KbのDNA断片を精製した。

10

20

30

40

50

上記で得たプラスミドpKOFUT8gE2-1由来のEcoRV-KpnI断片 (約1.5Kb) 4.0 μl、プラスミドploxPPuro由来のHpaI-KpnI断片 (約3.5Kb) 1.0 μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μlを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-2と称す。

【0311】

(4) プラスミドpscFUT8gE2-3の構築

実施例12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpscFUT8gE2-3を構築した (第36図)。

プラスミドpFUT8fgE2-4 2.0 μgをNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素HpaI (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、Blunting High (東洋紡社製) を用い、添付の説明書に従ってDNA末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行ってDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5KbのDNA断片を精製した。

【0312】

一方、プラスミドLITMUS39 (New England Biolabs社製) 1.0 μgをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) および20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-4由来のHpaI-HindIII断片 (約3.5Kb) 4.0 μl、プラスミドLITMUS39由来のEcoRV-HindIII断片 (約2.8Kb) 1.0 μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μlを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pscFUT8gE2-3と称す。

【0313】

(5) プラスミドpKOFUT8gE2-3の構築

実施例12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-3を構築した (第37図)。

プラスミドpFUT8fgE2-4 2.0 μgをNEBuffer for EcoRI (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI (New England Biolabs社製) および20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約1.8KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドpBluescriptII KS(+) (Stratagene社製) 1.0 μgをNEBuffer for EcoRI (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI (New England Biolabs社製) および20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.0KbのDNA断片を精製した。

【0314】

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-4由来のHindIII-EcoRI断片 (約1.8Kb) 4.0 μl、プラスミドpBluescriptII KS(+)由来のHindIII-EcoRI断片 (約3.0Kb) 1.0 μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μlを混合し、16 で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3

10

20

30

40

50

と称す。

【0315】

(6) プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築

本項 (4) および (5) で得たプラスミドpscFUT8gE2-3およびpKOFUT8gE2-3を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-4を構築した (第38図)。

プラスミドpscFUT8gE2-3 1.0 μgを、100 μg/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer for SaII (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、制限酵素SaII (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μlに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.6KbのDNA断片を精製した。

10

【0316】

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-3 1.0 μgを、100 μg/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer for SaII (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、制限酵素SaII (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μlに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 μlおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μlを添加し、65 °Cで30分間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水10 μlに溶解した。

20

上記で得たプラスミドpscFUT8gE2-3由来のSaII- HindIII断片 (約3.1Kb) 4.0 μl、プラスミドpKOFUT8gE2-3由来のSaII- HindIII断片 (約4.8Kb) 1.0 μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μlを混合し、16 °Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-4と称す。

【0317】

(7) プラスミドpKOFUT8gE2-5の構築

本項 (3) および (6) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-2およびpKOFUT8gE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-5を構築した (第39図)。

プラスミドpKOFUT8gE2-2 1.0 μgをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μlに溶解し、制限酵素SmaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて25 °Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μlに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液30 μlおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0 μlを添加し、65 °Cで1時間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水10 μlに溶解した。

40

【0318】

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-4 1.0 μgをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μlに溶解し、制限酵素SmaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて25 °Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μlに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約5.2KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpKOFUT8gE2-2由来のSmaI-BamHI断片 (約5.0Kb) 0.5 μl、プラス

50

ミドpKOFUT8gE2-4由来のSmaI-BamHI断片 (約5.42 Kb) 4.5 µl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 µlを混合し、16 °Cで15時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5と称す。

【 0 3 1 9 】

(8) プラスミドpKOFUT8Puroの構築

本項 (7) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-5を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8Puroを構築した (第40図)。

プラスミドpKOSelectDT (Lexicon社製) 1.0 µgをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 50 µlに溶解し、制限酵素RsrII (New England Biolabs社製) 16単位を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ジフテリアトキシン発現ユニットを含む約1.2KbのDNA断片を精製した。

【 0 3 2 0 】

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-5 1.0 µgをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 50 µlに溶解し、制限酵素RsrII (New England Biolabs社製) 16単位を加えて37 °Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 30 µlおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0 µlを添加し、65 °Cで1時間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 µlに溶解した。

上記で得たプラスミドpKOSelectDT由来のRsrII-RsrII断片 (約1.2Kb) 1.0 µl、プラスミドpKOFUT8gE2-5由来のRsrII-RsrII断片 (約10.4Kb) 1.0 µl、滅菌水3.0 µl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 µlを混合し、16 °Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Puroと称す。

【 0 3 2 1 】

2. -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン2を含むゲノム領域を1コピー破壊したCHO細胞の作製

(1) ターゲティングベクターの導入

本実施例第1項で構築したチャイニーズハムスターFUT8ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Puroを実施例8の1(2) で作製した5-03株へ導入した。

プラスミドpKOFUT8Puroの5-03株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミドpKOFUT8Puro 150 µgをNEBuffer for SalI (New England Biolabs社製) 1.8mlに溶解し、600単位の制限酵素SalI (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで5時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを1 µg/µl水溶液とした。一方、5-03株をK-PBS緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na₂HPO₄、1.5mmol/l KH₂PO₄、4.0mmol/l MgCl₂) に懸濁して8 × 10⁷個/mlとした。細胞懸濁液200 µl (1.6 × 10⁶個) を上記線状化プラスミド4 µl (4 µg) と混和した後、細胞-DNA混和液の全量をGene Pulser Cuvette (電極間距離2mm) (BIO-RAD社製) へ移し、細胞融合装置Gene Pulser (BIO-RAD社製) を用いてパルス電圧350V、電気容量250 µFの条件で遺伝子導入を行った。同様にしてキュベット30本分に対し遺伝子導入した後、細胞懸濁液を10% ウシ胎児血清 (Life Technologies社製) および1倍濃度のHT supplement (Life Technologies社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) に懸濁し、接着細胞培養用10cmディッシュ (Falcon社製) 30枚へ播種した。5% CO₂、37 °Cの条件下で24時間培養した後、培養上清を除去し、15 µg/ml Puromycin (SIGMA社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologies社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を10mlずつ分注した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら10日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性株を取得した。

10

20

30

40

50

【 0 3 2 2 】

(2) ターゲティングベクター導入株の取得

本項 (1) で得たピューロマイシン耐性株より任意の900個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、ピューロマイシン耐性株が出現した10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7mlを注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底96穴プレート (Falcon社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底96穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、15 µg/ml Puromycin (SIGMA社製)

および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて1週間培養した。

10

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2倍量の凍結培地 (20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM) と混和した。このうち半量を接着細胞用平底96穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、15 µg/ml Puromycin (SIGMA社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて1週間培養した。

【 0 3 2 3 】

(3) ゲノムPCRによる相同組換えの診断

本項 (2) で得た900クローンに対し、以下の手順でゲノムPCRによる相同組換えの診断を行った。

20

まず、本項 (2) で作製したレプリカプレートより公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々TE-RNase緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 µg/ml RNase A) 30 µlに一晩溶解した。また、FUT8ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号26に示す) およびベクター内のloxP配列に結合するプライマー (配列番号27に示す) を設計した。

【 0 3 2 4 】

DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、上記で調製したゲノムDNA溶液を各々10 µl含む25 µlの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 µmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号26および配列番号27)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、94 °Cで3分間の加熱の後、94 °Cで1分間、60 °Cで1分間、72 °Cで2分間からなる反応を1サイクルとした38サイクルの条件で行った。

30

PCR後、反応液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、CHO細胞ゲノム領域とターゲティングベクター相同領域との境界部を含む約1.7Kbの特異的増幅が認められるものを陽性クローンとした。本法により陽性を示す1クローンを見出した。

【 0 3 2 5 】

(4) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (3) で陽性が確認された1クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断を行った。

40

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、本項 (3) で見出された陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5% CO₂、37 °Cの条件下で10分間静置した。静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート (Greiner社製) へ播種した。15 µg/ml Puromycin (SIGMA社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート (Greiner社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々TE-RNase緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 µg/ml RNase A) 150 µlに一晩溶解した。

【 0 3 2 6 】

50

上記で調製したゲノムDNA 12 µgをNEBuffer 3 (New England Biolabs社製) 120 µlに溶解し、25単位の制限酵素PstI (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、TE緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA) 20 µlに溶解し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80 °Cで2時間の熱処理を行った。

【0327】

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号28および配列番号29) を設計した。次に、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例12 (2) で得たプラスミドpFUT8fgE2-2 4.0ngを含む20 µlの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 µmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号28および配列番号29)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、94 °Cで1分間の加熱の後、94 °Cで30秒間、55 °Cで30秒間、74 °Cで1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液 5 µlに対し、[⁻³²P]dCTP 1.75MBqおよびMegaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて放射線標識した。

【0328】

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5ラSSPE、50ラDenhardt's液、0.5% (w/v) SDS、100 µg/ml サケ精子DNA] 15mlを加えて65 °Cで3時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65 °Cで一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mlに浸漬し、65 °Cで15分間加温した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、膜を0.2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mlに浸漬し、65 °Cで15分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80 °Cで二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素PstI処理により、野生型FUT8対立遺伝子から約4.4KbのDNA断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約6.0KbのDNA断片が生じる。

本法により、本項 (3) における陽性クローンのゲノムDNAより上記約4.4Kbおよび約6.0Kbの特異的断片が見出された。両断片の量比が1:1であったことから、本クローンは、FUT8対立遺伝子を1コピー破壊したクローンであることが確認された。本クローンを以下、1st. FUT8 2-46株と称す。

【0329】

3. -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子を1コピー破壊したCHO細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Creリコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例第2項で作製した1st. FUT8 2-46株へ、Creリコンビナーゼ発現ベクター-pBS185 (Life Technologies社製) を導入した。

プラスミドpBS185の1st. FUT8 2-46株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、1st. FUT8 2-46株をK-PBS緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na₂HPO₄、1.5mmol/l KH₂PO₄、4.0mmol/l MgCl₂] に懸濁して8×10⁷個/mlとした。細胞懸濁液200 µl (1.6×10⁶個) をプラスミドpBS185 4 µgと混和した後、細胞-DNA混和液の全量をGene Pulser Cuvette (電極間距離2mm) (BIO-RAD社製) へ移し、細胞融合装置Gene Pulser (BIO-RAD社製) を用いてパルス電圧350V、電気容量250 µFの条件で遺伝子導入を行っ

た。導入後、細胞懸濁液を10% ウシ胎児血清 (Life Technologies社製) および1倍濃度のHT supplement (Life Technologies社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) 10mlに懸濁し、さらに同培地を用いて2万倍希釈した。接着細胞培養用10cm ディッシュ (Falcon社製) 7枚へ播種後、5%CO₂、37 °Cの条件下で24時間培養した。培養後、上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を10mlずつ分注した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら10日間の培養を行った。

【0330】

(2) Creリコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項 (1) で得た株より任意の400個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液7mlを注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底96穴プレート (Falcon社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底96穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、10%ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2倍量の凍結培地 (20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM) と混和した。このうち半量を接着細胞用平底96穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートを作製する一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

次に、レプリカプレートを15 µg/ml Puromycin (SIGMA社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて6日間培養した。Creリコンビナーゼの発現によりloxP配列に挟まれたピューロマイシン耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、ピューロマイシン存在下で死滅する。本選択法により91個の陽性クローンを見出した。

【0331】

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項 (2) で見出された陽性クローンのうち任意の6クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、上記6クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂、37 °Cの条件下で10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート (Greiner社製) へ播種した。10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) を用いて1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート (Greiner社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々TE-RNase緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 µg/ml RNase A) 150 µlに一晩溶解した。

【0332】

上記で調製したゲノムDNA 12 µgをNEBuffer for BamHI (New England Biolabs社製) 120 µlに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37 °Cで一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、TE緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20 µlに溶解し、0.4% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80 °Cで2時間の熱処理を行った。

【0333】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号30および配列番号31) を設計した。次に、DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を

用いて、実施例12 (2) で得たプラスミドpFUT8fgE2-2 4.0ngを含む20 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l上記遺伝子特異的プライマー (配列番号30および配列番号31)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、94 で1分間の加熱の後、94 で30秒間、55 で30秒間、74 で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約230bpのプロープDNA断片を精製した。得られたプロープDNA溶液5 μ lに対し、[$^{-32}$ P]dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて放射線標識した。

【0334】

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボ
トルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 (5ラSSPE、50ラDenhardt's液、0.5% (w/v) S
DS、100 μ g/ml サケ精子DNA) 15mlを加えて65 で3時間のプレハイブリダイゼーションを
行った。次に、 32 P標識したプロープDNAを熱変性してボトルへ投入し、65 で一晩加温し
た。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS 50mlに浸漬し、65
で15分間加温した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、膜を0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SD
S 50mlに浸漬し、65 で15分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80 で
二晩暴露し現像した。

【0335】

前述の制限酵素BamHI処理により、野生型FUT8対立遺伝子から約19.0KbのDNA断片が生じ
る。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対
立遺伝子から約12.5KbのDNA断片が生じる。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子か
らピューロマイシン耐性遺伝子 (約1.5Kb) が除去された場合には、同処理により約11.0K
bのDNA断片が生じる。

本法により、上記6クローンのうち5クローンのゲノムDNAより上記約19.0Kbおよび約11.
0Kbの特異的断片が見出された。両断片の量比が1:1であったことから、FUT8ゲノム領域
を1コピー破壊した株よりピューロマイシン耐性遺伝子が除去されたことが示された。本
クローンを以下、1st. FUT8 2-46-1株と称す。尚、上述の1st. FUT8 2-46-1株、1st.
FUT8 2-46株、及び、5-03株のゲノムサザンの結果を第41図に示した。なお1st. FUT8 2-
46-1株は2-46-1の株名で、平成13年9月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許
生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6) にFERM BP-7755として寄託さ
れている。

【0336】

4. -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体の精製

本実施例第3項で得たFUT8対立遺伝子を1コピー破壊した株1st. FUT8 2-46-1株を、3 \times
10⁵個/mlの密度で15 μ g/ml Puromycin (SIGMA社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life
Technologie社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) へ懸濁後、接着細胞
培養用T182フラスコ (Greiner社製) 2本に計60ml各々播種した。3日間の培養後、上清を
除去し、EXCELL301培地 (JRH Biosciences社製) 計60mlへ交換した。

これを37 の5%CO₂インキュベーター内で7日間培養後、細胞懸濁液を回収した。該細
胞懸濁液に対し3000rpm、4 の条件で10分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm
、4 の条件で1時間の遠心分離を行った後、0.22 μ m孔径150ml容PES Filter Unit (NALG
ENE社製) を用いて濾過した。

【0337】

0.8cm径のカラムにProsep-A HighCapacity (bioPROCESSING社製) を厚さ2cmで充填し、
0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10mlおよび1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩
衝液 (pH8.6) 10mlで順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養
上清100mlをカラムに通塔し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH8.6) 50ml
で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5mlを用いてProsep-Aに吸着
した抗体の溶出を行い、溶出液を500 μ lずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ2mol/l

Tris-HCl (pH8.5) 100 μ lと混合して中和した。BCA法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む2画分 (計1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH6.0) を用いて4 で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22 μ m孔径Millex GV (MILLIPORE社製) を用いて滅菌濾過した。

【0338】

5. -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体のin vitro細胞傷害活性 (ADCC活性)

本実施例第4項で精製した抗CCR4抗体のin vitro細胞傷害活性を評価するため、実施例8に記載のCCR4陽性細胞株CCR4/EL-4を用いたADCC活性を行った。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie社製) を含むRPMI1640培地 (Life Technologie社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養したCCR4/EL-4株 1×10^6 個をRPMI1640-FBS(10) 500 μ lに懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 3.7MBqを添加して37 で90分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpmで5分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞をRPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁した。この洗浄操作を3回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で30分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁することにより、 2.0×10^5 個/mlの標的細胞懸濁液を調製した。

【0339】

一方、健常人の静脈血 30mlを採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mlを加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30mlと混合した。混合後、各10mlをそれぞれLymphoprep (NYCOMED PHARMA AS社製) 4ml上に穏やかに重層し、室温下2000rpmで30分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30mlに懸濁した。室温下1200rpmで15分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞をRPMI1640-FBS(10) 20mlに懸濁した。この洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2.5×10^6 個/mlのエフェクター細胞懸濁液を調製した。

【0340】

96穴U字底プレート (Falcon社製) の各穴に標的細胞懸濁液を50 μ lずつ (1×10^4 個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を100 μ lずつ (2.5×10^5 個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を25:1とした。次にRPMI1640-FBS(10)を用いて、本実施例第4項で得た各抗CCR4抗体より0.01 μ g/ml、0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/mlの希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに50 μ l添加することにより、終濃度0.0025 μ g/ml、0.025 μ g/ml、0.25 μ g/ml、2.5 μ g/mlとした。5%CO₂、37 の条件下で4時間反応させた後、プレートに対し1200rpmで5分の遠心分離を行った。各穴の上清75 μ lを12mm径RIAチューブ (IWAKI社製) に分取し、MINAX- オートガンマカウンタ-5550 (PACKRD社製) を用いて解離⁵¹Cr量の測定を行った。

【0341】

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えてRPMI1640-FBS(10) 150 μ lを添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離⁵¹Cr量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて1規定塩酸 100 μ lおよびRPMI1640-FBS(10) 50 μ lを添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離⁵¹Cr量の値を求めた。これらの値を用いて前記式 (II) により、ADCC活性を求めた。

第42図に各種抗CCR4抗体のADCC活性を示した。FUT8対立遺伝子を1コピー破壊した1st.

FUT8 2-46-1株より得た抗体は、該遺伝子破壊前のCHO細胞5-03株が産生する抗体に比へ有意に高いADCC活性を示した。また、これら抗体での抗原結合活性には変化は観察されなかった。以上の結果より、宿主細胞のFUT8対立遺伝子を破壊することにより、産生抗体のADCC活性を向上し得ることが確認された。

【0342】

実施例14. レクチン耐性CHO/DG44細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

(1) レクチン耐性CHO/DG44株の取得

10

20

30

40

50

CHO/DG44細胞を、IMDM-FBS(10) 培地 [ウシ胎児血清 (FBS) を10%、HT supplement (G IBCO BRL社製) を1倍濃度含むIMDM培地] にて接着培養用フラスコ75cm²(グライナー社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5mlのダルベッコPBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、ダルベッコPBSで希釈した0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を1.5ml添加して37℃にて5分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、 1×10^5 細胞/mlの密度になるようにIMDM-FBS(10) 培地を添加して懸濁後、未添加又は0.1 µg/mlのアルキル化剤であるN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNGと表記、Sigma社製) を添加した。CO₂インキュベータ (TAKAI製) 内で37℃にて3日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10) 培地に懸濁後、接着培養用96穴プレート (岩城硝子社製) に1000細胞/ウエルの密度で播種した。各ウエルには培地中終濃度で1mg/mlのレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCAと表記、Vector社製)、あるいは1mg/mlのヒヨロチャワンタケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AALと表記、Vector社製)、あるいは1mg/mlのインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHAと表記、Vector社製) を添加した。CO₂インキュベータ内で37℃にて2週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性CHO/DG44株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性CHO/DG44株については、LCA耐性株をCHO-LCA株、AAL耐性株をCHO-AAL株、L-PHA耐性株をCHO-PHA株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA株はAALに対しても耐性であり、CHO-AAL株はLCAに対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA株及びCHO-AAL株は、LCAやAALが認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位とフコースの1位が結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度1mg/mlのエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin; 以下、PSAと表記、Vector社製) が添加された培地でもCHO-LCA株及びCHO-AAL株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤MNNG無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、それら株を解析に用いた。

【0343】

(2) 抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞の作製

上記(1)で得られた3種類のレクチン耐性株に、実施例8に記載した方法で、抗CCR4ヒト型キメラ抗体発現プラスミドpKANTEX2160を導入し、薬剤MTXによる遺伝子増幅を行い、抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例8の2に記載したELISA法を用いて行い、CHO-LCA株、CHO-AAL株、CHO-PHA株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA株由来の形質転換株をCHO/CCR4-LCA株、CHO-AAL株由来の形質転換株をCHO/CCR4-AAL株、CHO-PHA株由来の形質転換株をCHO/CCR4-PHA株と名付けた。なおCHO/CCR4-LCA株はNega-13の株名で、平成13年9月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6) にFERM BP-7756として寄託されている。

【0344】

(3) レクチン耐性CHO細胞による高ADCC活性抗体の生産

上記(2)で得られた3種類の形質転換株を用い、実施例8の3に記載した方法で精製抗体を取得した。各抗CCR4ヒト型キメラ抗体精製標品の抗原結合活性は実施例8の2に記載したELISA法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例8で作製した通常のCHO/DG44細胞を宿主とした組換え細胞株 (5-03株) が生産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例8の7に記載した方法にしたがって各抗CCR4ヒト型キメラ抗体精製標品のADCC活性を評価した。その結果を図43に示した。5-03株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA株及びCHO/CCR4-AAL株が生産した抗体では、約10倍程度のADCC活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA株が生産した抗体では有意なADCC活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA株とYB2/0株が生産した抗体のADCC活性を実施例8の7に記載した方法にしたがって比較したところ、CHO/CCR4-LCA株が

生産した抗体は実施例8の1で作製したYB2/0細胞株が生産した抗体KM2760-1と同様に、5-03株が生産した抗体に比べ高いADCC活性を示すことが明らかとなった（第44図）。

【0345】

(4) レクチン耐性CHO細胞が生産する抗体の糖鎖解析

上記(3)で精製した抗CCR4ヒト型キメラ抗体の糖鎖解析を行った。精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー-0.5-10K（ミリポア社製）を用いて10mM KH_2PO_4 に溶液を置換した。置換倍率は80倍以上になるように行なった。抗体は、UV-1600（島津社製）を用いて濃度を測定した。抗体のアミノ酸配列から式(III) [アドバンスズ・イン・プロテインケミストリー (Advances in Protein Chemistry), 12, 303, 1962]を用いてモル吸光定数を算出し、280nmの吸光度1.0を1.38mg/mlとして濃度を決定した。

10

【0346】

【数2】

$$E_{1\text{mol/l}} = A \times n1 + B \times n2 + C \times n3 \quad (\text{III})$$

【0347】

$$E_{1\text{mol/ml}} = E_{1\text{mol/l}} / \text{MW}$$

$E_{1\text{mol/l}}$: 280nmでの吸光係数 ($\text{mg}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$)

20

$E_{1\text{mol/ml}}$: 280nmでのモル吸光係数 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

A: トリプトファンの280nmでのモル吸光係数 = 5550 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

B: チロシンの280nmでのモル吸光係数 = 1340 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

C: シスチンの280nmでのモル吸光係数 = 200 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

n1: 抗体1分子あたりのトリプトファンの数

n2: 抗体1分子あたりのチロシンの数

n3: 抗体1分子あたりのシスチンの数

MW: 抗体の分子量 (g/mol)

【0348】

100 μg の抗体をヒドラクラブS-204用Test tubeに入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させたTest tubeをホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110℃、1時間反応させた [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を30分間放置して室温に戻した。Test tubeにホーネン社製アセチル化試薬のacetylation reagentを250 μl 、無水酢酸を25 μl 入れてよく攪拌させ、室温で30分間反応させた。さらにacetylation reagentを250 μl 、無水酢酸を25 μl 加えてよく攪拌させ、室温で1時間反応させた。試料を-80℃のフリーザーで凍結させ、約17時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa社製セルロースカートリッジグリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984]。2-アミノピリジン溶液は2-アミノピリジン1gに対しHCl760 μl を加え(1×PA溶液)、その溶液を逆浸透精製水で10倍に希釈したものをを用いた(10倍希釈PA溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム10mgに対し1×PA溶液20 μl 、逆浸透精製水430 μl を加えて調製した。試料に10倍希釈PA溶液を67 μl 入れて100℃、15分反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を2 μl 入れて90℃、12時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群(PA化糖鎖群)を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム(Pharmacia社製)を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は10mM炭酸水素アンモニウム、流速は0.5ml/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長320nm、蛍光波長400nmで行なった。試料添加後20分から30分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖群とした。次に、CLC-OD

30

40

50

Sカラム (Shimadzu社製、6.0nm × 150nm) を用いて、精製PA化糖鎖群の逆相HPLC分析を行った。カラム温度は55、流速は1ml/ml、蛍光検出器は励起波長320nm、蛍光波長400nmで行なった。10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて80分間溶出した。各PA化糖鎖の同定は、分取した各PA化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa社製PA化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各PA化糖鎖を消化後、逆相HPLC分析により行なった (第45図)。糖鎖含量は、逆相HPLC分析における各PA化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端がN-アセチルグルコサミンでないPA化糖鎖は、不純物由来であるか、PA化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。

10

【0349】

緩衝液Aとしてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液Bとしてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5% 1-ブタノールを用い、実施例11の (6) と同様に分析した。

第45図において、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i) ~ (viii) のうち (i) ~ (iv) のピークが占める面積、 α -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i) ~ (viii) のうち (v) ~ (viii) のピークが占める面積から算出した。

レクチン耐性株が生産する抗CCR4ヒト型キメラ抗体精製標品の糖鎖構造を分析した結果を第6表に示した。ここで、レクチン耐性株が生産した抗CCR4ヒト型キメラ抗体の糖鎖を分析した結果を示したものである。実施例11の (6) に記載した方法で分析しピーク面積から計算した、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合 (%) を表に示す。

20

【0350】

【表7】

第6表

抗体の生産細胞	α -1,6-フコースを持たない複合二本鎖型糖鎖 (%)
5-03株	9
CHO/CCR4-LCA株	48
CHO/CCR4-AAL株	27
CHO/CCR4-PHA株	8

30

【0351】

5-03株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA株が生産した抗体では、分析ピーク面積から計算すると、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL株が生産した抗体では、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から27%まで上昇していた。一方、PHA耐性株では5-03株と比較して、糖鎖パターン及び α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

【0352】

実施例15. レクチン耐性CHO細胞株の解析

40

1. 抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞株CHO/CCR4-LCAにおけるGMD酵素の発現量解析

実施例14で取得した抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞株CHO/CCR4-LCAにおける、フコース生合成酵素として知られるGMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)、GFPP (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase)、F_x (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)、及びフコース転移酵素であるFUT8 (α -1,6-fucosyltransferase) の各遺伝子の発現量を、RT-PCR法を用いて解析した。

【0353】

(1) 各種細胞株からのRNA調製

CHO/DG44細胞、実施例8の1(2) で取得した抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞株5-03、実施例14(2) で取得した抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞株CHO/CCR4-LCAをそれぞれ37 の

50

5%CO₂インキュベーター内にて継代後4日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各 1×10^7 細胞より添付の使用説明書に従ってRNAを調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL社製) を用い、添付の使用説明書に従って各RNA5 μ gより20 μ lの反応液中にて一本鎖cDNAを合成した。

【0354】

(2) RT-PCR法を用いたGMD遺伝子の発現量解析

GMD cDNAをPCR法によって増幅するために、実施例17の1で示すCHO細胞由来GMD cDNA配列より、配列番号32で示される塩基配列を有する24merの合成DNAプライマーと配列番号33で示される塩基配列を有する26merの合成DNAプライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖cDNA 0.5 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号32と33の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー-480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。上記の該PCR反応液10 μ lをアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA社製) を用いてDNA断片を染色し、予想される約350bpのDNA断片量をFluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

【0355】

(3) RT-PCR法を用いたGFPP遺伝子の発現量解析

GFPP cDNAをPCR法によって増幅するために、実施例16の2で取得したCHO細胞由来GFPPのcDNA配列に基づいて、配列番号34で示される塩基配列を有する27merの合成DNAプライマーと配列番号35で示される塩基配列を有する23merの合成DNAプライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖cDNA 0.5 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号34と35の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー-480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを24サイクル行なった。上記の該PCR反応液10 μ lをアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA社製) を用いてDNA断片を染色し、予想される約600bpのDNA断片量をFluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

【0356】

(4) RT-PCR法を用いたFx遺伝子の発現量解析

Fx cDNAをPCR法によって増幅するために、実施例16の1で取得したCHO細胞由来FXのcDNA配列に基づいて、配列番号36で示される塩基配列を有する28merの合成DNAプライマーと配列番号37で示される塩基配列を有する28merの合成DNAプライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖cDNA 0.5 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号36と37の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー-480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを22サイクル行なった。上記の該PCR反応液10 μ lをアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA社製) を用いてDNA断片を染色し、予想される約300bpのDNA断片量をFluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

【0357】

(5) RT-PCR法を用いたFUT8遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNAをPCR法によって増幅するために、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖cDNA 0.5 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号13 と14 の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー-480 (パーキンエルマー社製) を用

いて、94℃にて5分間加熱した後94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを20サイクル行なった。上記の該PCR反応液10μlをアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA社製) を用いてDNA断片を染色し、予想される約600bpのDNA断片量をFluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

【0358】

(6) RT-PCR法を用いた -アクチン遺伝子の発現量解析

-アクチンcDNAをPCR法によって増幅するために、本項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖cDNA 0.5μlを鋳型として含む20μlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの配列番号15と16の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを14サイクル行なった。上記の該PCR反応液10μlをアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA社製) を用いてDNA断片を染色し、予想される約800bpのDNA断片量をFluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

【0359】

(7) 各細胞株におけるGMD、GFPP、Fx、FUT8遺伝子の発現量

本項(2)から(6)で測定した各細胞株におけるGMD、GFPP、Fx、FUT8 cDNA由来PCR増幅断片量の値を、各細胞株における -アクチンのcDNA由来PCR増幅断片量の値で割り、CHO/DG44細胞におけるPCR増幅断片量を1とした場合の5-03株及びCHO/CCR4-LCA株における各遺伝子のPCR増幅断片量を求めた。結果を第7表に示す。

【0360】

【表8】

第7表

	GMD	GFPP	Fx	FUT8
CHO/DG44株	1	1	1	1
5-03株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03株由来				
LCA耐性細胞	0.160	0.886	0.920	0.875
CHO/CCR4-LCA				

【0361】

第7表で示したようにCHO/CCR4-LCA株のGMD遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ1/10程度に低下していた。なお、本実験は独立して2回行い、その平均値を使用した。

【0362】

2. GMD遺伝子を強制発現させた抗CCR4ヒト型キメラ抗体生産細胞株CHO/CCR4-LCAを用いた解析

(1) CHO細胞由来GMD遺伝子発現ベクターpAGE249GMDの構築

実施例17の1で取得したCHO細胞由来GMDのcDNA配列に基づいて、配列番号38で示される塩基配列を有する28merのプライマー、及び配列番号39で示される塩基配列を有する29merのプライマーを作製した。続いて、本実施例1項(1)で作製したCHO細胞由来GMD一本鎖cDNA 0.5μlを鋳型として含む20μlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの配列番号38と39の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて5分間加熱した後94℃にて1分間、58℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを8サイ

10

20

30

40

50

クル反復した後、さらに94にて1分間、68にて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約600bpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドmt-Cを得た (第46図参照)。

【0363】

次に、実施例17の1で取得したCHO細胞由来GMD のcDNA配列に基づいて、配列番号40で示される塩基配列を有する45merのプライマー、及び配列番号41で示される塩基配列を有する31merのプライマーを作製した。続いて、本実施例1項(1) で作製したCHO細胞由来GMD一本鎖cDNA 0.5 µlを鋳型として含む20 µlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2 mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 µMの配列番号40と41の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー-480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94にて5分間加熱した後94にて1分間、57にて1分間、72にて1分間のサイクルを8サイクル反復した後、さらに94にて1分間、68にて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約150pのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドATGを得た (第47図参照)。

【0364】

次に、実施例17の1で作製した3 µgのプラスミドCHO-GMDを制限酵素SacI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約900bpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。1.4 µgのプラスミドmt-Cを制限酵素SacI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約3.1kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、プラスミドWT-N(-)を得た (第48図参照)。

【0365】

次に、2 µgのプラスミドWT-N(-) を制限酵素BamHI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約1kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。3 µgのプラスミドpBluescriptSK(-) (Stratagene社製) を制限酵素BamHI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約3kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、プラスミドWT-N(-) in pBSを得た (第49図参照)。

【0366】

次に、2 µgのプラスミドWT-N(-) in pBSを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で37にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約4kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 µgのプラスミドATGを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で37にて16時間反応

後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約150bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5⁺株を形質転換し、プラスミドWT in pBSを得た(第50図参照)。

【0367】

次に、2μgのプラスミドpAGE249を制限酵素HindIIIとBamHI (共に宝酒造社製) で37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約6.5kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2μgのプラスミドWT in pBSを制限酵素HindIIIとBamHI (共に宝酒造社製) で37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約1.2kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5⁺株を形質転換し、プラスミドpAGE249GMDを得た(第51図参照)。

【0368】

(2) CHO/CCR4-LCAにおけるGMD遺伝子の安定発現

制限酵素FspI (NEW ENGLAND BIOLABS社製) で切断することにより直鎖状としたCHO細胞由来GMD遺伝子発現ベクターpAGE249GMDを5μg、 1.6×10^6 細胞のCHO/CCR4-LCA株へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、MTX (SIGMA社製) を200nMの濃度で含む30mlのIMDM-dFBS(10) 培地を10%含むIMDM培地 (GIBCO BRL社製) に懸濁し、182cm²フラスコ (Greiner社製) にて37℃の5%CO₂インキュベーター内で24時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを0.5mg/ml、MTX (SIGMA社製) を200nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地に培地交換してさらに19日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

また同様に、pAGE249ベクターを上記と同じ方法でCHO/CCR4-LCA株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

【0369】

(3) GMD遺伝子を発現させたCHO/CCR4-LCA株の培養及び抗体の精製

本項(2)で取得したGMDを発現している形質転換細胞群をMTX (SIGMA社製) を200nM、ハイグロマイシンを0.5mg/mlの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地を用いて、182cm²フラスコ (Greiner社製) にて37℃の5%CO₂インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25mlのPBSバッファー (GIBCO BRL社製) にて細胞を洗浄後、EXCELL301培地 (JRH社製) を35ml注入した。37℃の5%CO₂インキュベーター内で7日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CCR4キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗CCR4キメラ抗体を回収、精製した。

【0370】

(4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

本項(2)で取得したGMD遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX (SIGMA社製) を200nM、ハイグロマイシンを0.5mg/mlの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地に 6×10^4 細胞/mlになるように懸濁し、96ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に50μl/ウェルずつ分注した。続いて、このウェルにMTX (SIGMA社製) を200nM、ハイグロマイシンを0.5mg/mlの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地に0mg/ml、0.4mg/ml、1.6mg/ml、4mg/mlの濃度でLCA (LENS CULINARIS AGGLUTININ: Vector Laboratories社製) を懸濁した培地を50μlずつ加え、37℃の5%CO₂インキュベーター内で96時間培養した。培養後、WST-1 (ベーリンガー社製) を10μl/ウェルになるよう加え、37℃の5%CO₂インキュベーター内で30分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD社製) にて450nmと595nmの吸光度 (以下OD450、OD595と表記する) を測定した。また同様に、pAGE249ベクターを導入した形質

また同様に、pAGE249ベクターを導入した形質

転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して2回行なった。

【0371】

上記で測定したOD450からOD595を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCAを加えていないウェルの細胞生存数を100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を%で表記し第52図に示した。第52図に示したように、GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株ではLCA耐性度の低下が観察され、0.2mg/mlのLCA存在下での細胞生存率は40%程度、0.8mg/mlのLCA存在下での細胞生存率は20%程度であった。一方、pAGE249ベクターを導入したCHO/CCR4-LCA株では、0.2mg/mlのLCA存在下での細胞生存率は100%、0.8mg/mlのLCA存在下においても細胞生存率は80%程度であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA株はGMD遺伝子の発現量が低下しており、その結果LCAに対する耐性を獲得していることが示唆された。

10

【0372】

(5) GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株より取得した抗CCR4キメラ抗体のin vitro細胞障害活性 (ADCC活性)

本項 (3) で得られた精製抗CCR4キメラ抗体のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

【0373】

i) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地に500 µg/mlの濃度でG418硫酸塩 (ナカライテスク製) を添加した培地で培養したCCR4-EL4株 (実施例8の7参照) の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37 °Cで90分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4 °Cで30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を5ml加え、 2.5×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

20

【0374】

ii) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

30

【0375】

iii) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記i) で調製した標的細胞溶液の50 µl (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いでii) で調製したエフェクター細胞溶液を100 µl (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は25:1となる) 添加した。更に、各種抗CCR4キメラ抗体 (本項 (3) で精製した抗CCR4キメラ抗体、及びKM2760-1、KM3060) を最終濃度0.0025 ~ 2.5 µg/mlとなるように加え、37 °Cで4時間反応させた。

反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量をβ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は前記式 (11) により求めた。

40

ADCC活性測定の結果を第53図に示した。第53図に示したように、GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株より取得した精製抗CCR4キメラ抗体のADCC活性は、実施例8で取得したKM3060と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249ベクターを導入したCHO/CCR4-LCA株より取得した精製抗CCR4キメラ抗体のADCC活性は、CHO/CCR4-LCA株より取得した精製抗CCR4キメラ抗体と同程度のADCC活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA株はGMD遺伝子の発現量が低下しており、その結果ADCC活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

【0376】

(6) GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株由来の抗CCR4キメラ抗体の糖鎖解析

50

本項 (3) で得られた精製抗CCR4キメラ抗体の糖鎖解析を実施例14 (4) に示す方法に従って行ない、その解析結果を第55図に示した。実施例14で作製したCHO/CCR4-LCAより取得した精製抗CCR4キメラ抗体と比較して、GMD遺伝子を発現させたCHO/CCR4-LCA株より取得した精製抗CCR4キメラ抗体では、分析ピークの面積から計算すると -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が9%に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA株にGMD遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が5-03株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

【0377】

実施例16 . CHO細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

1 . CHO細胞のF_x cDNA配列の決定

10

(1) CHO/DG44細胞由来全RNAの抽出

CHO/DG44細胞を10%ウシ胎児血清 (Life Technologies社製) および1倍濃度のHT supplement (Life Technologies社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で接着細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。37 °Cの5%CO₂インキュベーター内で培養し、培養2日目に 1×10^7 個を回収後、RNAeasy (QIAGEN社製) により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

【0378】

(2) CHO/DG44細胞由来全一本鎖cDNAの調製

上記 (1) で調製した全RNAを45 μ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 μ l、付属の10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 μ lをそれぞれに添加して、37 °Cで30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50 μ lの滅菌水に溶解した。

20

得られた全RNA3 μ lに対しSUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした20 μ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。GFPおよびF_xのクローニングには該反応液の50倍希釈水溶液を使用した。使用するまで-80 °Cで保管した。

【0379】

(3) チャイニーズハムスターF_xのcDNA部分断片の取得

30

以下の手順によりチャイニーズハムスターF_xのcDNA部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒトF_xのcDNA (Genebank 登録番号U58766) およびマウスのcDNA (Genebank 登録番号M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号42および配列番号43に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (2) で調製したCHO/DG44由来一本鎖cDNAを1 μ lを含む25 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 μ mol/l上記遺伝子特異的プライマー (配列番号42および配列番号43)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは94 °Cで5分間の加熱の後、94 °Cで1分、58 °Cで2分間、72 °Cで3分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72 °Cで10分間加熱する条件で行った。

40

【0380】

PCR後、反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片301bpをQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した (以下、アガロースゲルからのDNA断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A)、69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法

50

にはこの方法を用いる)に従って、プラスミドDNAを単離し、Fx cDNA部分断片が組み込まれた2クローンを得た。各々pCRFxクローン8、pCRFxクローン12と称す。

Fxクローン8、Fxクローン12に挿入されたcDNAの塩基配列はDNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入cDNAがチャイニーズハムスターのFxのオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。

【0381】

(4) RACE用一本鎖cDNAの合成

本項 (1) で抽出したCHO/DG44 全RNAからの5'および3'RACE用一本鎖cDNAの作製を、SMA RT™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただしPowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖cDNAは各々、キット添付のTricin-EDTA buffer で10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

【0382】

(5) RACE法によるチャイニーズハムスターFx全長cDNAの決定

上記 (3) 項で決定したチャイニーズハムスターFxの部分配列をもとにチャイニーズハムスターFx に特異的な5'RACE用プライマーFx GSP1-1 (配列番号44) およびFx GSP1-2 (配列番号45)、チャイニーズハムスターFx 特異的な3'RACE用プライマーFx GSP2-1 (配列番号46) およびFx GSP2-2 (配列番号47) を設計した。

次にAdvantage2 PCR Kit (CLONTECH社製) を用いて、本項 (4) で調製したCHO/DG44由来RACE用一本鎖cDNAを1μlを含む50μlの反応液 [Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH社製)、0.2mM dNTPs、0.2μmol/l チャイニーズハムスターFx特異的RACE用プライマー、1倍濃度の共通プライマー (CLONTECH社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCRは94℃で5秒間、68℃で10秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして20サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より1μlをとりTricin-EDTA bufferで50倍に希釈した水溶液1μlをテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件でPCRを行った。一回目および二回目のPCRで用いた、プライマーの組み合わせおよび増幅されるDNA断片長を第8表に示した。

【0383】

【表9】

第8表

チャイニーズハムスターFxcDNA RACE PCR に用いた

プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	<u>Fx</u> 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	<u>Fx</u> GSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	<u>Fx</u> GSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp
3' RACE	<u>Fx</u> 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	<u>Fx</u> GSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	<u>Fx</u> GSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

【0384】

PCR後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片をQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR 2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、チャイニーズハムスターFxの5'領域を含むcDNA5クローンを得た。各々をFx5'クローン25、Fx5'クローン26、Fx5'クローン28、Fx5'クローン31、Fx5'クローン32と称す。

同様にチャイニーズハムスターFxの3'領域を含むcDNA5クローンを得た。各々Fx3'をFx3'クローン1、Fx3'クローン3、Fx3'クローン6、Fx3'クローン8、Fx3'クローン9と称す。

上記、5'および3'RACEにより取得した各クローンのcDNA部分の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各cDNAの塩基配列を比較し、PCRに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFxcDNA全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号48) に示す。

【 0 3 8 5 】

2. CHO細胞のGFPP cDNA配列の決定

(1) チャイニーズハムスターGFPPのcDNA部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPPのcDNA部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒトGFPPのcDNA (Genebank 登録番号AF017445)、該配列と相同性の高いマウスEST配列 (Genebank 登録番号A1467195、AA422658、BE3043 25、A1466474)、およびRat EST配列 (Genebank 登録番号BF546372、A1058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3種間で保存性の高い領域にラットGFPPに特異的なプライマーGFPP FW9およびGFPP RV9 (配列番号49および配列番号50) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項1 (2) で調製したCHO/DG44由来一本鎖cDNAを1 μ lを含む25 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 μ mol/l上記GFPP特異的プライマーGFPP FW9およびGFPP RV9 (配列番号49および配列番号50)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは94 で5分間の加熱の後、94 で1分、58 で2分間、72 で3分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72 で10分間加熱する条件で行った。

【 0 3 8 6 】

PCR後、反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1.4KbpをQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR 2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、GFPP cDNA部分断片が組み込まれた3クローンを得た。各々GFPPクローン8、GFPPクローン11、GFPPクローン12と称す。

GFPPクローン8、GFPPクローン11、GFPPクローン12に挿入されたcDNAの塩基配列はDNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入cDNAがチャイニーズハムスターのGFPPのオープンリーディングフレーム (ORF) の部分配列をコードすることを確認した。

【 0 3 8 7 】

(2) RACE法によるチャイニーズハムスターGFPP全長cDNAの決定

本項2 (1) で決定したチャイニーズハムスターFxの部分配列をもとにチャイニーズハムスターFxに特異的な5'RACE用プライマーGFPP GSP1-1 (配列番号52) およびGFPP GSP1-2 (配列番号53)、チャイニーズハムスターGFPP 特異的な3'RACE用プライマーGFPP GSP2-1 (配列番号54) およびGFPP GSP2-2 (配列番号55) を設計した。

次にAdvantage2 PCR Kit (CLONTECH社製) を用いて、本項 (4) で調製したCHO/DG44由来RACE用一本鎖cDNA1 μ lを含む50 μ lの反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH社製)

10

20

30

40

50

、0.2mM dNTPs、0.2 μmol/l チヤイニーズハムスター-GFPF特異的RACE用プライマー、1倍濃度の共通プライマー (CLONTECH社製) を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCRは94 で5秒間、68 で10秒間、72 で2分間からなる反応を1サイクルとして20サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より1 μlをとりTricin-EDTA bufferで50倍に希釈した水溶液1 μlをテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件でPCRを行った。一回目および二回目のPCRで用いた、プライマーの組み合わせおよび増幅されるDNA断片長を第9表に示した。

【 0 3 8 8 】

【表 1 0】

10

第9表

チヤイニーズハムスター-GFPF cDNA RACE PCRに用いた

プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	GFPF 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

3' RACE	GFPF 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM(Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP(Nested Univarsal primer)	1400bp

20

【 0 3 8 9 】

PCR後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片をQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μlで溶出した。上記増幅断片4 μlをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR 2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 を形質転換した。

30

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、チヤイニーズハムスター-GFPFの5'領域を含むcDNA4クローンを得た。各々をGFPP5'クローン1、GFPP5'クローン2、GFPP5'クローン3、GFPP5'クローン4と称す。

同様にチヤイニーズハムスター-GFPFの3'領域を含むcDNA 3クローンを得た。各々をGFPP 3'クローン10、GFPP3'クローン16、GFPP3'クローン20と称す。

上記、5'および3'RACEにより取得した各クローンのcDNA部分の塩基配列は、DNAシーケンサー-377 (Parkin Elmer社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各cDNAの塩基配列を比較し、PCRに伴う塩基の読み誤りを除き、チヤイニーズハムスター-GFPF cDNA全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号51) に示す。

40

【 0 3 9 0 】

実施例17. CHO細胞由来GMD遺伝子の取得

1. CHO細胞由来GMD cDNA配列の決定

(1) CHO細胞由来GMD遺伝子のcDNA取得 (5'及び3'末端配列を除く部分cDNAの取得)

GenBankに登録されているヒトGMD cDNA配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来GMD cDNAを公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3種類のマウスEST配列が得られた (GenBank Accesssion No. BE986856、BF158988、E284785)。これらEST配列を連結させることにより、推定されるマウスGMD cDNA配列を決定した。

このマウスGMD cDNA配列より、配列番号56で示される塩基配列を有する28merのプライ

50

マー、配列番号57で示される塩基配列を有する27merのプライマー、配列番号58で示される塩基配列を有する25merのプライマー、配列番号59で示される塩基配列を有する24merのプライマー、配列番号60で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。

【0391】

続いて、CHO細胞由来GMD cDNAを増幅するために以下の方法でPCRを行なった。実施例15の1項(1)で作製したCHO細胞由来一本鎖cDNA 0.5 µlを鋳型として含む20 µlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 µMの合成DNAプライマー2種類] を調製した。なお、合成DNAプライマーには配列番号56と配列番号57、配列番号58と配列番号57、配列番号56と配列番号59、配列番号56と配列番号60の組み合わせを用いた。該反応液をDNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて94 にて5分間加熱した後、94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

【0392】

このPCR反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号56と配列番号57の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1.2kbp、配列番号58と配列番号57の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1.1kbp、配列番号56と配列番号59の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約350bp、配列番号56と配列番号60の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1kbpのDNA断片が増幅された。これらDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド22-8 (配列番号56と配列番号57の合成DNAプライマーから増幅された約1.2kbpのDNA断片を有する)、23-3 (配列番号58と配列番号57の合成DNAプライマーから増幅された約1.1kbpのDNA断片を有する)、31-5 (配列番号56と配列番号59の合成DNAプライマーから増幅された約350bpのDNA断片を有する)、34-2 (配列番号56と配列番号60の合成DNAプライマーから増幅された約1kbpのDNA断片を有する) を得た。これらプラスミドに含まれるCHO細胞由来GMD cDNA配列を、DNAシーケンサーABI PRISM 377 (パーキンエルマー社製) を用い、常法に従って決定した (5'末端側の開始メチオンより下流28塩基の配列、及び3'末端側の終了コドンより上流27塩基の配列は合成オリゴDNA配列由来のため、マウスGMD cDNA配列である)。

【0393】

さらに、プラスミド22-8と34-2に含まれるCHO細胞由来GMD cDNAを組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。1 µgのプラスミド22-8を制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で37 にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約4kbpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 µgのプラスミド34-2を制限酵素EcoRIで37 にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約150bpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドCHO-GMDを得た (第54図参照)。

【0394】

(2) CHO細胞由来GMD cDNAの5'末端配列の決定

CHO細胞由来GMD cDNAの5'末端側非コード (non-coding) 領域の塩基配列より配列番号61で示される塩基配列を有する24merのプライマー、及びCHO由来GMD cDNA配列より配列番号62で示される塩基配列を有する32merのプライマーを作製し、cDNAを増幅するために以下の方法でPCRを行なった。実施例15の1項(1)で得られたCHO細胞由来の一本鎖cDNA 0.5 µlを鋳型として含む20 µlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 µMの配列番号61と配列番号62の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後、94 にて1分間、55 にて1分間、72 にて2分間のサイクルを

20サイクル行なった後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを18サイクル行なった。該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約300bpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付の説明書に従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド5'GMDを得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの開始メチオニンより下流28塩基の配列を決定した。

【0395】

(3) CHO細胞由来GMD cDNAの3'末端配列の決定

CHO細胞由来GMDの3'末端cDNA配列を得るため、以下の方法でRACE法を行なった。実施例15の1項(1)で取得したCHO細胞由来RNAより、3'RACE用一本鎖cDNAの作製をSMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素にはPowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH社製) を用いた。調製後の一本鎖cDNAは、キット添付のTricin-EDTA bufferで10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

続いて、上記3'RACE用一本鎖cDNA 1μlを鋳型として含む20μlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの配列番号63で示す24merの合成DNAプライマー [本項(1)で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、1倍濃度のUniversal Primer Mix (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属; CLONTECH社製)] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

【0396】

反応終了後、該PCR反応液より1μlを取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH社製) で20倍希釈した水溶液1μlを鋳型として含む20μlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの配列番号64で示す25merの合成DNAプライマー [本項(1)で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、0.5μMのNested Universal Primer (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属; CLONTECH社製)] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行

なった。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約700bpのDNA断片をGene Clean II kit (BIO101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNAはDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド3'GMDを得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの終止コドンより上流27塩基の配列、及び3'側のnon-coding領域415bpの塩基配列を決定した。

以上、本項(1)、(2)、(3)より決定したCHO由来GMD遺伝子の全長cDNA配列を配列番号65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号71に示す。

【0397】

2. CHO/DG44細胞のGMD遺伝子を含むゲノム配列の決定

実施例17の1項で決定したマウスGMD cDNA配列より、配列番号66で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。続いて、以下の方法でCHO細胞由来ゲノムDNAを取得した。CHO/DG44細胞をIMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地 [HT supplement (インビトロジェン社製) を1倍濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地] に 3×10^5 細胞/mlになるように懸濁し、接着細胞用平底6穴プレート (Greiner社製) に2ml/ウェルずつ分注した。37℃の5%CO₂インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従ってゲノムDNAを調製し、TE-RNase緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、20

0 µg/ml RNase A) 150 µlに一晩溶解した。

【0398】

上記で取得したCHO/DG44細胞由来ゲノムDNAを100ng、20 µlの反応液 [1x EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 µMの配列番号59と配列番号66の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約100bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue (R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH 5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドex3を得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定し、配列番号67に示した。

10

【0399】

次に、実施例17の1項で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より、配列番号68で示される塩基配列を有する25merのプライマー、及び配列番号69で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44由来ゲノムDNAを100ng、20 µlの反応液 [1x EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 µMの配列番号68と配列番号69の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 にて5分間加熱した後、94 にて1分間、68 にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

20

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約200bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドex4を得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定し、配列番号70に示した。

【0400】

実施例18. 市販抗体の糖鎖解析

CHO細胞を宿主細胞にして産生させた市販抗HER2/neu抗体ハーセプチン (Herceptin; GE NENTECH社、Roche社製) の糖鎖解析を、実施例11の (6) の方法にしたがって行った (第31図)。ピーク面積から計算すると、Herceptinの -1,6-フコースのない糖鎖含量は16%、-1,6-フコース結合糖鎖含量は84%であった。他の市販抗体に関しても同様の分析を行った結果、Rituxan (GENENTECH社、Roche社、IDEC社製)、Zenapax (Roche社、PDL社製) ではHerceptinよりも -1,6-フコースのない糖鎖含量が少なかった。

30

第31図は、Herceptinから調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相HPLCの分析条件、糖鎖構造、-1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は実施例11の(6)と同じ方法で行った。

【0401】

40

【発明の効果】

(産業上の利用可能性)

本発明によれば、抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、ならびにその用途を提供することができる。

【0402】

配列番号4-人工配列の説明：合成DNA

配列番号5-人工配列の説明：合成DNA

配列番号8-人工配列の説明：合成DNA

配列番号9-人工配列の説明：合成DNA

配列番号10-人工配列の説明：合成DNA

50

配列番号11-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号12-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号13-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号14-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号15-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号16-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号17-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号18-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号19-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号20-人工配列の説明：合成DNA	10
配列番号21-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号22-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号26-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号27-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号28-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号29-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号30-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号31-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号32-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号33-人工配列の説明：合成DNA	20
配列番号34-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号35-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号36-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号37-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号38-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号39-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号40-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号41-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号42-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号43-人工配列の説明：合成DNA	30
配列番号44-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号45-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号46-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号47-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号49-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号50-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号52-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号53-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号54-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号55-人工配列の説明：合成DNA	40
配列番号56-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号57-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号58-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号59-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号60-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号61-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号62-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号63-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号64-人工配列の説明：合成DNA	
配列番号66-人工配列の説明：合成DNA	50

配列番号68-人工配列の説明：合成DNA

配列番号69-人工配列の説明：合成DNA

【図面の簡単な説明】

第1図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。1A図が非還元条件、1B図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-GD3キメラ抗体、3がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、4がSP2/0-GD3キメラ抗体、5がNS0-GD3キメラ抗体（302）、6がNS0-GD3キメラ抗体（GIT）、7が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第2図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のGD3との結合活性を抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。がYB2/0-GD3キメラ抗体、がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、がSP2/0-GD3キメラ抗体、がNS0-GD3キメラ抗体（302）、がNS0-GD3キメラ抗体（GIT）の活性をそれぞれ示す。

10

第3図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。がYB2/0-GD3キメラ抗体、がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、がSP2/0-GD3キメラ抗体、がNS0-GD3キメラ抗体（302）、がNS0-GD3キメラ抗体（GIT）の活性をそれぞれ示す。

第4図は、精製した3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。4A図が非還元条件、4B図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-hIL-5RCR抗体、3がCHO/d-hIL-5RCR抗体、4がNS0-hIL-5RCR抗体、5が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

20

第5図は、精製した3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体のhIL-5R との結合活性を抗体濃度を变化させて測定した結果を示した図である。縦軸はhIL-5R との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。がYB2/0-hIL-5RCR抗体、がCHO/d-hIL-5RCR抗体、がNS0-hIL-5RCR抗体の活性をそれぞれ示す。

第6図は、精製した3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体のhIL-5R発現マウスT細胞株CTLL-2（h5R）に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。がYB2/0-hIL-5RCR抗体、がCHO/d-hIL-5RCR抗体、がNS0-hIL-5RCR抗体の活性をそれぞれ示す。

第7図は、精製した3種類の抗hIL-5R CDR移植抗体のカニクイザルのhIL-5誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数（抗体及びhIL-5の投与開始日を0日とした）をそれぞれ示す。101、102が抗体非投与群、301、302、303がYB2/0-hIL-5RCR抗体投与群、401、402、403がCHO/d-hIL-5RCR抗体投与群、501、502、503がNS0-hIL-5RCR抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

30

第8図は、YB2/0が生産した精製抗hIL-5R CDR移植抗体（8A図）およびNS0が生産した精製抗hIL-5R CDR移植抗体（8B図）のPA化糖鎖の逆相HPLC溶離の溶離図（左図）とそのPA化糖鎖を-L-フコシダーゼ処理した後に逆相HPLCで分析して得た溶離図（右図）を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第9図は、CHO/d細胞が生産した精製抗hIL-5R CDR移植抗体からPA化糖鎖を調製し、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

40

第10図で、10A図は、非吸着画分、吸着画分の一部のGD3との結合活性を、抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。

が非吸着画分、が吸着画分の一部をそれぞれ示す。10B図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。が非吸着画分、が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

第11図は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製したPA化糖鎖を逆相HPLCで分析して得た溶離図を示した図である。11A図に非吸着画分の溶離図、11B図に吸着画分の一部の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

50

第12図は、6種類の抗GD3キメラ抗体（12A図～12F図）から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第13図は、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる6種類の抗GD3キメラ抗体のGD3に対する結合活性を抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗GD3キメラ抗体（50%）、△が抗GD3キメラ抗体（45%）、□が抗GD3キメラ抗体（29%）、◇が抗GD3キメラ抗体（24%）、▽が抗GD3キメラ抗体（13%）、×が抗GD3キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

第14図は、ドナーAのエフェクター細胞を用いた、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる6種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗GD3キメラ抗体（50%）、△が抗GD3キメラ抗体（45%）、□が抗GD3キメラ抗体（29%）、◇が抗GD3キメラ抗体（24%）、▽が抗GD3キメラ抗体（13%）、×が抗GD3キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

10

第15図は、ドナーBのエフェクター細胞を用いた、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる6種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗GD3キメラ抗体（50%）、△が抗GD3キメラ抗体（45%）、□が抗GD3キメラ抗体（29%）、◇が抗GD3キメラ抗体（24%）、▽が抗GD3キメラ抗体（13%）、×が抗GD3キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

20

第16図は、6種類の抗CCR4キメラ抗体から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第17図は、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる6種類の抗CCR4キメラ抗体のCCR4に対する結合活性を抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸はCCR4との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗CCR4キメラ抗体（46%）、△が抗CCR4キメラ抗体（39%）、□が抗CCR4キメラ抗体（27%）、◇が抗CCR4キメラ抗体（18%）、▽が抗CCR4キメラ抗体（9%）、×が抗CCR4キメラ抗体（8%）の活性をそれぞれ示す。

第18図は、ドナーAのエフェクター細胞を用いた、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗CCR4キメラ抗体のCCR4/EL-4細胞に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗CCR4キメラ抗体（46%）、△が抗CCR4キメラ抗体（39%）、□が抗CCR4キメラ抗体（27%）、◇が抗CCR4キメラ抗体（18%）、▽が抗CCR4キメラ抗体（9%）、×が抗CCR4キメラ抗体（8%）の活性をそれぞれ示す。

30

第19図は、ドナーBのエフェクター細胞を用いた、-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗CCR4キメラ抗体のCCR4/EL-4細胞に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗CCR4キメラ抗体（46%）、△が抗CCR4キメラ抗体（39%）、□が抗CCR4キメラ抗体（27%）、◇が抗CCR4キメラ抗体（18%）、▽が抗CCR4キメラ抗体（9%）、×が抗CCR4キメラ抗体（8%）の活性をそれぞれ示す。

第20図は、プラスミドCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1の構築を示した図である。

第21図は、プラスミドCHAc-pBSおよびYBAC-pBSの構築を示した図である。

第22図は、プラスミドCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1の構築を示した図である。

40

第23図は、プラスミドCHAc-d-pBSおよびYBAC-d-pBSの構築を示した図である。

第24図は、競合的RT-PCR法を用いた各宿主細胞株におけるFUT8転写産物量の定量結果を示した図である。ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を示す。○がCHO細胞株、△がYB2/O細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第25図は、プラスミドmfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

第26図は、プラスミドpBSmfFUT8の構築を示した図である。

第27図は、プラスミドpAGEmfFUT8の構築を示した図である。

第28図は、競合的RT-PCR法を用いたFUT8遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸にβ-アクチン転写量に対するFUT8転写量の相対値を示す。

50

第29図は、FUT8遺伝子過剰発現株より精製した抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第30図は、mfFUT8-6、pAGE249導入株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。30A図にmfFUT8-6株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖、30B図にpAGE249導入株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第31図は、Herceptinから調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第32図は、プラスミドCHfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

第33図は、プラスミドploxPPuroの構築を示した図である。

第34図は、プラスミドpKOFUT8gE2-1の構築を示した図である。

第35図は、プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築を示した図である。

第36図は、プラスミドpscFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第37図は、プラスミドpKOFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第38図は、プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築を示した図である。

第39図は、プラスミドpKOFUT8gE2-5の構築を示した図である。

第40図は、プラスミドpKOFUT8Puroの構築を示した図である。

第41図は、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ 遺伝子破壊CHO細胞株である1st. FUT8 2-46-1株及び1st. FUT8 2-46株のゲノムサザン解析結果を示した図である。

第42図は、FUT8対立遺伝子破壊株より精製した抗CCR4キメラ抗体のADCC活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。 はそれぞれ、抗CCR4キメラ抗体産生CHO細胞5-03株由来の精製抗体および1st. FUT8 2-46-1株由来の精製抗体の活性をそれぞれ示す。

第43図は、レクチン耐性株が生産した抗CCR4ヒト型キメラ抗体のADCC活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。 は5-03株、 はCHO/CCR4-LCA株、 はCHO/CCR4-AAL株、 はCHO/CCR4-PHA株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第44図は、レクチン耐性株が生産した抗CCR4ヒト型キメラ抗体のADCC活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。 はYB2/0株 (KM2760#58-35-16)、 は5-03株、 はCHO/CCR4-LCA株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第45図は、精製した抗CCR4ヒト型キメラ抗体から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。45A図は5-03株が生産する抗体、45B図はCHO/CCR4-LCA株が生産する抗体、45C図はCHO/CCR4-AAL株が生産する抗体、および45D図はCHO/CCR4-PHA株が生産した抗体の分析結果を示す。

第46図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第1の工程を示した図である。

第47図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第2の工程を示した図である。

第48図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第3の工程を示した図である。

第49図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第4の工程を示した図である。

第50図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第5の工程を示した図である。

第51図は、CHO細胞由来GMDの発現ベクター構築（全6工程）の第6の工程を示した図である。

10

20

30

40

50

第52図は、GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株のLCAレクチンに対する耐性度を示した図である。LCAレクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を100%とし、2回測定を行った図である。図中249は、発現ベクターpAGE249を導入したCHO/CCR4-LCA株のLCAレクチンに対する生存率を示す。GMDはGMD発現ベクターpAGE249GMDを導入したCHO/CCR4-LCA株のLCAレクチンに対する耐性度を示す。

第53図は、GMDを発現させたCHO/CCR4-LCA株の細胞群が生産した抗CCR4キメラ抗体のADC活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第54図は、CHO細胞由来のGMD cDNAクローン22-8の5'末端にクローン34-2の5'末端を導入したプラスミドCHO-GMDの作製工程を示した図である。

第55図は、GMD遺伝子を発現させたCHO/CCR4-LCA株より精製した抗CCR4キメラ抗体から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

<130> P-38524

<150> JP 2000-308526

<151> 2000-10-06

10

<160> 73

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

20

<400> 1

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattett 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcggttga ttatgctcat tctttttgce tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

30

gcaaagctgg agcgettaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420

ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480

tttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540

40

catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600

tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
 agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
 gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttga atctcagaat 840
 tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
 gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacia aatgttcaa 960 10
 gtggctgagc tccccattgt agacagcctc catcctctc ctccttactt acccttggt 1020
 gtaccagaag accttgacaga tcgactctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080
 gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
 gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
 gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260 20
 gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
 actgatgacc cttctttggt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
 agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
 cggggcgtga tcttgatat acactttctc tcccaggctg acttcttgt gtgtactttt 1500 30
 tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
 gcaaaacttc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
 attgcagttt atctcacca acctcgaact aaagaggaaa tcccctgga acctggagat 1680
 atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
 ggaaaaacag gcctgtacce ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaatac 1800 40
 cctacatate ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctgggtggaac gcctctttgt 1980

gaagggtgc tgtgccctca agcccatg

2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60 10
 ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccage 120
 agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
 aggcgaatgg ctgagtcctc ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
 ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300 20
 aagaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
 aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagegaac tgaagaaatt aaagcattta 420
 gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
 aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
 gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600 30
 cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
 gttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
 ctcatcttgg aatctcagaa ttggectat gctactgggtg gatgggagac tgtgttttaga 780
 cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
 gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900 40
 cctccttact taccactggc tgttcagaa gaccttcag accgactcct aagagtccat 960
 ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaact acttgattcg tccacaacct 1020

tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
 ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
 gagtacatgg tacacgttga agaacatfff cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
 aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggagc aaagacaaag 1260
 tactccaatt atgaatffat tagtgataac tetatffctt ggtcagctgg actacacaat 1320
 cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactffct ctcacaggct 1380
 gactffctag tgtgtactff ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcate ctgatgcctc tgccaacttc cattctfftg atgacatcta ctatfftgga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt taccctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga taccattggg gtggctggaa accattggga tggttatffct 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatata cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

10

20

<210> 3
 <211> 9196
 <212> DNA
 <213> *Cricetulus griseus*

30

<400> 3
 tctagaccag gctggctctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgctg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tattfftgaa tattgtgata 120
 atttacatta taattgtaag taaaaatfft cagcctatff ttgtatacat tfftgcgtaa 180
 attatffctff tffgaaagff ttgttgtcca taatagctta gggaaacata aagttataat 240
 tfftgcttat gtatffgcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
 ggtatgtaat agctffcaaca tgtgggtatga tagaatffff cagtgctata taagttgffa 360

40

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaatth tttatgaatt attaaattga 420
 atccttaage tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tetgttcatt 480
 ctttctatat atgtggaaag gtaggoccca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
 ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
 gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatt 660 10
 ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggetgtttg 720
 tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgctctt 780
 atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
 aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
 cccaccacct ccagagtggc aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960 20
 aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
 cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
 agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg cttcaaata 1140
 atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
 gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttttg catttaaagt 1260 30
 caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
 cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttttaatttg ggccatgtgg tcaaagtata 1380
 tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
 tctataatat atgacttttc tccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500 40
 tttcatalat gttcttttg ggaggagata attttatttc taagagaate ctaagcatac 1560
 tgattgagaa atggcaacaa aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttgagg 1620

tttaaaatac atagccaccc taagggttta actggttgta gccttcctttt ggaattttta 1680
 ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
 tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaataat atttgaaaaa ataatggtct 1800
 ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860
 ataaccttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
 gttgcaagtt aagtagtgag atgacagoga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
 ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattage ctgaagtaca 2040
 tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
 cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
 aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta cttttacct gatactgggt 2220
 agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
 ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
 gcacaggaca agaaagctgc ctccctgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400
 acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaca acagaaactt 2460
 attttctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
 aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gogggcatgg actggttctt ggcgttgat 2580
 tatgctcatt ctttttgcc tggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
 agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
 gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc gtaggtttg 2760
 aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgacctt aggtataggg tctcagtctg 2820
 ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
 tttttaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940

10

20

30

40

ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
 attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060
 attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaagget tagttactct taaattctta 3120
 tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtga tccggaatgt gggtaattat 3180
 tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
 gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
 ttaacttga gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
 tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
 tgcagatatg aagacttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
 agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
 tagagaggat gccttctggc tetcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
 cttttagaac tcagatgttt catatggat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
 aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
 tctctgggtg gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
 agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
 cagggagggt tatgaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
 gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
 gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
 tgttttcagc ctttttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
 aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
 tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaatTTTtatt 4200

10

20

30

40

taaaagtctc aggagagact toccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
 gctcctgaat aatcaactgaa ttttctccat gttccatcta tagtaactgtt atttctgttt 4320
 tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
 aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataacacac 4440
 agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttetta ttggctagct 4500 10
 ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
 caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620
 cgatttecta tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
 ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
 gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800 20
 taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
 ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
 agagtttatt cagattacat ttttaaggta taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
 cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
 gatgcatgca ttctgtgct cagctcactt ttctgggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100 30
 tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataage 5160
 catctetcca gtccctcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
 aattgaatte ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
 aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340 40
 gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctoccca ggetgttctc tagattctac 5400
 tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttatct taaagctaag acatgaatga 5460
 tggacatgct tgtttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520

gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
 aggcataataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
 caataatfff caaaagcagt taccacaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
 gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
 tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
 tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttgtt ccattctggg 5880
 tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
 aggtatataa ttctatatte tgtatttttt tctctgtca tatatttgc tctgtttta 6000
 ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacctc ttctttggga tttattttgc 6060
 tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
 atagactgaa tgcccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
 ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
 gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaa ttaatttgtg 6300
 ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
 atttttttgt ttgatctggt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
 tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttota gccaaatgaa 6480
 attatattct gtattatfff agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
 tggatgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactc tatatagcat 6600
 gttgtttggt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaa 6660
 atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
 ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtggt gaactaactc tccgtactat 6780

10

20

30

40

ctgtttttct gtgaattaac ccottttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
 aacaagttaa ttacagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
 ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
 tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattettaga tagtctagga 7020
 tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc caettacttc agttcatgca 7080 10
 atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
 ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
 gtaaataata tgaaaatggt gattatcacc ataattcacc tgtatccctt tgttattgta 7260
 gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
 aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380 20
 gtatgttctc ccagtctttg gottgtatth tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440
 ttattttttt tatttaaat agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
 tccctccctt cctcccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
 aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgcataatca tttggagcag 7620 30
 gccttagacc ctcccagtg tgtctaggct gagagagtat cctctatgt ggagagggt 7680
 ccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg cccatagat 7740
 tgtccggacc tccaaactga ctccctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
 tccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gttctgtag 7860
 gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcateacttc tccctctctg caactggatt 7920 40
 ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcacc tgettccacc agctactgga 7980
 tgaggctctt aggatggcat ataaggtagt catcagctc attatcagag aagggtttt 8040
 aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggtcctc tgtggtgga tccctttct 8160
 tgetctcacc cgttctccc ctgactagat ctctctctc cctcatgtc tctctcccc 8220
 tccccttctc ccttctctt tcttctaact cctctcccc tccaccacg atccccatta 8280
 gcttatgaga tcttctcctt attttagcaa aaccttttg gtataaaat taattaattt 8340
 aatatgetta tctcaggtt attttgcta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400 10
 accttaattg acatgtatcc ttataattag acacagattt aatatattga agtttttttt 8460
 tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtctctc gctctcatgc cagaagaggg 8520
 caccagatct cattcaaggt gtttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
 gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag ccctgaagt 8640
 gtttctttta aagaggatag cagtgcacca ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700 20
 actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
 ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcacc tcttattttt gtctgttggg ttatataggc 8820
 ttttattttt ctgtttttac agtaagtat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
 gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
 gctatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000 30
 aaaccccagc tctcttgga aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
 caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttctatc tctagcacc 9120
 atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
 aggatcccaa gagctc 9196 40

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg 25

10

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

cttgaccgtt tetatcttct ctgc 24 20

<210> 6

<211> 979

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 6

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgtttag 60 30

acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggectctcc actggacact ggtcaggatga 120

agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctcccatt gtagacagcc tccatcctcg 180

tctecttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240

tggtgatcct gcagtgtggt gggatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300

ttggctggaa agggaaatag aagaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360 40

tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420

ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480

taaaaaaaga gtgtatctgg cactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
 gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
 ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctcccaggc 660
 tgacttcett gtgtgtactt ttcaccca ggtctgtagg gttgcttatg aatcatgca 720
 aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780
 aggccaaaat gccacaacc agattgcagt ttatctcac caacctgaa ctaaagagga 840
 aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900
 taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaac aggctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960
 gaagatagaa acggtcaag 979

10

20

<210> 7
 <211> 979
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 7
 actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgtttag 60
 acctgtaagt gagacatgca cagacagate tggcctctcc actggacact ggtcaggatga 120
 agtgaatgac aaaaatattc aagtggatgga gctcccatt gtagacagcc ttcacctctg 180
 gcctccttac ttaccactgg ctgttcaga agaccttgca gatcgacteg taagagtcca 240
 tggatgactc gcagtgtggt ggggtgccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
 ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360
 tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccacga 420
 agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
 taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

30

40

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
 tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcagc 660
 tgacttecta gtgtgtactt tttcatceca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720
 aacctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780
 aggccaaaat gccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
 aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
 taaagggtgc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat cctcctaca aagtccgaga 960
 gaagatagaa acggtaag 979

10

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt

40

30

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg

40

40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

atattaaggtta ccgaagcatt tgcgggtgcac gatggagggg 40

10

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ctccaattat gaatttatta gtg 23

20

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggatggttga agccaagctt cttgg 25

30

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

40

gtccatggtg atcctgcagt gtgg

24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

10

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gatatcgctg cgctcgttgt cgac

24

<210> 16

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagg

24

40

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gatatcgctg cgctogtcgt cgac 24

<210> 18

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

caggaaggaa ggctggaaga gacg 24

20

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

atgcgggcat ggactggttc ctgg 30

24

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

ctatntttca gcttcaggat atgtggg 27

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

 <400> 21
 gtctgaagca ttatgtgttg aagc 24 10

 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA 20

 <400> 22
 gtgagtacat tcattgtact gtg 23

 <210> 23
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus* 30

 <400> 23
 Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45 40
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65				70						75				80				
Gly	Arg	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Glu	Gln			
				85					90					95				
Ile	Glu	Asn	Tyr	Lys	Lys	Gln	Ala	Arg	Asn	Asp	Leu	Gly	Lys	Asp	His			
			100					105						110				
Glu	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Gly	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp	Phe			10
		115					120						125					
Phe	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu			
	130					135					140							
Leu	Gln	Arg	His	Ala	Asp	Glu	Ile	Leu	Leu	Asp	Leu	Gly	His	His	Glu			
145				150						155					160			
Arg	Ser	Ile	Met	Thr	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Gln	Thr	Asp	Gly	Ala			
				165					170					175				20
Gly	Glu	Trp	Arg	Glu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Gln			
			180					185						190				
Arg	Arg	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Pro	Lys	Asp	Cys	Ser	Lys	Ala	Arg			
		195				200							205					
Lys	Leu	Val	Cys	Asn	Ile	Asn	Lys	Gly	Cys	Gly	Tyr	Gly	Cys	Gln	Leu			
	210					215						220						30
His	His	Val	Val	Tyr	Cys	Phe	Met	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	Arg	Thr			
225					230					235					240			
Leu	Ile	Leu	Glu	Ser	Gln	Asn	Trp	Arg	Tyr	Ala	Thr	Gly	Gly	Trp	Glu			
				245					250					255				
Thr	Val	Phe	Arg	Pro	Val	Ser	Glu	Thr	Cys	Thr	Asp	Arg	Ser	Gly	Leu			
			260					265						270				40
Ser	Thr	Gly	His	Trp	Ser	Gly	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Asn	Val	Gln	Val			
		275					280					285						
Val	Glu	Leu	Pro	Ile	Val	Asp	Ser	Leu	His	Pro	Arg	Pro	Pro	Tyr	Leu			
	290					295					300							

Pro	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Arg	Leu	Leu	Arg	Val	His				
305					310					315					320				
Gly	Asp	Pro	Ala	Val	Trp	Trp	Val	Ser	Gln	Phe	Val	Lys	Tyr	Leu	Ile				
				325					330					335					
Arg	Pro	Gln	Pro	Trp	Leu	Glu	Arg	Glu	Ile	Glu	Glu	Thr	Thr	Lys	Lys				
			340					345						350					
Leu	Gly	Phe	Lys	His	Pro	Val	Ile	Gly	Val	His	Val	Arg	Arg	Thr	Asp				10
		355					360					365							
Lys	Val	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Phe	His	Pro	Ile	Glu	Glu	Tyr	Met	Val				
	370						375					380							
His	Val	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	Leu	Glu	Arg	Arg	Met	Lys	Val	Asp				
385					390					395					400				
Lys	Lys	Arg	Val	Tyr	Leu	Ala	Thr	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Leu	Lys	Glu				20
				405					410						415				
Ala	Lys	Thr	Lys	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Glu	Phe	Ile	Ser	Asp	Asn	Ser	Ile				
			420					425						430					
Ser	Trp	Ser	Ala	Gly	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Glu	Asn	Ser	Leu	Arg				
		435					440						445						
Gly	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Ala	Asp	Phe	Leu	Val				30
	450					455					460								
Cys	Thr	Phe	Ser	Ser	Gln	Val	Cys	Arg	Val	Ala	Tyr	Glu	Ile	Met	Gln				
465					470					475				480					
Thr	Leu	His	Pro	Asp	Ala	Ser	Ala	Asn	Phe	His	Ser	Leu	Asp	Asp	Ile				
				485					490					495					
Tyr	Tyr	Phe	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala	His	Asn	Gln	Ile	Ala	Val	Tyr	Pro				40
			500					505						510					
His	Gln	Pro	Arg	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Pro	Met	Glu	Pro	Gly	Asp	Ile				
		515					520						525						

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

10

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

20

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

30

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

40

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

10

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

20

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

30

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

40

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys

1

5

10

15

Pro Cys

10

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

20

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

30

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

10

<400> 29

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

40

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

aggaaggtgg cgctcatcac gggc 24

<210> 33

<211> 26

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

taaggccaca agtettaatt gcatcc 26

20

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

caggggtggt cccttgagga ggtggaa 30

27

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

40

<400> 35

cccctcagc atgaagcctg gag 23

<210> 36
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

 <400> 36
 ggcaggagac caccttgoga gtgcccac 28 10

 <210> 37
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA 20

 <400> 37
 ggcgctggct taccggaga ggaatggg 28

 <210> 38
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

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

 <400> 38
 aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg 28

 <210> 39 40
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

cgcgatcct caagcgttgg ggttggtcc

29

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

cccaagcttg ccaccatggc tcacgtccc gctagctgcc cgagc

45

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

ccggaattct gcccaagtatg agccatcctg g

31

30

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gccatccaga aggtggt

17

40

<210> 43

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

 <400> 43
 gtcttgtcag ggaagat 17 10

 <210> 44
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA 20

 <400> 44
 ggcaggagac caccttgca gtgccac 28

 <210> 45
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

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

 <400> 45
 ggggtgggctg taccttctgg aacagggc 28

 <210> 46
 <211> 28
 <212> DNA 40
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 46
 ggcgctggct tacccggaga ggaatggg 28

<210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

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

<400> 47
 ggaatgggtg tttgtctctc caaatgac 28

<210> 48
 <211> 1316
 <212> DNA 20
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 48
 gcccccccc ctccactgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
 tggactgggt gaacctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
 gatcctagt acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtegcaga 180
 tggcgctggc ttacceggag agaatgggt gtttgtctec tccaaagatg cagatctgac 240
 ggatgcagca caaaccaag cctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
 tgetgcaat gtaggagcc ttttcggaa tatcaatac aacttggatt tctggaggaa 360
 gaatgtgca atcaatgaca acgtctgca ctacagcttc gaggtgggca ctcgcaaggt 420
 ggtctctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
 aatgatccac aatggccac cccacagcag caatthtggg tactcgtatg ccaagaggat 540
 gattgacgt cagaacagg cctacttcca gcagcatggc tgcacettca ctgctgtcat 600
 cctaccaat gtctttggac ctcatgaaa ctccaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660

30

40

tggcctcatic cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
 tacagggaaa ccacggagge agttcateta ctcaactggac ctagccccgc tcttcatctg 780
 ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
 agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
 cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
 tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
 tgccctggttc accgacaact atgagcagge ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
 tcagctggca atgccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgtc aagaactgag 1140
 gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
 atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaagge cagaccaaca cttgtttgt 1260
 etgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggctctg ctgtccctg tctaga 1316

10

20

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

gatcctgctg ggacccaaaat tgg

23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg

22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 51

acggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60

tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180

agctgaagag aaaggaattg ccccttgag ttaactacca tgttttact gatcctcctg 240

gaacccaaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300

atggagacia gtggaattcc ttcacagtc tgtaattca ctctggtggc tacagtcaac 360

gacttcccaa tgcaagcgt ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420

tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcatagaagc 480

ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540

ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600

gcaccacaca tggagtattt gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660

agtacaggca atgccaccgt ttcttcata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720

atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780

gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840

cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900

cctatggatga cttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960

10

20

30

40

cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020
 tctcaaggg aacacccctg aatgttggtg tccttaataa ctccaggttt tatcacattg 1080
 gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttogttacag gcagagctgg 1140
 gcttgcaate catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
 cctgtgtcat tcacagcate ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260 10
 aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcggaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
 tcatagaaaa agctgttctg ccccatggt ctttcgtgtg ctctttaagt gtggagataa 1380
 atggacactt agaatattca actatgggtg ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
 ttaaaacat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttgtt 1500
 tagatatttg gaaecttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560 20
 gcctgtggac tgctegaatt ttccctgtct gttcttctct gagtgagtcg gttgcagcat 1620
 cccttgggat gttaaatgcc attcgaacc attcgcatt cagcctgagc aacttcaagc 1680
 tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gttacaggg 1740
 agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgatteggag aaatcttaaa 1800
 tacaatggat tttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860 30
 gttcttcttt ctttctcccc tctctccttt cctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
 aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

10

20

30

40

<400> 52		
caggggtgtt cccttgagga ggtggaa	27	
<210> 53		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 53		
cactgagcca ggggccacac agcatcc	27	
<210> 54		
<211> 23		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 54		
cccctcaagc atgaagcctg gag	23	
<210> 55		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 55		
tgccaccgtt tectccataa gccccagc	27	40
<210> 56		
<211> 28		
<212> DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga 28

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

tcaagcgttt gggttggtcc tcatgag 27 20

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA 30

<400> 58

tccggggatg gcgagatggg caage 25

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

cttgacatgg ctctgggctc caag 24

<210> 60
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 60
 ccacttcagt cggtcggtag tattt 25 10

<210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA 20

<400> 61
 cgctcacccg cctgaggcga catg 24

<210> 62
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

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

<400> 62
 ggcaggtgct gtcggtgagg tcacccatagt gc 32

<210> 63
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

ggggccatgc caaggactat gtcg 24

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

atgtggctga tgttacaaaa tgatg 25

20

<210> 65

<211> 1504

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

30

<400> 65

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48
 Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96
 Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144
 Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

40

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192
 Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg

50	55	60		
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg			240	
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met				
65	70	75	80	
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc			288	
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile				
85	90	95	100	10
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc			336	
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser				
105	110	115		
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat			384	
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp				
120	125	130		
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt			432	20
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu				
135	140	145		
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga			480	
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly				
150	155	160		
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg			528	
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg				30
165	170	175	180	
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac			576	
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn				
185	190	195		
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat			624	
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn				
200	205	210		40
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc			672	
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser				
215	220	225		
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg			720	

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu		
230	235	240
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768	
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val		
245	250	255 260
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816	
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val		10
265	270	275
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864	
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser		
280	285	290
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912	
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn		
295	300	305
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat	960	
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp		
310	315	320
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc	1008	
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys		
325	330	335 340
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac	1056	30
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp		
345	350	355
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc	1104	
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr		
360	365	370
aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaatc gcgagacatg gactatggtg	1159	
Asn Pro Asn Ala		40
375		
cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagacat cgaccataaa cctcgcactg	1219	
cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac	1279	
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat	1339	
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat	1399	

ttttgagtct tgagattggt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
 aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

10

<400> 66

atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67

<211> 59

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

20

<400> 67

cgcacagcac ctgectagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

accttgata gaaaggggtg gtctc

25

<210> 70

<211> 125

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

10

<400> 70

ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
 ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120
 agaaa 125

<210> 71

<211> 376

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

20

<400> 71

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80

40

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95 100

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 105 110 115

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 120 125 130

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 135 140 145

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175 180

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 185 190 195

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 200 205 210

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 215 220 225

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255 260

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 265 270 275

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 280 285 290

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 295 300 305

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335 340

10

20

30

40

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

Asn Pro Asn Ala
 375

10

<210> 72

<211> 321

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 72

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

20

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60

30

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

40

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

10

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

20

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

30

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 73

<211> 590

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

40

<400> 73

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser

1		5							10					15					
Glu	Met	Arg	Gly	Lys	Pro	Val	Ala	Thr	Gly	Lys	Phe	Trp	Asp	Val	Val				
			20						25				30						
Val	Ile	Thr	Ala	Ala	Asp	Glu	Lys	Gln	Glu	Leu	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gln				
		35					40					45							
Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Pro	Leu	Gly	Val	Asn	Tyr				10
		50				55						60							
His	Val	Phe	Thr	Asp	Pro	Pro	Gly	Thr	Lys	Ile	Gly	Asn	Gly	Gly	Ser				
		65				70					75				80				
Thr	Leu	Cys	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Asp	Lys	Trp				
				85						90				95					
Asn	Ser	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Ile	His	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ser	Gln	Arg				20
			100					105						110					
Leu	Pro	Asn	Ala	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys	Ile	Phe	Thr	Ala	Leu	Pro	Leu				
		115					120					125							
Gly	Glu	Pro	Ile	Tyr	Gln	Met	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Ala	Met	Tyr	Met				
		130				135					140								
Asp	Phe	Pro	Ser	Arg	Met	Lys	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Cys	Ala	Asp				30
				150						155					160				
Asp	Ile	Glu	Leu	Tyr	Ser	Ile	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Ile	Ala	Phe	Glu				
				165					170					175					
Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Ala	His	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Gly				
			180					185					190						
Thr	Thr	His	Gly	Val	Phe	Val	Leu	Asp	Ser	Ala	Gly	Ser	Leu	Gln	His				40
		195					200						205						
Gly	Asp	Leu	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys	His	Arg	Phe	Leu	His	Lys	Pro	Ser				
		210				215					220								
Ile	Glu	Asn	Met	His	His	Phe	Asn	Ala	Val	His	Arg	Leu	Gly	Ser	Phe				
				230						235					240				

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
 245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
 260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
 275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
 290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
 305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
 325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
 340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
 370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
 385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val
 420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
 435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
 450 455 460

10

20

30

40

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
 465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
 485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
 500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
 515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
 530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
 545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
 565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
 580 585 590

10

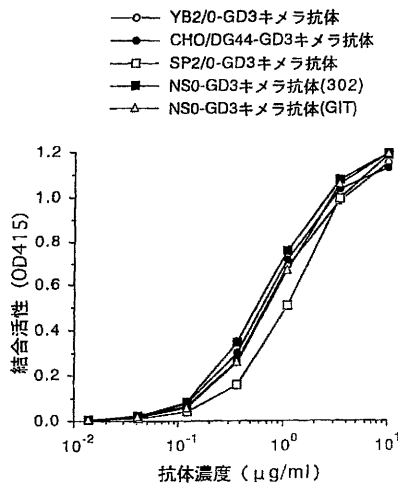
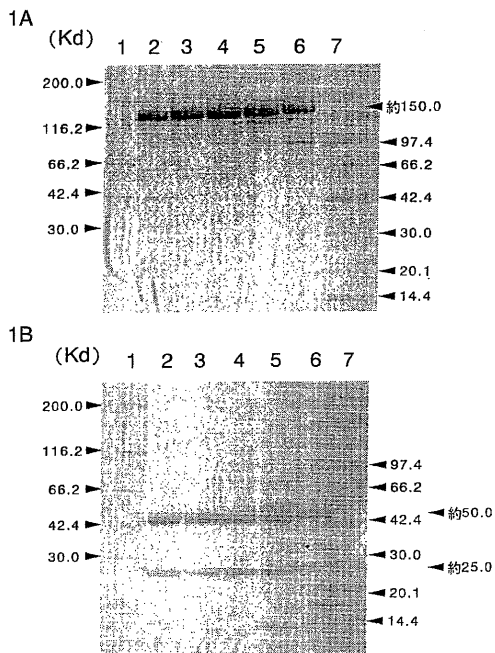
20

【 図 1 】

【 図 2 】

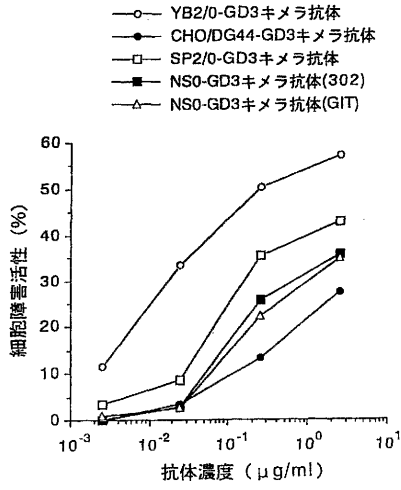
第 1 図

第 2 図



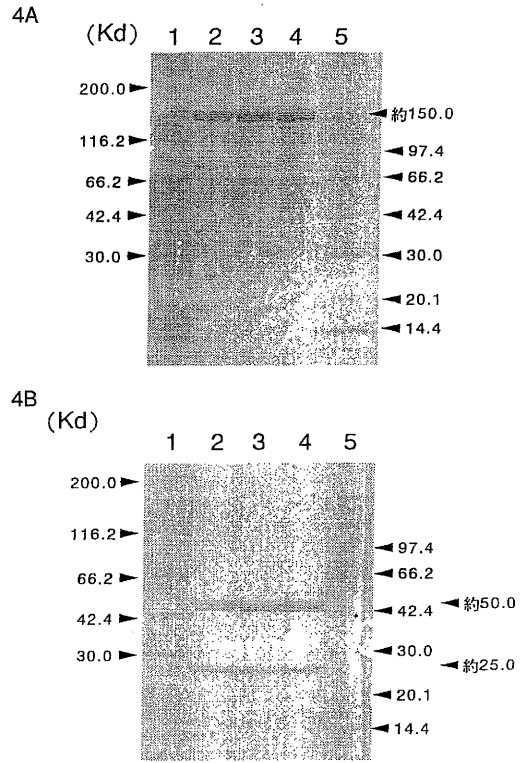
【 図 3 】

第 3 図



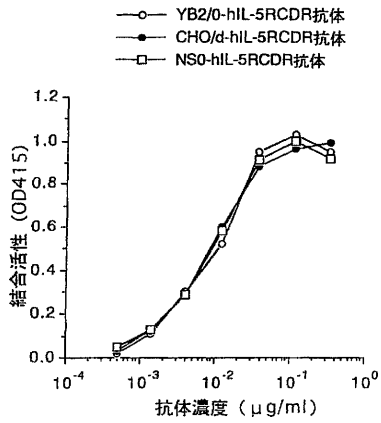
【 図 4 】

第 4 図



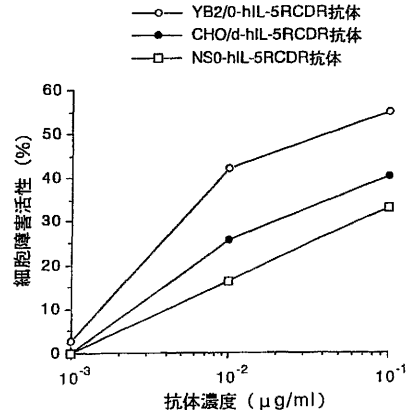
【 図 5 】

第 5 図

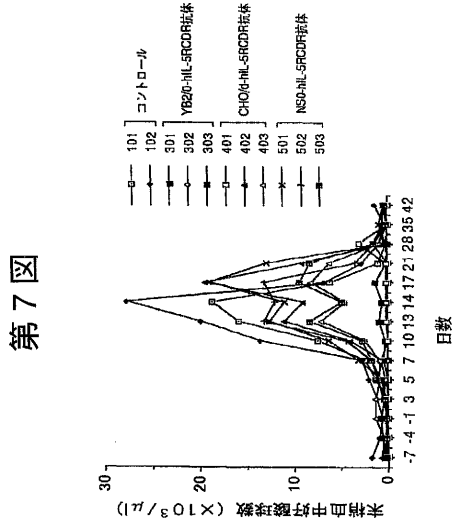


【 図 6 】

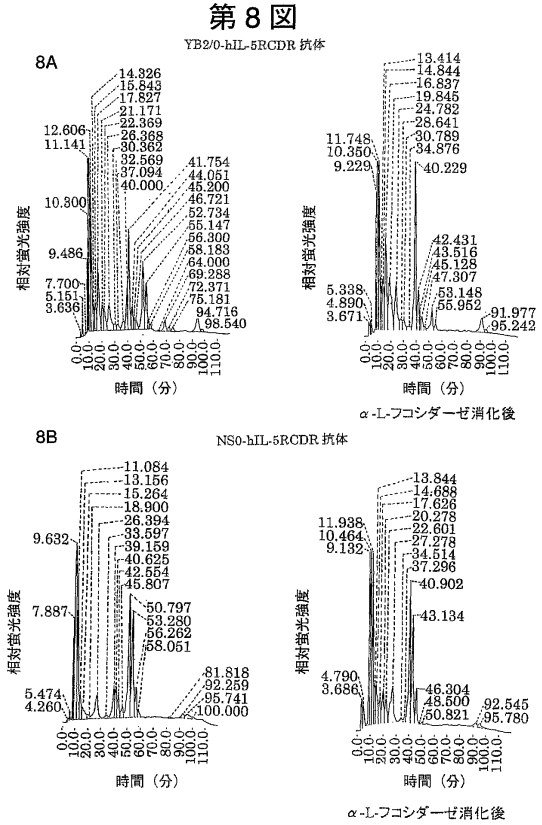
第 6 図



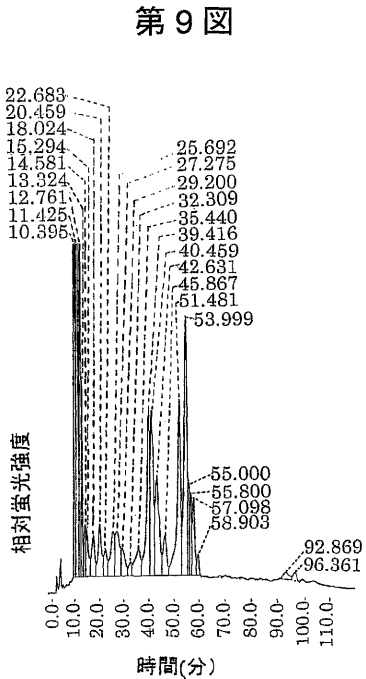
【 図 7 】



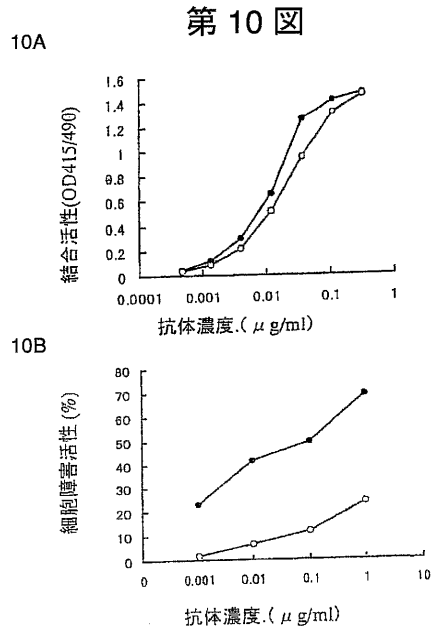
【 図 8 】



【 図 9 】

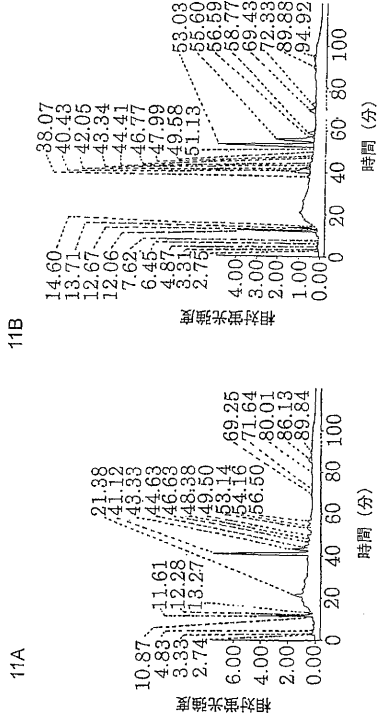


【 図 10 】



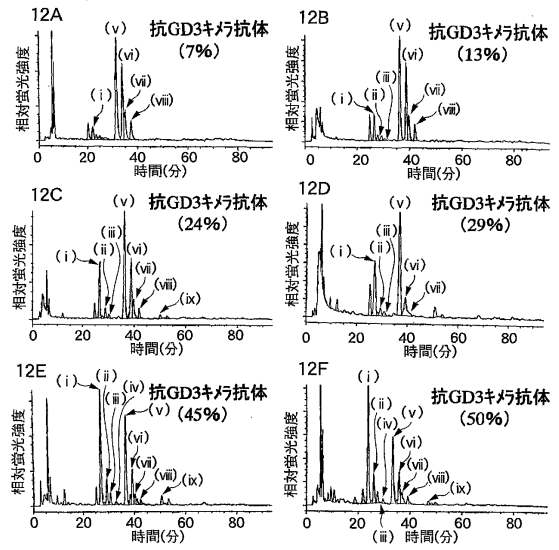
【図11】

第11図



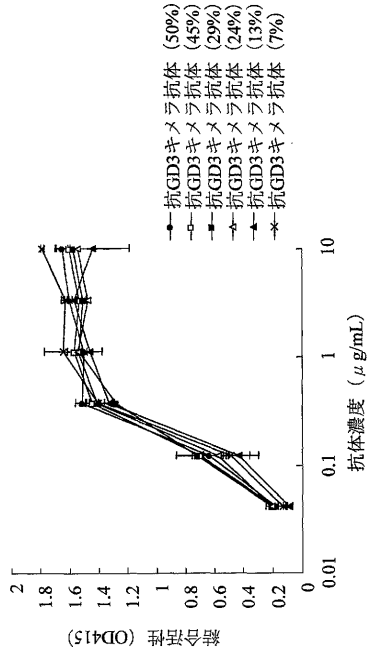
【図12】

第12図



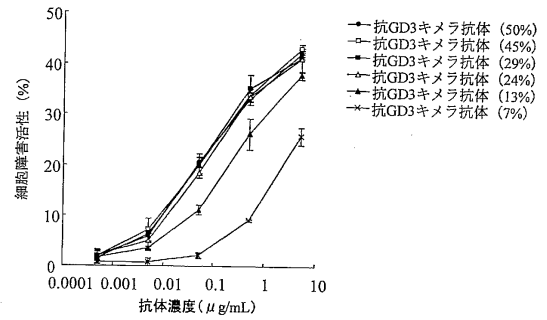
【図13】

第13図



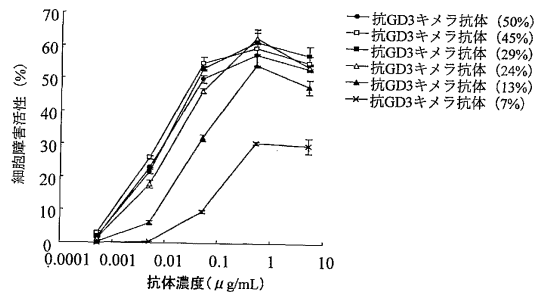
【図14】

第14図



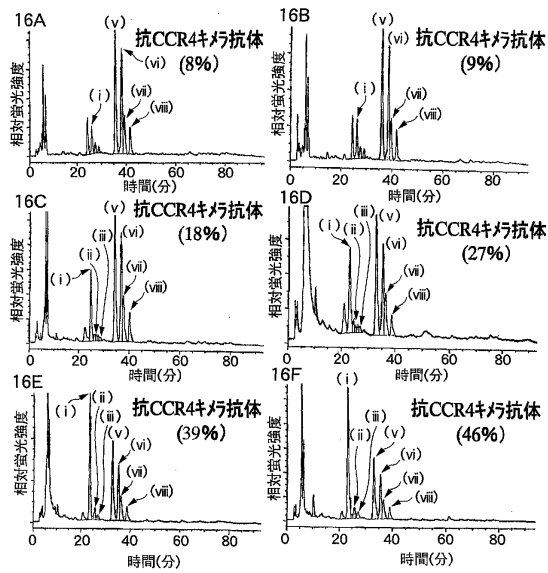
【図15】

第15図



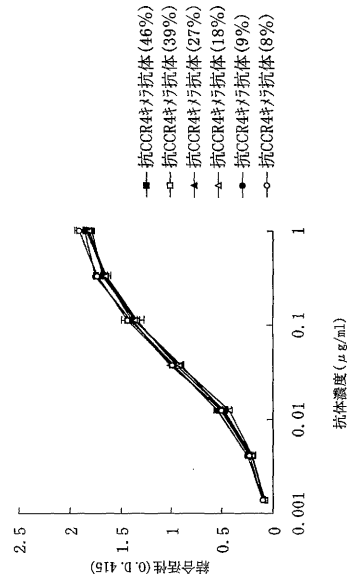
【 図 1 6 】

第16図



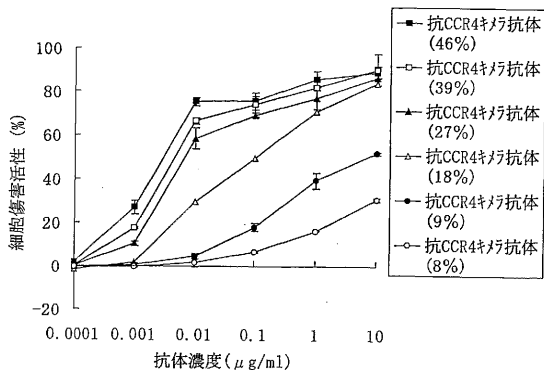
【 図 1 7 】

第17図



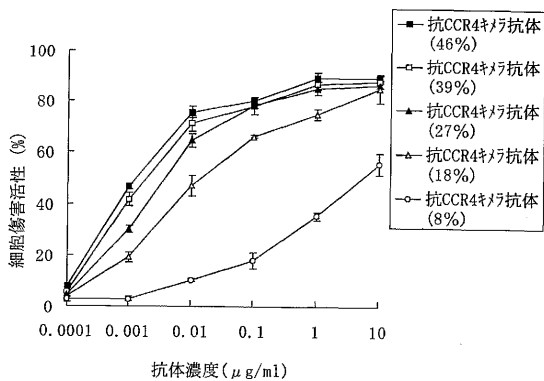
【 図 1 8 】

第18図



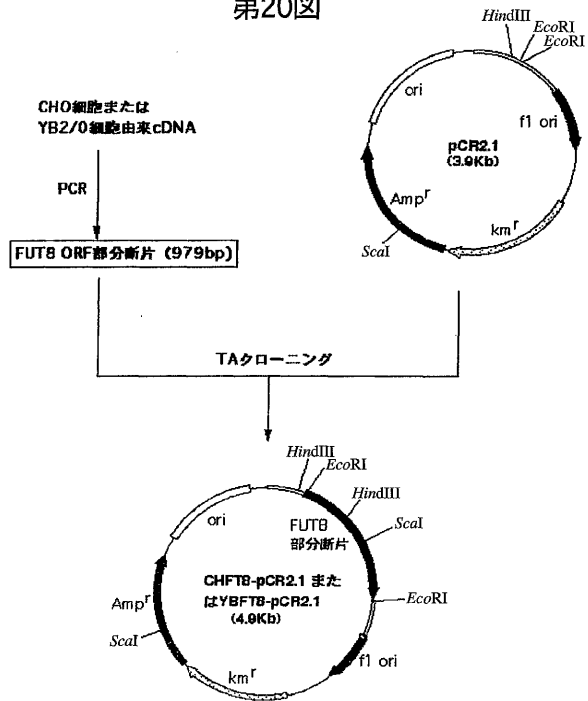
【 図 1 9 】

第19図

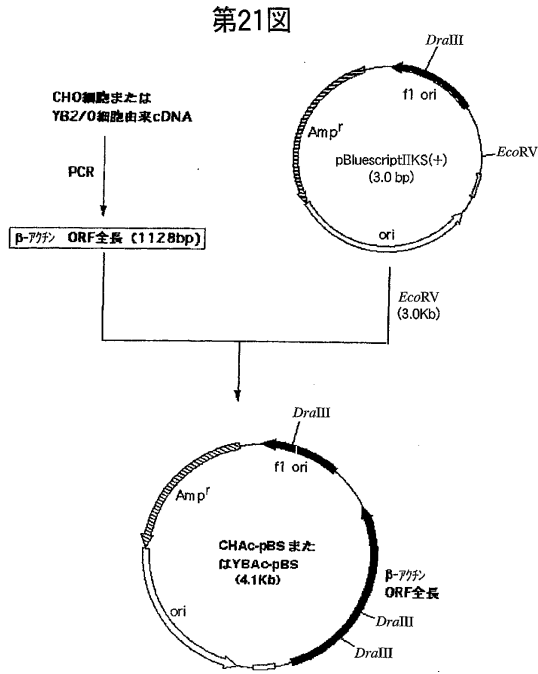


【 図 2 0 】

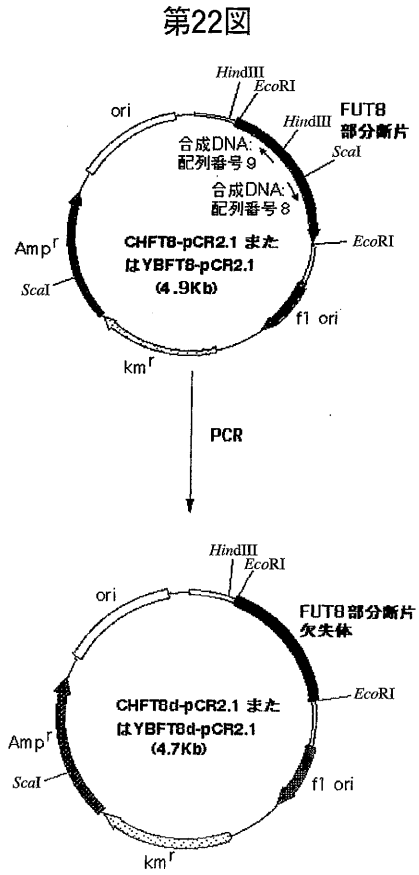
第20図



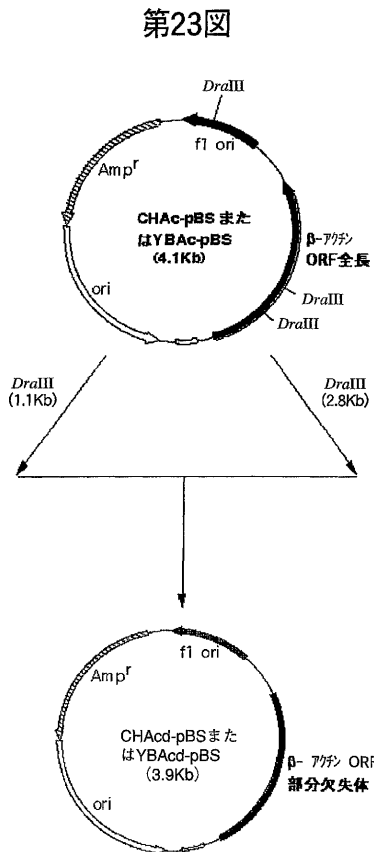
【 図 2 1 】



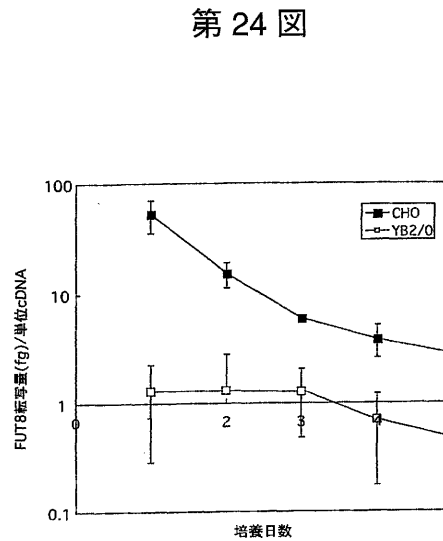
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

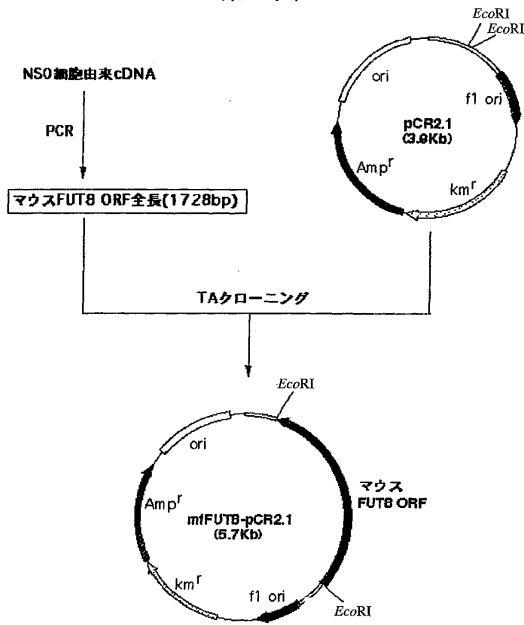


【 図 2 4 】



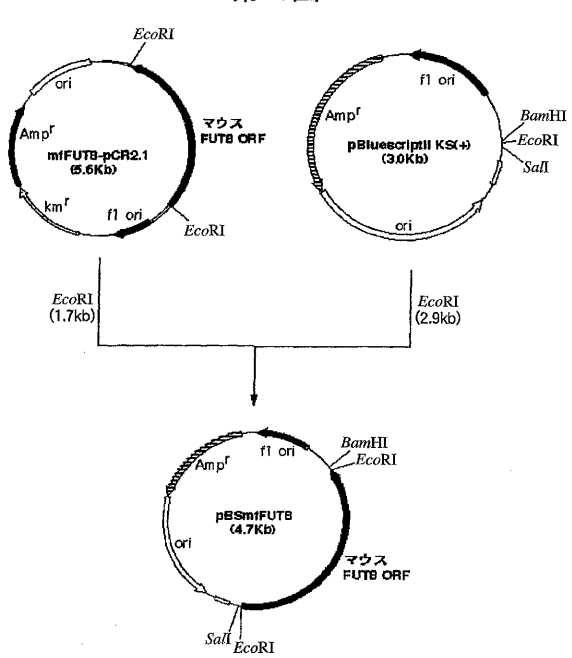
【図25】

第25図



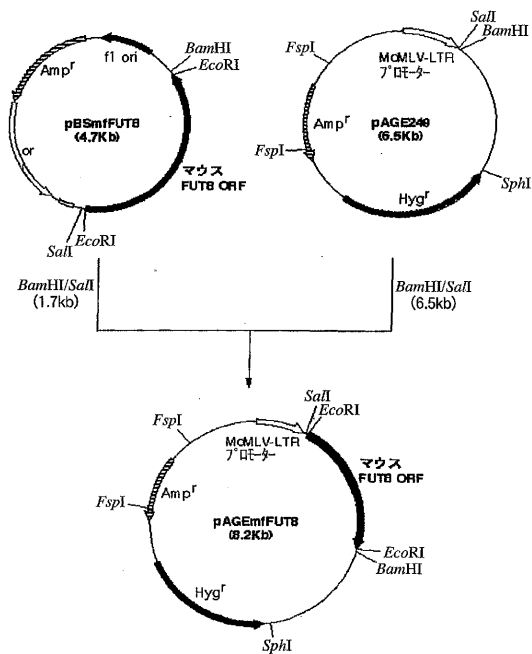
【図26】

第26図



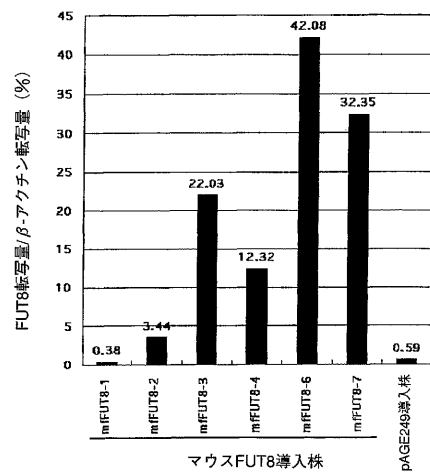
【図27】

第27図



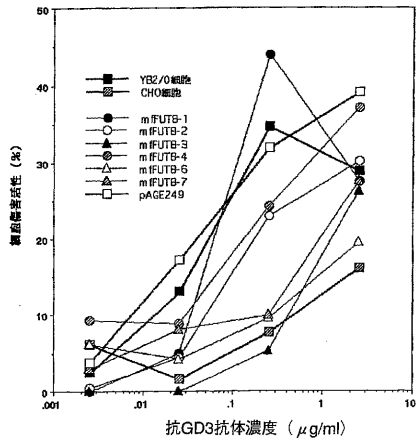
【図28】

第28図



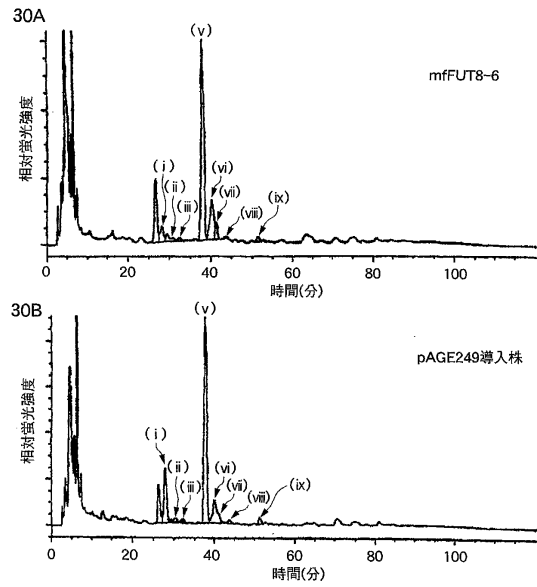
【図29】

第29図



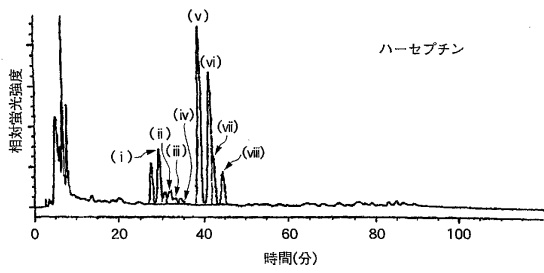
【図30】

第30図



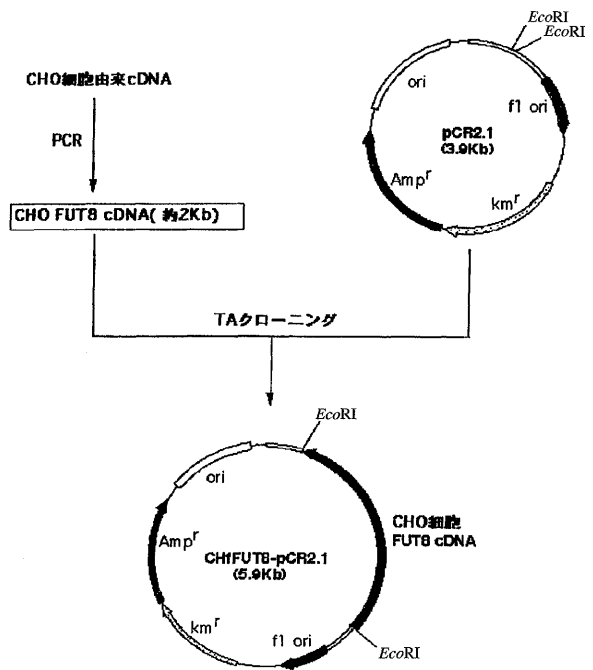
【図31】

第31図

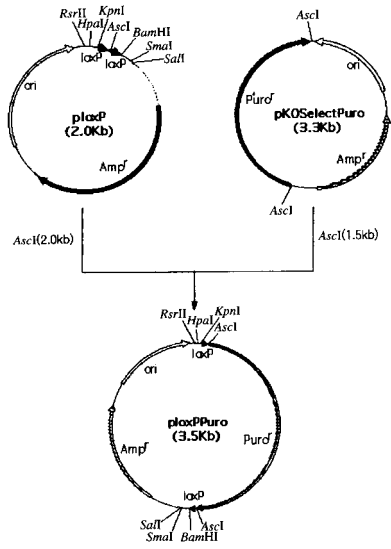


【図32】

第32図

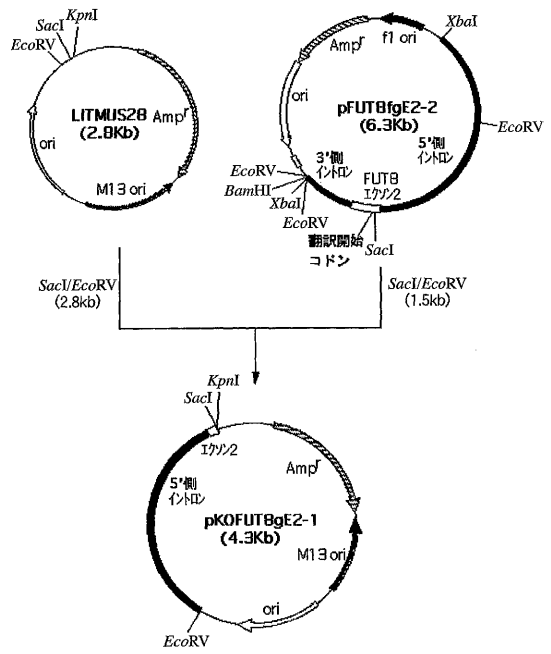


【 図 3 3 】



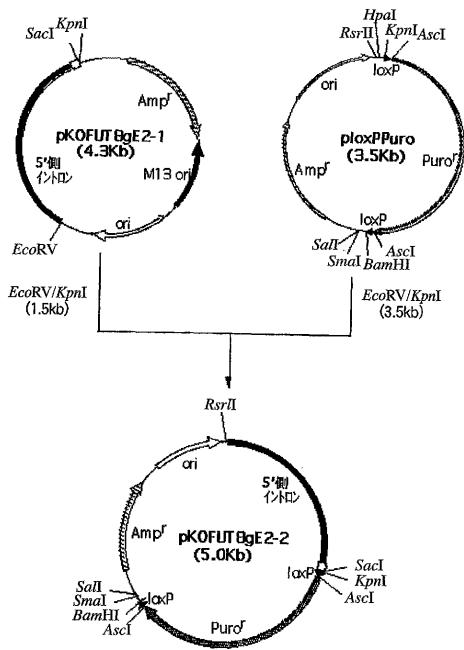
【 図 3 4 】

第34図



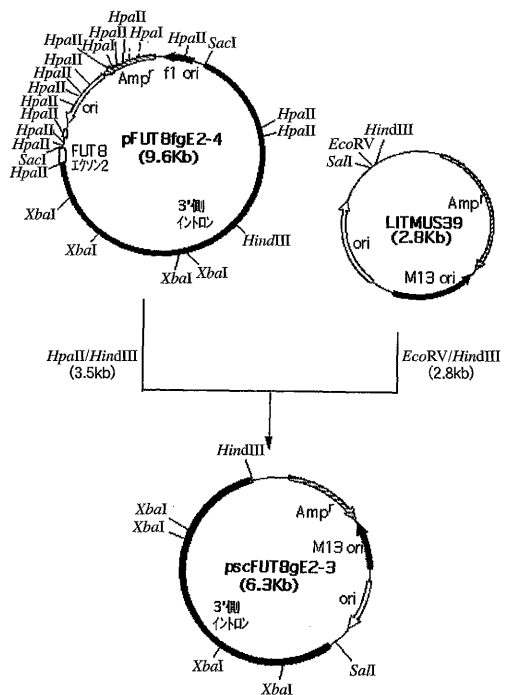
【 図 3 5 】

第35図



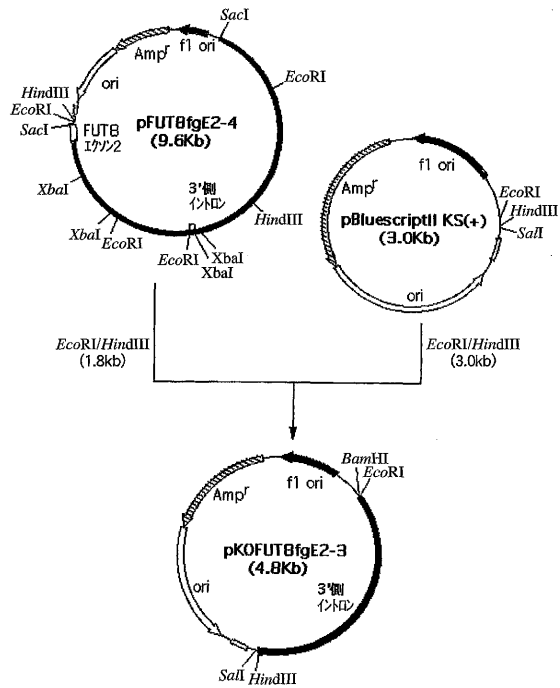
【 図 3 6 】

第36図

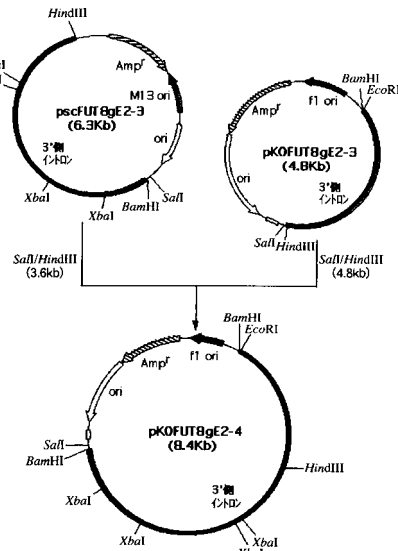


【 図 3 7 】

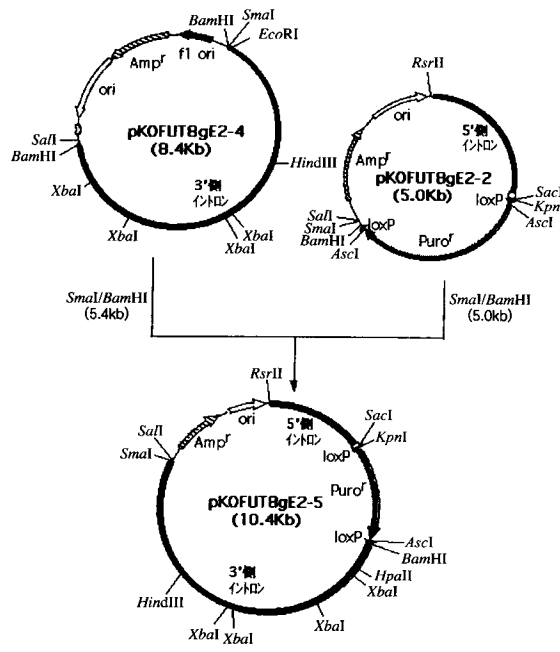
第37図



【 図 3 8 】

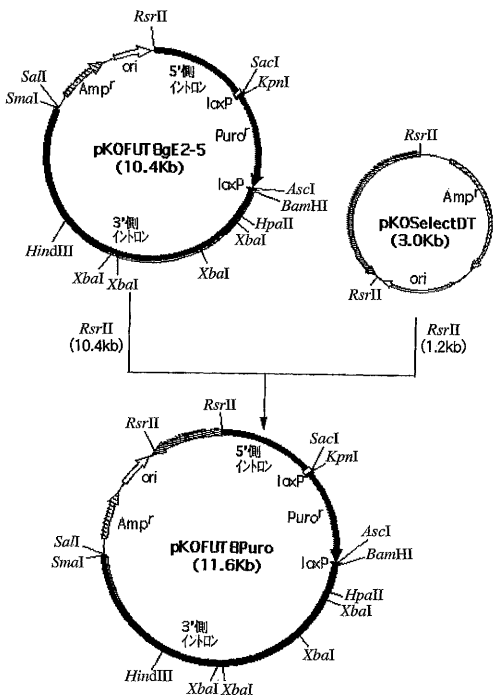


【 図 3 9 】



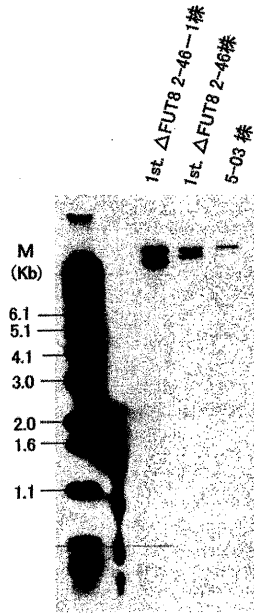
【 図 4 0 】

第40図



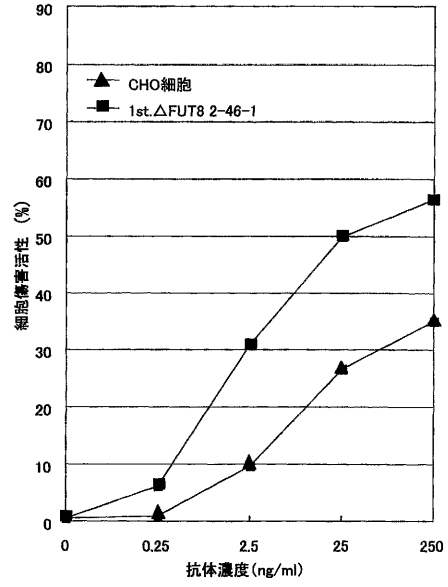
【図41】

第41図



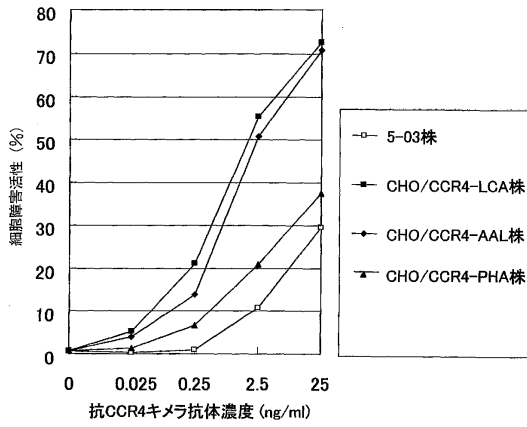
【図42】

第42図



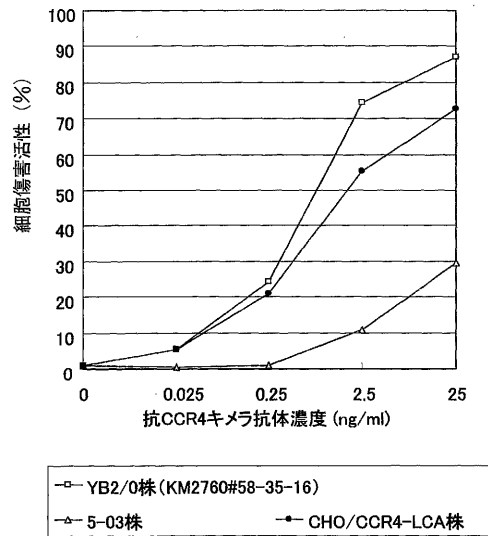
【図43】

第43図

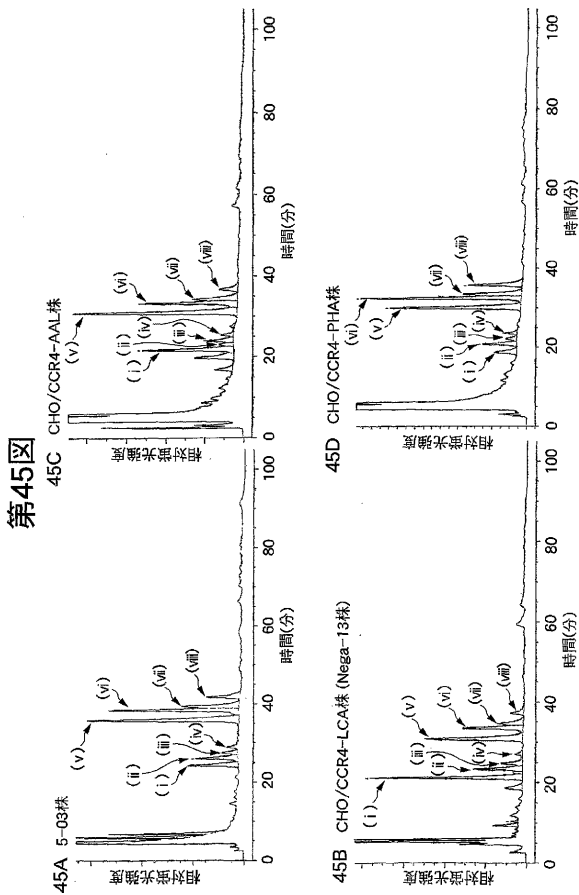


【図44】

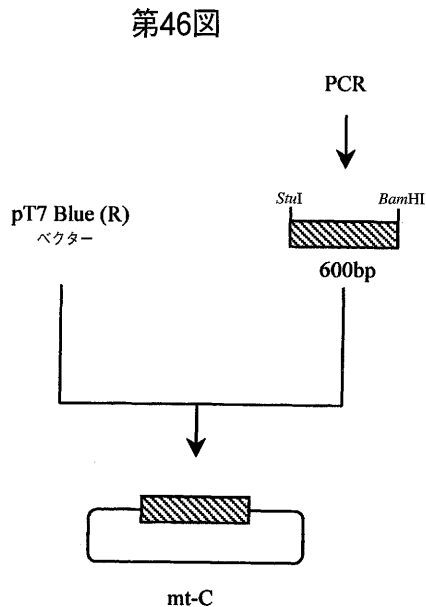
第44図



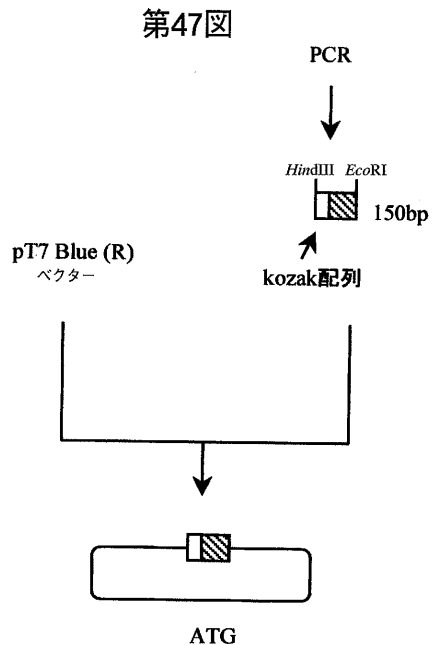
【 図 4 5 】



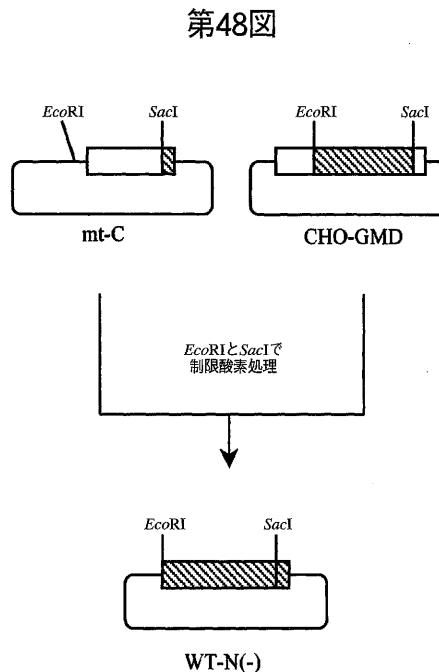
【 図 4 6 】



【 図 4 7 】

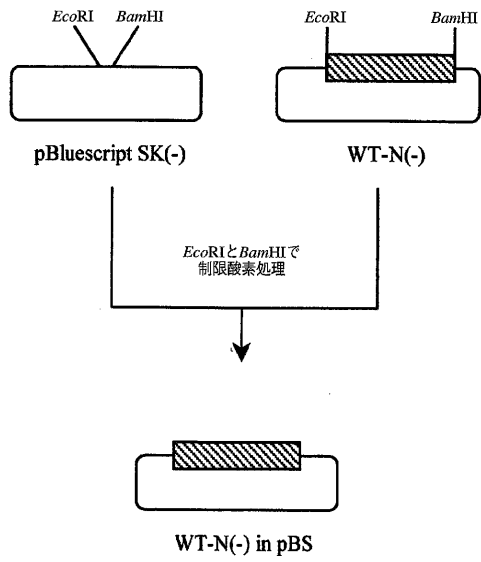


【 図 4 8 】



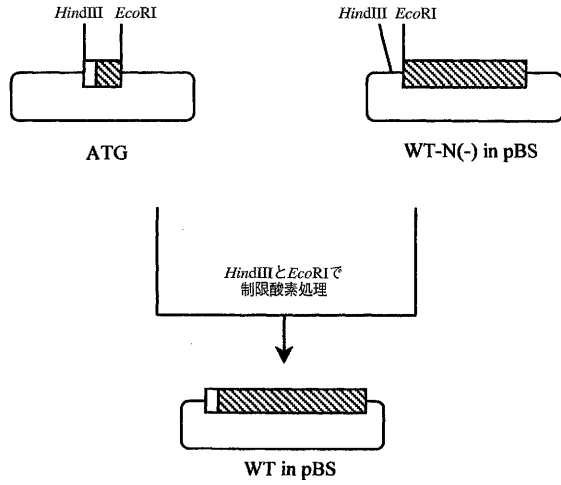
【 図 4 9 】

第49図



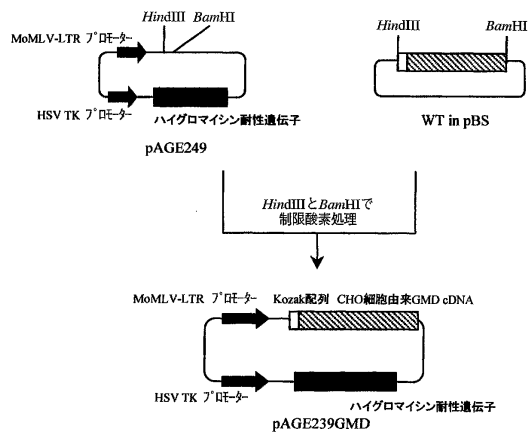
【 図 5 0 】

第50図



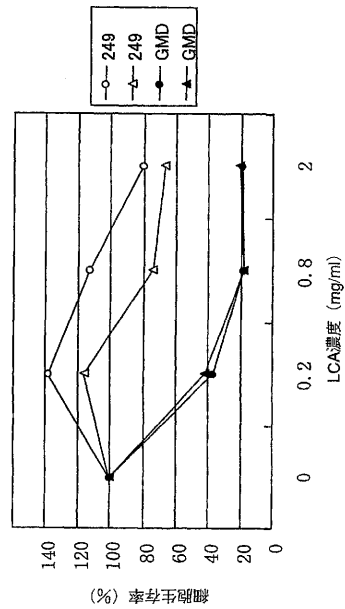
【 図 5 1 】

第51図



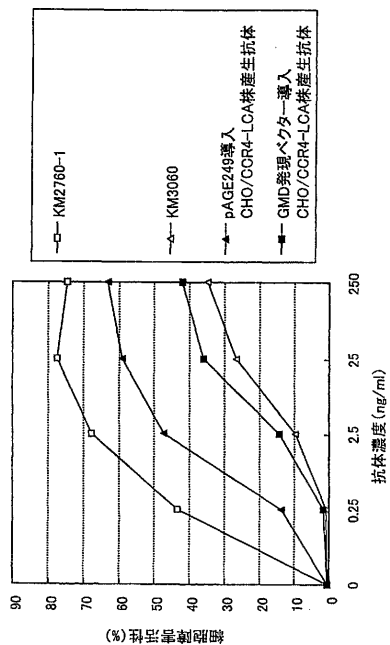
【 図 5 2 】

第 52 図



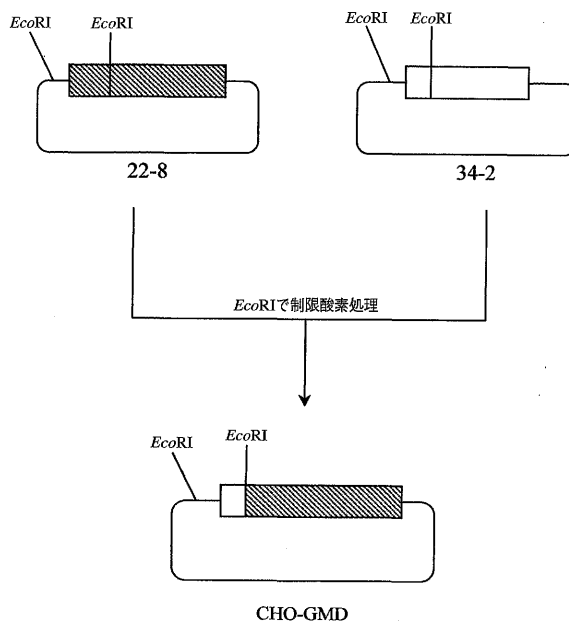
【 図 5 3 】

第 53 図



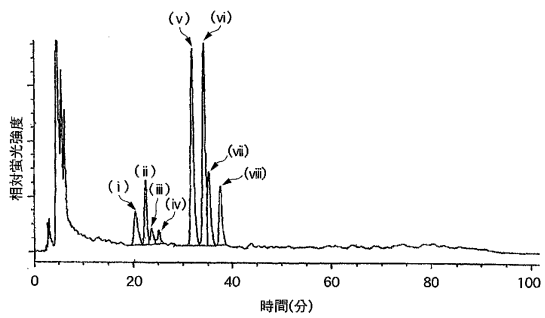
【 図 5 4 】

第54図



【 図 5 5 】

第55図



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	R
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	V
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	9/88	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	9/90	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
			C 1 2 N	9/02	
			C 1 2 N	9/10	
			C 1 2 N	9/12	
			C 1 2 N	9/88	
			C 1 2 N	9/90	

- (72)発明者 中村 和靖
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 内田 和久
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 新川 豊英
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 山根 尚子
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 保坂 絵美
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 山野 和也
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 山 崎 基生
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 花井 陳雄
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

審査官 深草 亜子

- (56)参考文献 国際公開第00/061739(WO, A1)
J.Immunol.Methods, 1994年, Vol.167, p.271-278
Arch.Biochem.Biophys., 1986年, Vol.249, p.533-545
Glycobiology, 2000年 5月, Vol.10, p.477-486
Nat.Biotechnol., 1999年, Vol.17, p.176-180
Glycobiology, 1995年, Vol.5, p.813-822

J.Biol.Chem. , 1998年, Vol.273, p.14582-14587

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 5/10-5/28

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)