

申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人 (共5人)	姓 名 (中文)	5. 土屋政幸
	姓 名 (英文)	5. TSUCHIYA, MASAYUKI
	國 籍 (中英文)	5. 日本 JP
三、 申請人 (共2人)	名稱或 姓 名 (中文)	
	名稱或 姓 名 (英文)	
	國 籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中 文)	
	住居所 (營業所) (英 文)	
	代表人 (中文)	
	代表人 (英文)	



一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十七條第一項國際優先權
美國 US	2003/07/15	60/487,333	有

二、☐主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：四、☐有關生物材料已寄存於國外：

寄存國家：

無

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

☐有關生物材料已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

無

寄存號碼：

☐不須寄存生物材料者：所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、發明說明 (1)

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於利用基因操作技術以製造IgM。

【先前技術】

許多高等動物之免疫球蛋白存在有5種不同的類型，IgG、IgA、IgM、IgD及IgE。各類型之免疫球蛋白其大小、電荷、胺基酸組成、糖含量等性狀為相異。該等類型中IgM約佔血漿免疫球蛋白全體之10%。IgM為對抗具複雜抗原性之細胞膜抗原、感染性微生物或溶解性抗原所產生之初期抗體之主成份。

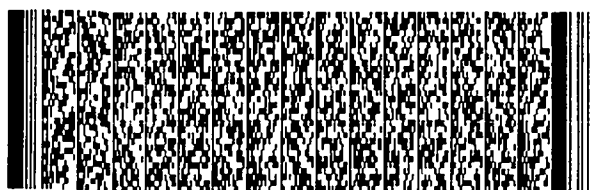
人類IgM於活體內通常係具有五元體的構造。構成IgM的五元體構造之5個次單元係由類似於IgG之4條鏈構造所構成。為IgM之H鏈的 μ 鏈與為IgG之H鏈的 γ 鏈除胺基酸序列不同之外，尚有如下的不同點：

μ 鏈之固定區結構域(domain)較 γ 鏈多1個。

μ 鏈之寡糖鏈數較 γ 鏈多4個。

IgM具有IgG中所未見之稱為J鏈之多肽鏈。J鏈被認為是用於在IgM從抗體產生細胞被分泌時，輔助 μ 鏈之會合。

近年來，由於單株抗體技術及重組DNA技術之進步，可大量生產純的免疫球蛋白。且，基因重組技術可生產嵌合(chimera)抗體或人類化抗體。嵌合抗體係具有將可變區不同之種其可變區加以重組構造之抗體。例如，已知者有具有人類以外動物種之可變區與人類抗體之固定區的

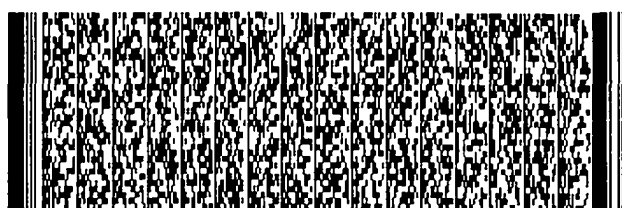
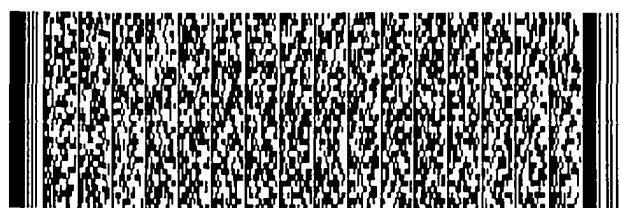


五、發明說明 (2)

「嵌合抗體」(文獻1/Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1984)81:6851)。再者，周知者尚有將其他動物種之互補性決定區(complementary determining regions;CDR)移植於人類免疫球蛋白之人類化抗體(文獻2/Nature (1986)321:521)。

實際上，若列舉相關抗腫瘤抗體，已有為抗CD20人類嵌合抗體之利土奇尚(RituxanR:IDEC公司)或為抗HER2/neu人類化抗體之何西普丁(HerceptinR:Genetech公司)其臨床試驗已終了且已獲許可並販售。已知IgG及IgM之作用性(effector)機能有抗體依存性細胞阻害活性(以下稱為ADDC活性)或補體依存性細胞阻害活性(以下稱為CDC活性)。因IgM之CDC活性較IgG為高，故被認為將IgM作為以CDC活性為主藥效之抗腫瘤抗體的可能性極高。但如上所述，IgM不同於IgG，其會形成多元體。因此，欲以工業規模生產重組IgM被認為是困難的。

關於IgM重組體，已有數份使用非淋巴球細胞之生產系的報告。於C6神經膠質瘤細胞、CHO細胞或Hela細胞內導入IgMH鏈、L鏈之基因，已確認會形成多元體，但也確認CHO細胞之生產量非常低(文獻3/EMBO J.(1987)9:2753)(專利文獻1/W089/01975)。又，於CHO細胞中，藉由將IgM之H鏈、L鏈分別嵌入表現載體，並進行共表現，可取得IgM產生株(文獻4/J. Immunol.(1990)145:3011)(文獻5/Human Antibodies(1997)8:137)。該等報告中雖然CHO細胞所產生之重組IgM形成了多元體，但關於五元體及六



五、發明說明 (3)

元體之存在比例等並不明確。

IgM重組體之多元體構造無法確認的最大理由為解析技術沒有確立。亦即，周知之免疫球蛋白解析方法無法正確分析具有多元體構造之IgM。例如，蛋白質分離及鑑定技術已知有如SDS-PAGE之膠體電泳。但IgM為分子量約100萬之巨大分子，故以一般方法對多元體構造(五元體及六元體)進行定量性解析是困難的。

已報告之IgM多元體構造分析法係使用以RI標記之IgM進行非還原SDS-PAGE(文獻6/J. Immunol. (1994)152:1206)。為開發IgM為醫藥品，於製程中必須有可分析IgM多元體構造之技術。具體而言，於選定製造細胞、細胞培養之監測、純化、原體製造、製劑製造等各製程中必須分析IgM之多元體構造。但使用RI之方法對該等所有製程進行評價是不實際的。

[文獻1]Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
(1984)81:6851

[文獻2]Nature (1986)321:521

[文獻3]EMBO J. (1987)9:2753

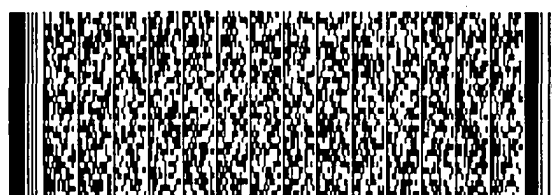
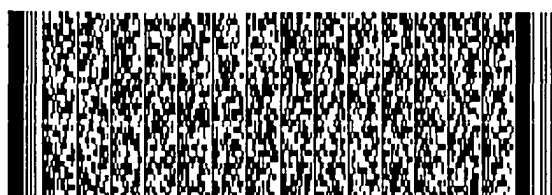
[文獻4]J. Immunol. (1990)145:3011

[文獻5]Human Antibodies(1997) 8:137

[文獻6]J. Immunol. (1994)152:1206

[專利文獻1]W089/01975

【發明內容】



五、發明說明 (4)

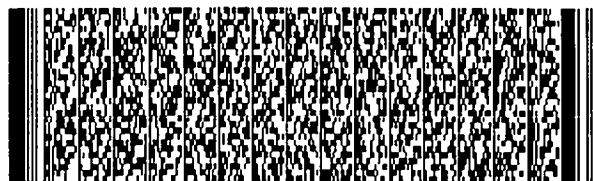
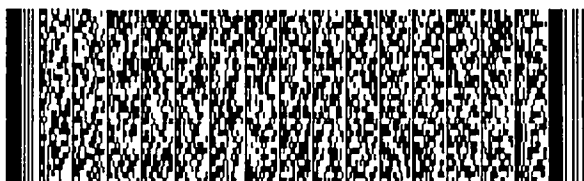
(發明之揭示)

本發明之課題為提供具高IgM產生能力之細胞。又，本發明之課題為提供具五元體或六元體構造之IgM的技術。又，本發明之課題為提供解析IgM多元體構造或聯合體之技術。

到目前為止之IgM研究多數係使用骨髓瘤、融合瘤、B淋巴腫瘤細胞株等淋巴球細胞進行。藉由將J鏈基因導入B細胞各分化過程之細胞株，已確認不表現J鏈之細胞所分泌之IgM會形成六元體，表現J鏈之細胞所分泌之IgM會形成五元體(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1995)92:2884)。又，分別由B淋巴腫瘤細胞株及融合瘤所分泌之IgM之五元體、六元體成份，顯示六元體成份較六元體成份之CDC活性為高(Eur. J. Immunol., (1990)20:1971)(J. Immunol. (1998)160:5979)。CDC活性被認為與IgM之構形有重要關係。但是，要大量取得淋巴球細胞所分泌IgM之五元體或六元體成份是困難的。

為大量得到取得困難之蛋白質，常用手法為基因重組技術。但關於IgM，尚未發現可於重組體中構建多元體構造之技術。故本發明人等專心研究，目的為提供可多量供給IgM之細胞，以及確立可產生具多元體構造之IgM之技術。

結果，本發明人等發現藉由將編碼為H、L及J鏈之基因配置於適當載體上，並對寄主細胞進行轉形，可取得



五、發明說明 (5)

IgM五元體。又，本發明人等解明了當轉形細胞未伴隨表現J鏈時，IgM主要會形成六元體。又，進一步確認了該等表現細胞之IgM產生量極高，而完成了本發明。亦即，本發明係關於以下之IgM產生細胞、IgM產生方法及可藉由該等細胞或方法得到之IgM多元體。再者，本發明提供IgM多元體構造或IgM聯合體之解析方法。

[1] 可產生100mg/L以上之IgM的轉形細胞。

[2] 可產生35pg/cell/day以上之IgM的轉形細胞。

[3] 如[1]或[2]之轉形細胞，其為真核細胞。

[4] 如[1]或[2]之轉形細胞，其為原核細胞。

[5] 如[3]之轉形細胞，其為哺乳動物細胞。

[6] 如[1]~[5]任一項之轉形細胞，其為株化細胞。

[7] 如[6]之轉形細胞，其為非淋巴球系細胞株。

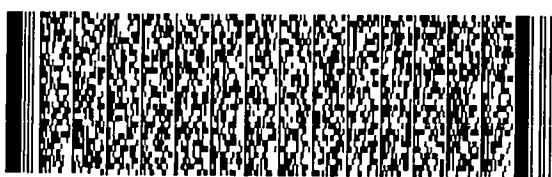
[8] 如[7]之轉形細胞，其為CHO細胞株。

[9] 一表現載體，係於同一載體上同時具有(1)編碼為IgMH鏈之鹼基序列及(2)編碼為IgML鏈之鹼基序列兩者，或含有前述基因(1)及(2)之基因片段。

[10] 一表現載體，係於同一載體上同時具有(1)編碼為IgMH鏈之鹼基序列、(2)編碼為IgML鏈之鹼基序列及(3)編碼為IgMJ鏈之鹼基序列者，或含有前述基因(1)、(2)及(3)之基因片段。

[11] 如[9]或[10]之表現載體或基因片段，其可藉由轉錄調節序列控制IgM之分泌。

[12] 如[11]之表現載體或基因片段，其轉錄調節序



五、發明說明 (7)

[21] 如[14]~[16]任一項之轉形細胞，其中前述表現載體或基因片段含有編碼為IgMJ鏈之鹼基序列，且產生之五元體與六元體之IgM其比(五元體/六元體比)為1.5以上。

[22] 如[14]或[15]之轉形細胞，其中前述表現載體或基因片段含有編碼為IgMJ鏈之鹼基序列，且產生之六元體與五元體之IgM其比(六元體/五元體比)為1.5以上。

[23] 如[14]或[15]之轉形細胞，其中含有編碼為IgMH鏈及IgML鏈基因之表現載體或基因片段不含有編碼為J鏈之鹼基序列，且可藉由共轉形導入編碼為J鏈之鹼基序列並表現。

[24] 製造IgM之方法，包含培養[1]~[8]及[14]~[23]任一項之細胞，並採取IgM之製程。

[25] 製造實質上純的IgM之方法，包含從[1]~[8]及[14]~[23]任一項之細胞培養物純化IgM之製程。

[26] IgM，係以[24]之方法得到。

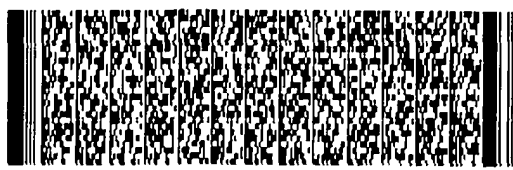
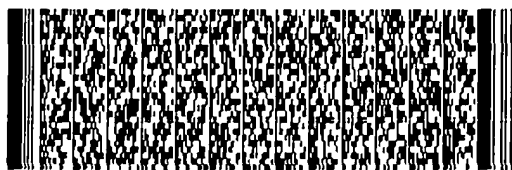
[27] 實質上純的IgM，係以[25]之方法得到。

[28] 如[26]或[27]之IgM，係人類抗體、小鼠抗體、人類嵌合抗體或人類化抗體。

[29] 如[26]~[28]任一項之IgM，為實質上純的五元體或六元體。

[30] 實質上純的五元體或六元體IgM，其中CHO細胞具有加成糖鏈。

[31] 如[26]~[30]任一項之IgM，其為抗糖鏈抗體。



五、發明說明 (8)

[32] 如[31]之IgM，其為抗神經節糖苷抗體。

[33] 如[32]之IgM，其為抗GM2或GM3抗體。

[34] 一單離聚核苷酸，其含有序列識別號:1之鹼基序列或編碼為序列識別號:2之胺基酸序列之鹼基序列。

[35] 一單離聚核苷酸，其含有序列識別號:3之鹼基序列或編碼為序列識別號:4之胺基酸序列之鹼基序列。

[36] 一單離蛋白質，其含有由[34]之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列。

[37] 一單離蛋白質，其含有由[35]之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列。

[38] 一IgM，係以[36]之蛋白質及[37]之蛋白質作為構成單位。

[39] 如[38]之IgM，進一步含有IgMJ鏈。

[40] 如[39]之IgM，為五元體。

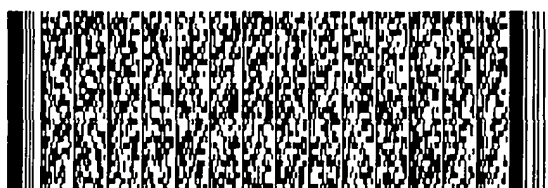
[41] 一單離聚核苷酸，其含有序列識別號:19之鹼基序列或編碼為序列識別號:20之胺基酸序列之鹼基序列。

[42] 一單離聚核苷酸，其含有序列識別號:21之鹼基序列或編碼為序列識別號:22之胺基酸序列之鹼基序列。

[43] 一單離蛋白質，其含有由[41]之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列。

[44] 一單離蛋白質，其含有由[42]之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列。

[45] 一IgM，係以[43]之蛋白質及[44]之蛋白質作為構成單位。



五、發明說明 (9)

[46] 如[45]之IgM，進一步含有IgMJ鏈。

[47] 如[39]之IgM，為五元體。

[48] 一醫藥組成物，含有[26]~[33]、[38]及[45]任一項之IgM。

[49] 一醫藥組成物，含有80%以上之五元體IgM。

[50] 一醫藥組成物，含有50%以上之六元體IgM。

[51] 如[50]之醫藥組成物，其中含有80%以上之六元體IgM。

[52] 一醫藥組成物，其含有之IgM中五元體/六元體比為1.5以上。

[53] 一醫藥組成物，其含有之IgM中六元體/五元體比為1.5以上。

[54] 一種IgM多元體之分析方法，其含有分離IgM之製程，係藉由以滿足擇自以下a)-c)所構成群中至少之一條件之聚丙烯醯胺凝膠為擔體之SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳進行：

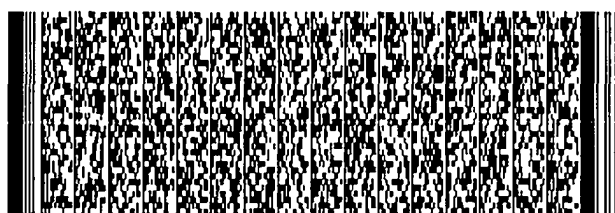
a) 於高溫聚合之聚丙烯醯胺凝膠；

b) 含有高濃度過硫酸銨及甘油之聚丙烯醯胺凝膠；及

c) 聚合前藉由攪拌、除泡而均一化之聚丙烯醯胺凝膠。

[55] 如[54]之方法，其中條件a)之溫度為37℃以上。

[56] 如[54]之方法，其中條件b)之過硫酸銨濃度為0.25%以上。



五、發明說明 (10)

[57] 如[54]之方法，其中聚丙稀醯胺凝膠滿足擇自前述a)-c)所構成群中至少2個條件。

[58] 如[54]之方法，其中聚丙稀醯胺凝膠滿足前述a)-c)所有條件。

[59] 如[54]之方法，其中電泳使用之緩衝液為三(羥甲基)氨基甲烷乙酸鹽(Tris-acetate)SDS電泳緩衝液。

[60] 如[54]之方法，其中IgM多元體為IgM五元體及/或六元體。

[61] 如[54]之方法，係分析IgM之聯合體。

[62] 如[54]之方法，其不使用RI。

[63] 如[54]之方法，其含有於電泳後對分離之IgM多元體進行定量之過程。

[64] 一種分離用之電泳用凝膠，其係由以滿足擇自以下a)-c)所構成群中至少之一條件之聚丙稀醯胺凝膠所構成，以將IgM多元體藉由SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳進行分離：

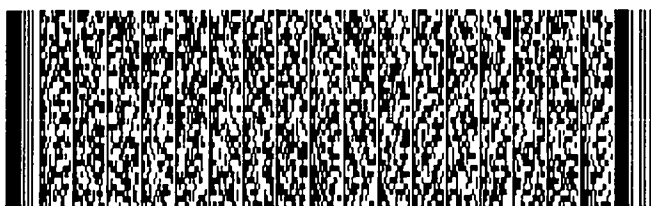
a) 於高溫聚合之聚丙稀醯胺凝膠；

b) 含有高濃度過硫酸銨及甘油之聚丙稀醯胺凝膠；及

c) 聚合前藉由攪拌、除泡而均一化之聚丙稀醯胺凝膠。

[65] 一種分離用電泳用凝膠之製造方法，其含有擇自以下a)-c)所構成群中至少之一之製程，以將IgM多元體藉由SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳進行分離：

a) 於高溫聚合聚丙稀醯胺之製程；



五、發明說明 (11)

b) 於聚丙烯醯胺添加高濃度過硫酸銨之製程；及

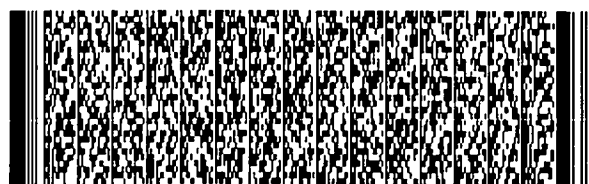
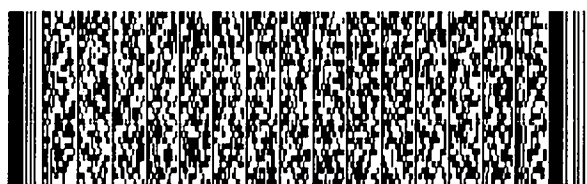
c) 於聚合前將聚丙烯醯胺藉由攪拌、除泡而均一化之製程。

本發明提供可產生100mg/L以上之IgM的轉形細胞。本發明中轉形細胞係指可保持表現外來性IgM基因之細胞。產生100mg/L以上之IgM係指IgM產生細胞之培養物1L中，可蓄積100mg/L以上之IgM。培養物中IgM產生量可藉由ELISA等測定。本發明中IgM蓄積量通常為100mg/L以上，較佳為120mg/L以上，更佳為150mg~300mg/L。對因係多元體而被認為難以實現高生產量之IgM，本發明之轉形細胞之產生量可說是為極高水準的。

以細胞融合法所建立之融合瘤其產生之單株抗體雖可期待高產量，但對於IgM一般而言為數mg~數10mg之譜。亦即，本發明之轉形細胞產生之IgM量遠較融合瘤之標準單株抗體產生量為高。

本發明中IgM係指一種免疫球蛋白，其具有 μ 鏈固定區為H鏈固定區，且具五元體或六元體之構造。又，本發明中構成IgM可變區之來源不限定。故，除來自 μ 鏈之可變區，可含有來自IgG之可變區或其部分構造。可變區之部分構造可用框架(framework)或CDR表示。又，本發明中IgM係指被導入於轉形細胞之外來性基因之表現產物。

又，本發明中構成IgM固定區之來源動物種不限定。亦即，本發明之IgM包括由來自具有IgM型免疫球蛋白之各動物種的IgM固定區。



五、發明說明 (12)

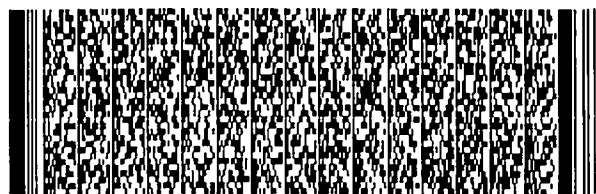
當IgM用於體內投予時，希望至少其固定區係由來自與投予對象之種同樣之種。故，用於對人類投予時，希望至少其固定區係由來自人類。以由來自人類之固定區與由來自其他動物種或由來自人類之其他個體之可變區所構成之IgM稱為嵌合抗體。

用於對人類投予IgM，除固定區，若可變區之框架亦由來自人類，則為更佳。維持可變區之框架構造，而僅將CDR重組為其他動物種抗體之抗體稱為人類化抗體。

又，本發明提供產生35pg/cell/day以上之IgM之轉形細胞。本發明所欲之轉形細胞，1個細胞1日之IgM產生量通常為35pg以上，較佳為40pg以上。1個細胞之IgM產生量可根據培養物中蓄積之IgM量與構成培養物之轉形細胞數目解明。若轉形細胞為選殖(cloning)細胞時，依此決定之1個細胞之IgM產生量可視為構成該細胞集團之所有細胞具有相等的特性。

IgM通常係經過於細胞內表現及取得構形而分泌至培養基上清中。但，若可藉由細胞破碎等，以回收具機能性構形之IgM，則IgM亦可不泌出而蓄積於細胞內。又，若回收之IgM分子可藉某種處理而賦予機能性構形，則並不一定於培養物中須顯示IgM之活性。

本發明所提供具高度IgM產生能力之轉形細胞可對適當寄主細胞以將構成 μ 鏈之H鏈與L鏈基因配置於同一載體之可表現載體或基因片段轉形而得到。以下說明可得到本發明轉形細胞之寄主細胞以及用於使該等寄主細胞轉形之



五、發明說明 (13)

方法。

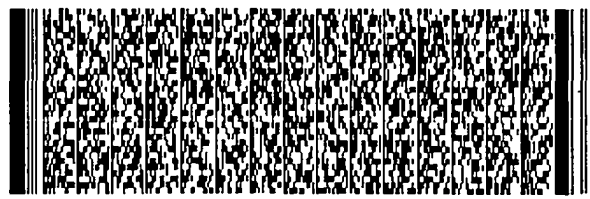
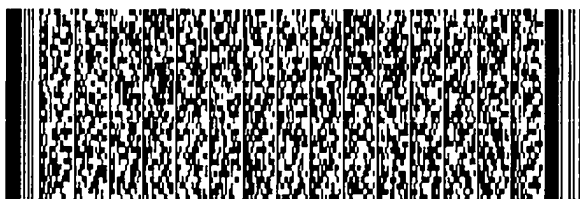
以下說明可得到本發明轉形細胞之寄主細胞以及用於使該等寄主細胞轉形之方法。首先，將編碼為目的H鏈與L鏈之DNA嵌入表現載體。嵌入表現載體之基因亦可進一步組合編碼為J鏈之基因。該等基因係於可在表現控制區的控制下進行表現的方式被嵌入表現載體。

取得編碼為IgM之H鏈、L鏈或J鏈之基因(IgM基因)的方法為周知的。以下，「IgM基因」係作為表示構成IgM H鏈、L鏈或J鏈之基因中任一者的用語。

首先，編碼為J鏈之基因已被選殖，且構造已解明(GenBank Accession No.M12759, Max & Korsmeyer, J. Exp. Med.(1995), 161:832-849)。根據已解明之鹼基序列資料，以IgM產生細胞之mRNA為模板，便可取得編碼為J鏈之基因。

例如，利用實施例所記載之J鏈放大用引子J-f1及J-r1，便可將編碼為J鏈之DNA放大。實施例中編碼為單離J鏈之cDNA其鹼基序列表示於序列識別號:5，又，該鹼基序列所編碼之胺基酸表示於序列識別號:6。

其次說明H鏈或L鏈之基因。一般而言，於取得免疫球蛋白之基因時，編碼為含有其可變區之區域的鹼基序列是重要的。免疫球蛋白之固定區構造為保留性的。故，若選殖時，藉由重組可變區，則被認為可再構成具有目的之抗原結合活性之免疫球蛋白。因此，通常係先取得可變區或CDR之基因，再藉由移殖至已選殖之固定區或框架，以構



五、發明說明 (14)

建編碼為免疫球蛋白全體之鹼基序列。構成IgM μ 鏈其H鏈或L鏈之固定區的構造已被解明。

μ 鏈固定區：Dorai & Gillies, Nucleic acids Res. (1989) 17:6412

κ 鏈固定區：Hieter et al., Cell (1980) 22:197-207

γ 鏈固定區：Hieter et al., Nature (1981) 294:536-540

又，本發明之IgM包括改變固定區者。例如，改變構成IgM之 μ 鏈的H鏈或L鏈其固定區，可能可提到其CDC活性。或，亦可藉由與IgG之Fc區接合，以創出具有具ADCC活性之IgM分子。

本發明中，編碼為可變區之基因其由來不限定。例如，可藉由PCR法從IgM產生細胞將可變區之基因放大。能藉由PCR法將可變區之基因放大之引子為周知的 (Ivanovzki et al., Blood (1998) 91:2433-2442)。

又，亦可從噬菌體抗體庫單離可變區之基因 (Clackson et al., Nature (1991) 352:624-628; Marks et al., J. Mol. Biol. (1991) 222:581-597)。又，亦可將如IgG之IgM以外免疫球蛋白其可變區之基因接合於IgM的固定區。

用於取得可變區基因之IgM產生細胞或者IgM以外免疫球蛋白產生細胞可使用任意之免疫球蛋白產生細胞。例如，可由人類微血管採取之B細胞取得人類IgM或人類IgG



五、發明說明 (15)

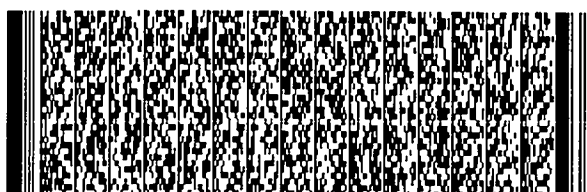
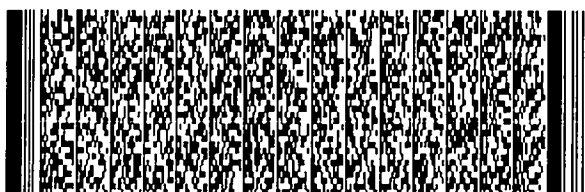
等之可變區基因。具體而言，希望藉由以產生人類IgM或人類IgG之B細胞及骨髓瘤細胞以製作融合瘤，或將產生人類IgM或人類IgG之B細胞以EB(Epstein-Barr)病毒進行轉形，使不死化，再將對抗目的抗原之IgM產生細胞加以選殖，以取得可變區基因。又，亦可由以目的抗原免疫之免疫動物其B細胞或負責免疫的細胞以取得IgM或IgG等之可變區基因。

又，亦可由IgM產生細胞之mRNA以取得編碼為IgM之鹼基序列全長。首先，事先將構造已解明之編碼為固定區的部分以PCR法放大。接著，藉由用於決定5'方向未知鹼基序列的手法，取得編碼為可變區的部分。依據已知的鹼基序列資料，以放大未知鹼基序列之手法為周知的。例如，可藉由5' RACE，以取得5'側之未知鹼基序列。

或者，若可取得已選殖之IgM基因時，則亦可直接將該基因，或依須要放大之後，利用於構建以下載體或基因片段。

例如，對抗神經節糖苷GM3之IgM抗體其L612基因之鹼基序列已被解明(Cancer Research 1993:53:5244-5250)。又，對抗神經節糖苷GM2之IgM抗體其L55基因之鹼基序列為周知的(Immunogenetics 1998:48:73-75)。

可將本發明使用之IgM基因加以改變以製成IgM抗體變異體。本發明中，「IgM抗體變異體」係指有1個或以上胺基酸被改變之抗體的胺基酸序列變異體。無論是有何種改



五、發明說明 (17)

關於真核細胞，於哺乳動物細胞、植物細胞、昆蟲細胞或酵母細胞等細胞中，已有各種外來性基因之表現系統被實用化。

用於得到本發明轉形細胞之寄主細胞可使用哺乳動物細胞或昆蟲細胞。如前所述， μ 鏈具有數個糖鏈結合部位。藉由將該等糖鏈結合部位加成於糖鏈，可得到接近於天然IgM構造之IgM。

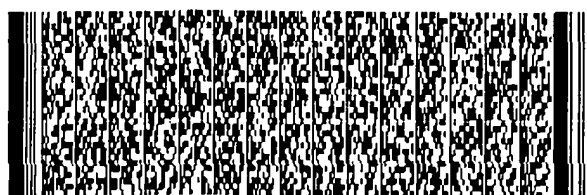
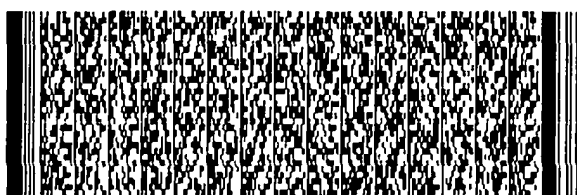
由模仿天然構造 μ 鏈所構成之IgM可期待高的IgM活性。IgM活性可表示為例如CDC活性或者多元體或聯合體之形成能力。又，IgM之構造接近於天然分子有助於IgM之治療效果及提高安全性。原因為推測受體(recipient)之免疫學排除機制不易作用於具有天然構造之IgM。

為表現具糖鏈狀態之IgM，利用真核細胞是有利的。其中以哺乳動物細胞顯示可為較佳寄主細胞。更具體而言，因非淋巴球系之哺乳動物細胞容易培養，且不表現J鏈之細胞(Cattaneo & Neuberger, EMBO J. (1987)

6:2753-2758, Davis et al., J. Exp. Med. (1988)

18:1001-1008)多，故為較佳寄主細胞。非淋巴球系之細胞株例如有CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞。該等動物細胞中，可期待與天然IgM相近之糖鏈加成。特別是CHO細胞因高IgM表現量及可期待與天然IgM相近之糖鏈加成，故為較佳寄主細胞。

本發明之轉形細胞可藉由將IgM之H鏈與L鏈導入該等寄主細胞，或更進一步導入編碼為J鏈之鹼基序列(IgM基



五、發明說明 (21)

使用pelB信息序列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)。對寄主細胞導入載體例如可使用氯化鈣法、電穿孔法以進行。

本發明提供導入上述載體或基因片段之轉形細胞。導入上述載體之寄主細胞不限定。例如，可使用大腸菌或各種動物細胞等。本發明之轉形細胞例如可作為用以製造或表現IgM之產生系使用。用以製造多肽之產生系有體外(in vitro)及體內(in vivo)的產生系。體外產生系例如有使用真核細胞之產生系或使用原核細胞之產生系。

若使用真核細胞時，例如有可使用動物細胞、植物細胞、真菌細胞作為寄主。動物細胞株或人類細胞株已知者例如有如下的哺乳動物細胞株。

CHO(倉鼠卵巢細胞(hamster ovarian cell), J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、

COS(猴腎細胞(monkey kidney cell), Miyazaki, et al., Gene (1989) 79-269)、

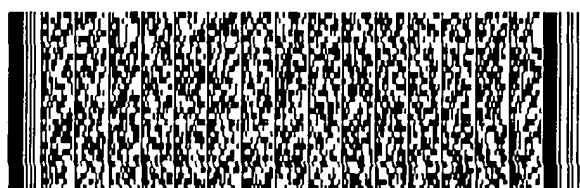
3T3(小鼠纖維母細胞(mouse fibroblasts))、

PC12(人類漿細胞瘤(human plasmacytoma), Neumann, et al., EMBO J. (1982) 1, 841)、

BHK(幼倉鼠腎(baby hamster kidney))、

HeLa(人類上皮細胞(human epithelial cell), Cattaneo, et al. EMBO J. (1987) 6, 2753)、

C6(人類膠質瘤細胞(human glioma cell), Cattaneo, et al. Eur. J. Biochem. (1983) 135, 285)、



五、發明說明 (22)

Vero 及

非洲爪蟾蝾卵母細胞(Valle, et al., Nature(1981) 291, 358-340)等兩生類細胞

此外，已知有Sf9、Sf21或Tn5等昆蟲細胞。

CHO細胞特別較佳為使用欠缺DHFR基因之CHO細胞(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980) 77, 4216-4220)或CHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1968) 60, 1275)等。動物細胞中，以大量表現為目的時，特別較佳者為CHO細胞。該等之細胞株可由寄存機構取得。以下記載代表性之細胞株與ATCC之取得編號。

CHO	CCL-61, CRL-9096	BHK	CRL-1632
COS	CRL-1650, CRL-1651	HeLa	CCL-2
3T3	CRL-1658	Vero	CCL-81

表現載體可藉由任意方法導入寄主細胞。導入載體之方法例如有如下的方法。

磷酸鈣法、

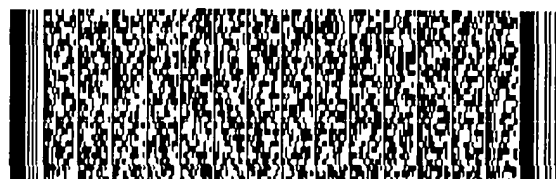
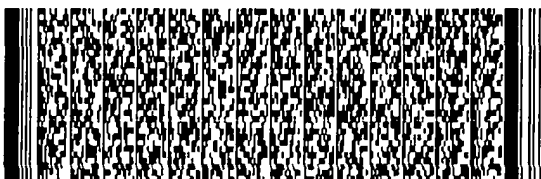
DEAE葡聚糖法、

使用陽離子glyposomeDOTAP(貝林賈曼漢姆公司製)之方法、

電穿孔法、

微脂粒感染(lipofection)

植物細胞已知有例如以菸草屬(Nicotiana)由來之細胞作為多肽產生系，可將該等caluse培養即可。又，近年來有以浮萍(Lemnaceae)或玉米(Zea mays)生產多肽之報



五、發明說明 (23)

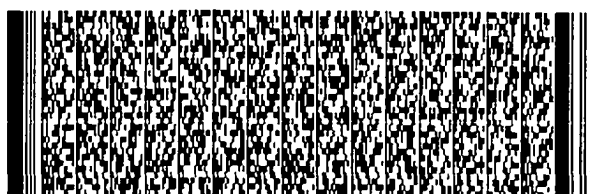
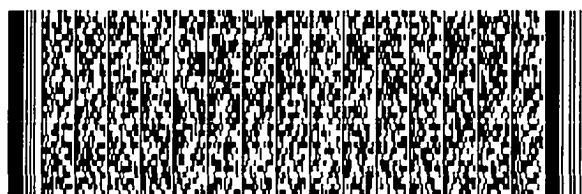
告。真菌細胞例如有糖酵母屬(*Saccharomyces*)屬，例如啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、絲狀菌，例如有麴菌屬(*Aspergillus*)，已知者例如有黑麴菌(*Aspergillus niger*)。

使用原核細胞時，有使用細菌細胞之產生系。細菌細胞例如有大腸菌(*E. coli*)，例如有JM109、DH5 α 、HB101等，此外，已知有枯草菌。

若將該等寄主細胞藉由上述表現載體或基因片段轉形，可得到具有高IgM產生能力之轉形細胞。藉由從該等轉形細胞中選擇具有高IgM產生能力之細胞，可得到本發明之轉形細胞。

例如，將轉形細胞加以選殖，可對各選殖體進行IgM產生能力之評價。IgM產生能力可藉由將轉形細胞培養於適當培養基中，並測定其培養上清中所含有的IgM而得到。為選擇可產生具有目的反應性之高力價IgM之細胞，可利用使用目的抗原之免疫試驗法。例如，利用結合抗原之微平板的ELISA為一種確認抗原專一性IgM之產生的較佳方法。再者，為評價IgM之細胞阻害作用，可進行補體受體之解析或對IgM所具有之CDC作用進行評價。具體而言，IgM之測定方法或用於決定每一細胞之IgM生產量的方法例如有如實施例(1.6)所示者。

再者，本發明提供產生五元體或六元體IgM之轉形細胞。本發明人等解明了若將寄主細胞轉形之表現載體或基因片段中所含之IgM基因具有編碼為J鏈之鹼基序列時，



五、發明說明 (24)

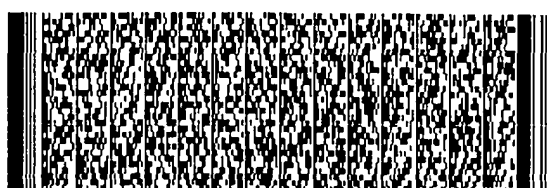
IgM 會以五元體的形式表現。又解明了，若不含編碼為J鏈之鹼基序列時，IgM 會以六元體的形式表現。藉此方式，基於本發明之發現，可控制IgM之多元體構造。

本發明中，編碼為J鏈之鹼基序列可配置於與保持編碼為H鏈及L鏈之鹼基序列的表現載體相同的載體上。或者，亦可將保持編碼為J鏈之鹼基序列的載體與保持編碼為H鏈及L鏈之鹼基序列的載體一起藉由共轉形(cotransfection)以導入於細胞中。再者，亦可將編碼為H鏈、L鏈及J鏈之鹼基序列配置於不同的載體上，再共轉形於同一細胞內。

藉由將3個基因配置於單一載體以將寄主細胞轉形，可防止載體間轉形效率之差異或者表現水平之差異。亦即，用於得到本發明轉形細胞之載體較佳為配置有H鏈、L鏈及J鏈等3個基因的表現載體。

亦即，本發明係關於一種轉形細胞，其中前述載體或基因片段具有編碼為IgM之H鏈、IgM之L鏈及IgM之J鏈的鹼基序列，且轉形細胞可產生具60%以上含量之五元體IgM。本發明中，較佳之轉形細胞係產生具80%以上含量之五元體IgM者。所產生之五元體IgM佔IgM分子之比例例如可藉由後述方法(實施例4)而得知。本發明中，全部IgM中五元體與六元體之比(五元體/六元體)例如為1.5以上，較佳為5以上，更佳為10以上。

又，本發明係關於一種轉形細胞，其中前述基因片段或載體具有編碼為IgM之H鏈及L鏈的鹼基序列，且不含有



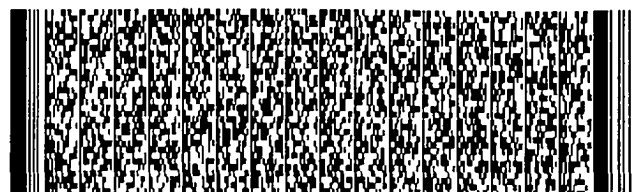
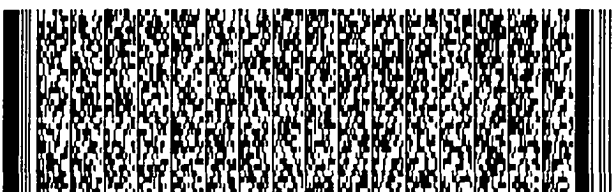
五、發明說明 (25)

編碼為J鏈之鹼基序列，且轉形細胞可產生具50%以上含量之六元體IgM。本發明中，較佳之轉形細胞係產生具80%以上含量之六元體IgM者。所產生之六元體IgM佔IgM分子之比例例如可藉由後述方法(實施例4)而得知。本發明中，全部IgM中六元體與五元體之比(六元體/五元體)例如為1.5以上，較佳為5以上，更佳為10以上。六元體之IgM與五元體相較，已有關於其CDC活性較高之報告。故，可優先製造六元體IgM之本發明之方法對於抗體醫藥之製造技術是有用的。

活體內所存在之IgM主成分係透過J鏈所構成之五元體。生產五元體含有量高之重組IgM係意指可得到接進天然分子之IgM，且為有用的。又，因藉由含有J鏈，可幾乎不形成五元體以外的成分(一元體~四元體及六元體)(Wiersma et al., J. Immunol. (1998)

160:5979-5989, Sorensen et al., Int Immunol. (2000) 12:19-27)，故可生產更純的重組IgM。

藉由培養上述轉形細胞，可由其培養物中取得IgM。轉形細胞之培養方法周知者有體外(in vitro)或體內(in vivo)的方法。例如，動物細胞可使用適當之動物細胞培養用培養基加以培養。周知之動物細胞培養用培養基有DMEM、MEM、RPMI1640或IMDM等培養基。該等培養基中，亦可併用胎牛血清(FCS)等血清補液，亦可進行無血清下培養。培養時之pH較佳為約6~8。培養通常於約30~40℃進行15~200小時，並依需要，進行培養基更換、通氣或者攪



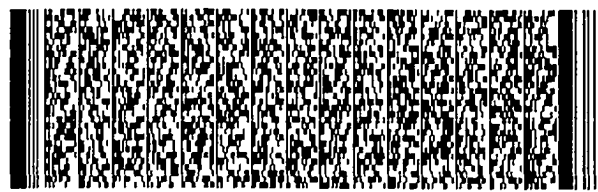
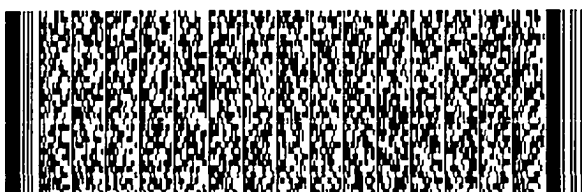
五、發明說明 (26)

拌。

體外培養方法周知者有將細胞分散於培養基中進行培養之方法或者透過半透膜使細胞與培養基接觸的方法。體內培養方法周知者有將細胞接種於小鼠的腹腔內的方法。

以IgM表現載體轉形之CHO細胞等之動物細胞其會分泌IgM於培養上清中。故，藉由回收培養上清，可得到所需之IgM。培養上清可利用膠體過濾、離子交換層析或者各種親和層析等純化技術，以純化IgM(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。本發明提供一種實質純的IgM的製造方法，係由培養上清純化。本發明中，實質純的IgM可定義為該IgM不含有該IgM分子由來生物種之蛋白質。例如，由以人類由來之IgM基因轉形之細胞所回收之IgM子若不含人類由來之IgM以外之蛋白質時，則可說該IgM為實質純的。或者，若為小鼠-人類嵌合IgM時，不含有小鼠與人類任一者蛋白質之IgM，則為實質純的IgM。本發明中實質純的IgM希望實質上不含有寄主細胞由來之蛋白質及寄主細胞培養時所使用培養液之蛋白成分者。實質上不含有係指該等蛋白質成分對於總蛋白質為20%以下，例如為10%以下，較佳為5%以下，或者2%以下，更佳為1%以下。

本發明包含可藉由該等製造方法所得到之IgM抗體或者實質純的IgM抗體。本發明中較佳的IgM抗體係由50%以上之六元體、60%以上之五元體，較佳為80%以上之五元體

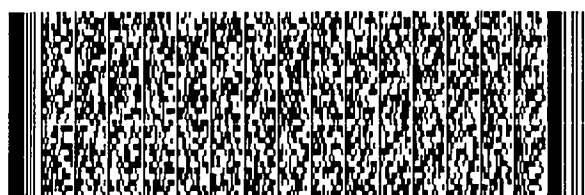


五、發明說明 (27)

或六元體IgM分子所構成。本發明中，由至少50%以上之六元體或60%以上之五元體所構成之IgM抗體為實質純的五元體或六元體。本發明中，較希望之實質純的五元體或六元體例如為具80%以上之含量者。該種實質純的IgM作為醫藥用組成物是有用的。

本發明中IgM抗體其由來物種不限定。本發明可得到例如人類抗體或者小鼠抗體。又，本發明之IgM抗體如前所述，亦可為固定區與可變區之基因其由來相異的嵌合抗體。嵌合抗體可表示為人類(固定)-人類(可變)嵌合抗體或人類(固定)-異種動物(可變)嵌合抗體。編碼為人類-人類嵌合抗體之基因可藉由將任意可變區基因接合於事先選殖之人類固定區基因上而得到。再者，本發明包含人類化抗體。人類化抗體可藉由將在人類可變區基因之框架嵌入異種動物由來CDR的基因加以表現而得到。

本發明之IgM抗體所辨識之抗原不限定。IgM為具有CDC活性之強細胞阻害性抗體。再者，亦報告有具細胞死誘導活性的IgM抗體(Yonehara et al., J. Exp. Med. (1989) 169:1747-1756)。故，IgM抗體作為治療如癌症之細胞阻害之治療策略之醫療技術是有用的。例如，已知各種糖鏈抗原可被利用為腫瘤細胞之細胞表面標記。故，可辨識糖鏈之IgM抗體可作為以細胞為目標之抗體醫藥。例如，已知某種神經節糖苷作為對抗腫瘤細胞之抗體醫藥目標分子是有用的。具體而言，對抗神經節糖苷GM2、GD2、GD3或GM3之抗體已確認對數種腫瘤細胞具有阻



五、發明說明 (28)

害作用。對抗神經節糖苷GM2或神經節糖苷GM3之抗體為本發明較佳之IgM。該等IgM抗體亦可利用本發明之方法製造。

據報告有數種可辨識神經節糖苷GM2或GM3之抗體。本發明中抗神經節糖苷GM2之抗體或抗神經節糖苷GM3之抗體其由來不限定。可利用已知的IgM抗體之基因，亦可取得新的抗IgM抗體基因並應用於本發明。例如，以下序列識別號所記載之胺基酸序列可為本發明中較佳之抗神經節糖苷GM2抗體及抗神經節糖苷GM3抗體之可變區。編碼為該等胺基酸序列之DNA鹼基序列記載於()中。

抗神經節糖苷GM2抗體(L55)：

H鏈：序列識別號：20(序列識別號：19)

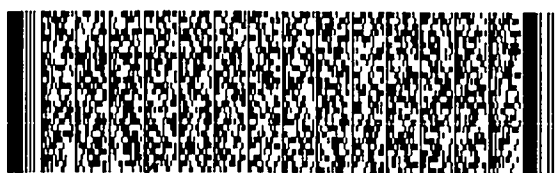
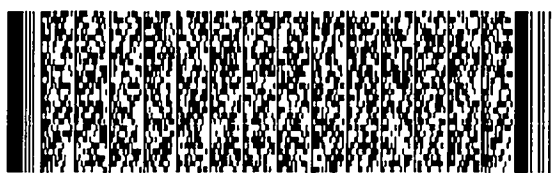
L鏈：序列識別號：22(序列識別號：21)

抗神經節糖苷GM3抗體(L612)：

H鏈：序列識別號：2(序列識別號：1)

L鏈：序列識別號：4(序列識別號：3)

再者，本發明提供一種醫藥組成物，係含有上述IgM抗體為有效成分。特別是，本發明提供之IgM其五元體或六元體任一者含量較其他者為多。其結果，本發明可提供富含IgM之五元體或六元體的醫藥組成物。亦即，本發明所提供之醫藥組成物，其五元體/六元體之比為1.5以上，較佳為5以上，更佳為10以上。或者，本發明所提供之醫藥組成物，其六元體/五元體之比為1.5以上，較佳為5以上，更佳為10以上。



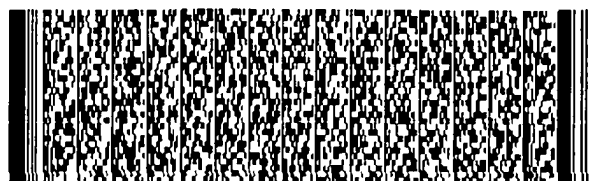
五、發明說明 (29)

例如，藉由投予含有本發明之抗神經節糖苷GM2 IgM抗體及抗神經節糖苷GM3 IgM抗體為有效成分之藥劑，可進行癌症治療(或癌症預防)。再者，亦可藉由投予以抗神經節糖苷GM2 IgM抗體為有效成分之藥劑，以進行愛滋病治療(或愛滋病預防)。本發明亦提供該種治療方法(或預防方法)。

含有抗神經節糖苷GM2 IgM抗體及抗神經節糖苷GM3 IgM抗體為有效成分之藥劑，可藉任意方法進行投予。

故，可藉經口、非經口投予任一者。較佳之投予方法為非經口投予。用於非經口投予之具體劑型例如有注射劑型、經鼻投予劑型、經肺投予劑型、經皮投予劑型等。注射劑型之例例如可藉由靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等以進行全身性或局部投予。再者，亦可直接投予於癌症局部部位。

除將含有抗神經節糖苷GM2 IgM抗體及抗神經節糖苷GM3 IgM抗體為有效成分之藥劑本身對患者直接投予以外，亦可藉由周知的製劑學方法以製成製劑化藥劑再投予。例如，可以水或其他藥學上可容許之液體等無菌溶液或懸浮液劑之注射劑的形式使用。又，例如，可藉由適當組合藥理學上可容許之擔體或介質，具體而言，為滅菌水或生理食鹽水、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、安定劑、載劑、防腐劑等，並以一般製藥方法所認可之單位用量形態加以混合，而製劑化。該等製劑中有效成分量可加以調整使能得到指示範圍之適當容量。



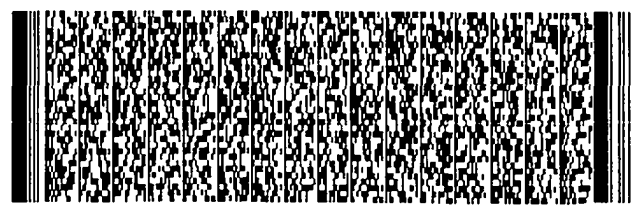
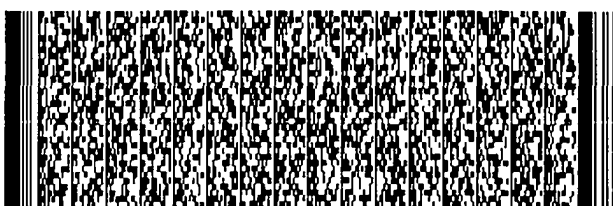
五、發明說明 (30)

用於注射之無菌組成物可使用如注射用蒸餾水載劑，依通常的製劑方法進行處方。注射用之水溶液例如可使用生理食鹽水、葡萄糖或含有其他輔助藥之等張液等。輔助劑具體而言可利用例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉等。醫藥組成物中亦可加入適當溶解輔助劑。較佳之溶解助劑例如有醇或非離子性界面活性劑。醇具體而言例如有，乙醇、多元醇例如丙二醇、聚乙二醇等。又，非離子性界面活性劑例如可使用聚山梨醇酐脂肪酸酯80™或者HCO-50。

油性液體例如有芝麻油、黃豆油，亦可併用苯甲酸苄酯、苄醇作為溶解輔助劑。又，亦可配合緩衝劑(例如磷酸鹽緩衝液、乙酸鈉緩衝液)、無痛化劑(例如鹽酸普卡因(Procaine))、安定劑(例如苄醇、苯酚)、抗氧化劑。所調製之注射液通常係充填於適當的小瓶。

又，投予量可依患者年齡、症狀適當決定。例如，可於每公斤體重每次0.0001mg~1000mg的範圍內選擇。或者，例如，可於每位患者0.001~100000mg/body的範圍選擇投予量。但，本發明之治療藥不限定於該等投予量。

附著於細胞或進入細胞內之IgM抗體於補體存在下或者IgM單獨的情形下，具有細胞阻害作用。於利用本發明IgM抗體之抗體醫藥製劑，亦可將各種治療用成分結合於抗體以使其治療效果進一步提高。治療用成分例如有小紅莓(doxorubicin)、氮甲喋呤、紫杉醇等化學治療藥劑、重金屬、放射性核種、假單胞菌解毒素等毒素類。關於與



五、發明說明 (31)

治療用成分結合體之生產方法及治療所使用之方法記載於美國專利第5057313號、美國專利第51556840號。或者，亦可將本發明所得到的IgM抗體與化學治療方法藥劑或辨識同種抗原、他種抗原的抗體製劑併用，以提高治療效果。

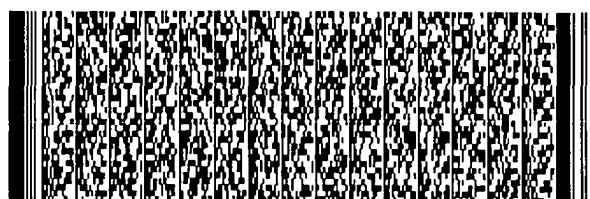
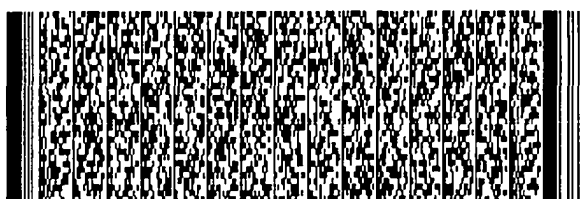
再者，本發明提供一種IgM多元體之分析方法，其含有分離IgM之製程，係藉由以滿足擇自以下a)-c)所構成群中至少之一條件之聚丙烯醯胺凝膠為擔體之SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳進行：

a) 於高溫聚合之聚丙烯醯胺凝膠；

b) 含有高濃度過硫酸銨及甘油之聚丙烯醯胺凝膠；及

c) 聚合前藉由攪拌、除泡而均一化之聚丙烯醯胺凝膠。

因IgM之分子量為100萬程度，為非常高的分子量，故依一般方法欲定量解析多元體構造(五元體及六元體)是困難的。所報告之IgM多元體構造分析法係使用標記RI之IgM以進行非還原SDS-PAGE(文獻6/J. Immunol.(1994) 152;1206)。該方法須要有RI。另一方面，為發展IgM為醫藥品，必須有於製程中可分析IgM多元體構造之技術。具體而言，於製造細胞之選定、細胞培養之監視、純化、原體製造、製劑製造等各製程中都須要分析IgM之多元體構造。該等製程中IgM之解析希望有不須RI之解析方法。本發明人等發現藉由利用如上條件，可解析IgM之多元體構造，並完成了本發明。以下具體對各條件加以敘述。



五、發明說明 (32)

a) 於高溫聚合之聚丙烯醯胺凝膠；

通常，於免疫球蛋白等蛋白質之電泳中之聚丙烯醯胺凝膠其聚合溫度為室溫。相對於此，例如可於 37°C 以上，較佳為 $40\sim 60^{\circ}\text{C}$ 聚合之聚丙烯醯胺凝膠對本發明之IgM解析方法是有用的。藉由賦予該高溫條件，可迅速使聚丙烯醯胺聚合。

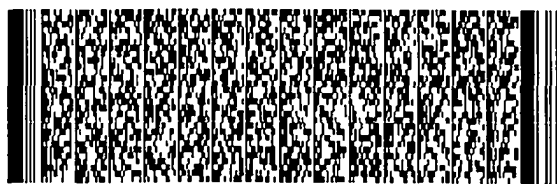
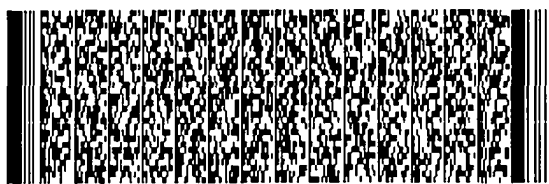
b) 含有高濃度過硫酸銨及甘油之聚丙烯醯胺凝膠；

一般，SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳用之聚丙烯醯胺凝膠含有0.05%左右之APS。相對於此，含有0.25%以上，較佳為0.1%~0.5%之APS之聚丙烯醯胺凝膠對本發明之IgM解析方法是有用的。

c) 聚合前藉由攪拌、除泡而均一化之聚丙烯醯胺凝膠。

電泳分析用之聚丙烯醯胺凝膠調製為不生氣泡之均一狀為重要的。故，添加聚丙烯醯胺凝膠之聚合起始劑後，一面注意不使氣泡混入一面使聚合溶液充分攪拌。相對於此，本發明使用HYBRID MIXER(KEYENCE)，以將聚合溶液更均一攪拌並進行脫泡以防止氣泡混入，以製作均一的凝膠。

本發明之IgM解析方法可藉由使用滿足上述條件a)-c)中至少任一條件之聚丙烯醯胺凝膠來實施。為對IgM於維持其多元體構造的情況下以高精度進行解析，較佳為使用滿足上述條件a)-c)中至少2個以上，更佳為滿足a)-c)全部條件之聚丙烯醯胺凝膠來實施。



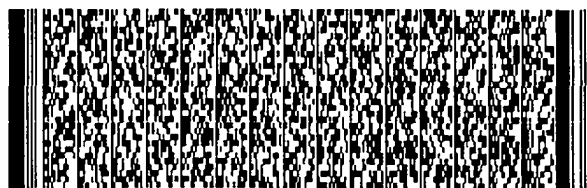
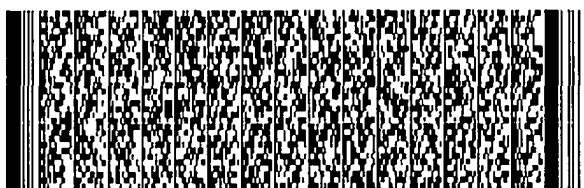
五、發明說明 (33)

本發明之IgM解析方法中，電泳用緩衝液可利用任意緩衝液。例如，三(羥甲基)氨基甲烷乙酸鹽(Tris-acetate)SDS電泳緩衝液為本發明之IgM解析方法之較佳緩衝液。三(羥甲基)氨基甲烷乙酸鹽(Tris-acetate)SDS電泳緩衝液之具體組成如後述實施例所記載。

本發明之IgM解析方法可以五元體及/或六元體IgM作為解析對象。本發明中之IgM解析係指解明IgM分子係為具五元體構造或者具有六元體構造何者之意。五元體係指IgM具有5個由2分子H鏈及2分子L鏈所構成之IgM構成單位者。同樣的，六元體係指構成單位為6之IgM。

IgM分子之五元體或六元體構造係指可藉由周知的方法(文獻6/J. Immunol. (1994) 152;1206)進行確認之五元體構造或六元體構造。再者，依本發明之IgM解析方法，亦可解明IgM五元體與六元體之存在量比。例如，電泳用凝膠中之IgM可以直接或轉印於膜再以可見色素或螢光色素染色。又，亦可測定染色強度或螢光強度以定量目的IgM構造體。本發明之IgM五元體或六元體定量方法具體而言，可依據實施例3及實施例4所記載之方法實施。此外，藉由利用超高速離心之周知方法，亦可推定IgM五元體及六元體量之比。

本發明之IgM多元體分析方法可利用於IgM聯合體之分析。本發明中，聯合體係指複數之IgM分子藉由共價鍵結合之分子。藉由形成聯合體，IgM抗體之活性會產生變化。例如，因分子之巨大化，IgM之聯合體容易生成沉

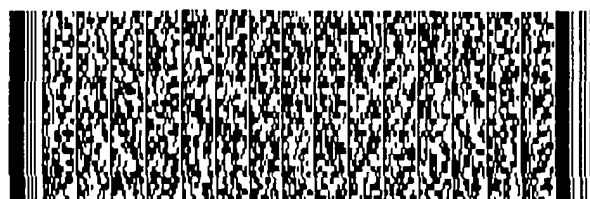
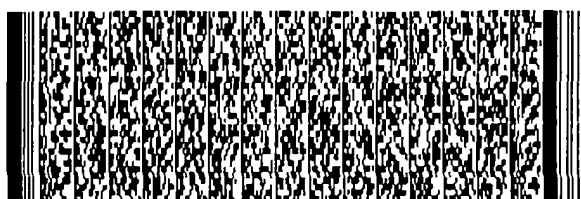


五、發明說明 (34)

澱。故，為將IgM開發為醫藥品，必須對IgM之聯合體進行定量評價。本發明之IgM多元體分析方法不僅可評價IgM之五元體與六元體量之比，亦可對IgM之聯合體量比進行定量評價。

更具體而言，藉由以上述條件實施SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳，將蛋白質電泳至具有相當於五元體(或六元體)分子量之位置，且將該蛋白質結合於抗IgM抗體，可解明IgM係以五元體(或六元體)之形式存在。若蛋白質為純化IgM，則可藉由蛋白質染色得知泳動位置。或，即使為純化之IgM，亦可使用抗 μ 鏈抗體進行免疫分析，以鑑定IgM之譜帶。若將所鑑定IgM譜帶之強度以定量性或半定量性進行評價，則可決定IgM之量。由電泳像決定蛋白質量之方法為周知的。

若利用本發明之IgM分析方法，可明白的辨別IgM之多元體構造。故，可於不使用放射性同位素(RI)下檢測電泳後之IgM。本發明中，不使用RI之分析方法(non-isotopic analysis)係指該分析方法包含將電泳後之IgM以放射性同位素以外之手段檢測之製程。放射性同位素以外之手段例如有藉由蛋白質之染色或藉由結合於IgM之親和性物質進行檢測者。親和性物質可使用抗IgM抗體、蛋白質L、蛋白質A、蛋白質G、IgM Fc受體等。本發明之分析方法中，可將該等親和性物質事先加以標記。將親和性物質標記可使用酵素或色素。酵素可使用超歧化酶(POD)、 β 半乳糖苷酶(β -GAL)或鹼性磷解酶(ALP)等。色素包括有螢光色



五、發明說明 (35)

素、發光色素或發色色素等。該等標記任一者皆為非放射性物質。

又，本發明係關於一種用於將IgM多元體藉由SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分離之電泳凝膠，係由滿足擇自以下a)-c)所構成群中至少之一的條件的聚丙烯醯胺凝膠所構成，或者，本發明係關於滿足擇自以下a)-c)所構成群中至少之一的條件的聚丙烯醯胺凝膠在IgM多元體分析方法中之使用。

a) 於高溫聚合之聚丙烯醯胺凝膠；

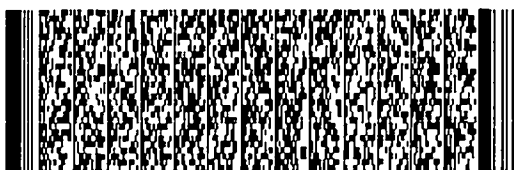
b) 含有高濃度APS(Ammonium Persulfate)之聚丙烯醯胺凝膠；及

c) 聚合前藉由攪拌、除泡而均一化之聚丙烯醯胺凝膠。

該等聚丙烯醯胺凝膠中任一者在本發明之IgM解析方法中皆為有用的。滿足擇自以上a)-c)所構成群中至少之一的條件的聚丙烯醯胺凝膠對於IgM解析上為有用的情事係於本發明首次解明。本發明中較佳之聚丙烯醯胺凝膠為滿足上述a)-c)中2個以上，更佳為滿足上述a)-c)全部。又，本發明係關於一種用於將IgM多元體藉由SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分離之電泳凝膠的製造方法，包括擇自以下a)-c)所構成群中至少之一的製程。

a) 將聚丙烯醯胺凝膠於高溫聚合之製程；

b) 於聚丙烯醯胺凝膠中添加高濃度過硫酸銨之製程；
及



五、發明說明 (36)

c) 聚合前將聚丙稀醯胺凝膠藉由攪拌、除泡而均一化之製程。

本發明中較佳之聚丙稀醯胺凝膠之製造方法包含上述製程中a)-c)2個以上，更佳為包含上述製程a)-c)全部。亦即，本發明係提供一種用於將IgM多元體藉由SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳分離之電泳凝膠的製造方法，包括擇自以下製程a)-c)。

a) 於聚丙稀醯胺凝膠中添加高濃度過硫酸銨之製程；

b) 聚合前將聚丙稀醯胺凝膠藉由攪拌、除泡而均一化之製程；及

c) 將聚丙稀醯胺凝膠於高溫聚合之製程。

又，本說明書中所引用的所有先行技術文獻係引入本說明書中以作為參考。

【實施方式】

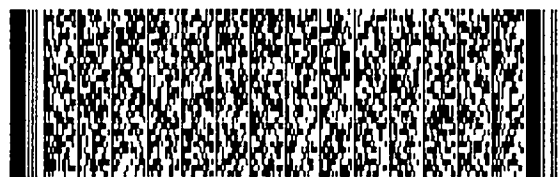
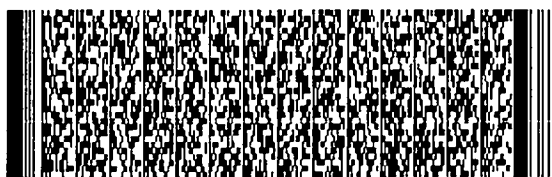
(據以發明實施之最佳形態)

以下根據實施例對本發明更具體說明。

[實施例1] 對抗神經節糖苷GM3之重組型人類抗體L612的製作

1.1 抗神經節糖苷GM3人類抗體H鏈基因之構建

編碼為結合於神經節糖苷GM3之人類抗體(以下，以L612表示)H鏈的基因係使用由以EB(Epstein-Barr)病毒轉形之B細胞(以下，以L612表現B細胞表示)所萃取之總RNA，並以RT-PCR法放大。關於L612之H鏈可變區基因的鹼



五、發明說明 (37)

基序列，Hoon等曾經報告過(Cancer Research 1993;53:5244-5250)。

總RNA係使用RNeasy Plant Mini Kits(商品名)(QIAGEN公司製)從 1×10^7 個之L612表現B細胞中萃取得到。關於IgM H鏈固定區之鹼基序列，係設計為兩條寡核苷酸(LMH-f3、LMH-r3)。LMH-f3(序列識別號:7)係以有義方向，LMH-r3(序列識別號:8)係以反義方向分別合成。

使用總RNA $1 \mu\text{g}$ ，並以SMART RACE cDNA Amplification Kit(商品名)(CLONTECH公司製)分成5'末端側及3'末端側，將基因片段放大。5'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LMH-r3，3'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LMH-f3。反轉錄反應係於 42°C 進行1小時30分鐘。

PCR反應溶液($50 \mu\text{L}$)之組成如下所示。

$10 \times$ Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) $5 \mu\text{L}$ 、
 $10 \times$ Universal Primer A Mix(商品名) $5 \mu\text{L}$ 、
dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM 、
Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) $1 \mu\text{L}$ 、
(以上成分皆為CLONTECH公司製)

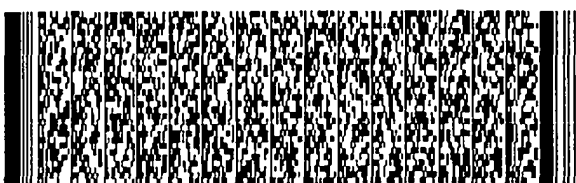
反轉錄反應產物 $2.5 \mu\text{L}$ 、

合成之寡核苷酸LMH-f3或LMH-r3 10pmole 。

又，反應條件如下所示。

94°C 起始溫度30秒

$94^\circ\text{C}/5\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/3\text{分鐘}$ 為一循環，進行5次



五、發明說明 (38)

94 °C / 5 秒、70 °C / 10 秒、72 °C / 3 分鐘為一循環，反複進行5次

94 °C / 5 秒、68 °C / 10 秒、72 °C / 3 分鐘為一循環，反複進行25次

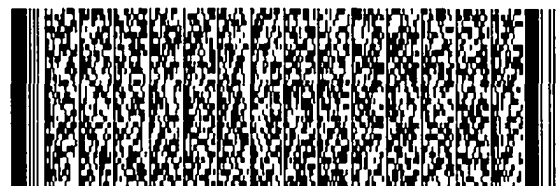
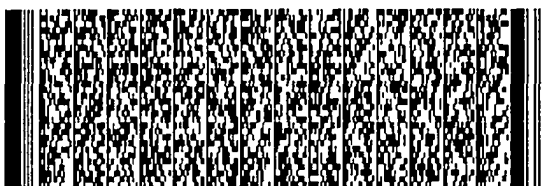
最後，將反應產物於72 °C加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載體(Promega公司製)上。決定鹼基序列後，將含有5'末端基因之載體以限制酶ApaI(寶酒造公司製)及SacII(寶酒造公司製)分解所得約1.1kbp之片段，與將含有3'末端基因之載體以限制酶NotI(寶酒造公司製)及SacII(寶酒造公司製)分解所得約1.1kbp之片段混合，並選殖至pBluescript KS+載體(東洋紡公司製)上，以得到完全長度之L612 H鏈基因。

為選殖至動物細胞表現用載體，使用合成核苷酸LMH-fxho、LMH-rsal，將完全長度之基因片段放大。LMH-fxho及LMH-rsal之設計分別為：LMH-fxho(序列識別號:11)係將前方引子雜交於L612 H鏈基因之5'末端，且具有xhoI限制酶辨識序列及柯札克(Kozak)序列(Kozak, M. J. Mol. Biol. (1987), 196, 947)，而LMH-rsal(序列識別號:12)係將後方引子雜交於L612 H鏈基因之3'末端，且具有SalI限制酶辨識序列。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ PCR緩衝液5 μ L、



五、發明說明 (39)

MgSO₄ 1mM、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

DNA 聚合酶KOD-Plus-1 單位、

(以上成分皆為東洋紡公司製)

含完全長度L612 H 鏈基因之pBluescript KS+ 載體
10ng、

合成核苷酸LMH-fxho、LMH-rsa1 10pmole

又，反應條件如下所示。

94℃ 起始溫度2分鐘

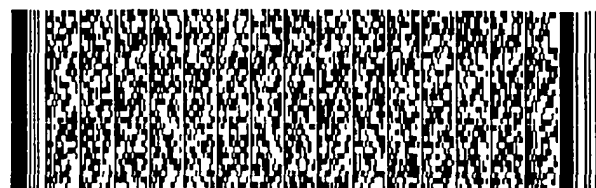
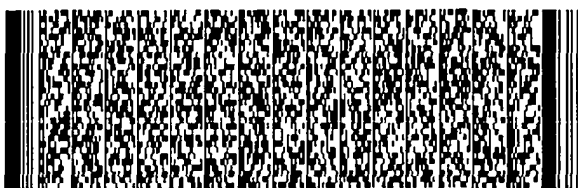
94℃/15秒、60℃/30秒、68℃/2分鐘為一循環，進行
30次

最後，將反應產物於72℃加熱5分鐘。

將放大後之基因片段以限制酶XhoI(寶酒造公司製)及
限制酶SalI(寶酒造公司製)分解後，以QIAquick PCR
Purification Kit(商品名)(QIAGEN公司製)純化，並連結
於pUCAG之限制酶Xho部位，以選殖之。本pUCAG載體係將
pCXN(Niwa等，Gene 1991:108:193-200)以限制酶BamHI分
解得到之2.6kbp片段連結於pUC19載體(東洋紡公司製)之
限制酶BamHI部位並選殖所得之載體。完成之質體命名
為pUCA/L612H。本質體所含之L612H鏈其鹼基序列及胺基
酸序列表示於序列識別號:1及序列識別號:2。

1.2 抗神經節糖苷GM3人類抗體L鏈基因之構建

編碼為L612 L鏈的基因係使用由L612表現B細胞所萃
取之總RNA，並以RT-PCR法放大。關於L612之L鏈可變區基



五、發明說明 (40)

因的鹼基序列，Hoon等曾經報告過(Cancer Research 1993;53:5244-5250)。

總RNA係與實施例1.1以同樣方式，從L612表現B細胞中萃取得到。關於IgM L鏈固定區之鹼基序列，係設計為兩條寡核苷酸(LML-f1、LML-r1)。LML-f1(序列識別號:9)係以有義方向，LML-r1(序列識別號:10)係以反義方向分別合成。使用總RNA 1 μ g，並以SMART RACE cDNA Amplification Kit(商品名)(CLONTECH公司製)分成5'末端側及3'末端側，將基因片段放大。5'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LML-r1，3'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LML-f1。反轉錄反應係於42℃進行1小時30分鐘。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10× Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) 5 μ L、
10× Universal Primer A Mix(商品名) 5 μ L、
dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、
Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) 1 μ L、
(以上成分皆為CLONTECH公司製)

反轉錄反應產物2.5 μ L、

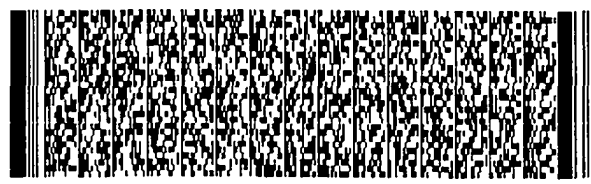
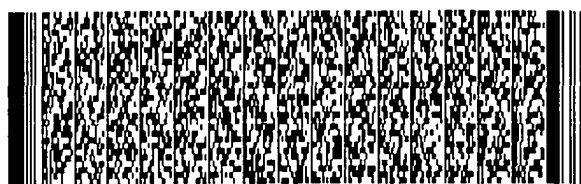
合成之寡核苷酸LML-f1或LML-r1 10pmole。

又，反應條件如下所示。

94℃起始溫度30秒

94℃/5秒、72℃/3分鐘為一循環，進行5次

94℃/5秒、70℃/10秒、72℃/3分鐘為一循環，反複



五、發明說明 (41)

進行5次

94 °C / 5 秒、68 °C / 10 秒、72 °C / 3 分鐘為一循環，反復進行25次

最後，將反應產物於72 °C 加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載體(Promega公司製)上。決定鹼基序列後，將含有5'末端基因之載體以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)分解所得到約0.7kbp之片段，與將含有3'末端基因之載體以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)分解所得到約0.9kbp之片段混合，並用合成核苷酸LML-feco、LMLrnot將完全長度之基因片段放大。合成核苷酸LML-feco及LMLrnot之設計分別為：LML-feco(序列識別號:13)係將前方引子雜交於L612 L鏈基因之5'末端，且具有EcoRI限制酶辨識序列及柯札克(Kozak)序列，而LMLrnot(序列識別號:14)係將後方引子雜交於L612 L鏈基因之3'末端，且具有NotI限制酶辨識序列。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ PCR緩衝液5 μ L、

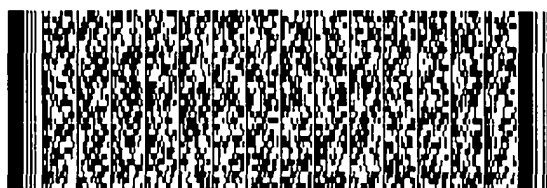
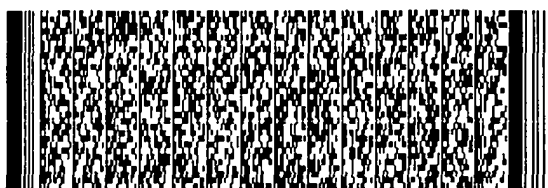
MgSO₄ 1mM、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

DNA聚合酶KOD-Plus-1單位、

(以上成分皆為東洋紡公司製)

5'末端側基因片段、



五、發明說明 (42)

3' 末端側基因片段、

合成核苷酸LML-feco、LMLrnot 10pmole

又，反應條件如下所示。

94 °C 起始溫度2分鐘

94 °C / 15 秒、60 °C / 30 秒、68 °C / 2 分鐘為一循環，進行
30 次

最後，將反應產物於72 °C 加熱5分鐘。

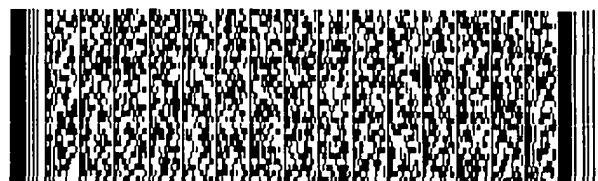
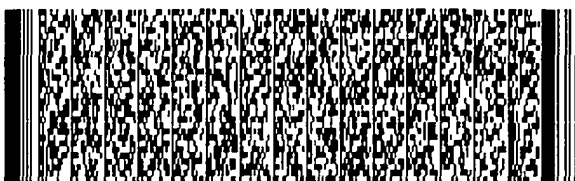
將放大後之基因片段以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)
及限制酶NotI(寶酒造公司製)分解後，以QIAquick PCR
Purification Kit(商品名)(QIAGEN公司製)純化，並連結
於pCXND3之限制酶EcoRI及NotI切斷部位，以選殖之。

本載體pCXND3之構建流程如下所述。為使DHFR-△
E-rvH-PM1-f(參見W092/19759)之抗體H鏈基因與載體分
開，於限制酶EcoRI/SmaI部位分解，並僅回收載體側後，
選殖EcoRI-NotI-amHI adaptor(寶酒造公司製)。該載體
命名為pCHOI。

將pCHOI之DHFR基因表現部位選殖至pCXN(Niwa等，
Gene 1991;108:193-200)之限制酶HindIII部位所選殖成
的載體命名為pCXND3。又，將L鏈基因片段選殖至pCXND3
上所完成之質體命名為pCXND3/L612L。本質體所含之
L612L鏈其鹼基序列及胺基酸序列表示於序列識別號:3及
序列識別號:4。

1.3 抗神經節糖苷GM3人類抗體之表現載體之構建

為製作L612表現載體，將pUCAG/L612H以限制酶



五、發明說明 (43)

HindIII(寶酒造公司製)分解所得之約4.0kbp片段連結於pCXND3/L612H之限制酶HindIII(寶酒造公司製)切斷部位，並選殖之。完成之質體命名為pCXND3/L612IgM。本質體可於動物細胞內表現新黴素耐受性基因、DHFR基因及L612基因。

1.4 抗神經節糖苷GM3人類抗體J鏈基因及表現載體之構建

用從L612表現B細胞萃取的總RNA作為編碼為L612 J鏈之基因，並以RT-PCR法放大。總RNA係與上述以同樣方式，從L612表現B細胞萃取。依據登記於GenBank之人類抗體J鏈基因的鹼基序列(GenBank編號:M12759)，設計2條寡核苷酸(J-f1、J-r1)並合成之。J-f1(序列識別號:15)會在有義方向雜交於人類抗體J鏈基因外子(Exon)3，J-r1(序列識別號:16)會在反義方向雜交於人類抗體J鏈基因外子(Exon)4。

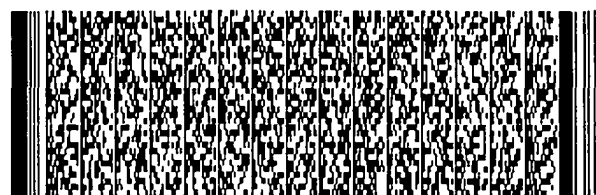
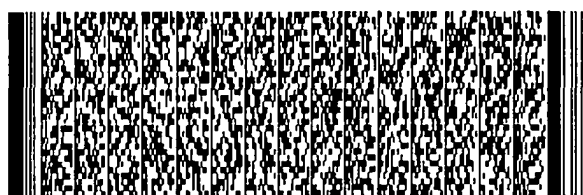
使用總RNA 1 μ g，並以SMART RACE cDNA Amplification Kit(商品名)(CLONTECH公司製)分成5'末端側及3'末端側，將基因片段放大。5'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸J-r1，3'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸J-f1。反轉錄反應係於42℃進行1小時30分鐘。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) 5 μ L、

10 $\times$ Universal Primer A Mix(商品名) 5 μ L、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、



五、發明說明 (44)

Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) 1 μ L、
(以上成分皆為CLONTECH公司製)

反轉錄反應產物2.5 μ L、

合成之寡核苷酸J-fl或J-rl 10 pmole。

又，反應條件如下所示。

94 $^{\circ}$ C 起始溫度30秒

94 $^{\circ}$ C/5秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，進行5次

94 $^{\circ}$ C/5秒、70 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，反複
進行5次

94 $^{\circ}$ C/5秒、68 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，反複
進行25次

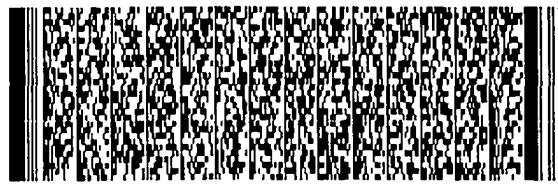
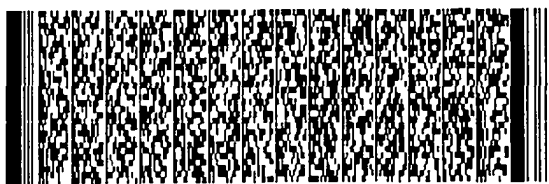
最後，將反應產物於72 $^{\circ}$ C加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)
(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載
體(Promega公司製)上。

決定鹼基序列後，將含有5'末端基因之載體以限制酶
EcoRI(寶酒造公司製)分解所得約0.5kbp之片段，與將
含有3'末端基因之載體以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)分
解所得約1.0kbp之片段混合，並用合成核苷酸J-feco、
J-rxba將完全長度之基因片段放大。

合成核苷酸J-feco及J-rxba之設計分別為：

J-feco(序列識別號:17)係將前方引子雜交於L612 J鏈基
因之5'末端，且具有EcoRI限制酶辨識序列及柯札克
(Kozak)序列，而J-rxba(序列識別號:18)係將後方引子雜



五、發明說明 (45)

交於L612 J鏈基因之3'末端，且具有XbaI限制酶辨識序列。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ PCR緩衝液5 μ L、

MgSO₄ 1mM、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

DNA聚合酶KOD-Plus-1單位、

(以上成分皆為東洋紡公司製)

5'末端側基因片段、

3'末端側基因片段、

合成核苷酸J-feco、J-rxba 10pmole

又，反應條件如下所示。

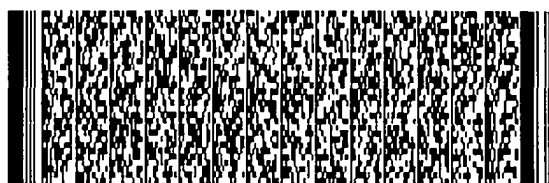
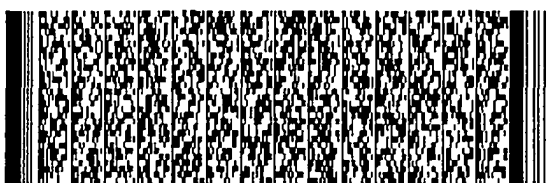
94℃起始溫度2分鐘

94℃/15秒、60℃/30秒、68℃/2分鐘為一循環，進行30次

最後，將反應產物於72℃加熱5分鐘。

將放大後之基因片段以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)及限制酶XbaI(寶酒造公司製)分解後，以QIAquick PCR Purification Kit(商品名)(QIAGEN公司製)純化，並連結於pCOSII-Zeo之限制酶EcoRI及XbaI切斷部位，以選殖之。

本載體pCOSII-Zeo係除去上述pCHOI之DHFR基因表現部位，並選殖Zeocin耐受性基因表現部位所得到的載體。所完成之質體命名為pCOSII-Zeo/J Chain。本質體所含之



五、發明說明 (46)

L612 J 鏈其鹼基序列及胺基酸序列表示於序列識別號:5 及序列識別號:6。

1.5 使用動物細胞表現抗神經節糖苷GM3 人類抗體

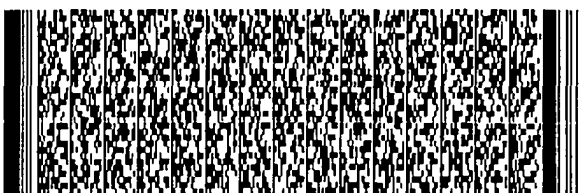
依如下方式使用CHO細胞(DG44株)製作安定表現細胞株。使用Gene Pulser II(Biorad公司製)依電穿孔法導入基因。

對未表現J鏈之細胞株導入基因係如以下所述。將混合有L612表現載體-pCXND3/L612IgM(25 μ g)與懸浮於PBS之CHO細胞(1×10^7 細胞/mL)0.7mL之混合物於冰上冷卻10分鐘,並移至比色管後,以1.5kV、25 μ FD的電量給予脈衝。

於室溫經過10分鐘的回復期後,將經電穿孔之細胞懸浮於含有HT supplement(Invitrogen公司製)1倍濃度之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)40mL內。以同樣的培養基製作50倍稀釋液,並以100 μ L/孔分注於96孔培養用平盤。於二氧化碳培養箱(5%CO₂)培養24小時後,添加Geneticin (Invitrogen公司製)使濃度為0.5mg/mL,並培養2週。

觀測顯示Geneticin耐受性之轉形細胞群落,並將該孔之培養上清中IgM的量依實施例1.6所示的濃度定量法測定。依序擴大培養L612高表現細胞株,以得到L612安定表現細胞株CA02、CA15、CA19、CA20及CA24。

對表現J鏈之細胞株導入基因係如以下所述。將混合有L612表現載體-pCXND3/L612IgM(25 μ g)與J鏈表現載體



五、發明說明 (47)

pCOSII-Zeo/J 鍵(20 μ g) 與懸浮於PBS之CHO細胞(1×10^7 細胞/mL) 0.75mL之混合物於冰上冷卻10分鐘，並移至比色管後，以1.5kV、25 μ FD的電量給予脈衝。

於室溫經過10分鐘的回復期後，將經電穿孔之細胞懸浮於含有HT supplement(Invitrogen公司製)1倍濃度之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)40mL內。

以同樣的培養基製作50倍稀釋液，並以100 μ L/孔分注於96孔培養用平盤。於二氧化碳培養箱(5%CO₂)培養24小時後，添加濃度為0.5mg/mL之Geneticin(Invitrogen公司製)及濃度為0.6mg/mL之Zeocin(Invitrogen公司製)，並培養2週。觀測顯示Geneticin、Zeocin耐受性之轉形細胞群落，並將該孔之培養上清中IgM的量依實施例1.6所示的濃度定量法測定。依序擴大培養L612高表現細胞株，以得到L612安定表現細胞株(CJ15、CJ25、CJ38、CJ45及CJ67)。

1.6 培養上清中IgM濃度之測定

培養上清中IgM濃度之測定依如下方式。將抗人類IgM(BIOSORCE公司)以覆膜緩衝液(coating buffer, 0.1M NaHCO₃、0.02%NaN₃)稀釋至濃度為1 μ g/mL，並以100 μ L/孔之量添加於96孔ELISA用平盤，於4℃反應24小時以上，以進行覆膜。

接著，以潤洗緩衝液清洗後，添加100 μ L/孔量之稀釋緩衝液，於室溫反應1小時以上，以阻斷反應。潤洗緩衝液及稀釋緩衝液之組成分別如下。



五、發明說明 (48)

潤洗緩衝液：

PBS(-)、

0.05% Tween 20

稀釋緩衝液：

50mM Tris、

1mM $MgCl_2$

0.15M NaCl、

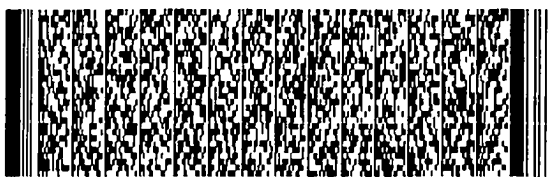
0.05% Tween20、

0.02% NaN_3 、

1% BSA

之後，以100 μ L/孔的量添加將以稀釋緩衝液進行適當稀釋後之培養上清，並於室溫反應1小時。以潤洗緩衝液清洗後，以100 μ L/孔的量添加結合鹼性磷解酶之山羊抗人類IgM(BIOSORCE公司製)(以稀釋緩衝液稀釋4000倍)，並於室溫反應1小時。最後，以潤洗緩衝液清洗後，添加鹼性磷解酶基質(Sigma公司製)，並以分光光度計 Benchmark Plus(商品名)(BioRad公司製)，測定於波長405nm之吸光度(對照波長655nm)。IgM濃度係與L612純化品(Hoon等，Cancer Research 1993;53:5244-5250)比較後算出。

將各L612安定表現細胞株以起始細胞密度為 2×10^5 細胞/mL培養於75cm²培養燒瓶，並依上述方法測定培養上清中之IgM濃度。結果如表1所示。IgM生產量在培養第3日為約20mg/mL、培養第7日為約50mg/mL，單一細胞所顯示之



五、發明說明 (49)

產生能力為5~19pg/cell/day。因IgM在免疫球蛋白中形成多元體，故重組體的表現量低，且大量調製困難，但依據本次的結果，可解明在CHO細胞中可以製作高生產量的重組型IgM表現細胞。

表 1

J鏈之表現	細胞株	培養3日的 生產量(mg/mL)	培養7日的 生產量(mg/mL)	生產能力 (pg/cell/day)
無	CA02	24.1	36.9	14.1
	CA15	11.8	39.7	4.9
	CA19	27.1	62.3	13.1
	CA20	20.2	35.4	10.5
	CA24	25.0	41.5	10.7
有	CJ15	29.4	N.T.	19.4
	CJ25	24.4	N.T.	18.1
	CJ38	14.9	N.T.	12.4
	CJ45	26.4	N.T.	18.7
	CJ67	18.0	N.T.	12.8

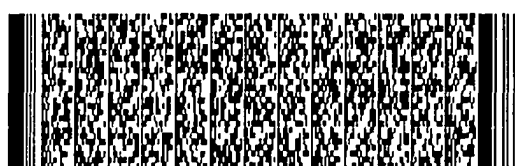
N.T.: 未測定

[實施例2] 對抗神經節糖苷GM2之重組型人類抗體L55的製作

2.1 抗神經節糖苷GM2人類抗體H鏈基因之構建

編碼為結合於神經節糖苷GM2之人類抗體(以下，以L55表示)H鏈的基因係使用由以EB(Epstein-Barr)病毒轉形之B細胞(以下，以L55表現B細胞表示)所萃取之總RNA，並以RT-PCR法放大。關於L55之H鏈可變區基因的鹼基序列，Nishinaka等曾經報告過(Immunogenetics 1998;48:73-75)。

總RNA係使用RNeasy Plant Mini Kits(商品



五、發明說明 (50)

名)(QIAGEN 公司製)從 1×10^7 個之L55表現B細胞中萃取得到。關於IgM H鏈固定區之鹼基序列，係設計為兩條寡核苷酸(LMH-f3、LMH-r3)。LMH-f3(序列識別號:7)係以有義方向，LMH-r3(序列識別號:8)係以反義方向分別合成。

使用總RNA 1 μ g，並以SMART RACE cDNA Amplification Kit(商品名)(CLONTECH公司製)分成5'末端側及3'末端側，將基因片段放大。5'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LMH-r3，3'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LMH-f3。反轉錄反應係於42℃進行1小時30分鐘。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) 5 μ L、
10 $\times$ Universal Primer A Mix(商品名) 5 μ L、
dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、
Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) 1 μ L、
(以上成分皆為CLONTECH公司製)

反轉錄反應產物2.5 μ L、

合成之寡核苷酸LMH-f3或LMH-r3 10pmole。

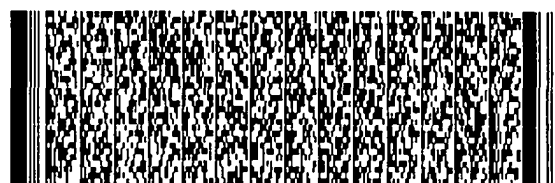
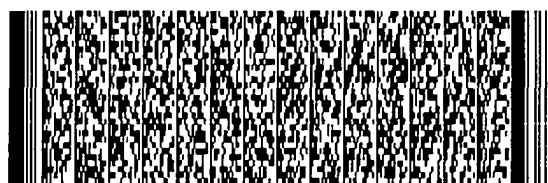
又，反應條件如下所示。

94℃起始溫度30秒

94℃/5秒、72℃/3分鐘為一循環，進行5次

94℃/5秒、70℃/10秒、72℃/3分鐘為一循環，反複進行5次

94℃/5秒、68℃/10秒、72℃/3分鐘為一循環，反複



五、發明說明 (51)

進行25次

最後，將反應產物於72℃加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載體(Promega公司製)上。決定鹼基序列後，將含有5'末端基因之載體以限制酶ApaI(寶酒造公司製)及SacII(寶酒造公司製)分解所得約1.1kbp之片段，與將含有3'末端基因之載體以限制酶NotI(寶酒造公司製)及SacII(寶酒造公司製)分解所得約1.1kbp之片段混合，並選殖至pBluescript KS+載體(東洋紡公司製)上，以得到完全長度之L55 H鏈基因。

為選殖至動物細胞表現用載體，使用合成核苷酸LMH-fxho、LMH-rsal，將完全長度之基因片段放大。LMH-fxho及LMH-rsal之設計分別為：LMH-fxho(序列識別號:11)係將前方引子雜交於L55H鏈基因之5'末端，且具有xhoI限制酶辨識序列及柯札克(Kozak)序列，而LMH-rsal(序列識別號:12)係將後方引子雜交於L55H鏈基因之3'末端，且具有SalI限制酶辨識序列。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

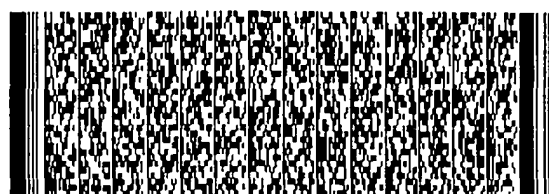
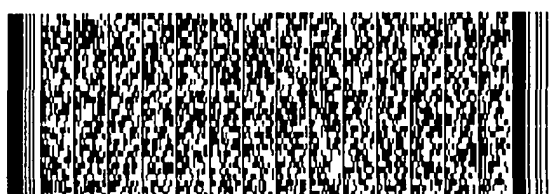
10 $\times$ PCR緩衝液5 μ L、

MgSO₄ 1mM、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

DNA聚合酶KOD-Plus-1單位、

(以上成分皆為東洋紡公司製)



五、發明說明 (52)

含完全長度L55H鏈基因之pBluescript KS+載體
10ng、

合成核苷酸LMH-fxho、LMH-rsa1 10pmole

又，反應條件如下所示。

94℃起始溫度2分鐘

94℃/15秒、55℃/30秒、68℃/3分鐘為一循環，進行
30次

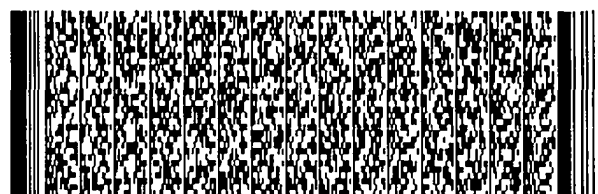
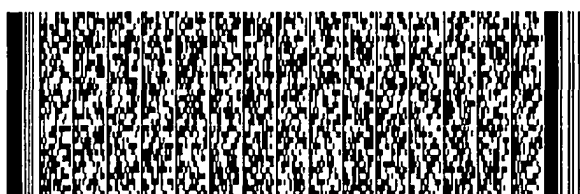
最後，將反應產物於72℃加熱7分鐘。

將放大後之基因片段以限制酶XhoI(寶酒造公司製)及
限制酶SalI(寶酒造公司製)分解後，以QIAquick PCR
Purification Kit(商品名)(QIAGEN公司製)純化，並連結
於pUCAG之限制酶Xho部位，以選殖之。完成之質體命名為
pUCA/L55H。本質體所含之L55H鏈其鹼基序列及胺基酸序
列表示於序列識別號:19及序列識別號:20。

2.2 抗神經節糖苷GM2人類抗體L鏈基因之構建

編碼為L55 L鏈的基因係使用由L612表現B細胞所萃取
之總RNA，並以RT-PCR法放大。關於L55之L鏈可變區基因
的鹼基序列，Nishinaka等曾經報告過(Immunogenetics
1998;48:73-75)。

總RNA係與實施例2.1以同樣方式，從L55表現B細胞中
萃取得到。關於IgM L鏈固定區之鹼基序列，係設計為兩
條寡核苷酸(LML-f1、LML-r1)。LML-f1(序列識別號:9)係
以有義方向，LML-r1(序列識別號:10)係以反義方向分別
合成。使用總RNA 1 μg，並以SMART RACE cDNA



五、發明說明 (53)

Amplification Kit(商品名)(CLONTECH公司製)分成5'末端側及3'末端側，將基因片段放大。5'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LML-r1，3'末端側基因放大時使用合成之寡核苷酸LML-f1。反轉錄反應係於42℃進行1小時30分鐘。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) 5 μ L、

10 $\times$ Universal Primer A Mix(商品名) 5 μ L、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) 1 μ L、

(以上成分皆為CLONTECH公司製)

反轉錄反應產物2.5 μ L、

合成之寡核苷酸LML-f1或LML-r1 10pmole。

又，反應條件如下所示。

94℃起始溫度30秒

94℃/5秒、72℃/3分鐘為一循環，進行5次

94℃/5秒、70℃/10秒、72℃/3分鐘為一循環，反複進行5次

94℃/5秒、68℃/10秒、72℃/3分鐘為一循環，反複進行25次

最後，將反應產物於72℃加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載體(Promega公司製)上。



五、發明說明 (54)

決定鹼基序列後，設計會雜交於5'末端非轉錄區之前方引子-L55-f(序列識別號:23)、會雜交於3'末端非轉錄區之後方引子-L55-r(序列識別號:24)，並進行PCR。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示。

10 $\times$ Advantage 2 PCR緩衝液(商品名) 5 μ L、

10 $\times$ Universal Primer A Mix(商品名) 5 μ L、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

Advantage 2 Polymerase Mix(商品名) 1 μ L、

(以上成分皆為CLONTECH公司製)

反轉錄反應產物2.5 μ L、

合成之寡核苷酸L55-f或L55-r 10pmole。

又，反應條件如下所示：

94 $^{\circ}$ C 起始溫度30秒

94 $^{\circ}$ C/5秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，進行5次

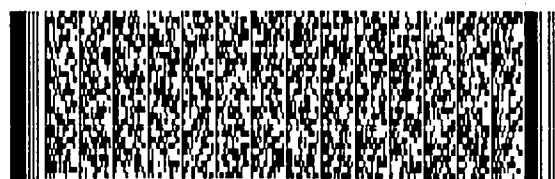
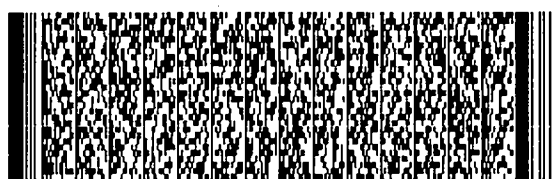
94 $^{\circ}$ C/5秒、70 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，反複進行5次

94 $^{\circ}$ C/5秒、68 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/3分鐘為一循環，反複進行25次

最後，將反應產物於72 $^{\circ}$ C加熱7分鐘。

將PCR產物用QIAquick Gel Extraction Kit(商品名)(QIAGEN公司製)從瓊脂上純化後，選殖至pGEM-T Easy載體(Promega公司製)上。

決定鹼基序列後，使用合成核苷酸LML-feco、LML-rnot將完全長度之基因片段放大。LML-feco(序列識



五、發明說明 (55)

別號:13)設計為前方引子會雜交於L55 L鏈基因的5'末端，且具有EcoRI限制酶辨識序列及柯扎克序列，而LML-rnot(序列識別號:14)設計為後方引子會雜交於L55 L鏈基因的3'末端，且具有NotI限制酶辨識序列。

PCR反應溶液(50 μ L)之組成如下所示：

10 $\times$ PCR緩衝液5 μ L、

MgSO₄ 1mM、

dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 0.2mM、

DNA聚合酶KOD-Plus-1單位、

(以上成分皆為東洋紡公司製)

含L55 L鏈基因之pGEM-T Easy載體 10ng、

合成核苷酸LML-feco、LMLrnot 10pmole

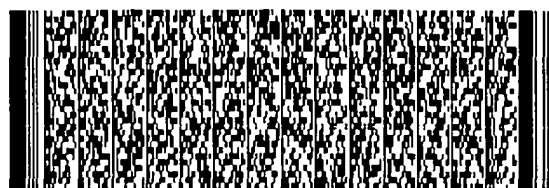
又，反應條件如下所示。

94℃起始溫度2分鐘

94℃/15秒、55℃/30秒、68℃/3分鐘為一循環，進行30次

最後，將反應產物於72℃加熱7分鐘。

將放大後之基因片段以限制酶EcoRI(寶酒造公司製)及限制酶NotI(寶酒造公司製)分解後，以QIAquick PCR Purification Kit(商品名)(QIAGEN公司製)純化，並連結於pCXND3之限制酶EcoRI及NotI切斷部位，以選殖之。所完成之質體命名為pCXND3/L55L。本質體所含之L55L鏈其鹼基序列及胺基酸序列表示於序列識別號:21及序列識別號:22。



五、發明說明 (56)

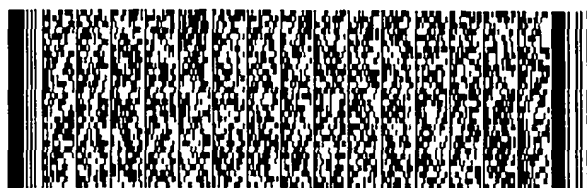
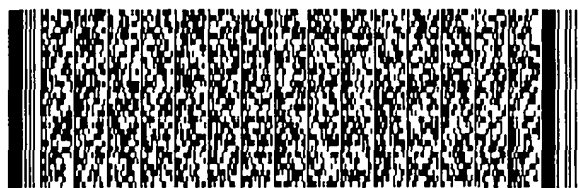
2.3 抗神經節糖苷GM2人類抗體之表現載體之構建
為製作L55表現載體，將pUCAG/L55H以限制酶HindIII(寶酒造公司製)分解所得之約4.0kbp片段連結於pCXND3/L55H之限制酶HindIII(寶酒造公司製)切斷部位，並選殖之。完成之質體命名為pCXND3/L55IgM。本質體可於動物細胞內表現新黴素耐受性基因、DHFR基因及L55基因。

2.4 抗神經節糖苷GM2人類抗體J鏈基因及表現載體之構建

依如下方式使用CHO細胞(DG44株)製作安定表現細胞株。使用Gene Pulser II(Biorad公司製)依電穿孔法導入基因。

對未表現J鏈之細胞株導入基因係如以下所述。將混合有L55表現載體-pCXND3/L55IgM(25 μ g)與懸浮於PBS之CHO細胞(1×10^7 細胞/mL)0.75mL之混合物於冰上冷卻10分鐘，並移至比色管後，以1.5kV、25 μ FD的電量給予脈衝。

於室溫經過10分鐘的回復期後，將經電穿孔之細胞懸浮於含有HT supplement(Invitrogen公司製)1倍濃度之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)40mL內。以同樣的培養基製作50倍稀釋液，並以100 μ L/孔分注於96孔培養用平盤。於二氧化碳培養箱(5%CO₂)培養24小時後，添加Geneticin(Invitrogen公司製)使濃度為0.5mg/mL，並培養2週。



五、發明說明 (57)

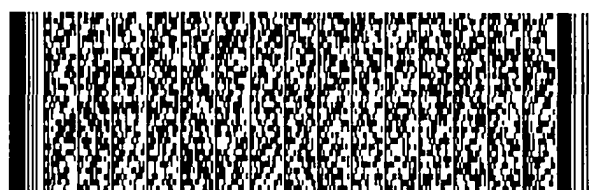
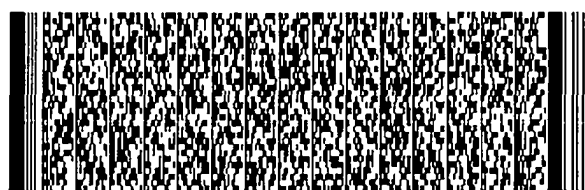
觀測顯示Geneticin耐受性之轉形細胞群落，並將該孔之培養上清中IgM的量依實施例1.6所示的濃度定量法測定。依序擴大培養L55高表現細胞株，以得到L55安定表現細胞株LA24、LA26、LA39、LA66及LA74。

對表現J鏈之細胞株導入基因係如以下所述。將混合有L55表現載體-pCXND3/L55IgM($25\text{ }\mu\text{g}$)與實施例1.4所製作之J鏈表現載體pCOSII-Zeo/J鏈($20\text{ }\mu\text{g}$)與懸浮於PBS之CHO細胞(1×10^7 細胞/mL)0.75mL之混合物於冰上冷卻10分鐘，並移至比色管後，以1.5kV、 $25\text{ }\mu\text{FD}$ 的電量給予脈衝。

於室溫經過10分鐘的回復期後，將經電穿孔之細胞懸浮於含有HT supplement(Invitrogen公司製)1倍濃度之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)40mL內。

以同樣的培養基製作50倍稀釋液，並以 $100\text{ }\mu\text{L}$ /孔分注於96孔培養用平盤。於二氧化碳培養箱($5\%\text{CO}_2$)培養24小時後，添加濃度為 0.5mg/mL 之Geneticin(Invitrogen公司製)及濃度為 0.6mg/mL 之Zeocin(Invitrogen公司製)，並培養2週。觀測顯示Geneticin、Zeocin耐受性之轉形細胞群落，並將該孔之培養上清中IgM的量依實施例1.6所示的濃度定量法測定。依序擴大培養L612高表現細胞株，以得到L55安定表現細胞株(LJ05、LJ23、LJ32、LJ49及LJ61)。

將各L55安定表現細胞株以起始細胞密度為 2×10^5 細胞/mL培養於 75cm^2 培養燒瓶，並依實施例1.6所示方法測定培



五、發明說明 (58)

養上清中之IgM濃度。結果如表1所示。IgM生產量在培養第3日為約7~70mg/mL、培養第7日為約50~150mg/mL，單一細胞所顯示之產生能力為5~40pg/cell/day。

可得到與實施例1.6所示重組型L612產生細胞株為同等或更高的產生量。由此結果，可解明在CHO細胞中可以製作高生產量的重組型IgM表現細胞株。

表2

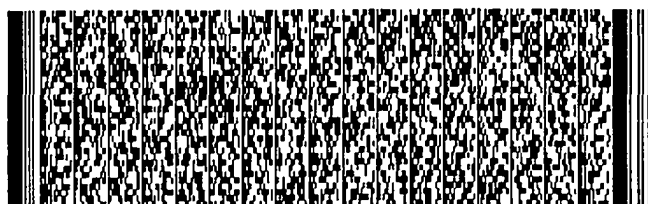
J鏈之表現	細胞株	培養3日的 生產量(mg/mL)	培養7日的 生產量(mg/mL)	生產能力 (pg/cell/day)
無	LA24	30.7	50.6	15.3
	LA26	52.6	97.6	24.4
	LA39	58.2	99.7	29.9
	LA66	51.0	108.8	21.2
	LA74	76.0	159.4	40.7
有	LJ05	44.4	82.5	21.3
	LJ32	17.1	N.T.	8.6
	LJ38	19.8	48.6	11.2
	LJ49	6.9	N.T.	5.2
	LJ61	26.4	53.7	14.9

N.T.: 未測定

[實施例3]

3.1 解析重組型L612(實施例1)及重組型L55(實施例2)之多元體形成

解析重組型L612及重組型L55(實施例2)之多元體係使用非還原SDS-PAGE進行。非還原SDS-PAGE電泳用凝膠係依如下方法製作。於HYBRID MIXER(TOMY)專用之容器內加入30%丙烯醯胺(C%=3.33%)1.80ml、1.50M Tris-HCl pH8.8 3.75mL、miliQ水(商品名)3.39mL、甘油2.25mL並混合，



五、發明說明 (59)

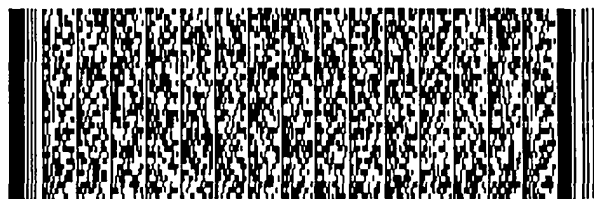
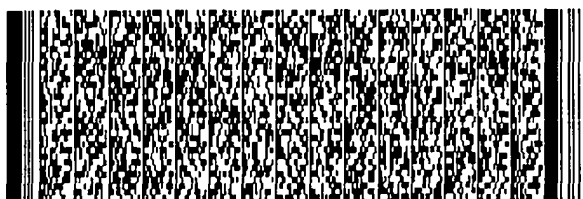
將溶液保溫於50℃。接著，加入2%瓊脂3.75mL，並再度將溶液保溫於50℃。

之後，於室溫靜置1分鐘，並加入TEMED 12 μ L、25%過硫酸銨(APS)50 μ L，以HYBRID MIXER(TOMY)攪拌15秒、脫泡15秒。以即拋式針筒回收溶液，並將溶液流入凝膠平板，於37℃進行1小時丙烯醯胺的聚合反應。之後，於室溫使瓊脂硬化，並將完成的電泳凝膠保存於4℃。

電泳緩衝液係利用將NuPAGE Tris-Acetate 20× running buffer(Invitrogen)以miliQ水稀釋20倍以製作。2×樣本緩衝液係使用125mM Tris-HCl pH6.8、4.0%SDS、30%甘油、0.004%溴酚藍。

將實施例1及實施例2所得到之重組型L612(實施例1、J鏈+及J鏈-)及重組型L55(實施例2、J鏈+及J鏈-)的培養上清用上述電泳凝膠、電泳緩衝液、2×樣本緩衝液，並以固定電壓60V進行13小時的電泳。之後，藉由一次抗體依西方墨點法檢測抗 μ 鏈抗體。西方墨點法依如下方式進行。

將電泳後的凝膠使用半乾方式的點墨裝置，轉印於PVDF膜上。轉印後，使用含有Tween 80為0.05%之脫脂奶進行2小時的點墨。以含有Tween 80為0.05%之Tris-緩衝鹽水清洗後，使用稀釋3000倍之兔子抗人類IgM(DAKO)作為一次抗體，反應1小時。再度清洗後，使用稀釋1000倍之AP-山羊兔子抗IgG(H+L)雙重染色級(ZYMED)作為二次抗體，反應1小時。再度清洗後，使用放大鹼性磷酸酶



五、發明說明 (60)

Immuno-Blot Assist Kit(Bio-Rad) 進行呈色。

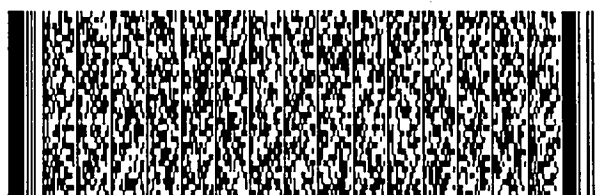
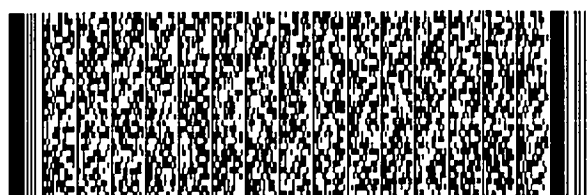
其結果，重組型L612(J鏈+)主要為得到相當於由L612表現B細胞所得到之L612五元體的譜帶(第1圖)。重組型L612(J鏈-)主要為得到相當於由L612表現B細胞所得到之L612六元體的譜帶。關於電泳的各譜帶是五元體或是六元體，已經利用電子顯微鏡確認過。重組型L55亦得到同樣的結果(第2圖)。

由該結果，可解明並確認IgM產生細胞的培養上清中之五元體或六元體。又，解明了表現J鏈(J鏈+)之重組型IgM主要為形成五元體，而不表現J鏈(J鏈-)之重組型IgM主要為形成六元體。藉由控制J鏈之有無，可以分別製作重組型IgM之五元體及六元體。

[實施例4]

4.1 L612表現細胞株中多元體形成比率之分析

與實施例3同樣，進行非還原SDS-PAGE電泳。回收電泳後的凝膠，並將凝膠以10%甲醇、7%乙酸清洗30分鐘以上後，使用Ruby凝膠染色溶液(Bio-Rad)染色3小時以上。染色後，以10%甲醇、7%乙酸將凝膠脫色60分鐘以上。脫色後，用FluorImager 595(Molecular Dynamics)於480nm激發，並於618nm檢測各多元體的譜帶(第3圖)。藉該等，製作各譜帶的密度圖(densitogram)，並求出峰值面積以定量各譜帶之強度。所得到聯合體(aggregate)、六元體(hexamer)、五元體(pentamer)及四元體(tetramer)之比率如表3所示。依本發明之方法，確認可以對IgM之多元體



五、發明說明 (62)

為將抗體L鏈表現單元導入表現載體，將L612CA-L/pBlue之約3.0kb之*SaI* I、*Bam* HI片段選殖於INPEP4-dCMV(MCS)之*Xho* I、*Bgl* II辨識位。此載體命名為L612CA-L4/dCMV。

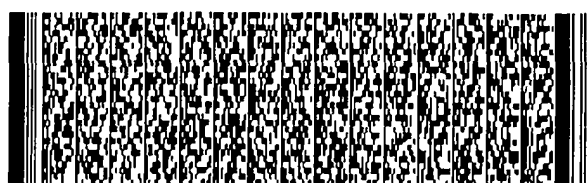
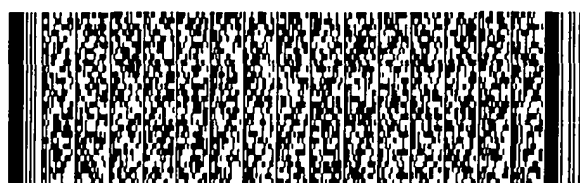
為次選殖抗體H鏈表現單元，將pCXND3/L612IgM之約4.1kb之*SaI* I、*Pst* I片段選殖於pBluescrip II SK⁺之*SaI* I、*Pst* I辨識位。此載體命名為L612CA-H/pBlue。

為將抗體H鏈表現單元導入表現載體，將L612CA-H/pBlue之約4.1kb之*SaI* I、*Bam* HI片段選殖於L612CA-L4/dCMV之*SaI* I、*Bam* HI辨識位。此載體命名為pL612CA4。該質體會於動物細胞內表現新黴素耐受性基因、DHFR基因、L612基因(H鏈、L鏈)。

5.2 電穿孔、Geneticin選擇

對CHO細胞DG44導入基因係藉由電穿孔法進行。將表現質體pL612CA4以限制酶*Pvu* I分解一晚，並以苯酚萃取、氯仿萃取後，以乙醇沉澱純化之，並溶解於TE中。將培養於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)內之細胞與純化之*Pvu* I分解pL612CA4混合，並放入比色管後，以基因導入裝置給予脈衝以導入基因。

導入基因後，將比色管的細胞加入於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)10mL內，並以該培養基適當稀釋後，以100 μ L/孔接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二



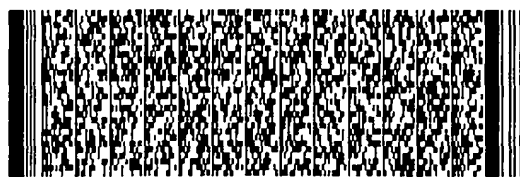
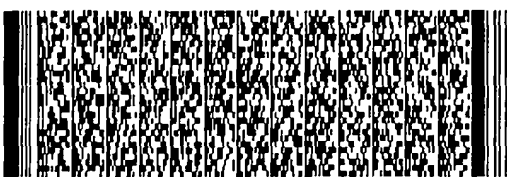
五、發明說明 (63)

氧化碳培養箱(37℃、8%CO₂濃度)內進行培養。於二氧化碳培養箱內培養1日後，在每一孔中加入適量之Geneticin(Invitrogen公司製)，及加入100 μL/孔含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)，並培養至形成群落為止。對所得之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度後，使用入適量之

Geneticin(Invitrogen公司製)及含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)於24孔培養用平盤擴大培養。之後，每隔3~7日進行擴大培養，以選擇L612高產生株。

5.3 MTX選擇

將以Geneticin選擇所取得之L612高產生株懸浮於含適當量MTX(氮甲喋呤)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)，並接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二氧化碳培養箱(37℃、8%CO₂濃度)內進行培養至形成群落。對所得之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度後，於24孔培養用平盤或48孔培養用平盤上擴大培養。之後，每隔3~7日進行擴大培養，以選擇L612高產生株。藉由將MTX濃度階段式升高並重複此操作以誘導基因放大，選擇出表4所示的L612高產生株。



五、發明說明 (64)

表 4

J 鍵表現	細胞株	培養 3 日之 產生量(mg/L)	產生能力 (pg/cell/day)
無	CA4-37-500-3	116.7	194.6

5.4 培養上清中之IgM濃度測定法(1)

HPLC 系統：Waters 公司製 HPLC System Alliance

2487 雙吸收檢測器、2690 分離模組、Millennium 32
第 3.21 版

使用管柱：GPC 管柱 Spuerco 6 HR 10/30
(Amersham Bioscience 公司製)

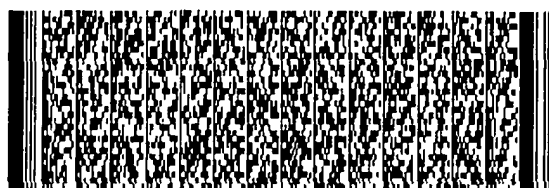
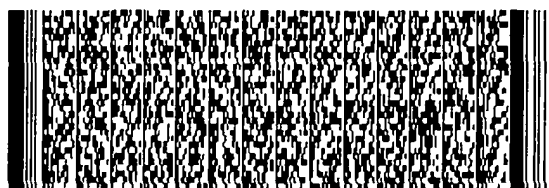
標準品：將凍結之 L612 IgM 純化品熔解後離心，將上清分注並凍結保存，以此作為 GPC 用標準品。

移動相：於 D-PBS 中添加聚環氧乙烷(20)山梨糖醇酐單月桂酯及重氮化鈉，使濃度分別為 0.02%、0.05% 以調製。

HPLC 條件：移動相流量 0.5 mL/min、測定波長 280 nm、試樣注入量 100 μ L。

操作之進行如下。將保溫於 37 $^{\circ}$ C 數分鐘並熔解之 GPC 標準品以分光光度計測定於波長 280 nm 之吸光度，並以該值求出使波長 280 nm 時吸光度為 0.12 之稀釋率。

分析將 GPC 標準品稀釋為所求得稀釋率時之峰值面積，以及注入與適度稀釋之標準品為同容量之未知試樣的峰值面積及其稀釋倍率，以求出未知試樣於 280 nm 之吸光度。由所得之吸光度值與 L612 吸光數 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.4$ ，用以下



五、發明說明 (65)

數學式，求出L612濃度($\mu\text{g/mL}$)。

$$\text{L612濃度}(\mu\text{g/mL}) = \text{吸光度}(\text{Abs280}) / 1.4 \times 100$$

5.5 以不含哺乳動物由來成分之培養基進行選殖。

將以MTX選擇得到之L612高產生株懸浮於含適當量MTX之不含哺乳動物由來成分的培養基(Invitrogen公司製)，並以極限稀釋法稀釋為1cell/200 μL 。將其以100 μL /孔接種於96孔培養用平盤。將以含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之不含哺乳動物由來成分的培養基所培養之DG44株懸浮於含適當MTX之不含哺乳動物由來成分的培養基中，使其濃度為 $1 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 後，以100 μL /孔接種於前述96孔培養用平盤。於二氧化碳培養箱(37°C 、8% CO_2 濃度)內靜置，7日後添加適量Geneticin(Invitrogen公司製)及含適當MTX之不含哺乳動物由來成分的培養基100 μL 後，於二氧化碳培養箱(37°C 、8% CO_2 濃度)內靜置。約2週後，對所得到之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度後，以含適當MTX之不含哺乳動物由來成分的培養基於24孔培養用平盤上擴大培養。之後，每隔3~7日進行擴大培養，最後，依5.4之凝膠過濾層析法，測定培養上清中之IgM濃度，並建立表5所示之L612高產生選殖體。

表5

J鏈表現	選殖體	培養3日之產生量(mg/L)	培養7日之產生量(mg/L)	產生能力(pg/cell/day)
無	PSS-37H3	42.0	337.2	47.0

五、發明說明 (66)

5.6 培養上清中之IgM濃度測定法(2)

HPLC系統：HITACH LaChrom HPLC 裝置(HITACHI L-7120 泵(A,B)、L-7200 自動取樣器、L-7240 UV-VIS 檢測器、L-7610 脫氣器)

數據解析軟體：D-7000 型 Advanced HPLC System Manager(HITACHI)

分析用管柱：TOSHO TSKgel G4000W_{XL} 7.8mmID×300mm(目錄編號08542，管柱編號G0151)

標準品：MABON01R306(與5.4之標準品具有同等品質)。

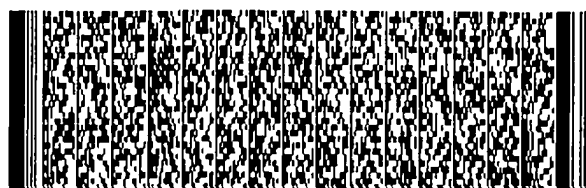
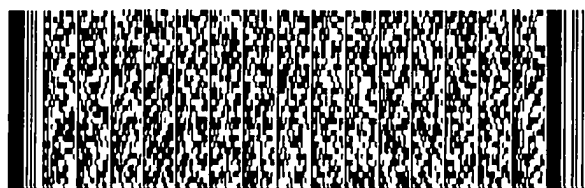
移動相：50mM 磷酸緩衝液、500mM KCl, pH7.4、0.05%NaN₃(pH7.4)

HPLC條件：0.5mL/min(20min)→1.0mL/min、測定波長280nm、試樣注入量100 μL

校正曲線：以1600、800、100 μg/mL 3點製作。

5.7 以不含哺乳動物由來成分之培養基進行L612高產生株之批式培養及饋料式培養

將製作之L612高產生株以起始細胞密度為 2×10^5 cells/mL進行批式培養及饋料式培養，並以凝膠過濾層析法(參見5.4、5.6之方法)測定培養上清中之IgM濃度。使用不含哺乳動物由來成分之培養基，且批式培養中以酵母萃取物作為水解物，饋料式培養中使用魚肉萃取物作為水解物。關於增殖因子，批式培養中使用胰島素，饋料式培養中使用胰島素及類胰島素增殖因子-I。批式培養中之



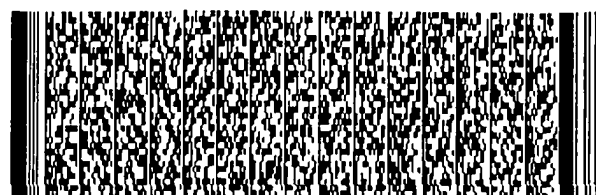
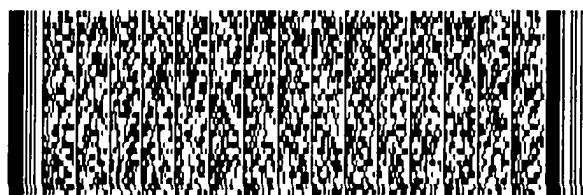
五、發明說明 (67)

L612 產生量在培養第6日為269.9mg/L(依5.4的方法測定)。另一方面，饋料式培養中之L612產生量在培養第6日為374.4mg/L、培養第14日為1669.1mg/L(依5.6的方法測定)。為使IgM在免疫球蛋白中形成多元體故重組體的表現量低，大量調製為困難的，但藉由使用水解物及饋料式培養法，解明了可在CHO細胞中調製高產生量之重組型IgM。[實施例6]以單一之表現載體製作五元體L612產生株

6.1 表現質體pL612pentaCA4之構建

將來自L612CA-H/pBlue之約4.1kb之SalI-BamHI之抗體H鏈表現單元轉殖於INPEP4-dCMV(MCS)之XhoI、BglII辨識位，以製作L612CA-H3/dCMV。將來自L612CA-H3/dCMV之約3.0kb之BamHI-SalI之抗體L鏈表現單元轉殖於INPEP4-dCMV(MCS)之BamHI、SalI辨識位，以製作pL612CA3。

為構建抗體J鏈表現單元，以pCOSII-Zeo/J chain為模板，以序列識別號27:GAGGAATTCCACCATGAAGAACC及序列識別號28:GAGGCGGCCGCTTAGTCAGGATAGCAG為引子，藉由PCR反應放大抗體J鏈基因，並轉殖於pCRBlunt II-TOP0(Invitrogen公司製)。以pSV2-dhfr(Subramani等, Mole. Cell. Biol. 1981;1:854-864)為模板，以序列識別號29:AAAAGCGGCCGCGATCATAATCAGCCATACCA及序列識別號30:AAAAC TCGAGAAGCTTAGACATGATAAGATACATTG為引子，藉由PCR反應放大SV40之polyA訊息基因，並轉殖於pT7-Blue(Novagen公司製)。



五、發明說明 (69)

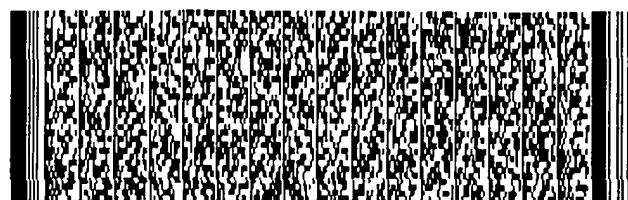
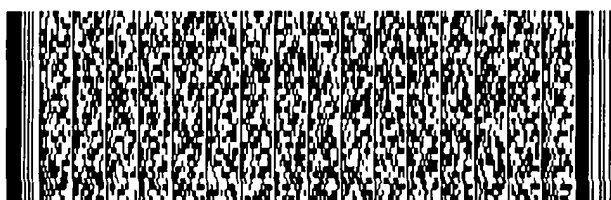
(37 °C、8%CO₂ 濃度)內進行培養1日後，加入適量之 Geneticin(Invitrogen 公司製)，及加入等量含1倍濃度 HT supplement(Invitrogen 公司製)之 CHO-S-SFMII 培養基 (Invitrogen 公司製)，並培養至形成群落為止。對所得之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度，以選擇高產生株，並藉由每隔3~7日依序進行擴大培養，以得到L612產生株CA4-119及CA4-139。

6.3 多元體形成之分析

將Geneticin選擇得到之細胞株於S100螺旋燒瓶以起始細胞密度 2×10^5 cell/mL培養3日，使用培養上清，依實施例3所示方法實施非還原SDS-PAGE，並以抗 μ 鏈抗體作為一次抗體，實施西方墨點法。其結果，pL612pentaCA4導入株所得之譜帶主要為相當於由L612表現B細胞得到之L612之五元體，而相當於六元體之譜帶則未檢測出(第4圖)。由此解明了將J鏈表現單位及H鏈及L鏈表現單位置於單一之鏈表現載體上，藉由適當控制J鏈對於H鏈及L鏈表現之表現水平，可主要生成五元體L612。

[實施例7] 重組型L612之CDC活性

於經⁵¹Cr-鉻酸鈉放射性標記之目標細胞M1融合瘤細胞 1×10^4 /50 μ L/孔內添加以HAVB適度稀釋之抗體溶液50 μ L/孔，以使重組型L612(J鏈-;CA19)或重組型L612(J鏈+;CJ45)之抗體最終濃度各為0.16、0.8、4、20、100 μ g/mL，再於冰上靜置60分鐘。接著，於各孔中逐一添加人類由來血漿100%乃至於全血100 μ L以作為補體源，於5%二



五、發明說明 (70)

氧化碳培養箱中以37℃靜置90分鐘。離心(1000rpm、5分鐘、4℃)後，從各孔各回收上清100 μ L，並以 γ 計數器(COBRA II AUTO-GAMMA, MODEL D5005, Packard Instrument company)測定游離放射活性(第5圖)。CDC活性，即細胞傷害活性(%)係藉由 $(A-C)/(B-C) \times 100$ 計算出。A表示各孔之放射活性(cpm)，B表示在添加有目標細胞懸浮液50 μ L、10%NP-40水溶液(Nonidet^RP-40, Code No. 252-23，納卡萊得司克(股)公司)50 μ L、HAVB 130 μ L之孔其放射活性(cpm)平均值、C表示在添加有目標細胞懸浮液50 μ L、HAVB 150 μ L之孔其放射活性(cpm)平均值。試驗進行三重複，以算出專一性鉻游離率之平均值以及標準偏差。於任一者之條件皆為重組型L612(CA19)比L612誘導出較強之CDC活性，而誘導50%細胞溶解之濃度比為5.8~5.9倍。又，未觀察到因與血球共存導致CDC活性顯著減弱。

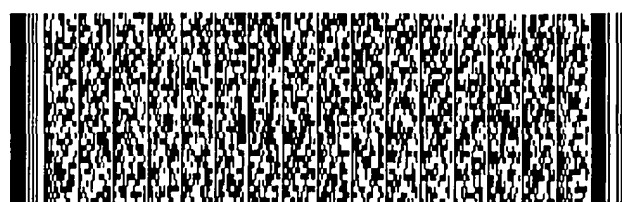
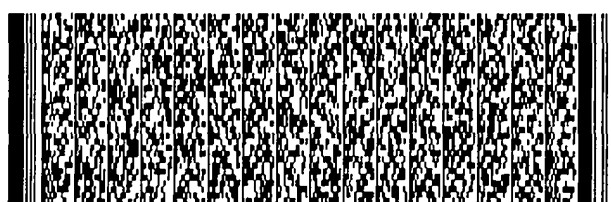
[實施例8]製作優先產生六元體IgM之細胞株(1)

8.1 表現質體pL612CA3之構建

將來自L612CA-H/pBlue之約4.1kb之SalI-BamHI之抗體H鏈表現單元轉殖於INPEP4-dCMV(MCS)之XhoI、BglII辨識位，以製作L612CA-H3/dCMV。將來自L612CA-H3/dCMV之約3.0kb之BamHI-SalI之抗體L鏈表現單元轉殖於INPEP4-dCMV(MCS)之BamHI、SalI辨識位，以製作pL612CA3。

8.2 電穿孔、Geneticin選擇

對CHO細胞DG44導入基因係藉由電穿孔法進行。將表



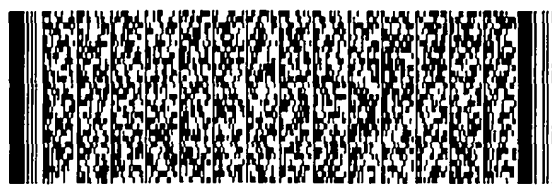
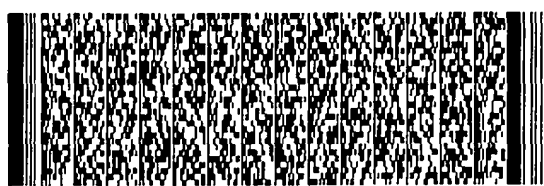
五、發明說明 (71)

現質體pL612CA3以限制酶Pvu I分解一晚，並以苯酚萃取、氯仿萃取後，以乙醇沉澱純化之，並溶解於TE中。將培養於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)內之細胞與純化之Pvu I分解pL612CA3混合，並放入比色管後，以基因導入裝置給予脈衝以導入基因。

導入基因後，將比色管的細胞加入於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)10mL內，並以該培養基適當稀釋後，接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二氧化碳培養箱(37℃、8%CO₂濃度)內進行培養1日後，加入適量之Geneticin(Invitrogen公司製)，及加入等量含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)，並培養至形成群落為止。對所得到之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度，以選擇高產生株，並藉由每隔3~7日依序進行擴大培養，以得到L612產生株CA3-1016。

8.3 MTX 選擇

將以Geneticin選擇所取得之L612高產生株懸浮於含適當量MTX(氮甲喋呤)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)，並接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二氧化碳培養箱(37℃、8%CO₂濃度)內進行培養至形成群落。對所得到之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度，以選擇高產生株，再藉由每隔3~7



五、發明說明 (72)

日進行擴大培養，以得到L612產生株CA3-1016-50-11。

8.4 以不含哺乳動物由來成分之培養基進行L612高產生株之批式培養

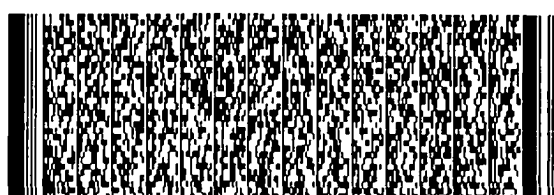
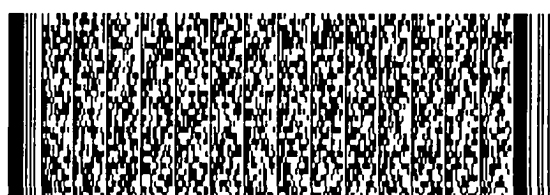
將製作之L612產生株CA3-1016-50-11以起始細胞密度為 $2\sim 3 \times 10^5$ cells/mL進行批式培養，並以實施例5之5.4所記載之凝膠過濾層析法測定培養上清中之IgM濃度。使用不含哺乳動物由來成分之培養基，且以酵母萃取物作為水解物。關於增殖因子，使用胰島素。批式培養中之L612產生量在培養第3日為56.0mg/L。

8.5 純化方法

將批式培養得到之培養上清裝載於以含150mMNaCl之20mM磷酸鈉緩衝液(pH7.4)平衡化之陰離子交換樹脂充填管柱，以吸附L612，接著，以該平衡化緩衝液清洗後，以含350mMNaCl之20mM磷酸鈉緩衝液(pH7.4)洗提L612。將該洗提部分裝載於以含10mM磷酸鈉緩衝液(pH7.1)平衡化之羧基磷灰石充填管柱，以吸附L612，接著，以該平衡化緩衝液清洗後，以含350mM磷酸鈉緩衝液(pH7.1)洗提L612。進行該等2項管柱層析以分離純化雜質後，將得到之L612部分以含300mMNaCl之20mM乙酸緩衝液(pH6.0)作為移動相，以膠體過濾進行聯合體之分離去除。將膠體過濾得到之目標部分以0.2 μ m過濾膜過濾，以作為純化之L612部分。

[實施例9]製作優先產生六元體IgM之細胞株(2)

9.1 電穿孔、Geneticin選擇



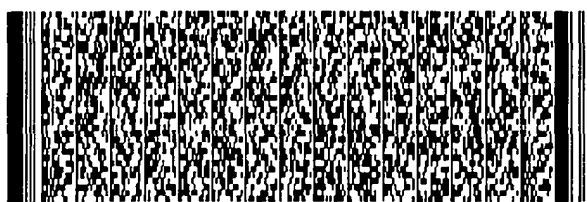
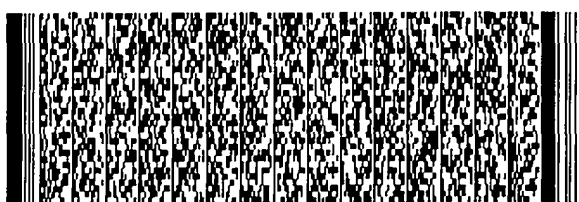
五、發明說明 (73)

對CHO細胞DG44導入基因係藉由電穿孔法進行。將表現質體pCXND3/L612IgM以限制酶Pvu I分解一晚，並以苯酚萃取、氯仿萃取後，以乙醇沉澱純化之，並溶解於TE中。將培養於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)內之細胞與純化之Pvu I分解pCXND3/L612IgM混合，並放入比色管後，以基因導入裝置給予脈衝以導入基因。

導入基因後，將比色管的細胞加入於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)80mL內，並以該培養基適當稀釋後，接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二氧化碳培養箱(37℃、8%CO₂濃度)內進行培養至形成群落為止。對所得之單一群落，依實施例1之1.6所記載的方法測定培養上清中之IgM濃度，以選擇高產生株，並藉由每隔3~7日依序進行擴大培養，以得到L612產生株CA3-1016。

9.2 以不含哺乳動物由來成分之培養基進行L612高產生株之連續批式培養

將製作之L612產生株DG44(HT-)-30以起始細胞密度為 $2\sim3\times 10^5$ cells/mL進行連續批式培養，並以實施例5之5.4所記載之凝膠過濾層析法測定培養上清中之IgM濃度。使用不含哺乳動物由來成分之培養基，且以酵母萃取物作為水解物。關於增殖因子，使用胰島素。每次3日4次之批式培養中L612產生量各為28.7mg/L、32.0mg/L、25.7mg/L、22.2mg/L。



五、發明說明 (74)

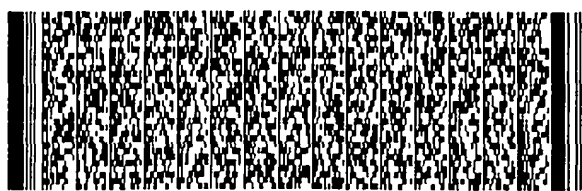
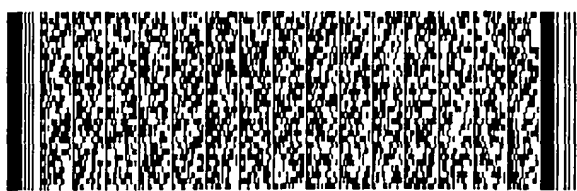
9.3 純化方法

將4次之批式培養得到之培養上清分別裝載於以含150mMNaCl之20mM磷酸鈉緩衝液(pH7.4)平衡化之陰離子交換樹脂充填管柱，以吸附L612，接著，以該平衡化緩衝液清洗後，以含350mMNaCl之20mM磷酸鈉緩衝液(pH7.4)洗提L612。將該洗提部分裝載於以含10mM磷酸鈉緩衝液(pH7.1)平衡化之羥基磷灰石充填管柱，以吸附L612，接著，以該平衡化緩衝液清洗後，以含350mM磷酸鈉緩衝液(pH7.1)洗提L612。進行該等2項管柱層析以分離純化雜質後，將得到之L612部分以含300mMNaCl之20mM乙酸緩衝液(pH6.0)作為移動相，以膠體過濾進行聯合體之分離去除。4次之各純化L612以實施例5之5.4所記載之凝膠過濾層析法測定回收率分別為83.7%、45.6%、63.6%、75.6%。將4次之膠體過濾之目標部分以0.2 μ m過濾膜過濾，以作為純化之L612部分。

[實施例10] 優先產生六元體IgM之細胞株中多元體形成比率之分析

分別對於實施例8及實施例9所得到之純化L612部分，以與實施例4所記載之同樣方法分析IgM多元體形成比率。惟，將電泳時之凝膠組成及電泳緩衝液改變為以所示。

SDS-PAGE用電泳凝膠係將30%丙烯醯胺(acrylamide:N,N'-methylenebisacrylamide=29:1)1.85mL、1.50M三(羥甲基)氨基甲烷乙酸鹽pH7.0 3.75mL、miliQ水3.34mL、甘油2.25mL於HYBRID MIXER(TOMY)專用



五、發明說明 (75)

容器內混合，並將溶液於50℃保溫。然後，加入2.0%瓊脂3.75mL，再度於50℃保溫。

之後，於室溫放置1分鐘，並添加TEMED 12 μ L、25%過硫酸銨(APS)50 μ L，於HYBRID MIXER(TOMY)攪拌15秒，脫泡15秒。以拋棄式針筒回收溶液，並將溶液流入凝膠平盤，於37℃進行1小時之丙烯醯胺聚合反應。之後於室溫使瓊脂凝固，並將完成之電泳凝膠保存於4℃。

電泳緩衝液係藉由將三(羥基甲基)胺基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)6.06g、Tricine8.96g及SDS 1g以miliQ水調整容積至1000mL以調製。

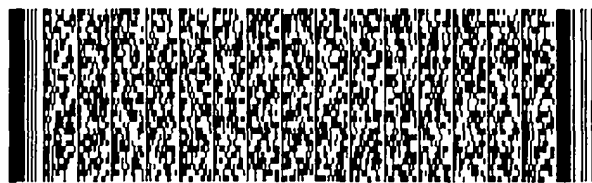
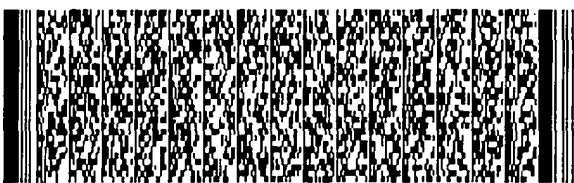
聯合體(aggregate)、六元體(hexamer)、五元體(pentamer)及四元體(tetramer)之比率如表6所示。

表6

	J鏈	聯合體 (aggregate)	六元體 (hexamer)	五元體 (pentamer)	四元體 (tetramer)
CA3-1016-50-11	-	13%	53%	27%	7%
DG44(HT-)-30	-	11%	76%	9%	4%

[產業上之可利用性]

本發明提供IgM生產能力高的細胞。依據本發明所構建之IgM產生細胞與依例如細胞融合法所建立之IgM產生細胞相比，具有較高的IgM產生能力。IgM與IgG不同，具有五元體或六元體等多元體構造。因此，欲使單位細胞之產生量提高一般而言較IgG為困難。亦即，依本法明使IgM產



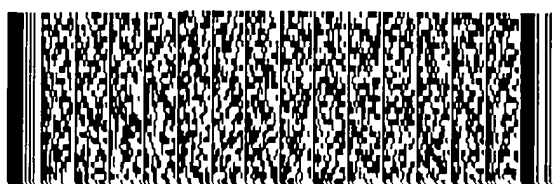
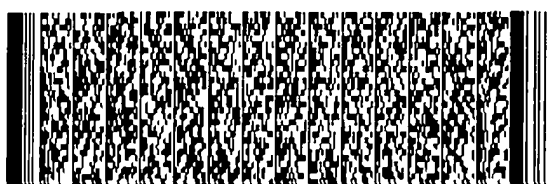
五、發明說明 (76)

生能力提高之IgM產生細胞或者利用該細胞之IgM產生方法可以說是解決了極為困難的課題的成果。

又，本發明提供五元體IgM及六元體IgM之產生方法。已知IgM分子中存在有五元體及六元體的構造。但是，並不知道用於製造具有任一者構造之IgM之方法。本發明藉由轉形時所利用之IgM基因及是否有J鏈，成供的優先產生具有五元體或六元體任一者構造之IgM。

依該方式所產生之六元體IgM確認了比起產生之五元體IgM，具有較強的細胞阻害作用。本發明為產生六元體構造之重組人類IgM，且使用人類補體以首次呈現重組人類IgM之強力細胞阻害作用。依此方式，本發明可以優先製造六元體構造之IgM，並對於得到利用IgM之細胞阻害作用的之抗體醫藥的方法而言是理想的。

再者，本發明提供可解析五元體及六元體IgM之方法。周知的方法在辨別IgM多元體構造上是困難的。若依本發明之解析方法，可以正確辨別IgM之多元體構造。利用本發明之IgM解析方法，可以正確知道依某製造方法所得到之IgM中五元體或六元體所佔的比例。了解具有某構造之IgM所佔的比例對於IgM製造技術之評價是重要的。而且，本發明之解析方法不需要RI。不需要RI之解析方法對醫藥品的各製造過程進行評價方面是有用的。



圖式簡單說明

【圖示簡單說明】

第1圖表示重組型L612之培養上清的西方墨點法結果照片。左(J鏈+)為J鏈表現轉形細胞之培養上清解析結果，右(J鏈-)為未導入J鏈基因之轉形細胞之培養上清解析結果。各線分別為對應於以下試樣之結果。

marker：分子量標記

bulk：L612純化品

左邊照片(J鏈+)之CJ15、CJ25、CJ38、CJ45及CJ67分別表示實施例1.5所得之L612安定表現細胞株之培養上清結果。

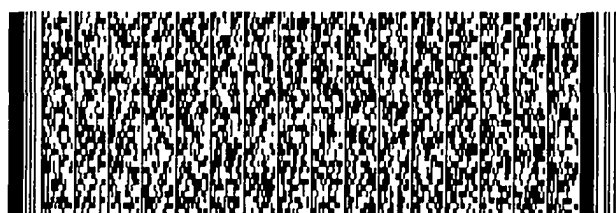
右邊照片(J鏈-)之CA02、CA15、CA19、CA20及CA24分別表示實施例1.5所得之L612安定表現細胞株之培養上清結果。

第2圖表示重組型L55之培養上清的西方墨點法結果照片。左(J鏈+)為未導入J鏈基因之轉形細胞之培養上清解析結果，右(J鏈-)為J鏈表現轉形細胞之培養上清解析結果。各線分別為對應於以下試樣之結果。

St：L55純化品

左邊照片(J鏈+)之05、23、32、49及61分別表示實施例2.3所得之L55安定表現細胞株LJ05、LJ23、LJ32、LJ49及LJ61之培養上清結果。

右邊照片(J鏈-)之24、26、39、66及74分別表示實施例2.4所得之L55安定表現細胞株LA24、LA26、LA39、LA66及LA74之培養上清結果。



圖式簡單說明

第3圖表示重組型L612之培養上清中各多元體之檢測結果照片。各線分別為對應於以下試樣之結果。

L612：L612純化品之結果。

CA19：實施例1.5所得到之L612安定表現細胞株CA19之培養上清結果。

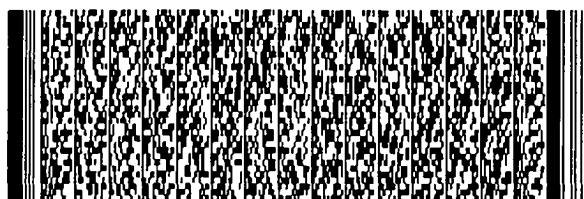
CJ45：實施例1.5所得到之L612安定表現細胞株CJ45之培養上清結果。

第4圖表示pL612pentaCA4導入株之多元體形成解析結果照片。

第5圖表示重組型L612之細胞阻害活性測定結果圖。上圖表示加入全血以作為補體原之情形，下圖表示添加人類由來血漿100%之情形。縱軸表示由標的細胞所專一性釋出之 C^{51} 的比例(%)，橫軸表示抗體濃度($\mu\text{g/mL}$)。

【主要元件符號說明】

無



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
HUMAN MONOCLONALS INTERNATIONAL

<120> Method for producing of IgM by transfect cells and determination thereof

<130> C1-A0223P

<150> US 60/487,333

<151> 2003-07-15

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1779

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1779)

<223>

<400> 1

atg gag ttt ggg ctg agc tgg ctt ttt ctt gtg gct att tta aaa ggt	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
1 5 10 15	

gtc cag tgt gag gtg cag ctg ttg gat tct ggg gga ggc ttg gta cag	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
20 25 30	

cct ggg ggg tgc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt	144
Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	

agc agc tgt gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg	192
Ser Ser Cys Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	

gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca	240
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala	
65 70 75 80	

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aaa tcc aag aac	288
---	-----

Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	
				85					90					95		
acg	ttg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gcc	gta	336
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
tat	tac	tgt	gcg	aaa	ggc	ggc	aac	gat	att	ttg	act	ggc	tat	tat	gct	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ala	
		115					120					125				
tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggg	agt	gca	tcc	gcc	432
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	
	130					135					140					
cca	acc	ctt	ttc	ccc	ctc	gtc	tcc	tgt	gag	aat	tcc	ccg	tcg	gat	acg	480
Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	
145					150				155						160	
agc	agc	gtg	gcc	gtt	ggc	tgc	ctc	gca	cag	gac	ttc	ctt	ccc	gac	tcc	528
Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	
			165					170						175		
atc	act	ttc	tcc	tgg	aaa	tac	aag	aac	aac	tct	gac	atc	agc	agc	acc	576
Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	
		180					185					190				
cgg	ggc	ttc	cca	tca	gtc	ctg	aga	ggg	ggc	aag	tac	gca	gcc	acc	tca	624
Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	
		195				200						205				
cag	gtg	ctg	ctg	cct	tcc	aag	gac	gtc	atg	cag	ggc	aca	gac	gaa	cac	672
Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His	
	210					215					220					
gtg	gtg	tgc	aaa	gtc	cag	cac	ccc	aac	ggc	aac	aaa	gaa	aag	aac	gtg	720
Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	
225				230					235					240		
cct	ctt	cca	gtg	att	gct	gag	ctg	cct	ccc	aaa	gtg	agc	gtc	ttc	gtc	768
Pro	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	
			245					250						255		
cca	ccc	cgc	gac	ggc	ttc	ttc	ggc	aac	ccc	cgc	aag	tcc	aag	ctc	atc	816
Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	
		260					265					270				
tgc	cag	gcc	acg	ggc	ttc	agt	ccc	cgg	cag	att	cag	gtg	tcc	tgg	ctg	864

Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	
		275					280					285				
cgc	gag	ggg	aag	cag	gtg	ggg	tct	ggc	gtc	acc	acg	gac	cag	gtg	cag	912
Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	
	290					295				300						
gct	gag	gcc	aaa	gag	tct	ggg	ccc	acg	acc	tac	aag	gtg	acc	agc	aca	960
Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	
305					310					315					320	
ctg	acc	atc	aaa	gag	agc	gac	tgg	ctc	ggc	cag	agc	atg	ttc	acc	tgc	1008
Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Gly	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	
			325						330					335		
cgc	gtg	gat	cac	agg	ggc	ctg	acc	ttc	cag	cag	aat	gcg	tcc	tcc	atg	1056
Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	
			340					345					350			
tgt	gtc	ccc	gat	caa	gac	aca	gcc	atc	cgg	gtc	ttc	gcc	atc	ccc	cca	1104
Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	
		355					360					365				
tcc	ttt	gcc	agc	atc	ttc	ctc	acc	aag	tcc	acc	aag	ttg	acc	tgc	ctg	1152
Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	
	370					375					380					
gtc	aca	gac	ctg	acc	acc	tat	gac	agc	gtg	acc	atc	tcc	tgg	acc	cgc	1200
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	
385					390					395					400	
cag	aat	ggc	gaa	gct	gtg	aaa	acc	cac	acc	aac	atc	tcc	gag	agc	cac	1248
Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	
			405						410					415		
ccc	aat	gcc	act	ttc	agc	gcc	gtg	ggt	gag	gcc	agc	atc	tgc	gag	gat	1296
Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	
			420					425					430			
gac	tgg	aat	tcc	ggg	gag	agg	ttc	acg	tgc	acc	gtg	acc	cac	aca	gac	1344
Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	
		435					440					445				
ctg	ccc	tgc	cca	ctg	aag	cag	acc	atc	tcc	cgg	ccc	aag	ggg	gtg	gcc	1392
Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	
	450					455					460					
ctg	cac	agg	ccc	gat	gtc	tac	ttg	ctg	cca	cca	gcc	cgg	gag	cag	ctg	1440

4/24

Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	
465					470					475					480	
aac	ctg	cgg	gag	tcg	gcc	acc	atc	acg	tgc	ctg	gtg	acg	ggc	ttc	tct	1488
Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	
				485					490					495		
ccc	gcg	gac	gtc	ttc	gtg	cag	tgg	atg	cag	agg	ggg	cag	ccc	ttg	tcc	1536
Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	
			500					505					510			
ccg	gag	aag	tat	gtg	acc	agc	gcc	cca	atg	cct	gag	ccc	cag	gcc	cca	1584
Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	
		515					520					525				
ggc	cgg	tac	ttc	gcc	cac	agc	atc	ctg	acc	gtg	tcc	gaa	gag	gaa	tgg	1632
Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	
	530					535				540						
aac	acg	ggg	gag	acc	tac	acc	tgc	gtg	gtg	gcc	cat	gag	gcc	ctg	ccc	1680
Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	
545					550					555					560	
aac	agg	gtc	acc	gag	agg	acc	gtg	gac	aag	tcc	acc	ggt	aaa	ccc	acc	1728
Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys	Pro	Thr	
				565				570					575			
ctg	tac	aac	gtg	tcc	ctg	gtc	atg	tcc	gac	aca	gct	ggc	acc	tgc	tac	1776
Leu	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Thr	Ala	Gly	Thr	Cys	Tyr	
			580					585					590			
tga																1779

<210> 2
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

5/24

Ser	Ser	Cys	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
50						55					60				
Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala
65					70					75					80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn
				85					90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ala
		115					120					125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala
	130					135					140				
Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr
145					150					155					160
Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser
				165					170					175	
Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr
			180					185					190		
Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser
		195					200					205			
Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His
	210					215					220				
Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val
225					230					235					240
Pro	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val
				245					250					255	
Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile
			260					265					270		
Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu
		275					280					285			
Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln
	290					295					300				

6/24

Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr
305 310 315 320

Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys
325 330 335

Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met
340 345 350

Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro
355 360 365

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
385 390 395 400

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His
405 410 415

Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp
420 425 430

Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp
435 440 445

Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala
450 455 460

Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu
465 470 475 480

Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser
485 490 495

Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser
500 505 510

Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro
515 520 525

Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp
530 535 540

Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro
545 550 555 560

7/24

Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr
565 570 575

Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
580 585 590

<210> 3
<211> 723
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(723)
<223>

<400> 3
atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct 96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt 144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag 192
Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 240
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat 288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat 336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
100 105 110

tac tgt cag caa tat tat agt act cct ccg acg ttc ggc caa ggg acc 384
Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

8/24

aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432
Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

tag 723

<210> 4
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

9/24

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 5
<211> 480
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(480)
<223>

<400> 5
atg aag aac cat ttg ctt ttc tgg gga gtc ctg gcg gtt ttt att aag
Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys
1 5 10 15 48

10/24

gct gtt cat gtg aaa gcc caa gaa gat gaa agg att gtt ctt gtt gac 96
Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp
20 25 30

aac aaa tgt aag tgt gcc cgg att act tcc agg atc atc cgt tct tcc 144
Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser
35 40 45

gaa gat cct aat gag gac att gtg gag aga aac atc cga att att gtt 192
Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val
50 55 60

cct ctg aac aac agg gag aat atc tct gat ccc acc tca cca ttg aga 240
Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg
65 70 75 80

acc aga ttt gtg tac cat ttg tct gac ctc tgt aaa aaa tgt gat cct 288
Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro
85 90 95

aca gaa gtg gag ctg gat aat cag ata gtt act gct acc cag agc aat 336
Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn
100 105 110

atc tgt gat gaa gac agt gct aca gag acc tgc tac act tat gac aga 384
Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg
115 120 125

aac aag tgc tac aca gct gtg gtc cca ctc gta tat ggt ggt gag acc 432
Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr
130 135 140

aaa atg gtg gaa aca gcc tta acc cca gat gcc tgc tat cct gac taa 480
Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
145 150 155

<210> 6
<211> 159
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys
1 5 10 15

Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp
20 25 30

11/24

Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser
35 40 45

Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val
50 55 60

Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg
65 70 75 80

Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro
85 90 95

Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn
100 105 110

Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg
115 120 125

Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr
130 135 140

Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
145 150 155

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 7

ccaacggcaa caaagaaaag aacg

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 8

aacatgctct ggccgagcca gtcg

24

<210> 9

12/24

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 9
gcaagtccag ccagagtgtt ttat

24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 10
ctgtccttgc tgcctgctc tgtg

24

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11
aacagctcga gccaccatgg agtttgggct gag

33

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12
agcggccagc cgccccgagc ctgtcgacag gc

32

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence

 <400> 13
 atagaattcc accatggtgt tgcagaccca gg 32

 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence

 <400> 14
 ggagcaggcg gccgcacttc tccctctaac 30

 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> an artificially synthesized sequence

 <400> 15
 accattgaga accagatttg tgta 24

 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> an artificially synthesized sequence

 <400> 16
 tgtgtagcac ttgtttctgt cata 24

 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence

 <400> 17

atgaattcca ccatgaagaa ccatttgc 28

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18
tatctagatt agtcaggata gcaggc 26

<210> 19
<211> 1788
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1788)
<223>

<400> 19
atg gag ttt ggg ctg agc tgg ctt ttt ctt gtg gct att tta aaa ggt 48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag 96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt 144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

agc agc tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt tat acc aca tac tac gca 240
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

15/24

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tat tac tgt gcc aaa aaa ccg ggg gac tat ggt tgc ggg agt tat tac Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Pro Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr 115 120 125	384
ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg agt Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser 130 135 140	432
gca tcc gcc cca acc ctt ttc ccc ctc gtc tcc tgt gag aat tcc ccg Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro 145 150 155 160	480
tgc gat acg agc agc gtg gcc gtt ggc tgc ctc gca cag gac ttc ctt Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu 165 170 175	528
ccc gac tcc atc act ttc tcc tgg aaa tac aag aac aac tct gac atc Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile 180 185 190	576
agc agc acc cgg ggc ttc cca tca gtc ctg aga ggg ggc aag tac gca Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala 195 200 205	624
gcc acc tca cag gtg ctg ctg cct tcc aag gac gtc atg cag ggc aca Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr 210 215 220	672
gac gaa cac gtg gtg tgc aaa gtc cag cac ccc aac ggc aac aaa gaa Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu 225 230 235 240	720
aag aac gtg cct ctt cca gtg att gct gag ctg cct ccc aaa gtg agc Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser 245 250 255	768
gtc ttc gtc cca ccc cgc gac ggc ttc ttc ggc aac ccc cgc aag tcc Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser 260 265 270	816
aag ctc atc tgc cag gcc acg ggt ttc agt ccc cgg cag att cag gtg Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val 275 280 285	864

16/24

tcc tgg ctg cgc gag ggg aag cag gtg ggg tct ggc gtc acc acg gac Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp 290 295 300	912
cag gtg cag gct gag gcc aaa gag tct ggg ccc acg acc tac aag gtg Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val 305 310 315 320	960
acc agc aca ctg acc atc aaa gag agc gac tgg ctc agc cag agc atg Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met 325 330 335	1008
ttc acc tgc cgc gtg gat cac agg ggc ctg acc ttc cag cag aat gcg Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala 340 345 350	1056
tcc tcc atg tgt gtc ccc gat caa gac aca gcc atc cgg gtc ttc gcc Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala 355 360 365	1104
atc ccc cca tcc ttt gcc agc atc ttc ctc acc aag tcc acc aag ttg Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu 370 375 380	1152
acc tgc ctg gtc aca gac ctg acc acc tat gac agc gtg acc atc tcc Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser 385 390 395 400	1200
tgg acc cgc cag aat ggc gaa gct gtg aaa acc cac acc aac atc tcc Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser 405 410 415	1248
gag agc cac ccc aat gcc act ttc agc gcc gtg ggt gag gcc agc atc Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile 420 425 430	1296
tgc gag gat gac tgg aat tcc ggg gag agg ttc acg tgc acc gtg acc Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr 435 440 445	1344
cac aca gac ctg ccc tcg cca ctg aag cag acc atc tcc cgg ccc aag His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys 450 455 460	1392
ggg gtg gcc ctg cac agg ccc gat gtc tac ttg ctg cca cca gcc cgg Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg 465 470 475 480	1440

17/24

gag cag ctg aac ctg cgg gag tcg gcc acc atc acg tgc ctg gtg acg 1488
Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
485 490 495

ggc ttc tct ccc gcg gac gtc ttc gtg cag tgg atg cag agg ggg cag 1536
Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
500 505 510

ccc ttg tcc ccg gag aag tat gtg acc agc gcc cca atg cct gag ccc 1584
Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro
515 520 525

cag gcc cca ggc cgg tac ttc gcc cac agc atc ctg acc gtg tcc gaa 1632
Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
530 535 540

gag gaa tgg aac acg ggg gag acc tac acc tgc gtg gtg gcc cat gag 1680
Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu
545 550 555 560

gcc ctg ccc aac agg gtc acc gag agg acc gtg gac aag tcc acc ggt 1728
Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
565 570 575

aaa ccc acc ctg tac aac gtg tcc ctg gtc atg tcc gac aca gct ggc 1776
Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly
580 585 590

acc tgc tac tga 1788
Thr Cys Tyr
595

<210> 20
<211> 595
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

18/24

50	55	60
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala		
65	70	75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
	85	90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
	100	105 110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Pro Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr		
	115	120 125
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser		
	130	135 140
Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro		
	145	150 155 160
Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu		
	165	170 175
Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile		
	180	185 190
Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala		
	195	200 205
Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr		
	210	215 220
Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu		
	225	230 235 240
Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser		
	245	250 255
Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser		
	260	265 270
Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val		
	275	280 285
Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp		
	290	295 300
Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val		

305		310		315		320
Thr Ser Thr	Leu Thr	Ile Lys Glu Ser	Asp Trp	Leu Ser	Gln Ser	Met
	325		330		335	
Phe Thr Cys	Arg Val	Asp His Arg Gly	Leu Thr	Phe Gln	Gln Asn	Ala
	340		345		350	
Ser Ser Met	Cys Val	Pro Asp Gln Asp	Thr Ala	Ile Arg	Val Phe	Ala
	355		360		365	
Ile Pro Pro	Ser Phe	Ala Ser Ile	Phe Leu	Thr Lys	Ser Thr	Lys Leu
	370		375		380	
Thr Cys Leu	Val Thr	Asp Leu Thr	Thr Tyr	Asp Ser	Val Thr	Ile Ser
	385		390		395	400
Trp Thr Arg	Gln Asn	Gly Glu Ala	Val Lys	Thr His	Thr Asn	Ile Ser
	405		410		415	
Glu Ser His	Pro Asn	Ala Thr Phe	Ser Ala	Val Gly	Glu Ala	Ser Ile
	420		425		430	
Cys Glu Asp	Asp Trp	Asn Ser Gly	Glu Arg	Phe Thr	Cys Thr	Val Thr
	435		440		445	
His Thr Asp	Leu Pro	Ser Pro	Leu Lys	Gln Thr	Ile Ser	Arg Pro
	450		455		460	Lys
Gly Val Ala	Leu His	Arg Pro	Asp Val	Tyr Leu	Leu Pro	Pro Ala
	465		470		475	Arg
Glu Gln Leu	Asn Leu	Arg Glu	Ser Ala	Thr Ile	Thr Cys	Leu Val
	485		490		495	Thr
Gly Phe Ser	Pro Ala	Asp Val	Phe Val	Gln Trp	Met Gln	Arg Gly
	500		505		510	Gln
Pro Leu Ser	Pro Glu	Lys Tyr	Val Thr	Ser Ala	Pro Met	Pro Glu
	515		520		525	Pro
Gln Ala Pro	Gly Arg	Tyr Phe	Ala His	Ser Ile	Leu Thr	Val Ser
	530		535		540	Glu
Glu Glu Trp	Asn Thr	Gly Glu	Thr Tyr	Thr Cys	Val Val	Ala His
	545		550		555	Glu
Ala Leu Pro	Asn Arg	Val Thr	Glu Arg	Thr Val	Asp Lys	Ser Thr
						Gly

20/24

	565	570	575	
Lys Pro Thr	Leu Tyr Asn Val Ser	Leu Val Met Ser Asp Thr	Ala Gly	
	580	585	590	
Thr Cys Tyr				
	595			
<210>	21			
<211>	726			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1)..(726)			
<223>				
<400>	21			
atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct				48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser				
1 5 10 15				
ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct				96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala				
20 25 30				
gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt				144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser				
35 40 45				
gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag				192
Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln				
50 55 60				
aaa cca gga cag cct cct aag ttg ctc att tac tgg gca tct acc cgg				240
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg				
65 70 75 80				
gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat				288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp				
85 90 95				
ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat				336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr				
100 105 110				
tac tgt cag caa tat tat act act ctt ccg ctc act ttc ggc gga ggg				384

21/24

Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly		
	115						120					125					
acc	aag	gtg	gag	atc	aaa	cga	act	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc		432
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile		
	130					135					140						
ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg		480
Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val		
145					150					155					160		
tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag		528
Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys		
			165					170						175			
gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggt	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag		576
Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu		
		180						185					190				
cag	gac	agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg		624
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu		
	195					200						205					
agc	aaa	gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc		672
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr		
	210					215					220						
cat	cag	ggc	ctg	agc	tcg	ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag		720
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu		
225					230					235					240		
tgt	tag																726
Cys																	

<210> 22
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35	40	45																	
Val	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Asn	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln				
50						55					60								
Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg				
65					70					75					80				
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp				
				85					90					95					
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr				
			100					105					110						
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly				
		115					120					125							
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile				
		130				135					140								
Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val				
145					150					155					160				
Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys				
			165						170					175					
Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu				
			180					185					190						
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu				
		195					200					205							
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr				
	210					215					220								
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu				
225					230					235					240				

Cys

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 23
caacaggcag gcaggggcag caag 24

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 24
agcataatta aagccaagga ggag 24

<210> 25
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 25
cctgatcatg aagacgtcga ctagtccgga tccccgggag ctgagcgtct ctagatcttt 60
aattaagg 68

<210> 26
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 26
cgcgcccttaa ttaaagatct agagcgctcg agctcccggg gatccggact agtcgacgtc 60
ttcatgatca ggccgg 76

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27	
gaggaattcc accatgaaga acc	23
<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 28	
gaggcggccg cttagtcagg atagcag	27
<210> 29	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 29	
aaaagcggcc gcgatcataa tcagccatac ca	32
<210> 30	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 30	
aaaactcgag aagcttagac atgataagat acattg	36
<210> 31	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> an artificially synthesized linker sequence	
<400> 31	
cccgatccg gg	12

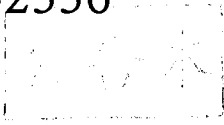
四、中文發明摘要 (發明名稱：以轉形細胞進行IgM之生產及其定量方法)

藉由將編碼為H鏈、L鏈、J鏈之基因配置於同一載體上，並於適當寄主細胞內進行轉形，以取得五元體IgM。編碼為J鏈之基因亦可藉由共轉形以導入。又，未伴隨J鏈表現時會生產六元體之IgM。依據本發所得之轉形體其IgM之產生量為高的。再者，本發明提供可分離定量多元體IgM之方法。

本案若有化學式，請揭示最能顯示發明特徵的化學式
無

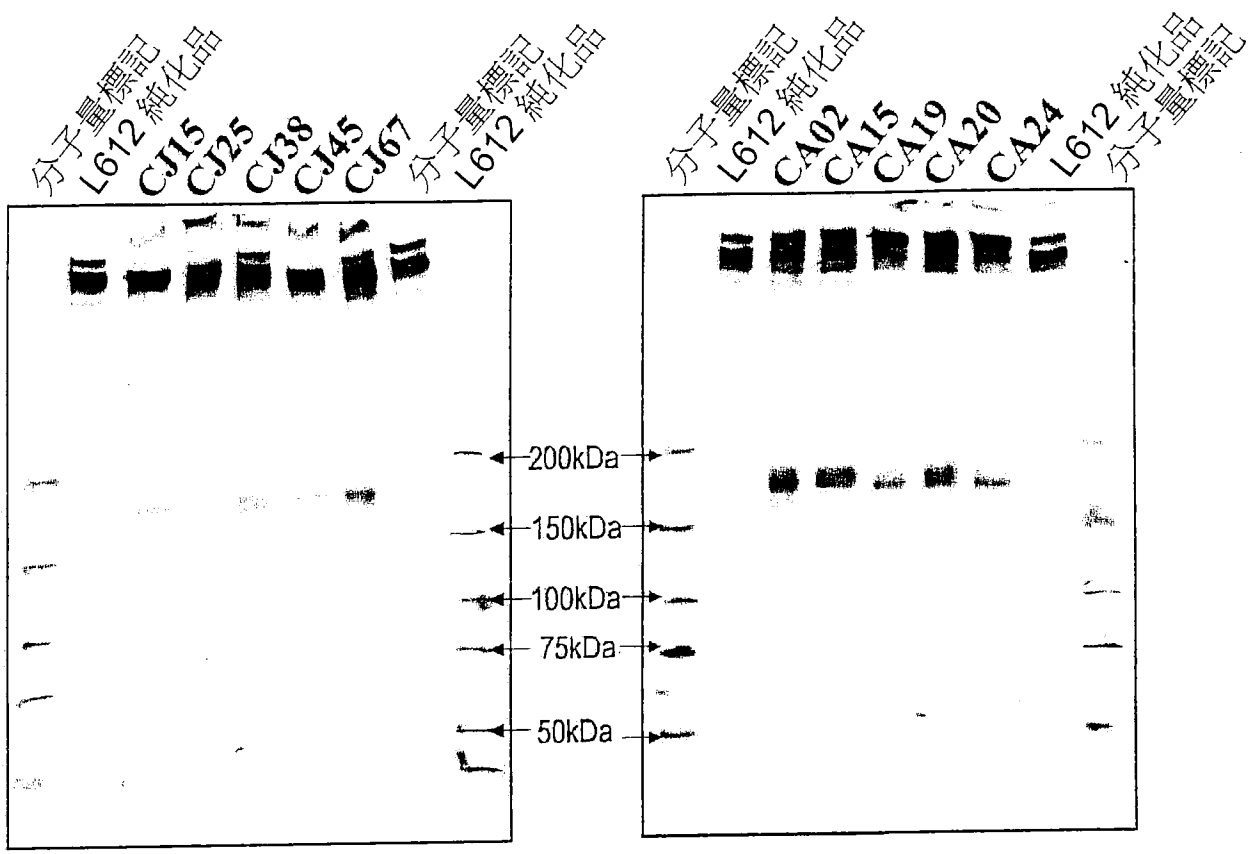
五、英文發明摘要 (發明名稱：)



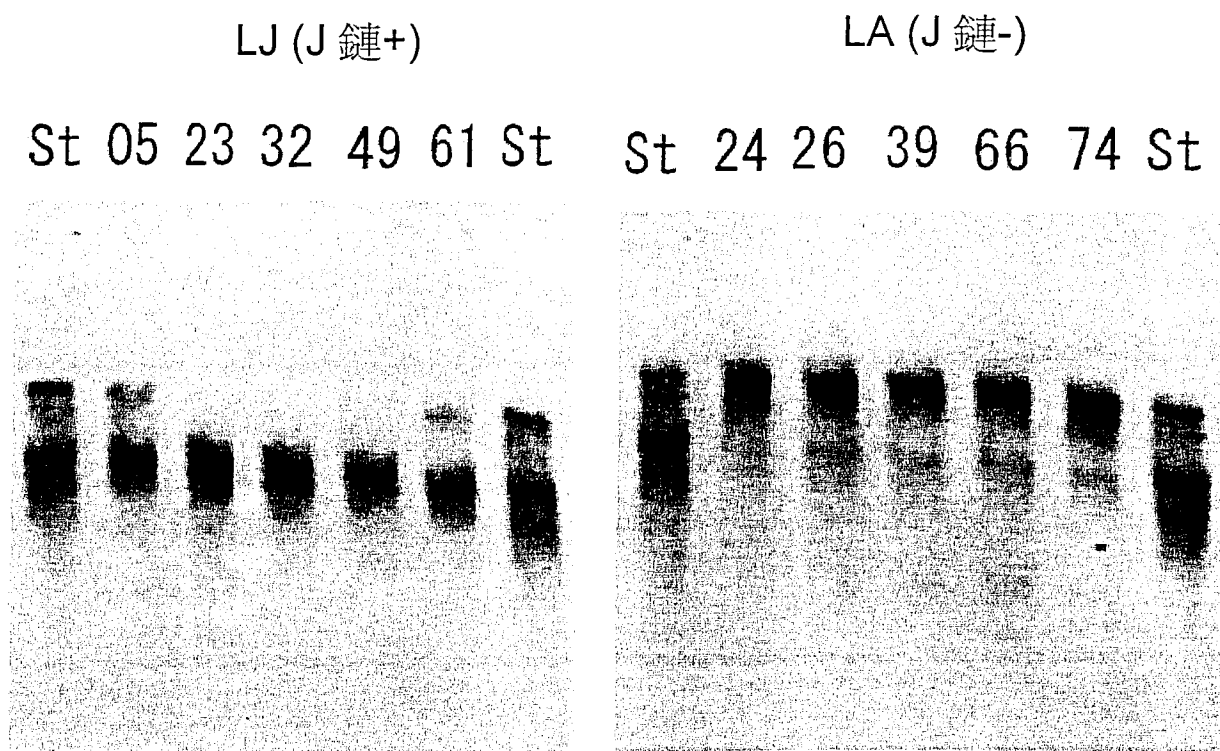


J 鏈(+)

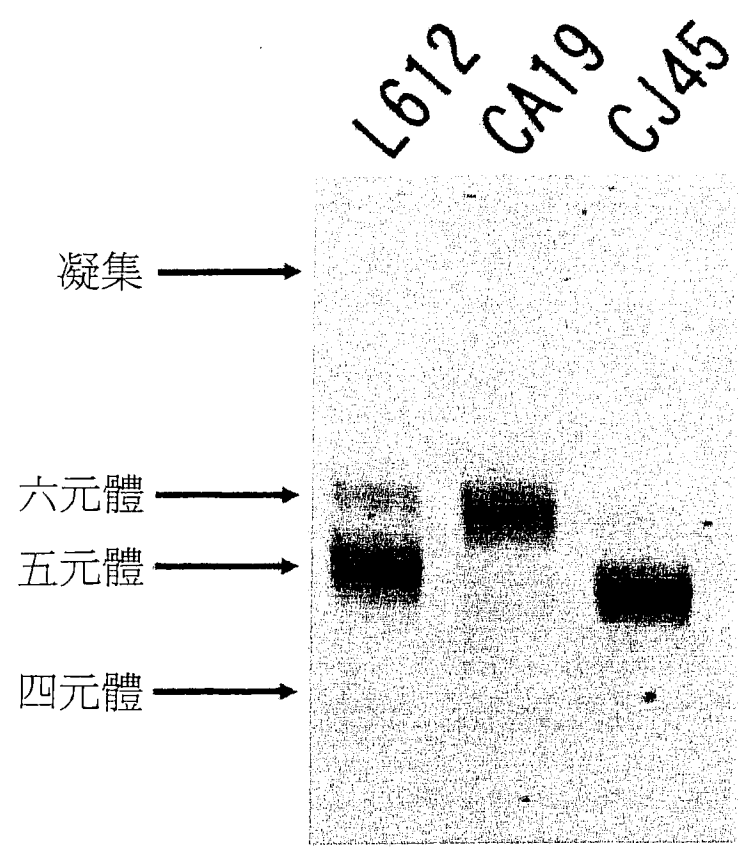
J 鏈(-)



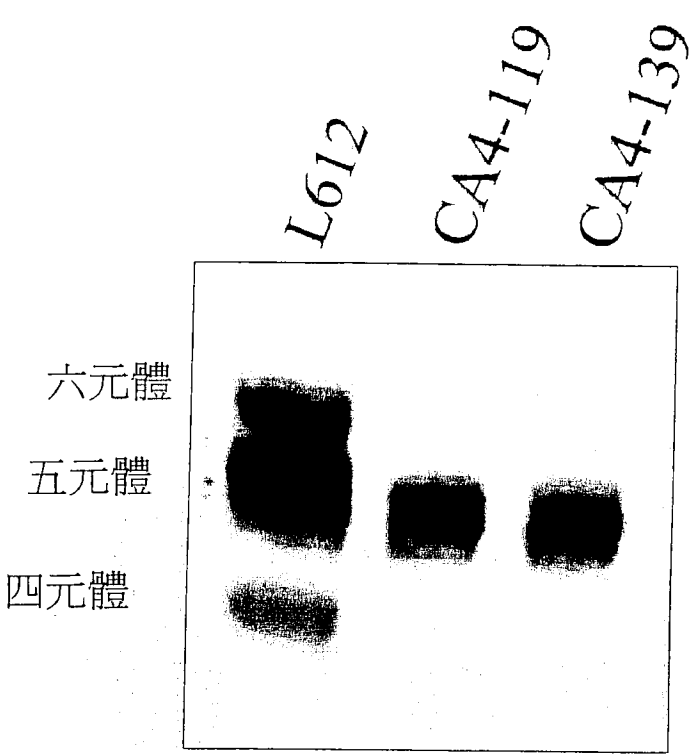
第 1 圖



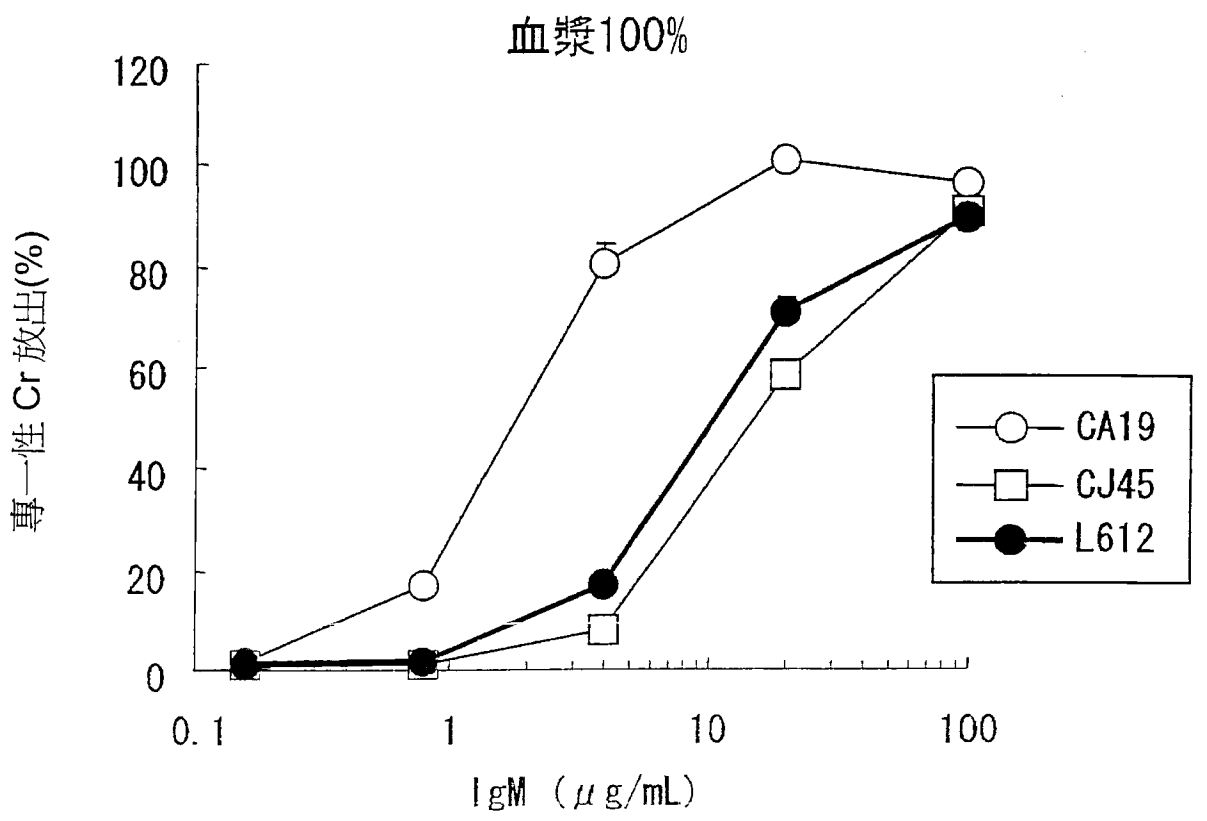
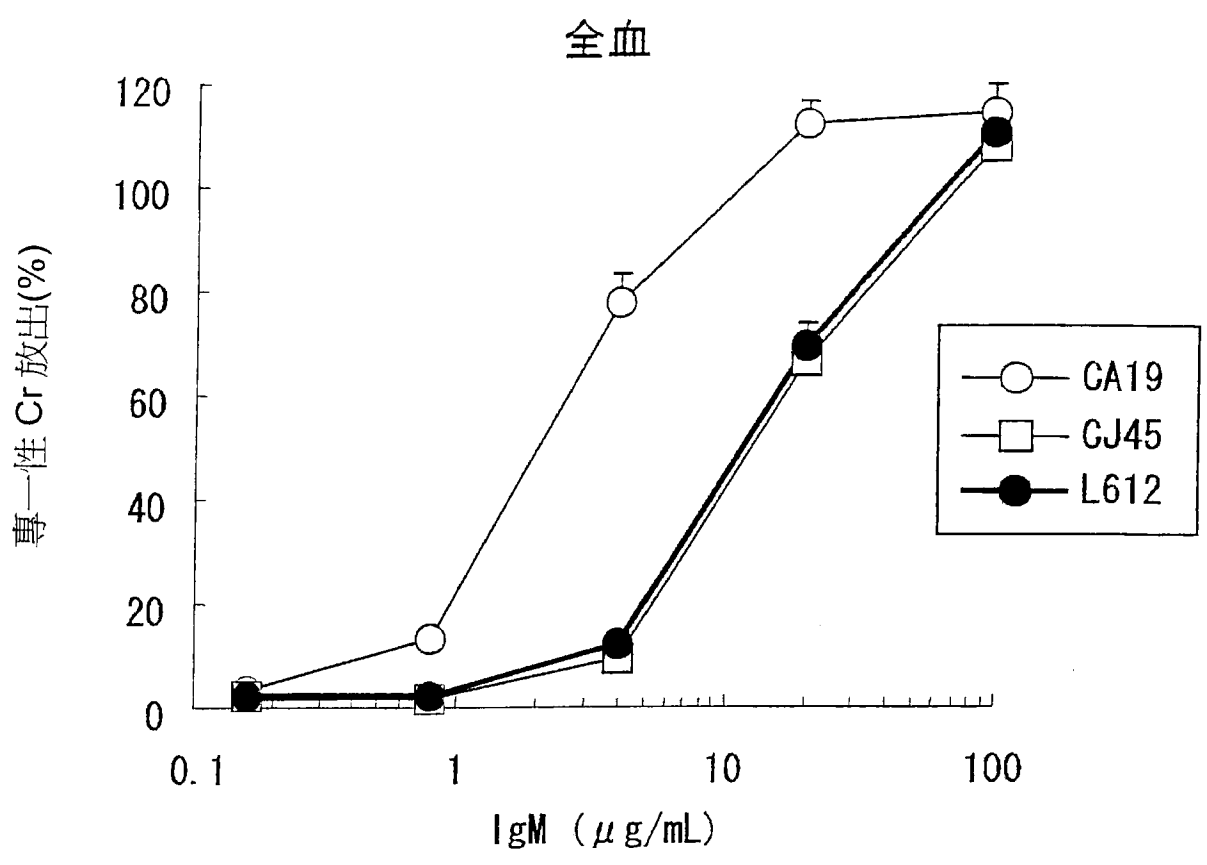
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖

六、指定代表圖

(一)、本案代表圖為：第1圖

(二)、本案代表圖之元件符號簡單說明：無



申請日期: 93.7.15	IPC分類
申請案號: 93121127	C12N15/63(2006.01) 96年4月13日

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	以轉形細胞進行IgM之生產及其定量方法
	英文	
二、 發明人 (共5人)	姓名 (中文)	1. 入江禮子 2. 角田浩行 3. 井川智之 4. 關森泰男
	姓名 (英文)	1. IRIE, REIKO 2. TSUNODA, HIROYUKI 3. IGAWA, TOMOYUKI 4. SEKIMORI, YASUO
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP 2. 日本 JP 3. 日本 JP 4. 日本 JP
三、 申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 中外製藥股份有限公司
	名稱或姓名 (英文)	1. CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP
	住居所 (營業所) (中文)	1. 日本國東京都北區浮間5丁目5番1號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1.
	代表人 (中文)	1. 永山治
	代表人 (英文)	1.



2125-6442-PE(N3):Chiumeow.ptd

五、發明說明 (6)

列係擇自由腺病毒2型主後期啟動子、猿病毒40早期啟動子、小鼠乳癌病毒LTR啟動子、單純皰疹病毒胸腺嘧啶激酶啟動子、巨細胞病毒啟動子、多肽鏈延長因子1 α 啟動子、牛成長荷爾蒙啟動子、 β 肌動蛋白基因啟動子及CAG啟動子所構成之群。

[13] 如[12]之表現載體或基因片段，其轉錄調節序列係擇自由猿病毒40早期啟動子、巨細胞病毒啟動子、多肽鏈延長因子1 α 啟動子及CAG啟動子所構成之群。

[14] 一轉形細胞，係以[9]~[13]任一項之載體或基因片段進行轉形。

[15] 如[1]~[4]之轉形細胞，係擇自[1]~[8]任一項之轉形細胞。

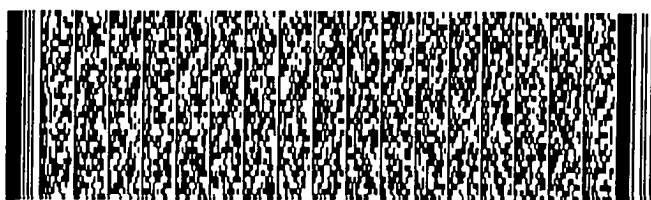
[16] 如[14]或[15]之轉形細胞，其中表現載體或基因片段含有編碼為J鏈之鹼基序列。

[17] 如[14]~[16]任一項之轉形細胞，其中前述表現載體或基因片段含有編碼為IgMJ鏈之鹼基序列，且可生產五元體含量60%以上之IgM。

[18] 如[17]之轉形細胞，其可生產五元體含量80%以上之IgM。

[19] 如[14]或[15]之轉形細胞，其中前述表現載體或基因片段含有編碼為IgMJ鏈之鹼基序列，且可生產六元體含量50%以上之IgM。

[20] 如[19]之轉形細胞，其可生產六元體含量80%以上之IgM。



五、發明說明 (16)

變的胺基酸序列變異體，只要具有與原本抗體相同之結合專一性，則包含於本發明的「抗體變異體」內。該種變異體與抗體之H鏈或L鏈的可變區其胺基酸序列之相同性或類似性至少為75%，較佳為至少80%，又更佳為至少85%，又再更佳為至少90%，最佳為至少95%，且胺基酸序列之相同性或類似性較100%為低。

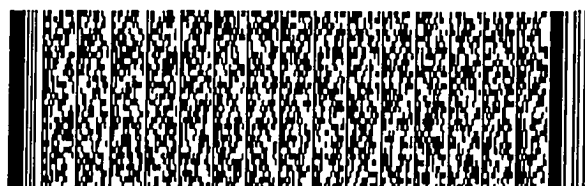
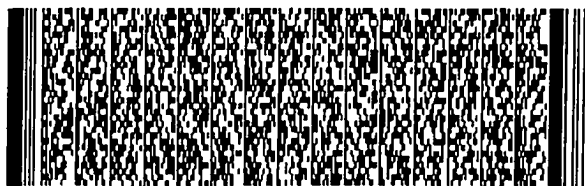
例如，於IgM H鏈導入Cys殘基之變異體中，已確認五/六元體之構造轉換(Davis, et al. EMBO J. (1989) 8, 2519-2526)。或，於IgM H鏈之4區(C μ 1, C μ 2, C μ 3, C μ 4)加缺失、變異，已確認J鏈之嵌入或五/六元體之構造轉換。基於該等知識，可得到編碼為能構成目的五元體或六元體之IgM變異體的基因。

又，本發明之IgM抗體亦為糖鏈改變之IgM抗體。

另一方面，本發明中係利用例如增強子(enhancer)或啟動子作為表現控制區。藉由該表現載體使寄主細胞轉形，可表現IgM。

或，可藉由含該等基因之基因片段使寄主細胞轉形，可得到本發明之轉形細胞。例如，含有由表現控制區及構造基因所構成表現匣之基因片段可藉由相同重組以導入寄主細胞的基因庫。保有基因片段之寄主細胞可表現該構造基因。

為得到本發明之轉形細胞，可使用適當寄主細胞與表現載體或基因片段之組合。寄主細胞可利用原核細胞或真核細胞。原核細胞可利用大腸菌或枯草菌等。另一方面，



五、發明說明 (18)

因)並使其表現以得到。用於將外來性基因導入該等寄主細胞並表現之表現載體為周知的。

本發明中，以真核細胞作為寄主細胞時，例如可利用如下之寄主載體系。

例如，哺乳動物由來之表現載體有pCXN(Niwa等, Gene 1991;108;193-200)、pcDNA3(Introgen公司製)、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF及pCDM8為周知的。藉由動物病毒由來之表現載體，亦可將哺乳動物細胞轉形。病毒由來之表現載體例如有pHSV、pMV或pAdexLcw。此外，反轉錄病毒由來之表現載體pZIPneo亦對動物細胞之轉形為有用的。

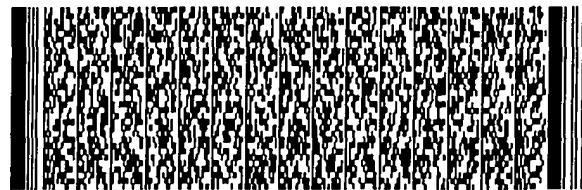
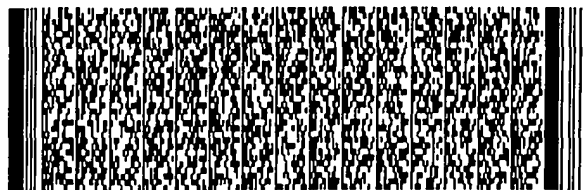
再者，pBacPAK8為市售之昆蟲細胞用表現載體(「Bac-to-Bac baculovirus expression system」, GIBCO BRL公司製)。又，植物細胞用之表現載體例如有pMH1或pMH2。又，酵母用之表現載體例如有「畢赤酵母表現套組(Pichia Expression kit)」(Invitrogen公司製)、pNV11、SP-Q01。

以於CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等動物細胞表現為目的時，係將IgM基因以可受表現控制區控制下表現的方式配置。表現控制區包括增強子或啟動子。例如，在哺乳動物細胞中有效的啟動子例如有以下者：

腺病毒2型主後期啟動子、

猿病毒40早期啟動子、

單純皰疹病毒胸腺嘧啶激酶啟動子、



五、發明說明 (19)

巨細胞病毒啟動子、

多肽鏈延長因子1 α 啟動子(Mizushima等, Nucleic Acid Res. (1990) 18, 5322)、

牛成長荷爾蒙啟動子、

β 肌動蛋白基因啟動子及

CAG啟動子、

SV40啟動子(Mulligan等, Nature(1979) 277, 108)、

小鼠乳癌病毒(MMTV)-LTR啟動子、

該等啟動子中, 較佳之啟動子如下所示。該等之啟動子可期待於哺乳動物細胞中具有高表現誘導作用。

猿病毒40早期啟動子、

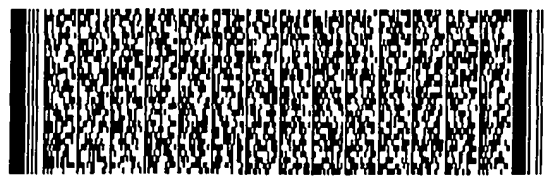
巨細胞病毒啟動子、

多肽鏈延長因子1 α 啟動子、

CAG啟動子

再者, 含有選擇標記之表現載體對選擇轉形細胞是容易的。選擇標記一般係使用對新黴素或G418具藥物耐受性之基因。具有該特性之載體例如有pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV或pOP13。

用以使導入轉形細胞之基因可安定表現並使細胞內基因之份數增加的技術為周知的。例如, 若於欠缺核酸合成路徑之CHO細胞中導入具有與該等互補之DHFR基因之載體, 則可藉由氨甲喋呤(MTX)將基因表現放大。DHFR基因例如有pCHOI。



五、發明說明 (20)

此外，若使用染色體上具有表現SV40 T抗原基因之COS細胞，並以具有SV40複製起點之載體轉形，則可使基因進行一貫表現。具有SV40複製起點之載體周知者有pcD等。複製起點亦可使用由來自多瘤病毒、腺病毒、牛乳突病毒(BPV)等者。

為使轉形細胞中基因份數增加，表現載體亦可含有胺基糖苷轉移酶(APH)基因、胸腺嘧啶激酶(TK)基因、大腸菌黃嘌呤鳥糞嘧啶磷酸基核糖基轉移酶(Ecogpt)基因、二氫葉酸還原酵素(dhfr)基因等。

除真核細胞以外，本發明亦可利用原核細胞之表現系統。例如，大腸菌之表現載體例如有M13系載體、pUC載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script等。又，枯草菌由來之表現載體例如有pPL608或pKTH50。若以JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue等大腸菌作為寄主時，必須利用可使大腸菌有效表現之啟動子。該等啟動子例如有lacZ啟動子(Ward等，Nature(1989) 341, 544-546;FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araB啟動子(Better等，Science (1988) 240, 1041-1043)或T7啟動子等。該種載體除上述載體以外，例如有pGEX-5X-1(Pharmacia公司製)、

「QIAexpression system」(Qiagen公司製)、pEGFP或pET等。若為pET，較佳之寄主為主要表現T7 RNA聚合酶之BL21。

又，載體中亦可含有用於使多肽分泌之信息序列。若於大腸菌之細胞質產生時，用於使多肽分泌之信息序列可

五、發明說明 (61)

構造或聯合體進行定量性的評價。

表 3

	J 鏈	聯合體	六元體	五元體	四元體
L612	+	5%	18%	73%	3%
CA19	-	5%	82%	10%	3%
CJ45	+	4%	6%	90%	-

[實施例5] 重組型人類抗體L612高產生株之製作

5.1 表現質體pL612CA4之構建

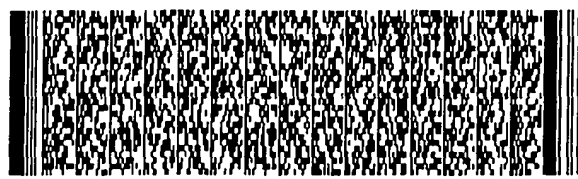
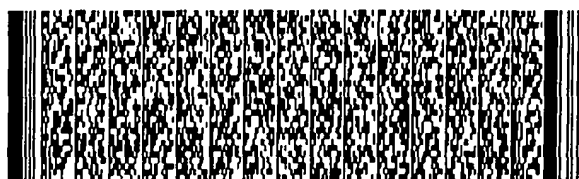
將載體INPEP4(美國專利號碼:US20010019715)以限制酶 *Pvu* II 進行部分分解,以除去CMV啟動子及多A訊息(*polyA* signal),得到約5.5kb之片段並使其環狀化。該載體命名為INPEP4-dCMV。該質體會於動物細胞內表現新黴素耐受性基因、DHFR基因。

為將多重轉殖位導入INPEP4-dCMV,將含有限制酶 *Eg*I II、*Xho* I、*Bam* HI、*Sal* I等之辨識位的調節序列(將序列識別號:25及26接合以調製)轉殖於INPEP4-dCMV之*Asc* I、*Fse* I辨識位。該載體命名為INPEP4-dCMV(MCS)。序列識別號:25及26之序列如下所示。

CCTGATCATGAAGACGTCGACTAGTCCGGATCCCCGGGAGCTCGAGCGCT
CTAGATCTTTAATTAAGG(序列識別號:25)

CGCGCCTTAATTAAGATCTAGAGCGCTCGAGCTCCCGGGGATCCGGACT
AGTCGACGTCTTCATGATCAGGCCGG(序列識別號:26)

為次選殖抗體L鏈表現單元,將pCXND3/L612IgM之約3.0kb之*Sal* I、*Pst* I部分分解片段選殖於pBluescrip II SK⁺之*Sal* I、*Pst* I辨識位。此載體命名為L612CA-L/pBlue。



五、發明說明 (68)

將作為pCXND3之CAG啟動子之約1.7kb之SpeI-EcoRI片段、轉殖之J鏈基因之約0.5kb之EcoRI-NotI片段、轉殖之SV40之polyA訊息約0.3kb之NotI-XhoI片段組合於pCRBlunt II-TOPO之SpeI-XhoI辨識位間。該載體命名為pCRCAGproJpA。

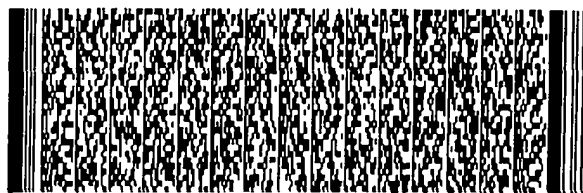
將pCRCAGproJpA之XhoI辨識位平滑化並加成BamHI連結子(linker)(pCCCGGATCCGGG)(序列識別號:31)，以轉換為BamHI辨識位，再以約2.5kb之BamHI片段作為抗體J鏈表現單元，轉殖於pL612CA3之BamHI辨識位。該得到之質體命名為pL612pentaCA4。

該質體會於動物細胞內表現新黴素耐受性基因、DHFR基因、L612基因(H鏈、L鏈、J鏈)。

6.2 電穿孔、Geneticin選擇

對CHO細胞DG44導入基因係藉由電穿孔法進行。將表現質體pL612pentaCA4以限制酶Pvu I分解一晚，並以苯酚萃取、氯仿萃取後，以乙醇沉澱純化之，並溶解於TE中。將培養於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)內之細胞與純化之Pvu I分解pL612pentaCA4混合，並放入比色管後，以基因導入裝置給予脈衝以導入基因。

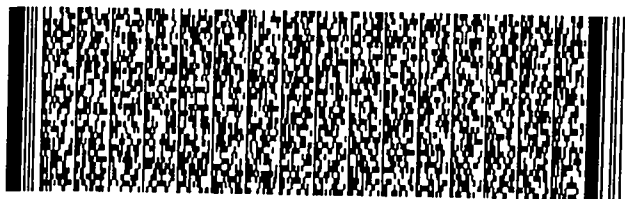
導入基因後，將比色管的細胞加入於含1倍濃度HT supplement(Invitrogen公司製)之CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen公司製)10mL內，並以該培養基適當稀釋後，接種於96孔培養用平盤。接種完成後，於二氧化碳培養箱



六、申請專利範圍

(100年3月3日修(更)正本)

1. 一種轉形細胞，由一表現載體進行轉形，該表現載體包含在同一載體上具有(1)編碼為IgM H鏈之鹼基序列及(2)編碼為IgM L鏈之鹼基序列兩者，IgM的分泌由CAG啟動子控制，其中該轉形細胞為CHO細胞，該表現載體更包含編碼為IgM J鏈之鹼基序列，以及該轉形細胞生產五元體含量60%以上之IgM。
2. 一種轉形細胞，由一表現載體進行轉形，該表現載體包含在同一載體上具有(1)編碼為IgM H鏈之鹼基序列及(2)編碼為IgM L鏈之鹼基序列兩者，IgM的分泌由CAG啟動子控制，其中該轉形細胞為CHO細胞，該表現載體不包含編碼為IgM J鏈之鹼基序列，該轉形細胞生產六元體含量50%以上之IgM。
3. 如申請專利範圍第1項之轉形細胞，其可生產五元體含量80%以上之IgM。
4. 如申請專利範圍第2項之轉形細胞，其可生產六元體含量80%以上之IgM。
5. 如申請專利範圍第1項之轉形細胞，其中前述表現載體含有編碼為IgMJ鏈之鹼基序列，且產生之五元體與六元體之IgM其比(五元體/六元體比)為1.5以上。
6. 如申請專利範圍第2項之轉形細胞，其中前述表現載體不含有編碼為IgM J鏈之鹼基序列，且產生之六元體與五元體之IgM其比(六元體/五元體比)為1.5以上。
7. 一種轉形細胞，由一表現載體進行轉形，該表現載體包含在同一載體上具有(1)編碼為IgM H鏈之鹼基序列及



六、申請專利範圍

(2) 編碼為IgM L鏈之鹼基序列兩者，IgM的分泌由CAG啟動子控制，其中該轉形細胞為CHO細胞，含有編碼為IgM H鏈及IgM L鏈之基因的之上述表現載體不含有編碼為J鏈之鹼基序列，且可藉由共轉形導入編碼為J鏈之鹼基序列並表現，該轉形細胞生產五元體含量60%以上之IgM。

8. 一種IgM之製造方法，包含培養申請專利範圍第1或7項之轉形細胞，並採取五元體IgM之製程。

9. 一種IgM之製造方法，包含培養申請專利範圍第2項之轉形細胞，並採取六元體IgM之製程。

10. 如申請專利範圍第8或9項之方法，包含從該細胞的培養物之培養上清中純化IgM之製程。

