

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 359**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A01K 67/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2001 PCT/JP2001/08804**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2002 WO02031140**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2001 E 01974718 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 1331266**

54 Título: **Células que producen unas composiciones de anticuerpo**

30 Prioridad:

06.10.2000 JP 2000308526

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.06.2017

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**KANDA, YUTAKA;
SATO, MITSUO;
NAKAMURA, KAZUYASU;
UCHIDA, KAZUHISA;
SHINKAWA, TOYOHIDE;
YAMANE, NAOKO;
HOSAKA, EMI;
YAMANO, KAZUYA;
YAMASAKI, MOTOO y
HANAI, NOBUO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 620 359 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células que producen unas composiciones de anticuerpo.

5 **Campo técnico**

En la presente memoria se describe una célula para la producción de una molécula de anticuerpo, tal como un anticuerpo útil para diversas enfermedades, un fragmento del anticuerpo y una proteína de fusión que presenta la región Fc del anticuerpo o similar, a un procedimiento para producir una composición del anticuerpo utilizando la célula, a la composición del anticuerpo y a la utilización de la misma.

Antecedentes de la técnica

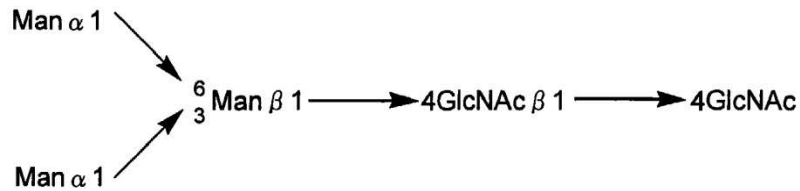
Debido a que los anticuerpos presentan una elevada actividad de unión, especificidad de unión y una elevada estabilidad en sangre, se ha intentado aplicarlos al diagnóstico, a la prevención y al tratamiento de diversas enfermedades humanas [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., capítulo 2.1, 1995]. Además, se ha intentado producir un anticuerpo humanizado, tal como un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo con injertación de una región determinante de complementariedad humana (en adelante denominada "RDC") a partir de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano, mediante la utilización de técnicas de recombinación genética. El anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo en el que su región variable de anticuerpo (en adelante denominada "región V") es un anticuerpo derivado de un animal diferente del ser humano y su región constante (en adelante denominada "región C") se deriva de un anticuerpo humano. El anticuerpo con injertación de RDC humano es un anticuerpo en el que se ha sustituido la RDC de un anticuerpo humano por la RDC de un anticuerpo obtenido de un animal diferente de un ser humano.

Se ha descubierto que se encuentran presentes cinco clases en los anticuerpos obtenidos de los mamíferos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Los anticuerpos de la clase IgG humana se utilizan principalmente para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades humanas debido a que presentan características funcionales, tales como una semivida prolongada en sangre, diversas funciones efectoras y similares [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., capítulo 1, 1995]. El anticuerpo de clase IgG humana se clasifica además en las 4 subclases siguientes: IgG1, igG2, IgG3 e IgG4. Hasta hoy se han llevado a cabo muchos estudios de la actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos (en adelante denominada "actividad ADCC") y de la actividad citotóxica dependiente del complemento (en adelante denominada "actividad CDC") como funciones efectoras del anticuerpo de clase IgG y se ha informado de que entre los anticuerpos de la clase IgG humana, la subclase IgG1 presenta las actividades ADCC y CDC más elevadas [Chemical Immunology 65:88, 1997]. En la vista de lo anteriormente expuesto, la mayoría de los anticuerpos humanizados antitumorales, incluyendo el Rituxan y el Herceptin disponibles comercialmente, que requieren funciones efectoras elevadas para la expresión de sus efectos, son anticuerpos de la subclase IgG1 humana.

La expresión de la actividad ADCC y de la actividad CDC de los anticuerpos de subclase IgG1 humana requiere la unión de la región Fc del anticuerpo a un receptor de anticuerpo presente sobre la superficie de una célula efectora, tal como una célula asesina, una célula asesina natural, un macrófago activado o similar (en adelante denominada "FcγR") y se unen diversos componentes del complemento. Con respecto a la unión, se ha sugerido que son importantes varios residuos aminoácidos en la región bisagra y en el segundo dominio de la región C (en adelante denominados "dominio Cy2") del anticuerpo [Eur. J. Immunol. 23:1098, 1993; Immunology 86:319, 1995; Chemical Immunology 65:88, 1997] y que también resulta importante una cadena de azúcar que se une al dominio Cy2 [Chemical Immunology 65:88, 1997].

Con respecto a la cadena de azúcar, Boyd *et al.* han examinado los efectos de una cadena de azúcar sobre la actividad de ADCC y de la actividad de CDC mediante el tratamiento de un anticuerpo con injertación de RDC humana, CAMPATH-1H (subclase IgG1 humana) producido por una célula de ovario de hámster chino (célula CHO) o una célula NS0 de mieloma de ratón (célula NS0) con diversos enzimas hidrolíticos de azúcares, y se ha informado de que la eliminación del ácido siálico del extremo no reductor no influye sobre ambas actividades pero que la actividad CDC por sí sola resultó afectada por la eliminación adicional del residuo de galactosa y se redujo la actividad en aproximadamente 50%, y que la eliminación completa de la cadena de azúcar provocó la eliminación de ambas actividades [Molecular Immunol. 32:1311, 1995]. Además, Lifely *et al.* han analizado la cadena de azúcar unida a un anticuerpo injertado con RDC humana, CAMPATH-1H (subclase IgG humana) que había sido producido por una célula CHO, una célula NS0 o una célula YO de mieloma de rata, han medido su actividad ADCC y han informado de que el anticuerpo CAMPATH-1H obtenido de la célula YO mostraba la actividad ADCC más elevada, sugiriendo que la N-acetilglucosamina (en adelante también denominada "GlcNAc") en la posición bisectante resulta importante para la actividad [Glycobiology 5:813, 1995; documento nº WO 99/54342]. Estos informes indican que la estructura de la cadena de azúcar desempeña un papel importante en las funciones efectoras de los anticuerpos humanos de la subclase IgG1 y que resulta posible preparar un anticuerpo que presente una función efectora más elevada mediante la modificación de la estructura de la cadena de azúcar. Sin embargo, de hecho, las estructuras de las cadenas de azúcar son diversas y complejas y no puede afirmarse que se haya identificado una estructura importante real para la función efectora.

5 Las cadenas de azúcar de las glucoproteínas se dividen en términos generales en dos tipos: una cadena de azúcar que se une a la asparagina (cadena sacárida unida mediante N-glucósido) y una cadena de azúcar que se une a otro aminoácido, tal como la serina, la treonina (cadena sacárida unida mediante O-glucósido), basándose en la forma de unión de la fracción proteína. Las cadenas de azúcar unidas mediante N-glucósido presentan diversas estructuras [Biochemical Experimentation Method 23 - Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Gakujutsu Shuppan Center), editado por Reiko Takahashi, 1989], aunque es conocido que presentan una estructura nuclear común básica mostrada mediante la fórmula estructural (I) a continuación:



10 **Fórmula estructural (I)**

El extremo de la cadena de azúcar que se une a la asparagina se denomina extremo reductor y el lado contrario se denomina extremo no reductor. Es conocido que la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido incluye un tipo rico en manosas en el que la manosa sola se une al extremo no reductor de la estructura nuclear; un tipo complejo en el que el lado de extremo no reductor de la estructura nuclear presenta por lo menos una rama paralela de galactosa-N-acetilglucosamina (en adelante denominada "Gal-GlcNAc") y el lado de extremo no reductor de Gal-GlcNAc presenta una estructura de ácido siálico N-acetilglucosamina bisectante o similar; un tipo híbrido en el que el lado de extremo no reductor de la estructura nuclear presenta ramas del tipo tanto manosa como del tipo complejo, y similares.

20 En la región Fc de un anticuerpo de un tipo IgG, se encuentran presentes dos sitios de unión de cadena de azúcar unidas mediante N-glucósido. En la IgG sérica, al sitio de unión de cadena de azúcar generalmente se une una cadena de azúcar de tipo complejo que presenta una pluralidad de ramas y en la que la adición de ácido siálico o de N-acetilglucosamina bisectante es baja. Es conocido que existe variabilidad en la adición de galactosa al extremo no reductor de la cadena de azúcar de tipo complejo y en la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor [Biochemistry 36:130, 1997].

30 Se ha considerado que dicha estructura de una cadena de azúcar está determinada por los genes de cadena de azúcar, es decir, un gen para una glucosiltransferasa que sintetiza una cadena de azúcar y un gen para un enzima glucolítico que hidroliza la cadena de azúcar.

La síntesis de una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido se describe a continuación.

35 Las glucoproteínas se modifican con una cadena de azúcar en la luz del retículo endoplasmático (en adelante denominado "RE"). Durante la etapa de biosíntesis de la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido, se transfiere una cadena de azúcar relativamente grande a la cadena polipeptídica que se está elongando en la luz del RE. En la transformación, en primer lugar la cadena de azúcar se añade sucesivamente a los grupos fosfato de un portador de lípidos de cadena larga que comprende aproximadamente 20 unidades de α -isopreno, que se denomina dolicol-fosfato (en adelante también denominado "P-Dol"). Es decir, se transfiere la N-acetilglucosamina al dolicol-fosfato para formar de esta manera GlcNAc-P-P-Dol y seguidamente se transfiere un GlcNAc adicional para formar GlcNAc-GlcNAc-P-P-Dol. A continuación, se transfieren cinco manosas (en adelante la manosa también se denomina "Man") para formar de esta manera (Man)₅-(GlcNAc)₂-P-P-Dol y después se transfieren cuatro Man y tres glucosas (en adelante las glucosas también se denominan "Glc"). De esta manera, se forma un precursor de cadena de azúcar, (Glc)₃-(Man)₉-(GlcNAc)₂-P-P-Dol, denominado oligosacárido nuclear. El precursor de cadena de azúcar, que comprende 14 azúcares, se transfiere en masa a un polipéptido que presenta una secuencia asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina en la luz del RE. En la reacción, se libera dolicol pirofosfato (P-P-Dol) unido al oligosacárido nuclear aunque nuevamente se convierte en dolicol-fosfato mediante hidrólisis con pirofosfatasa y se recicla. El recorte de la cadena de azúcar se inicia inmediatamente después de la unión de la cadena de azúcar al polipéptido. Es decir, se eliminan 3 Glc y 1 o 2 Man en el RE y es conocido que la α -1,2-glucosidasa I, α -1,3-glucosidasa II y la α -1,2-manosidasa se relacionan con la eliminación.

55 La glucoproteína sometida a recorte en el RE se transfirió al cuerpo de Golgi y se modifica de diversas maneras. En la parte cis del cuerpo de Golgi, la N-acetilglucosamina fosfotransferasa, que se relaciona con la adición de manosa fosfato, N-acetilglucosamina 1-fosfodiéster α -N-acetilglucosaminidasa y α -manosidasa I se encuentran presentes y se reducen los residuos de Man a 5. En la parte intermedia del cuerpo de Golgi se encuentran presentes la N-acetilglucosamina transferasa I (GntI), que se relaciona con la adición de la primera GlcNAc externa de la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante N-glucósidos, la α -manosidasa II, que se relaciona con la eliminación de 2 Man, la N-acetilglucosamina transferasa II (GnTII), que se relaciona con la adición de la segunda GlcNAc desde el

extremo, y la α -1,6-fucosiltransferasa, que se relaciona con la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina de extremo reductor. En la parte trans del cuerpo de Golgi, se encuentran presentes la galactosa transferasa, que se relaciona con la adición de galactosa y la sialiltransferasa, que se relaciona con la adición de ácido siálico, tal como ácido N-acetilneuramínico o similar. Es conocido que la cadena de azúcar unida mediante N-glucósidos se forma mediante las actividades de dichos diversos enzimas.

En general, la mayoría de los anticuerpos humanizados para los que se considera su aplicación en medicamentos se preparan utilizando técnicas de recombinación genética y se producen utilizando células CHO derivadas de tejido de ovario de hámster chino como células hospedadoras. Aunque, tal como se ha indicado anteriormente, debido a que la estructura de la cadena de azúcar desempeña un papel notablemente importante en la función efectora de los anticuerpos y se observan diferencias en la estructura de la cadena de azúcar de las glucoproteínas expresadas por las células hospedadoras, se desea el desarrollo de una célula hospedadora que pueda utilizarse para la producción de un anticuerpo con una función efectora más elevada.

Con el fin de modificar la estructura de la cadena de azúcar de la glucoproteína producida, se han intentado diversos métodos, tales como: 1) la aplicación de un inhibidor de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar, 2) la selección de un mutante, 3) la introducción de un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar, y similar. Se describen ejemplos específicos a continuación.

Entre los ejemplos de un inhibidor contra un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar se incluyen la tunicamicina, que inhibe selectivamente la formación de GlcNAc-P-P-Dol, que es la primera etapa de la formación de un oligosacárido nuclear que es un precursor de una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido, castanospermina y N-metil-1-desoxinojirimicina que son inhibidores de la glucosidasa I, el bromocondulitol, que es un inhibidor de la glucosidasa II, la 1-desoxinojirimicina y el 1,4-dioxi-1,4-imino-D-manitol, que son inhibidores de la manosidasa I, la swainsonina, que es un inhibidor de la manosidasa II y similares. Entre los ejemplos de un inhibidor específico de una glucosiltransferasa se incluyen derivados desoxi de sustratos contra la N-acetilglucosamina transferasa V (GnTV) y similares [Glycobiology Series 2 - Destiny of Sugar Chain in Cell (Kodan-sha Scientific), editado por Katsutaka Nagai, Senichiro Hakomori y Akira Kobata, 1993]. Además, es conocido que la 1-desoxinojirimicina inhibe la síntesis de una cadena de azúcar de tipo complejo e incrementa la proporción de cadenas de azúcar de tipo rico en manosas y de tipo híbrido. De hecho se ha informado de que la estructura de cadena de azúcar de la IgG se modificó y se han modificado propiedades tales como la actividad de unión a antígeno y similares al añadir los inhibidores al medio [Molecular Immunol. 26:1113, 1989].

Los mutantes relacionados con la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar se seleccionan y obtienen principalmente en forma de una estirpe celular resistente a lectina. Por ejemplo, se han obtenido células CHO mutantes que presentan diversas estructuras de cadena de azúcar como estirpe celular resistente a lectina utilizando una lectina tal como la AGT (aglutinina de germen de trigo obtenida de *T. vulgaris*), ConA (concaivalina A obtenida de *C. ensiformis*), RIC (una toxina obtenida de *R. communis*), L-PHA (leucoaglutinina obtenida de *P. vulgaris*), LCA (aglutinina de lenteja obtenida de *L. culinaris*), PSA (lectina de guisante obtenida de *P. sativum*) o similar [Somatic Cell Mol. Genet. 12:51, 1986].

A título de ejemplo de la modificación de la estructura de cadena de azúcar de un producto obtenido mediante la introducción del gen de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en una célula hospedadora, se ha informado de que puede producirse una proteína en la que se añaden varios ácidos siálicos al extremo no reductor de la cadena de azúcar, mediante la introducción de β -galactósido- α -2,6-sialiltransferasa de rata en la célula CHO [J. Biol. Chem. 261:13848, 1989].

Además, se ha confirmado que se expresa un antígeno H (Fuc α 1-2Gal β 1) en el que se ha añadido fucosa (en adelante también denominada "Fuc") al extremo no reductor de la cadena de azúcar mediante la introducción de β -galactósido-2- α -fucosiltransferasa humana en células L de ratón [Science 252:1668, 1991]. Además, basándose en el conocimiento de que la adición de la N-acetilglucosamina en posición bisectante de la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido resulta importante para la actividad ADCC del anticuerpo, Umana *et al.* prepararon células CHO que expresaban β -1,4-N-acetilglucosamina transferasa III (GnTIII) y las compararon con la expresión de GnTIII de la estirpe celular parental. Confirmaron que no se observaba expresión de GnTIII en la estirpe celular parental de las células CHO [J. Biol. Chem. 261:13370, 1984] y que el anticuerpo expresado utilizando las células CHO expresantes de GnTIII producidas presentaban una actividad ADCC 16 veces superior a la del anticuerpo expresado utilizando la estirpe celular parental [Glycobiology 5:813, 1995; documento nº WO 99/54342]. Umana *et al.* también produjeron células CHO en las que habían introducido β -1,4-N-acetilglucosamina transferasa V (GnTV) y se informó de que la expresión en exceso de GnTIII o GnTV mostraba toxicidad para las células CHO.

Exposición de la invención

De esta manera, con el fin de modificar la estructura de cadena de azúcar de la glucoproteína que debía producirse, se intentó controlar la actividad del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la célula hospedadora, aunque en la práctica las estructuras de las cadenas de azúcar son diversas y complejas, y la solución de las funciones fisiológicas de las cadenas de azúcar resultaría insuficiente, por lo que se repitieron las pruebas de

ensayo y error. En particular, aunque se ha encontrado poco a poco que la función efectora de los anticuerpos resulta muy influida por la estructura de la cadena de azúcar, todavía no se ha determinado una estructura de cadena de azúcar verdaderamente importante. Por lo tanto, para el desarrollo de medicamentos se espera a la identificación de una cadena de azúcar que influya sobre la función efectora de los anticuerpos y al desarrollo de una célula hospedadora a la que pueda añadirse una estructura de cadena de azúcar.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una célula hospedadora que produzca una composición de anticuerpo y pueda controlar una estructura de cadena de azúcar unida a una molécula de anticuerpo, una célula que pueda producir una composición de anticuerpo que presente una elevada actividad de ADCC, un método de producción de una composición de anticuerpo utilizando la célula y una composición de anticuerpo producida mediante el método de producción.

La presente invención se refiere a (1) a (61), a continuación.

(1) Una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino en la que se introduce un gen codificante de una molécula de anticuerpo, que produce una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpos que presenta cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc, en la que el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas al Fc se expresó mediante la introducción de β -galactósido-2 α -fucosiltransferasa humana en células L de ratón [Science 252:1668, 1991]. Además, basándose en el conocimiento de que la adición de la N-acetilglucosamina en posición bisectante de la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido resulta importante para la actividad de ADCC del anticuerpo, Umana *et al.* prepararon una célula CHO que expresa β -1,4-N-acetilglucosamina transferasa III (GnTIII) y compararon su expresión con la de la estirpe celular parental. Se confirmó que no se observaba expresión de GnTIII en la estirpe celular parental de las células CHO [J. Biol. Chem. 261:13370, 1984] y que el anticuerpo expresado utilizando la células CHO expresantes de GnTIII presentaba una actividad ADCC 16 veces más elevada que el anticuerpo expresado utilizando la estirpe celular parental [Glycobiology 5:813, 1995; documento nº WO 99/54342]. En este momento, Umana *et al.* también produjeron una célula CHO en la que se había introducido β -1,4-N-acetilglucosamina transferasa V (GnTV) e informaron de que la expresión en exceso de GnTIII o GnTV mostraba toxicidad para las células CHO.

Exposición de la invención

De esta manera, con el fin de modificar la estructura de la cadena de azúcar de la glucoproteína que debía producirse, se intentó controlar la actividad del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la célula hospedadora, aunque de hecho las estructuras de las cadenas de azúcar son diversas y complejas y la solución de las funciones fisiológicas de las cadenas de azúcar resultaría insuficiente, por lo que se repitieron las pruebas de ensayo y error. En particular, aunque se ha encontrado poco a poco que la función efectora de los anticuerpos resulta muy influida por la estructura de la cadena de azúcar, todavía no se ha especificado una estructura de cadena de azúcar verdaderamente importante. Por lo tanto, para el desarrollo de medicamentos se espera a la identificación de una cadena de azúcar que influya sobre la función efectora de los anticuerpos y al desarrollo de una célula hospedadora a la que pueda añadirse una estructura de cadena de azúcar.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una célula hospedadora que produzca una composición de anticuerpo y pueda controlar una estructura de cadena de azúcar unida a una molécula de anticuerpo, una célula que pueda producir una composición de anticuerpo que presente una elevada actividad de ADCC, un método de producción de una composición de anticuerpo utilizando la célula y una composición de anticuerpo producida mediante el método de producción.

La presente invención se refiere a (1) a (22) a continuación.

[1]. Una célula en la que:

- (i) se ha delecionado la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa,
- (ii) se ha delecionado la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa y la actividad de una α 1,6-fucosiltransferasa,

mediante una técnica de ingeniería genética, en la que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:

- (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
- (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa),

y en el que la técnica de ingeniería genética es una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en (A), (B), (C) y (D) a continuación:

- (A) una técnica de disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,
(B) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima,
(C) una técnica para introducir una mutación en el enzima,
(D) una técnica para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen codificante del enzima.

[2]. Un animal no humano o planta transgénico o las progenies del mismo, que comprende un genoma que se modifica de manera que la actividad del enzima relacionado con la síntesis de la GDP-fucosa y la actividad de la α 1,6-fucosiltransferasa resulten reducidas, mediante una técnica de ingeniería genética, en la que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:

- (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
(b) Fx (GDP-ceto-6-desoximano 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
(c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa),

y en el que la técnica de ingeniería genética es una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en (A), (B), (C) y (D) a continuación:

- (A) una técnica de disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,
(B) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima,
(C) una técnica para introducir una mutación en el enzima,
(D) una técnica para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen codificante del enzima,

en el que se ha introducido, en dicho animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo, un gen codificante de un anticuerpo y el animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo es capaz de producir una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar en 20% o más del total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido de unión a la región Fc contenida en la composición de anticuerpo.

[3]. El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según [2], que comprende un genoma que se modifica de manera que un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa o α 1,6-fucosiltransferasa se encuentra inactivado.

[4]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según [2] o [3], en la que la GMD es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 65,
(b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 65 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD.

[5]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según [2] o [3], en la que la GMD es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 71,
(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se han delecionado, sustituido, insertado y/o añadido 1 a 20 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD,
(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD.

[6]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según [2] o [3], en la que Fx es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 48,
(b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 48 bajo condiciones restrictivas y que codifica una proteína que presenta actividad Fx.

[7]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según [2] o [3], en la que Fx es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 72,

- 5
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que han sido deletados, sustituidos, insertados y/o añadidos 1 a 20 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 72 y que presenta actividad Fx,
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 72 y presenta actividad Fx.
- 10 [8]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según [2] o [3], en la que GFPP es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 51,
- 15 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 51 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP.
- [9]. La célula según [1] o el animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según [2] o [3], en la que la GFPP es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 20 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73,
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos han sido deletados, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP,
- 25 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y presenta actividad de GFPP.
- 30 [10]. La célula animal o vegetal no humana transgénica o la progenie de la misma según cualquiera de entre [1] y [3], en la que la α 1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c) y (d), a continuación:
- 35 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,
- (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2,
- (c) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1, bajo condiciones restrictivas, y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- 40 (d) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.
- 45 [11]. La célula animal o vegetal no humana transgénica o la progenie de la misma según cualquiera de entre [1] y [3], en la que la α 1,6-fucosiltransferasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c), (d), (e) y (f), a continuación:
- 50 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23,
- (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24,
- 55 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos han sido deletados, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos han sido deletados, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- 60 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- 65 (f) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo

menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.

- 5 [12]. La célula según cualquiera de entre [1] y [4] a [11], que es resistente a por lo menos una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.
- 10 [13]. La célula según cualquiera de entre [1] y [4] a [12], que es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) a (i), a continuación:
- 15 (a) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino,
 (b) una estirpe celular de mieloma de rata, célula YB2/3HL.P2.G11.16.AG.20,
 (c) una estirpe celular de mieloma de ratón, células NS0,
 (d) una estirpe celular de mieloma de ratón, célula SP2/0-Ag14,
 (e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster chino,
 (f) una célula de hibridoma productor de anticuerpos,
 (g) una célula Namalwa de estirpe celular de leucemia humana,
 (h) una célula madre embrionaria no humana,
 20 (i) una célula de huevo fertilizado no humano.
- [14]. La célula según cualquiera de entre [1] o [4] a [13] en la que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo.
- 25 [15]. La célula según [14], en la que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
- [16]. Un procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende cultivar la célula según [14] o [15] en un medio para producir y acumular la composición de anticuerpo en el cultivo y recuperar la composición de anticuerpo a partir del cultivo.
- 30 [17]. El procedimiento según [16], que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo obtenida a partir de su estirpe celular parental.
- 35 [18]. La célula animal o vegetal no humana transgénica o la progenie de la misma según cualquiera de entre [2] y [11], en la que el animal no humano transgénico es un animal seleccionado de entre el grupo que consiste en vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono y conejo.
- 40 [19]. Un procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende recuperar una composición de anticuerpo a partir de tejido o líquido corporal, que comprende el anticuerpo, en el que el tejido o líquido corporal ha sido aislado a partir de un animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según cualquiera de entre [2] y [11] y [18], en el que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo.
- 45 [20]. El procedimiento según [19], en el que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
- [21]. El procedimiento según [19] o [20], que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo obtenida de un animal no humano o planta o la progenie del mismo el genoma del cual no ha sido modificado.
- 50 [22]. La célula según cualquiera de entre [1] o [4] a [15] o el animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según cualquiera de entre [2] y [11] o [18], en la que dicha técnica según (D) presenta como diana un gen de un enzima relacionado con la síntesis de la GDP-fucosa o un gen de α 1,6-fucosiltransferasa con un constructo génico de ARNi, en el que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:
- 55 (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
 (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
 60 (c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa).

En la presente memoria se da a conocer además (1) a (61), a continuación:

- 65 (1) una célula CHO obtenida de tejido de ovario de hámster chino en la que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo, que comprende una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido

unidas a la región Fc, en la que entre el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc en la composición, la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es de 20% o superior.

- 5
- (2) La célula CHO según (1), en la que la cadena de azúcar a la que no se encuentra unida la fucosa es una cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido en la que la posición 1 de fucosa no se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α .
- 10
- (3) La célula CHO según (1) o (2), en la que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
- (4) La célula CHO según cualquiera de entre (1) y (3), en la que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa y/o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se encuentra reducida o anulada.
- 15
- (5) La célula CHO según (4), en la que el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 20
- (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
 (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
 (c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa).
- 25
- (6) La célula CHO según (5), en la que GMD es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- 30
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65,
 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD.
- 35
- (7) La célula CHO según (5), en la que GMD es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 40
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido delecionado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD,
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD.
- 45
- (8) La célula CHO según (5), en la que Fx es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- 50
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48,
 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de Fx.
- 55
- (9) La célula CHO según (5), en la que Fx es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 60
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido delecionado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx,
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx.
- 65

- (10) La célula CHO según (5), en la que GFPP es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- 5
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP.
- (11) La célula CHO según (5), en la que GFPP es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 10
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73,
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP,
- 15
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y presenta actividad de GFPP.
- 20
- (12) La célula CHO según (4), en la que el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido es una α -1,6-fucosiltransferasa.
- 25
- (13) La célula CHO según (12), en la que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,
- 30
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.
- 35
- (14) La célula CHO según (12), en la que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23,
- 40
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa.
- 45
- (15) La célula CHO según cualquiera de entre (4) y (14), en la que la actividad enzimática se reduce o se anula mediante una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c), (d) y (e), a continuación:
- 50
- (a) una técnica de disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,
- (b) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima,
- (c) una técnica para introducir una mutación en el enzima,
- 55
- (d) una técnica para inhibir la transcripción o la traducción de un gen codificante del enzima,
- (e) una técnica para seleccionar una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.
- 60
- (16) La célula CHO según cualquiera de entre (4) y (15), que es resistente a por lo menos una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.
- 65

- 5
- (17) La célula CHO según cualquiera de entre (4) y (16), que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo producida por las células CHO parentales.
- 10
- (18) La célula CHO según (17), que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo en la que el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc contenidas en la composición de anticuerpo, la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es inferior a 20%.
- 15
- (19) La célula CHO según (18), en la que la cadena de azúcar a la que no se encuentra unida la fucosa es una cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido en la que la posición 1 de la fucosa no se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α .
- 20
- (20) Un procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende cultivar la célula CHO según cualquiera de entre (1) y (19) en un medio para producir y acumular la composición de anticuerpo en el cultivo y recuperar la composición de anticuerpo a partir del cultivo.
- (21) Una composición de anticuerpo que se produce utilizando el método según (20).
- 25
- (22) Una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc, que es producida por una célula CHO, en la que entre el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc en la composición, la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es de 20% o superior.
- 30
- (23) Una célula en la que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa y/o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se reduce o se anula mediante una técnica de ingeniería genética.
- 35
- (24) La célula según (23), en la que el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 40
- (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
 (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
 (c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa).
- (25) La célula según (24), en la que GMD es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- 45
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65,
 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD.
- 50
- (26) La célula según (24), en la que GMD es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- 55
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD,
- 60
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD.
- (27) La célula según (24), en la que Fx es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:
- 65
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48,
 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID

nº 48, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de Fx.

(28) La célula según (24), en la que Fx es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx,

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx.

(29) La célula según (24), en la que GFPP es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51,

(b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP.

(30) La célula según (24), en la que GFPP es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP,

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y presenta actividad de GFPP.

(31) La célula según (23), en la que el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido es una α -1,6-fucosiltransferasa.

(32) La célula según (31), en la que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c) y (d), a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,

(b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2,

(c) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,

(d) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2, bajo condiciones restrictivas y que codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.

(33) La célula según (31), en la que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c), (d), (e) y (f):

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23,

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24,

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,

(d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha

sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,

- 5 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- 10 (f) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa.
- (34) La célula según cualquiera de entre (23) y (33), en la que la técnica de ingeniería genética es una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c) y (d), a continuación:
- 15 (a) una técnica de disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,
 (b) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima,
 (c) una técnica para introducir una mutación en el enzima,
 (d) una técnica para inhibir la transcripción o la traducción de un gen codificante del enzima.
- 20 (35) La célula según cualquiera de entre (23) y (34), que es resistente a por lo menos una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido.
- 25 (36) La célula según cualquiera de entre (23) y (35), que es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) a (i), a continuación:
- 30 (a) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino,
 (b) una estirpe celular de mieloma de rata, célula YB2/3HL.P2.G11.16.Ag.20,
 (c) una estirpe celular de mieloma de ratón, células NS0,
 (d) una estirpe celular de mieloma de ratón, célula SP2/0-Ag14,
 (e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster chino,
 (f) una célula de hibridoma productor de anticuerpos,
 (g) una célula Namalwa de estirpe celular de leucemia humana,
 (h) una célula madre embrionaria,
 (i) una célula de huevo fertilizado.
- 35 (37) La célula según cualquiera de entre (23) y (36) en la que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo.
- 40 (38) La célula según (37), en la que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
- 45 (39) Un procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende cultivar la célula según (37) o (38) en un medio para producir y acumular la composición de anticuerpo en el cultivo y recuperar la composición de anticuerpo a partir del cultivo.
- 50 (40) El procedimiento según (39), que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo obtenida a partir de su estirpe celular parental.
- (41) Una composición de anticuerpo que se produce utilizando el procedimiento según (39) o (40).
- 55 (42) Un animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo, que comprende un genoma que se encuentra modificado de manera que la actividad del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa y/o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido se encuentra reducida.
- 60 (43) Un animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según (42), en el que el gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido se encuentra anulado.
- 65 (44) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (42) o (43), en el que el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, es un enzima seleccionado de

entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:

- (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),
- (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa),
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa).

(45) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (44), en el que GMD es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD.

(46) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (44), en el que Fx es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de Fx.

(47) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (44), en el que GFPP es una proteína codificada por un ADN de (a) o (b), a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP.

(48) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (42) o (43), en el que el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido es una α -1-6-fucosiltransferasa.

(49) El animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo según (48), en el que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c) y (d), a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,
- (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2,
- (c) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- (d) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2, bajo condiciones restrictivas y que codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.

(50) El animal o vegetal no humano transgénico o la progenie del mismo según cualquiera de entre (42) y (49), en el que el animal no humano transgénico es un animal seleccionado de entre el grupo que consiste en vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono y conejo.

(51) Un procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende introducir un gen codificante de una molécula de anticuerpo en el animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo según cualquiera de entre (42) y (50), criar el animal o planta, aislar el tejido o líquido corporal que comprende el anticuerpo introducido a partir del animal o planta criado, y recuperar la composición de anticuerpo a partir del tejido o líquido corporal aislado.

(52) El procedimiento según (51), en el que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.

(53) El procedimiento según (51) o (52), que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más elevada que una composición de anticuerpo obtenida de un animal no humano o planta o la progenie del mismo el genoma del cual no ha sido modificado.

- (54) Una composición de anticuerpo que se produce utilizando el procedimiento según (51) a (53).
- 5 (55) Un medicamento que comprende la composición de anticuerpo según (21), (22), (41) y (54) como ingrediente activo.
- 10 (56) El medicamento según (55), en el que el medicamento es un fármaco diagnóstico, un fármaco preventivo o un fármaco terapéutico para enfermedades acompañadas de tumores, enfermedades acompañadas de alergias, enfermedades acompañadas de inflamaciones, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades de órganos circulatorios, enfermedades acompañadas de infecciones víricas o enfermedades acompañadas de infecciones bacterianas.
- 15 (57) Una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) y (j), a continuación:
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71,
- 20 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD,
- (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72,
- 25 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx,
- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73,
- 30 (f) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP,
- (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23,
- 35 (h) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- 40 (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24,
- (j) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- 45 (58) Un ADN que codifica la proteína según (57).
- (59) Un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b), (c), (d) y (e), a continuación:
- 50 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,
(b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2,
(c) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65,
(d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48,
(e) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51.
- 55 (60) Un ADN genómico seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c), a continuación:
- (a) un ADN genómico que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 3,
(b) un ADN genómico que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 67,
60 (c) un ADN genómico que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 70.
- (61) Un vector diana para la recombinación homóloga, que comprende una longitud completa del ADN según cualquiera de entre (58) y (60), o una parte del mismo.
- 65 La célula CHO obtenida de tejido de ovario de hámster chino en la que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo introducida según la presente invención puede ser cualquier célula CHO con la condición de

que sea una célula CHO obtenida de tejido de ovario de hámster chino en la que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo, que produce una composición de anticuerpo que comprende cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc de una molécula de anticuerpo, en la que el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc en la composición, la proporción, la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es de 20% o superior.

En la presente invención, la molécula de anticuerpo incluye cualquier molécula con la condición de que comprende la región Fc de un anticuerpo. Entre los ejemplos se incluyen un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende una región Fc y similares.

El anticuerpo es una proteína que es producida en el cuerpo vivo mediante reacción inmunológica como resultado de la estimulación por antígenos exógenos y que presenta una actividad de unión específica al antígeno. Entre los ejemplos del anticuerpo se incluyen un anticuerpo secretado por una célula de hibridoma preparada a partir de una célula de bazo de un animal inmunizado con un antígeno, un anticuerpo preparado mediante una técnica de recombinación genética, es decir un anticuerpo obtenido mediante la introducción de un vector de expresión de anticuerpo en el que se ha insertado un gen de anticuerpo en una célula hospedadora, y similares. Entre los ejemplos específicos se incluyen un anticuerpo producido por un hibridoma, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y similares.

Un hibridoma es una célula que se obtiene mediante fusión celular entre una célula B obtenida mediante la inmunización de un mamífero diferente de un ser humano con un antígeno y una célula de mieloma obtenida del ratón o similar y que puede producir un anticuerpo monoclonal que presenta la especificidad de antígeno deseada.

Entre los ejemplos del anticuerpo humanizado se incluye un anticuerpo híbrido humano, un anticuerpo injertado con RDC humano y similares.

Un anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo (en adelante denominado "VH", siendo la cadena pesada "cadena H") y una región variable de cadena ligera de anticuerpo (en adelante denominada "VL", siendo la cadena ligera "cadena L"), ambas de un animal diferente del ser humano, una región constante de cadena pesada de anticuerpo humano (en adelante también denominada "CH") y una región constante de cadena ligera de anticuerpo humano (en adelante también denominada "CL"). Como animal diferente del ser humano, puede utilizarse cualquier animal, tal como el ratón, la rata, el hámster, el conejo o similar, con la condición de que pueda prepararse un hibridoma a partir del mismo.

El anticuerpo híbrido humano puede producirse mediante la obtención del ADNc codificante de VH y VL a partir de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales, insertándolos en un vector de expresión para una célula hospedadora que presenta genes codificantes de CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, para construir de esta manera un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano y después introducir el vector en una célula hospedadora para expresar el anticuerpo.

Como CH del anticuerpo híbrido humano, puede utilizarse cualquier CH, con la condición de que pertenezca a una inmunoglobulina humana (en adelante denominada "Ig_h"). Aunque las pertenecientes a la clase IgG_h resultan preferentes, puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG_h, tales como IgG1_h, IgG2_h, IgG3_h e IgG4_h. Además, como CL del anticuerpo híbrido humano, puede utilizarse cualquier CL, con la condición de que pertenezca a la clase Ig_h, y también pueden utilizarse cualquiera perteneciente a la clase κ o λ.

Un anticuerpo injertado con RDC humana es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de las RDC de VH y VL de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano se injertan en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano.

El anticuerpo con injertación de RDC humano puede producirse mediante la construcción de los ADNc codificantes de regiones V en las que las RDC de VH y VL de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano se injertan en RDC de VH y VL de un anticuerpo humano, insertándolos en un vector de expresión para una célula hospedadora que presenta genes codificantes de CH de anticuerpo humano y de CL de anticuerpo humano, para construir de esta manera un vector de expresión de anticuerpo con injertación de RDC humano y después introducir el vector de expresión en una célula hospedadora para expresar el anticuerpo con injertación de RDC humano.

Como CH del anticuerpo con injertación de la RDC humano, puede utilizarse cualquier CH, con la condición de que pertenezca a hlg, pero aquellos de la clase IgG_h resultan preferentes y puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase de IgG_h, tal como IgG1_h, IgG2_h, IgG3_h e IgG4_h. Además, como CL del anticuerpo injertado con RDC humano, puede utilizarse cualquier CL, con la condición de que pertenezca a la clase Ig_h, y también pueden utilizarse cualquiera perteneciente a la clase κ o λ.

Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo existente naturalmente en el cuerpo humano, aunque también incluye anticuerpos obtenidos de una biblioteca fágica de anticuerpos humanos, un animal transgénico productor de

anticuerpos humanos y una planta transgénica productora de anticuerpos humanos, que se preparan basándose en los avances recientes en las técnicas de ingeniería genética, de ingeniería celular y de ingeniería del desarrollo.

5 Con respecto al anticuerpo existente en el cuerpo humano, puede cultivarse un linfocito capaz de producir el anticuerpo mediante el aislamiento de un linfocito de sangre periférica humano, inmortalizándolo mediante su infección por virus EB o similar y después clonándolo, y el anticuerpo puede purificarse a partir del cultivo.

10 La biblioteca fágica de anticuerpos humanos es una biblioteca en la que se expresan fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla y similares, sobre la superficie fágica mediante la inserción de un gen codificante de un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen fágico. Un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que presenta la actividad de unión de antígeno deseada puede recuperarse a partir de la biblioteca, utilizando su actividad para unirse a un sustrato inmovilizado con antígeno a modo de marcador. El fragmento de anticuerpo puede convertirse además en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

15 Un animal transgénico no humano productor de anticuerpos humanos es un animal en el que se ha introducido un gen de anticuerpo humano en las células. Específicamente, un animal transgénico productor de anticuerpos humanos puede prepararse mediante la introducción de un gen de anticuerpo humano en una célula ES de un ratón, trasplantando la célula ES en un embrión de estadio temprano de otro ratón y seguidamente desarrollándolo. 20 Mediante la introducción de un gen humano de anticuerpo híbrido en un huevo fertilizado y desarrollándolo, también puede prepararse el animal transgénico. Con respecto al método de preparación de un anticuerpo humano a partir del animal transgénico productor de anticuerpos humanos, puede producirse el anticuerpo humano y acumularse en un cultivo mediante la obtención de un hibridoma productor de anticuerpos humanos mediante un método de preparación de hibridomas habitualmente llevado a cabo en mamíferos diferentes del ser humano y después cultivándolo. 25

Entre los ejemplos del animal no humano transgénico se incluyen vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono, conejo y similares.

30 Además, en la presente invención, resulta preferente que el anticuerpo sea un anticuerpo que reconozca un antígeno de tipo tumoral, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con alergia o inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad de órgano circulatorio, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con enfermedad autoinmunitaria o un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con infección vírica o bacteriana, y resulta preferente un anticuerpo humano que pertenece a la clase 35 IgG.

Un fragmento de anticuerpo es un fragmento que comprende la región Fc de un anticuerpo. Entre los ejemplos del fragmento de anticuerpo se incluyen un monómero de cadena H, un dímero de cadenas H y similares.

40 Una proteína de fusión que comprende una región Fc es una composición en la que un anticuerpo que comprende la región Fc de un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se fusiona con una proteína, tal como un enzima, una citoquina o similar.

45 En la presente invención, entre los ejemplos de la cadena de azúcar que se une a la región Fc de una molécula de anticuerpo se incluyen una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos de la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido se incluyen un tipo complejo en el que el lado de extremo no reductor de la estructura nuclear presenta una o una pluralidad de ramas paralelas de galactosa-N-acetilglucosamina (en adelante denominadas "Gal-GlcNAc") y el lado de extremo no reductor de Gal-GlcNAc presenta una estructura, tal como 50 ácido siálico, N-acetilglucosamina bisectante o similar.

55 En un anticuerpo, la región Fc presenta posiciones a las que se une una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido que se describirá a continuación. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se unen dos cadenas de azúcar por cada molécula de anticuerpo. Debido a que la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido que se une a un anticuerpo incluye cualquier cadena de azúcar que presenta la estructura nuclear representada por la fórmula estructural (I), pueden resultar posibles varias combinaciones de cadenas de azúcar para las dos cadenas de azúcar unidas mediante N-glucósido que se unen al anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, puede considerarse la identidad de las sustancias desde el punto de vista de la estructura sacárida unida a la región Fc.

60 En la presente invención, la composición que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido en la región Fc puede comprender un anticuerpo que presenta la misma estructura de cadena de azúcar o un anticuerpo que presenta diferentes estructuras de cadena de azúcar, con la condición de que se obtenga el efecto de la presente invención a partir de la composición.

65 En la presente invención, la proporción de una cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido a la región Fc contenida en la composición de anticuerpo es la proporción del número

de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar respecto al número total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc contenida en la composición.

5 En la presente invención, la cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido es una cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen una cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido en la que la posición 1 de la fucosa no se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina mediante un enlace α .

15 La composición de anticuerpo mostraba una elevada actividad de ADCC en el caso de que la proporción de cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido de unión a la región Fc contenida en la composición de anticuerpo producida según la presente invención preferentemente es de 20% o superior, más preferentemente de 25% o superior, todavía más preferentemente de 30% o superior, todavía más preferentemente de 40% o superior, y todavía más preferentemente de 50% o superior. A medida que se reduce la concentración de anticuerpos, se reduce la actividad de la ADCC, aunque puede obtenerse una actividad elevada de ADCC aunque la concentración de los anticuerpos sea baja, con la condición de que la proporción de la cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar es de 20% o superior.

25 La proporción de cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar contenida en la composición que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido en la región Fc puede determinarse liberando la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo utilizando un método conocido, tal como la hidrazinólisis, la digestión enzimática o similar [Biochemical Experimentation Methods 23 - Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi, 1989], realizando el marcaje fluorescente o el marcaje con isótopo radioactivo de la cadena de azúcar liberada y separando después la cadena de azúcar marcada mediante cromatografía. Además, la cadena de azúcar liberada también puede determinarse mediante el análisis de la misma utilizando el método HPAED-PAD [J. Liq. Chromatogr. 6:1557, 1983].

35 En la presente invención, las células CHO derivadas de tejido de ovario de hámster chino incluye cualquier célula que sea una estirpe celular establecida a partir de un tejido ovárico de hámster chino (*Cricetulus griseus*). Entre los ejemplos de las células CHO indicadas en documentos tales como Journal of Experimental Medicine 108:945, 1958; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1275, 1968; Genetics 55:513, 1968; Chromosoma 41:129, 1973; Methods in Cell Science 18:115, 1996; Radiation Research 148:260, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. 60:1275, 1968; Cell 6:121, 1975; Molecular Cell Genetics, apéndices I y II (páginas 883 a 900) y similares. Además, también pueden proporcionarse como ejemplos las estirpes celulares CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), DUXB11 (ATCC nº CCL-9096) y Pro-5 (ATCC nº CCL-1781) registrados en la ATCC (The American Type Culture Collection) y una sub-línea celular disponible comercialmente CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619) o líneas subcelulares obtenidas mediante la adaptación de estirpes celulares utilizando diversos medios.

45 En la presente invención, el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa, puede ser cualquier enzima con la condición de que sea un enzima relacionado con la síntesis del azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, como fuente de suministro de fucosa a una cadena de azúcar. El enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa, es un enzima que presenta una influencia sobre la síntesis del azúcar-nucleótido intracelular GDP-fucosa.

50 El azúcar-nucleótido intracelular GDP-fucosa es suministrado mediante una ruta de síntesis *de novo* o una ruta de síntesis de reutilización. De esta manera, todos los enzimas relacionados con las rutas de síntesis están incluidos en el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa.

55 Entre los ejemplos del enzima relacionado con la ruta de síntesis *de novo* del azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa, se incluyen GDP-manosa 4,6-deshidratasa (en adelante denominado "GMD"), GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa 4,6-reductasa (en adelante denominado "Fx") y similares.

60 Entre los ejemplos del enzima relacionado con la ruta de síntesis de reutilización del azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen la GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (en adelante denominada "GFPP"), la fucoquinasa y similares.

65 Como enzima que presenta influencia sobre la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa, también se encuentra incluido un enzima que presenta influencia sobre la actividad del enzima relacionado con la síntesis del azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, y un enzima que presenta influencia sobre la estructura de sustancias como sustrato del enzima.

En la presente invención, entre los ejemplos de la GMD se incluyen:

una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:

- 5 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD,
- 10 (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71,
- (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD,
- 15 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y que presenta actividad de GMD, y similares.

20 Además, entre los ejemplos del ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de GMD se incluyen un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 65 y un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 65 bajo condiciones restrictivas y codifica una secuencia de aminoácidos que presenta actividad de GMD.

25 En la presente invención, entre los ejemplos de Fx se incluyen:

una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:

- 30 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48,
- (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de Fx,
- 35 (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72,
- (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx,
- 40 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y que presenta actividad de Fx, y similares.

45 Además, entre los ejemplos del ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de Fx se incluyen un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 48 y un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 48 bajo condiciones restrictivas y codifica una secuencia de aminoácidos que presenta actividad de Fx.

En la presente invención, entre los ejemplos de la GFPP se incluyen:

50 una proteína codificada por un ADN de (a) o (b) a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51,
- 55 (b) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP,
- (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73,
- 60 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP,
- 65 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP, y similares.

Además, entre los ejemplos del ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de GFPP se incluyen un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 51 y un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 51 bajo condiciones restrictivas y codifica una secuencia de aminoácidos que presenta actividad de Fx.

En la presente invención, el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido incluye cualquier enzima, con la condición de que sea un enzima relacionado con la reacción de unión de la posición 1 de la fucosa a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. El enzima relacionado con la reacción de unión de la posición 1 de la fucosa a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se refiere a un enzima relacionado con la reacción de unión de la posición 1 de la fucosa a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Entre los ejemplos del enzima relacionado con la reacción de unión de la posición 1 de la fucosa a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la α -1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

Además, entre los ejemplos se incluye un enzima que influye sobre la actividad del enzima relacionado con la reacción de unión de la posición 1 de la fucosa a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido y un enzima que influye sobre la estructura de sustancias como sustrato del enzima.

En la presente invención, entre los ejemplos de la α -1,6-fucosiltransferasa se incluyen:

una proteína codificada por un ADN de (a), (b), (c) o (d) a continuación:

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1,
- (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2,
- (c) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1, bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- (d) un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2, bajo condiciones restrictivas y que codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa,
- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23,
- (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24,
- (g) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- (h) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deletado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- (i) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa,
- (j) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa, y similares.

Además, entre los ejemplos del ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de la α -1,6-fucosiltransferasa se incluyen un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1 o nº 2 y un ADN que se hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1 o nº 2 bajo condiciones restrictivas y codifica una secuencia de aminoácidos que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa.

En la presente invención, un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas es un ADN obtenido mediante, por

ejemplo, un método tal como la hibridación de colonias, la hibridación de placas o la hibridación de transferencia southern utilizando un ADN tal como el ADN que presenta la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1, nº 2, nº 48, nº 51 o nº 65 o un fragmento parcial de la misma a modo de sonda, y específicamente incluye un ADN que puede identificarse llevando a cabo la hibridación a 65°C en presencia de cloruro sódico 0,7 a 1,0 M utilizando un filtro en el que se inmovilizan fragmentos de ADN derivados de una colonia o placa, seguido del lavado del filtro a 65°C con solución 0,1 a 2 x SSC (composición de la solución 1 x SSC que comprende cloruro sódico 150 mM y citrato sódico 15 mM). La hibridación puede llevarse a cabo siguiendo los métodos descritos en, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (en adelante denominado "Molecular Cloning, Second Edition"), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (en adelante denominado "Current Protocols in Molecular Biology"); DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, 1995, y similares. Entre los ejemplos del ADN hibridable se incluye un ADN que presenta una homología de por lo menos 60% o superior, preferentemente de 70% o superior, más preferentemente de 80% o superior, todavía más preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, respecto a la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1, nº 2, nº 48, nº 51 o nº 65.

En la presente invención, puede obtenerse la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido deleciónado, sustituido, insertado y/o añadido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 23, nº 24, nº 71, nº 72 o nº 73 y que presenta actividad de α -1,6-fucosiltransferasa, actividad de GMD, actividad de Fx o actividad de GFPP, por ejemplo mediante la introducción de mutación dirigida a sitio en un ADN codificante de una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1, nº 2, nº 65, nº 48 o nº 51, respectivamente, utilizando la mutagénesis dirigida a sitio descrita en, por ejemplo, Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; Nucleic Acids Research 10:6487, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409, 1982; Gene 34:315, 1985; Nucleic Acids Research 13:4431, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985, y similares. El número de aminoácidos que debe delecionarse, sustituirse, insertarse y/o añadirse es uno o más, y el número no se encuentra particularmente limitado, aunque es un número que puede delecionarse, sustituirse o añadirse mediante una técnica conocida, tal como la mutagénesis dirigida a sitio, por ejemplo es de 1 a varias decenas, preferentemente de entre 1 y 20, más preferentemente de entre 1 y 10, y todavía más preferentemente de entre 1 y 5.

Además, con el fin de mantener la actividad de α -1,6-fucosiltransferasa, la actividad de GMD, la actividad de Fx o la actividad de GFPP de la proteína que debe utilizarse en la presente invención, presenta una homología de por lo menos 80% o superior, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, todavía más preferentemente de 97% o superior, y todavía más preferentemente de 99% o superior, respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 23, nº 24, nº 71, nº 72 o nº 73, calculada utilizando software de análisis, tal como BLAST [J. Mol. Biol. 215:403, 1990], FASTA [Methods in Enzymology 183:63, 1990] o similares.

Entre los ejemplos de la célula CHO de la presente exposición se incluyen una célula en la que la actividad enzimática se encuentra reducida o deleciónada.

Entre las células en las que la actividad de un enzima se encuentra reducida o deleciónada se incluyen las células en las que la actividad de un enzima relacionado con la modificación de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar, en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se encuentra reducida o deleciónada. Como método para obtener dichas células, puede utilizarse cualquier técnica, con la condición de que pueda reducir o delecionar la actividad enzimática de interés. Entre los ejemplos de la técnica para reducir o delecionar la actividad enzimática se incluyen:

- (a) una técnica de disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,
- (b) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima,
- (c) una técnica para introducir una mutación en el enzima,
- (d) una técnica para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen codificante del enzima.
- (e) una técnica para seleccionar una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, y similares.

En la presente memoria, puede obtenerse la estirpe celular resistente a lectina mediante el cultivo de una estirpe celular en un medio que comprende una concentración predeterminada de lectina y después mediante la selección de una estirpe celular que adquiere dicha propiedad de manera que su tasa de supervivencia se incrementa en por

lo menos 2 veces, preferentemente en 3 veces, y más preferentemente en 5 veces o más, que la estirpe celular parental con significancia estadística. Además, también puede obtenerse mediante el cultivo de una estirpe celular en un medio que comprende lectina, seguido de la selección de una estirpe celular que puede cultivarse a una determinada tasa de supervivencia, por ejemplo una tasa de supervivencia de 80%, a una concentración de lectina de por lo menos 2 veces, preferentemente de 5 veces, más preferentemente de 10 veces, y todavía más preferentemente de 20 veces o más, que la estirpe celular parental.

Como lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido, puede utilizarse cualquier lectina que puede reconocer la estructura de cadena de azúcar. Entre los ejemplos se incluyen una lectina de *Lens culinaris* LCA (aglutinina de lenteja obtenida de *Lens culinaris*), una lectina de guisante PSA (lectina de guisante obtenida de *Pisum sativum*), una lectina de haba VFA (aglutinina obtenida de *Vicia faba*), una lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina obtenida de *Aleuria aurantia*) y similares.

La célula CHO de la presente invención puede producir una composición de anticuerpo que presenta una actividad de ADCC más elevada que la de una composición de anticuerpo producida por la célula CHO parental antes de aplicar la técnica para reducir o eliminar la actividad enzimática de interés.

Además, la célula CHO de la presente invención puede producir una composición de anticuerpo que presenta una actividad de ADCC más alta que la de una composición de anticuerpo en la que, del total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido unidas a la región Fc contenidas en la composición de anticuerpo, la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es inferior a 20%.

Un ejemplo de la estirpe celular parental que debe utilizarse en la presente invención es una célula en la que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido no se encuentra reducida. Específicamente, se utiliza una célula que no ha sido tratada para reducir o anular la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar, en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

En la presente invención, la actividad de ADCC es una actividad citotóxica en la que un anticuerpo unido a un antígeno de superficie celular sobre una célula tumoral en el cuerpo vivo activa una célula efectora mediante un receptor de Fc existente sobre la región de Fc de anticuerpo y la superficie de la célula efectora, obstruyendo de esta manera la célula tumoral y similares [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., capítulo 2.1, 1955]. Entre los ejemplos de la célula efectora se incluyen una célula asesina, una célula asesina natural, un macrófago activado y similares.

La presente exposición se refiere además a una célula en la que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se reduce mediante una técnica de ingeniería genética. La célula hospedadora de la presente invención resulta útil como célula hospedadora para producir una composición de anticuerpo que presenta una actividad de ADCC elevada.

La célula hospedadora de la presente invención puede ser cualquier huésped, con la condición de que pueda expresar una molécula de anticuerpo según la presente invención. Entre los ejemplos se incluyen una célula de levadura, una célula animal, una célula de insecto, una célula vegetal y similares. Entre los ejemplos de las células se incluyen aquellas que a continuación se proporcionan en el ítem 3. Entre las células animales entre los ejemplos preferentes se incluyen una célula CHO obtenida de un tejido de ovario de hámster chino, una estirpe celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, una estirpe celular de mieloma de rata NS0, un mieloma de ratón SP2/0-Ag14, una célula BHK derivada de un tejido renal de hámster sirio, una célula de hibridoma productor de anticuerpos, una célula Namalwa de la estirpe celular de leucemia humana, una célula madre embrionaria, una célula de huevo fertilizado y similares.

A continuación se describe en detalle la presente invención.

1. Preparación de la célula hospedadora de la presente invención

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante las técnicas a continuación.

(1) Técnica de interrupción génica con diana en un gen codificante de un enzima

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse utilizando una técnica de disrupción génica utilizando como diana un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen GMD, Fx, GFPP, fucoquinasa y similares. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la α -1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

El gen tal como se utiliza en la presente memoria incluye ADN y ARN.

El método de disrupción génica puede ser cualquier método, con la condición de que se incluya la posibilidad de interrumpir el gen del enzima diana. Entre los ejemplos se incluyen un método antisentido, un método de ribozima, un método de recombinación homóloga, un método RDO, un método de ARNi, un método en que se utilizan retrovirus, un método en que se utilizan trasposones y similares. Los métodos se describen específicamente a continuación.

(a) Preparación de la célula hospedadora de la presente invención mediante el método antisentido o el método de ribozima.

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante el método de ribozima descrito en Cell Technology 12:239, 1993; Bio/Technology 17:1097, 1999; Hum. Mol. Genet. 5:1083, 1995; Cell Technology 13:255, 1994; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1886, 1999, o similar, por ejemplo de la manera siguiente, utilizando como diana un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Se prepara un ADNc o un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc o ADN genómico preparado.

Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña una longitud apropiada de un gen antisentido o constructo de ribozima que comprende una fracción de ADN que codifica el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido una parte de su región no traducida o un intrón.

Con el fin de expresar el gen antisentido o ribozima en una célula, se prepara un vector recombinante mediante la inserción de un fragmento o la longitud total del ADN preparado cadena abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Se obtiene un transformante mediante la introducción del vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

La célula hospedadora de la presente invención puede obtenerse mediante la selección de un transformante basada en la actividad del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. La célula hospedadora de la presente invención también puede obtenerse mediante la selección de un transformante basándose en la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular o la estructura de cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo producida.

Como célula hospedadora utilizada para la producción de la célula hospedadora de la presente invención, puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima diana relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen células hospedadoras que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Como vector de expresión, se utiliza un vector que es de replicación autónoma en la célula hospedadora o que puede integrarse en el cromosoma y comprende un promotor en una posición que permite que el gen antisentido o ribozima diseñado pueda transferirse. Entre los ejemplos se incluyen vectores de expresión que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Con respecto al método para introducir un gen en diversas células hospedadoras, pueden utilizarse los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diversas células hospedadoras, que se describirán a continuación, en el ítem 3.

El método a continuación puede ejemplificarse como el método de selección de un transformante basado en la actividad del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Método para la selección de un transformante:

Entre los ejemplos del método para seleccionar una célula en la que se encuentra reducida la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen métodos bioquímicos o técnicas de ingeniería genética descritos en New Biochemical Experimentation Series 3 - Saccharides I, Glycoprotein (Tokyo Kagaku Dojin), editado por la Japanese Biochemical Society, 1988; Cell Engineering, suplemento, Experimental Protocol Series, Glycobiology Experimental Protocol, Glycoprotein, Glycolipid and Proteoglycan (Shujun-sha), editado por Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Kiyoshi Furukawa y Kazuyuki Sugawara, 1996; Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; y similares. Entre los ejemplos del método bioquímico se incluyen un método en el que se evalúa la actividad enzimática utilizando un sustrato específico de enzima y similares. Entre los ejemplos de la técnica de ingeniería genética se incluye el análisis northern, la RT-PCR y similares que miden la cantidad de ARNm de un gen codificante del enzima.

Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 1(5). Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se incluyen los métodos que se describen a continuación, en los ítems 5 y 6.

Como método para preparar un ADNc codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se proporciona a modo de ejemplo el método siguiente.

Preparación de ADN:

Se preparó un ARN total o ARNm a partir de un tejido o célula humano o animal no humano.

Se preparó una biblioteca de ADNc a partir del ARN total o ARNm preparado.

Se producen cebadores degenerados basándose en la secuencia de aminoácidos de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, y se obtiene un fragmento génico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, mediante PCR utilizando la biblioteca de ADNc preparada como molde.

Se prepara un ADN codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido puede obtenerse mediante cribado de la biblioteca de ADNc utilizando el fragmento génico obtenido a modo de sonda.

Con respecto al ARNm de un tejido o célula humano o no humano, puede utilizarse un producto disponible comercialmente (por ejemplo fabricado por Clontech) o puede prepararse a partir de un tejido o célula humano o no humano de la manera siguiente. Entre los ejemplos del método para preparar un ARN total a partir de un tejido o célula humano o animal no humano se incluye el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology 154:3, 1987], el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo ácido (AGPC) [Analytical Biochemistry 162:156, 1987; Experimental Medicine 9:1937, 1991] y similares.

Además, entre los ejemplos del método de preparación de ARNm a partir de un ARN total como ARN poli(A)⁺ se incluyen un método de columna de celulosa con oligo(dT) inmovilizado (Molecular Cloning, segunda edición) y similares.

Además, puede prepararse ARNm utilizando un kit, tal como el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia) o similares.

Se preparó una biblioteca de ADNc a partir del ARNm preparado de un tejido o célula humano o animal no humano. Entre los ejemplos del método de preparación de bibliotecas de ADNc se incluyen los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; A Laboratory Manual, segunda edición, 1989, y similares, o métodos utilizando kits disponibles comercialmente, tales como el sistema de plásmidos SuperScript para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (fabricado por Life Technologies), el kit de síntesis de ADNc-ZAP (fabricado por STRATAGENE) y similares.

Como vector de clonación para la utilización en la preparación de la biblioteca de ADNc, puede utilizarse cualquier vector, tal como un vector fágico, un vector plásmido o similar, con la condición de que sea autónomamente replicable en *Escherichia coli* K12. Entre los ejemplos se incluyen ZAP Express [fabricado por Stratagene, Strategies 5:58, 1992], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research 17:9494, 1989], Lambda ZAP II (fabricado por STRATAGENE), λ gt10 y λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49, 1985], λ TriplEx (fabricado por Clontech), XExCell (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983], pUC18 [Gene 33:103, 1985] y similares.

Puede utilizarse cualquier microorganismo como microorganismo huésped, aunque preferentemente se utiliza *Escherichia coli*. Entre los ejemplos se incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [fabricado por STRATAGENE, Strategies 5:81, 1992], *Escherichia coli* C600 [Genetics 39:440, 1954], *Escherichia coli* Y1088 [Science 222:778, 1983], *Escherichia coli* Y1090 [Science 222:778, 1983], *Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol. 166:1, 1983], *Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16:118, 1966], *Escherichia coli* JM105 [Gene 38:275, 1985] y similares.

La biblioteca de ADNc puede utilizarse sin modificación en los análisis posteriores y con el fin de obtener un ADNc de longitud completa con la máxima eficiencia posible mediante la reducción de la proporción de ADNc de longitud completa, puede utilizarse una biblioteca de ADNc preparada utilizando el método de caperuza oligo desarrollado por Sugano *et al.* [Gene 138:171, 1994; Gene 200:149, 1997; Protein, Nucleic Acid and Protein 41:603, 1996; Experimental Medicine 11:2491, 1993; cDNA Cloning (Yodo-sha) (1996); Methods for Preparing Gene Libraries (Yodo-sha) (1994)] en el análisis a continuación.

Se prepararon cebadores degenerados específicos para las secuencias de nucleótidos 5'-terminales y 3'-terminales de una secuencia de nucleótidos que se considera que codifica la secuencia de aminoácidos, basándose en la secuencia de aminoácidos del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido y el ADN se amplificó mediante PCR [PCR Protocols, Academic Press, 1990] utilizando la biblioteca de ADNc preparada como molde para obtener un fragmento génico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Puede confirmarse que el fragmento génico obtenido es un ADN codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, mediante un método utilizado habitualmente para analizar un nucleótido, tal como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)], un analizador de secuencias de nucleótidos ABIPRISM 377 DNA Sequencer (fabricado por PE Biosystems) o similar.

Se preparó un ADN codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido puede obtenerse llevando a cabo la hibridación de colonias o la hibridación de placas (Molecular Cloning, segunda edición) para el ADNc o la biblioteca de ADNc sintetizada a partir

del ARNm contenido en el tejido o célula humano o animal no humano, utilizando el fragmento génico a modo de sonda de ADN.

Además, un ADN codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, también puede obtenerse realizando un cribado mediante PCR utilizando el ADNc o biblioteca de ADNc sintetizado a partir de ARNm contenido en un tejido o célula humano o animal no humano como molde y utilizando los cebadores utilizados para obtener el fragmento génico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

La secuencia de nucleótidos del ADN obtenido codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se analizó desde su extremo y se determinó mediante un método utilizado habitualmente para analizar un nucleótido, tal como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)], un analizador de secuencias de nucleótidos ABIPRISM 377 DNA Sequencer (fabricado por PE Biosystems) o similar.

Un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido también puede determinarse a partir de genes en bases de datos mediante la búsqueda en bases de datos de secuencias de nucleótidos tales como GenBank, EMBL, DDBJ y similares utilizando un programa de recuperación de homologías tal como BLAST basado en la secuencia de nucleótidos determinada del ADNc.

Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del gen obtenido mediante el método, codificantes del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48, nº 51 o nº 65. Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del gen codificante del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1 o nº 2.

El ADNc codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido también puede obtenerse mediante síntesis química de la misma con un sintetizador de ADN, tal como un sintetizador de ADN modelo 392 fabricado por Perkin Elmer o similar utilizando el método de fosfoamidita, basándose en la secuencia de nucleótidos de ADN determinada.

A título de ejemplo del método para preparar un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se proporciona a modo de ejemplo el método siguiente.

Preparación de ADN genómico:

Entre los ejemplos del método de preparación del ADN genómico se incluyen métodos conocidos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology, y similares. Además, un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido también puede aislarse utilizando un kit tal como el sistema de cribado de bibliotecas de ADN genómico (fabricado por Genome Systems), kits Universal GenomeWalker™ (fabricado por Clontech) o similares.

Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico obtenido mediante el método codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 67 o nº 70. Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de

la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 3.

5 Además, la célula hospedadora de la presente invención también puede obtenerse sin utilizar un vector de expresión, mediante la introducción directa de un oligonucleótido antisentido o ribozima en una célula hospedadora, que se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor
10 mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

El oligonucleótido antisentido o ribozima puede prepararse mediante el método habitual o utilizando un sintetizador de ADN. Específicamente, puede prepararse basándose en la información de secuencia de un oligonucleótido que
15 presenta una secuencia correspondiente continua de 5 a 150 bases, preferentemente de 5 a 60 bases, y más preferentemente de 10 a 40 bases, entre secuencias de nucleótidos de un ADNc y un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, mediante la síntesis de un oligonucleótido que corresponde a una secuencia complementaria al
20 oligonucleótido (oligonucleótido antisentido) o un ribozima que comprende la secuencia oligonucleótida.

Entre los ejemplos del oligonucleótido se incluyen el oligo de ARN y derivados del oligonucleótido (en adelante denominado "derivados de oligonucleótido").

25 Entre los ejemplos de los derivados de oligonucleótido se incluyen derivados de oligonucleótido en los que un enlace fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace fosforotioato, un derivado de oligonucleótido en el que un enlace fosfodiéster en el que el oligonucleótido se convierte en un enlace fosfoamidato N3'-P5', un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa y un enlace fosfodiéster en el oligonucleótido se convierten en un enlace péptido-ácido nucleico, un derivado de oligonucleótido en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye con C-5 propiniluracilo, un derivado de oligonucleótido en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye con tiazol-uracilo C-5, un derivado de oligonucleótido en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye con propinilcitosina C-5, un derivado de oligonucleótido en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye con citosina modificada con fenoxazina, un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye con 2'-O-propilribosa y un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye con 2'-metoxietoxirribosa [Cell
35 Technology 16:1463, 1997].

(b) Preparación de la célula hospedadora de la presente invención mediante recombinación homóloga

La célula hospedadora de la presente invención puede producirse mediante la modificación de un gen diana en el
40 cromosoma mediante una técnica de recombinación homóloga, utilizando un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.
45

El gen diana en el cromosoma puede modificarse mediante la utilización de un método descrito en Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994 (en adelante denominado "Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual"); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells, Yodo-sha (1995) (en adelante denominado "Preparation of Mutant Mice using ES Cells"), o similar, por
50 ejemplo de la manera siguiente.

Se preparó un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la
55 posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADN genómico, se preparó un vector diana para la recombinación homóloga de un gen diana que debe modificarse (por ejemplo un gen estructural del enzima relacionado con la
60 síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, o un gen promotor.

65 La célula hospedadora de la presente invención puede producirse mediante la introducción del vector diana preparada en una célula hospedadora y la selección de una célula en la que se produce recombinación homóloga

entre el gen diana y el vector diana.

Como célula hospedadora puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen células hospedadoras que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Entre los ejemplos del método de preparación de un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en la preparación de ADN genómico en el ítem 1(1)(a) y similares.

Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 67 o nº 70. Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 3.

El vector diana para la utilización en la recombinación homóloga del gen diana puede prepararse de acuerdo con un método descrito en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells, Yodo-sha (1995), o similares. El vector diana puede utilizarse como de tipo sustitución o de tipo inserción.

Para introducir el vector diana en diversas células hospedadoras, pueden utilizarse los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diversas células hospedadoras, que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Entre los ejemplos del método para seleccionar eficientemente un recombinante homólogo se incluye un método, tal como la selección positiva, la selección de promotor, la selección negativa o la selección de poliA descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells, Yodo-sha (1995), o similares. Entre los ejemplos del método para seleccionar el recombinante homólogo de interés de las estirpes celulares seleccionadas se incluyen el método de transferencia southern para el ADN genómico (Molecular Cloning, segunda edición), PCR [PCR Protocols, Academic Press, 1990] y similares.

(c) Preparación de la célula hospedadora de la presente invención mediante el método RDO

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante un método de RDO (oligonucleótido ARN-ADN) dirigiendo un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, por ejemplo de la manera siguiente.

Se preparó un ADNc o un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADNc o ADN genómico preparado.

Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseñó y se sintetizó una longitud apropiada de un constructo de RDO que comprende una fracción de ADN que codifica el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido o una parte de su región no traducida o un intrón.

La célula hospedadora de la presente invención puede obtenerse mediante la introducción del RDO sintetizado en una célula hospedadora y después seleccionando un transformante en el que se ha producido una mutación en el enzima diana, es decir el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra

unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

5 Como célula hospedadora puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen células hospedadoras que se describirán a continuación, en el ítem 3.

10 Entre los ejemplos del método para introducir RDO en diversas células hospedadoras se incluyen métodos para introducir vectores recombinantes adecuadas para diversas células hospedadoras, que se describirán a continuación, en el ítem 3.

15 Entre los ejemplos del método de preparación de ADNc codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en la preparación de ADN en el ítem 1(1)(a) y similares.

20 Entre los ejemplos del método de preparación de un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos en la preparación de ADN genómico en el ítem 1(1)(a) y similares.

25 La secuencia de nucleótidos del ADN puede determinarse digiriéndola con enzimas de restricción apropiados, clonando los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) o similares, sometiendo los clones a la reacción utilizada generalmente como método de análisis de una secuencia de nucleótidos, tal como el método de dideoxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977] de Sanger *et al.* o similares, y analizando seguidamente los clones utilizando un analizador automático de secuencias de nucleótidos, tal como el secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) o similares.

35 El RDO puede prepararse mediante el método habitual o utilizando un sintetizador de ADN.

40 Entre los ejemplos del método de selección de una célula en la que se ha producido una mutación, mediante la introducción de la ROD en la célula hospedadora, en el gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos para detectar directamente mutaciones en los genes cromosómicos descritos en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, y similares,

45 los métodos descritos en el ítem 1(1)(a) para la selección de un transformante mediante la evaluación de la actividad del enzima introducido relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar, en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, el método para la selección de un transformante utilizando la estructura sacárida de una glicoproteína sobre la membrana celular que se describirá a continuación, en el ítem 1(5), y el método para la selección de un transformante basándose en la estructura sacárida de la molécula de anticuerpo producida que se describirá a continuación en el ítem 5 o 6, y similares.

50 El constructo de la ROD puede diseñarse de acuerdo con los métodos descritos en Science 273:1386, 1996; Nature Medicine 4:285, 1998; Hepatology 25:1462, 1997; Gene Therapy 5:1960, 1999; J. Mol. Med. 75:829, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8774, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768, 1999; Nuc. Acids. Res. 27:1323, 1999; Invest. Dermatol. 111:1172, 1998; Nature Biotech. 16:1343, 1998; Nature Biotech. 18:43, 2000; Nature Biotech. 18:555, 2000, y similares.

(d) Preparación de la célula hospedadora de la presente invención mediante el método de ARNi

60 La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante el método de ARNi (interferencia de ARN) dirigiendo un gen de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, por ejemplo de la manera siguiente.

65 Se preparó un ADNc codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-

fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

5 Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADNc preparado.

Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseñó una longitud apropiada de un constructo génico de ARNi que comprendía la fracción de ADN que codifica el enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido o una parte de su región no traducida.

Con el fin de expresar el gen de ARNi en una célula, se preparó un vector recombinante mediante la inserción de un fragmento o la longitud total del ADN preparado cadena abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Se obtuvo un transformante mediante la introducción del vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

La célula hospedadora de la presente invención puede obtenerse mediante la selección de un transformante basada en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, o la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular o de la molécula de anticuerpo producida.

Como célula hospedadora puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima diana relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o del enzima diana relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen células hospedadoras que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Como vector de expresión, se utiliza un vector que es de replicación autónoma en la célula hospedadora o que puede integrarse en el cromosoma y que comprende un promotor en una posición que permite que el gen de ARNi pueda transferirse. Entre los ejemplos se incluyen vectores de expresión que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Con método para introducir un gen en diversas células hospedadoras, pueden utilizarse métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diversas células hospedadoras, que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Entre los ejemplos del método de selección de un transformante basándose en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en el ítem 1(1)(a).

Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 1(5). Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 5 o 6.

Entre los ejemplos del método de preparación de ADNc codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en la preparación de ADN en el ítem 1(1)(a) y similares.

Además, la célula hospedadora de la presente invención también puede obtenerse sin utilizar un vector de expresión, mediante la introducción directa de un gen de ARNi diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

El gen de ARNi puede prepararse mediante el método habitual o utilizando un sintetizador de ADN.

El constructo de gen de ARNi puede diseñarse de acuerdo con los métodos descritos en Nature 391:806, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502, 1998; Nature 395:854, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5049, 1999; Cell 95:1017, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1451, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959, 1998; Nature Cell Biol. 2:70, 2000, y similares.

(e) Preparación de la célula hospedadora de la presente invención mediante un método que utiliza un trasposón

La célula hospedadora de la presente invención puede obtenerse mediante la inducción de una mutación utilizando un sistema de trasposón descrito en Nature Genet. 25:35, 2000, o similar, seleccionando seguidamente un mutante basándose en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, o la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína de una molécula de anticuerpo producida o sobre la membrana celular.

El sistema de trasposones es un sistema en el que se induce una mutación mediante la inserción aleatoria de un gen exógeno en el cromosoma, en el que un gen exógeno interpuesto entre trasposones se utiliza generalmente como vector para inducir una mutación, y se introduce simultáneamente en la célula un vector de expresión de trasposasa para la inserción aleatoria del gen en el cromosoma.

Puede utilizarse cualquier trasposasa, con la condición de que resulte adecuada para la secuencia del trasposón que debe utilizarse.

Como gen exógeno, puede utilizarse cualquier gen, con la condición de que pueda inducir una mutación en el ADN de una célula hospedadora.

Como célula hospedadora puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima diana relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o del enzima diana relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen las células hospedadoras que se describen a continuación, en el ítem 3. Para la introducción del gen en diversas células hospedadoras, puede utilizarse el método de introducción de vectores recombinantes adecuados para diversas células hospedadoras, que se describirá a continuación, en el ítem 3.

Entre los ejemplos del método de selección de un mutante basándose en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en el ítem 1(1)(a).

Entre los ejemplos del método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 1(5). Entre los ejemplos del método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 5 o 6.

(2) Método para introducir un mutante negativo dominante de un gen codificante del enzima

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse utilizando como diana un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, utilizando una técnica para introducir un mutante negativo dominante del enzima. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen GMD, Fx, GFPP, fucoquinasa y similares. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la α -1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

Los enzimas catalizan reacciones específicas que presentan especificidad de sustrato y pueden prepararse mutantes negativos dominantes de los enzimas mediante disrupción del centro activo de los enzimas que catalizan la actividad catalítica que presenta especificidad de sustrato. El método para preparar un mutante negativo dominante se describe específicamente de la manera siguiente en referencia a GMD de entre los enzimas diana.

Como resultado del análisis de la estructura tridimensional de la GMD derivada de *E. coli*, se ha encontrado que 4 aminoácidos (la treonina en la posición 133, el ácido glutámico en la posición 135, la tirosina en la posición 157 y la lisina en la posición 161) presentan una función importante en la actividad del enzima (Structure 8:2, 2000). Es decir, al preparar mutantes mediante la sustitución de los 4 aminoácidos por otros aminoácidos diferentes basándose en la información de la estructura tridimensional, se reduce significativamente la actividad enzimática de la totalidad de los mutantes. Por otra parte, prácticamente no se observaron en los mutantes cambios en la capacidad de la GMD de unirse al coenzima NADP de GMD y su sustrato GDP-manosa. De acuerdo con lo anterior, puede prepararse un mutante negativo dominante mediante la sustitución de los 4 aminoácidos que controlan la actividad enzimática de GMD. Por ejemplo, en GMD (SEC ID nº 65) derivada de células CHO, puede prepararse un mutante negativo dominante mediante sustitución de la treonina en la posición 155, el ácido glutámico en la posición 157, la tirosina en la posición 179 y la lisina en la posición 183 por otros aminoácidos, mediante comparación de la homología y la predicción de la estructura tridimensional utilizando la información de secuencia de aminoácidos basándose en los resultados de la GMD derivada de *E. coli*. Dicho gen en el que se introduce la sustitución de aminoácido puede prepararse mediante mutagénesis dirigida a sitio, descrita en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology o similares.

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology o similares, utilizando el gen mutante negativo dominante preparado del enzima diana, por ejemplo, tal como se indica a continuación.

Se preparó un gen codificante de un mutante negativo dominante (en adelante denominado "gen mutante negativo dominante") del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido.

Basándose en el ADN de longitud completa preparado del gen mutante negativo dominante, se preparó, en caso necesario, un fragmento de ADN de longitud apropiada que contenía una fracción codificante de la proteína.

Se produjo un vector recombinante mediante la inserción del fragmento de ADN o el ADN de longitud completa cadena abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Se obtuvo un transformante mediante la introducción del vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante la selección de un transformante basándose en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o en la actividad del enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, o la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína de una molécula de anticuerpo producida o sobre la membrana celular.

Como célula hospedadora puede utilizarse cualquier célula, tal como de levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal, con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o del enzima diana relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen células hospedadoras que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Como vector de expresión, se utiliza un vector que es de replicación autónoma en la célula hospedadora o que puede integrarse en el cromosoma y que comprende un promotor en una posición que permite llevar a cabo la transcripción del ADN codificante del mutante negativo dominante de interés. Entre los ejemplos se incluyen vectores de expresión que se describirán a continuación, en el ítem 3.

Para introducir el gen en diversas células hospedadoras, puede utilizarse el método para introducir vectores recombinantes adecuados para diversas células hospedadoras, que se describirá a continuación, en el ítem 3.

Entre los ejemplos del método de selección de un transformante basándose en la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en el ítem 1(1)(a).

Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 1(5). Entre los ejemplos del método para seleccionar un transformante basándose en la estructura de la cadena

de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se incluyen los métodos que se describen a continuación, en el ítem 5 o 6.

(3) Método para introducir una mutación en el enzima

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante la introducción de una mutación en un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, seguido de la selección de una estirpe celular de interés en la que se ha producido la mutación en el enzima.

Entre los ejemplos del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se incluyen GMD, Fx, GFPP, fucoquinasa y similares. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la α -1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

Entre los ejemplos del método se incluyen: 1) un método en el que se selecciona una estirpe celular deseada a partir de mutantes obtenidos mediante un tratamiento inductor de mutación de una estirpe celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la actividad de un enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad de un enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, 2) un método en el que la estirpe celular deseada se selecciona de entre mutantes obtenidos mediante un tratamiento inductor de mutación de una estirpe celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida, y 3) un método en el que la estirpe celular deseada se selecciona de entre mutantes obtenidos mediante un tratamiento inductor de mutación de una estirpe celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular.

Como tratamiento inductor de mutación puede utilizarse cualquier tratamiento, con la condición de que pueda inducir una mutación puntual o una delección o mutación por desplazamiento de marco en el ADN de las células de la estirpe celular parental.

Entre los ejemplos se incluyen el tratamiento con etilnitrosourea, nitrosoguanidina, benzopireno o un pigmento de acridina y el tratamiento con radiación. Además, pueden utilizarse como mutágenos diversos agentes alquilantes y carcinógenos. Entre los ejemplos del método que permite que actúe un mutágeno sobre las células se incluyen los métodos descritos en Tissue Culture Techniques, tercera edición (Asakura Shoten), editado por Japanese Tissue Culture Association (1996), Nature Genet. 24:314, 2000, y similares.

Entre los ejemplos del mutante generado espontáneamente se incluyen mutantes que se forman espontáneamente al continuar el subcultivo bajo condiciones generales de cultivo celular, sin aplicar un tratamiento especial inductor de mutaciones.

Entre los ejemplos del método para medir la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad del enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, se incluyen los métodos descritos en el ítem 1(1)(a). Entre los ejemplos del método para discriminar la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo preparada se incluyen los métodos que se describirán a continuación, en el ítem 5 o 6. Entre los ejemplos del método para discriminar la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen los métodos que se describirán a continuación, en el ítem 1(5).

(4) Método para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen codificante del enzima

La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante la inhibición de la transcripción y/o traducción de un gen diana mediante un método tal como la técnica de ARN/ADN antisentido [Bioscience and Industry 50:322, 1992; Chemistry 46:681, 1991; Biotechnology 9:358, 1992; Trends in Biotechnology 10:87, 1992; Trends in Biotechnology 10:152, 1992; Cell Engineering 16:1463, 1997], la técnica de triple hélice [Trends in Biotechnology 10:132, 1992] o similares, utilizando un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, y/o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, como la diana.

Entre los ejemplos del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, se

incluyen GMD, Fx, GFPP, fucoquinasa y similares. Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido se incluyen la α -1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

5 (5) Método de selección de una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido

10 La célula hospedadora de la presente invención puede prepararse mediante la utilización de un método de selección de una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido

15 Entre los ejemplos del método de selección de una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido se incluyen los métodos que utilizan lectina descritos en Somatic Cell Mol. Genet. 12:51, 1986, y similares. Como la lectina, puede utilizarse cualquier lectina, con la condición de que sea una lectina que reconozca una estructura de

20 cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido. Entre los ejemplos se incluyen una lectina de *Lens culinaris* LCA (aglutinina de lenteja obtenida de *Lens culinaris*), una lectina de guisante PSA (lectina de guisante obtenida de *Pisum sativum*), una lectina de haba VFA (aglutinina obtenida de *Vicia faba*), una lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina obtenida de *Aleuria aurantia*) y similares.

25 Específicamente, la estirpe celular indicada en la presente memoria resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido puede seleccionarse mediante el cultivo de células durante un tiempo de entre 1 día y 2 semanas, preferentemente

30 de entre 1 día y 1 semana, utilizando un medio que comprende la lectina a una concentración de entre 1 μ g/ml y 1 mg/ml, subcultivando las células supervivientes o recolectando una colonia y transfiriéndola a un recipiente de cultivo y a continuación continuando el cultivo utilizando el medio que contiene lectina. Entre los ejemplos de la estirpe celular obtenidos mediante el método se incluyen CHO/CCR4-LCA Nega-13 (FERM nº BP-7756) obtenidos en el

35 Ejemplo 14(2) que se describen a continuación.

2. Preparación de un animal no humano o planta transgénico o la progenie del mismo de la presente invención

El animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo de la presente invención es un animal no humano o planta transgénico o progenie del mismo en el que se modifica un gen genómico de manera que pueda controlarse

40 la actividad de un enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo, y puede prepararse según un método similar al del ítem 1, utilizando un gen codificante de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, como la diana.

45

En un animal no humano transgénico, puede prepararse una célula madre embrionaria de la presente invención en la que se encuentra controlada la actividad del enzima relacionada con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad del enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la

50 que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, aplicando un método similar al del ítem 1 a una célula madre embrionaria del animal no humano deseado, tal como vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono, conejo o similar.

55 Específicamente, se preparó un clon mutante en el que un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o el enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja se inactiva o se sustituye con cualquier secuencia, mediante una técnica de recombinación homóloga [por ejemplo Nature 326(6110):295, 1987; Cell 51(3):503, 1987, o

60 similares]. Utilizando el clon mutante preparado, puede prepararse un individuo híbrido que comprende un clon de células madre embrionarias y una célula normal, mediante un método de inyección química en un blastocito de huevo fertilizado de un animal o mediante un método de agregación química. El individuo híbrido se cruza con un individuo normal, de manera que puede obtenerse un animal no humano transgénico en el que la actividad del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima

65 relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar

compleja unida mediante N-glucósido se encuentra reducida o anulada en las células corporales completas.

Además, una célula de huevo fertilizado no humano de la presente invención en la que se ha eliminado la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad del enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido, puede prepararse aplicando un método similar al del ítem 1 a un huevo fertilizado de un animal no humano de interés, tal como vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono, conejo o similar.

Un animal no humano transgénico en el que se ha eliminado la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa, o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida puede prepararse mediante el trasplante de la célula de huevo fertilizado preparada en el oviducto o útero de una hembra pseudogestante utilizando el método de trasplante embrionario descrito en Manipulation Mouse Embryo, segunda edición, o similar, seguido del nacimiento del animal.

En una planta transgénica, el callo de la presente invención en el que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido ha sido eliminada puede prepararse mediante la aplicación de un método similar al del ítem 1 a un callo o célula de la planta de interés.

Una planta transgénica en la que se encuentra reducida la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-fucosa o la actividad de un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido puede prepararse mediante el cultivo del callo preparado utilizando un medio que comprende auxina y citoquinina para rediferenciarlo de acuerdo con un método conocido [Tissue Culture 20, 1994; Tissue Culture 21, 1995; Trends in Biotechnology 15:45, 1997].

3. Procedimiento para producir una composición de anticuerpo

La composición de anticuerpo puede obtenerse expresándola en una célula hospedadora utilizando los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (en adelante denominado "*Antibodies*"); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, Acad. Press, 1993 (en adelante también denominada "*Monoclonal Antibodies*"), y Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (en adelante también denominada "*Antibody Engineering*"), por ejemplo, tal como se indica a continuación.

Se preparó un ADNc de longitud completa codificante de una molécula de anticuerpo y se preparó una longitud apropiada de un fragmento de ADN que comprendía una fracción codificante de la molécula de anticuerpo.

Se preparó un vector recombinante mediante la inserción del fragmento de ADN o el ADN de longitud completa cadena abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Puede obtenerse un transformante que produce la molécula de anticuerpo mediante la introducción del vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

Como célula hospedadora, puede utilizarse cualquiera de entre una célula de levadura, una célula animal, una célula vegetal o similar, con la condición de que pueda expresar el gen de interés.

Como célula hospedadora también puede utilizarse una célula tal como una célula de levadura, una célula animal, una célula de insecto, una célula vegetal o similar en la que se ha introducido mediante una técnica de ingeniería genética un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido que se une a la región Fc de la molécula de anticuerpo.

Como vector de expresión, se utiliza un vector que es de replicación autónoma en la célula hospedadora o que puede integrarse en el cromosoma y que comprende un promotor en una posición que permite que el ADN codificante de la molécula de anticuerpo pueda transferirse.

El ADNc puede prepararse a partir de un tejido o célula humano o no humano utilizando, por ejemplo, un cebador sonda específico para la molécula de anticuerpo de interés, de acuerdo con los métodos descritos en la preparación de ADN en el ítem 1(1)(a).

En el caso de que se utilice una levadura como célula hospedadora, entre los ejemplos de vector de expresión se incluyen YEP13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419) y similares.

5 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en las levaduras. Entre los ejemplos se incluyen un promotor de un gen de la ruta glucolítica, tal como un gen de hexosa quinasa, etc., el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP, el promotor ADH, el promotor gal 1, el promotor gal 10, el promotor de la proteína de choque térmico, el promotor MF α 1, el promotor CUP 1 y similares.

10 Entre los ejemplos de célula hospedadora se incluyen los microorganismos pertenecientes al género *Saccharomyces*, al género *Schizosaccharomyces*, al género *Kluyveromyces*, al género *Trichosporon*, al género *Schwanniomyces* y similares, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans* and *Schwanniomyces alluvius*, etc.

15 Como método para introducir el vector recombinante, puede utilizarse cualquier método, con la condición de que pueda introducir ADN en levaduras. Entre los ejemplos se incluyen la electroporación [Methods in Enzymology 194:182, 1990], el método de esferoplastos [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1929, 1978], el método de acetato de litio [J. Bacteriol. 153:163, 1983], un método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978, y similares.

20 En el caso de que se utilice una célula animal como huésped, entre los ejemplos del vector de expresión se incluyen pcDNA1, pcDM8 (disponible de Funakoshi), pAGE107 [solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 22979/91; Cytotechnology 3:133, 1990], pAS3-3 (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 227075/90), pCDM8 [Nature 329:840, 1987], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry 101:1307, 1987], pAGE210 y similares.

25 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en una célula animal. Entre los ejemplos se incluye un promotor de gen TI (temprano inmediato) del citomegalovirus (CMV), un promotor temprano del SV40, un promotor de retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, un promotor SR α y similares. Además, puede utilizarse un intensificador del gen TI del CMV humano conjuntamente con el
30 promotor.

Entre los ejemplos de la célula hospedadora se incluyen una célula humana tal como una célula Namalwa, una célula de mono tal como una célula COS, una célula de hámster chino, tal como una célula CHO o HBT5637 (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 299/88), una célula de mieloma de rata, una célula de mieloma de ratón, una célula derivada de riñón de hámster sirio, una célula madre embrionaria, una célula de huevo fertilizado y similares.

35 Como método para introducir el vector recombinante, puede utilizarse cualquier método, con la condición de que pueda introducir ADN en células animales. Entre los ejemplos se incluyen la electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], el método del fosfato de calcio (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987], el método de inyección [Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual], un método que utiliza una pistola de partícula (pistola génica) (patente japonesa nº 2606856, patente japonesa nº 2517813), el método de DEAE-dextrano [Biomaterial Series 4-Gene Transfer and Expression Analysis (Yodo-sha), editado por Takashi Yokota y Kenichi Arai, 1994], el método del vector vírico (Manipulating
40 Mouse Embryo, segunda edición) y similares.

En el caso de que se utilice una célula de insecto como huésped, la proteína puede expresarse mediante el método descrito en Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992), Bio/Technology 6:47, 1988, o similares.

50 Es decir, la proteína puede expresarse mediante la introducción simultánea de un vector de introducción de un gen recombinante y un baculovirus en una célula de insecto con el fin de obtener un virus recombinante en un sobrenadante de cultivo de células de insecto y después infectar las células de insecto con el virus recombinante.

55 Entre los ejemplos del vector de introducción de genes utilizado en el método se incluyen pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (todos fabricados por Invitrogen) y similares.

Entre los ejemplos de baculovirus se incluyen el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica*, que infecta un insecto de la familia *Barathra*.

60 Entre los ejemplos de células de insecto se incluyen los oocitos de *Spodoptera frugiperda* Sf9 y Sf21 [Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992], un oocito de *Trichoplusia ni* High 5 (fabricado por Invitrogen) y similares.

65 Entre los ejemplos del método para la introducción simultánea del vector de introducción de genes recombinantes y el baculovirus para la preparación de virus recombinante se incluyen el método de fosfato de calcio (solicitud

publicada de patente japonesa examinada nº 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987] y similares.

5 En el caso de que se utilice una célula vegetal como célula hospedadora, entre los ejemplos de vector de expresión se incluyen el plásmido Ti, el virus del mosaico del tabaco y similares.

Como promotor puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en una célula vegetal. Entre los ejemplos se incluye el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor actina 1 del arroz y similares.

10 Entre los ejemplos de célula hospedadora se incluyen células vegetales de la planta del tabaco, de la patata, del tomate, de la zanahoria, de la soja, de la colza, de la alfalfa, del arroz, del trigo, de la cebada, y similares.

15 Como método para introducir el vector recombinante, puede utilizarse cualquier método, con la condición de que pueda introducir ADN en una célula vegetal. Entre los ejemplos se incluye un método que utiliza *Agrobacterium* (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 140885/84, solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 70080/85, documento nº 94/00977), la electroporación (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 251887/85), un método que utiliza una pistola de partícula (pistola génica) (patente japonesa nº 2606856, patente japonesa nº 2517813), y similares.

20 Como método para expresar un gen, puede llevarse a cabo la producción mediante secreción, la expresión de una proteína de fusión de la región Fc con otra proteína y similares, de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning, segunda edición, o similar, además de la expresión directa.

25 En el caso de que se exprese un gen en una bacteria, levadura, célula animal, célula de insecto o célula vegetal en la que se ha introducido un gen relacionado con la síntesis de una cadena de azúcar, puede obtenerse una molécula de anticuerpo a la que un gen introducido añade un azúcar o cadena de azúcar.

30 Puede obtenerse una composición de anticuerpo mediante el cultivo del transformante obtenido en un medio para producir y acumular la molécula de anticuerpo en el cultivo y después recuperarla a partir del cultivo resultante. El método para el cultivo del transformante utilizando un medio puede aplicarse de acuerdo con un método general que se utiliza para el cultivo de células hospedadoras.

35 Como medio para el cultivo de un transformante obtenido utilizando un procarionta tal como *Escherichia coli*, etc., o un eucariota tal como una levadura, etc., como la célula hospedadora, el medio puede ser un medio natural o un medio sintético, con la condición de que comprenda materiales tales como una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sal inorgánica y similares que puedan resultar asimilados por el organismo y pueda llevarse a cabo eficientemente el cultivo del transformante.

40 Como fuente de carbono, pueden utilizarse aquellas que puedan ser asimiladas por el organismo. Entre los ejemplos se incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que los contienen, almidón, hidrolizado de almidón, etc.; ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, etc.; alcoholes, tales como etanol, propanol, etc., y similares.

45 Entre los ejemplos de la fuente de nitrógeno se incluye amonio, sales amónicas de ácido inorgánico u orgánico, tales como cloruro amónico, sulfato amónico, acetato amónico, fosfato amónico, etc.; otros compuestos que contienen nitrógeno, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maceración del maíz, hidrolizado de caseína, harina de soja, hidrolizado de harina de soja, diversas células fermentadas e hidrolizados de las mismas, y similares.

50 Entre los ejemplos del material inorgánico se incluyen dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio y similares.

55 El cultivo se lleva a cabo de manera general bajo condiciones aeróbicas, tales como el cultivo bajo agitación, el cultivo bajo agitación de aireación sumergido o similares. La temperatura de cultivo preferentemente es de entre 15°C y 40°C y el tiempo de cultivo generalmente es de entre 16 horas y 7 días. Durante el cultivo, el pH se mantiene en un valor entre 3,0 y 9,0. El pH se ajusta utilizando un ácido inorgánico u orgánico, una solución de álcali, urea, carbonato de calcio, amonio o similar.

60 En caso necesario, puede añadirse al medio un antibiótico, tal como ampicilina, tetraciclina o similar, durante el cultivo.

65 En el caso de que se obtenga un microorganismo transformado con un vector recombinante utilizando un promotor inducible al cultivar el promotor, puede añadirse un inductor al medio, en caso necesario. Por ejemplo, al cultivar un microorganismo transformado con un vector recombinante obtenido utilizando un promotor *lac*, puede añadirse isopropil-β-D-tiogalactopiranosido al medio y al cultivar un microorganismo transformado con un vector recombinante

obtenido utilizando un promotor *trp*, puede añadirse ácido indol-acrílico al medio.

En el caso de que se cultive un transformante obtenido utilizando una célula animal como la célula hospedadora, entre los ejemplos del medio se incluyen el medio RPMI 1640 utilizado generalmente [The Journal of the American Medical Association 199:519, 1967], medio MEM de Eagle [Science 122:501, 1952], medio MEM modificado por Dulbecco [Virology 8:396, 1959], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73:1, 1950] y medio de Whitten [Developmental Engineering Experimentation Manual-Preparation of Transgenic Mice (Kodan-sha), editado por M. Katshuki, 1987], medio al que se añadió suero de feto bovino, etc., y similares.

El cultivo generalmente se llevó a cabo a un pH de entre 6 y 8 a una temperatura de entre 30°C y 40°C durante 1 a 7 días en presencia de 5% de CO₂. En caso necesario, puede añadirse al medio un antibiótico, tal como canamicina, ampicilina o similar, durante el cultivo.

Entre los ejemplos del medio para la utilización durante el cultivo de un transformante obtenido utilizando una célula de insecto como huésped se incluyen el medio TNM-FH (fabricado por Pharmingen), el medio Sf-900 II SFM (fabricado por Life Technologies), ExCell 400 y ExCell 405 (ambos fabricados por JRH Biosciences), medio para insectos de Grace [Nature 195:788, 1962] y similares.

El cultivo generalmente se lleva a cabo a un pH del medio de entre 6 y 7 y a una temperatura de entre 25°C y 30°C durante 1 a 5 días.

Además, pueden añadirse antibióticos tales como la gentamicina al medio durante el cultivo, según se requiera.

Un transformante obtenido utilizando una célula vegetal puede cultivarse como una célula o mediante la diferenciación del mismo en célula u órgano vegetal. Entre los ejemplos del medio para el cultivo del transformante se incluyen el medio Murashige y Skoog (MS) y el medio de White utilizados de manera general, medios a los que se añade una hormona vegetal tal como auxina, citoquinina, etc., y similares.

El cultivo generalmente se lleva a cabo a un pH de entre 5 y 9 y a una temperatura de entre 20°C y 40°C durante 3 a 60 días.

En caso necesario, puede añadirse al medio un antibiótico, tal como canamicina, higromicina o similar, durante el cultivo.

De acuerdo con lo anterior, puede producirse una composición de anticuerpo mediante el cultivo de un transformante derivado de un microorganismo, una célula animal o una célula vegetal, que comprende un vector recombinante en el que se inserta un ADN codificante de una molécula de anticuerpo, de acuerdo con un método general de cultivo, produciendo y acumulando de esta manera la composición de anticuerpo y recuperando después la composición de anticuerpo a partir del cultivo.

Como método para expresar un gen, puede llevarse a cabo la producción mediante secreción, la expresión de una proteína de fusión y similares, de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning, segunda edición, o similar, además de la expresión directa. Entre los ejemplos del procedimiento para producir una composición de anticuerpo se incluyen la expresión intracelular en una célula hospedadora, un método de secreción extracelular a partir de una célula hospedadora y un método de producción sobre la cubierta externa de la membrana de una célula hospedadora. El método puede seleccionarse cambiando la célula hospedadora utilizada o la estructura de la composición de anticuerpo producida.

En el caso de que la composición de anticuerpo de la presente exposición se produzca en una célula hospedadora o sobre la cubierta externa de la membrana de una célula hospedadora, puede secretarse positivamente al exterior de la célula de acuerdo con el método de Paulson *et al.* [J. Biol. Chem. 264:17619, 1989], el método de Lowe *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8227, 1989; Genes Develop. 4:1288, 1990], los métodos descritos en la solicitud publicada de patente japonesa examinada n° 336963/93 y solicitud publicada de patente japonesa examinada n° 823021/94 y similares.

Es decir, una molécula de anticuerpo de interés puede secretarse positivamente al exterior de la célula a partir de una célula hospedadora mediante la inserción de un ADN codificante de la molécula de anticuerpo y un ADN codificante de un péptido de señal adecuado para la expresión de la molécula de anticuerpo en un vector de expresión utilizando una técnica de recombinación génica, introduciendo el vector de expresión en la célula hospedadora y expresando después la molécula de anticuerpo.

Además, puede incrementarse su cantidad de producción de acuerdo con el método descrito en la solicitud publicada de patente japonesa examinada n° 227075/90 utilizando un sistema de amplificación génica utilizando un gen de dihidrofolato reductasa.

Además, la composición de anticuerpo también puede producirse utilizando un animal individual en el que se ha

introducido un gen (animal no humano transgénico) o una planta individual (planta transgénica) que se construye mediante la rediferenciación de una célula animal o vegetal en la que se ha introducido el gen.

5 En el caso de que el transformante sea un animal individual o una planta individual, puede producirse una composición de anticuerpo de acuerdo con el método general mediante cría o cultivo, produciendo y acumulando de esta manera la composición de anticuerpo, recuperando después la composición de anticuerpo a partir del animal o planta individual.

10 Entre los ejemplos del procedimiento para producir una composición de anticuerpo utilizando un animal individual se incluyen un método en el que la composición de anticuerpo de interés se produce en un animal construido mediante la introducción de un gen de acuerdo con un método conocido [American Journal of Clinical Nutrition 63:627S, 1996; Bio/Technology 9:830, 1991].

15 En el caso de un animal individual, puede producirse una composición de anticuerpo mediante la cría de un animal no humano transgénico en el que se ha introducido un ADN codificante de una molécula de anticuerpo, produciendo y acumulando de esta manera la composición de anticuerpo en el animal, y recuperando después la composición de anticuerpo a partir del animal. Entre los ejemplos de los sitios del animal en que se produce y se acumula la composición se incluyen la leche (solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 309192/88) y huevos del animal. Como promotor utilizado en dicho caso, puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en un animal. Entre los ejemplos preferentes se incluyen promotores específicos de células de glándula mamaria, tales como el promotor caseína α , el promotor caseína β , el promotor lactoglobulina β , promotor de proteína ácida de suero y similares.

25 Un ejemplo del procedimiento para producir una composición de anticuerpo utilizando una planta individual incluye un método en el que se produce una composición de anticuerpo mediante el cultivo de una planta transgénica en la que se introduce un ADN codificante de una molécula de anticuerpo mediante un método conocido [Tissue Culture 20, 1994; Tissue Culture 21, 1995; Trends in Biotechnology 15:45, 1997] para producir y acumular la composición de anticuerpo en la planta y después recuperar la composición de anticuerpo a partir de la planta.

30 Con respecto a la purificación de una composición de anticuerpo producida por un transformante en el que se ha introducido un gen codificante de una molécula de anticuerpo, por ejemplo en el caso de que la composición de anticuerpo se exprese intracelularmente en estado disuelto, las células se recuperan tras el cultivo mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuoso y después se fragmentan utilizando un oscilador ultrasónico, prensa francesa, homogeneizador Manton Gaulin, molino Dynamill o similar, con el fin de obtener un extracto libre de células. Puede obtenerse un producto purificado de la composición de anticuerpo a partir de un sobrenadante obtenido mediante centrifugación del extracto libre de células, mediante la utilización de una técnica general de purificación para el aislamiento de enzimas, tal como la extracción con solvente, la precipitación a altas concentraciones salinas ("salting out"), la desalación con sulfato amónico, etc.; la precipitación con un solvente orgánico, la cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina, tal como dietilaminoetil (DEAE)-sefaroza, DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical), etc.; la cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina, tal como S-Sepharose FF (fabricada por Pharmacia), etc.; cromatografía hidrofóbica utilizando una resina, tal como butil-sefaroza, fenil-sefaroza, etc.; la filtración en gel utilizando un tamiz molecular; la cromatografía de afinidad; el cromatofoque; la electroforesis, tal como el enfoque isoelectrico, etc.; y similares, que pueden utilizarse solos o en combinación.

45 Además, en el caso de que la composición de anticuerpo se exprese intracelularmente mediante la formación de un cuerpo insoluble, las células se recuperan, se fragmentan y se centrifugan de la misma manera, y el cuerpo insoluble de la composición de anticuerpo se recupera como una fracción precipitada. El cuerpo insoluble recuperado de la composición de anticuerpo se solubiliza utilizando un agente desnaturizante de proteínas. La composición de anticuerpo se convierte en una estructura tridimensional normal mediante dilución o dialización de la solución solubilizada, obteniendo un producto purificado de la composición de anticuerpo mediante el mismo método de aislamiento mediante purificación.

55 En el caso de que la composición de anticuerpo se secrete extracelularmente, la composición de anticuerpo o derivados del mismo puede recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo. Es decir, el cultivo se trató mediante una técnica, tal como centrifugación o similar, con el fin de obtener una fracción soluble y puede obtenerse una preparación purificada de la composición de anticuerpo a partir de la fracción soluble mediante el mismo método de aislamiento mediante purificación.

60 Entre los ejemplos de la composición de anticuerpo obtenida de esta manera se incluyen un anticuerpo, el fragmento del anticuerpo, una proteína de fusión que comprende la región Fc del anticuerpo, y similares.

65 A título de ejemplo para obtener la composición de anticuerpo, un procedimiento para producir una composición de un anticuerpo humanizado se describe a continuación, aunque también pueden obtenerse otras composiciones de anticuerpo de una manera similar al método.

(1) Construcción de vector para la expresión de anticuerpos humanizados

Un vector para la expresión de anticuerpos humanizados es un vector de expresión para células animales en las que se insertan genes codificantes de regiones C de cadena pesada (cadena P) y de cadena ligera (cadena L), que pueden construirse mediante clonación de cada uno de los genes codificantes de las regiones C de cadena H y de cadena L de un anticuerpo humano en un vector de expresión para células animales.

Las regiones C de un anticuerpo humano puede ser la cadena H y la cadena L de cualquier anticuerpo humano. Entre los ejemplos se incluyen la región C perteneciente a la subclase IgG1 en la cadena H de un anticuerpo humano (en adelante denominada "Cy1_h"), la región C perteneciente a la clase k en la cadena L de un anticuerpo humano (en adelante denominado "Ck_h") y similares.

Como genes codificantes de las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano, puede utilizarse un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón o también puede utilizarse un ADNc.

Como vector de expresión para células animales, puede utilizarse cualquier vector, con la condición de que pueda insertarse un gen codificante de la región C de un anticuerpo humano en el mismo y expresarse en el mismo. Entre los ejemplos se incluyen pAGE107 [Cytotechnology 3:133, 1990], pAGE103 [J. Biochem. 101:1307, 1987], pHSG274 [Gene 27:223, 1984], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981], pSG1 β d2-4 [Cytotechnology 4:173, 1990] y similares. Entre los ejemplos del promotor e intensificador en el vector de expresión para células animales se incluyen el promotor e intensificador tempranos del SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], promotor RTL de la leucemia de Moloney de ratón [Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:960, 1987], el promotor [Cell 41:479, 1985] e intensificador [Cell, 33, 717 (1983)] de cadena H de inmunoglobulina y similares.

El vector de expresión de anticuerpos humanizados puede ser de un tipo en el que los genes codificantes de las cadenas H y L de un anticuerpo se encuentran en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes se encuentran presentes en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpos humanizados, facilidad de introducción en células animales y equilibrio entre las cantidades expresadas de las cadenas H y L de un anticuerpo en células animales, resulta más preferente un tipo tándem del vector de expresión de anticuerpos humanizados [J. Immunol. Methods 167:271, 1994].

El vector de expresión construido de anticuerpos humanizados puede utilizarse para la expresión de un anticuerpo híbrido humano y un anticuerpo injertado con RDC humano en células animales.

(2) Preparación de ADNc codificante de la región V de anticuerpos obtenidos de animales diferentes del ser humano

Los ADNc codificantes de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano, tal como un anticuerpo de ratón, pueden obtenerse de la manera siguiente.

Se sintetizó un ADNc mediante la extracción del ARNm de una célula de hibridoma que produce el anticuerpo de ratón de interés. El ADNc sintetizado se clonó en un vector, tal como un fago o un plásmido, con el fin de obtener una biblioteca de ADNc. Se aisló cada uno de un fago recombinante o un plásmido recombinante que comprende un ADNc codificante de la región V de cadena H y un fago recombinante o plásmido recombinante que comprende un ADNc codificante de la región V de la cadena L a partir de la biblioteca utilizando una parte de región C o una parte de región V de un anticuerpo de ratón presente como sonda. Se determinan las secuencia de nucleótidos completas de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo de ratón de interés en el fago recombinante o el plásmido recombinante y las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de cadenas H y L se deducen de las secuencias de nucleótidos.

Como animal diferente del ser humano, puede utilizarse cualquier animal, tal como el ratón, la rata, el hámster, el conejo o similar, con la condición de que pueda prepararse una célula de hibridoma a partir del mismo.

Entre los ejemplos de método para preparar ARN total a partir de una célula de hibridoma se incluyen el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology 154:3, 1987] y similares, y como ejemplo del método de preparación de ARNm a partir del ARN total, el método de columna de celulosa con oligo(dT) inmovilizado (Molecular Cloning, segunda edición), y similares. Además, entre los ejemplos de un kit para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma se incluyen el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia) y similares.

Entre los ejemplos del método para sintetizar ADNc y la preparación de una biblioteca de ADNc se incluyen los métodos habituales (Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-34) y métodos utilizando un kit disponible comercialmente, tal como SuperScript™, el sistema de plásmidos para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (fabricado por Gibco Brl) o el kit de síntesis de ADNc-ZAP (fabricado por Stratagene) y similares.

Durante la preparación de la biblioteca de ADNc, el vector en el que se inserta un ADNc sintetizado utilizando el

ARNm extraído de una célula de hibridoma como molde puede ser cualquier vector con la condición de que pueda insertarse el ADNc. Entre los ejemplos se incluyen ZAP Express [Strategies 5:58, 1992], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research 17:9494, 1989], λzapII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach 1:49, 1985], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983], pUC18 [Gene 33:103, 1985] y similares.

Como *Escherichia coli* en la que se introduce la biblioteca de ADNc construida a partir de un vector fago o plásmido, puede utilizarse cualquier *Escherichia coli*, con la condición de que pueda introducirse, expresarse y mantenerse la biblioteca de ADNc. Entre los ejemplos se incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies 5:81, 1992], C600 [Genetics 39, 440, 1954], Y1088 y Y1090 [Science 222:778, 1983], NM522 [J. Mol. Biol. 166, 1, 1983], K802 [J. Mol. Biol. 16, 118, 1966], JM105 [Gene, 38, 275, 1985] y similares.

Como método para seleccionar un clon de ADNc codificante de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano a partir de la biblioteca de ADNc, puede utilizarse una hibridación de colonias o una hibridación de placas utilizando una sonda marcada con isótopos o con fluorescencia (Molecular Cloning, segunda edición). El ADNc codificante de las regiones V de las cadenas H y L también puede prepararse mediante la preparación de cebadores y llevando a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (en adelante denominada "PCR"; Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-34) utilizando un ADNc sintetizado a partir de ARNm o de una biblioteca de ADNc a modo de molde.

La secuencia de nucleótidos de los ADNc puede determinarse mediante la digestión de los ADNc seleccionados con enzimas de restricción apropiados, clonando los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) o similares, llevando a cabo la reacción de un método generalmente utilizado de análisis de la secuencia de nucleótidos, tal como el método de dideoxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977] de Sanger *et al.* o similar, y analizando seguidamente los clones utilizando un analizador automático de secuencias de nucleótidos, tal como el secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) o similares. Puede confirmarse si los ADNc obtenidos codifican las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretoria mediante la deducción de las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de las cadenas H y L a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y comparándolas con las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de las cadenas H y L de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services, 1991].

(3) Análisis de una secuencia de aminoácidos de la región V de anticuerpos obtenidos de animales diferentes del ser humano

Con respecto a las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretoria, puede deducirse la longitud de la secuencia de señal secretoria y las secuencias de aminoácidos N-terminales y también pueden encontrarse subgrupos a los que pertenecen, mediante la comparación de los mismos con las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de las cadenas H y L de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services, 1991]. Además, las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L de cada RDC también pueden encontrarse mediante la comparación de las mismas con las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services, 1991].

(4) Construcción de vector de expresión de anticuerpo híbrido humano

Puede construirse un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano mediante la clonación de ADNc codificantes de las regiones V de cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano cadena arriba de genes codificantes de las regiones C de las cadenas H y L de un anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpos humanizados construidos en el ítem 3(1). Por ejemplo, puede construirse un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano mediante la unión de cada uno de los ADNc codificantes de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano a un ADN sintético que comprende secuencias de nucleótidos en los extremos 3'-terminales de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano y secuencias de nucleótidos en los extremos 5'-terminales de las regiones C de las cadenas H y L de un anticuerpo humano y que también presentan una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en ambos extremos, y mediante la clonación de los mismos cadena arriba de los genes codificantes de las regiones C de las cadenas H y L de un anticuerpo humano contenido en el vector para la expresión de anticuerpos humanizados construidos que se describen en el ítem 3(1).

(5) Construcción de ADNc codificante de la región V de anticuerpo injertado con RDC humano

Los ADNc codificantes de las regiones V de las cadenas h y L de un anticuerpo injertado con RDC humano puede obtenerse de la manera siguiente. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de los marcos (en adelante denominados "RM") de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo humano para la injertación de las RDC de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo obtenido de un animal diferente del ser humano.

Como secuencias de aminoácidos de las RM de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo humano, pueden utilizarse cualesquiera secuencias de aminoácidos con la condición de que se obtengan de un anticuerpo humano. Entre los ejemplos se incluyen secuencias de aminoácidos de las RM de las regiones V de las cadenas H y L de anticuerpos humanos registrados en bases de datos tales como la Protein Data Bank, etc., secuencias de aminoácidos comunes en cada subgrupo de las RM de las regiones V de las cadenas H y L de los anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services, 1991] y similares. Sin embargo, con el fin de producir un anticuerpo con injertación de RDC humano que presenta una actividad potente, resulta preferible seleccionar una secuencia de aminoácidos que presente una homología tan elevada como resulte posible (de por lo menos 60% o superior) con secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo de interés obtenido de un animal diferente del ser humano.

A continuación, las secuencias de aminoácidos de las RDC de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo de interés obtenidas de un animal diferente de un ser humano se injertan en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las RM de las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo humano para diseñar secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo injertado con RDC humana. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN mediante la consideración de la frecuencia de uso de los codones en las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpo [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (1991)] y se diseñan las secuencias de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo injertado con RDC humana. Basándose en las secuencias de ADN diseñadas, se sintetizan varios fragmentos de ADN sintéticos con una longitud de aproximadamente 100 bases y se lleva a cabo la PCR utilizándolos. En este caso, resulta preferible en cada una de las cadenas H y L que se diseñen 6 ADN sintéticos en vista de la eficiencia de reacción de la PCR y las longitudes de los ADN que pueden sintetizarse.

Además, pueden clonarse fácilmente en el vector para la expresión de anticuerpos humanizados construido en el ítem 3(1), mediante la introducción de secuencias de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en los extremos 5'-terminales del ADN sintético presente en ambos extremos. Después de la PCR, el producto amplificado se clona en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) o similar y se determinan las secuencias de nucleótidos mediante el método en el ítem 3(2), obteniendo de esta manera un plásmido que presenta secuencias de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo injertado con RDC humana deseado.

(6) Construcción de vector de expresión de anticuerpo injertado con RDC humana

Puede construirse un vector de expresión de anticuerpo injertado con RDC humana mediante la clonación de ADN codificantes de las regiones V de cadenas H y L de un anticuerpo injertado con RDC humana construido en el ítem 3(5), cadena arriba del gen codificante de las regiones C de las cadenas H y L de un anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpos humanizados construido en el ítem 3(1). Por ejemplo, el vector de expresión de anticuerpo con injertación de RDC humana puede construirse mediante la introducción de secuencias de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en los extremos 5'-terminales de ambos extremos de un fragmento sintético de ADN, de entre los fragmentos sintéticos de ADN que se utilizan al llevar a cabo una PCR en el ítem 3(5) para la construcción de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo con injertación de RDC humana, de manera que se clonan cadena arriba de los genes codificantes de las regiones C de las cadenas H y L de un anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpos humanizados indicado en el ítem 3(1) de manera que puedan expresarse en una forma adecuada.

(7) Producción estable de anticuerpos humanizados

Puede obtenerse un transformante capaz de producir establemente un anticuerpo híbrido humano y un anticuerpo injertado con RDC humano (ambos denominados en adelante en la presente memoria "anticuerpo humanizado") mediante la introducción de los vectores de expresión de anticuerpo humanizado indicados en los ítems 3(4) y (6) en una célula animal apropiada.

Entre los ejemplos del método para introducir un vector de expresión de anticuerpos humanizados en una célula animal se incluyen la electroporación [solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 257891/90; Cytotechnology 3:133, 1990] y similares.

Como célula animal en la que se introduce un vector de expresión de anticuerpo humanizado, puede utilizarse cualquier célula con la condición de que sea una célula animal que pueda producir el anticuerpo humanizado.

Entre los ejemplos se incluyen células de mieloma de ratón, tales como las células NS' y las células SP2/0, células de ovario de hámster chino, tales como las células CHO/dhfr- y las células CHO/DG44, mieloma de rata tal como las células YB2/0 y las células IR983F, células BHK obtenidas de riñón de hámster chino, células de mieloma humano tales como las células Namalwa y similares, y resultan preferentes las células CHO/DG44 de ovario de hámster chino, las células YB2/0 de mieloma de rata y las células hospedadoras de la presente invención indicadas en el ítem 5.

Tras la introducción del vector de expresión de anticuerpos humanizados, puede seleccionarse un transformante capaz de producir establemente el anticuerpo humanizado utilizando un medio de cultivo de células animales que comprende un agente tal como el sulfato de G418 (en adelante denominado "G418", fabricado por Sigma) y similares de acuerdo con el método dado a conocer en la solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 257891/90. Entre los ejemplos de medio para el cultivo de células animales se incluye el medio RPMI 1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical), el medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), el medio Ex-Cell 302 (fabricado por JRH), el medio IMDM (fabricado por Gibco BRL), el medio hibridoma-SFM (fabricado por Gibco BRL), medios obtenidos mediante la adición de diversos aditivos, tales como el suero de feto bovino (en adelante denominado "FBS") a dichos medios, y similares. El anticuerpo humanizado puede producirse y acumularse en el sobrenadante de cultivo mediante el cultivo del transformante obtenido en un medio. El nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo humanizado en el sobrenadante de cultivo pueden medirse mediante un método tal como el ensayo de inmunosorción ligada a enzima [en adelante denominado "ELISA"; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulo 14, 1998, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996] o similares. Además, puede incrementarse el nivel de expresión de anticuerpo humanizado del transformante utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR de acuerdo con el método dado a conocer en la solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 257891/90.

El anticuerpo humanizado puede purificarse a partir de un sobrenadante de cultivo del transformante utilizando una columna de proteína A [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 8, 1988, *Monoclonal Antibodies, Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996]. Además, también pueden utilizarse métodos de purificación utilizados generalmente para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la purificación puede llevarse a cabo mediante la combinación de una filtración en gel, una cromatografía de intercambio iónico y una ultrafiltración. El peso molecular de la cadena H, la cadena L o la molécula de anticuerpo completa del anticuerpo humanizado purificado pueden medirse mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida [en adelante denominada "SDS-PAGE"; *Nature* 227:680, 1970], Western blotting [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 12, 1988; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996] o similares.

De esta manera, se han descrito métodos para producir una composición de anticuerpo utilizando una célula animal como huésped, aunque, tal como se ha indicado anteriormente, la composición de anticuerpo también puede ser producida por una levadura, una célula de insecto, una célula vegetal, un animal individual o una planta individual mediante los mismos métodos que en la célula animal.

En el caso de que una célula hospedadora presente la capacidad de expresar una molécula de anticuerpo de manera innata, puede producirse la composición de anticuerpo de la presente exposición mediante la preparación de una célula que expresa la molécula de anticuerpo utilizando el método indicado en el ítem 1, cultivando la célula y después purificando la composición de anticuerpo de interés a partir del cultivo resultante.

4. Evaluación de actividad de la composición de anticuerpo

Como método para medir la cantidad de composición purificada de anticuerpo, la actividad de unión a un anticuerpo y la función efectora de la composición purificada de anticuerpo, puede utilizarse el método conocido que se describe en *Monoclonal Antibodies, Antibody Engineering*, y similares.

A título de ejemplos, en el caso de que la composición de anticuerpo sea de un anticuerpo humanizado, la actividad de unión a un antígeno y la actividad de unión a una estirpe celular en cultivo positiva para antígeno pueden medirse mediante métodos tales como ELISA, un método de inmunofluorescencia [*Cancer Immunol. Immunother.* 36:373, 1993] y similares. La actividad citotóxica contra una estirpe celular en cultivo positiva para antígeno puede evaluarse mediante la medición de la actividad de CDC, la actividad de ADCC [*Cancer Immunol. Immunother.* 36:373, 1993] y similares.

Además, puede evaluarse la seguridad y el efecto terapéutico de la composición de anticuerpo en el ser humano utilizando un modelo apropiado de especie animal relativamente próxima al ser humano, tal como *Macaca fascicularis* o similar.

5. Análisis de las cadenas de azúcar de unión a moléculas de anticuerpo expresadas en diversas células

La estructura de cadena de azúcar de unión a una molécula de anticuerpo expresada en diversas células puede analizarse de acuerdo con el análisis general de la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína. Por ejemplo, la cadena de azúcar que se une a una molécula de IgG comprende un azúcar neutro, tal como galactosa, manosa, fucosa o similar, un aminoazúcar tal como N-acetilglucosamina o similar, y un azúcar ácido, tal como ácido siálico o similar, y puede analizarse mediante un método tal como un análisis de la estructura de las cadenas de azúcar o similar utilizando el análisis de la composición de azúcares, el mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar o similares.

(1) Análisis de las composiciones de azúcares neutros y aminoazúcares

La composición de cadenas de azúcar de unión a una molécula de anticuerpo puede analizarse llevando a cabo la hidrólisis ácida de las cadenas de azúcar con un ácido, tal como el ácido trifluoroacético o similar, para liberar un azúcar neutro o un aminoazúcar y medir las proporciones composicionales.

Entre los ejemplos se incluye un método de utilización de un analizador de la composición de azúcares (BioLC) fabricado por Dionex. El BioLC es un aparato que analiza la composición de azúcares mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento-detección amperométrica pulsada) [J. Liq. Chromatogr. 6:1577, 1983].

Las proporciones composicionales también pueden analizarse mediante un método de marcaje de fluorescencia utilizando 2-aminopiridina. Específicamente, las proporciones composicionales pueden calcularse de acuerdo con un método conocido [Agric. Biol. Chem. 55(1):283-284, 1991] mediante marcaje de una muestra hidrolizada con ácido con fluorescencia de 2-aminopiridilación y analizando después la composición mediante HPLC.

(2) Análisis de la estructura de las cadenas de azúcar

La estructura de las cadenas de azúcar de unión a una molécula de anticuerpo puede analizarse mediante el método de mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar [Anal. Biochem. 171:73, 1988; Biochemical Experimentation Methods 23 - Methods for Studying Glycoprotein Sugar Chains (Japan Scientific Societies Press) editado por Reiko Takahashi, 1989]. El método de mapeado bidimensional de cadenas de azúcar es un método para deducir la estructura de las cadenas de azúcar por ejemplo representando gráficamente el tiempo de retención o la posición de elución de una cadena de azúcar mediante cromatografía de fase inversa en el eje X y el tiempo de retención o posición de elución de la cadena de azúcar mediante cromatografía de fase normal en el eje Y, respectivamente, y comparándolas con dichos resultados de las cadenas de azúcar conocidas.

Específicamente, las cadenas de azúcar se liberan del anticuerpo sometiendo al mismo a hidrazinolisis y la cadena de azúcar liberada se somete a marcaje de fluorescencia con 2-aminopiridina (en adelante denominado "PA") [J. Biochem. 95:197, 1984] y después las cadenas de azúcar se separan de un exceso de reactivo de tratamiento de PA mediante filtración en gel y se someten a cromatografía de fase inversa. A continuación, cada pico de las cadenas de azúcar separadas se somete a cromatografía de fase normal. La estructura de cadena de azúcar puede deducirse representando gráficamente los resultados en un mapa bidimensional de las cadenas de azúcar y comparándolos con los puntos de un estándar de cadena de azúcar (fabricado por Takara Shuzo) o la literatura [Anal. Biochem. 171:73, 1988].

La estructura deducida mediante el método de mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar puede confirmarse llevando a cabo adicionalmente una espectrometría de masas, tal como EM-MALDI-TOF de cada cadena de azúcar o similares.

6. Método de determinación inmunológica para discriminar la estructura de cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo

Una composición de anticuerpo comprende una molécula de anticuerpo en la que las cadenas de azúcar de unión a la región Fc del anticuerpo presentan estructuras diferentes. La composición de anticuerpo en la que la proporción de cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es 20% o más del total de cadenas de azúcar complejas unidas mediante N-glucósido que se unen a la región Fc de la composición de anticuerpo presenta una actividad de ADCC potente en el extremo reductor. La composición de anticuerpo puede identificarse mediante la utilización del método de análisis de la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo descrita en el ítem 6. Además, también puede identificarse mediante un método de determinación inmunológica utilizando una lectina.

La estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo puede identificarse mediante el método de determinación inmunológica utilizando una lectina de acuerdo con un método de determinación inmunológica conocido, tal como tinción western, RIA (radioinmunoensayo), VIA (viroinmunoensayo), EIA (enzimo-inmunoensayo), FIA (fluoro-inmunoensayo), MIA (metalo-inmunoensayo) y similares, descritos en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc. (1995); Immunoassay, 3a ed., Igakushoin (1987); Enzyme Antibody Method, edición revisada, Gakusai Kikaku (1985), y similares.

Una lectina que reconoce la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo comprendida en una composición de anticuerpo se marca y la lectina marcada se deja reaccionar con una composición de anticuerpo, que es la muestra. A continuación, se mide la cantidad de complejo de lectina marcada que se forma con la molécula de anticuerpo.

Entre los ejemplos de la lectina utilizada para identificar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo se incluye WGA (aglutinina de germen de trigo obtenido de *T. vulgaris*), ConA (cocoavalina A obtenida

de *C. ensiformis*), RIC (una toxina obtenida de *R. communis*), L-PHA (leucoaglutinina obtenida de *P. vulgaris*), LCA (aglutinina de lenteja obtenida de *L. culinaris*), PSA (lectina de guisante obtenida de *P. sativum*), AAL (lectina de *Aleuria aurantia*), ACL (lectina de *Amaranthus caudatus*), BPL (lectina de *Bauhinia purpurea*), DSL (lectina de *Datura stramonium*), DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), EBL (lectina de corteza de saúco), ECL (lectina de *Erythrina cristagalli*), EEL (lectina de *Euonymus europaeus*), GNL (lectina de *Galanthus nivalis*), GSL (lectina de *Griffonia simplicifolia*), HPA (aglutinina de *Helix pomatia*), HHL (lectina de híbrido de *Hippeastrum*), Jacalina, LTL (lectina de *Lotus tetragonolobus*), LEL (lectina de *Lycopersicon esculentum*), MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MPL (lectina de *Maclura pomifera*), NPL (lectina de *Narcissus pseudonarcissus*), PNA (aglutinina de cacahuete), E-PHA (eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), PTL (lectina de *Psophocarpus tetragonolobus*), RCA (aglutinina de *Ricinus communis*), STL (lectina de *Solanum tuberosum*), SJA (aglutinina de *Sophora japonica*), SBA (aglutinina de soja), UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), VVL (lectina de *Vicia villosa*) y WFA (aglutinina de *Wisteria floribunda*). Resulta preferente utilizar una lectina que reconozca específicamente una estructura de cadena de azúcar en la que la fucosa se une a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glicosido. Entre los ejemplos se incluyen lectina de *Lens culinaris* LCA (aglutinina de lenteja obtenida de *Lens culinaris*), lectina de guisante PSA (lectina de guisante obtenida de *Pisum sativum*), lectina de haba VFA (aglutinina obtenida de *Vicia faba*) y lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina obtenida de *Aleuria aurantia*).

7. Aplicación de una molécula de anticuerpo producida de acuerdo con la presente invención

La composición de anticuerpo producida de acuerdo con la presente invención presenta una potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos. Un anticuerpo que presente una potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos resulta útil para prevenir y tratar diversas enfermedades, incluyendo cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas tales como enfermedades autoinmunológicas, alergias y similares, enfermedades de órganos circulatorios e infecciones víricas o bacterianas.

En el caso de los cánceres, concretamente los tumores malignos, las células de cáncer crecen. Los agentes antitumorales generales inhiben el crecimiento de las células de cáncer. En contraste, un anticuerpo que presente una potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos puede tratar cánceres al dañar las células de cáncer mediante su efecto de eliminación celular y, por lo tanto, resulta más eficaz como agente terapéutico que los agentes antitumorales generales. Actualmente, en el agente terapéutico para cánceres, un efecto antitumoral de un medicamento de anticuerpo por sí solo resulta insuficiente, de manera que se ha llevado a cabo una terapia de combinación con quimioterapia [Science 280:1197, 1998]. En el caso de que se encontrase un efecto antitumoral más potente con la composición de anticuerpo producida de acuerdo con la presente invención por sí sola, se reduciría la dependencia de la quimioterapia y se reducirían los efectos secundarios.

En enfermedades inmunológicas tales como las enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunológicas, alergias y similares, se inducen reacciones *in vivo* de las enfermedades debido a la liberación de una molécula mediadora por los inmunocitos, de manera que puede inhibirse la reacción alérgica mediante la eliminación de los inmunocitos utilizando un anticuerpo que presente una potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos.

Entre los ejemplos de enfermedades de órganos circulatorios se incluyen la arterioesclerosis y similares. Actualmente, la arterioesclerosis se trata utilizando catéteres con balón, aunque las enfermedades de órganos circulatorios pueden prevenirse y tratarse mediante la inhibición del crecimiento de las células arteriales en restricción tras el tratamiento con un anticuerpo con potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos.

Pueden prevenirse y tratarse diversas enfermedades, incluyendo infecciones víricas y bacterianas, mediante la inhibición de la proliferación de las células infectadas por un virus o bacteria utilizando un anticuerpo con potente actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos.

Posteriormente se describen ejemplos de un anticuerpo que reconozca un antígeno de tipo tumoral, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con alergia o inflamación, un anticuerpo que reconozca antígenos relacionados con enfermedades de los órganos circulatorios y un anticuerpo que reconozca antígenos relacionados con infecciones víricas o bacterianas.

Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno de tipo tumoral se incluyen el anticuerpo anti-GD2 (Ohta *et al.*, Anticancer Res. 13:331-336, 1993), el anticuerpo anti-GD3 (Ohta *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 36:260-266, 1993), el anticuerpo anti-GM2 (Nakamura *et al.*, Cancer Res. 54:1511-1516, 1994), el anticuerpo anti-HER2 (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992), el anticuerpo anti-CD52 (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992), el anticuerpo anti-MAGE (Jungbluth *et al.*, British J. Cancer 83:493-497, 2000), el anticuerpo anti-HM1.24 (Ono *et al.*, Molecular Immunol. 36:387-395, 1999), el anticuerpo anti-proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) antibody (Ogata *et al.*, Cancer 88:2909-2911, 2000), el anticuerpo anti-factor básico de crecimiento fibroblástico y el anticuerpo anti-FGF8 (Matsuzaki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9911-9915, 1989), el anticuerpo anti-receptor del factor básico de crecimiento fibroblástico y el anticuerpo anti-receptor de FGF8 (Kuo *et al.*, J. Biol. Chem. 265:16455-16463, 1990), el anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a la insulina

(Yao *et al.*, J. Neurosci. Res. 40:647-659, 1995), el anticuerpo anti-PMSA (Murphy *et al.*, J. Urology, 160, 2396-2401, 1998), el anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (Presta *et al.*, Cancer Res. 57:4593-4599, 1997), el anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (Kanno *et al.*, Oncogene 19:2138-2146, 2000) y similares.

5 Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con alergia o inflamación se incluyen el anticuerpo anti-interleuquina 6 (Abrams *et al.*, Immunol. Rev. 127:5-24, 1992), el anticuerpo anti-receptor de interleuquina 6 (Sato *et al.*, Molecular Immunol. 31:371-381, 1994), el anticuerpo anti-interleuquina 5 (Abrams *et al.*, Immunol. Rev. 127:5-24, 1992), el anticuerpo anti-receptor de interleuquina 5 y el anticuerpo anti-interleuquina 4 (Biord *et al.*, Cytokine 3:562-567, 1991), el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral (Tempest *et al.*, Hybridoma 13:183-190, 1994), el anticuerpo anti-receptor del factor de necrosis tumoral (Amrani *et al.*, Molecular Pharmacol. 58:237-245, 2000), el anticuerpo anti-CCR4 (Campbell *et al.*, Nature 400:776-780, 1999), el anticuerpo anti-quimioquina (Peri *et al.*, J. Immuno. Meth. 174:249-257, 1994), el anticuerpo anti-receptor de quimioquina (Wu *et al.*, J. Exp. Med. 186:1373-1381, 1997) y similares. Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad de órgano circulatorio se incluye el anticuerpo anti-GpIIb/IIIa (Co *et al.*, J. Immunol. 152:2968-2976, 1994), el anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas (Ferns *et al.*, Science 253:1129-1132, 1991), el anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (Shulman *et al.*, J. Biol. Chem. 272:17400-17404, 1997) y el anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea (Peter *et al.*, Circulation 101:1158-1164, 2000) y similares.

20 Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con infección vírica o bacteriana se incluye el anticuerpo anti-gp120 (Tugarinov *et al.*, Structure 8:385-395, 2000), el anticuerpo anti-CD4 (Schulze-Koops *et al.*, J. Rheumatology 25:2065-2076, 1998), el anticuerpo anti-CCR4 y el anticuerpo anti-toxina Vero (Karnali *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37:396-399, 1999) y similares.

25 Dichos anticuerpos pueden obtenerse de organizaciones públicas tales como la ATCC (The American Type Culture Collection), el RIKEN Gene Bank at The Institute of Physical and Chemical Research, National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (nombre actual: International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) y similares, o compañías privadas proveedoras de reactivos, tales como Dainippon Pharmaceutical, R & D SYSTEMS, PharMingen, Cosmo Bio, Funakoshi y similares.

35 El medicamento que comprende la composición de anticuerpo producida de acuerdo con la presente invención puede administrarse como agente terapéutico solo, aunque generalmente resulta preferente proporcionarlo como formulación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la fabricación farmacéutica, mediante la mezcla del mismo con por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

40 Resulta deseable seleccionar una vía de administración que resulte más eficaz en el tratamiento. Entre los ejemplos se incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular, intravenosa o similar. En una preparación de anticuerpo, resulta preferente la administración intravenosa.

45 La forma de administración incluye sprays, cápsulas, tabletas, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas y similares.

Entre los ejemplos de la preparación farmacéutica adecuados para la administración oral se incluyen emulsiones, sprays, cápsulas, tabletas, polvos, gránulos y similares.

50 Pueden producirse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, utilizando, a modo de aditivos, agua, sacáridos tales como sacarosa, sorbitol, fructosa, etc.; glicoles, tales como polietilenglicol, propilenglicol, etc.; aceites, tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, etc.; antisépticos, tales como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, etc.; saborizantes, tales como saborizante de fresa, hierbabuena, etc., y similares.

55 Pueden producirse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares utilizando, a modo de aditivo, rellenos, tales como lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, etc.; agentes desintegrantes, tales como almidón, alginato sódico, etc.; lubricantes, tales como estearato de magnesio, talco, etc.; ligantes, tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, gelatina, etc.; surfactantes, tales como éster de ácido graso, etc.; plastificadores, tales como glicerina, etc., y similares.

60 Entre los ejemplos de la preparación farmacéutica adecuados para la administración parenteral se incluyen inyecciones, supositorios, sprays y similares.

65 Las inyecciones pueden prepararse utilizando un portador, tal como una solución salina, una solución de glucosa, una mezcla de ambas, o similares. Además, pueden prepararse inyecciones de polvos mediante liofilización de la composición de anticuerpo de la manera habitual y añadiendo cloruro sódico a la misma.

Pueden prepararse supositorios utilizando un portador, tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada, ácido carboxílico o similares.

5 Además, pueden prepararse sprays utilizando la composición de anticuerpo por sí sola o utilizando un portador que no estimula la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y puede facilitar la absorción de la composición de anticuerpo dispersándola en forma de partículas finas.

10 Entre los ejemplos del portador se incluyen lactosa, glicerol y similares. Dependiendo de las propiedades de la composición de anticuerpo y el portador, resulta posible producir preparaciones farmacéuticas, tales como aerosoles, polvos secos y similares. Además, los componentes ejemplificados como aditivos para preparaciones orales también pueden añadirse a las preparaciones parenterales.

15 Aunque la dosis clínica o la frecuencia de administración varía dependiendo del efecto terapéutico objetivo, del método de administración, del periodo de tratamiento, de la edad, del peso corporal y similares, habitualmente es de entre 10 µg/kg y 20 mg/kg al día por adulto.

20 Además, como método de examen del efecto antitumoral de la composición de anticuerpo contra diversas células tumorales, entre los ensayos *in vitro* se incluyen el método de medición de la actividad CDC, el método de medición de la actividad ADCC y similares, y entre los ensayos *in vivo* se incluyen experimentos antitumorales utilizando un sistema antitumoral en un animal experimental, tal como un ratón, etc., y similares.

25 Las mediciones de la actividad CDC y de la actividad ADCC y los experimentos antitumorales pueden llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos en Cancer Immunology Immunotherapy 36:373, 1993; Cancer Research 54:1511, 1994, y similares.

A continuación se describe la presente invención en detalle basándose en los ejemplos; sin embargo, los ejemplos son únicamente simples ilustraciones y el alcance de la presente invención no se encuentra limitada a los mismos.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra patrones de electroforesis de SDS-PAGE de cinco anticuerpo híbridos anti-GD3 purificados (utilizando un gradiente de gel de 4% a 15%). Las figuras 1A y 1B muestran los resultados de la electroforesis bajo condiciones no reductoras y bajo condiciones reductoras, respectivamente. Los carriles 1 a 7 muestran los patrones de electroforesis de marcadores de peso molecular alto. Anticuerpo híbrido YB2/0-GD3, anticuerpo híbrido CHO/DG44-GD3, anticuerpo híbrido SP2/0-GD3, anticuerpo híbrido NS0-GD3 (302), anticuerpo híbrido NS0-GD3 (GIT) y marcadores de peso molecular bajo, respectivamente.

40 La figura 2 muestra las actividades de cinco anticuerpos híbridos anti-GD3 purificados de unión a GD3, medidos mediante modificación de la concentración de anticuerpo. La ordenada y las abscisas muestran la actividad de unión a GD3 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "○", "●", "□", "■" y "△" muestran las actividades del anticuerpo híbrido YB2/0-GD3, del anticuerpo híbrido CHO/DG44-GD3, del anticuerpo híbrido SP2/0-GD3, del anticuerpo híbrido NS0-GD3 (302) y del anticuerpo híbrido NS0-GD3 (GIT), respectivamente.

45 La figura 3 muestra las actividades de ADCC de cinco anticuerpos híbridos anti-GD3 purificados para la estirpe celular de melanoma humano G-361. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "○", "●", "□", "■" y "△" muestran las actividades del anticuerpo híbrido YB2/0-GD3, del anticuerpo híbrido CHO/DG44-GD3, del anticuerpo híbrido SP2/0-GD3, del anticuerpo híbrido NS0-GD3 (302) y del anticuerpo híbrido NS0-GD3 (GIT), respectivamente.

50 La figura 4 muestra los patrones de electroforesis de SDS-PAGE de tres anticuerpos anti-IL_h-5R α con inyección de RDC (utilizando un gradiente de gel de 4% a 15%). Las figuras 4A y 4B muestran los resultados de la electroforesis llevada a cabo bajo condiciones no reductoras y bajo condiciones reductoras, respectivamente. Los carriles 1 a 5 muestran los patrones de electroforesis de los marcadores de peso molecular alto, anticuerpo de YB2/0-IL_h RDC, anticuerpo de CHO/d-IL-5R_h RDC, anticuerpo de NS0-IL-5R_h RDC y de los marcadores de peso molecular bajo, respectivamente.

55 La figura 5 muestra las actividades de tres anticuerpos anti-hIL-5R α con inyección de RDC purificados de unión a IL-5R α _h, medidos mediante modificación de la concentración de anticuerpo. La ordenada y las abscisas muestran la actividad de unión con IL-5R α _h y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "○", "●" and "□" muestran las actividades del anticuerpo de YB2/0-IL-5R_h RDC, del anticuerpo de CHO/d-IL-5R_h RDC y del anticuerpo de NS0-IL-5R_h RDC, respectivamente.

60 La figura 6 muestra las actividades de ADCC de tres anticuerpos anti-IL-5R α _h con inyección de RDC purificados para una línea de células T de ratón expresante de IL-5R_h llamada CTLL-2(h5R). La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "○", "●" and "□" muestran las actividades del anticuerpo de YB2/0-IL-5R_h RDC, del anticuerpo de CHO/d-IL-5R_h RDC y del anticuerpo de NS0-

IL-5R_h RDC, respectivamente.

La figura 7 muestra las actividades de inhibición de tres anticuerpos anti-IL-5R_h con injertación de RDC purificados en un modelo de incremento de eosinófilos inducido por IL-5_h de *Macaca fascicularis*. La ordenada y las abscisas muestran el número de eosinófilos en sangre periférica y el número de días (el día de inicio de la administración de anticuerpo y de IL-5_h se definió como día 0). "101 y 102", "301, 302 y 303", "401, 402 y 403" y "501, 502 y 503" muestran los resultados en el grupo de no administración de anticuerpo, en el grupo de administración de anticuerpo de YB2/0-IL-5R_h RDC, en el grupo de administración de CHO/d-IL-5R_h RDC y del grupo de administración de NS0-IL-5R_h RDC, respectivamente.

La figura 8 muestra los patrones de elución de la elución de HPLC de fase inversa de una cadena de azúcar tratada con PA (lado izquierdo) y de un patrón de elución obtenido mediante el tratamiento de la cadena de azúcar tratada con PA con α -L-fucosidasa y después analizados mediante HPLC de fase inversa (lado derecho) del anticuerpo anti-IL-5R_h con injertación de RDC purificado producido por YB2/0 (figura 8A) y del anticuerpo anti-IL-5R_h con injertación de RDC purificado producido por NS0 (figura 8B). La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La figura 9 muestra un patrón de elución obtenido mediante la preparación de una cadena de azúcar tratada con PA a partir del anticuerpo anti-IL-5R_h con injertación de RDC purificado producido por las células CHO/d y el análisis del mismo mediante HPLC de fase inversa. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

En la figura 10, la figura 10A muestra las actividades de unión a GD3 de una fracción no adsorbida y una parte de una fracción adsorbida, medidas mediante la modificación de la concentración de anticuerpo. La ordenada y las abscisas muestran la actividad de unión a GD3 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "●" y "○" muestran la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, respectivamente. La figura 10B muestra las actividades de ADCC de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida para la línea de melanoma humano G-361. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "●" y "○" muestran la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, respectivamente.

La figura 11 muestra los patrones de elución obtenidos mediante en análisis de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de una fracción no adsorbida y una parte de una fracción adsorbida mediante una HPLC de fase inversa. Las figuras 11A y 11B muestran un patrón de elución de la fracción no adsorbida y un patrón de elución de una parte de la fracción adsorbida, respectivamente. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La figura 12 muestra los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de 6 anticuerpos híbridos anti-GD3 (figs. 12A a 12F) obtenidos mediante el análisis de los mismos mediante HPLC de fase inversa. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La figura 13 muestra las actividades de unión a GD3 de 6 anticuerpos híbridos anti-GD3 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa medidas mediante modificación de la concentración de anticuerpo. La ordenada y las abscisas muestran la actividad de unión a GD3 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "●", "□", "■", "△", "▲" y "x" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-GD3 (50%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (45%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (29%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (24%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (13%) y del anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%), respectivamente.

La figura 14 muestra actividades de ADCC de seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa contra una estirpe celular de melanoma humano G-361, utilizando una célula efectora del donante A. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "●", "□", "■", "△", "▲" y "x" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-GD3 (50%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (45%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (29%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (24%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (13%) y del anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%), respectivamente.

La figura 15 muestra actividades de ADCC de seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa contra una estirpe celular de melanoma humano G-361, utilizando una célula efectora del donante B. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "●", "□", "■", "△", "▲" y "x" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-GD3 (50%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (45%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (29%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (24%), del anticuerpo híbrido anti-GD3 (13%) y del anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%), respectivamente.

La figura 16 muestra los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3, obtenidos mediante el análisis de los mismos mediante HPLC de fase inversa. La

ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La figura 17 muestra las actividades de unión a CCR4 de seis tipos de anticuerpo híbrido anti-CCR4 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa medidas mediante modificación de la concentración de anticuerpo. La ordenada y las abscisas muestran la actividad de unión a CCR4 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "■", "□", "▲", "△", "●" y "○" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (46%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (39%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (27%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (18%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (9%) y del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%), respectivamente.

La figura 18 muestra actividades de ADCC de anticuerpos híbridos anti-CCR4 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa contra células CCR4/EL-4, utilizando una célula efectora del donante A. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "■", "□", "▲", "△", "●" y "○" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (46%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (39%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (27%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (18%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (9%) y del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%), respectivamente. Además, las figuras 18A y 18B muestran los resultados obtenidos utilizando células efectoras del donante A y del donante B, respectivamente.

La figura 19 muestra actividades de ADCC de anticuerpos híbridos anti-CCR4 que presentan una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa contra células CCR4/EL-4, utilizando una célula efectora del donante B. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "■", "□", "▲", "△", "●" y "○" muestran las actividades del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (46%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (39%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (27%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (18%), del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (9%) y del anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%), respectivamente.

La figura 20 muestra la construcción de los plásmidos CHFT8-pCR2.1 e YBFT8-pCR2.1.

La figura 21 muestra la construcción de los plásmidos CHAc-pBS e YBAC-pBS.

La figura 22 muestra la construcción de los plásmidos CHFT8d-pCR2.1 e YBFT8d-pCR2.1.

La figura 23 muestra la construcción de los plásmidos CHAc-d-pBS e YBAC-d-pBS.

La figura 24 muestra los resultados de la determinación de un producto de transcripción FUT8 en cada línea de célula hospedadora mediante RT-PCR competitiva. Se muestran las cantidades del producto de transcripción FUT8 en cada línea de célula hospedadora utilizando la secuencia de FUT8 de rata como estándar y se muestra el control interno. "■" y "□" muestran los resultados al utilizar las estirpes celulares CHO e YB2/0, respectivamente, como célula hospedadora.

La figura 25 muestra la construcción de un plásmido mfFUT8-pCR2.1.

La figura 26 muestra la construcción de un plásmido pBSmfFUT8.

La figura 27 muestra la construcción de un plásmido pAGEmfFUT8.

La figura 28 muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión del gen FUT8 por una estirpe celular de expresión en exceso del gen utilizando una RT-PCR competitiva. La ordenada muestra los valores relativos de cantidades de transcripción de FUT8 respecto a las cantidades de transcripción de β -actina.

La figura 29 muestra las actividades de ADCC de un anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado a partir de una estirpe celular que expresa en exceso gen FUT8 contra una estirpe celular de melanoma humano G-361. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente.

La figura 30 muestra los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de anticuerpos producidos por estirpes celulares en las que se ha introducido mfFUT8-6 y pAGE249, obtenidos mediante el análisis de los mismos mediante HPLC de fase inversa. Las figuras 30A y 30B muestran los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de un anticuerpo producido por la estirpe celular en la que se ha introducido mfFUT8-6 y cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de un anticuerpo producido por la estirpe celular en la que se ha introducido pAGE249, respectivamente. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La figura 31 muestra un patrón de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas con herceptina, obtenido mediante el análisis del mismo mediante HPLC de fase inversa. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

- La figura 32 muestra la construcción del plásmido CHfFUT8-pCR2.1.
- La figura 33 muestra la construcción del plásmido ploxPPuro.
- 5 La figura 34 muestra la construcción del plásmido pKOFUT8gE2-1.
- La figura 35 muestra la construcción del plásmido pKOFUT8gE2-2.
- La figura 36 muestra la construcción del plásmido pscFUT8gE2-3.
- 10 La figura 37 muestra la construcción del plásmido pKOFUT8gE2-3.
- La figura 38 muestra la construcción del plásmido pKOFUT8gE2-4.
- 15 La figura 39 muestra la construcción del plásmido pKOFUT8gE2-5.
- La figura 40 muestra la construcción de un plásmido pKOFUT8Puro.
- La figura 41 muestra los resultados de análisis southern del genoma de las líneas de células CHO con disrupción del gen de α -1,6-fucosiltransferasa 1st. Δ FUT8 2-46-1 y 1st. Δ FUT8 2-46.
- 20 La figura 42 muestra las actividades de ADCC de un anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado a partir de una estirpe celular con disrupción génica de alelo de FUT8. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo. "▲" y "■" muestran las actividades de un anticuerpo purificado derivado de una célula CHO 5-03 productora de anticuerpos híbridos anti-CCR4 y un anticuerpo purificado derivado de 1st. Δ FUT8 2-46-1, respectivamente.
- 25 La figura 43 muestra actividades de ADCC de anticuerpos híbridos anti-CCR4 humanos producidos por estirpes celulares resistentes a lectina. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo. "□", "■", "◆" y "▲" muestran las actividades de los anticuerpos producidos por la cepa 5-03, CHO/CCR4-LCA, CHO/CCR4-AAL y CHO/CCR4-PHA, respectivamente.
- 30 La figura 44 muestra actividades de ADCC de anticuerpos híbridos anti-CCR4 humanos producidos por estirpes celulares resistentes a lectina. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. "□", "Δ" y "●" muestran las actividades de los anticuerpos producidos por YB2/0 (KM2760 # 58-35-16), 5-03 y CHO/CCR4-LCA, respectivamente.
- 35 La figura 45 muestra los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de anticuerpos híbridos anti-CCR4 purificados, obtenidos mediante el análisis de los mismos mediante HPLC de fase inversa. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente. Las figuras 45A, 45B, 45C y 45D muestran los resultados de los análisis de un anticuerpo producido por la cepa 5-03, un anticuerpo producido por CHO/CCR4-LC1, un anticuerpo producido por CHO/CCR4-AAL y un anticuerpo producido por CHO/CCR4-PHA, respectivamente.
- 40 La figura 46 muestra la primera etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- 45 La figura 47 muestra la segunda etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- 50 La figura 48 muestra la tercera etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- 55 La figura 49 muestra la cuarta etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- 60 La figura 50 muestra la quinta etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- 65 La figura 51 muestra la sexta etapa de construcción de un vector de expresión de GMD derivada de células CHO (6 etapas en total).
- La figura 52 muestra la resistencia de CHO/CCR4-LCA que expresa GMD para la lectina LCA. La medición se llevó a cabo dos veces definiendo la tasa de supervivencia de un grupo de células cultivadas sin adición de lectina LCA como 100%. En el dibujo, "249" muestra la tasa de supervivencia de CHO/CCR4-LCA en el que se ha introducido el vector de expresión pAGE249 para la lectina LCA. GMD muestra la resistencia de CHO7CCR4-LCA en la que se ha

introducido un vector de expresión de GMD pAGE249GMD para la lectina LCA.

La figura 53 muestra actividades de ADCC de anticuerpos híbridos anti-CCR4 humanos producidos por células de las estirpes celulares CHO/CCR4-LCA expresantes de GMD. La ordenada y las abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente.

La figura 54 muestra una etapa de producción de un plásmido CHO-GMD en el que el extremo 5'-terminal de un clon 34-2 se introduce en el extremo 5'-terminal de un ADNc clon 22-8 de GMD derivado de célula CHO.

La figura 55 muestra un patrón de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de un anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado a partir de CHO/CCR4-LCA expresante de gen de GMD, obtenidos mediante el análisis de los mismos mediante HPLC de fase inversa. La ordenada y las abscisas muestran la intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

Ejemplo 1

Producción de anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3:

1. Construcción de vector de expresión en tándem pChiLHGM4 para el anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3

Se construyó un plásmido pChi641LGM40 mediante la ligación de un fragmento de aproximadamente 4,03 kb que contiene un ADNc de cadena L, obtenido mediante la digestión de un vector de expresión de cadena L, pChi641LGM4 [J. Immunol. Methods 167:271, 1994] para el anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3 (en adelante denominado "anticuerpo híbrido anti-GD3") con los enzimas de restricción MluI (fabricado por Takara Shuzo) y Sall (fabricado por Takara Shuzo) con un fragmento de aproximadamente 3,40 kb que contenía un gen de resistencia a G418 y una señal de procesamiento, obtenido mediante la digestión de un vector de expresión pAGE107 [Cytotechnology 3:133, 1990] para células animales con enzimas de restricción MluI (fabricado por Takara Shuzo) y Sall (fabricado por Takara Shuzo) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y transformando después *E. coli* HB101 (Molecular Cloning, segunda edición) con el producto ligado.

A continuación, un fragmento de aproximadamente 5,68 kb que contiene un ADNc de cadena L, obtenido mediante la digestión del plásmido construido pChi641LGM40 con un enzima de restricción ClaI (fabricado por Takara Shuzo), creando extremos romos en el mismo utilizando el kit de creación de extremos romos de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y digiriéndolo además con MluI (fabricado por Takara Shuzo), se ligó con un fragmento de aproximadamente 8,40 kb que contenía un ADNc de la cadena H, obtenido mediante digestión con un vector de expresión de la cadena H de anticuerpo híbrido anti-GD3, pChi641HGM4 [J. Immunol. Methods 167:271, 1994] con el enzima de restricción XhoI (fabricado por Takara Shuzo), creando extremos romos con el kit de creación de extremos romos de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y digiriéndolo además con MluI (fabricado por Takara Shuzo) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y después *E. coli* HB101 (Molecular Cloning, segunda edición) se transformó con el producto ligado, construyendo de esta manera el vector de expresión en tándem pChi641LHGM4 para el anticuerpo híbrido anti-GD3.

2. Preparación de células que producen establemente anticuerpo híbrido anti-GD3

Las células que pueden producir establemente un anticuerpo híbrido anti-GD3 se prepararon utilizando el vector de expresión en tándem pChi641LHGM4 para el anticuerpo híbrido anti-GD3 construido en el ítem 1 del Ejemplo 1, tal como se indica a continuación.

(1) Preparación de célula productora de anticuerpos utilizando la célula YB2/0 de mieloma de rata

Tras introducir 5 µg del vector de expresión pChi641LHGM4 del anticuerpo híbrido anti-GD3 en 4×10^6 células de YB2/0 de mieloma de rata [ATCC nº CRL-1662; J.V. Kilmarin *et al.*, J. Cell. Biol. 93:576-582, 1982] mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 40 ml de RPMI 1640-FBS(10) (medio RPMI1640 que comprendía FBS al 10% (fabricado por Gibco BRL)) y se dispensaron 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Sumitomo Bakelite). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂, se añadió G418 hasta una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó de los pocillos el sobrenadante de cultivo, en el que se habían formado colonias de los transformantes que mostraban resistencia a G418 y se había observado el crecimiento de las colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en el medio RPMI1640-FBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y el inhibidor de DHFR 50 nM, metotrexato (en adelante denominado "MTX",

fabricado por Sigma), proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml y la suspensión se dispensaron 2 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂. Se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo en pocillos en la que se observó crecimiento de los transformantes mediante el ELISA mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1. Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, se incrementó la concentración de MTX a 100 nM y después a 200 nM, y los transformantes capaces de crecer en el medio RPMI1640-FBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo híbrido anti-GD3 en una gran cantidad se obtuvieron finalmente mediante el mismo método que se ha indicado anteriormente. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares adecuadas y se aislaron en células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

El clon 7-9-51 de células transformadas productoras de anticuerpo híbrido anti-GD3 obtenido se depositó el 5 de abril de 1999 como FERM nº BP-6691 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Higashi 1-1-3, Tsukuba, Ibaraki, Japón) (nombre actual: International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón)).

(2) Preparación de células productoras de anticuerpos utilizando células CHO/DG44

Tras introducir 4 µg del vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-GD3, pChi641LHGM4, en $1,6 \times 10^6$ células de CHO/DG44 [G. Urlaub y L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980], mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 10 ml de IMDM-FBS(10) [medio IMDM que comprendía FBS al 10% y 1x concentración de complemento HT (fabricado por Gibco BRL)] y se dispensaron 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Iwaki Glass). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂, se añadió G418 hasta una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó de los pocillos el sobrenadante de cultivo, en el que se habían formado colonias de los transformantes que mostraban resistencia a G418 y se había observado el crecimiento de las colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en medio IMDM-dFBS(10) [medio IMDM que comprendía suero de feto bovino dializado al 10% (en adelante denominado "dFBS", fabricado por Gibco BRL)] que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 10 nM, proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml y la suspensión se dispensaron 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 10 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂. Con respecto a los transformantes en los pocillos en los que se había observado crecimiento, se incrementó la concentración de MTX a 100 nM, y finalmente se obtuvieron transformantes capaces de crecer en el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 100 nM y de producir anticuerpo híbrido anti-GD3 en gran cantidad, mediante el mismo método que el indicado anteriormente. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares adecuadas y se aislaron en células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

(3) Preparación de células productoras de anticuerpos utilizando células NS0 de mieloma de ratón

Tras introducir 5 µg del vector de expresión pChi641LHGM4 del anticuerpo híbrido anti-GD3 en 4×10^6 células NS0 de mieloma de ratón mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 40 ml de EX-CELL302-FBS(10) (medio EX-CELL302 que comprendía FBS al 10% y L-glutamina 2 mM [en adelante denominado "L-Gln", fabricado por Gibco BRL]) y se dispensaron 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Sumitomo Bakelite). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂, se añadió G418 hasta una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó de los pocillos el sobrenadante de cultivo, en el que se habían formado colonias de los transformantes que mostraban resistencia a G418 y se había observado el crecimiento de las colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en medio EX-CELL302-dFBS(10) (medio

EX-CELL302 que comprendía dFBS al 10% y L-Gln 2 mM) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 50 nM, proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml y la suspensión se dispensaron 2 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂. Se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo en pocillos en los que se había observado crecimiento de transformantes, mediante el ELISA mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1. Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, se incrementó la concentración de MTX a 100 nM y después a 200 nM, y los transformantes capaces de crecer en el medio EX-CELL302-dFBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo híbrido anti-GD3 en una gran cantidad se obtuvieron finalmente mediante el mismo método que se ha indicado anteriormente. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares y se aislaron en forma de células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

3. Medición de la actividad de unión del anticuerpo a GD3 (ELISA)

Se midió la actividad de unión a GD3 del anticuerpo tal como se indica a continuación.

En 2 ml de solución de etanol que contenía 10 μ g de dipalmitoilfosfatidilcolina (fabricada por Sigma) y 5 μ g de colesterol (fabricado por Sigma), se disolvieron 4 nmoles de GD3. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos para ELISA (fabricada por Greiner), se dispensaron 20 μ l de la solución (40 pmoles/pocillo de concentración final), seguido de secado al aire, se dispensó PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (en adelante denominada "BSA", fabricada por Sigma) (en adelante denominado "PBS-BSA al 1%") a razón de 100 μ l/pocillo y después se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo de los grupos activos restantes. Tras descartar el PBS-BSA al 1%, se dispensó un sobrenadante de cultivo de un transformante o una solución diluida de un anticuerpo híbrido humano en 50 μ l/pocillo para llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción, se lavó cada pocillo con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) (en adelante denominado "PBS-Tween"), una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con peroxidasa (H y L) (fabricada por American Qualex) diluida 3.000 veces con PBS-BSA al 1% y se dispensó a razón de 50 μ l/pocillo como solución de anticuerpo secundario y después se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción y posterior lavado con PBS-Tween, se dispensó solución de sustrato ABTS [solución preparada mediante disolución de 0,55 g de sal amónica de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) en 1 litro de tampón citrato 0,1 M (pH 4,2) y adición de 1 μ l/ml de peróxido de hidrógeno a la solución inmediatamente antes del uso (en adelante se utiliza la misma solución)] en 50 μ l/pocillo para el revelado de color y después se midió la absorbancia a 415 nm (en adelante denominada "DO415").

4. Purificación de anticuerpo híbrido anti-GD3

(1) Cultivo de célula productora de anticuerpos derivada de célula YB2/0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos híbridos anti-GD3 obtenido en el ítem 2(1) del Ejemplo 1 se suspendió en el medio de hibridoma-SFM que comprendía BSA al 0,2%, MTX 200 nM y triyodotironina 100 nM (en adelante denominado "T3", fabricado por Sigma), proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y se cultivó utilizando una botella centrifugadora de 2,0 litros de capacidad (fabricada por Iwaki Glass) bajo agitación a una velocidad de 50 rpm. Tras cultivarlas a 37°C durante 10 días en una sala de temperatura controlada, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-GD3 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido YB2/0-GD3.

(2) Cultivo de célula productora de anticuerpos derivada de célula CHO/DG44 y purificación de anticuerpos

El clon celular transformado productor de anticuerpo híbrido anti-GD3 obtenido en el ítem 2(2) del Ejemplo 1 se suspendió en el medio EX-CELL302 que comprendía L-Gln 3 mM, solución concentrada de ácidos grasos al 0,5% (en adelante denominada "CDLC", fabricada por Gibco BRL) y Pluronic F68 al 0,3% (en adelante denominada "PF68", fabricada por Gibco BRL), proporcionando una densidad de 1×10^5 células/ml y la suspensión se dispensó a razón de 50 ml en matraces de 175 mm² (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 4 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-GD3 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido CHO/DG44-GD3.

(3) Cultivo de células productoras de anticuerpos derivadas de células NS0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos híbridos anti-GD3 obtenido en el ítem 2(3) del Ejemplo

1 se suspendió en el medio EX-CELL302 que comprendía L-Gln 2 mM, G418 0,5 mg/ml, MTX 200 nM y FBS al 1%, proporcionando una densidad de 1×10^6 células/ml y la suspensión se dispuso a razón de 200 ml en matraces de 175 mm² (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 4 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-GD3 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido NS0-GD3 (302).

Además, el clon de células transformadas se suspendió en el medio GIT que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM, proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml, y la suspensión se dispuso a razón de 200 ml en matraces de 175 mm² (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 10 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-GD3 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido NS0-GD3 (GIT).

(4) Cultivo de células productoras de anticuerpos derivadas de células SP2/0 y purificación de los anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos híbridos anti-GD3 (KM-871 (FERM nº BP-3512)) descrito en la solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 304989/93 (EP nº 533199) se suspendió en el medio GIT que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM, proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml, y la suspensión se dispuso a razón de 200 ml en matraces de 175 mm² (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 8 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-GD3 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido SP2/0-GD3.

5. Análisis del anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado

De acuerdo con un método conocido [Nature 227:680, 1970], 4 µg de cada uno de los cinco tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 producido y purificado a partir de las células animales respectivas, obtenidos en el ítem 4 del Ejemplo 1, se sometieron a SDS-PAGE para analizar el peso molecular y el grado de purificación. Se muestran los resultados en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, se observó una única banda en aproximadamente 150 kilodaltons (en adelante denominados "kD") de peso molecular bajo condiciones no reductoras, y dos bandas de aproximadamente 50 kD y aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras, en cada uno de los anticuerpos híbridos anti-GD3 purificados. Los pesos moleculares prácticamente coincidieron con los pesos moleculares deducidos de las secuencias de nucleótidos de ADNc de las cadenas H y L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 Kd; cadena L: aproximadamente 23 Kd; molécula completa: aproximadamente 144 kD) y también coincidieron con los informes que indican que el anticuerpo IgG presentaba un peso molecular de aproximadamente 150 kD bajo condiciones no reductoras y resultaba degradado en cadenas H con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y cadenas L que presentaban un peso molecular de aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras debido al corte del enlace disulfuro (en adelante denominado "enlace S-S") en la molécula [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulo 14, 1998; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996], de manera que se confirmó que cada anticuerpo híbrido anti-GD3 se había expresado y purificado en forma de molécula de anticuerpo con la estructura real.

Ejemplo 2

Evaluación de la actividad del anticuerpo híbrido anti-GD3:

1. Medición de la actividad de unión del anticuerpo híbrido anti-GD3 a GD3 (ELISA)

Se midió la actividad de los cinco tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado obtenidos en el ítem 4 del Ejemplo 1 de unión a GD3 (fabricados por Snow Brand Milk Products) mediante el ELISA mostrado en el ítem 3 del Ejemplo 1. La figura 2 muestra el resultado del examen de la actividad de unión medida mediante la modificación de la concentración del anticuerpo híbrido anti-GD3 que debía añadirse. Tal como se muestra en la figura 2, los cinco tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 mostraron prácticamente la misma actividad de unión a GD3. El resultado demuestra que las actividades de unión a antígeno de dichos anticuerpos son constantes independientemente de las células animales productoras de anticuerpos y los métodos de cultivo de las mismas. Además, la comparación entre el anticuerpo híbrido de NS0-GD3 (302) y el anticuerpo híbrido de NS0-GD3 (GIT) sugiere que las actividades de unión a antígeno son constantes independientemente de los medios utilizados en el cultivo.

2. Actividad citotóxica (actividad ADCC) *in vitro* del anticuerpo híbrido anti-GD3

Con el fin de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los cinco tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado obtenidos en el ítem 4 del Ejemplo 1, se midió la actividad ADCC de acuerdo con el método siguiente.

(1) Preparación de solución de células diana

Se cultivó la estirpe celular de melanoma humano G-361 (ATCC nº CRL 1424) utilizando el medio RPMI1640-FBS(10) para preparar 1×10^6 células, y las células se marcaron radioisotópicamente haciéndolas reaccionar con 3,7 MBq equivalentes de la sustancia radioactiva $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a 37°C durante 1 hora. Tras la reacción, las células se lavaron tres veces en la suspensión de medio RPMI1640-FBS(10) y la centrifugación, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos en hielo para la disolución espontánea de la sustancia radioactiva. Tras la centrifugación, se ajustó el precipitado a 2×10^5 células/ml mediante la adición de 5 ml del medio RPMI1640-FBS(10) y se utilizó como solución de las células madre.

(2) Preparación de solución de células efectoras

De una persona sana se recolectaron 50 ml de sangre venosa y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricado por Takeda Pharmaceutical). La mezcla se centrifugó para aislar una capa de células mononucleares utilizando Lymphoprep (fabricado por Nycomed Pharma AS) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras lavar con el medio RPMI1640-FBS(10) mediante centrifugación tres veces, el precipitado resultante se resuspendió, proporcionando una densidad de 2×10^6 células/ml con el medio y se utilizó como la solución de células efectoras.

(3) Medición de la actividad ADCC

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon), se dispensaron 50 µl de la solución de células diana preparada en (1) anteriormente (1×10^4 células/pocillo). A continuación, se añadieron a lo anterior 100 µl de la solución de células efectoras preparadas en (2), anteriormente (2×10^5 células/pocillo, la proporción de células efectoras a células diana alcanzó 20:1). A continuación, se añadió cada uno de los anticuerpos híbridos anti-GD3, proporcionando una concentración final de entre 0,0025 y 2,5 µg/ml, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Tras la reacción, se centrifugó la placa y se midió la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante utilizando un contador γ. Se calculó la cantidad de ^{51}Cr liberado espontáneamente mediante la misma operación, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de células efectoras y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la cantidad total de ^{51}Cr liberado mediante la misma operación, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de anticuerpos y añadiendo ácido clorhídrico 1 N en lugar de la solución de células efectoras y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la actividad de ADCC a partir de la ecuación (II) a continuación:

$$\text{Actividad ADCC (\%)} = \frac{{}^{51}\text{Cr en sobrenadante-muestra} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}}{{}^{51}\text{Cr liberado total} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}} \times 100 \text{ (II)}$$

Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, entre los cinco tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3, el anticuerpo híbrido de YB2/0-GD3 mostró la actividad ADCC más potente, seguido del anticuerpo híbrido de SP2/0-GD3, el anticuerpo híbrido de NS0-GD3 y el anticuerpo híbrido de CHO-GD3, en ese orden. No se observó diferencia de actividad ADCC entre el anticuerpo híbrido de NS0-GD3 (302) y el anticuerpo híbrido de NS0-GD3 (GIT) preparado utilizando diferentes medios durante el cultivo. Los resultados anteriores demuestran que la actividad ADCC de los anticuerpos varía en gran medida dependiendo del tipo de células animales que deben utilizarse en la producción de los mismos. Respecto a su mecanismo, debido a que las actividades de unión a antígeno eran idénticas, se consideró que la unión estaba causada por una diferencia en la unión de la estructura a la región Fc de anticuerpo.

Ejemplo 3

Preparación de anticuerpo con injertación de RDC humana anti-cadena α de receptor de interleuquina 5 humana:

1. Preparación de células productoras estables de anticuerpo con injertación de RDC humana anti-cadena α de receptor de interleuquina 5 humana:

(1) Preparación de célula productora de anticuerpos utilizando la célula YB2/0 de mieloma de rata

Mediante la utilización del vector de expresión del anticuerpo con injertación de RDC humana anti-cadena α de receptor de interleuquina 5 humana (en adelante denominado "anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5Rα_h"), pKANTEX1259HV3LV0, descrita en el documento nº WO 97/10354, se prepararon células capaces de producir establemente anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5Rα_h tal como se indica a continuación.

Tras introducir 5 µg del vector de expresión de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5Rα_h pKANTEX1259HV3LV0 en 4×10^6 células de YB2/0 de mieloma de rata mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 40 ml de RPMI1640-FBS(10) y se dispensaron 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Sumitomo Bakelite). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO_2 , se añadió G418 hasta una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2

semanas. Se recuperó de los pocillos el sobrenadante de cultivo, en el que se habían formado colonias de los transformantes que mostraban resistencia a G418 y se había observado el crecimiento de las colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 2 del Ejemplo 3.

5 Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en el medio RPMI1640-FBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 50 nM, proporcionando una densidad de 1 a 10 2×10^5 células/ml y la suspensión se dispensaron 2 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂. Se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en sobrenadantes de cultivo en la que se observó crecimiento de los transformantes mediante el ELISA mostrado en el ítem 2 del Ejemplo 3. Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en sobrenadantes de cultivo, se incrementó la concentración de MTX a 100 nM y después a 200 nM, y los transformantes capaces de crecer en el medio RPMI1640-FBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en una gran cantidad se obtuvieron finalmente de la manera indicada anteriormente. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares y se aislaron en forma de células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada. El clon de células transformadas n° 3 productoras de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h obtenido se depositó el 5 de abril de 1999 como FERM n° BP-6690 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Higashi 1-1-3, Tsukuba, Ibaraki, Japón) (nombre actual: International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón)).

30 (2) Preparación de células productoras de anticuerpos utilizando células CHO/dhfr

Tras introducir 4 μ g del vector de expresión de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h pKANTEX1259HV3LV0 descrito en el documento n° WO 97/10354 en $1,6 \times 10^6$ células de CHO/dhfr mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 10 ml de IMDM-FBS(10) y se dispensaron 200 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂, se añadió G418 hasta una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó de los pocillos respectivos el sobrenadante de cultivo, en el que se habían formado colonias de los transformantes que mostraban resistencia a G418 y se había observado el crecimiento de las colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 2 del Ejemplo 3.

Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de los transformantes en medio IMDM-dFBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 10 nM, proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml, y la suspensión se dispuso a razón de 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 10 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂. Con respecto a los transformantes en los pocillos en los que se había observado crecimiento, se incrementó la concentración de MTX a 100 nM y después a 500 nM y finalmente se obtuvieron transformantes capaces de crecer en el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 500 nM y de producir anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en gran cantidad, mediante el mismo método que el indicado anteriormente. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares y se aislaron en forma de células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

60 (3) Preparación de células productoras de anticuerpos utilizando células NS0 de mieloma de ratón

Se preparó un vector de expresión de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h de acuerdo con el método de Yarranton *et al.* [Biotechnology 10:169, 1992] y utilizando el ADNc de cadena H de anticuerpo y el ADNc de cadena L en el vector de expresión de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h, pKANTEX1259HV3LV0 descrito en el documento n° WO 97/10354, se transformaron célula NS0 para obtener transformantes capaces de producir el anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h en gran cantidad. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionaron las estirpes celulares y se aislaron en forma de células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces. Además, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-

fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

2. Medición de la actividad de unión del anticuerpo a IL-5R α _h (ELISA)

Se midió la actividad de unión a IL-5R α _h del anticuerpo tal como se indica a continuación.

Se preparó una solución mediante dilución del anticuerpo de ratón anti-IL-5R α _h KM1257 descrito en el documento n° WO 97/10354 con PBS, proporcionando una concentración de 10 μ g/ml y se dispensaron 50 μ l de la solución resultante en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para el ELISA (fabricado por Greiner), seguido de la reacción a 4°C durante 20 horas. Tras la reacción, se dispuso BSA-PBS al 1% a razón de 100 μ l/pocillo y después se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos restantes. Tras descartar PBS-BSA al 1%, una solución preparada mediante dilución de la IL-5R α _h soluble descrita en el documento n° WO 97/10354 con PBS-BSA al 1%, proporcionando una concentración de 0,5 μ g/ml, se dispuso a razón de 50 μ l/pocillo, seguido de la reacción a 4°C durante 20 horas. Tras la reacción, se lavó cada pocillo con Tween-PBS, los sobrenadantes de cultivo de los transformantes o de las soluciones diluidas de anticuerpos con inyección de RDC humana purificados se dispensaron a razón de 50 μ g/pocillo para llevar a cabo la temperatura de reacción durante 2 horas. Tras la reacción, se lavó cada pocillo con Tween-PBS, una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H y L) marcado con peroxidasa (fabricada por American Qualex) diluida 3.000 veces con PBS-BSA al 1% y se dispuso a razón de 50 μ l/pocillo como solución de anticuerpo secundario y después se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción y posterior lavado con Tween-PBS, la solución de sustrato ABTS se dispuso a razón de 50 μ l/pocillo para el revelado del color y después se midió la absorbancia a DO415.

3. Purificación de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h

(1) Cultivo de célula productora de anticuerpos derivada de célula YB2/0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos con inyección de RD anti-IL-5R α _h obtenido en el ítem 1(1) del Ejemplo 1 se suspendió en el medio GIT que comprendía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM, proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y la suspensión se dispuso a razón de 200 ml en matraces de 175 mm² (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 8 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de intercambio iónico y un método de filtración en gel. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificado se denominó anticuerpo de YB2/0-IL-5R α _h RDC.

(2) Cultivo de células productoras de anticuerpos derivada de células CHO/dhfr⁻ y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos inyectados con RDC anti-IL-5R α _h obtenido en el ítem 1(2) del Ejemplo 3 se suspendió en el medio EX-CELL302 que comprendía L-Gln 3 mM, CDLC al 0,5% y PF68 al 0,3%, proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y se cultivó utilizando una botella centrifugadora de 4,0 litros de capacidad (fabricada por Iwaki Glass) bajo agitación a una velocidad de 100 rpm. Tras cultivarlas a 37°C durante 10 días en una sala de temperatura controlada, se recuperó el sobrenadante de cultivo. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de intercambio iónico y un método de filtración en gel. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificado se denominó anticuerpo de CHO/d-IL-5R α _h RDC.

(3) Cultivo de células productoras de anticuerpos derivadas de células NS0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h obtenido en el ítem 1(3) del Ejemplo 3 se cultivó de acuerdo con el método de Yarranton *et al.* [Bio/Technology 10:169, 1992] y después se recuperó un sobrenadante de cultivo. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de intercambio iónico y el método de filtración en gel. El anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificado se denominó anticuerpo de NS0/IL-5R α _h RDC.

4. Análisis de anticuerpos con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificados

De acuerdo con un método conocido [Nature 227:680, 1970], 4 μ g de cada uno de los tres tipos de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h producido y purificado a partir de las células animales respectivas, obtenidos en el ítem 3 del Ejemplo 3, se sometieron a SDS-PAGE para analizar el peso molecular y el grado de purificación. Se muestran los resultados en la figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, se observó una única banda en aproximadamente 150 kilodaltons de peso molecular bajo condiciones no reductoras, y dos bandas de aproximadamente 50 kD y aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras, en cada uno de los anticuerpos con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificados. Los pesos moleculares prácticamente coincidieron con los pesos moleculares deducidos de las secuencias de nucleótidos de ADNc de las cadenas H y L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 kD; cadena L: aproximadamente 23 kD; molécula completa: aproximadamente 144 kD) y también coincidieron con los informes que indican que el anticuerpo IgG presentaba un peso molecular de

aproximadamente 150 kD bajo condiciones no reductoras y resultaba degradado en cadenas H con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y cadenas L que presentaban un peso molecular de aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras debido al corte del enlace S-S en la molécula [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulo 14, 1998; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996], de manera que se confirmó que cada anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α se había expresado y purificado en forma de molécula de anticuerpo con la estructura real.

Ejemplo 4

10 Evaluación de actividad de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α h

1. Actividad de unión de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α h (ELISA)

15 Se midió la actividad de los tres tipos de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h purificado obtenidos en el ítem 3 del Ejemplo 3 de unión a IL-5R α _h mediante el ELISA mostrado en el ítem 2 del Ejemplo 3. La figura 5 muestra el resultado del examen de la actividad de unión medida mediante la modificación de la concentración del anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h que debía añadirse. Tal como se muestra en la figura 5, los tres tipos de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h mostraron prácticamente la misma actividad de unión a IL-5R α _h. El resultado demuestra que las actividades de unión a antígeno de dichos anticuerpos son constantes independientemente de las células animales productoras de anticuerpos y los métodos de cultivo de las mismas, de manera similar al resultado del ítem 1 del Ejemplo 2.

2. Actividad citotóxica (actividad ADCC) *in vitro* del anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α h

25 Con el fin de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los tres tipos de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h purificado obtenidos en el ítem 3 del Ejemplo 3, se midió la actividad ADCC de acuerdo con el método siguiente.

30 (1) Preparación de solución de células diana

Se cultivó la línea de células T de ratón CTLL-2(h5R) que expresaba las cadenas α y β de IL-5R_h descritos en el documento n^o WO 97/10354 utilizando el medio RPMI1640-FBS(10), proporcionando una densidad de 1×10^6 células/0,5 ml, y las células se marcaron radioisotópicamente haciéndolas reaccionar con 3,7 MBq equivalentes de la sustancia radioactiva Na₂⁵¹CrO₄ a 37°C durante 1,5 horas. Tras la reacción, las células se lavaron tres veces en la suspensión de medio RPMI1640-FBS(10) y se centrifugaron, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos en hielo para la disolución espontánea de la sustancia radioactiva. Tras la centrifugación, se ajustó el precipitado a una densidad de 2×10^5 células/ml mediante la adición de 5 ml del medio RPMI1640-FBS(10) y se utilizó como solución de las células madre.

40 (2) Preparación de solución de células efectoras

De una persona sana se recolectaron 50 ml de sangre venosa y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricado por Takeda Pharmaceutical). La mezcla se centrifugó para aislar una capa de células mononucleares utilizando Polymorphprep (fabricado por Nycomed Pharma AS) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras lavar con el medio RPMI1640-FBS(10) mediante centrifugación tres veces, las células resultantes se resuspendieron, proporcionando una densidad de 9×10^6 células/ml con el medio y se utilizaron como solución de células efectoras.

50 (3) Medición de la actividad ADCC

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon), se dispensaron 50 μ l de la solución de células diana preparada en (1) anteriormente (1×10^4 células/pocillo). A continuación, se añadieron a lo anterior 100 μ l de la solución de células efectoras preparadas en (2), anteriormente (9×10^5 células/pocillo, la proporción de células efectoras a células diana alcanzó 90:1). A continuación, se añadió cada uno de los anticuerpos con injertación de RDC anti-IL-5R α _h, proporcionando una concentración final de entre 0,001 y 0,1 μ g/ml, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Tras la reacción, se centrifugó la placa y se midió la cantidad de ⁵¹Cr en el sobrenadante utilizando un contador y. Se calculó la cantidad de ⁵¹Cr liberado espontáneamente mediante la misma operación, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de células efectoras y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ⁵¹Cr en el sobrenadante. Se calculó la cantidad total de ⁵¹Cr liberado mediante la misma operación, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de anticuerpos y añadiendo ácido clorhídrico 1 N en lugar de la solución de células efectoras y midiendo la cantidad de ⁵¹Cr en el sobrenadante.

Se calculó la actividad de ADCC a partir de la ecuación (II), anteriormente proporcionada.

65 Los resultados se muestran en la figura 6. Tal como se muestra en la figura 6, entre los tres tipos de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h, el anticuerpo YB2/0-IL-5R_h RDC mostró la actividad ADCC más potente, seguido

del anticuerpo CHO/d-IL-5R_h RDC y el anticuerpo NS0-IL-5R_h RDC, en este orden. De manera similar al resultado del ítem 2 del Ejemplo 2, los resultados anteriores demuestran que la actividad ADCC de los anticuerpos varía en gran medida dependiendo de las células animales que deben utilizarse en la producción de los mismos. Además, debido a que los anticuerpos producidos por las células YB2/0 mostraban la actividad ADCC más potente en ambos tipos de anticuerpo humanizado, se reveló que podía producirse un anticuerpo con actividad ADCC potente mediante la utilización de células YB2/0.

3. Evaluación de la actividad *in vivo* del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h

Con el fin de evaluar la actividad *in vivo* de los tres tipos de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h purificado obtenidos en el ítem 3 del Ejemplo 3, se examinó la actividad de inhibición en un modelo de eosinofilia creciente inducida por IL-5_h de *Macaca fascicularis* de acuerdo con el método siguiente.

Se administró la IL-5_h (método de preparación descrito en el documento n° WO 97/10354) en *Macaca fascicularis* bajo la piel dorsal a una dosis de 1 μ g/kg, desde el primer día y una vez al día durante un total de 14 veces. Cada anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h se administró por vía intravenosa a una dosis de 0,3 mg/kg una hora antes de la administración de IL-5_h el día cero. A modo de control se utilizó un grupo sin adición de anticuerpo. En los grupos en los que se había administrado anticuerpo se utilizaron tres animales de *Macaca fascicularis* en cada grupo (n° 301, n° 302, n° 303, n° 401, n° 402, n° 403, n° 501, n° 502 y n° 503) y se utilizaron dos animales (n° 101 y n° 102) en el grupo sin adición de anticuerpo. Desde los 7 días antes del inicio de la administración y hasta 42 días después de la administración, se recolectó periódicamente aproximadamente 1 ml de sangre de una vena safena o una vena femoral y se midió el número de eosinófilos en 1 μ l de sangre periférica. Se muestran los resultados en la figura 7. Tal como se muestra en la figura 7, el incremento de los eosinófilos en sangre resultó completamente inhibido en el grupo en el que se había administrado anticuerpo YB2/0-IL-5R_h RDC. Por otra parte, se observó una actividad de inhibición completa en un animal en el grupo en el que se había administrado el anticuerpo de CHO/d-IL-5R_h RDC, mientras que la actividad de inhibición no era suficiente en dos animales. En el grupo en el que se había administrado el anticuerpo de NS0-IL-5R_h RDC, no se observó actividad de inhibición completa y su efecto no resultó suficiente.

Los resultados anteriores demuestran que la actividad *in vivo* de los anticuerpos varía en gran medida dependiendo del tipo de células animales que deben utilizarse en la producción de los mismos. Además, debido a que se observó una correlación positiva entre el grado de actividad *in vivo* del anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h y el grado de su actividad ADCC descrito en el ítem 2 del Ejemplo 4, se señaló que el grado de actividad de ADCC resulta notablemente importante para la expresión de la actividad del mismo.

Basándose en los resultados anteriormente proporcionados, se espera que un anticuerpo con potente actividad de ADCC también resulte útil en el campo clínico para diversas enfermedades en el ser humano.

Ejemplo 5

Análisis de las cadenas de azúcar que potencian la actividad de ADCC:

1. Preparación de cadena de azúcar marcada con 2-aminopiridina (cadena sacárida tratada con PA)

El anticuerpo humanizado de la presente invención se hidrolizó con ácido clorhídrico para eliminar el ácido siálico. Tras eliminar por completo el ácido clorhídrico, la cadena de azúcar se cortó de la proteína mediante hidrazinolisis [Method of Enzymology 83:263, 1982]. Se eliminó la hidrazina y se llevó a cabo la N-acetilación mediante la adición de una solución acuosa de acetato amónico y anhídrido acético. Tras la liofilización, se llevó a cabo el marcaje fluorescente con 2-aminopiridina [J. Biochem. 95:197, 1984]. La cadena de azúcar marcada fluorescentemente (cadena sacárida tratada con PA) se separó de las impurezas utilizando una columna Superdex Peptide HR 10/30 (fabricada por Pharmacia). La fracción de cadena de azúcar se secó utilizando un concentrador centrífugo y se utilizó como cadena de azúcar tratada con PA purificada.

2. Análisis de HPLC de fase inversa de cadena de azúcar tratada con PA de anticuerpo con inyección de RDC anti-IL-5R α _h

Según el método en el ítem 1 del Ejemplo 5, los diversos anticuerpos con inyección de RDC anti-IL-5R α _h producidos en el Ejemplo 3 se sometieron a tratamiento de las cadenas de azúcar tratadas con PA y se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa con una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu). Se añadió una cantidad en exceso de α -L-fucosidasa (obtenida de riñón bovino, fabricada por Sigma) a la cadena de azúcar tratada con PA para la digestión (37°C, 15 horas) y después se analizaron los productos mediante HPLC de fase inversa (figura 8). Se confirmó que la cadena de azúcar unida a asparagina se eluye durante 30 a 80 minutos utilizando los estándares de cadena de azúcar tratados con PA fabricados por Takara Shuzo. Se calculó la proporción de cadenas de azúcar en las que las posiciones de elución en la HPLC de fase inversa se encontraban desplazadas (cadenas sacáridas eluidas entre 48 y 78 minutos) en la digestión con α -L-fucosidasa. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1

Célula productora de anticuerpos	Cadena sacárida con enlace α -1,6-fucosa (%)
YB2/0	47
NS0	73

5 Aproximadamente 47% del anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h producido por las células YB2/0 y aproximadamente 73% del anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h producido por las células NS0 eran cadenas de azúcar en las que la posición 1 de la fucosa se encontraba unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido (en adelante denominado "cadena sacárida que presenta α -1,6-fucosa"). De esta manera, la proporción de cadenas de azúcar en las que la posición 1 de la fucosa no se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido (en adelante denominada "cadena sacárida libre de α -1,6-fucosa") es superior en el anticuerpo producido por la célula YB2/0 que en el anticuerpo producido por la célula NS0.

15 3. Análisis de la composición de monosacáridos de anticuerpos con injertación de RDC anti-IL-5R α _h purificados

Las cadenas de azúcar de anticuerpos con injertación de RDC anti-IL-5R α _h producidos por células YB2/0, células NS0 y células CHO/d se hidrolizaron en monosacáridos mediante hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético y el análisis de la composición de monosacáridos se llevó a cabo utilizando BioLC (fabricado por Dionex).

20 De entre las cadenas de azúcar unidas mediante N-glucósido, hay 3 unidades de manosa en una cadena de azúcar en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante N-glucósido. En la Tabla 2 se muestra una proporción relativa de cada monosacárido obtenido estimando el número de manosas en 3.

Tabla 2

Célula productora de anticuerpos	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	Actividad ADCC (%)*
YB2/0	0,60	4,98	0,30	3,00	42,27
NS0	1,06	3,94	0,66	3,00	16,22
CHO/dhFr ⁻	0,85	3,59	0,49	3,00	25,73
CHO/dhFr ⁻	0,91	3,80	0,27	3,00	25,73
*: Concentración de anticuerpos: 0,01 μ g/ml					

Debido a que las proporciones relativas de fucosa se encontraban en el orden YB2/0 < CHO/d < NS0, la cadena de azúcar producida en el anticuerpo producido por la célula YB2/0 mostraba el contenido de fucosa más bajo, tal como también se muestra en los presentes resultados.

30 4. Análisis de cadenas de azúcar del anticuerpo producido por las células CHO/dhfr⁻

Se prepararon cadenas de azúcar tratadas con PA a partir de anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h purificado producido por las células CHO/dhfr⁻ y el análisis de HPLC de fase inversa se llevó a cabo utilizando una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu) (figura 9). En la figura 9, un tiempo de elución de 35 a 45 minutos correspondía a cadenas de azúcar que no presentaban fucosa y un tiempo de elución de entre 45 y 60 minutos correspondía a las cadenas de azúcar que presentaban fucosa. De manera similar al caso del anticuerpo producido por las células NS0 de mieloma de ratón, el anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h producido por las células CHO/dhfr⁻ presentaba un contenido de cadenas de azúcar libres de fucosa inferior que el de los anticuerpos producidos por las células YB2/0 de mieloma de rata.

Ejemplo 6

Separación del anticuerpo de actividad ADCC potente:

Se separó el anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h producido por las células YB2/0 de mieloma de rata utilizando una columna de lectina que se unía a cadenas de azúcar que presentaban fucosa. Se llevó a cabo una HPLC utilizando LC-6A fabricado por Shimadzu a un caudal de 1 ml/min. y a temperatura ambiente como la temperatura de la columna. Tras el equilibrado con tampón de Tris-sulfato 50 mM (pH 7,3), se inyectó el anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h purificado y después se eluyó mediante un gradiente lineal de densidades (60 minutos) de α -metilmanósido 0,2 M (fabricado por Nacalai Tesque). Se separó el anticuerpo con injertación de RDC anti-IL-5R α _h en fracción no adsorbida y fracción adsorbida. Al muestrear la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida y medirse su actividad de unión a IL-5R α _h, mostraron una actividad de unión similar (figura 10A). Al medir la actividad ADCC, la fracción no adsorbida mostró una potente actividad ADCC, 100 a 1.000 veces la actividad de la parte de fracción adsorbida (figura 10B). Además, se prepararon cadenas de azúcar tratadas con PA a partir de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida y se llevó a cabo el análisis de HPLC de fase

inversa utilizando una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu) (figura 11). En la fracción no adsorbida se encontraba presente principalmente un anticuerpo de unión a cadenas de azúcar libres de fucosa y en la parte de fracción adsorbida, se encontraba presente principalmente un anticuerpo de unión a cadenas de azúcar que presentaban fucosa.

Ejemplo 7

Evaluación de la actividad de anticuerpo híbrido anti-GD3 con diferentes proporciones de cadena de azúcar libre de α -1,6-fucosa:

1. Preparación de anticuerpo híbrido anti-GD3 con diferentes proporciones de cadena de azúcar libre de α -1,6-fucosa

De acuerdo con el método descrito en el ítem 2(1) del Ejemplo 1, se obtuvieron clones transformados obtenidos de las células YB2/0 capaces de producir un anticuerpo híbrido anti-GD3. Se prepararon anticuerpos a partir de los clones transformados obtenidos de células YB2/0 y se denominaron lotes 1, 2 y 3. Cada cadena de azúcar que se unía a los anticuerpos híbridos anti-GD3 de los lotes 1, 2 y 3 se analizó de acuerdo con el método del Ejemplo 11 (6) y se encontró que las proporciones de las cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa eran de 50%, 45% y 29%, respectivamente. En la presente memoria dichas muestras se denominan anticuerpo híbrido anti-GD3 (50%), anticuerpo híbrido anti-GD3 (45%) y anticuerpo híbrido anti-GD3 (29%).

Además, las cadenas de azúcar del anticuerpo híbrido anti-GD3 derivado de células CHO/DG44 preparadas en el ítem 2(2) del Ejemplo 1 se analizaron de acuerdo con el método del Ejemplo 11(6) y se encontró que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa era de 7%. En la presente memoria la muestra se denomina anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%).

Se mezcló anticuerpo híbrido anti-GD3 (45%) y anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%) en una proporción de anticuerpo híbrido GD3 (45%): anticuerpo híbrido anti-GD3 (7%) de 5:3 o de 1:7. Se analizaron las cadenas de azúcar de las muestras de acuerdo con el método del Ejemplo 10(6) y se encontró que se habían preparado muestras que presentaban una proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa de 24% y de 13% (valores calculados). En la presente memoria se denominan anticuerpo híbrido anti-GD3 (24%) y anticuerpo híbrido anti-GD3 (13%).

Los resultados del análisis de cadenas de azúcar de cada una de las muestras se muestran en la figura 12. La proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa se muestra como valor medio del resultado de dos análisis de cadenas sacárida.

2. Evaluación de la actividad de unión a GD3 (ELISA)

Las actividades de unión de los seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 con una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa preparadas en el ítem 1 del Ejemplo 7 contra GD3 (fabricado por Snow Brand Milk Products) se midieron mediante el ELISA mostrado en el ítem del Ejemplo 1. Como resultado, la totalidad de los seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 mostró prácticamente la misma actividad de unión a GD3 mostrada en la figura 13 y se encontró que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa no presentaba influencia sobre la actividad de unión a antígenos del anticuerpo.

3. Evaluación de la actividad ADCC sobre la estirpe celular de melanoma humano

Se midió la actividad ADCC de los anticuerpos híbridos anti-GD3 sobre una estirpe celular de melanoma humano G-361 (ATCC n° CRL 1424) de la manera siguiente.

(1) Preparación de suspensión de células diana

Se prepararon 1×10^6 células de una estirpe celular de melanoma humano G-361, se añadió a lo anterior un equivalente de 3,7 MBq de una sustancia radioactiva, $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora para marcar las células con el isótopo radioactivo. Tras la reacción, las células se lavaron tres veces mediante un procedimiento en suspensión en medio y la posterior centrifugación, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos en hielo para llevar a cabo la disolución espontánea de la sustancia radioactiva. Tras la centrifugación, se ajustaron las células a 2×10^5 células/ml mediante la adición de 5 ml del medio y se utilizaron como suspensión de células diana.

(2) Preparación de suspensión de células efectoras humanas

De una persona sana se recolectaron 50 ml de sangre periférica y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricada por Shimizu Pharmaceutical). Utilizando Lymphoprep (fabricado por Axis Shield), lo anterior se centrifugó (800 g, 20 minutos) siguiendo las instrucciones del fabricante, separando una capa de células mononucleares. Las células se lavaron mediante centrifugación (1.200 rpm, 5 minutos) tres veces utilizando un

medio y después se resuspendieron en el medio, proporcionando una densidad de 2×10^6 células/ml y se utilizaron como suspensión de células efectoras humanas.

(3) Medición de la actividad ADCC

5 La suspensión de células diana preparada en (1) se dispensó a razón de 50 μ l (1×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, se añadieron a lo anterior 100 μ l de la suspensión de células efectoras humanas preparada en (2) (2×10^5 células/pocillo), la proporción de células efectoras humanas a células diana alcanzó 20:1. Se añadió a lo anterior cada uno de los anticuerpos híbridos anti-GD3, proporcionando una concentración final de entre 0,0005 y 5 μ g/ml, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Tras la reacción, se centrifugó la placa y se midió la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante utilizando un contador γ . Se calculó la cantidad de ^{51}Cr liberado espontáneamente llevando a cabo el mismo procedimiento, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de células efectoras humanas y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la actividad de ADCC de los anticuerpos híbridos anti-GD3 mostrando una tendencia a incrementarse proporcionalmente a la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa a cada concentración de anticuerpo. La actividad de ADCC se redujo en el caso de que la concentración de anticuerpo fuese baja. A una concentración de anticuerpo de 0,05 μ g/ml, el anticuerpo en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa es de 24%, 29%, 45% o 50% mostraron una actividad de ADCC prácticamente igual de potente pero la actividad de ADCC fue baja en el anticuerpo (13%) o (7%) en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa es inferior a 20%. Estos resultados fueron iguales en el caso de modificación del donante de células efectoras.

20 Las figuras 14 y 15 muestran el resultado de la medición de la actividad de ADCC de los seis tipos de anticuerpo híbrido anti-GD3 que presentaban una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa a diversas concentraciones (0,0005 a 5 μ g/ml) utilizando células efectoras de dos donantes sanos (A y B), respectivamente. Tal como se muestra en las figuras 14 y 15, la actividad de ADCC de los anticuerpos híbridos anti-GD3 mostraban una tendencia a incrementarse proporcionalmente a la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa a cada concentración de anticuerpo. La actividad de ADCC se redujo en el caso de que la concentración de anticuerpo fuese baja. A una concentración de anticuerpo de 0,05 μ g/ml, el anticuerpo en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa es de 24%, 29%, 45% o 50% mostraron una actividad de ADCC prácticamente igual de potente pero la actividad de ADCC fue baja en el anticuerpo (13%) o (7%) en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa es inferior a 20%. Estos resultados fueron iguales en el caso de modificación del donante de células efectoras.

30 **Ejemplo 8**

Evaluación de la actividad de anticuerpo híbrido anti-CCR4 con diferentes proporciones de cadena de azúcar libre de α -1,6-fucosa:

35 1. Producción de células que producen establemente anticuerpo híbrido anti-CCR4

Las células que son capaces de producir establemente un anticuerpo híbrido anti-CCR4 se prepararon de la manera siguiente, utilizando el vector de expresión de tipo tándem pKANTEX2160 para un anticuerpo híbrido anti-CCR4 descrito en el documento nº WO 01/64754.

(1) Preparación de célula productora de anticuerpos utilizando la célula YB2/0 de mieloma de rata

45 Tras introducir 10 μ g del vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-CCR4 pKANTEX2160 en 4×10^6 células de YB2/0 de mieloma de rata mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 40 ml de hibridoma-SFM-FBS(5) [medio de hibridoma-SFM (fabricado por Invitrogen) que comprendía FBS al 5% (fabricado por PAA Laboratories)] y se dispensaron en 200 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Sumitomo Bakelite). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO_2 , se añadió G418 hasta una concentración de 1 mg/ml, seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó el sobrenadante de cultivo a partir de los pocillos en el que se observó crecimiento de transformantes que mostraban resistencia a G418 a partir de la formación de colonias, y se midió la actividad de unión a antígenos del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en el sobrenadante mediante ELISA, mostrado en el ítem 2 del Ejemplo 8.

55 Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en el medio hibridoma-SFM-FBS(5) que comprendía 1 mg/ml de G418 y el inhibidor de DHFR MTX 50 nM (fabricado por Sigma), proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml y la suspensión se dispensó en porciones de 1 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO_2 , se indujeron los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM. Se observó actividad de unión a antígeno del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en sobrenadantes de cultivo en pocillos en los que se observó crecimiento de los transformantes mediante el ELISA descrito en el ítem 2 del Ejemplo 8.

65 Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se observó producción del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en sobrenadantes de cultivo, se incrementó la concentración de MTX mediante el mismo método y finalmente se obtuvo un transformante capaz de crecer en medio de hibridoma-SFM-FBS(5) que comprendía MTX 200 nM y capaz de

producir el anticuerpo híbrido anti-CCR4 en una gran cantidad. El transformante obtenido se convirtió en células individuales (clonación) mediante dilución limitante dos veces y la estirpe celular clonada obtenida se denominó KM2760 nº 58-35-16. En este caso, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente pequeña del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

(2) Preparación de células productoras de anticuerpos utilizando células CHO/DG44

Tras introducir 4 μ g del vector de expresión del anticuerpo híbrido anti-CCR4 pKANTEX2160 en $1,6 \times 10^6$ células CHO/DG44 mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], las células se suspendieron en 10 ml de IMDM-dFBS(10)-HT(1) [medio IMDM (fabricado por Invitrogen) que comprendía FBS al 10% (fabricado por Invitrogen) y 1x concentración de suplemento HT (fabricado por Invitrogen)] y se dispensaron 100 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricado por Iwaki Glass). Tras cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂, se cambió el medio a IMDM-dFBS(10) (medio IMDM que comprendía 10% de FBS dializado), seguido del cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó el sobrenadante de cultivo a partir de los pocillos en el que se observó crecimiento debido a la formación de un transformante que mostraba crecimiento independiente de HT y un nivel de expresión del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en el sobrenadante mediante ELISA descrito en el ítem 2 del Ejemplo 8.

Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se había observado producción del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en los sobrenadantes de cultivo, con el fin de incrementar la cantidad de anticuerpo producido utilizando un sistema de amplificación de gen DHFR, se suspendió cada uno de ellos en el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía MTX 50 nM, proporcionando una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml, y la suspensión se dispuso a razón de 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Tras cultivarlas a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador con 5% de CO₂, se indujeron los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM. Con respecto a los transformantes en los pocillos en los que se había observado crecimiento, se incrementó la concentración de MTX a 200 nM mediante el mismo método, y finalmente se obtuvo un transformante capaz de crecer en el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía MTX 200 nM y de producir anticuerpo híbrido anti-CCR4 en gran cantidad en una gran cantidad. El transformante obtenido se denominó 5-03. En este caso, utilizando el método para determinar el producto de transcripción de un gen de α -1,6-fucosiltransferasa mostrado en el Ejemplo 9, se seleccionó una estirpe celular productora de una cantidad relativamente reducida del producto de transcripción y se utilizó como estirpe celular adecuada.

2. Actividad de unión de anticuerpo al péptido parcial de CCR4 (ELISA)

Se seleccionó el compuesto 1 (SEC ID nº 25) como péptido de la región extracelular de CCR4 humano capaz de reaccionar con el anticuerpo híbrido anti-CCR4. Con el fin de utilizarlo en la medición de actividad mediante ELISA, se preparó un conjugado con BSA (albúmina de suero bovino) (fabricado por Nacalai Tesque) mediante el método siguiente y se utilizó a modo de antígeno. Es decir, se añadieron gota a gota 100 ml de una solución en DMSO que comprendía 25 mg/ml de SMCC [éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico] (fabricado por Sigma) a 900 ml de una solución en PBS que contenía 10 mg de BSA bajo agitación con vórtex, seguido de agitación suave durante 30 minutos. Se aplicó una porción de 1 ml de la solución de reacción a una columna de filtración en gel, tal como una columna NAP-10 o similar equilibrada con 25 ml de PBS y después se eluyó con 1,5 ml de PBS y el eluido resultante se eluyó como solución de BSA-SMCC (la concentración de BSA se calculó basándose en la medición de A₂₈₀). A continuación, se añadieron 250 ml de PBS a 0,5 mg de compuesto 1 y después se disolvieron completamente mediante la adición de 250 ml de DMF, y la solución de BSA-SMCC se añadió a lo anterior bajo agitación con vórtex, seguido de agitación suave durante 3 horas. La solución de reacción se dializó frente a PBS a 4°C durante la noche, se añadió a lo anterior azida sódica, proporcionando una concentración final de 0,05% y la mezcla se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m para utilizarse como solución de BSA-compuesto 1.

Se dispuso el conjugado preparado a una concentración de 0,05 μ g/ml y a razón de 50 μ l/pocillo en una placa EIA de 96 pocillos (fabricado por Greiner) y se incubó para la adhesión a 4°C durante la noche. Tras lavar cada pocillo con PBS, se añadió a lo anterior BSA al 1%-PBS a razón de 100 μ l/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente para bloquear los grupos activos restantes. Tras lavar cada pocillo con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (en adelante denominado "Tween-PBS"), se añadió un sobrenadante de cultivo de un transformante a razón de 50 μ l/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción, se lavó cada pocillo con Tween-PBS y después una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG(γ) humana marcado con peroxidasa (fabricada por American Qualex) diluida 6000 veces con PBS-BSA al 1% se añadió a razón de 50 μ l/pocillo como anticuerpo secundario y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción y posterior lavado con Tween-PBS, la solución de sustrato ABTS se dispuso a razón de 50 μ l/pocillo para el revelado del color y 20 minutos después se detuvo la reacción mediante la adición de una solución de SDS al 5% a razón de 50 μ l/pocillo. A continuación se midió la absorbancia DO₄₁₅. El anticuerpo híbrido anti-CCR4 obtenido en el ítem 1 del Ejemplo 8 mostró la actividad de unión a CCR4.

3. Purificación de anticuerpo híbrido anti-CCR4

(1) Cultivo de célula productora de anticuerpos derivada de célula YB2/0 y purificación de anticuerpos

El clon KM2760 nº 58-35-16 de células transformantes expresantes de anticuerpo híbrido anti-CCR4 obtenido en el ítem 1(1) del Ejemplo 8 se suspendió en medio de hibridoma-SFM (fabricado por Invitrogen) que comprendía MTX 200 nM y 5% de GF21 de Daigo (fabricado por Wako Pure Chemical Industries), proporcionando una densidad de 2×10^5 células/ml y se sometió a cultivo bajo agitación por lotes alimentados utilizando una botella centrifugadora (fabricada por Iwaki Glass) en una cámara termostatazada a 37°C. Tras cultivarlo durante 8 a 10 días, se purificó el anticuerpo híbrido anti-CCR4 a partir del sobrenadante de cultivo recuperado utilizando una columna de Prosep-A (fabricada por Millipore) y la filtración en gel. El anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado se denominó KM2760-1.

(2) Cultivo de células productoras de anticuerpos derivadas de células CHO-DG44 y purificación de anticuerpos

La línea 5-03 de células transformantes productoras de anticuerpo híbrido anti-CCR4 obtenida en el ítem 1(2) del Ejemplo 8 se cultivó a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ utilizando medio IMDM-dFBS(10) en un matraz de 182 cm² (fabricado por Greiner). Tras alcanzar la densidad celular la confluencia tras varios días, se descartó el sobrenadante del cultivo y las células se lavaron con 25 ml de tampón PBS y después se mezclaron con 25 ml de medio EXCELL 301 (fabricado por JRH). Tras cultivarlas a 37°C durante 7 días en un incubador con 5% de CO₂, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-CCR4 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado se denominó KM3060.

Al medir la actividad de unión a CCR4 de KM2760-1 y KM3060 mediante ELISA, mostraron una actividad de unión equivalente.

4. Análisis de los anticuerpos híbridos anti-CCR4 purificados

Cada 4 µg de los dos tipos de anticuerpo híbrido anti-CCR4 producidos y purificados a partir de las células animales respectivas, obtenidos en el ítem 1 del presente ejemplo, se sometió a SDS-PAGE de acuerdo con el método conocido [Nature 227:680, 1970] y se analizó el peso molecular y el grado de purificación. En cada uno de los anticuerpos híbridos anti-CCR4 purificados, se encontró una única banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 150 kD bajo condiciones no reductoras y se encontraron dos bandas en aproximadamente 50 kD y aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras. Los pesos moleculares prácticamente coincidieron con los pesos moleculares deducidos de las secuencias de nucleótidos de ADNc de las cadenas H y L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 Kd; cadena L: aproximadamente 23 Kd; molécula completa: aproximadamente 144 kD) y también coincidieron con los informes que indican que el anticuerpo de tipo IgG presenta un peso molecular de aproximadamente 150 kD bajo condiciones no reductoras y resulta degradado en cadenas H con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y cadenas L que presentaban un peso molecular de aproximadamente 25 kD bajo condiciones reductoras debido al corte del enlace S-S en la molécula [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulo 14, 1988, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996], confirmando de esta manera que cada anticuerpo híbrido anti-CCR4 se había expresado y purificado en forma de molécula de anticuerpo con la estructura correcta.

5. Preparación de anticuerpo híbrido anti-CCR4 con diferentes proporciones de cadena de azúcar libre de α-1,6-fucosa

Se analizaron las cadenas de azúcar que se unían al anticuerpo híbrido anti-CCR4 KM2760-1 obtenido de células YB2/0 preparadas en el ítem 3(1) del Ejemplo 8 y al anticuerpo híbrido anti-CCR4 KM3060 obtenido de células CHO/DG44 preparadas en el ítem 3(2) del Ejemplo 2 de acuerdo con el método del Ejemplo 10(6). La proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa era de 87% y 8% en KM2760 y KM3060, respectivamente. En la presente memoria las muestras se denominan anticuerpo híbrido anti-CCR4 (87%) y anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%).

Se mezcló anticuerpo híbrido anti-CCR4 (87%) y anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%) en una proporción de anticuerpo híbrido anti-CCR4 (87%): anticuerpo híbrido anti-CCR4 (8%) = 1: 39, 16 : 67, 22 : 57, 32 : 47 ó 42: 37. Se analizaron las cadenas de azúcar de dichas muestras de acuerdo con el método del Ejemplo 10(6). La proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa era de 9%, 18%, 27%, 39% y 46%, respectivamente. En la presente memoria dichas muestras se denominan anticuerpo híbrido anti-CCR4 (9%), anticuerpo híbrido anti-CCR4 (18%), anticuerpo híbrido anti-CCR4 (27%), anticuerpo híbrido anti-CCR4 (39%) y anticuerpo híbrido anti-CCR4 (46%).

Los resultados del análisis de cadenas de azúcar de cada una de las muestras se muestran en la figura 16. La proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa se muestra como valor medio del resultado de dos análisis de cadenas sacárida.

6. Evaluación de la actividad de unión al péptido parcial de CCR4 (ELISA)

La actividad de unión de los seis tipos diferentes de anticuerpo híbrido anti-CCR4 que presentaban una cadena de azúcar libre de α-1,6-fucosa diferente preparada en el ítem 5 del Ejemplo 8 a péptido parcial de CCR4 se midió de

acuerdo con el método descrito en el ítem 2 del Ejemplo 8.

Como resultado, tal como se muestra en la figura 17, los seis tipos de anticuerpo híbrido anti-CCR4 mostraron prácticamente la misma actividad de unión a CCR4 y se encontró que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa no presentaba ninguna influencia sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo.

7. Evaluación de la actividad ADCC sobre la estirpe celular humana de nivel elevado de expresión de CCR4

La actividad de ADCC de los anticuerpos híbridos anti-CCR4 contra una célula humana CCR4/EL-4 de alto nivel de expresión de CCR4 (documento nº WO 01/64754) se midió de la manera siguiente.

(1) Preparación de suspensión de células diana

Se prepararon células ($1,5 \times 10^6$) de una célula expresante de CCR4 humanas, células CCR4/EL-4, descritas en el documento nº WO 01/64754, y se añadió a las mismas 5,55 MBq equivalentes de una sustancia radioactiva $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, seguido de la reacción a 37°C durante 1,5 horas, para marcar de esta manera las células con un isótopo radioactivo. Tras la reacción, las células se lavaron tres veces mediante suspensión en medio y la posterior centrifugación, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos en hielo para llevar a cabo la disolución espontánea de la sustancia radioactiva. Tras la centrifugación, se ajustaron las células a 2×10^5 células/ml mediante la adición de 7,5 ml del medio y se utilizaron como suspensión de células diana.

(2) Preparación de suspensión de células efectoras humanas

De una persona sana se extrajeron 60 ml de sangre periférica y se añadieron 0,6 ml de heparina sodio (fabricada por Shimizu Pharmaceutical), seguido de la mezcla suave. La mezcla se centrifugó (800 g, 20 minutos) para aislar una capa de células mononucleares utilizando Lymphoprep (fabricado por Axis Shield) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron mediante centrifugación (1.400 rpm, 5 minutos) tres veces utilizando un medio y después se resuspendieron en el medio, proporcionando una densidad de 5×10^6 células/ml y se utilizaron como suspensión de células efectoras humanas.

(3) Medición de la actividad ADCC

La suspensión de células diana preparada en (1) se dispensó a razón de 50 μl (1×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, se añadieron a lo anterior 100 μl de la suspensión de células efectoras humanas preparada en (2) (2×10^5 células/pocillo, la proporción de células efectoras humanas a células diana alcanzó 50:1). 1). Además, se añadió a lo anterior cada uno de los anticuerpos híbridos anti-CCR4, proporcionando una concentración final de entre 0,0001 y 10 $\mu\text{g/ml}$, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Tras la reacción, se centrifugó la placa y se midió la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante utilizando un contador γ . Se calculó la cantidad de ^{51}Cr liberado espontáneamente llevando a cabo el mismo procedimiento, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de células efectoras humanas y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la cantidad de ^{51}Cr disociado total llevando a cabo el mismo procedimiento, utilizando 1 mol/l de solución de ácido clorhídrico en lugar de la solución de anticuerpo y la suspensión de células efectoras humanas y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la actividad ADCC (%) utilizando la ecuación (II).

Las figuras 18 y 19 muestran el resultado de la medición de la actividad de ADCC de los anticuerpos híbrido anti-CCR4 que presentaban una proporción diferente de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa a diversas concentraciones (0,001 a 10 $\mu\text{g/ml}$) utilizando células efectoras de dos donantes sanos (A y B), respectivamente. Tal como se muestra en las figuras 18 y 19, la actividad de ADCC de los anticuerpos híbridos anti-CCR4 mostraban una tendencia a incrementarse proporcionalmente a la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa a cada concentración de anticuerpo. La actividad de ADCC se redujo en el caso de que la concentración de anticuerpo fuese baja. A una concentración de anticuerpo de 0,01 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa es de 27%, 39% o 46% mostraron una actividad de ADCC prácticamente igual de potente pero la actividad de ADCC fue baja en el anticuerpo en el que la proporción de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa era inferior a 20%. Estos resultados fueron iguales en el caso de que se cambiase el donante de las células efectoras.

Ejemplo 9

Determinación del producto de transcripción del gen α -1,6-fucosiltransferasa en la estirpe celular huésped:

(1) Preparación de ADNc de cadena sencilla a partir de diversas estirpes celulares

Se prepararon muestras de ADNc de cadena sencilla a partir de células CHO/DG44 con delección del gen dihidrofolato reductasa (dhfr) obtenidas de células de ovario de hámster chino y YB2/0 de mieloma de rata mediante el procedimiento a continuación.

Las células CHO/DG44 se suspendieron en medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) y 1x concentración de complemento HT (fabricado por Life Technologies) y se inocularon 15 ml de la suspensión en matraz T75 para la utilización en cultivo celular adherente (fabricado por Greiner) a una densidad de 2×10^5 células/ml. Además, las células YB2/0 se suspendieron en medio RPMI1640 (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) y L-GLN 4 mmoles/l (fabricado por Life Technologies) y se inocularon 15 ml de la suspensión en matraz T75 para el cultivo celular de suspensión (fabricado por Greiner) a una densidad de 2×10^5 células/ml. Se cultivaron a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ y se recuperaron 1×10^7 de las células hospedadoras respectivas en el primer, 2º, 3º, 4º y 5º días del cultivo para extraer el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total se disolvió en 45 µl de agua estéril, se añadió a lo anterior 1 µl de ADNasa libre de ADNasa RQ1 (fabricado por Promega), 5 µl de 10x tampón de ADNasa adjunto y 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), seguido de la reacción a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico contaminante en la muestra. Tras la reacción, se purificó nuevamente el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 50 µl de agua estéril.

En 20 µl de la mezcla de reacción utilizando oligo(dT) como cebador, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 3 µg de cada una de las muestras de ARN total obtenidas mediante reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de preamplificación Superscript™ para la síntesis del ADNc de primera cadena (fabricado por Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una solución de 1x concentración de la solución de reacción para la clonación de α-1,6-fucosiltransferasa (en adelante denominada en ocasiones "FUT8") y β-actina derivada de las células hospedadoras respectivas y solución acuosa diluida 50 veces de la solución de reacción para la determinación de cada nivel de transcripción génica mediante PCR competitiva y las soluciones se almacenaron a -80°C hasta la utilización de las mismas.

(2) Preparación de fragmentos parciales de ADNc de FUT8 de hámster chino y FUT8 de rata

Se preparó cada fragmento parcial de ADNc de FUT8 de hámster chino y FUT8 de rata mediante el procedimiento siguiente (figura 20).

En primer lugar, se diseñaron cebadores (mostrados en la SEC ID nº 4 y nº 5) específicos para las secuencias de nucleótidos comunes al ADNc de FUT8 humano [J. Biochem. 121:626, 1997] y ADNc de FUT8 porcino [J. Biol. Chem. 271:27810, 1995].

A continuación, 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP y 0,5 µmmoles/l de cebadores específicos de gen (SEC ID nº 4 y nº 5)] que contenían 1 µl de cada uno de los ADNc preparados a partir de células CHO y ADNc preparado a partir de células YB2/0, ambos obtenidos en el ítem (1) 2 días después del cultivo, y se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricado por Takara Shuzo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo, y calentamiento final a 72°C durante 10 minutos.

Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y un fragmento amplificado específico de 979 pb se purificó utilizando el kit GeneClean Spin (fabricado por Bio 101) y se eluyó con 10 µl de agua estéril (en adelante el método se utiliza para la purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa). En un plásmido pCR2.1, se utilizaron 4 µl del fragmento amplificado para la inserción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) y se transformó *E. coli* XL1-blue con la solución de reacción mediante el método de Cohen *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, 1972] (en adelante el método se utiliza para la transformación de *E. coli*). Se aislaron muestras de ADN plasmídico siguiendo un método conocido [Nucleic Acids Research 7:1513, 1979] (en adelante se utilizó el método para el aislamiento de plásmido) a partir de 6 clones con ADNc insertado de entre las colonias resistente a canamicina obtenidas.

La secuencia de nucleótidos de cada ADNc insertado en el plásmido se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó que la totalidad de los ADNc insertados de los que se determinaron la secuencia mediante el método codificaban las secuencias parciales del marco de lectura abierta (ORF, según sus siglas en inglés) de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata (mostrados en SEC ID nº 6 y nº 7). Entre ellos, se seleccionaron muestras de ADN plasmídico que no contenía ningún error en absoluto mediante PCR en las secuencias. En la presente memoria dichos plásmidos se denominan CHFUT8-pCR2.1 y YBFUT8-pCR2.1.

(3) Preparación de ADNc de β-actina de hámster chino y de β-actina de rata

Se preparó ADNc de β-actina de hámster chino y de β-actina de rata mediante el procedimiento a continuación

(figura 21).

En primer lugar, se diseñó un cebador directo específico para una secuencia común que contiene un codón de inicio de la traducción (mostrado en SEC ID nº 8) y cebadores inversos específicos para las secuencias respectivas que contienen un codón de terminación de la traducción (mostrado en las SEC ID nº 9 y nº 10) a partir de secuencias genómicas de β -actina de hámster chino (GenBank, nº U20114) y de β -actina de rata [Nucleic Acids Research 11:1759, 1983].

A continuación, 25 μ l de una solución de reacción [tampón KOD nº 1 (fabricado por Toyobo), 0,2 mmoles/l de dNTP y $MgCl_2$ 1 mmol/l, 0,4 μ moles/l de cebadores específicos de gen (SEC ID nº 8 y nº 9 o SEC ID nº 8 y nº 10) y DMSO al 5%] que contenían 1 μ l de cada uno de los ADNc preparados a partir de células CHO y ADNc preparado a partir de células YB2/0, ambos obtenidos en el ítem (1) 2 días después del cultivo, y se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa KOD (fabricado por Toyobo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 1 minuto y posteriores 25 ciclos de calentamiento a 98°C durante 15 segundos, 65°C durante 2 segundos y 74°C durante 30 segundos en un ciclo.

Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento amplificado específico de 1.128 pb. El fragmento de ADN se sometió a fosforilación 5'-terminal del ADN utilizando Megalabel (fabricado por Takara Shuzo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recuperó el fragmento de ADN a partir de la solución de reacción utilizando el método de precipitación con etanol y se disolvió en 10 μ l de agua estéril.

Separadamente se disolvieron 3 μ g de plásmido pBluescript II KS(+) (fabricado por Stratagene) en 35 μ l de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 16 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por Takara Shuzo) para la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. A la solución de reacción se añadieron 35 μ l de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,5 μ l de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 30 minutos para desfosforilar de esta manera el extremo del ADN. La solución de reacción se extrajo con fenol/cloroformo, seguido de la precipitación con etanol y el fragmento de ADN recuperado se disolvió en 100 μ l de agua estéril.

Cada 4 μ l de fragmento amplificado preparado a partir de ADNc de hámster chino o de fragmento amplificado (1.192 pb) preparado a partir de ADNc de rata se mezclaron con 1 μ l del fragmento EcoRV-EcoRV (aproximadamente 3,0 kb) preparado a partir del plásmido pBluescript II KS(+) y 5 μ l de Ligation High (fabricado por Toyobo) para la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Utilizando la solución de reacción se transformó *E. coli* XL1-Blue y se aislaron las muestras de ADN plasmídico respectivas de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos.

La secuencia de nucleótidos de cada ADNc insertado en el plásmido se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó que la totalidad de los ADNc insertados de los que se habían determinado las secuencias mediante el método codificaban las secuencias completas de ORF de la β -actina de hámster chino o de β -actina de rata. Entre ellos, se seleccionaron muestras de ADN plasmídico que no contenía ningún error en absoluto mediante PCR en las secuencias. En la presente memoria, los plásmidos se denominan CHAc-pBS e YBac-pBS.

(4) Preparación de estándar de FUT8 y control interno

Con el fin de medir el nivel de transcripción de ARNm del gen de FUT8 en cada célula, como plásmidos, CHFT8-pCR2.1 o YBFT8-pCR2.1, en los que los fragmentos parciales de ADNc preparados en el ítem (2) de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata, respectivamente, se digirieron con el enzima de restricción EcoRI, y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándares para la preparación de una curva de calibración. CHFT8d-pCR2.1 e YBFT8d-pCR2.1, obtenidos de CHFT8-pCR2.1 e YBFT8-pCR2.1, mediante la delección de 203 pb entre Scal e HindIII, una secuencia de nucleótidos interna de FUT8 de hámster chino y FUT8 de rata, respectivamente, se digirieron con el enzima de restricción EcoRI y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándares internos para la determinación de la cantidad de FUT8. Los detalles de los mismos se proporcionan a continuación.

Se prepararon los estándares de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata de la manera siguiente. En 40 μ l de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs), se disolvieron 2 μ g del plásmido CHFT8-pCR2.1 y se añadieron 24 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Separadamente, se disolvieron 2 μ g de plásmido YBFT8-pCR2.1 en 40 μ l de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 24 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Sometiendo una porción de cada una de las soluciones de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% se confirmó que un fragmento EcoRI-EcoRI (aproximadamente 1 kb) que contenía cada uno de los fragmentos parciales de ADNc de FUT8 de hámster chino y FUT8 de rata se había separado de los plásmidos CHFT8-pCR2.1 e YBFT8-pCR2.1 mediante las reacciones de digestión con enzima de restricción. Se diluyó cada una de las soluciones de reacción con 1 μ g/ml de ARNt de

levadura de panadería (fabricada por Sigma), proporcionando concentraciones de 0,02 fg/μl, 0,2 fg/μl, 1 fg/μl, 2 fg/μl, 10 fg/μl, 20 fg/μl y 100 fg/μl y se utilizó como estándares de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata.

5 Se prepararon los estándares internos de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata de la manera siguiente (figura 22). Se preparó una solución de reacción [tampón KOD nº 1 (fabricado por Toyobo), 0,2 mmoles/l de dNTP, MgCl₂ 1 mmol/l, cebadores específicos génicos 0,4 μmoles/l (SEC ID nº 11 y nº 12) y DMSO al 5%] que contenía 5 ng de CHFT8-pCR2.1 o YBFT8-pCR2.1 y se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa KOD (fabricado por Toyobo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 4 minutos y los posteriores 25 ciclos de calentamiento a 98°C durante 15 segundos, 65°C durante 2 segundos y 74°C durante 30 segundos en un ciclo. Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento amplificado específico de aproximadamente 4,7 kb. El extremo 5'-terminal de ADN se fosforiló utilizando Megalabel (fabricado por Takara Shuzo) siguiendo las instrucciones del fabricante y después se recuperó el fragmento de ADN a partir de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 50 μl de agua estéril. Se mezcló el fragmento de ADN obtenido (5 μl, aproximadamente 4,7 kb) y 5 μl de Ligation High (fabricado por Toyobo), seguido de una reacción de autociclización a 16°C durante 30 minutos.

20 Utilizando la solución de reacción se transformó *E. coli* DH5α y se aislaron las muestras de ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. La secuencia de nucleótidos de cada ADN plasmídico se determinó utilizando un aparato DNA Sequencer 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) y se confirmó que se había deletado una secuencia de nucleótidos interna de 203 pb entre ScaI e HindIII de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata. Los plásmidos obtenidos se denominaron CHFT8d-pCR2.1 o YBFT8d-pCR2.1, respectivamente.

25 A continuación, se disolvieron 2 μg de plásmido CHFT8d-pCR2.1 en 40 μl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 24 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Separadamente, se disolvieron 2 μg de plásmido YBFT8d-pCR2.1 en 40 μl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 24 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Una parte de cada una de las soluciones de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% se confirmó que un fragmento EcoRI-EcoRI (aproximadamente 800 pb) que contenía un fragmento del que se habían deletado 203 pb de las secuencias de nucleótidos internas de los fragmentos parciales de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata, se separó de los plásmidos CHFT8d-pCR2.1 o YBFT8d-pCR2.1 mediante reacciones de digestión con enzima de restricción. Se prepararon diluciones de 2 fg/μl a partir de las soluciones de reacción utilizando 1 μg/ml de ARNt de levadura de panadería (fabricada por Sigma) y se utilizó como controles internos de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata.

(5) Preparación de estándar de β-actina y control interno

40 Con el fin de medir el nivel de transcripción del ARNm del gen β-actina en diversas células hospedadoras, los plásmidos CHAc-pBS e YBac-pBS, en los que la longitud completa del ORF de cada ADNc de β-actina de hámster chino y β-actina de rata preparado en el ítem (3) se habían insertado en pBluescript II KS(+), respectivamente, se digirieron con los enzimas de restricción HindIII y PstI y los enzimas de restricción HindIII y KpnI, respectivamente, y los ADN lineales digeridos se utilizaron como estándares para la preparación de una curva de calibración. CHAc-d-pBS e YBac-d-pBS, obtenidos de CHAc-pBS e YBac-pBS, mediante la deletación de 180 pb entre DraIII y DraIII de una secuencia de nucleótidos interna de β-actina de hámster chino y de β-actina de rata se digirieron con los enzimas de restricción HindIII y PstI y los enzimas de restricción HindIII y KpnI, respectivamente, y los ADN lineales digeridos se utilizaron como estándares internos para la determinación de la cantidad de β-actina. Los detalles de los mismos se proporcionan a continuación.

50 Se prepararon los estándares de β-actina de hámster chino y de β-actina de rata de la manera siguiente. En 40 μl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs), se disolvieron 2 μg del plásmido CHAc-pBS y se añadieron 25 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) y 20 unidades de PstI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Separadamente se disolvieron 2 μg del plásmido YBac-pBS en 40 μl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron a lo anterior 25 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) y 25 unidades de KpnI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Una parte de cada una de las soluciones de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se confirmó que se separaba un fragmento HindIII-PstI y un fragmento HindIII-KpnI (de aproximadamente 1,2 kb) que contenía el ORF de longitud completa de cada ADNc de la β-actina de hámster chino y de la β-actina de rata, a partir de los plásmidos CHAc-pBS e YBac-pBS mediante las reacciones de digestión con los enzimas de restricción. Se diluyó cada una de las soluciones de reacción con 1 μg/ml de ARNt de levadura de panadería (fabricada por Sigma), proporcionando concentraciones de 2 pg/μl, 1 pg/μl, 200 fg/μl, 100 fg/μl y 20 fg/μl y se utilizaron como estándares de β-actina de hámster chino y/o de β-actina.

65 Se prepararon los estándares internos de β-actina de hámster chino y de β-actina de rata de la manera siguiente

(figura 23). En 100 μ l de NEBuffer 3 (fabricado por New England Biolabs), que contenía 100 ng/ μ l, 1 pg/ μ l, 200 fg/ μ l, 100 fg/ μ l and 20 fg/ μ l I de BSA (fabricado por New England Biolabs), se disolvieron 2 μ g del plásmido CHAc-pBS y se añadieron 10 unidades del enzima de restricción DraIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Se recuperaron fragmentos de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se convirtieron los extremos de ADN en extremos romos utilizando el kit de generación de extremos romos de ADN (fabricado por Takara Shuzo) siguiendo las instrucciones del fabricante y después se dividió la solución de reacción en dos partes iguales. En primer lugar, a una parte de la solución de reacción se añadieron 35 μ l de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,5 μ l de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 30 minutos para desfosforilar los extremos del ADN. El fragmento de ADN se recuperó llevando a cabo el tratamiento de desfosforilación, el tratamiento de extracción con fenol/cloroformo y el tratamiento de precipitación con etanol y después se disolvió en 10 μ l de agua estéril. La parte restante de la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kb que contenía el fragmento parcial de ORF de la β -actina de hámster chino.

Se mezcló el fragmento DraIII-DraIII desfosforilado (4,5 μ l), 4,5 μ l del fragmento DraIII-DraIII de aproximadamente 1,1 kb y 5 μ l de Ligation High (fabricado por Toyobo), seguido de una reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Utilizando la solución de reacción se transformó *E. coli* DH5 α y se aislaron los ADN plasmídicos de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. La secuencia de nucleótidos de cada ADN plasmídico se determinó utilizando un aparato DNA Sequencer 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) y se confirmó que se había delecionado una secuencia DraIII-DraIII de la β -actina de hámster chino de 180 pb insertada en el plásmido. El plásmido se denominó CHAc-pBS.

Además, se preparó un plásmido en el que se había delecionado un fragmento DraIII-DraIII de 180 pb de la β -actina de rata mediante las mismas etapas de CHAc-pBS. El plásmido se denominó YBAc-pBS.

A continuación, se disolvieron 2 μ g del plásmido CHAc-pBS en 40 μ l de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron a lo anterior 25 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) y 20 unidades de PstI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Separadamente se disolvieron 2 μ g del plásmido YBAc-pBS en 40 μ l de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron a lo anterior 25 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) y 24 unidades de KpnI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 3 horas. Una parte de cada una de las soluciones de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se confirmó que había separado un fragmento HindIII-PstI y un fragmento HindIII-KpnI (de aproximadamente 1,0 kb) que contenía un fragmento en el que se había delecionado la secuencia de nucleótidos interna de 180 pb del ORF de longitud completa de cada ADNc de β -actina de hámster chino y de β -actina de rata, de los plásmidos CHAc-pBS e YBAc-pBS mediante las reacciones de digestión con los enzimas de restricción. Se prepararon diluciones de 200 fg/ μ l a partir de las soluciones de reacción utilizando 1 μ g/ml de ARNt de levadura de panadería (fabricada por Sigma) y se utilizaron como controles internos de β -actina de hámster chino y de β -actina de rata.

(6) Determinación del nivel de transcripción mediante PCR competitiva

Se llevó a cabo una PCR competitiva utilizando el ADN de control interno de FUT8 preparado en el ítem (4) y el ADNc derivado de la célula hospedadora obtenido en el ítem (1) como moldes, el valor determinado del producto de transcripción FUT8 en la línea de células hospedadoras se calculó a partir del valor relativo de la cantidad de producto amplificado obtenido de cada molde. Por otra parte, debido a que se considera que el gen β -actina se transcribe continuamente en cada célula y su nivel de transcripción es aproximadamente el mismo en las células, se determinó el nivel de transcripción del gen β -actina como medida de la eficiencia de la reacción de síntesis del ADNc en cada línea de células hospedadoras. Es decir, se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN de control interno de β -actina preparado en el ítem (5) y el ADNc derivado de la célula hospedadora obtenido en el ítem (1) como moldes, el valor determinado del producto de transcripción de β -actina en la línea de células hospedadoras se calculó a partir del valor relativo de la cantidad de producto amplificado obtenido de cada molde. Los detalles de los mismos se proporcionan a continuación.

Se determinó el producto de transcripción de FUT8 mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se diseñó un grupo de cebadores específicos de secuencia (mostrado en las SEC ID n° 13 y n° 14) comunes a las secuencias internas de las secuencias parciales de ORF de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata obtenidos en el ítem (2).

A continuación, se llevó a cabo la PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 μ l de volumen total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricada por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP, 0,5 μ moles/l de cebadores específicos de gen (SEC ID n° 13 y n° 14) y DMSO al 5%] que contenía 5 μ l de solución de ADNc diluida 50 veces, preparada a partir de cada una de las líneas de células hospedadoras respectivas en el ítem (1) y 5 μ l (10 fg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 32 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo.

Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 5 µl (0,1 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg, 50 fg, 100 fg, 500 fg o 1 pg) del plásmido de estándar de FUT8 obtenido en el ítem (4) en lugar de cada ADNc derivado de línea de célula hospedadora y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de FUT8.

Se determinó el producto de transcripción de β-actina mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se diseñaron dos juegos de los cebadores específicos de gen respectivos comunes a las secuencias internas de las longitudes completas de ORF de la β-actina de hámster chino y la β-actina de rata obtenidos en el ítem (3) (se muestran los primeros en las SEC ID nº 15 y nº 16, y los segundos se muestran en las SEC ID nº 17 y nº 18).

A continuación, se llevó a cabo la PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 µl de volumen total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP, 0,5 µmoles/l de cebadores específicos de gen (SEC ID nº 15 y nº 16 o SEC ID nº 17 y nº 18) y DMSO al 5%] que contenía 5 µl de solución de ADNc diluida 50 veces, preparada a partir de las líneas de célula hospedadora respectivas en el ítem (1) y 5 µl (1 pg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 17 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo.

Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 5 µl (10 pg, 5 pg, 1 pg, 500 fg o 100 fg) del plásmido de estándar de β-actina obtenido en el ítem (5) en lugar de cada ADNc derivado de línea de célula hospedadora y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de β-actina.

Tabla 3

Gen diana	Juego de cebadores	Tamaño (pb) del producto de amplificación de PCR	
		Diana	Competidor
FUT8	F: 5'-GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3'	638	431
	R: 5'-CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'		
β-Actina (hámster chino)	F: 5'-GATATCGCTGCGCTCGTTGTGCGAC-3'	789	609
	R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'		
β-Actina (Rata)	F: 5'-GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3'	789	609
	R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAAGAGGC-3'		

* F: cebador directo, R: cebador inverso

Mediante la realización de la PCR con el juego de cebadores indicado en la Tabla 3 puede amplificarse un fragmento de ADN que presenta el tamaño mostrado en la columna de dianas de la Tabla 3 a partir de cada producto de transcripción génica y cada estándar y puede amplificarse un fragmento de ADN que presenta un tamaño mostrado en la columna de competidores de la Tabla 3 a partir de cada control interno.

Se sometió una porción de 7 µl de cada una de las soluciones tras la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1,75% y después se tiñó el gel sumergiéndolo durante 30 minutos a concentración 1x de tinción de gel de ácidos nucleicos SYBR Verde I (fabricada por Molecular Probes). La cantidad de fragmento de ADN amplificado se midió mediante el cálculo de la intensidad de luminiscencia de cada ADN amplificado utilizando un aparato Fluoro-imager (FluorImager SI, fabricado por Molecular Dynamics).

La cantidad de producto amplificado formado mediante PCR utilizando un plásmido estándar como molde se midió mediante el método, y se preparó una curva de calibración representando gráficamente los valores medidos frente a las cantidades de plásmido estándar. Utilizando la curva de calibración se calculó la cantidad de ADNc de un gen de interés en cada estirpe celular a partir de la cantidad de producto amplificado al utilizar como molde cada ADNc derivado de estirpe celular de expresión, y se definió la cantidad como el nivel de transcripción de ARNm en cada estirpe celular.

La cantidad de producto de transcripción FUT8 en cada estirpe celular huésped al utilizar una secuencia de FUT8 de rata en el estándar y el control interno se muestra en la figura 24. Durante todo el periodo de cultivo la línea de células CHO mostró un nivel de transcripción 10 veces o más superior al de la estirpe celular YB2/0. También se observó la tendencia al utilizar una secuencia de FUT8 de hámster chino en el estándar y el control interno.

Además, se muestran los niveles de transcripción de FUT8 en la Tabla 4 como valores relativos respecto a la cantidad de producto de transcripción de β -actina. Durante todo el periodo de cultivo el nivel de transcripción de FUT8 en la línea de células YB2/0 era de aproximadamente 0,1% el de la β -actina, mientras que era de 0,5% a 2% en la línea de células CHO.

5 Los resultados muestran que la cantidad de producto de transcripción de FUT8 en la línea de células YB2/0 era significativamente inferior que la observada en la línea de células CHO.

Tabla 4

Línea celular	Días de cultivo				
	1º	2º	3º	4º	5º
CHO	1,95	0,90	0,57	0,52	0,54
YB2/0	0,12	0,11	0,14	0,08	0,07

Ejemplo 10

Determinación del producto de transcripción del gen α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) en la estirpe celular productora de anticuerpos híbridos anti-gangliósido GD3:

(1) Preparación de ADNc de cadena sencilla a partir de diversas estirpes celulares productoras de anticuerpos

Se preparó ADNc de cadena sencilla a partir de las estirpes celulares DCHI01-20 y 61-33 productoras de anticuerpo híbrido anti-gangliósido GD3 de la manera siguiente. La DCHI01-20 es un clon transformante derivado de las células CHO/DG44 descritas en el ítem 2(2) del Ejemplo 1. Además, 61-33 es un clon obtenido llevando a cabo la adaptación sin suero de las células transformantes 7-9-51 derivadas de YB2/0 (FERM nº BP-6691, depósito internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) y llevando a cabo después el aislamiento de células individuales mediante dos diluciones limitantes.

Las células DCHI01-20 se suspendieron en medio EXCELL 302 (fabricado por Jrh Biosciences) complementado con 3 mmoles/l de L-GLN (fabricado por Life Technologies) y Pluronic F-68 al 0,3% (fabricado por Life Technologies) y concentrado de ácidos grasos al 0,5% (fabricado por Life Technologies) y se inocularon 15 ml de la suspensión en un matraz T75 para el cultivo celular de suspensión (fabricado por Greiner) a una densidad de 2×10^5 células/ml. Además, las células 61-33 se suspendieron en medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con fracción V de suero de feto bovino al 0,2% (fabricado por Life Technologies) (en adelante denominado "BSA") y se inocularon 15 ml de la suspensión en matraz T75 para el cultivo celular en suspensión (fabricado por Greiner) a una densidad de 2×10^5 células/ml. Se cultivaron a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ y se recuperaron 1×10^7 de las células hospedadoras respectivas en el día 1, 2, 3, 4 y 5 después del cultivo para extraer el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total se disolvió en 45 μ l de agua estéril y se añadió a lo anterior 1 μ l de ADNasa libre de ARNasa RQ1 (fabricado por Promega), 5 μ l del tampón 10x de ADNasa adjunto y 0,5 μ l de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), seguido de la reacción a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico contaminante en la muestra. Tras la reacción, se purificó nuevamente el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 50 μ l de agua estéril.

En 20 μ l de la mezcla de reacción utilizando oligo(dT) como cebador, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 3 μ g de cada una de las muestras de ARN total obtenidas mediante reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de preamplificación SuperscriptTM para la síntesis del ADNc de primera cadena (fabricado por Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de reacción se diluyó 50 veces con agua y se almacenó a -80°C hasta la utilización.

(2) Determinación del nivel de transcripción de cada gen mediante PCR competitiva

Se determinó el nivel de transcripción de los genes en el ADNc derivado de la estirpe celular productora de anticuerpos obtenida en el ítem (1) mediante PCR competitiva de acuerdo con el Ejemplo 9(6).

Se determinó el nivel de transcripción de ARNm derivado de gen de FUT8 en cada una de las estirpes celulares productoras de anticuerpos mediante el procedimiento a continuación.

CHFT8-pCR2.1 e YBFT8-pCR2.1, como plásmidos en los que los fragmentos parciales de ADNc preparados en el Ejemplo 9(2) de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata, respectivamente, insertados en pCR2.1 fueron digeridos con el enzima de restricción EcoRI, y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándares para la preparación de una curva de calibración para determinar el nivel de transcripción de FUT8.

CHFT8d-pCR2.1 e YBFT8d-pCR2.1, obtenidos mediante la delección de 203 pb entre Scal e HindIII de una secuencia de nucleótidos interna de FUT8 de hámster chino y FUT8 de rata, respectivamente, en el Ejemplo 9(4) se digirieron con el enzima de restricción EcoRI y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándares internos para la determinación de la cantidad de FUT8.

5 Se llevó a cabo la PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 μ l de volumen total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP, 0,5 μ moles/l de cebadores específicos de gen de FUT8 (SEC ID n° 13 y n° 14) y DMSO al 5%] que contenía 5 μ l de solución de ADNc diluida 50 veces, preparada a partir de cada una de las líneas de células hospedadoras productoras de anticuerpos en el ítem (1) y 5 μ l (10 fg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 32 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo.

15 Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 5 μ l (0,1 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg, 50 fg, 100 fg, 500 fg o 1 pg) del plásmido de estándar de FUT8 en lugar de cada ADNc derivado de línea de célula hospedadora productora de anticuerpos y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de FUT8. En este caso, se utilizó 1 μ g/ml de un ARNt de levadura de panadería (fabricado por Sigma) para la dilución del plásmido estándar.

20 Por otra parte, debido a que se considera que el gen β -actina se transcribe de manera constante en cada célula y su nivel de transcripción es aproximadamente el mismo en las células, se determinó el nivel de transcripción del gen β -actina como índice de la eficiencia de la reacción de síntesis del ADNc en cada línea de células productora de anticuerpos.

25 CHAc-pBS e YBAC-pBS como plásmidos en los que la longitud completa del ORF de cada ADNc de β -actina de hámster chino y β -actina de rata preparadas en el Ejemplo 9(3) insertados en pBluescript II KS(+), respectivamente, fueron digeridos con los enzimas de restricción HindIII y KpnI, y las muestras de ADN lineal obtenidas se utilizaron como estándares en la preparación de una curva de calibración para determinar el nivel de transcripción de β -actina.

30 CHAc-d-pBS e YBAC-d-pBS, obtenidos mediante la delección de 180 pb entre Dral y Dral de una secuencia de nucleótidos interna de β -actina de hámster chino y β -actina de rata, respectivamente, en el Ejemplo 9(5) se digirieron con los enzimas de restricción HindIII y KpnI, y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándares internos para la determinación de β -actina.

35 Se llevó a cabo la PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 μ l de volumen total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP, 0,5 μ moles/l de cebadores específicos de gen de β -actina (SEC ID n° 17 y n° 18) y DMSO al 5%] que contenía 5 μ l de solución de ADNc diluida 50 veces, preparada a partir de cada una de las líneas de células hospedadoras productoras de anticuerpos y 5 μ l (1 pg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 17 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo. Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 10 pg, 5 pg, 1 pg, 500 fg o 100 fg) del plásmido de estándar de β -actina en lugar de cada ADNc derivado de línea de célula hospedadora productora de anticuerpos y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de β -actina. En este caso, se utilizó 1 μ g/ml de un ARNt de levadura de panadería (fabricado por Sigma) para la dilución del plásmido estándar.

50 Mediante la realización de la PCR con el juego de cebadores indicado en la Tabla 3 puede amplificarse un fragmento de ADN que presenta el tamaño mostrado en la columna de dianas de la Tabla 3 a partir de cada producto de transcripción génica y cada estándar y puede amplificarse un fragmento de ADN que presenta un tamaño mostrado en la columna de competidores de la Tabla 3 a partir de cada control interno.

55 Se sometió una porción de 7 μ l de cada una de las soluciones tras la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1,75% y después se tiñó el gel sumergiéndolo durante 30 minutos a una concentración 1x de tinción de gel de ácidos nucleicos SYBR Verde I (fabricada por Molecular Probes). La cantidad de fragmento de ADN amplificado se midió mediante el cálculo de la intensidad de luminiscencia de cada ADN amplificado utilizando un aparato Fluoroimager (FluoroImager SI, fabricado por Molecular Dynamics).

60 La cantidad de producto amplificado formado mediante PCR utilizando un plásmido estándar como molde se midió mediante el método, y se preparó una curva de calibración representando gráficamente los valores medidos frente a las cantidades de plásmido estándar. Utilizando la curva de calibración se calculó la cantidad de ADNc de un gen de interés en cada estirpe celular a partir de la cantidad de producto amplificado al utilizar como molde cada ADNc derivado de estirpe celular productora de anticuerpos, y el valor se definió como el nivel de transcripción de ARNm en cada estirpe celular.

65 Además, se muestran los niveles de transcripción de FUT8 en la Tabla 5 como valores relativos respecto a la cantidad de producto de transcripción de β -actina. Durante todo el periodo de cultivo el nivel de transcripción de

FUT8 en la línea de células YB2/0 productora de anticuerpos 61-33 era de aproximadamente 0,3% o menos del de la β -actina, mientras que era de 0,7% a 1,5% en la línea de células CHO productora de anticuerpos.

- 5 Los resultados muestran que la cantidad de producto de transcripción de FUT8 en la línea de células YB2/0 productora de anticuerpos era significativamente inferior que la observada en la línea de células productora de anticuerpos derivada de células CHO.

Tabla 5

Línea celular	Días de cultivo				
	1º	2º	3º	4º	5º
DCHI01-20	0,75	0,73	0,99	1,31	1,36
61-33	0,16	0,19	0,24	0,30	<0,10

10

Ejemplo 11

Preparación de estirpe celular sobreexpresante de gen de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de ratón

- 15 (1) Construcción de plásmido de expresión de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de ratón

Se extrajo el ARN total de 1×10^7 células de una célula NS0 de mieloma de ratón (RCB0213, Cell Bank at The Institute of Physical and Chemical Research) subcultivada utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) que contenía suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se disolvió en 45 μ l de agua estéril y se añadió a lo anterior 1 μ l de ADNasa libre de ARNasa RQ1 (fabricada por Promega), 5 μ l del tampón 10x de ADNasa adjunto y 0,5 μ l de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), seguido de la reacción a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico contaminante en la muestra. Tras la reacción, se purificó nuevamente el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 50 μ l de agua estéril. En 20 μ l de la mezcla de reacción utilizando oligo(dT) como cebador, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 3 μ g de cada una de las muestras de ARN total obtenidas mediante reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de preamplificación Superscript™ para la síntesis del ADNc de primera cadena (fabricado por Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 30 Se preparó ADNc de FUT8 de ratón mediante el procedimiento siguiente (figura 25).

En primer lugar se diseñó un cebador directo específico para una secuencia que contenía un codón de inicio de traducción (mostrado en SEC ID nº 19) y un cebador inverso específico para una secuencia que contenía el codón de terminación de traducción (mostrado en SEC ID nº 20) a partir de una secuencia de ADNc de FUT8 de ratón (GenBank, AB025198).

40 A continuación, se prepararon 25 μ l de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP, DMSO al 4% y 0,5 μ moles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20)] que contenía 1 μ l del ADNc derivado de células NS0 y se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo, y calentamiento final a 72°C durante 10 minutos.

45 Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento amplificado específico de 1.728 pb. En un plásmido pCR2.1, se utilizaron 4 μ l del fragmento de ADN para la inserción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) y se transformó *E. coli* DH5 α con la solución de reacción. Se aislaron los ADN plasmídicos de acuerdo con un método conocido a partir de 6 clones con inserción de ADNc de entre las colonias resistentes a canamicina obtenidas.

50 La secuencia de nucleótidos de cada ADNc insertado en el plásmido se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó que la totalidad de los ADNc insertados las secuencias de los cuales habían sido determinadas codificaba la secuencia total del ORF de la FUT8 de ratón. De entre ellas se seleccionó un ADN plasmídico que no contenía ningún error de lectura de bases en absoluto mediante PCR (se muestran la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos en SEC ID nº 2 y nº 24, respectivamente). Además, se observó una inconsistencia de 3 bases debido a la sustitución de aminoácidos en la secuencia en comparación con la secuencia de FUT8 de ratón registrada en GenBank. En la presente memoria el plásmido se denomina mFUT8-pCR2.1.

60 A continuación, se construyó el plásmido pBSmfFUT8 que contiene el ORF de secuencia completa de FUT8 de ratón de la manera siguiente (figura 26). En primer lugar se disolvió 1 μ g de plásmido pBluescript II KS(+) (fabricado

por Stratagene) en 35 µl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. A la solución de reacción se añadieron 35 µl de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,5 µl de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 30 minutos para desfosforilar de esta manera los extremos del ADN. La solución de reacción se extrajo con fenol/cloroformo, seguido de la precipitación con etanol y el fragmento de ADN recuperado se disolvió en 10 µl de agua estéril.

Separadamente, se disolvió 1 µg de plásmido mfFUT8-pCR2.1 en 35 µl de NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. La solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que contenía el ORF de secuencia completa del ADNc de FUT8 de ratón.

Se mezcló el fragmento EcoRI-EcoRI derivado del plásmido pBluescript II KS(+) obtenido (1 µl, 2,9 kb), 4 µl del fragmento EcoRI-EcoRI (1,7 kb) preparado a partir del plásmido mfFUT8-pCR2.1 y 5 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo), seguido de una reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Utilizando la solución de reacción se transformó *E. coli* DH5α y se aislaron los ADN plasmídicos de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pBSmfFUT8.

Utilizando pBSmfFUT8 y pAGE249, se construyó el vector de expresión pAGEmfFUT8 de FUT8 de ratón mediante el procedimiento a continuación (figura 27). El plásmido pAGE249 es un derivado de pAGE248 [J. Biol. Chem. 269:14730, 1994], que es un vector del que se ha eliminado un fragmento SphI-SphI (2,7 kb) que contenía el gen dihidrofolato reductasa (dhfr) en pAGE248.

En 50 µl de tampón universal H (fabricado por Takara Shuzo), se disolvió 1 µg de plásmido pAGE249 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Sall (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción BamHI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, a la solución de reacción se añadieron 35 µl de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,5 µl de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 30 minutos para desfosforilar los extremos del ADN. La solución de reacción se extrajo con fenol/cloroformo, seguido de la precipitación con etanol y el fragmento de ADN recuperado se disolvió en 10 µl de agua estéril.

Separadamente, en 50 µl de tampón universal H (fabricado por Takara Shuzo), se disolvió 1 µg de plásmido pBSmfFUT8 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Sall (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción BamHI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. La reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que contenía el ORF de secuencia completa del ADNc de FUT8 de ratón.

Se mezcló el fragmento BamHI-Sall (1 µl, 6,5 kb) derivado del plásmido pAGE249, 4 µl del fragmento BamHI-Sall (1,7 kb) preparado a partir del plásmido pBSmfFUT8 y 5 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo), seguido de una reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Utilizando la solución de reacción se transformó *E. coli* DH5α y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pAGEmfFUT8.

(2) Preparación de estirpe celular sobreexpresante de gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de ratón

Se obtuvo una estirpe celular expresante de gen de FUT8 estable mediante la introducción del vector de expresión de FUT8 de ratón pAGEmfFUT8 construido en el ítem (1) en 61-33. El clon 61-33 es un clon obtenido mediante la adaptación sin suero de la célula transformante 7-9-51 (FERM nº BP-6691, depósito internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) derivado de una célula YB2/0 de alta producción de un anticuerpo híbrido anti-gangliósido GD3 y realizando después el aislamiento de células individuales mediante dos diluciones limitantes.

El plásmido pAGEmfFUT8 se transfirió al interior de 61-33 mediante el procedimiento siguiente, mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990]. En primer lugar, se disolvieron 30 µg de plásmido pAGEmfFUT8 en 600 µl de NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 100 unidades del enzima de restricción FspI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas, obteniendo un fragmento lineal. La solución de reacción se sometió a precipitación con etanol y el plásmido lineal recuperado se preparó en forma de una solución acuosa 1 µg/µl. A continuación, se suspendió 61-33 en un tampón K-PBS (KCl 137 moles/l, NaCl 2,7 moles/l, Na₂HPO₄ 8,1 moles/l, KH₂PO₄ 1,5 moles/l, MgCl₂ 4,0 moles/l), proporcionando una

densidad de 2×10^7 células/ml y se mezclaron 200 μ l de la suspensión celular (4×10^6 células) con 10 μ l (10 μ g) del plásmido lineal. La mezcla de células-ADN se transfirió a una cubeta de Gene Pulser (distancia entre electrodos: 2 mm) (fabricado por Bio-Rad) y después se llevó a cabo la electroporación utilizando un aparato de fusión celular Gene Pulser (fabricado por Bio-Rad) a un voltaje de pulso de 0,2 kV y 250 μ F de capacidad eléctrica. La suspensión celular se mezcló con 10 ml de medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 5% dializado (fabricado por Life Technologies) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies) y se dispensó en porciones de 100 μ l en una placa de 96 pocillos para la utilización de las células en suspensión (fabricado por Greiner). Tras el cultivo de las mismas a 37°C durante 24 horas en 5% de CO₂, se extrajeron 50 μ l del sobrenadante de cultivo y se dispensaron 100 μ l de medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con 0,5 mg/ml de higromicina B (fabricado por Wako Pure Chemical Industries), suero de feto bovino al 5% dializado (fabricado por Life Technologies) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies). Se cultivaron durante 3 semanas, repitiendo la etapa de intercambio de medio a intervalos de 3 a 4 días y se obtuvieron 14 estirpes celulares que mostraban resistencia a la higromicina.

Por otra parte, se preparó una estirpe celular de control negativo mediante la introducción del plásmido pAGE249 como vector parental de pAGEmfFUT8 en 61-33. Siguiendo el procedimiento anteriormente indicado, se convirtieron 10 μ g del plásmido pAGE249 en la forma lineal con el enzima de restricción FspI y se introdujeron en 4×10^6 células de 61-33 mediante electroporación. Se mezclaron las células con 15 ml de medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 5% dializado (fabricado por Life Technologies) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies), se transfirieron a un matraz T75 para el cultivo celular en suspensión (fabricado por Greiner) y después se cultivaron a 37°C durante 24 horas en 5% de CO₂. Tras el cultivo de las mismas, una mitad del sobrenadante de cultivo (7,5 ml) se extrajo mediante centrifugación a 800 rpm durante 4 minutos y las células se suspendieron en 7,5 ml de medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con 0,5 mg/ml de higromicina B (fabricado por Wako Pure Chemical Industries), suero de feto bovino al 5% dializado (fabricado por Life Technologies) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies) y se transfirió a un matraz T75 para el cultivo celular en suspensión (fabricado por Greiner). Se cultivaron durante 3 semanas, repitiendo la etapa de intercambio de medio a intervalos de 3 a 4 días y se obtuvo una estirpe celular resistente a la higromicina.

(3) Análisis del nivel de expresión del gen de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de estirpes celulares sobreexpresantes del gen

Utilizando 6 estirpes celulares seleccionadas opcionalmente de entre 14 estirpes celulares sobreexpresantes de FUT8 de ratón de 61-33 en el ítem (2) y la estirpe celular de control negativo, se compararon los niveles de expresión de FUT8 mediante RT-PCR competitiva.

Se suspendió en medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) cada una de dichas estirpes celulares sobreexpresantes, complementado con 0,5 mg/ml de higromicina B (fabricado por Wako Pure Chemical Industries), suero de feto bovino al 5% dializado (fabricado por Life Technologies) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies), proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y después se transfirió a un matraz T75 para el cultivo celular en suspensión (fabricado por Greiner). Tras el cultivo de las mismas a 37°C durante 24 horas en 5% de CO₂, se recuperaron 1×10^7 células intactas para la extracción del ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se disolvió en 45 μ l de agua estéril y se añadió a lo anterior 0,5 μ l de ADNasa libre de ARNasa RQ1 (fabricada por Promega), 5 μ l del tampón 10x de ADNasa adjunto y 0,5 μ l de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), seguido de la reacción a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico contaminante en la muestra. Tras la reacción, se purificó nuevamente el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 50 μ l de agua estéril.

En 20 μ l de la mezcla de reacción utilizando oligo(dT) como cebador, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 2,5 μ g del ARN total obtenido mediante reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de preamplificación SuperscriptTM para la síntesis del ADNc de primera cadena (fabricado por Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de reacción se diluyó 50 veces con agua y se determinó el nivel de transcripción de cada gen mediante PCR competitiva según el Ejemplo 9(6).

Se determinó el nivel de transcripción de ARNm derivado de gen de FUT8 en cada una de las estirpes celulares mediante el procedimiento a continuación.

YBFT8-pCR2.1, como plásmido en el que se había insertado un fragmento parcial de ADNc preparado en el Ejemplo 9(2) de FUT8 de rata en pCR2.1, fue digerido con el enzima de restricción EcoRI, y el ADN lineal obtenido se utilizó como estándar para la preparación de una curva de calibración para determinar el nivel de transcripción de FUT8.

Entre los YBFT8d-pCR2.1 preparados en el Ejemplo 9(4), el YBFT8d-pCR2.1 obtenido mediante la delección de 203 pb entre Scal e HindIII de una secuencia de nucleótidos interna de FUT8 de rata se digirió con el enzima de restricción EcoRI y los ADN lineales obtenidos se utilizaron como estándar interno para la determinación de FUT8.

Se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 μ l de volumen

total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricada por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de dNTP, 0,5 μ moles/l de cebadores específicos de gen (SEC ID nº 13 y nº 14) y DMSO al 5%] que contenía 5 μ l de solución de ADNc diluida 50 veces, preparada a partir de cada una de las líneas de células hospedadoras respectivas anteriormente y 5 μ l (10 fg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 32 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo.

Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 5 μ l (0,1 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg, 50 fg, 100 fg, 500 fg o 1 pg) del plásmido estándar de FUT8 en lugar de cada ADNc derivado de línea de célula hospedadora y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de FUT8. En este caso, se utilizó 1 μ g/ml de un ARNt de levadura de panadería (fabricado por Sigma) para la dilución del plásmido estándar.

Por otra parte, debido a que se considera que el gen β -actina se transcribe de manera constante en cada célula y su nivel de transcripción es aproximadamente el mismo en todas las células, se determinó el nivel de transcripción del gen β -actina como índice de la eficiencia de la reacción de síntesis del ADNc en cada estirpe celular de expresión.

YBac-pBS, plásmido en el que se había insertado el ORF de longitud completa del ADNc de la β -actina de rata en pBluescript II KS(+), preparado en el Ejemplo 9(3), fue digerido con los enzimas de restricción HindIII y KpnI, y el ADN lineal obtenido se utilizó como estándar en la preparación de una curva de calibración para determinar el nivel de transcripción del gen de la β -actina.

YBAcd-pBS, obtenido mediante la delección de 180 pb entre Dral y Dral de una secuencia de nucleótidos interna de la β -actina de rata, fue digerida con los enzimas de restricción HindIII y KpnI, y el ADN lineal obtenido se utilizó como estándar interno para la determinación de la cantidad de β -actina.

Se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) en 20 μ l de volumen total de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mmoles/l, cebadores específicos de β -actina 0,5 μ moles/l (SEC ID nº 17 y nº 18) y DMSO al 5%] que contenía 5 μ l de solución de ADNc diluida 50 veces preparada a partir de cada una de las estirpes celulares de expresión y 5 μ l (1 pg) del plásmido como control interno. La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 3 minutos y los posteriores 17 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo.

Además, se llevó a cabo una PCR en una serie de reacción en la que se añadieron 10 pg, 5 pg, 1 pg, 500 fg o 100 fg) del plásmido de estándar de β -actina en lugar de cada ADNc derivado de estirpe celular de expresión y se utilizó en la preparación de una curva de calibración para el nivel de transcripción de β -actina. En este caso, se utilizó 1 μ g/ml de un ARNt de levadura de panadería (fabricado por Sigma) para la dilución del plásmido estándar.

Mediante la realización de la PCR con el juego de cebadores indicado en la Tabla 3 pudo amplificarse un fragmento de ADN que presentaba el tamaño mostrado en la columna de dianas de la Tabla 3 a partir de cada producto de transcripción génica y cada estándar y puede amplificarse un fragmento de ADN que presenta un tamaño mostrado en la columna de competidores de la Tabla 3 a partir de cada control interno.

Cada una de las soluciones (7 μ l) tras la PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1,75% y después se tiñó el gel sumergiéndolo durante 30 minutos a concentración 1x de tinción de gel de ácidos nucleicos SYBR Verde I (fabricada por Molecular Probes). La cantidad de fragmento de ADN amplificado se midió mediante el cálculo de la intensidad de luminiscencia de cada ADN amplificado utilizando un aparato Fluoro-imager (FluoroImager SI, fabricado por Molecular Dynamics).

La cantidad de producto amplificado formado mediante PCR utilizando un plásmido estándar como molde se midió mediante el método, y se preparó una curva de calibración representando gráficamente los valores medidos frente a las cantidades de plásmido estándar. Utilizando la curva de calibración se calculó la cantidad de ADNc de un gen de interés en cada estirpe celular a partir de la cantidad de producto amplificado al utilizar como molde cada ADNc derivado de estirpe celular de expresión, y se definió la cantidad como el nivel de transcripción de ARNm en cada estirpe celular.

La figura 28 muestra los niveles de transcripción de FUT8 como valores relativos respecto a la cantidad de producto de transcripción de β -actina. Las tres estirpes celulares mfFUT8-1, mfFUT8-2 y mfFUT8-4 y la estirpe celular en la que se ha introducido pAGE249 eran estirpes celulares que mostraban un nivel de transcripción de FUT8 relativamente pequeño, que era equivalente a 0,3% a 10% del nivel de transcripción de β -actina. Por otra parte, las otras tres estirpes celulares mfFUT8-3, mfFUT8-6 y mfFUT8-7 eran estirpes celulares que mostraban un nivel de transcripción de FUT8 elevado, que era equivalente a 20% a 40% del nivel de transcripción de β -actina.

(4) Purificación del anticuerpo producido por una estirpe celular sobreexpresante de gen de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8)

Cada una de las seis estirpes celulares sobreexpresantes del gen de FUT8 y una estirpe celular de control negativo obtenidos en el ítem (2) se suspendió en medio de hibridoma-SFM (fabricado por Life Technologies) complementado con 200 nmoles/l de MTX, 0,5 mg/ml de higromicina B (fabricada por Wako Pure Chemical Industries) y BSA al 0,2% (fabricado por Life Technologies), proporcionando una densidad de 2×10^5 células/ml y después se inocularon 100 ml en total de la suspensión en tres matraces T225 para la utilización en el cultivo celular en suspensión (fabricados por Iwaki). Tras cultivarlas a 37°C durante 7 a 9 días en un incubador con 5% de CO₂, se contó el número de células intactas con el fin de confirmar que la viabilidad de las mismas era prácticamente igual (diferentes en 30% o menos) y después se recuperó cada suspensión celular. Se centrifugó cada una de las suspensiones celulares a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante recuperado se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 1 hora y después se filtró utilizando una unidad de filtración PES (fabricada por Nalgene) que presentaba un diámetro de poro de 0,22 µm y una capacidad de 150 ml.

Se empaquetó un Prosep-A HighCapacity (fabricado por bioProcessing) en una columna de 0,8 cm de diámetro hasta un grosor de 2 cm y se lavó con 10 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,0) y 10 moles de tampón de glicina/NaOH 1 mol/l-NaCl 0,1 moles/l (pH 8,6) en ese orden para conseguir el equilibrado del portador. A continuación, se pasaron 100 ml de cada uno de los sobrenadantes de cultivo por la columna y se lavaron con 50 ml de tampón de glicina/NaOH 1 mol/l-NaCl 0,15 moles/l (pH 8,6). Tras lavarlas, el anticuerpo adsorbido en Prosep-A se eluyó utilizando 2,5 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,0), el eluido se fraccionó en porciones de 500 µl y cada fracción se neutralizó mediante la mezcla con 100 µl de Tris-HCl 2 moles/l (pH 8,5). Se seleccionaron dos fracciones que contenían el anticuerpo a concentración elevada (1,2 ml en total) mediante el método de BCA [Anal. Biochem. 150:76, 1985], se agruparon y después se dializaron frente a tampón citrato 10 moles/l (pH 6,0) a 4°C durante un día y noche completos. Tras la diálisis, se recuperó la solución de anticuerpo y se sometió a esterilización mediante filtración utilizando un Millex GV de 0,22 µm de tamaño de poro (fabricado por Millipore).

(5) Actividad citotóxica *in vitro* (actividad ADCC) del anticuerpo producido por una estirpe celular sobreexpresante de gen de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de ratón

Con el fin de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los anticuerpos anti-GD3 purificados en el ítem (4), se midió la actividad ADCC utilizando una célula positiva para GD3, la estirpe celular en cultivo de melanoma humano G-361 (RCB0991, Cell Bank at The Institute of Physical and Chemical Research).

Las células G-361 subcultivadas en medio RPMI1640 (fabricado por Life Technologies) que contenía suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) (en adelante denominado "RPMI1640-FBS(10)") se suspendieron en 500 µl de RPMI1640-FBS(10) a una densidad de 1×10^6 células y se añadieron 3,7 MBq de Na₂⁵¹CrO₄ al mismo, seguido del cultivo a 37°C durante 30 minutos para el marcaje de las células con el isótopo radioactivo. Tras la centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las células diana se suspendieron en 5 ml de RPMI1640-FBS(10). Se repitió la etapa de lavado tres veces y después la suspensión celular se incubó durante 30 minutos sobre hielo para la disociación espontánea de la sustancia radioactiva. Se repitió nuevamente dos veces la etapa de lavado y después las células se suspendieron en 5 ml de RPMI1640-FBS(10), preparando de esta manera 2×10^5 células/ml de una suspensión de células diana.

Por otra parte, se recolectaron 30 ml de sangre periférica de una persona sana y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricada por Shimizu Pharmaceutical) y después se mezclaron con 30 ml de solución salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical). Tras la mezcla, se aplicaron suavemente como capa superior 10 ml de la mezcla sobre 4 ml de Lymphoprep (fabricado por Nycomed Pharma AS) y se centrifugó a temperatura ambiente a 2.000 rpm durante 30 minutos. Las fracciones de células mononucleares separadas se recolectaron de los tubos de centrifugación, se agruparon y después se suspendieron en 30 ml de RPMI1640-FBS(10). Tras la centrifugación a temperatura ambiente a 1.200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 20 ml de RPMI1640-FBS(10). Se repitió dos veces la etapa de lavado y después se prepararon 2×10^6 células/ml de una suspensión de células efectoras utilizando RPMI1640-FBS(10).

La suspensión de células diana se dispuso a razón de 50 µl (1×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, se dispuso la suspensión de células efectoras a razón de 100 µl (2×10^5 células/pocillo) en cada pocillo, ajustando de esta manera la proporción de células efectoras a célula diana a 20: 1. A continuación, utilizando un tampón citrato 10 M (pH 6,0), se preparó una serie de soluciones diluidas de 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de cada anticuerpo anti-GD3 obtenido en el ítem (4), y las soluciones diluidas se dispensaron a razón de 50 µl en los pocillos, proporcionando concentraciones finales de 0,0025 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,25 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente. Tras llevar a cabo la reacción a 37°C durante 4 horas en 5% de CO₂, la placa se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos. En un tubo de RIA de 12 mm de diámetro (fabricado por Iwaki), se transfirieron 50 µl del sobrenadante en cada pocillo y se midió la cantidad del ⁵¹Cr disociado utilizando el contador MINAX-y auto-gamma 5550 (fabricado por Packard).

Además, se estimó la cantidad de ⁵¹Cr disociado espontáneamente llevando a cabo la misma reacción en una mezcla de reacción a la que se añadieron 150 µl de RPMI1640-FBS(10) en lugar de la suspensión de células efectoras y la solución de anticuerpo. Se estimó la cantidad de ⁵¹Cr total disociado llevando a cabo la misma

En primer lugar se diseñó un cebador directo específico para una secuencia no traducible 5'-terminal (mostrada en SEC ID nº 21) y un cebador inverso específico para una secuencia no traducible 3'-terminal (mostrada en SEC ID nº 22) a partir de una secuencia de ADNc de FUT8 de ratón (GenBank, AB025198).

A continuación, se prepararon 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP, DMSO al 4% y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 21 y SEC ID nº 22)] que contenía 1 µl del ADNc derivado de células CHO/DG44 y se llevó a cabo una PCR utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo, y calentamiento final a 72°C durante 10 minutos.

Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento amplificado específico de aproximadamente 2 kb. En un plásmido pCR2.1, se utilizaron 4 µl del fragmento de ADN para la inserción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) y se transformó *E. coli* DH5α con la solución de reacción. Se aislaron los ADN plasmídicos de acuerdo con un método conocido a partir de 8 clones con inserción de ADNc de entre las colonias resistentes a canamicina obtenidas.

La secuencia de nucleótidos de cada ADNc insertado en el plásmido se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó mediante el método que la totalidad de los ADNc insertados codificaban una secuencia que contenía el ORF completo de FUT8 de las células CHO. Entre ellos, se seleccionó un ADN plasmídico que no contenía ningún error de bases en absoluto en la PCR de las secuencias. En la presente memoria, el plásmido se denomina CHfFUT8-pCR2.1. La secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos del ADNc de FUT8 de CHO se muestran en las SEC ID nº 1 y nº 23, respectivamente.

(2) Preparación de la secuencia genómica de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de célula CHO

Utilizando como sonda el fragmento de ADNc del ORF de longitud completa de FUT8 de las células CHO obtenido en el ítem (1), se obtuvo un clon genómico de FUT8 de células CHO de acuerdo con un método de cribado genómico conocido que se describe en, por ejemplo, Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, A Laboratory Manual, segunda edición, 1989. A continuación, tras digerir el clon genómico obtenido utilizando diversos enzimas de restricción, se llevó a cabo la hibridación southern utilizando un fragmento Afal-Sau3AI (aproximadamente 280 pb) que contenía el codón de inicio del ADNc de FUT8 de células CHO como sonda, y después se seleccionó un fragmento XbaI-XbaI (aproximadamente 2,5 kb) y un fragmento SacI-SacI (aproximadamente 6,5 kb) de entre los fragmentos de enzima de restricción que mostraban reacción positiva, ser insertó en pBluescript II KS(+) (fabricado por Stratagene).

La secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos genómicos obtenidos se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. De esta manera se confirmó que el fragmento XbaI-XbaI codificaba una secuencia de un intrón cadena arriba de aproximadamente 2,5 kb que contenía el exón 2 de FUT8 de célula CHO y el fragmento SacI-SacI codificaba una secuencia de un intrón cadena abajo de aproximadamente 6,5 kb que contenía el exón 2 de FUT8 de célula CHO. En la presente memoria, el plásmido que contenía el fragmento XbaI-XbaI se denominó pFUT8fgE2-2 y el plásmido que contenía el fragmento SacI-SacI se denominó pFUT8fgE2-4. La secuencia de nucleótidos determinada (aproximadamente 9,0 kb) de la región genómica que contenía el exón 2 de FUT8 de célula CHO se muestra en la SEC ID nº 3.

Ejemplo 13

Preparación de célula CHO en la que se ha interrumpido el gen de α-1,6-fucosa-transferasa y producción de anticuerpo utilizando la célula:

Se preparó una célula CHO de la que se había delecionado la región genómica que comprendía el exón 2 del gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de célula CHO y se evaluó la actividad de ADCC del anticuerpo producido por la célula.

1. Construcción del plásmido vector pKOFUT8Puro con diana en el exón 2 del gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) de hámster chino

(1) Construcción del plásmido ploxPPuro

Se construyó el plásmido ploxPPuro mediante el procedimiento a continuación (figura 33).

En primer lugar se disolvió 1,0 µg de plásmido pKOSelectPuro (fabricado por Lexicon) en 35 µl de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Ascl (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb que contenía una unidad de expresión de gen de resistencia a la puromicina.

Por otra parte, se disolvió 1,0 µg de plásmido ploxP descrito en la solicitud publicada de patente japonesa examinada nº 314512/99 en 35 µl de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Ascl (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kb.

El fragmento Ascl-Ascl obtenido (4,5 µl, aproximadamente 1,5 kb) obtenido del plásmido pKOSelectPuro, 0,5 µl de fragmento Ascl-Ascl (aproximadamente 2,0 kb) obtenido del plásmido ploxP y 5,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina ploxPPuro.

(2) Construcción del plásmido pKOFUT8gE2-1

Se construyó el plásmido pKOFUT8gE2-1 mediante el procedimiento a continuación (figura 34), utilizando el plásmido pFUT8fgE2-2 obtenido en el Ejemplo 12(2), que presentaba una región genómica que comprendía el exón 2 de FUT8 de hámster chino.

En 35 µl de tampón NEBuffer 1 (fabricado por New England Biolabs), que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs), se disolvieron 2,0 µg del plásmido pFUT8fgE2-2 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción SacI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb.

Separadamente, en 35 µl de tampón NEBuffer 1 (fabricado por New England Biolabs), que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs), se disolvió 1,0 µg del plásmido LITMUS28 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción SacI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb.

El fragmento EcoRV-SacI obtenido (4,5 µl, aproximadamente 1,5 kb) obtenido del plásmido pFUT8fgE2-2, 0,5 µl de fragmento EcoRV-SacI (aproximadamente 2,8 kb) obtenido del plásmido LITMUS28 y 5,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pKOFUT8gE2-1.

(3) Construcción del plásmido pKOFUT8gE2-2

Se construyó el plásmido pKOFUT8gE2-2 mediante el procedimiento a continuación (figura 35), utilizando el plásmido pKOFUT8gE2-1 obtenido en el ítem (2).

En 30 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs), que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs), se disolvieron 2,0 µg del plásmido pKOFUT8gE2-1 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 30 µl de tampón NEBuffer 1 (fabricado por New England Biolabs) que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción KpnI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb.

Separadamente, se disolvió 1,0 µg de plásmido ploxPPuro en 30 µl de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New

England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HpaI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 30 µl de tampón NEBuffer 1 (fabricado por New England Biolabs) que contenía 100 µg/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del
 5 enzima de restricción KpnI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 3,5 kb.

Una porción de 4,0 µl del fragmento EcoRV-KpnI obtenido (aproximadamente 1,5 kb) del plásmido pKOFUT8gE2-1, 1,0 µl de fragmento HpaI-KpnI (aproximadamente 3,5 kb) obtenido del plásmido ploxPPuro y 5,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se
 10 denomina pKOFUT8gE2-2.

15 (4) Construcción del plásmido pscFUT8gE2-3

Se construyó el plásmido pscFUT8gE2-3 mediante el procedimiento a continuación (figura 36), utilizando el plásmido pFUT8fgE2-4 obtenido en el Ejemplo 12(2), que presentaba una región genómica que comprendía el exón 2 de
 20 FUT8 de hámster chino.

Se disolvieron 2,0 µg de plásmido pFUT8fgE2-3 en 35 µl de tampón NEBuffer 1 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HpaI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la
 25 reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN a partir de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y después se convirtieron los extremos del ADN en romos utilizando Blunting High (fabricado por Toyobo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recuperó el fragmento de ADN mediante precipitación con fenol/cloroformo y precipitación con etanol y se disolvió en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se
 30 sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 3,5 kb.

Por otra parte, en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) se disolvió 1,0 µg del plásmido LITMUS39 (fabricado por New England Biolabs) y la solución se mezcló con 20 unidades del enzima de restricción EcoRV (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de
 35 digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb.

El fragmento HpaI-HindIII obtenido (4,0 µl, aproximadamente 3,5 kb) del plásmido pFUT8fgE2-4, 1,0 µl de fragmento EcoRV-HindIII (aproximadamente 2,8 kb) obtenido del plásmido LITMUS39 y 5,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se
 40 denomina pscFUT8gE2-3.

45 (5) Construcción del plásmido pKOFUT8gE2-3

Se construyó el plásmido pKOFUT8gE2-3 mediante el procedimiento a continuación (figura 37), utilizando el plásmido pFUT8fgE2-4 obtenido en el Ejemplo 12(2), que presentaba una región genómica que comprendía el exón
 50 2 de FUT8 de hámster chino.

En 35 µl de tampón NEBuffer para EcoRI (fabricado por New England Biolabs) se disolvieron 2,0 µg del plásmido pFUT8fgE2-4 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por New England Biolabs) y 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión
 55 a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb.

Separadamente se disolvió 1,0 µg de plásmido pBluescript II KS(+) (fabricado por Stratagene) en 35 µl de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción EcoRI (fabricado por New England Biolabs) y 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se
 60 sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 3,0 kb.

El fragmento HindIII-EcoRI obtenido (4,0 µl, aproximadamente 1,8 kb) del plásmido pFUT8fgE2-4, 1,0 µl de fragmento HindIII-EcoRI (aproximadamente 3,0 kb) obtenido del plásmido pBluescript II KS(+) y 5,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30
 65 minutos.

minutos. Se transformó *E. coli* DH5 α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pKOFUT8gE2-3.

5 (6) Construcción del plásmido pKOFUT8gE2-4

Se construyó el plásmido pKOFUT8gE2-4 mediante el procedimiento a continuación (figura 38), utilizando los plásmidos pscFUT8fgE2-3 y pKOFUT8gE2-3 obtenido en los ítems (4) y (5).

10 En 35 μ l de tampón NEBuffer para Sall (fabricado por New England Biolabs), que contenía 100 μ g/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs), se disolvió 1,0 μ g del plásmido pscFUT8fgE2-3 y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Sall (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 30 μ l de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) que contenía 100 μ g/ml de BSA (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 3,6 kb.

20 Separadamente, se disolvió 1,0 μ g de plásmido pKOFUT8gE2-3 en 35 μ l de tampón NEBuffer para Sall (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción Sall (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 35 μ l de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción HindIII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, se añadieron 35 μ l de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,5 μ l de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 30 minutos para desfosforilar los extremos del ADN. Tras el tratamiento de desfosforilación, se recuperó el fragmento de ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se disolvió en 10 μ l de agua estéril.

30 El fragmento Sall-HindIII obtenido (4,0 μ l, aproximadamente 3,1 kb) del plásmido pscFUT8fgE2-3, 1,0 μ l de fragmento EcoRV-HindIII (aproximadamente 4,8 kb) obtenido del plásmido LITMUS39 y 5,0 μ l de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5 α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pKOFUT8gE2-4.

35 (7) Construcción del plásmido pKOFUT8gE2-5

40 Se construyó el plásmido pKOFUT8gE2-5 mediante el procedimiento a continuación (figura 39), utilizando los plásmidos pKOFUT8fgE2-2 y pKOFUT8gE2-4 obtenido en los ítems (3) y (6).

45 Se disolvió 1,0 μ g de plásmido pKOFUT8fgE2-2 en 30 μ l de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción SmaI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 25°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 30 μ l de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción BamHI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, se añadieron 30 μ l de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,0 μ l de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 1 hora para desfosforilar los extremos del ADN. Tras el tratamiento de desfosforilación, se recuperó el fragmento de ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se disolvió en 10 μ l de agua estéril.

55 Separadamente, se disolvió 1,0 μ g de plásmido pKOFUT8gE2-4 en 30 μ l de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción SmaI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 25°C durante 2 horas. Se recuperó un fragmento de ADN de la solución de reacción mediante precipitación con etanol y se disolvió en 30 μ l de tampón NEBuffer 2 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción BamHI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 5,2 kb.

60 El fragmento SmaI-BamHI obtenido (0,5 μ l, aproximadamente 5,0 kb) del plásmido pKOFUT8fgE2-2, 4,5 μ l de fragmento SmaI-BamHI (aproximadamente 5,4 kb) obtenido del plásmido pKOFUT8gE2-4 y 5,0 μ l de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 15 horas. Se transformó *E. coli* DH5 α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se

65

denomina pKOFUT8gE2-5.

(8) Construcción del plásmido pKOFUT8Puro

- 5 Se construyó el plásmido pKOFUT8Puro mediante el procedimiento a continuación (figura 40), utilizando el plásmido pKOFUT8gE2-5 obtenido en el ítem (7).

10 En primer lugar se disolvió 1,0 µg de plásmido pKOSelectDT (fabricado por Lexicon) en 50 µl de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 16 unidades del enzima de restricción RsrII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, la solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, purificando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb que contenía una unidad de expresión de una toxina diftérica.

15 Separadamente, se disolvió 1,0 µg de plásmido pKOFUT8gE2-5 en 50 µl de tampón NEBuffer 4 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 16 unidades del enzima de restricción RsrII (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 2 horas. Tras la reacción de digestión, se añadieron 30 µl de tampón Tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0) y 3,0 µl de fosfatasa alcalina derivada de *E. coli* C15 (fabricada por Takara Shuzo), seguido de la reacción a 65°C durante 1 hora para desfosforilar los extremos del ADN. Tras el tratamiento de desfosforilación, se recuperó el fragmento de ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se disolvió en 10 µl de agua estéril.

25 El fragmento RsrII-RsrII obtenido (1,0 µl, aproximadamente 1,2 kb) obtenido del plásmido pKOSelectDT, 1,0 µl de fragmento RsrII-RsrII (aproximadamente 10,4 kb) obtenido del plásmido pKOFUT8gE2-5 y 3,0 µl de Ligation High (fabricado por Toyobo) se mezclaron y seguidamente se llevó a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción y se aisló un ADN plasmídico de acuerdo con un método conocido a partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos. En la presente memoria el plásmido se denomina pKOFUT8Puro.

30 2. Preparación de células CHO en las que se ha interrumpido una copia de la región genómica que contiene el exón 2 del gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8)

(1) Introducción de vector de reconocimiento

35 Se introdujo el vector de reconocimiento pKOFUT8Puro de la región genómico de FUT8 de hámster chino construido en el ítem 1 del presente ejemplo, en la cepa 5-03 preparada en el ítem 1(2) del Ejemplo 8.

40 Se introdujo un gen del plásmido pKOFUT8Puro en la cepa 5-03 tal como se indica a continuación de acuerdo con el método de electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990]. En primer lugar, se disolvieron 150 µg de plásmido pKOFUT8Puro en 1,8 ml de NEBuffer para Sall (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 600 unidades del enzima de restricción Sall (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante 5 horas, obteniendo un fragmento lineal. La solución de reacción se sometió a extracción con fenol/cloroformo, seguido de precipitación con etanol y el plásmido lineal recuperado se preparó en forma de una solución acuosa 1 µg/µl. Separadamente, se suspendió la cepa 5-03 en un tampón K-PBS (KCl 137 mmoles/l, NaCl 2,7 mmoles/l, Na₂HPO₄ 8,1 mmoles/l, KH₂PO₄ 1,5 mmoles, MgCl₂ 4,0 mmoles), proporcionando una densidad de 8x10⁷ células/ml. Tras mezclar 200 µl de la suspensión celular (1,6x10⁶ células) con 4 µl (4 µg) del plásmido lineal, se transfirió un volumen entero de la mezcla de células-ADN a una cubeta de Gene Pulser (distancia entre electrodos: 2 mm) (fabricado por Bio-Rad) y después se llevó a cabo la electroporación utilizando un aparato de fusión celular Gene Pulser (fabricado por Bio-Rad) a un voltaje de pulso de 350 V y 250 µF de capacidad eléctrica. Tras llevar a cabo la electroporación utilizando 30 cubetas de la misma manera, se suspendió la suspensión celular en medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) y complemento HT a concentración 1x (fabricado por Life Technologies) y se inoculó en 30 placas de cultivo celular adherente de 10 cm de diámetro (fabricadas por Falcon). Tras el cultivo de las mismas a 37°C durante 24 horas en 5% de CO₂, se separó el sobrenadante de cultivo y se dispensó medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puomicina (fabricado por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies) en porciones de 10 ml. Tras cultivarlas durante 10 días, repitiendo el intercambio de medio a intervalos de 3 a 4 días, se obtuvieron estirpes celulares resistentes a puomicina.

(2) Preparación de estirpes celulares con vector de reconocimiento introducido

60 Se obtuvieron 900 colonias arbitrarias tal como se indica a continuación, a partir de las estirpes celulares resistentes a puomicina obtenidas en el ítem (1).

65 En primer lugar, se separó el sobrenadante de cultivo de la placa de 10 cm en la que habían formado estirpes celulares resistentes a puomicina y se añadieron 7 ml de tampón fosfato a la placa, que seguidamente se colocó bajo un estereomicroscopio. A continuación, se raspó cada colonia y se aspiró utilizando Pipetteman (fabricado por Gilson) y se transfirió a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Falcon). Tras el tratamiento de

tripsina, se inoculó cada clon en una placa de fondo redondo de 96 pocillos para la utilización en cultivo celular adherente (fabricado por Iwaki Glass) y se cultivó durante 1 semana utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puomicina (fabricada por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies).

5 Tras el cultivo de las mismas, cada clon en la placa se sometió a tratamiento de tripsina y después se mezcló con dos volúmenes de un medio liofilizante (DMSO al 20%, suero de feto bovino al 40% e IMDM al 40%). Se inoculó una mitad de la mezcla en una placa de fondo plano de 96 pocillos para el cultivo celular adherente (fabricada por Iwaki Glass) como placa réplica, mientras que la mitad restante de la mezcla se sometió a criopreservación como placas maestras. La placa réplica se cultivó durante 1 semana utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puomicina (fabricado por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies).

15 (3) Diagnóstico de la recombinación homóloga mediante PCR genómica

El diagnóstico de la recombinación homóloga en los 900 clones obtenidos en el ítem (2) se llevó a cabo mediante PCR genómica.

20 En primer lugar, se preparó el ADN genómico de cada clon a partir de la placa réplica preparada en el ítem (2) de acuerdo con un método conocido [Analytical Biochemistry 201:331, 1992] y se disolvió durante la noche en 30 µl de un tampón TE-ARNasa (pH 8,0 (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l, 200 µg/ml de ARNasa A). Además, se diseñó un cebador (mostrado en la SEC ID nº 26) que se une a una secuencia fuera de la región homóloga del vector de reconocimiento en la región genómica de FUT8 obtenida en el Ejemplo 12 y un cebador (mostrado en la SEC ID nº 27) que se une a la secuencia de loxP en el vector.

25 Utilizando la ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo), se prepararon 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 26 y SEC ID nº 27)] que contenía 10 µl de la solución de ADN genómico anteriormente preparada y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se llevó a cabo mediante calentamiento a 94°C durante 3 minutos y 38 ciclos posteriores de calentamiento utilizando la reacción a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo.

30 Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) y se identificó como clon positivo un fragmento de amplificación específica de aproximadamente 1,7 kb que contenía una región de límite entre la región genómica de las células CHO y la región homóloga del vector de reconocimiento. Mediante el método se encontró un clon positivo.

35 (4) Diagnóstico de la recombinación homóloga mediante transferencia southern del genoma

40 El diagnóstico de la recombinación homóloga en el clon, la señal positiva del cual se confirmó en el ítem (3), se llevó a cabo mediante transferencia southern del genoma.

45 Entre las placas maestras criopreservadas en el ítem (2), se seleccionó una placa de 96 pocillos que contenía el clon positivo encontrado en el ítem (3) y se incubó a 37°C durante 10 minutos en 5% de CO₂. Tras la incubación, se recolectaron las células de un pocillo correspondiente al clon positivo y se inocularon en una placa de fondo plano de 24 pocillos para células adherentes (fabricada por Greiner). Tras cultivarlas durante 1 semana utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puomicina (fabricado por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies), las células se inocularon en una placa de fondo plano de 6 pocillos para la adhesión celular (fabricada por Greiner). Se preparó el ADN genómico del clon en la placa de acuerdo con un método conocido [Nucleic Acids Research 3:2303, 1976] y se disolvió durante la noche en 150 µl de un tampón TE-ARNasa (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l, 200 µg/ml de ARNasa A).

50 Se disolvieron 12 µg del ADN genómico obtenido en 120 µl de tampón NEBuffer 3 (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 25 unidades del enzima de restricción PstI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante la noche. Se recuperó un fragmento de ADN a partir de la solución de reacción mediante precipitación con etanol, se disolvió en 20 µl de tampón TE (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l) y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v). Tras la electroforesis, se transfirió el ADN genómico a una membrana de nilón de acuerdo con un método conocido [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3683, 1979]. Tras completar la transferencia, la membrana de nilón se calentó a 80°C durante 2 horas.

55 Separadamente se preparó una sonda utilizada en la transferencia southern de la manera siguiente. En primer lugar, se diseñaron cebadores (SEC ID nº 28 y nº 29) que unen una secuencia fuera de la región homóloga del vector de reconocimiento con la región genómica de FUT8 obtenida en el Ejemplo 12. A continuación, utilizando la ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo), se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 28 y SEC ID nº 29)] que contenía 4,0 ng del plásmido pFUT8fgE2-2 obtenido en el Ejemplo 12(2) y se llevó a cabo la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se llevó a cabo mediante calentamiento a 94°C durante 1 minuto y posteriores 25 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 1 minuto en un ciclo. Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,75% (p/v), purificando un fragmento de ADN de sonda de aproximadamente 230 pb. La solución de ADN de sonda obtenida (5 µl) se marcó con un isótopo radioactivo utilizando 1,75 MBq de [α -³²P]dCTP y el sistema de marcaje de ADN Megaprime, dCTP (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

La hibridación se llevó a cabo de la manera siguiente. En primer lugar, la membrana de nilón se selló dentro de una botella centrifugadora y se llevó a cabo una prehibridación a 65°C durante 3 horas mediante la adición de 15 ml de una solución de hibridación [SSPE 5x, 50 x solución de Denhardt, SDS al 0,5% (p/v), ADN de esperma de salmón 100 µg/ml]. A continuación, la sonda de ADN marcada con ³²P se desnaturalizó por calor y se introdujo en la botella. A continuación, se calentó la membrana de nilón a 65°C durante la noche.

Tras la hibridación, la membrana de nilón se sumergió en 50 ml de SSC 2x-SDS al 0,1% (p/v) y se calentó a 65°C durante 15 minutos. Tras repetir la etapa de lavado dos veces, la membrana se sumergió en 50 ml de SSC 0,2-SDS al 0,1% (p/v) y se calentó a 65°C durante 15 minutos. Tras el lavado, la membrana de nilón se expuso a una película para rayos X a -80°C durante dos noches para el revelado.

Mediante tratamiento con el enzima de restricción PstI, se formó un fragmento de ADN de aproximadamente 4,4 kb a partir de un alelo de FUT8 de tipo salvaje. Por otra parte, se formó un fragmento de ADN de aproximadamente 6,0 kb a partir de un alelo en el que se había generado la recombinación homóloga con un vector de reconocimiento.

Mediante el método, dichos fragmentos específicos de aproximadamente 4,4 kb y aproximadamente 6,0 kb se encontraron a partir del ADN genómico del clon positivo en el ítem (3). Debido a que la proporción cuantitativa de ambos fragmentos era de 1: 1, se confirmó que el clon era un clon en el que se había interrumpido una copia del alelo de FUT8. En adelante en la presente memoria, el clon se denomina cepa 1st.ΔFUT8 2-46.

3. Deleción del gen de resistencia a fármaco de la célula CHO en la que se ha interrumpido 1 copia del gen de α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8)

(1) Introducción de vector de expresión de la recombinasa Cre

Se introdujo el vector pBS185 de expresión de la recombinasa Cre (fabricado por Life Technologies) en la cepa 1st.ΔFUT8 2-46 preparada en el ítem 2 del presente ejemplo.

Se introdujo un gen del plásmido pBS185 en la cepa 1st.ΔFUT8 2-46 tal como se indica a continuación de acuerdo con el método de electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990]. En primer lugar, se suspendió la cepa 1st.ΔFUT8 2-46 en un tampón K-PBS (KCl 137 mmoles/l, NaCl 2,7 mmoles/l, Na₂HPO₄ 8,1 mmoles/l, KH₂PO₄ 1,5 mmoles, MgCl₂ 4,0 mmoles), proporcionando una densidad de 8x10⁷ células/ml. Tras mezclar 200 µl de la suspensión celular (1,6x10⁶ células) y 4 µg del plásmido pBS185, se transfirió un volumen entero de la mezcla de células-ADN a una cubeta de Gene Pulser (distancia entre electrodos: 2 mm) (fabricado por Bio-Rad) y después se llevó a cabo la electroporación utilizando un aparato de fusión celular Gene Pulser (fabricado por Bio-Rad) a un voltaje de pulso de 350 V y 250 µF de capacidad eléctrica. Tras la transferencia génica, se suspendió la suspensión celular en 10 ml de medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) y complemento HT a concentración 1x (fabricado por Life Technologies) y se diluyó adicionalmente 20.000 veces utilizando el mismo medio. Las células se inocularon en 7 placas de cultivo celular adherente de 10 cm de diámetro (fabricadas por Falcon) y después se cultivaron a 37°C durante 24 horas con 5% de CO₂. Tras cultivarlas, se separó el sobrenadante de cultivo y se dispensaron 10 ml del medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies). El cultivo se llevó a cabo durante 10 días, repitiendo el intercambio de medio a intervalos de 3 a 4 días.

(2) Preparación de estirpes celulares con vector de expresión de recombinasa Cre introducido

Se obtuvieron 400 colonias arbitrarias tal como se indica a continuación, a partir de la estirpe celular obtenida en el ítem (1).

En primer lugar, se separó el sobrenadante de cultivo de la placa de 10 cm y se añadieron 7 ml de tampón fosfato a la placa, que seguidamente se colocó bajo un estereomicroscopio. A continuación, se raspó cada colonia y se aspiró utilizando Pipetteman (fabricado por Gilson) y se transfirió a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Falcon). Tras el tratamiento de tripsina, se inoculó cada clon en una placa de fondo redondo de 96 pocillos para la utilización en cultivo celular adherente (fabricado por Iwaki Glass) y se cultivó durante 1 semana utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies).

Tras el cultivo de las mismas, cada clon en la placa se sometió a tratamiento de tripsina y después se mezcló con dos volúmenes de un medio liofilizante (DMSO al 20%, suero de feto bovino al 40% e IMDM al 40%). Se inoculó una

mitad de la mezcla en una placa de fondo plano de 96 pocillos para el cultivo celular adherente (fabricada por Iwaki Glass) como placa réplica, mientras que la mitad restante de la mezcla se sometió a crioconservación como placa maestra.

5 A continuación, la placa réplica se cultivó durante 6 días utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puomicina (fabricado por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies). Un clon positivo del que se había eliminado el gen de resistencia a puomicina interpuesto entre las secuencias de loxP mediante la expresión de la recombinasa Cre moría en presencia de puomicina. Mediante este método de selección se encontraron 91 clones positivos.

10

(3) Diagnóstico de la eliminación de genes de resistencia a fármaco mediante transferencia southern del genoma

El diagnóstico de la eliminación del gen de resistencia a fármaco mediante transferencia southern del genoma se llevó a cabo en 6 clones opcionales de entre los clones positivos encontrados en el ítem (2).

15

Entre las placas maestras crioconservadas en el ítem (2), se seleccionó una placa de 96 pocillos que contenía los 6 clones positivos y se incubó a 37°C durante 10 minutos en 5% de CO₂. Tras la incubación, se recolectaron las células de un pocillo correspondiente a cada clon positivo y se inocularon en una placa de fondo plano de 24 pocillos para células adherentes (fabricada por Greiner). Tras cultivarlas durante 1 semana utilizando medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies), las células se inocularon en una placa de fondo plano de 6 pocillos para la adhesión celular (fabricada por Greiner). Se prepararon los ADN genómicos de cada clon en la placa de acuerdo con un método conocido [Nucleic Acids Research 3:2303, 1976] y se disolvieron durante la noche en 150 µl de un tampón TE-ARNasa (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l, 200 µg/ml de ARNasa A).

20

25

Se disolvieron 12 µg del ADN genómico obtenido en 120 µl de tampón NEBuffer para BamHI (fabricado por New England Biolabs) y se añadieron 20 unidades del enzima de restricción BamHI (fabricado por New England Biolabs), seguido de la reacción de digestión a 37°C durante la noche. Se recuperó un fragmento de ADN a partir de la solución de reacción mediante precipitación con etanol, se disolvió en 20 µl de tampón TE (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l) y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,4% (p/v). Tras la electroforesis, se transfirió el ADN genómico a una membrana de nilón de acuerdo con un método conocido [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3683, 1979]. Tras completar la transferencia, la membrana de nilón se calentó a 80°C durante 2 horas.

30

35

Por otra parte, se preparó una sonda utilizada en la transferencia southern de la manera siguiente. En primer lugar, se diseñaron cebadores (SEC ID nº 30 y nº 31) que se unen a una secuencia fuera de la región homóloga del vector de reconocimiento en la región genómica de FUT8 obtenida en el Ejemplo 12. A continuación, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) mediante la preparación de 20 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 30 y SEC ID nº 31)] que contenía 4,0 ng del plásmido pFUT8fgE2-2 obtenido en el Ejemplo 12(2). La PCR se llevó a cabo mediante calentamiento a 94°C durante 1 minuto y posteriores 25 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 1 minuto en un ciclo. Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,75% (p/v), purificando un fragmento de ADN de sonda de aproximadamente 230 pb. Una porción de 5 µl de la solución de ADN de sonda obtenida se marcó con un isótopo radioactivo utilizando 1,75 MBq de [α-³²P]dCTP y el sistema de marcaje de ADN Megaprime, dCTP (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

40

45

La hibridación se llevó a cabo de la manera siguiente. En primer lugar, la membrana de nilón se selló dentro de una botella centrifugadora y se llevó a cabo una prehibridación a 65°C durante 3 horas mediante la adición de 15 ml de una solución de hibridación [SSPE 5x, 50 x solución de Denhardt, SDS al 0,5% (p/v), ADN de esperma de salmón 100 µg/ml]. A continuación, la sonda de ADN marcada con ³²P se desnaturalizó por calor y se introdujo en la botella y la membrana de nilón se calentó durante la noche a 65°C.

50

Tras la hibridación, la membrana de nilón se sumergió en 50 ml de SSC 2x-SDS al 0,1% (p/v) y se calentó a 65°C durante 15 minutos. Tras repetir la etapa de lavado dos veces, la membrana se sumergió en 50 ml de SSC 0,2-SDS al 0,1% (p/v) y se calentó a 65°C durante 15 minutos. Tras el lavado, la membrana de nilón se expuso a una película para rayos X a -80°C durante dos noches para el revelado.

55

Mediante tratamiento con el enzima de restricción BamHI, se formó un fragmento de ADN de aproximadamente 19,0 kb a partir de un alelo de FUT8 de tipo salvaje. Además, se formó un fragmento de ADN de aproximadamente 12,5 kb a partir de un alelo en el que se había generado la recombinación homóloga con un vector de reconocimiento. Además, al delecionar el gen de resistencia a puomicina (aproximadamente 1,5 kb) en el que se había generado recombinación homóloga, se formó un fragmento de ADN de aproximadamente 11,0 kb mediante el mismo tratamiento.

60

65

Mediante el método, dichos fragmentos específicos de aproximadamente 19,0 kb y aproximadamente 11,0 kb se

encontraron a partir del ADN genómico de 5 de los 6 clones. Debido a que la proporción cuantitativa de ambos fragmentos era de 1: 1, se demostró que el gen de resistencia a puromicina había sido deleciónado de las estirpes celulares en las que se había interrumpido 1 copia de la región genómica de FUT8. En adelante en la presente memoria, uno de los clones se denomina 1st.ΔFUT8 2-46-1. Además, los resultados de la transferencia southern del genoma de las cepas 1st.ΔFUT8 2-46-1, 1st.ΔFUT8 2-46 y 5-03 se muestran en la figura 41. Adicionalmente, la cepa 1st.ΔFUT8 2-46-1, denominada 2-46-1, fue depositada el 26 de septiembre de 2001 como FERM nº BP-7755 en el depósito internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón)

4. Purificación del anticuerpo producido por una estirpe celular con interrupción del gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8)

La cepa 1st.ΔFUT8 2-46-1 obtenida en el ítem 3 del presente ejemplo mediante la interrupción de una copia del alelo de FUT8 se suspendió en medio IMDM (fabricado por Life Technologies) complementado con 15 µg/ml de puromicina (fabricado por Sigma) y suero de feto bovino al 10% dializado (fabricado por Life Technologies), proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y después se inocularon 60 ml en total de la suspensión en dos matraces T182 para la utilización en el cultivo celular adherente (fabricados por Greiner). Tras cultivarlas durante 3 días, se descartó el sobrenadante y se cambió por el total de 60 ml de medio EXCELL301 (fabricado por JRH Biosciences).

Tras cultivarlas a 37°C durante 7 días en un incubador con 5% de CO₂, se contó el número de células intactas con el fin de confirmar que la viabilidad de las mismas era prácticamente igual (diferentes en 30% o menos) y después se recuperó cada suspensión celular. Se centrifugó la suspensión celular a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante recuperado se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 1 hora y después se filtró utilizando una unidad de filtración PES (fabricada por Nalgene) de 150 ml de capacidad con un diámetro de poro de 0,22 µm.

Se empaquetó Prosep-A HighCapacity (fabricado por bioProcessing) en una columna de 0,8 cm de diámetro hasta un grosor de 2 cm y se lavó con 10 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,0) y 10 moles de tampón de glicina/NaOH 1 mol/l-NaCl 0,15 moles/l (pH 8,6) en ese orden para conseguir el equilibrio del portador. A continuación, se pasaron 100 ml de cada uno de los sobrenadantes de cultivo por la columna y se lavaron con 50 ml de tampón de glicina/NaOH 1 mol/l-NaCl 0,15 moles/l (pH 8,6). Tras lavarlas, el anticuerpo adsorbido en Prosep-A se eluyó utilizando 2,5 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,0), el eluido se fraccionó en porciones de 500 µl y cada fracción se neutralizó mediante la mezcla con 100 µl de Tris-HCl 2 moles/l (pH 8,5). Se seleccionaron dos fracciones que contenían el anticuerpo a concentración elevada (1,2 ml en total) mediante el método de BCA [Anal. Biochem. 150:76, 1985], se agruparon y después se dializaron frente a tampón citrato 10 moles/l-NaCl 0,15 moles/l (pH 6,0) a 4°C durante un día y noche completos. Tras la diálisis, se recuperó la solución de anticuerpo y se sometió a esterilización mediante filtración utilizando un Millex GV de 0,22 µm de tamaño de poro (fabricado por Millipore).

5. Actividad citotóxica in vitro (actividad de ADCC) del anticuerpo producido por una estirpe celular con interrupción del gen de α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8)

Con el fin de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo anti-CCR4 purificado en el ítem 4 del presente ejemplo, se midió la actividad de ADCC utilizando la estirpe celular CCR4/EL-4 positiva para CCR4 indicada en el Ejemplo 8.

Las células CCR4/EL-4 subcultivadas en medio RPMI1640 (fabricado por Life Technologies) que contenía suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) (en adelante denominado "RPMI1640-FBS(10)") se suspendieron en 500 µl de RPMI1640-FBS(10) a una densidad de 1×10^6 células y se añadieron 3,7 MBq de Na₂⁵¹CrO₄ al mismo, seguido del cultivo a 37°C durante 90 minutos para el marcaje de las células con el isótopo radioactivo. Tras la centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las células diana se suspendieron en 5 ml de RPMI1640-FBS(10). Se repitió la etapa de lavado tres veces y después la suspensión celular se incubó durante 30 minutos sobre hielo para la disociación espontánea de la sustancia radioactiva. Se repitió nuevamente dos veces la etapa de lavado y después las células se suspendieron en 5 ml de RPMI1640-FBS(10), preparando de esta manera 2×10^5 células/ml de una suspensión de células diana.

Separadamente, se recolectaron 30 ml de sangre venosa de una persona sana, se mezcló suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricada por Shimizu Pharmaceutical) y después se mezcló con 30 ml de solución salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical). Tras la mezcla, se aplicaron suavemente como capa superior 10 ml de la mezcla sobre 4 ml de Lymphoprep (fabricado por Nycomed Pharma AS) y se centrifugó a temperatura ambiente a 2.000 rpm durante 30 minutos. Las fracciones de células mononucleares separadas se recolectaron de los tubos de centrifugación, se agruparon y después se suspendieron en 30 ml de RPMI1640-FBS(10). Tras la centrifugación a temperatura ambiente a 1.200 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 20 ml de RPMI1640-FBS(10). Se repitió dos veces la etapa de lavado y después se prepararon $2,5 \times 10^6$ células/ml de una suspensión de células efectoras utilizando RPMI1640-FBS(10).

La suspensión de células diana se dispensó a razón de 50 µl (1×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de

96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, se dispensó la suspensión de células efectoras a razón de 100 µl (2,5x10⁵ células/pocillo) en cada pocillo, ajustando de esta manera la proporción de células efectoras a célula diana a 25: 1. A continuación, utilizando RPMI1640-FBS(10), se preparó una serie de soluciones diluidas de 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de cada uno de los anticuerpos anti-CCR4 obtenidos en el ítem 5 del Ejemplo 13 y las soluciones diluidas se dispensaron a razón de 50 µl en los pocillos, proporcionando concentraciones finales de 0,0025 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,25 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente. Tras llevar a cabo la reacción a 37°C durante 4 horas en 5% de CO₂, la placa se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos. En un tubo de RIA de 12 mm de diámetro (fabricado por Iwaki), se extrajeron 75 µl del sobrenadante de cada pocillo y se midió la cantidad del ⁵¹Cr disociado utilizando el contador MINAX-γ auto-gamma 5550 (fabricado por Packard).

Además, se estimó la cantidad de ⁵¹Cr disociado espontáneamente llevando a cabo la misma reacción en una mezcla de reacción a la que se añadieron 150 µl de RPMI1640-FBS(10) en lugar de la suspensión de células efectoras y la solución de anticuerpo. Se estimó la cantidad de ⁵¹Cr total disociado llevando a cabo la misma reacción en una mezcla de reacción a la que se añadieron 100 µl de ácido clorhídrico 1 N y 50 µl de RPMI1640-FBS(10) en lugar de la suspensión de células efectoras y la solución de anticuerpo. Utilizando estos valores se calculó la actividad ADCC utilizando la ecuación (II).

La figura 42 muestra la actividad de ADCC de cada uno de los anticuerpos anti-CCR4. El anticuerpo obtenido de la cepa 1st.ΔFUT8 2-46-1 en la que se había interrumpido 1 copia del alelo de FUT8 mostró una actividad de ADCC significativamente más potente que la del anticuerpo producido por la cepa 5-03, que es la línea de células CHO antes de la disrupción génica. Además, no se observaron cambios en la actividad de unión a antígeno de dichos anticuerpos. Basándose en estos resultados se confirmó que la actividad de ADCC de los anticuerpos producidos podía mejorarse mediante la disrupción del alelo de FUT8 en las células hospedadoras.

Ejemplo 14

Preparación de células CHO/DG44 resistentes a lectina y producción de anticuerpo utilizando las células:

(1) Preparación de CHO/DG44 resistentes a lectina

Se cultivaron células CHO/DG44 hasta alcanzar un estadio inmediatamente previo a la confluencia, mediante cultivo en un matraz de 75 cm² para el cultivo adherente (fabricado por Greiner) utilizando medio IMDM-FBS(10) [medio IMDM que comprende suero de feto bovino al 10% (FBS) y una concentración 1x de complemento HT (fabricado por Gibco BRL)]. Tras el lavado de las células con 5 ml de PBS de Dulbecco (fabricado por Invitrogen), se añadieron a las mismas 1,5 ml de tripsina al 0,05% (fabricado por Invitrogen) diluido con PBS de Dulbecco y se incubó a 37°C durante 5 minutos para desenganchar las células del fondo del matraz. Las células desenganchadas se recuperaron mediante una operación de centrifugación utilizada generalmente en el cultivo celular y se suspendieron en medio IMDM-FBS(10), proporcionando una densidad de 1x10⁵ células/ml y después se añadió o no se añadió 0,1 µg/ml del agente alquilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (en adelante denominado "MNNG", fabricado por Sigma). Tras incubarlo a 37°C durante 3 días en un incubador de CO₂ (fabricado por Tabai), se descartó el sobrenadante de cultivo y las células se lavaron nuevamente, se desengancharon y se recuperaron mediante las mismas operaciones, se suspendieron en medio IMDM-FBS(10) y después se inocularon en una placa de 96 pocillos de cultivo adherente (fabricada por Iwaki Glass), proporcionando una densidad de 1.000 células/pocillo. A cada pocillo, como concentración final en medio, se añadió 1 mg/ml de aglutinina de *Lens culinaris* (en adelante denominada "LCA", fabricada por Vector), 1 mg/ml de aglutinina de *Aleuria aurantia* (lectina de *Aleuria aurantia*, en adelante denominada "AAL", fabricada por Vector) o 1 mg/ml de aglutinina de haba (leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, en adelante denominada "L-PHA", fabricada por Vector). Tras cultivarlas a 37°C durante 2 semanas en un incubador de CO₂, las colonias que aparecieron eran CHO/DG44 resistentes a lectina. Con respecto a la célula CHO/DG44 resistente a lectina obtenida, la estirpe celular resistente a LCA se denominó CHO-LCA, la estirpe celular resistente a AAL se denominó CHO-AAL y la estirpe celular resistente a L-PHA se denominó CHO-PHA. Al examinar la resistencia de dichas estirpes celulares a diversos tipos de lectina, se encontró que CHO-LCA también era resistente a AAL y que CHO-AAL también era resistente a LCA. Además, CHO-LCA y CHO-AAL también mostraron resistencia a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar idéntica a la estructura de cadena de azúcar reconocida por LCA y AAL, es decir, una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 del residuo de N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar unida mediante N-glucósido. Específicamente, se encontró que CHO-LCA y CHO-AAL pueden mostrar resistencia y sobrevivir incluso en un medio complementado con 1 mg/ml a una concentración final de aglutinina de guisante (aglutinina de *Pisum sativum*, en adelante denominada "PSA", fabricada por Vector). Además, incluso en caso de no añadir el agente alquilante MNNG, se pudieron obtener estirpes celulares resistentes a lectina mediante el incremento del número de células que debían tratarse. En adelante en la presente memoria, se utilizaron dichas estirpes celulares en los análisis.

(2) Preparación de células productoras de anticuerpos híbridos anti-CCR4 humanos

Se introdujo el plásmido pKANTEX2160 de expresión de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 en tres estirpes celulares resistentes a lectina obtenidas en (1) mediante el método descrito en el Ejemplo 8, y se llevó a cabo la

amplificación génica con el fármaco MTX para preparar una estirpe celular productora de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4. Mediante la medición del nivel de expresión de anticuerpo mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 8-2, se obtuvieron transformantes expresantes de anticuerpos a partir de CHO-LCA, CHO-AAL y CHO-PHA. Con respecto a cada uno de los transformantes obtenidos, un transformante obtenido de CHO-LCA se denominó CHO/CCR4-LCA, un transformante obtenido de CHO-AAL se denominó CHO/CCR4-AAL y un transformante obtenido de CHO-PHA se denominó CHO/CCR4-PHA. Además, CHO/CCR4-LCA, nombre de Nega-13, fue depositado el 26 de septiembre de 2001, como FERM nº BP-7756 en el depósito internacional de organismos de patentes, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón).

(3) Producción de anticuerpo de potente actividad de ADCC por células CHO resistentes a lectina

Utilizando los tres transformantes obtenidos en (2), se obtuvieron anticuerpos purificados mediante el método descrito en el Ejemplo 8-3. La actividad de unión a antígeno de cada uno de los anticuerpos híbridos purificados humanos anti-CCR4 se evaluó utilizando el ELISA descrito en el Ejemplo 8-2. Los anticuerpos producidos por todos los transformantes mostraron una actividad de unión a antígeno similar a la del anticuerpo producido por una línea de células recombinantes (cepa 5-03) preparada en el Ejemplo 8 utilizando células CHO/DG44 generales como huésped. Utilizando dichos anticuerpos purificados, se evaluó la actividad de ADCC de cada uno de los anticuerpos híbridos purificados humanos anti-CCR4 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8-7. Se muestran los resultados en la figura 43. En comparación con el anticuerpo producido por la cepa 5-03, se observó una actividad de ADCC incrementada en aproximadamente 100 veces en los anticuerpos producidos por CHO/CCR4-LCA y CHO/CCR4-AAL. Por otra parte, no se observó ningún incremento significativo de la actividad de ADCC en el anticuerpo producido por CHO/CCR4-PHA. Además, al comparar las actividades de ADCC de los anticuerpos producidos por CHO/CCR4-LCA e YB2/0 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8-7, se encontró que el anticuerpo producido por CHO/CCR4-LCA mostraba una actividad de ADCC más potente que el anticuerpo producido por la cepa 5-03 similar al caso del anticuerpo KM2760-1 producido por la estirpe celular YB2/0 preparada en el Ejemplo 8-1 (figura 44).

(4) Análisis de cadenas de azúcar de anticuerpos producidos por células CHO resistentes a lectinas

Se analizaron las cadenas de azúcar de los anticuerpos híbridos anti-CCR4 purificados humanos en el ítem (3). La solución de cada uno de los anticuerpos purificados se intercambió por KH_2PO_4 10 mM utilizando Ultra Free 0,5-10K (fabricado por Millipore). El intercambio se llevó a cabo de manera que la proporción de intercambio fuese de 80 veces o superior. La concentración de los anticuerpos tras el intercambio de soluciones se midió utilizando UV-1600 (fabricado por Shimadzu). Se calculó el coeficiente de absorción molar a partir de la secuencia de aminoácidos de cada anticuerpo basándose en la ecuación (III) a continuación [Advances in Protein Chemistry 12:303, 1962], y se determinó la concentración definiendo la absorbancia a 280 nm en 1,38 mg/ml.

$$E_{1\text{mol/l}} = A \times n1 + B \times n2 + C \times n3 \quad (\text{III})$$

$$E_{1\text{mol/ml}} = E_{1\text{mol/l}} / \text{PM}$$

E1mol/l:	coeficiente de absorción a 280 nm ($\text{mg}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$)
E1mol/ml:	coeficiente de absorción molar a 280 nm ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
A:	coeficiente de absorción molar del triptófano a 280 nm = 5.550 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
B:	coeficiente de absorción molar de la tirosina a 280 nm = 1340 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
C:	coeficiente de absorción molar de la cistina a 280 nm = 200 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
n1:	número de triptófanos por cada molécula de anticuerpo
n2:	número de tirosinas por cada molécula de anticuerpo
n3:	número de cistinas por cada molécula de anticuerpo
PM:	peso molecular de anticuerpo (g/mol)

En una probeta Hydraclub S-205, se introdujeron 100 μg de cada anticuerpo y se secaron utilizando un evaporador centrífugo. La muestra seca en la probeta se sometió a hidrazinólisis utilizando Hydraclub, fabricado por Hohnen. Se dejó que la muestra reaccionase con la hidrazina a 110°C durante 1 hora utilizando un reactivo de hidrazinólisis fabricado por Hohnen hydrazinolysis [Method of Enzymology 83:263, 1982]. Tras la reacción, se evaporó la hidrazina bajo presión reducida y el tubo de reacción se retornó a la temperatura ambiente dejándolo en reposo durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 250 μl de un reactivo de acetilación fabricado por Hohnen y se añadieron 25 μl de anhídrido acético al mismo, seguido de agitación intensa para la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 250 μl de un reactivo de acetilación y 25 μl de anhídrido acético al mismo, seguido de agitación intensa para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La muestra se congeló a -80°C en un congelador y se liofilizó durante aproximadamente 17 horas. Se recuperaron las cadenas de azúcar de la muestra liofilizada utilizando el kit de preparación de glicanos de cartucho de celulosa fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd. La solución de cadenas de azúcar de muestra se secó utilizando un evaporador centrífugo y después de sometió a marcaje fluorescente con 2-aminopiridina [J. Biochem. 95:197, 1984]. La solución de 2-aminopiridina se preparó mediante la adición de 760 μl de HCl por cada 1 g de 2-aminopiridina (solución 1x PA) y diluyendo la

solución 10 veces con agua purificada mediante ósmosis inversa (solución de PA diluida 10 veces). La solución de cianoborohidruro sódico se preparó mediante la adición de 20 µl de solución 1x PA y 430 µl de agua purificada mediante ósmosis inversa por cada 10 mg de cianoborohidruro sódico. A la muestra se añadieron 67 µl de una solución de PA diluida 10 veces, seguido de la reacción a 100°C durante 15 minutos y se enfrió espontáneamente y se añadieron adicionalmente a lo anterior 2 µl de cianoborohidruro sódico, seguido de la reacción a 90°C durante 12 horas para el marcaje fluorescente de las cadenas de azúcar de muestra. Los grupos de cadena de azúcar marcados fluorescentemente (grupo de cadena de azúcar tratado con PA) se separaron del exceso de reactivos utilizando una columna Superdex Peptide HR 10/30 (fabricada por Pharmacia). Esta etapa se llevó a cabo utilizando bicarbonato amónico 10 mM como eluyente a un caudal de 0,5 ml/min. y a una temperatura de columna la temperatura ambiente y utilizando un detector de fluorescencia de 320 nm de longitud de onda de excitación y 400 nm de longitud de onda de fluorescencia. El eluido se recuperó 20 a 30 minutos después de la adición de la muestra y se secó utilizando un evaporador centrífugo para la utilización como cadenas de azúcar tratadas con PA purificadas. A continuación, se llevó a cabo el análisis de HPLC de fase inversa de las cadenas de azúcar tratadas con PA purificadas, utilizando una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu, φ 6,0 nm x 159 nm). La etapa se llevó a cabo a una temperatura de columna de 55°C y a un caudal de 1 ml/min. y utilizando un detector de fluorescencia de 320 nm de longitud de onda de excitación y 400 nm de longitud de onda de fluorescencia. La columna se equilibró con un tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 3,8) y la elución se llevó a cabo durante 80 minutos con un gradiente lineal de densidades de 1-butanol al 0,5%. Cada una de las cadenas de azúcar tratadas con PA se identificó mediante análisis de la descomposición de los iones metastables de cada pico de las cadenas de azúcar tratadas con PA separadas, utilizando espectrometría de masas de tiempo de vuelo mediante ionización láser asistida por matriz (análisis de EM MALDI-TOF, por sus siglas en inglés), la comparación de las posiciones de elución con estándares de cadena de azúcar tratada con PA fabricados por Takara Shuzo, y el análisis de HPLC de fase inversa tras la digestión de cada cadena de azúcar tratada con PA utilizando diversos enzimas (figura 45). El contenido de cada una de las cadenas de azúcar se estimó a partir del área de cada pico de cadena de azúcar tratada con PA mediante análisis de HPLC de fase inversa. Se excluyeron de la estimación de área de pico las cadenas de azúcar tratadas con PA el extremo reductor de las cuales no fuese N-acetilglucosamina, debido a que constituían impurezas o productos secundarios durante la preparación de las cadenas de azúcar tratadas con PA.

El análisis se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 11(6), utilizando un tampón de fosfato sódico (pH 3,8) como tampón A y un tampón de fosfato sódico (pH 3,8) + 1-butanol al 0,5% como tampón B.

En la figura 45, se calculó la proporción de grupos de cadena de azúcar libre de α-1,6-fucosa a partir del área ocupada por los picos (i) a (iv) respecto a la ocupada por (i) a (viii), y la proporción de grupos de cadena de azúcar con unión de α-1,6-fucosa, a partir del área ocupada por los picos (v) a (viii) respecto a la ocupada por (i) a (viii).

Los resultados del análisis de estructuras de cadena de azúcar de los anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 purificados producidos por las estirpes celulares resistentes a lectina se muestran en la Tabla 6. Los resultados muestran el análisis de cadenas de azúcar del anticuerpo híbrido humano anti-CCR4 producido por estirpes celulares resistentes a lectina. La proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa (%) calculada a partir de las áreas de pico mediante el análisis según el método descrito en el Ejemplo d(4) se muestra en la tabla.

Tabla 6

Célula productora de anticuerpos	Complejo de doble cadena de azúcar libre de α-1,6-fucosa (%)
Cepa 5-03	9
Cepa CHO/CCR4-LCA	48
Cepa CHO/CCR4-AAL	27
Cepa CHO/CCR4-PHA	8

En comparación con el anticuerpo producido por la cepa 5-03, la proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa se incrementó de 9% a 48% en el anticuerpo producido por CHO/CCR4-LCA al calcularla a partir del área del pico analizado. La proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa se incrementó a de 9% a 27% en el anticuerpo producido por CHO/CCR4-AAL. Por otra parte, no se observaron prácticamente cambios en el patrón de cadenas de azúcar y en la proporción de cadenas de azúcar libres de α-1,6-fucosa en la estirpe celular resistente a PHA en comparación con la cepa 5-03.

Ejemplo 15

Análisis de las estirpes celulares CHO resistentes a lectina:

1. Análisis del nivel de expresión de enzima GMD en la estirpe celular CHO/CCR4-LCA productora de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4

Mediante el método de RT-PCR se analizó el nivel de expresión de cada uno de los genes de la GMD (GDP-

manosa 4,6-deshidratasa), de GFPP (GDP-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa) y de FX (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa) conocidos como enzimas biosintéticos de la fucosa y de FUT8 (α -1,6-fucosiltransferasa) como fucosa transferasa, en la estirpe celular CHO/CCR4-LCA productora de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 obtenida en el Ejemplo 14.

5

(1) Preparación de ARN a partir de diversas estirpes celulares

Cada una de las estirpes celulares CHO/DG44, la estirpe celular 5-03 productora de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 obtenida en el Ejemplo 8-1(2) y la estirpe celular CHO/CCR4-LCA productora de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 obtenida en el Ejemplo 14(2), se subcultivó a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ y después se cultivó durante 4 días. Tras el cultivo de las mismas, se preparó ARN total a partir de 1×10^7 células de cada estirpe celular utilizando el minikit RNeasy Protect (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 5 µg de cada ARN en 20 µl de una solución de reacción utilizando el sistema de síntesis de primera cadena Super Script para RT-PCR (fabricado por Gibco Brl) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10

15

(2) Análisis del nivel de expresión del gen GMD mediante RT-PCR

Con el fin de amplificar el ADNc de GMD mediante PCR, se preparó un cebador de ADN sintético 24-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 32 y un cebador de ADN sintético 26-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 33, basándose en la secuencia de ADNc obtenida de células CHO que se muestra en el Ejemplo 17-1.

20

25

30

A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 32 y nº 33] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla preparada a partir de cada estirpe celular en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras someter 10 µl de la solución de reacción de PCR a electroforesis en agarosa, se tiñeron los fragmentos de ADN utilizando verde Cybrer (fabricado por BMA) y después se midió la cantidad del fragmento de ADN de aproximadamente 350 pb utilizando un Fluor Imager SI (fabricado por Molecular Dynamics).

35

(3) Análisis del nivel de expresión del gen GFPP mediante RT-PCR

Con el fin de amplificar el ADNc de GFPP mediante PCR, se preparó un cebador de ADN sintético 27-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 34 y un cebador de ADN sintético 23-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 35, basándose en la secuencia de ADNc de GFPP obtenida de células CHO que se muestra en el Ejemplo 16-2.

40

45

50

A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 34 y nº 35] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla preparada a partir de cada estirpe celular en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 24 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras someter 10 µl de la solución de reacción de PCR a electroforesis en agarosa, se tiñeron los fragmentos de ADN utilizando verde Cybrer (fabricado por BMA) y después se midió la cantidad del fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb utilizando un Fluor Imager SI (fabricado por Molecular Dynamics).

(4) Análisis del nivel de expresión del gen FX mediante RT-PCR

Con el fin de amplificar el ADNc de FX mediante PCR, se preparó un cebador de ADN sintético 28-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 36 y un cebador de ADN sintético 28-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 37, basándose en la secuencia de ADNc de FX obtenida de células CHO que se muestra en el Ejemplo 16-1.

55

60

65

A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 36 y nº 37] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla preparada a partir de cada estirpe celular en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 22 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras someter 10 µl de la solución de reacción de PCR a electroforesis en agarosa, se tiñeron los fragmentos de ADN utilizando verde Cybrer (fabricado por BMA) y después se midió la cantidad del fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb utilizando un Fluor Imager SI (fabricado por Molecular Dynamics).

(5) Análisis del nivel de expresión del gen FUT8 mediante RT-PCR

5 Con el fin de amplificar el ADNc de FUT8 mediante PCR, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 13 y nº 14] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla preparada a partir de cada estirpe celular en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 20 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras someter 10 µl de la solución de reacción de PCR a electroforesis en agarosa, se tiñeron los fragmentos de ADN utilizando verde Cybrer (fabricado por BMA) y después se midió la cantidad del fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb utilizando un Fluor Imager SI (fabricado por Molecular Dynamics).

(6) Análisis del nivel de expresión del gen de β-actina mediante RT-PCR

15 Con el fin de amplificar el ADNc de β-actina mediante PCR, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 15 y nº 16] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla preparada a partir de cada estirpe celular en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 14 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras someter 10 µl de la solución de reacción de PCR a electroforesis en agarosa, se tiñeron los fragmentos de ADN utilizando verde Cybrer (fabricado por BMA) y después se midió la cantidad del fragmento de ADN de aproximadamente 800 pb utilizando un Fluor Imager SI (fabricado por Molecular Dynamics).

(7) Niveles de expresión de los genes de GMD, GFPP, FX y FUT8 en cada estirpe celular

25 La cantidad de fragmento amplificado por PCR de cada gen en las cepas 5-03 y CHO/CCR4-LCA se calculó dividiendo los valores de las cantidades de los fragmentos amplificados por PCR obtenidos del ADNc de GMD, GFPP, FX y FUT en cada estirpe celular medidos en los ítems (2) a (6) por el valor de la cantidad del fragmento amplificado por PCR obtenido del ADNc de β-actina en cada estirpe celular, y definiendo la cantidad de los fragmentos amplificados por PCR en las células CHO/DG44 como 1. Se muestran los resultados en la Tabla 7.

Tabla 7

	GMD	GEPP	FX	FUT8
Cepa CHO/DG44	1	1	1	1
Cepa 5-03	1,107	0,793	1,093	0,901
Células CHO/CCR4-LCA resistentes a LCA obtenidas de la cepa 5-03	0,160	0,886	0,920	0,875

35 Tal como se muestra en la Tabla 7, el nivel de expresión del gen GDM en CHO/CCR4-LCA se redujo a aproximadamente 1/10 en comparación con las otras estirpes celulares. En este caso el ensayo se llevó a cabo independientemente dos veces y se utilizó el valor promedio.

2. Análisis utilizando CHO/CCR4-LCA productor de anticuerpos híbridos humanos anti-CCR4 en la que se ha forzado la expresión del gen GMD(1) Construcción del vector de expresión pAGE249GMD del gen GMD obtenido de células CHO

45 Basándose en la secuencia de ADNc de GMD derivada de células CHO obtenida en el Ejemplo 17-1, se preparó un cebador 28-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 38 y un cebador 29-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 39. A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 38 y nº 39] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla de GMD preparado a partir de las células CHO en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 8 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo, y después 22 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C en un ciclo. Tras completar la reacción, la solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se conectó al vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α (fabricado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener un plásmido mt-C (ver la figura 46).

60 A continuación, basándose en la secuencia de ADNc de GMD derivada de células CHO obtenida en el Ejemplo 17-1,

se preparó un cebador 45-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 40 y un cebador 31-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 41. A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 40 y nº 41] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla de GMD preparado a partir de las células CHO en el ítem (1) como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 8 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo, y después 22 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras completar la reacción, la solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 150 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se conectó al vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α (fabricado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener el plásmido ATG (ver la figura 47).

A continuación, se dejó reaccionar 3 µg del plásmido CHO-GMD preparado en el Ejemplo 17-1 con el enzima de restricción SmaI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 900 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que el plásmido mt-C (1,4 µg) reaccionase con el enzima de restricción SmaI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 3,1 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN recuperados se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido, obteniendo el plásmido WT-N(-) (ver la figura 48).

A continuación, se dejó que 2 µg del plásmido WT-N(-) reaccionase con el enzima de restricción BamHI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que el plásmido pBluescript SK(-) (3 µg, fabricado por Stratagene) reaccionase con el enzima de restricción BamHI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN recuperados se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido, obteniendo el plásmido WT-N(-) en pBS (ver la figura 49).

A continuación, se dejó que 2 µg del plásmido WT-N(-) en pBS reaccionase con el enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 4 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que una porción de 2 µg del plásmido ATG reaccionase con el enzima de restricción HindIII (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, se recuperó un ADN llevando a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol y se dejó que reaccionase con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas, el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 150 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN respectivos recuperados se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido, obteniendo el plásmido WT en pBS (ver la figura 50).

A continuación, se dejó que reaccionase 2 µg del plásmido pAGE249 con los enzimas de restricción HindIII y BamHI (ambos fabricados por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas y el digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 6,5 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que reaccionase el plásmido WT (2 µg) con los enzimas de restricción HindIII y BamHI (ambos fabricados por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas y el digerido se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN respectivos recuperados se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5 α se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido, obteniendo el plásmido pAGE249GMD (ver la figura 51).

5 (2) Expresión estable del gen GMD en CHO/CCR4-LCA

10 El vector de expresión pAGE249GMD (5 μ g) del gen GMD obtenido de células CHO linearizado mediante la digestión del mismo con el enzima de restricción FspI (fabricado por New England Biolabs), introducido en $1,6 \times 10^6$ células CHO/CCR4-LCA mediante electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990]. A continuación, las células se suspendieron en 30 ml de medio IMDM-dFBS(10) [medio IMDM (fabricado por Gibco BRL) complementado con 10% de dFBS] que contenía MTX 200 nM (fabricado por Sigma) y cultivadas utilizando un matraz de 182 cm² (fabricado por Greiner) a 37°C durante 24 horas en un incubador con 5% de CO₂. Tras cultivarlas, el medio se cambió por medio IMDM-dFBS(10) que contenía 0,5 mg/ml de higromicina y MTX 200 nM (fabricado por Sigma), seguido del cultivo durante 19 días, obteniendo colonias de transformantes resistentes a higromicina.

15 De la misma manera, se introdujo el vector pAGE249 en CHO/CCR4-LCA mediante el mismo método, obteniendo colonias de transformantes resistentes a higromicina.

20 (3) Cultivo de CHO/CCR4-LCA expresantes de gen GMD y purificación del anticuerpo

25 Utilizando el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía MTX 200 nM (fabricado por Sigma) y 0,5 mg/ml de higromicina, las células transformantes expresantes de GMD obtenidas en el ítem (2) se cultivaron utilizando un matraz de 182 cm² (fabricado por Greiner) a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. Varios días después, tras alcanzar la densidad celular la confluencia, se descartó el sobrenadante del cultivo y las células se lavaron con 25 ml de tampón PBS (fabricado por Gibco BRL) y después se mezclaron con 35 ml de medio EXCELL 301 (fabricado por JRH). Tras cultivarlas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ durante 7 días, se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se purificó el anticuerpo híbrido anti-CCR4 a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 De la misma manera, las células transformantes en las que se había introducido el vector pAGE249 se cultivaron mediante el mismo método y después se recuperó el anticuerpo híbrido anti-CCR4 y se purificó a partir del sobrenadante de cultivo.

35 (4) Medición de la resistencia a lectinas en células transformadas

40 Las células transformantes expresantes de GMD obtenidas en el ítem (2) se suspendieron en medio IMDM-dFBS(10) que comprendía MTX 200 nM (fabricado por Sigma) y 0,5 mg/ml de higromicina, proporcionando una densidad de 6×10^4 células/ml, y la suspensión se dispuso en porciones de 50 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). A continuación, un medio preparado mediante suspensión a concentraciones de 0 mg/ml, 0,4 mg/ml, 1,6 mg/ml o 4 mg/ml de LCA (aglutinina de Lens culinaris: fabricada por Vector Laboratories) en medio IMDM-dFBS(10) que contenía MTX 200 nM (fabricado por Sigma) y se añadieron 0,5 mg/ml de higromicina a la placa a razón de 50 μ l/pocillo, seguido del cultivo de las mismas a 37°C durante 96 horas en un incubador con 5% de CO₂. Tras cultivarlas, se añadió WST-1 (fabricado por Boehringer) a razón de 10 μ l/pocillo y se incubaron a 37°C durante 30 minutos en un incubador con 5% de CO₂ para producir el revelado del color y después se midió la absorbancia a 450 nm y a 595 nm (en adelante denominada "DO450" y "DO595", respectivamente) utilizando un lector de microplacas (fabricado por Bio-Rad). De la misma manera, se midieron mediante el mismo método las células transformantes en las que se había introducido el vector pAGE249. El ensayo se llevó a cabo dos veces de manera independiente.

50 La figura 52 muestra el número de células supervivientes en cada pocillo en porcentaje al utilizar un valor calculado restando DO595 de DO450 medidas anteriormente, como el número de supervivientes de cada grupo celular y el número de células supervivientes en cada uno de los pocillos libres de LCA se define como 100%. Tal como se muestra en la figura 52, se observó una reducción de la resistencia a LCA en las células CHO/CCR4-LCA expresantes de GMD y la proporción de supervivencia era de aproximadamente 40% en presencia de 0,2 mg/ml de LCA y la proporción de supervivencia era de aproximadamente 20% en presencia de 0,8 mg/ml de LCA. Por otra parte, en las células CHO/CCR4-LCA en las que se había introducido el vector pAGE249, la proporción de supervivencia era de 100% en presencia de 0,2 mg/ml de LCA y la proporción de supervivencia era de aproximadamente 80% incluso en presencia de 0,8 mg/ml de LCA. Basándose en estos resultados, se sugiere que el nivel de expresión del gen GMD en las células CHO/CCR4-LCA se encuentra reducido y, como resultado, se obtuvo una resistencia a LCA.

55 (5) Actividad citotóxica (actividad de ADCC) *in vitro* de anticuerpo híbrido anti-CCR4 obtenido de CHO/CCR4-LCA expresantes de GMD

60 Con el fin de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido en el ítem (3), se midió la actividad de ADCC de acuerdo con los métodos siguientes.

i) Preparación de una suspensión de células diana

Se añadieron 3,7 MBq equivalentes de una sustancia radioactiva $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a 1×10^6 células de CCR4-EL4 (ver el Ejemplo 8-7) cultivadas utilizando un medio preparado mediante la adición de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 sulfato (fabricado por Nacalai Tesque) al medio RPMI1640-FBS(10), seguido de la reacción a 37°C durante 90 minutos, marcando de esta manera las células con un isótopo radioactivo. Tras la reacción, las células se lavaron tres veces en la suspensión de medio RPMI1640-FBS(10) y la posterior centrifugación, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos en hielo para la disociación espontánea de la sustancia radioactiva. Tras la centrifugación, se ajustaron las células a 2×10^5 células/ml mediante la adición de 5 ml de medio RPMI1640-FBS(10) y se utilizaron como suspensión de células diana.

ii) Preparación de una suspensión de células efectoras

De una persona sana se recolectaron 50 ml de sangre venosa y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sodio (fabricado por Takeda Pharmaceutical). Utilizando Lymphoprep (fabricado por Nycomed Pharma AS), la mezcla se centrifugó siguiendo las instrucciones del fabricante para separar una capa de células mononucleares. Las células se lavaron tres veces mediante centrifugación utilizando medio RPMI1640-FBS(10) y después se resuspendieron en el medio, proporcionando una densidad de 2×10^6 células/ml y se utilizaron como suspensión de células efectoras.

iii) Medición de la actividad ADCC

La suspensión de células diana preparada en 1) se dispuso a razón de 50 μl (1×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, se añadieron 100 μl de la suspensión de células efectoras humanas preparada en 2) a lo anterior (2×10^5 células/pocillo, la proporción de células efectoras humanas a células diana era de 25: 1). Se añadió a lo anterior cada uno de los diversos anticuerpos híbridos anti-CCR4 (el anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado en el ítem (3), y KM2760-1 y KM3060), proporcionando una concentración final de entre 0,0025 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Tras la reacción, se centrifugó la placa y se midió la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante utilizando un contador γ . Se calculó la cantidad de ^{51}Cr disociado espontáneamente llevando a cabo el mismo procedimiento, utilizando únicamente el medio en lugar de la suspensión de células efectoras humanas y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la cantidad de ^{51}Cr disociado total llevando a cabo el mismo procedimiento, utilizando únicamente el medio en lugar de la solución de anticuerpo y una solución 1 N de ácido clorhídrico en lugar de la suspensión de células efectoras humanas y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. Se calculó la actividad ADCC basándose en la fórmula (II).

Los resultados de las mediciones de actividad de ADCC se muestran en la figura 53. Tal como se muestra en la figura 53, la actividad de ADCC del anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido de las CHO7CCR4-LCA expresantes de GMD se redujo en medida similar a la de KM3060 obtenido en el Ejemplo 8. Por otra parte, la actividad de ADCC del anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido de las CHO7CCR4-LCA en las que se había introducido el vector pAGE249 mostró un grado de actividad de ADCC similar a la del anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido a partir de las CHO/CCR4-LCA. Basándose en estos resultados, se sugiere que el nivel de expresión del gen GMD en las células CHO/CCR4-LCA se encuentra reducido y, como resultado, puede producirse un anticuerpo con una potente actividad de ADCC.

(6) Análisis de cadenas de azúcar del anticuerpo híbrido anti-CCR4 obtenido de CHO/CCR4-LCA expresantes de GMD

Las cadenas de azúcar que se unían al anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido en el ítem (3) se analizaron de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 14(4), mostrándose los resultados del análisis en la figura 55. En comparación con el anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado preparado a partir de CHO/CCR4-LCA en el Ejemplo 14, la proporción de cadenas de azúcar que no presentan α -1,6-fucosa en el anticuerpo híbrido anti-CCR4 purificado obtenido de las CHO/CCR4-LCA expresantes de GMD se redujo a 9% al calcular a partir del área del pico. De esta manera, se demostró que la proporción de cadenas de azúcar que no presentaban α -1,6-fucosa en el anticuerpo producido por la célula se reducía a un nivel similar al del anticuerpo producido por la cepa 5-03, mediante la expresión del gen GMD en las CHO/CCR4-LCA.

Ejemplo 16

Preparación de diversos genes codificantes de enzimas relacionados con la síntesis de cadenas de azúcar en las células CHO:

1. Determinación de la secuencia de ADNc de FX obtenido de células CHO(1) Extracción de ARN total de las células CHO/DG44

Las células CHO/DG44 se suspendieron en medio IMDM que contenía suero de feto bovino al 10% (fabricado por Life Technologies) y complemento HT a concentración 1x (fabricado por Life Technologies) y se inocularon 15 ml de la suspensión en un matraz T75 para la utilización en cultivo celular adherente (fabricado por Greiner), proporcionando una densidad de 2×10^5 células/ml. El segundo día después del cultivo de las mismas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂, se recuperaron 1×10^7 células y se extrajo el ARN total de las mismas utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

(2) Preparación de ADNc de cadena sencilla a partir de células CHO/DG44

El ARN total preparado en (1) se disolvió en 45 µl de agua estéril y se añadió a lo anterior 1 µl de ADNasa libre de ARNasa RQ1 (fabricada por Promega), 5 µl del tampón 10x de ADNasa adjunto y 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), seguido de la reacción a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico contaminante en la muestra. Tras la reacción, se purificó nuevamente el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 50 µl de agua estéril.

En 20 µl de la mezcla de reacción utilizando oligo(dT) como cebador, se sintetizó ADNc de cadena sencilla a partir de 3 µg de cada una de las muestras de ARN total obtenidas mediante reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de preamplificación SuperscriptTM para la síntesis del ADNc de primera cadena (fabricado por Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una solución acuosa diluida 50 veces de la solución de reacción en la clonación de GFPP y FX. Lo anterior se almacenó a -80°C hasta que fue utilizado.

(3) Preparación de fragmento parcial de ADNc de FX obtenido de hámster chino

Mediante el procedimiento a continuación se preparó el fragmento parcial de ADNc de FX obtenido de hámster chino.

En primer lugar, se diseñaron cebadores (mostrados en SEC ID nº 42 y nº 43) específicos para secuencias de nucleótidos comunes registradas en una base de datos pública, es decir, un ADNc de FX humano (GeneBank nº de acceso U58766) y un ADNc de ratón (GenBank nº de acceso M30127).

A continuación, se prepararon 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mmoles/l de los dNTP y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos (SEC ID nº 42 y SEC ID nº 43)] que contenía 1 µl del ADNc de cadena sencilla obtenido de células CHO/DG44 y se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos en un ciclo, y calentamiento final a 72°C durante 10 minutos.

Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y un fragmento amplificado específico de 301 pb se purificó utilizando el kit Quiacell Gel (fabricado por Qiagen) y se eluyó con 20 µl de agua estéril (en adelante el método se utiliza para la purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa). En un plásmido pCR2.1, se utilizaron 4 µl del fragmento amplificado para la inserción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) y se transformó *E. coli* DH5α con la solución de reacción mediante el método de Cohen *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, 1972] (en adelante el método se utiliza para la transformación de *E. coli*). Se aislaron muestras de ADN plasmídico siguiendo un método conocido [Nucleic Acids Research 7:1513, 1979] (en adelante se utilizó el método para el aislamiento de plásmido) a partir de las colonias resistentes a canamicina obtenidas para obtener 2 clones en los que se habían insertado fragmentos parciales de ADNc de FX, respectivamente. Se denominan pCRFX clon 8 y pCRFX clon 12.

La secuencia de nucleótidos del ADNc insertado en cada uno de los clon 8 de FX y clon 12 de FX se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó que cada uno de los ADNc insertados la secuencia de los cuales se había determinado codificaba una secuencia parcial de marco de lectura abierta (ORF) de FX de hámster chino.

(4) Síntesis de ADNc de cadena sencilla para RACE

Se prepararon muestras de ADNc de cadena sencilla para 5'- y 3'-RACE a partir del ARN total de CHO/DG44 extraído en el ítem (1) utilizando el kit de amplificación de ADNc RACE SMARTTM (fabricado por Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso como transcriptasa inversa se utilizó la transcriptasa inversa PowerScriptTM (fabricada por Clontech). Cada ADNc de cadena sencilla tras la preparación se diluyó 10 veces con el tampón de tricina-EDTA adjunto en el kit y se utilizó como molde para la PCR.

(5) Determinación mediante el método RACE del ADNc de longitud completa de FX obtenido de hámster chino

Basándose en la secuencia parcial del FX obtenida de hámster chino determinada en el ítem (3), se diseñaron los

cebadores FXGSP1-1 (SEC ID nº 44) y FXGSP1-2 (SEC ID nº 45) para 5'-RACE específico de FX de hámster chino y cebadores FXGSP2-1 (SEC ID nº 46) y FXGSP2-2 (SEC ID nº 47) para 3'-RACE específico de FX de hámster chino.

5 A continuación, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit de PCR Advantage2 (fabricado por Clontech), mediante la preparación de 50 µl de una solución de reacción [tampón para PCR Advantage2 (fabricado por Clontech), dNTP 0,2 mM, 0,2 µmoles/l de cebadores específicos de FX de hámster chino y concentración 1x de cebadores comunes (fabricados por Clontech)] que contenía 1 µl del ADNc de cadena sencilla obtenido de CHO/DG44 para RACE preparado en el ítem (4).

10 La PCR se llevó a cabo repitiendo 20 ciclos de calentamiento a 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo.

15 Tras completar la reacción, se diluyó 1 µl de la solución de reacción 50 veces con el tampón de tricina-EDTA y se utilizó a modo de molde 1 µl de la solución diluida. La solución de reacción se preparó nuevamente y la PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones. Los moldes, la combinación de cebadores utilizada en la primera y segunda PCR y la longitud de los fragmentos de ADN amplificados por las PCR se muestran en la Tabla 8.

20 Tabla 8

Combinación de cebadores utilizados en PCR RACE de ADNc de FX de hámster chino y tamaño de los productos de PCR			
5' RACE	Cebadores específicos de FX	Cebadores comunes	Tamaño del producto amplificado por PCR
Primera	FXGSP1-1	MCU (mezcla de cebadores universales)	
Segunda	FXGSP1-2	CUA (cebador universal anidado)	300 pb
3' RACE	Cebadores específicos de FX	Cebadores comunes	Tamaño del producto amplificado por PCR
Primera	FXGSP2-1	MCU (mezcla de cebadores universales)	
Segunda	FXGSP2-2	CUA (cebador universal anidado)	1.100 pb

25 Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y el fragmento amplificado específico de interés se purificó utilizando el kit de extracción en gel QiaexII (fabricado por Qiagen) y se eluyó con 20 µl de agua estéril. En un plásmido pCR2.1, se insertaron 4 µl del fragmento amplificado y se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción de acuerdo con las instrucciones adjuntas al kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen).

30 Se aislaron los ADN plasmídicos a partir de las colonias resistentes a canamicina que aparecieron, con el fin de obtener 5 clones de ADNc que contenían la región 5' de FX de hámster chino. Se denominaron FX5' clon 25, FX5' clon 26, FX5' clon 27, FX5' clon 28, FX5' clon 31 y FX5' clon 32.

De la misma manera, se obtuvieron 5 clones de ADNc que contenían la región 3' de FX de hámster chino. Estos clones 3' de FX se denominaron FX3' clon 1, FX3' clon 3, FX3' clon 6, FX3' clon 8 y FX3' clon 9.

35 La secuencia de nucleótidos de la fracción de ADNc de cada uno de los clones obtenidos mediante RACE 5' y 3' se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) según el método descrito en las instrucciones del fabricante. Mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos del ADNc determinadas mediante el método, se excluyeron los errores de lectura de las bases nucleótidas debidos a la PCR y se determinó la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ADNc de FX de hámster chino. La secuencia determinada se muestra en SEC ID nº 48.

40 2. Determinación de la secuencia de ADNc de GFPP obtenida de células CHO

45 (1) Preparación de fragmento parcial de ADNc de GFPP obtenido de hámster chino

Mediante el procedimiento a continuación se preparó el fragmento parcial de ADNc de GFPP obtenido de hámster chino.

50 En primer lugar, se compararon las secuencias de nucleótidos de un ADNc de GFPP (GenBank nº de acceso AF017445), las secuencias de EST de ratón con alta homología con la secuencia (GenBank nº de acceso AI467195, AA422658, BE304325 y AI466474) y secuencias de EST de rata (GenBank nº de acceso BF546372, AI058400 y AW144783), registradas en bases de datos públicas y se diseñaron los cebadores GFPP FW9 y GFPP RV9 (SEC ID nº 49 y nº 50) específicos para GFPP de rata en una región altamente conservada en estas tres especies.

5 A continuación, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una ADN polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo) mediante la preparación de 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), 0,2 mM de los dNTP y 0,5 µmoles/l de cebadores específicos para GFPP FW9 y GFPP RV9 (SEC ID nº 49 y SEC ID nº 50)] que contenía 1 µg del ADNc de cadena sencilla obtenido de CHO/DG44 preparado en el ítem 1(2). La PCR se llevó a cabo mediante el calentamiento a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos en un ciclo, y calentamiento final a 72°C durante 10 minutos.

10 Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y el fragmento amplificado específico de 1,4 Kpb se purificó utilizando el kit de extracción en gel QiaexII (fabricado por Qiagen) y se eluyó con 20 µl de agua estéril. En un plásmido pCR2.1, se utilizaron 4 µl del fragmento amplificado para la inserción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen) y se transformó *E. coli* DH5α con la solución de reacción.

15 Se aislaron los ADN plasmídicos a partir de las colonias resistentes a canamicina que aparecieron, con el fin de obtener 3 clones en los que se integraron respectivamente fragmentos parciales de ADNc de GFPP. Se denominan GFPP clon 8, GFPP clon 11 y GFPP clon 12.

20 La secuencia de nucleótidos del ADNc insertado en cada uno de los clones GFPP clon 8, GFPP clon 11 y GFPP clon 12 se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) siguiendo el método en las instrucciones del fabricante. Se confirmó que el ADNc insertado la secuencia del cual se había determinado codificaba una secuencia parcial de marco de lectura abierta (ORF) de GFPP de hámster chino.

25 (2) Determinación mediante el método RACE del ADNc de longitud completa de GFPP obtenido de hámster chino

30 Basándose en la secuencia parcial del FX obtenida de hámster chino determinada en el ítem 2(1), se diseñaron los cebadores GFPP GSP1-1 (SEC ID nº 52) y GFPP GSP1-2 (SEC ID nº 53) para 5'-RACE específico de FX de hámster chino y cebadores GFPP GSP2-1 (SEC ID nº 54) y GFPP GSP2-2 (SEC ID nº 55) para 3'-RACE específico de GFPP de hámster chino.

35 A continuación, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit de PCR Advantage2 (fabricado por Clontech), mediante la preparación de 50 µl de una solución de reacción [tampón para PCR Advantage2 (fabricado por Clontech), dNTP 0,2 mM, 0,2 µmoles/l de cebadores específicos de GFPP de hámster chino para RACE y concentración 1x de cebadores comunes (fabricados por Clontech)] que contenía 1 µl del ADNc de cadena sencilla obtenido de CHO/DG44 para RACE preparado en el ítem (4).

40 La PCR se llevó a cabo repitiendo 20 ciclos de calentamiento a 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo.

45 Tras completar la reacción, se diluyó 1 µl de la solución de reacción 50 veces con el tampón de tricina-EDTA y se utilizó a modo de molde 1 µl de la solución diluida. La solución de reacción se preparó nuevamente y la PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones. Los moldes, la combinación de cebadores utilizada en la primera y segunda PCR y la longitud de los fragmentos de ADN amplificados mediante las PCR se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Combinación de cebadores utilizados en PCR RACE de ADNc de GFPP de hámster chino y tamaño de los productos de PCR			
5' RACE	Cebadores específicos de GFPP	Cebadores comunes	Tamaño del producto amplificado por PCR
Primera	GFPPGSP1-1	MCU (mezcla de cebadores universales)	
Segunda	GFPPGSP1-2	CUA (cebador universal anidado)	1.100 pb
3' RACE	Cebadores específicos de GFPP	Cebadores comunes	Tamaño del producto amplificado por PCR
Primera	GFPPGSP2-1	MCU (mezcla de cebadores universales)	
Segunda	GFPPGSP2-2	CUA (cebador universal anidado)	1.400 pb

50 Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y el fragmento amplificado específico de interés se purificó utilizando el kit de extracción en gel QiaexII (fabricado por Qiagen) y se eluyó con 20

µl de agua estéril. En un plásmido pCR2.1, se insertaron 4 µl del fragmento amplificado y se transformó *E. coli* DH5α utilizando la solución de reacción de acuerdo con las instrucciones adjuntas al kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen).

- 5 Se aislaron los ADN plasmídicos a partir de las colonias resistentes a canamicina que aparecieron, con el fin de obtener 4 clones de ADNc que contenían la región 5' de GFPP de hámster chino. Se denominaron GFPP5' clon 1, GFPP5' clon 2, GFPP5' clon 3 y GFPP5' clon 4.

De la misma manera, se obtuvieron 5 clones de ADNc que contenían la región 3' de GFPP de hámster chino. Se denominaron GFPP3' clon 10, GFPP3' clon 16 y GFPP3' clon 20.

La secuencia de nucleótidos del ADNc de cada uno de los clones obtenidos mediante RACE 5' y 3' se determinó utilizando el secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer) según el método descrito en las instrucciones del fabricante. Mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos del ADNc después de la determinación de las secuencias de nucleótidos, se excluyeron los errores de lectura de las bases debidos a la PCR y se determinó la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ADNc de GFPP de hámster chino. La secuencia determinada se muestra en SEC ID nº 51.

Ejemplo 17

20 Preparación de gen GDM obtenido de células CHO:

1. Determinación de la secuencia de ADNc de GMD obtenida de células CHO

- 25 (1) Preparación de ADNc de gen GMD obtenido de células CHO (preparación de ADNc parcial excluyendo las secuencias 5'- y 3'-terminales)

Se buscó el ADNc de GMD obtenido de roedores en una base de datos pública (BLAST) utilizando una secuencia de ADNc de GMD de origen humano (GenBank nº de acceso AF042377) registrada en GenBank como pregunta y se obtuvieron tres tipos de secuencia EST de ratón (GenBank nº de acceso BE986856, BF158988 y BE284785). Mediante la ligación de estas secuencias EST, se determinó una secuencia de ADNc de GMD de ratón deducida.

Basándose en la secuencia de ADNc de GMD de origen ratón, se generó un cebador 28-mero que presentaba la secuencia representada por SEC ID nº 56, un cebador 27-mero que presentaba la secuencia representada por SEC ID nº 57, un cebador 25-mero que presentaba la secuencia representada por SEC ID nº 58, un cebador 24-mero que presentaba la secuencia representada por SEC ID nº 59 y un cebador 25-mero que presentaba la secuencia representada por SEC ID nº 60.

A continuación, con el fin de amplificar el ADNc de GMD obtenido de células CHO, se llevó a cabo una PCR mediante el método a continuación. Una porción de 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de dos cebadores de ADN sintéticos] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla obtenido de células CHO preparado en el Ejemplo 15-1(1) como molde. En este caso, se utilizaron las combinaciones de SEC ID nº 56 y SEC ID nº 57, SEC ID nº 58 y SEC ID nº 57, SEC ID nº 56 y SEC ID nº 59 o SEC ID nº 56 y SEC ID nº 60 a modo de cebadores de ADN sintéticos. La reacción se llevó a cabo utilizando un ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y los posteriores 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo.

La solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa para encontrar que se había amplificado un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kpb en el producto de PCR al utilizar los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y nº 57, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1,1 kpb en el producto de PCR al utilizar los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 57 y nº 59, se amplificó un fragmento de aproximadamente 350 pb en el producto de PCR al utilizar los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y nº 59 y se amplificó un fragmento de aproximadamente 1 kpb en el producto de PCR al utilizar los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y nº 60. Se recuperaron los fragmentos de ADN utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN recuperados se ligaron a un vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y se transformó *E. coli* DH (preparado por Toyobo) utilizando las muestras obtenidas de ADN plasmídico recombinante, obteniendo de esta manera los plásmidos 22-8 (que presenta un fragmento de ADN de aproximadamente 1.2 kpb amplificado a partir de cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y SEC ID nº 57), 23-3 (que presenta un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kpb amplificado a partir de cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 58 y SEC ID nº 57), 31-5 (un fragmento de ADN de aproximadamente 350 pb amplificado a partir de cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y SEC ID nº 59) y 34-2 (que presenta un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kpb amplificado a partir de cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 56 y SEC ID nº 60). La secuencia de ADNc de GMD obtenida de células CHO contenida en dichos plásmidos se determinó del modo habitual utilizando un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) (ya que una secuencia de 28 bases situada

cadena abajo del codón de inicio metionina en el lado 5'-terminal y una secuencia de 27 bases situada cadena arriba del codón de terminación en el lado 3'-terminal originadas en secuencias de ADN de oligo sintético, son secuencias de ADNc de GMD de ratón).

- 5 Además, se llevaron a cabo las etapas siguientes con el fin de preparar un plásmido en el que se combinaron los fragmentos de ADNc de GMD obtenidos de células CHO contenidos en los plásmidos 22-8 y 34-2. Se dejó que reaccionase el plásmido 22-8 (1 µg) con el enzima de restricción EcoRI (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 16 horas y el digerido se sometió a electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 4 kpb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que reaccionase el plásmido 34-2 (2 µg) con el enzima de restricción EcoRI a 37°C durante 16 horas y el digerido se sometió a electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 150 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por Bio 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN recuperados se sometieron respectivamente a desfosforilación terminal utilizando fosfatasa alcalina de intestino bovino (fabricada por Takara Shuzo) y después se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y se transformó *E. coli* DH5α (preparado por Toyobo) utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido, obteniendo un plásmido CHO-GMD (ver la figura 54).

(2) Determinación de la secuencia 5'-terminal de ADNc de GMD obtenida de células CHO

- 20 Se preparó un cebador 24-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 61 a partir de las secuencias de nucleótidos de la región no codificante del lado 5'-terminal del ADNc de GMD humano y de ratón obtenido de células CHO, y un cebador 32-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 62 a partir de la secuencia de ADNc de GMD obtenida de células CHO y se llevó a cabo la PCR mediante el método proporcionado a continuación para la amplificación del ADNc. A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 61 y nº 62] que contenían 0,5 µl del ADNc de cadena sencilla de GMD preparado en el Ejemplo 15-1(1) como molde, y se llevó a cabo la reacción en el mismo utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 20 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo, seguido de 18 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras el fraccionamiento de la solución de reacción de PCR mediante electroforesis en agarosa, se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se ligó a un vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5α (fabricado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener de esta manera 5'-GMD del plásmido. Utilizando un secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer), se determinó la secuencia de nucleótidos de 28 bases situada cadena bajo de la metionina de inicio del ADNc de GMD obtenida de células CHO contenida en el plásmido.

40 (3) Determinación de la secuencia 3'-terminal del ADNc de GMD obtenido de células CHO

- Con el fin de obtener la secuencia 3'-terminal del ADNc de GMD obtenida de células CHO, se llevó a cabo el método RACE mediante el método a continuación. Se preparó ADNc de cadena sencilla para 3'-RACE a partir del ARN obtenido de células CHO obtenido en el Ejemplo 15-1(1) utilizando el kit de amplificación de ADNc RACE SMART™ (fabricado por Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso como transcriptasa inversa se utilizó la transcriptasa inversa PowerScript™ (fabricada por Clontech). Cada ADNc de cadena sencilla tras la preparación se diluyó 10 veces con el tampón de tricina-EDTA adjunto en el kit y se utilizó como molde para la PCR.

- 50 A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM del cebador de ADN sintético 25-mero mostrado en SEC ID nº 63 generado basándose en la secuencia del ADNc de GMD obtenido de células CHO determinada en el ítem (1)] y una concentración 1x de mezcla de cebadores universales (adjunta al kit de amplificación de ADNc por RACE SMART™, fabricado por Clontech) que contenía 1 µl del ADNc para 3'-RACE como molde, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo.

- 60 Tras completar la reacción, 1 µl de la solución de reacción de PCR se diluyó 20 veces con tampón de tricina-EDTA (fabricado por Clontech). A continuación, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM del cebador de ADN sintético 25-mero mostrado en SEC ID nº 64 generado basándose en la secuencia del ADNc de GMD obtenido de células CHO determinada en el ítem (1)] y 0,5 µM de cebador universal anidado (adjunto al kit de amplificación de ADNc por RACE SMART™, fabricado por Clontech) que contenía 1 µl de la solución acuosa diluida 20 veces a modo de molde] y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo.

Tras completar la reacción, la solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 700 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se ligó a un vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5 α (fabricado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener de esta manera 3'-GMD plasmídico. Utilizando un secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer), se determinó la secuencia de nucleótidos de 27 bases situada encima del codón de terminación del ADNc de GMD obtenido de células CHO contenido en el plásmido.

La secuencia del ADNc de longitud completa del gen de GMD obtenido de células CHO determinada en los ítems (1), (2) y (3) y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestran en SEC ID nº 65 y nº 71, respectivamente.

2. Determinación de la secuencia genómica que contenía el gen de GMD obtenido de células CHO/DG44

Se preparó un cebador 25-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 66 a partir de la secuencia de ADNc de GMD de ratón determinada en el Ejemplo 17-1. A continuación, se obtuvo un ADN genómico obtenido de células CHO mediante el método a continuación. Se suspendió KC861 obtenido de células CHO/DG44 en medio IMDM-dFBS(10)-HT(1) [medio IMDM-dFBS(10) que comprendía una concentración 1x de complemento HT (fabricado por Invitrogen)], proporcionando una densidad de 3×10^5 células/ml y la suspensión se dispuso a razón de 2 ml/pocillo en una placa de fondo plano de 6 pocillos para la utilización como célula adherente (fabricado por Greiner). Tras cultivarlas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ hasta la confluencia de las células sobre la placa, se preparó ADN genómico a partir de las células sobre la placa mediante un método conocido [Nucleic Acids Research 3:2303, 1976] y se disolvió durante la noche en 150 μ l de tampón TE-ARNasa (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mmoles/l, EDTA 1 mmol/l, 200 μ g/ml de ARNasa A).

Se preparó una solución de reacción (20 μ l) [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 μ M de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 59 y nº 66] que contenían 100 ng del ADN genómico obtenido a partir de células CHO/DG44 y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo. Tras completar la reacción, la solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se ligó a un vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5 α (preparado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener de esta manera un plásmido ex3. Utilizando un secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer), se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN genómico obtenido de células CHO contenido en el plásmido. Se muestra el resultado en la SEC ID nº 67.

A continuación, se generó un cebador 25-mero que presentaba la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 68 y un cebador 25-mero que presentaba la secuencia de nucleótido representada por SEC ID nº 69 basados en la secuencia del ADNc de GMD obtenido de células CHO determinada en el Ejemplo 17-1. A continuación, se prepararon 20 μ l de una solución de reacción [tampón Ex Taq 1x (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 unidades de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 μ M de los cebadores de ADN sintéticos de SEC ID nº 68 y SEC ID nº 69] que contenían 100 ng del ADN genómico obtenido de células CHO/DG44 y se llevó a cabo la PCR utilizando el ciclador térmico de ADN 480 (fabricado por Perkin Elmer) mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos posteriores de calentamiento a 94°C durante 17 minutos y 68°C durante 2 minutos en un ciclo.

Tras completar la reacción, la solución de reacción de PCR se fraccionó mediante electroforesis en agarosa y después se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pb utilizando el kit Gene Clean II (fabricado por BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN recuperado se ligó a un vector pT7Blue(R) (fabricado por Novagen) utilizando el kit de ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y *E. coli* DH5 α (preparado por Toyobo) se transformó utilizando el ADN plasmídico recombinante obtenido para obtener de esta manera un plásmido ex4. Utilizando un secuenciador de ADN 377 (fabricado por Perkin Elmer), se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN genómico obtenido de células CHO contenido en el plásmido. Se muestra el resultado en la SEC ID nº 70.

60 **Ejemplo 18**

Análisis de cadenas de azúcar de anticuerpos disponibles convencionalmente:

Las cadenas de azúcar de unión al anticuerpo herceptina anti-HER2neu disponible convencionalmente (fabricado por Genentech y Roche) producidas por células CHO como célula hospedadora se analizaron siguiendo el método del Ejemplo 10(6) (figura 31). Al calcularlo a partir del área de cada pico del diagrama de elución, el contenido de

5 cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa en la herceptina era de 16% y el contenido de cadenas de azúcar unidas a α -1,6-fucosa era de 84%. Se llevó a cabo el mismo análisis en otros anticuerpos disponibles comercialmente, el Rituxan (fabricado por Genentech, Roche e IDEC) y el Zenapax (fabricado por Roche y PDL) y el contenido de cadenas de azúcar libres de α -1,6-fucosa era inferior al de la herceptina.

10 La figura 31 es un gráfico que muestra el patrón de elución de las cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de herceptina, obtenido mediante el análisis de la misma mediante HPLC de fase inversa. La intensidad relativa de fluorescencia y el tiempo de elución se han representado gráficamente como ordena y abscisa, respectivamente. Las condiciones del análisis mediante HPLC de fase inversa, el análisis de la estructura de las cadenas de azúcar y el cálculo de las proporciones de grupos de cadena de azúcar que no contenían cadenas de azúcar con α -1,6-fucosa se llevó a cabo mediante los métodos del Ejemplo 11(6).

15 Aplicabilidad industrial

15 La presente invención proporciona una célula que puede producir una composición de anticuerpo y un procedimiento para producir una composición de anticuerpo utilizando la célula.

Texto libre del listado de secuencias

20 SEC ID nº 4 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 5 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 8 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 9 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 10 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 11 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 25 SEC ID nº 12 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 13 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 14 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 15 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 16 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 30 SEC ID nº 17 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 18 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 19 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 20 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 21 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 35 SEC ID nº 22 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 26 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 27 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 28 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 29 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 40 SEC ID nº 30 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 31 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 32 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 33 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 34 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 45 SEC ID nº 35 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 36 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 37 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 38 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 39 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 50 SEC ID nº 40 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 41 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 42 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 43 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 44 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 55 SEC ID nº 45 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 46 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 47 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 49 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 50 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 60 SEC ID nº 52 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 53 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 54 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 55 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 56 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 65 SEC ID nº 57 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
 SEC ID nº 58 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético

- SEC ID nº 59 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 60 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 61 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 62 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- 5 SEC ID nº 63 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 64 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 66 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 68 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético
- SEC ID nº 69 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético

10

Listado de secuencias

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

15 <120> CÉLULA QUE PRODUCE UNA COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO

<130> P-38524

<150> JP 2000-308526

20 <151> 2000-10-06

<160> 73

<170> PatentIn Ver. 2. 1

25

<210> 1

<211> 2008

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

30

<400> 1

```

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattett 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattett 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gaggggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
    
```

ES 2 620 359 T3

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
 agaaagctgg tatgtaatat caacaaagcc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
 gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
 tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
 gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
 gtggtcgcgc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggtc 1020
 gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtg 1080
 gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
 gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
 gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
 gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
 actgatgacc cttctttggt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
 agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
 cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttcttgt gtgtactttt 1500
 tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
 gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
 attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
 atcattggtg tggctggaaa ccattggaat gttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
 ggaaaaacag gcctgtacce ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
 cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
 gaagggctgc tgtgccctca agcccatg 2008

- 5 <210> 2
- <211> 1728
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

ES 2 620 359 T3

<400> 2

atgCGggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtaaac tccatcacgt ggtctactgt tcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggtg gatgggagac tgtgttttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct gcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccacccctcg 900
cctccttact taccactggc tgttcagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020

ES 2 620 359 T3

tggctgaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatfff cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tataatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatffat tagtgataac tctatffctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactffct ctcacaggct 1380
gactffctag tgtgtactff ttcacccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcate ctgatgcctc tgccaacttc cattctffgg atgacatcta ctatfftgga 1500
ggccaaaatg cccacaatca gattgctgff tatectcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggffattct 1620
aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatate cctcctacaa agtccgagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3
<211> 9196
5 <212> ADN
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3
tctagaccag gctggctctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgctg 60
ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tattfftgaa tatttgata 120
attacatta taattgtaag taaaaatff cagcctatff tgttatacat tfftgctaa 180
attatctff tffgaaagff ttgffgtcca taatagtcta gggaaacata aagffataat 240
tfftgctat gtafftgcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattff cagtgctata taagffgta 360

ES 2 620 359 T3

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
 atccttaage tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
 ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
 ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtggt agaaaactcc tagaaaacaa 600
 gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
 ttctctccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
 tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780
 atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
 aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
 cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
 aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
 cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
 agtagacaag acattaaata ttctttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
 atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggt 1200
 gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg gttttttgtg catttaaagt 1260
 caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
 cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttaattttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
 tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
 tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
 tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
 tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620

ES 2 620 359 T3

tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtta gccttctttt ggaattttta 1680
 ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
 tacatcatac ccacctgtaa ttattagigt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
 ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860
 ataacctttg ctctcttaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
 gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
 ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
 tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
 cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
 aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta cttttacct gatactgggt 2220
 agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
 ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
 gcacaggaca agaaagctgc ctcttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcatc 2400
 acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaca acagaaactt 2460
 attttctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
 aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttctt ggcgttggat 2580
 tatgctcatt ctttttgctt gggggacctt attgttttat atagtggtc atttggttcg 2640
 agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
 gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
 aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgacctt aggtataggg tctcagctg 2820
 ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
 tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940

ES 2 620 359 T3

ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
 attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTT 3060
 attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
 tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtga tccggaatgt gggtaattat 3180
 tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
 gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
 ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
 tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgctacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
 tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
 agatacagct gaatatatta cttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
 tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
 cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
 aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
 tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
 agtcaggac aagaagtggg cgatacttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
 caggagggt tatgaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
 gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
 gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
 tgttttcagc ctttttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
 aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
 tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaatTTTatt 4200

ES 2 620 359 T3

taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatntag 4260
 gtcctgaat aatcaactgaa tttctccat gttccatcta tagtactggt atttctgttt 4320
 tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgtttattgt 4380
 aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
 agaggctgta ttaattatga aactgttggg cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
 ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
 caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagttaa gaggagagag 4620
 cgatttctta tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttctgcct 4680
 ggccaatcag ccaatcagtg tttattcat tagccaataa aagaacatt tacacagaag 4740
 gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
 taatTTTTat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
 ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
 agagtttatt cagattacat ttaaggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
 cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
 gatgcatgca ttctgtgct cagctcactt ttctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
 tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataage 5160
 catctctcca gtccctcata tggctcttta agacacttct tttatattct tgtacataga 5220
 aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
 aatgtaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
 gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctccca ggctgttctc tagattctac 5400
 tagtaatgct gtttgtacac catccacagg gttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
 tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatTTTTgt 5520

ES 2 620 359 T3

gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatfff caaaagcagt taccacaactt tccaaatata atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaa catccttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttgtt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggtatata tctatattc tgtatttttt tctctgtca tatatttget ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata tttccatcaa gttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaa ttaatttgtg 6300
ttctatattt tttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atftttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggatgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaactaac tccgtactat 6780

ES 2 620 359 T3

cttgttttct gtgaattaac cccttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
 aacaagttha ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
 ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
 tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
 tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggeatata cacttacttc agttcatgca 7080
 atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
 ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
 gtaaataata tgaaaatggt gattatcacc ataattcacc tgtatccctt tgttattgta 7260
 gatthttgtga agttcctatt caagtccttg ttccctcctt aaaaacctgt tttttagtha 7320
 aataggthtt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactthttta aagttagata ttattthtcaa 7380
 gtatgthtcc ccagtctttg gcttgtatth tcatcccttc aatacatata thttttgtaat 7440
 ttattthtttt tatttaaat agaacaag ctgctthttac atgtcagtct cagttccctc 7500
 tccctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
 aggaagggtg aggcctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca thtgagcag 7620
 ggcttagacc ctccccagt tgtctaggt gagagagtat cctctatgt ggagagggct 7680
 cccaaagttc atthgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
 tgtccggacc tccaaactga ctctctcctt caggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
 tccagatat cagctgggg tccatgagca acccttggt caggtcagtt glltctgtag 7860
 gthtccccag cccggtcttg accctthtgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
 ccagagthca gctcagtht tagctgtggg tgtctgcatc tgettccatc agctactgga 7980
 tgagggctct aggatggcat ataaggtagt catcagthc attatcagag aagggcttht 8040
 aagthagctt cthgattatt gcttagattg thagthggg tcaacctgt aggtctctgg 8100

ES 2 620 359 T3

acagtgcag aattctctt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tccctttct 8160
 tgctctcacc cgttcctccc ctgactagat ctctctctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
 tccccctctc ccttctctt tcttctaact ccctctcccc tccaccacag atccccatta 8280
 gcttatgaga tcttgctctt attttagcaa aaccttttg gctataaaat taattaattt 8340
 aatatgctta tatcagggtt attttgcta gtattgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400
 accttaattg acatgtatcc ttatatag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460
 tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtctctt gcctgcatgc cagaagaggg 8520
 caccagatct cattcaaggt ggttgtagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
 gacctctgga agaacagtea gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag ccctgaagt 8640
 gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
 actgaattgt ttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttacc 8760
 ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcacc tcttattttt gtctgttggg ttatataggg 8820
 ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
 gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttgccc agaagaaggt 8940
 gtcatttct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
 aaacccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
 caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120
 atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
 aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

10 <400> 4
 actcatctg gaatcaga attgg 25

<210> 5

ES 2 620 359 T3

<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 5
cttgaccggt tctatcttct ctcg 24

10 <210> 6
<211> 979
<212> ADN
<213> Cricetulus griseus

15 <400> 6
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgtttag 60

acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120

agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180

tctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240

tggatgatcct gcagtgtggt gggatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300

ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360

tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atccattga 420

ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480

taaaaaaaga gtgtatctgg cactgatga cccttcttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600

ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacacttct tctcccagge 660

tgacttcctt gtgtgtaact tttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aatcatgca 720

aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actatthttg 780

aggccaaaat gccacaacc agattgcagt ttatctctac caacctgaa ctaaagagga 840

aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900

taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaac aggctgtac ccttctaca aagtccgaga 960

gaagatagaa acggtcaag 979

20 <210> 7
<211> 979
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

25

ES 2 620 359 T3

<400> 7
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgtttag 60
acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtga gctccccatt gtagacagcc ttcacacctg 180
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240
tggtgatcct gcagtgtggt ggggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420
agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccttgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcagge 660
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aatcatgca 720
aacctgcat cctgatgcct ctgcaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780
aggccaaaat gccacacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
taaagggtgc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960
gaagatagaa acggtcaag 979

5

<210> 8
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

15

<400> 8
aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt 40

20

<210> 9
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 9
 atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

5 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 10
 atttaaggtg ccgaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

15 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 11
 25 ctccaattat gaattatta gtg 23

<210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

35 <400> 12
 ggatgttga agccaagctt ctgg 25

<210> 13
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

45 <400> 13
 gtccatggtg atctgcagt gtgg 24

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 14
 caccaatgat atctccaggt tcc 23

60 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 15
 gatatcgctg cgctcgttgt cgac 24

5 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 16
 caggaaggaa ggctggaaaa gagc 24

15 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 17
 gatatcgctg cgctcgtcgt cgac 24

25 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 18
 caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

35 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 19
 atgcgggcat ggactggttc ctgg 24

45 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 20
 ctattttca gcttcaggat atgtggg 27

55 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

ES 2 620 359 T3

<400> 21
gtctgaagca ttatgtgtg aagc 24

5 <210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 22
gtgagtacat tcattgtact gtg 23

15 <210> 23
<211> 575
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

20 <400> 23
Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

ES 2 620 359 T3

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

ES 2 620 359 T3

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

ES 2 620 359 T3

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 24
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 24
 Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

ES 2 620 359 T3

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

ES 2 620 359 T3

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 25
 <211> 18
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Cys

<210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 26
 ctgtgtgac tcttaactct cagag 25

 <210> 27
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 27
 ccctcgagat aactcgtat agc 23

 <210> 28
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 28
 ggtaggcctc actaactg 18

 35 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 29
 45 catagaaaca agtaacaaca gccag 25

 <210> 30
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 30
 55 gagacttcag cccactcaa ttattggc 28

 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 65 <400> 31
 gaggccactt gtgtagcgcc aagtg 25

<210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 32
 aggaaggtgg cgctcatcac ggc 24

 <210> 33
 <211> 26
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 33
 taagggcaca agtcttaatt gcatcc 26

 <210> 34
 25 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 34
 caggggtgtt cccttgagga ggtgaa 27

 35 <210> 35
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 35
 45 cccctcacgc atgaagcctg gag 23

 <210> 36
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 36
 55 ggcaggagac cacctgcca ggtccac 28

 <210> 37
 <211> 28
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 37
 65 ggcgctggct taccggaga ggaatggg 28

<210> 38
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 38
 aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg 28

 <210> 39
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 39
 cgcgatcct caagcgttg ggtgtgcc 29

 <210> 40
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 40
 cccaagcttg ccacatggc tcacgtccc gctagctgcc cgagc 45

 35 <210> 41
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 41
 45 ccggaattct gccaaagtatg agccatcctg g 31

 <210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 42
 55 gccatccaga aggtggt 17

 <210> 43
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 65 <400> 43
 gtctgtcag ggaagat 17

<210> 44
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 44
 ggcaggagac caccttgca gtgccac 28

 <210> 45
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 45
 ggtgggctg tacctctg aacagggc 28

 <210> 46
 25 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 46
 ggcgctggct tacccgaga ggaatggg 28

 35 <210> 47
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 47
 45 ggaatgggtg ttgtctctc caaatgac 28

 <210> 48
 <211> 1316
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 50

ES 2 620 359 T3

<400> 48

gcccccccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
tggactggtg gaaccctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gactcctagt acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgtctggc ttaccoggag aggaatgggt gtttctctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag cctgtttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccgaa tatcaatac aacttgatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagcttcc gaggtgggca ctcgcaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcacettca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcacc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggog aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcttggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgc aagaactgag 1140
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
atccagtagg gccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca cttgtttgt 1260
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

5

<210> 49

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

ES 2 620 359 T3

<400> 49
gatcctgctg ggaccaaagt tgg 23

5 <210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 50
ctaacatcc caaggatgc tg 22

15 <210> 51
<211> 1965
<212> ADN
<213> Cricetulus griseus

20 <400> 51
acggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60

tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgotta caagcaacag ttgtcggaga 180

agctgaagag aaaggaattg ccccttggag ttaactacca tgttttact gatcctcctg 240

gaaccaaagt tggaaatgga ggateaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300

atggagacaa gtggaattcc ttcacagtc tgtaattca ctctggtggc tacagtcaac 360

gacttcccaa tgcaagcgt ttaggaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420

tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcattgaagc 480

ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540

ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600

gcaccacaca tggagtattt gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660

agtacaggca atgccaccgt ttctccata agcccagcat tgaaacatg caccacttta 720

atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gaggggggg gacaccacct 780

gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct atttacatg gatcataaat 840

cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900

cctatggtga ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960

ES 2 620 359 T3

cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020
 tcctcaaggg aacaccctg aatggtgtg tccttaataa ctccaggtt tatcacattg 1080
 gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttcggttacag gcagagctgg 1140
 gcttgcaatc catagcttcc agtgtcttcc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
 cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260
 aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcggaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
 tcatagaaaa agctgttctg ccccatgtt ctttctgtg ctctttaagt gtggagataa 1380
 atggacactt agaatttca actatggtgt ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
 ttaaaacat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgttcc ctgacttgtt 1500
 tagatatttg gaacctaaa gctatggaag aactatttcc aggaagtaag acgcagctga 1560
 gcctgtggac tgctogaatt ttcctgtct gttcttctct gaggtagtgc gttgcagcat 1620
 cccttgggat gttaaatgcc attcgaacc attcgccatt cagcctgagc aactcaagc 1680
 tgctgtccat ccagaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
 agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aatctttaa 1800
 tacaatggat ttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860
 gttcttctt cttctcccc tctctctt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
 aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52
 <211> 27
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 52
 caggggtgtt cccttgagga ggtggaa 27

<210> 53
 15 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 53
 cactgagcca gggccacac agcatcc 27

<210> 54
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 54
 ccctcagc atgaagcctg gag 23

 <210> 55
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 55
 tgccaccgtt tctccataa gccagc 27

 <210> 56
 25 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 56
 atggctcaag ctcccgtaa gtgcccga 28

 35 <210> 57
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 57
 45 tcaagcgtt gggttgtcc tcatgag 27

 <210> 58
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 58
 55 tccgggatg gcgagatggg caagc 25

 <210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 65 <400> 59
 cttgacatgg ctctgggctc caag 24

<210> 60
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 10 <400> 60
 ccacttcagt cggtcggtag tattt 25

 <210> 61
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
 20
 <400> 61
 cgctacccg cctgaggcga catg 24

 <210> 62
 25 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 62
 ggcagtgct gtcggtgagg tcacatagtc gc 32

 35 <210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 63
 45 gggccatgc caaggactat gtcg 24

 <210> 64
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

 <400> 64
 55 atgtggctga tgtacaaaa tgatg 25

 <210> 65
 <211> 1504
 <212> ADN
 60 <213> Cricetulus griseus

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1119)
 65

ES 2 620 359 T3

<400> 65

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48
 Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96
 Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144
 Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192
 Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg

ES 2 620 359 T3

50	55	60	
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg			240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met			
65	70	75	80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc			288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile			
85	90	95	100
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc			336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser			
105	110	115	
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat			384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp			
120	125	130	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt			432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu			
135	140	145	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga			480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly			
150	155	160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg			528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac			576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
185	190	195	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat			624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
200	205	210	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc			672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
215	220	225	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg			720

ES 2 620 359 T3

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 230 235 240

gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc 768
 Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255 260

gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc 816
 Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 265 270 275

ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca 864
 Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 280 285 290

ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat 912
 Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 295 300 305

gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat 960
 Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 310 315 320

ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335 340

tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg 1159
 Asn Pro Asn Ala
 375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219
 cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacagttt gtgggcacca ggacggggac 1279
 actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggetcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
 caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat 1399
 ttttgagtct tgagattggt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
 aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1504

- <210> 66
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 620 359 T3

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

5 <400> 66
atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67
<211> 59
10 <212> ADN
<213> Cricetulus griseus

<400> 67
ccgacagcac ctgctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

15 <210> 68
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

<400> 68
25 gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69
<211> 25
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

35 <400> 69
acctggata gaaaggggtg gtctc 25

<210> 70
<211> 125
40 <212> ADN
<213> Cricetulus griseus

<400> 70

ttgatggagt tggcaccttg cggettctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtcaa gaaatacccc 120
45 agaaa 125

<210> 71
<211> 376
<212> PRT
50 <213> Cricetulus griseus

ES 2 620 359 T3

<400> 71

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

ES 2 620 359 T3

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
120 125 130

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
135 140 145

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165 170 175 180

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
185 190 195

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
200 205 210

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
215 220 225

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245 250 255 260

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
265 270 275

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
280 285 290

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
295 300 305

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335 340

ES 2 620 359 T3

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

Asn Pro Asn Ala
 375

<210> 72

<211> 321

5 <212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 72

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

ES 2 620 359 T3

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 73

<211> 590

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

5

ES 2 620 359 T3

<400> 73

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser
 1 5 10 15

Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val
 20 25 30

Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln
 35 40 45

Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr
 50 55 60

His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp
 85 90 95

Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg
 100 105 110

Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu
 115 120 125

Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met
 130 135 140

Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp
 145 150 155 160

Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu
 165 170 175

Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly
 180 185 190

Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His
 195 200 205

Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser
 210 215 220

Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe
 225 230 235 240

ES 2 620 359 T3

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
 245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
 260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
 275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
 290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
 305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
 325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
 340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
 370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
 385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val
 420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
 435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
 450 455 460

ES 2 620 359 T3

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
 465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
 485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
 500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
 515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
 530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
 545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
 565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
 580 585 590

REIVINDICACIONES

1. Célula en la que

- 5 (i) la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es suprimida, o
- (ii) la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa y la actividad de la α -1,6-fucosiltransferasa son suprimidas,
- 10 mediante una técnica de ingeniería genética, en la que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:

(a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa),

15 (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximano 3,5-epimerasa, 4-reductasa);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa),

20 y en la que la técnica de ingeniería genética es una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en los (A), (B), (C) y (D) siguientes:

(A) una técnica de disrupción génica que dianiza un gen que codifica el enzima;

(B) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen que codifica el enzima;

(C) una técnica para introducir una mutación en el enzima;

25 (D) una técnica para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen que codifica el enzima.

2. Animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos, que comprende un genoma que se ha modificado de manera que la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa y la actividad de la α -1,6-fucosiltransferasa son disminuidas,

30 mediante una técnica de ingeniería genética, en el/la que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:

(a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa);

35 (b) Fx (GDP-ceto-6-desoximano 3,5-epimerasa, 4-reductasa);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa),

40 y en el/la que la técnica de ingeniería genética es una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en los (A), (B), (C) y (D) siguientes:

(A) una técnica de disrupción génica que dianiza un gen que codifica el enzima;

(B) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de un gen que codifica el enzima;

(C) una técnica para introducir una mutación en el enzima;

45 (D) una técnica para inhibir la transcripción y/o la traducción de un gen que codifica el enzima

50 en el/la que en dichos animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos un gen que codifica un anticuerpo ha sido introducido y el animal no humano o la planta transgénicos o descendencia de los mismos pueden producir una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se encuentra unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar en 20% o más de entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido complejas que se unen a la región Fc contenida en la composición de anticuerpo.

3. Animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2, que comprende un genoma que se ha modificado de manera que un gen que codifica el enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa o α -1,6-fucosiltransferasa es inactivado.

55 4. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que la GMD es una proteína codificada por un ADN de los (a) o (b) siguientes:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65;

60 (b) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 65 bajo unas condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GMD.

65 5. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que GMD es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71;
- 5 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados en y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y presenta actividad de GMD;
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 71 y presenta actividad de GMD.
- 10 6. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que la Fx es una proteína codificada por un ADN de los (a) o (b) siguientes:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48;
- 15 (b) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 48 bajo unas condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de Fx.
7. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que la Fx es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72;
- 25 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados en y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y presenta actividad de Fx,
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 72 y presenta actividad de Fx.
- 30 8. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que la GFPP es una proteína codificada por un ADN de los (a) o (b) siguientes:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51;
- 35 (b) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 51 bajo unas condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de GFPP.
9. Célula según la reivindicación 1 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según la reivindicación 2 o 3, en la/el que la GFPP es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73;
- 45 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados en y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y que presenta actividad de GFPP;
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 73 y presenta actividad de GFPP.
- 50 10. Célula, animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la/el que la α 1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los (a), (b), (c) y (d) siguientes:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1;
- (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2;
- 60 (c) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 1 bajo unas condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
- (d) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID nº 2 bajo unas condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.
- 65

11. Célula, animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la/el que la α 1,6-fucosiltransferasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los (a), (b), (c), (d), (e) y (f) siguientes:

- 5 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID: 23;
- (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID: 24;
- 10 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados en y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y presenta una actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
- 15 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados en y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y presenta una actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
- 20 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 23 y presenta una actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
- (f) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 24 y presenta una actividad de α 1,6-fucosiltransferasa.

25 12. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 11, que es resistente a por lo menos una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en la cadena de azúcar unida a N-glucósido compleja.

30 13. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 12, que es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en los (a) a (i) siguientes:

- (a) una célula de CHO derivada de un tejido de ovario de hámster chino;
- 35 (b) una estirpe celular de mieloma de rata, célula YB2/3HL.P2.G11.16.AG.20;
- (c) una estirpe celular de mieloma de ratón, célula NS0;
- (d) una estirpe celular de mieloma de ratón, célula SP2/0-Ag14;
- (e) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster sirio;
- (f) una célula de hibridoma productor de anticuerpos;
- (g) una célula Namalwa de estirpe celular de leucemia humana;
- 40 (h) una célula troncal embrionaria no humana;
- (i) una célula de óvulo fecundado no humano.

45 14. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 13 en la que es introducido un gen que codifica una molécula de anticuerpo.

15. Célula según la reivindicación 14, en la que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.

50 16. Procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 14 o 15 en un medio para producir y acumular la composición de anticuerpo en el cultivo; y recuperar la composición de anticuerpo a partir del cultivo.

55 17. Procedimiento según la reivindicación 16, que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos superior a una composición de anticuerpo obtenida a partir de su estirpe celular madre.

60 18. Animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el/la que el animal no humano transgénico es un animal seleccionado de entre el grupo que consiste en ganado bovino y vacuno, oveja, cabra, cerdo, caballo, ratón, rata, ave, mono y conejo.

65 19. Procedimiento para producir una composición de anticuerpo, que comprende recuperar una composición de anticuerpo a partir de tejido o líquido corporal, que comprende el anticuerpo, habiendo sido dicho tejido o líquido corporal aislados a partir de un animal no humano o planta transgénicos o la descendencia de los mismos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 y 18, en cuyo interior ha sido introducido un gen que codifica una molécula de anticuerpo.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.

5 21. Procedimiento según la reivindicación 19 o 20, que produce una composición de anticuerpo que presenta una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos superior a una composición de anticuerpo obtenida a partir de un animal no humano o planta o la descendencia de los mismos cuyo genoma no está modificado.

10 22. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 15 o animal no humano o planta transgénicos o descendencia de los mismos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 o 18, en la/el que dicha técnica según (D) cloniza un gen de un enzima relacionado con la síntesis de la GDP-fucosa o un gen de α 1,6-fucosiltransferasa con un constructo génico de ARNi, en la/el que dicho enzima relacionado con la síntesis de GDP-fucosa es un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste en los (a), (b) y (c) siguientes:

- 15 (a) GMD (GDP-manosa 4,6-deshidratasa);
(b) Fx (GDP-ceto-6-desoximannosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa);
(c) GFPP (GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa).

FIG. 1A

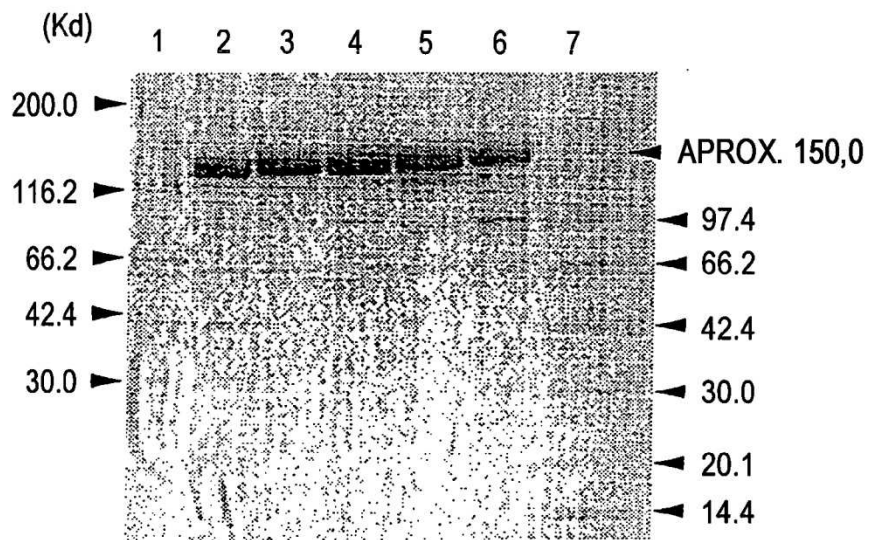


FIG. 1B

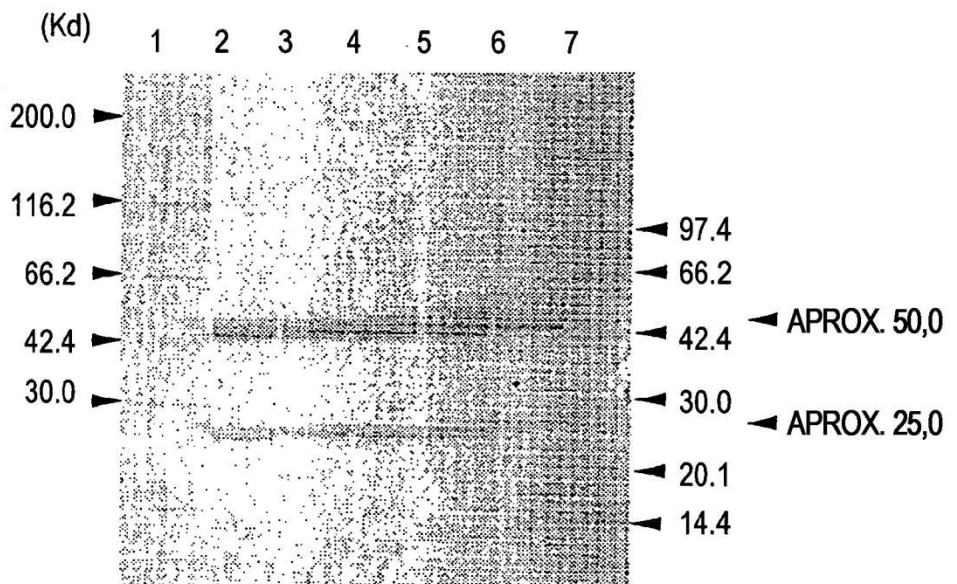


FIG. 2

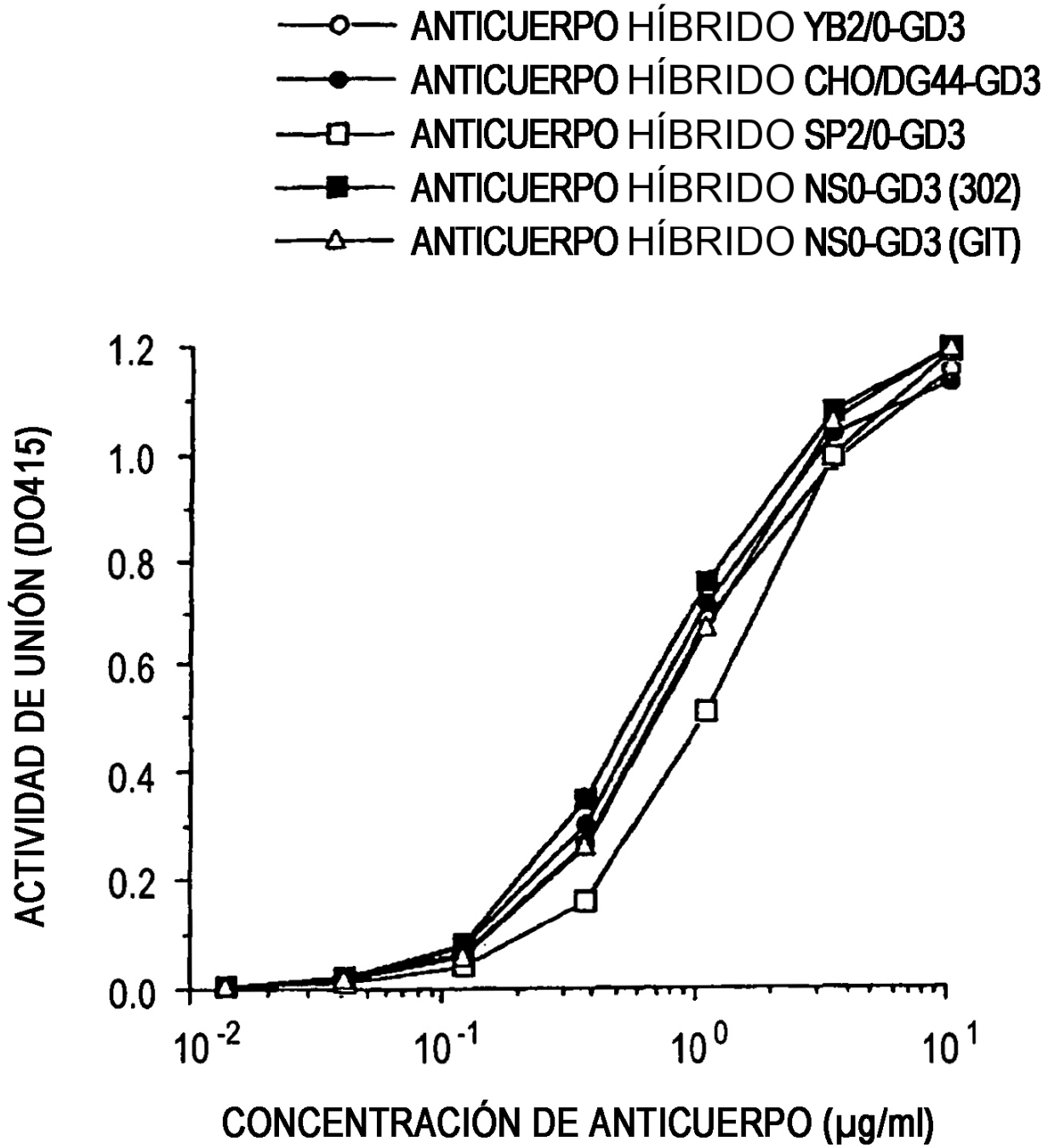


FIG. 3

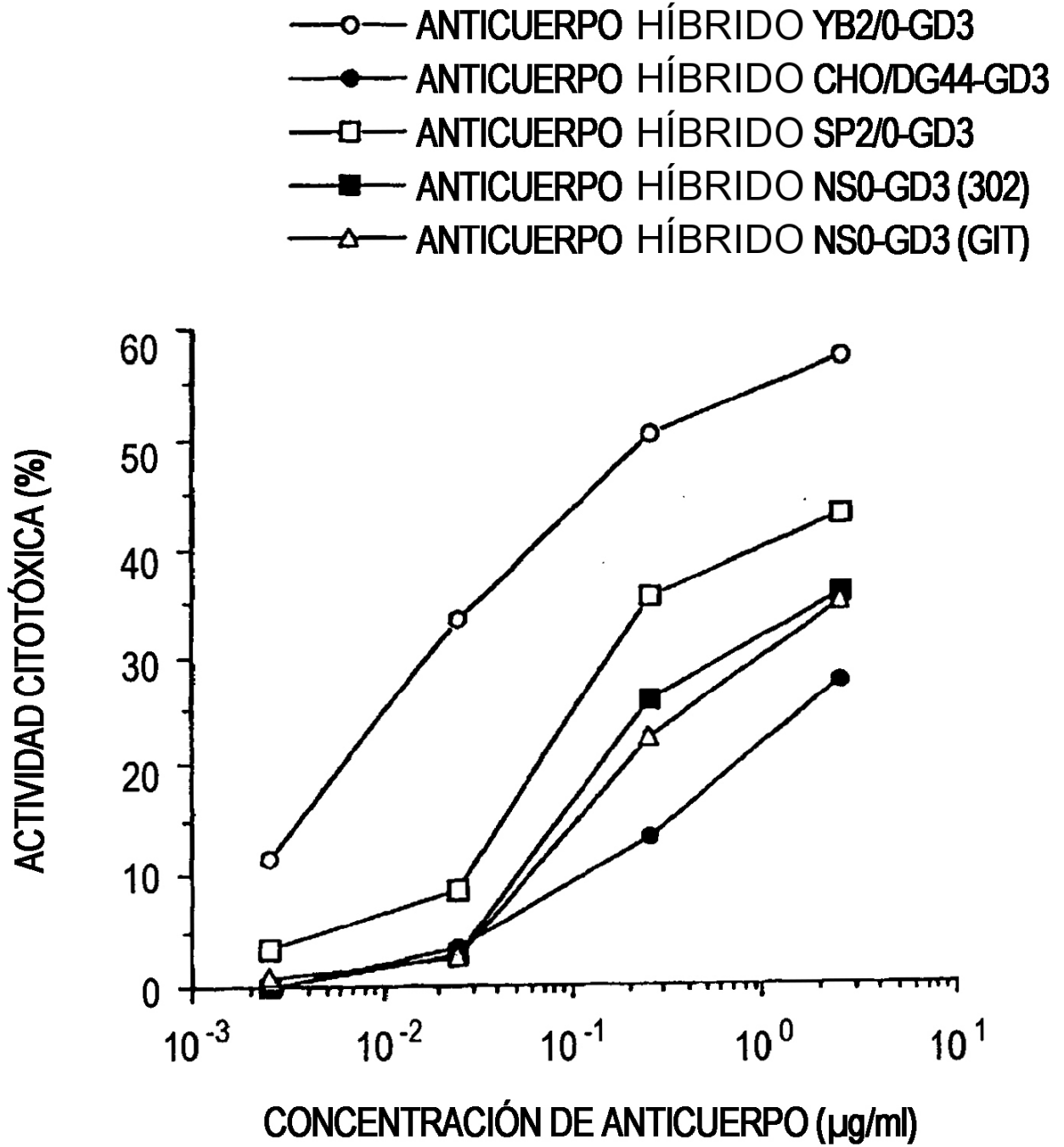


FIG. 4A

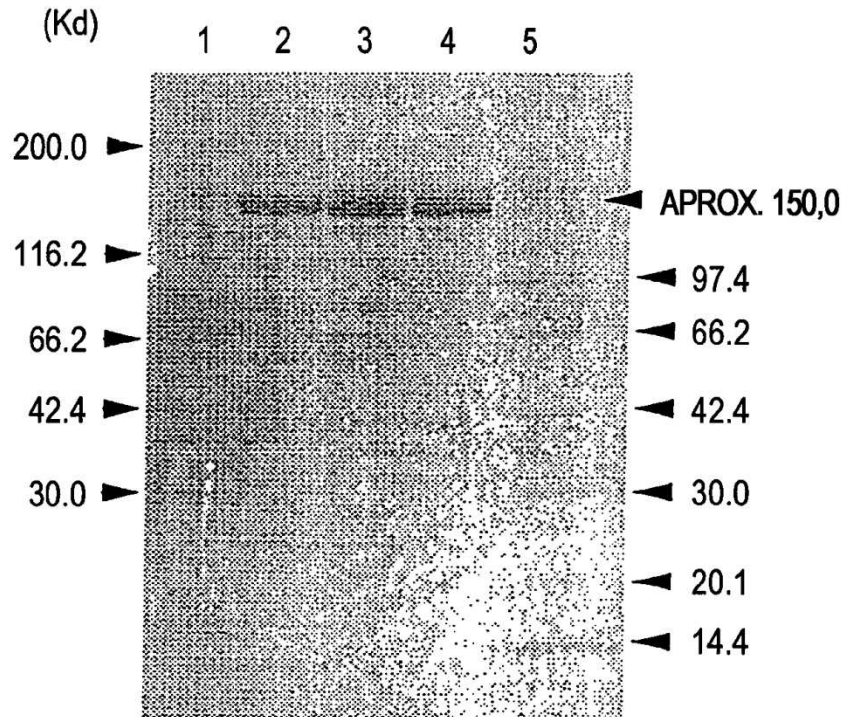


FIG. 4B

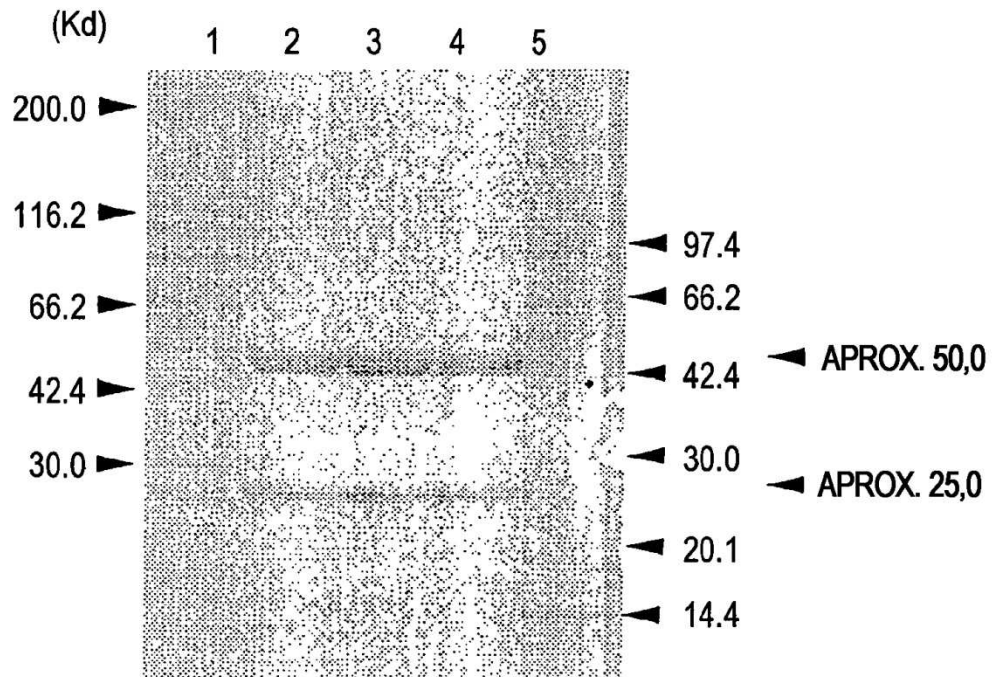


FIG. 5

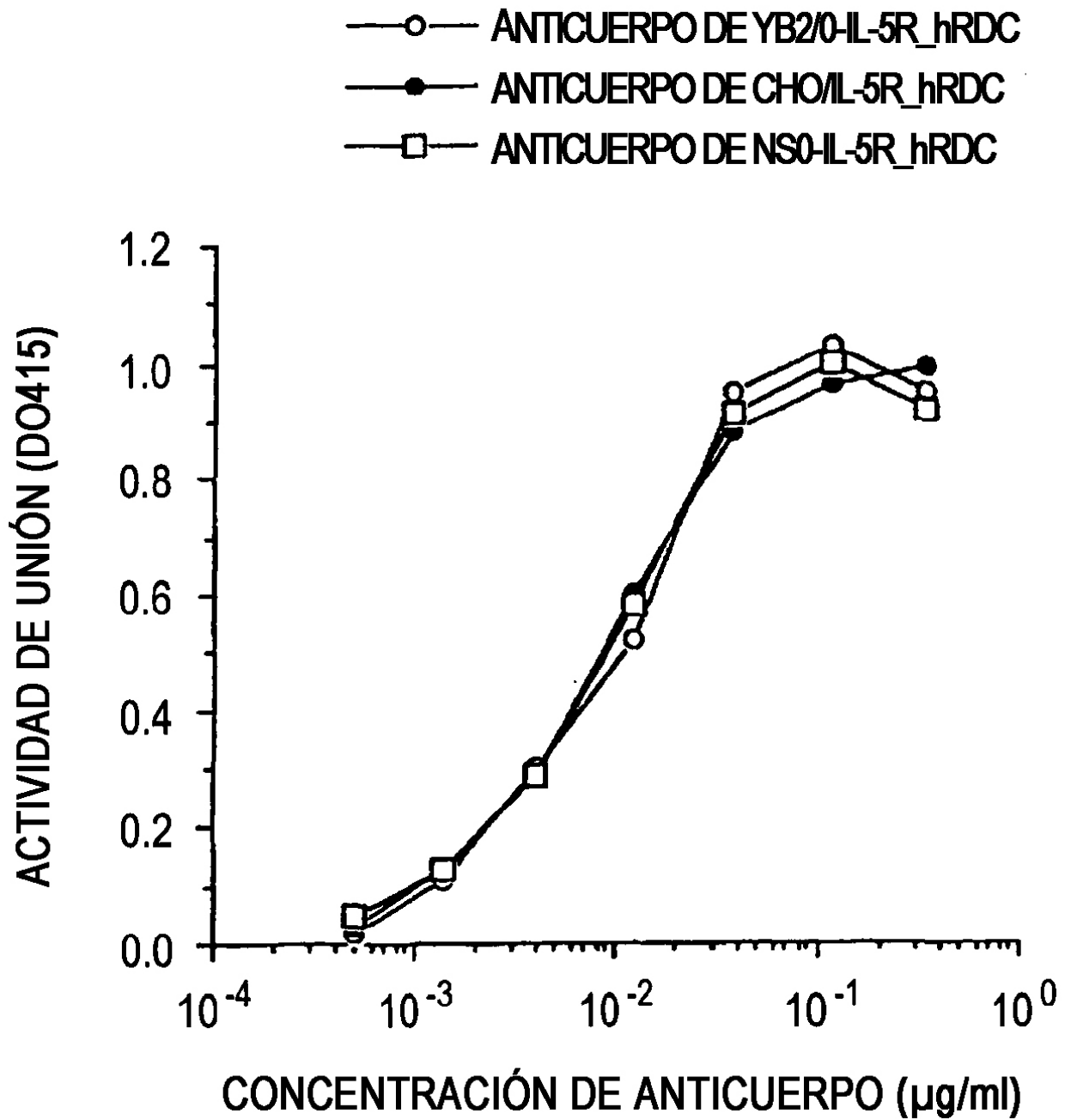


FIG. 6

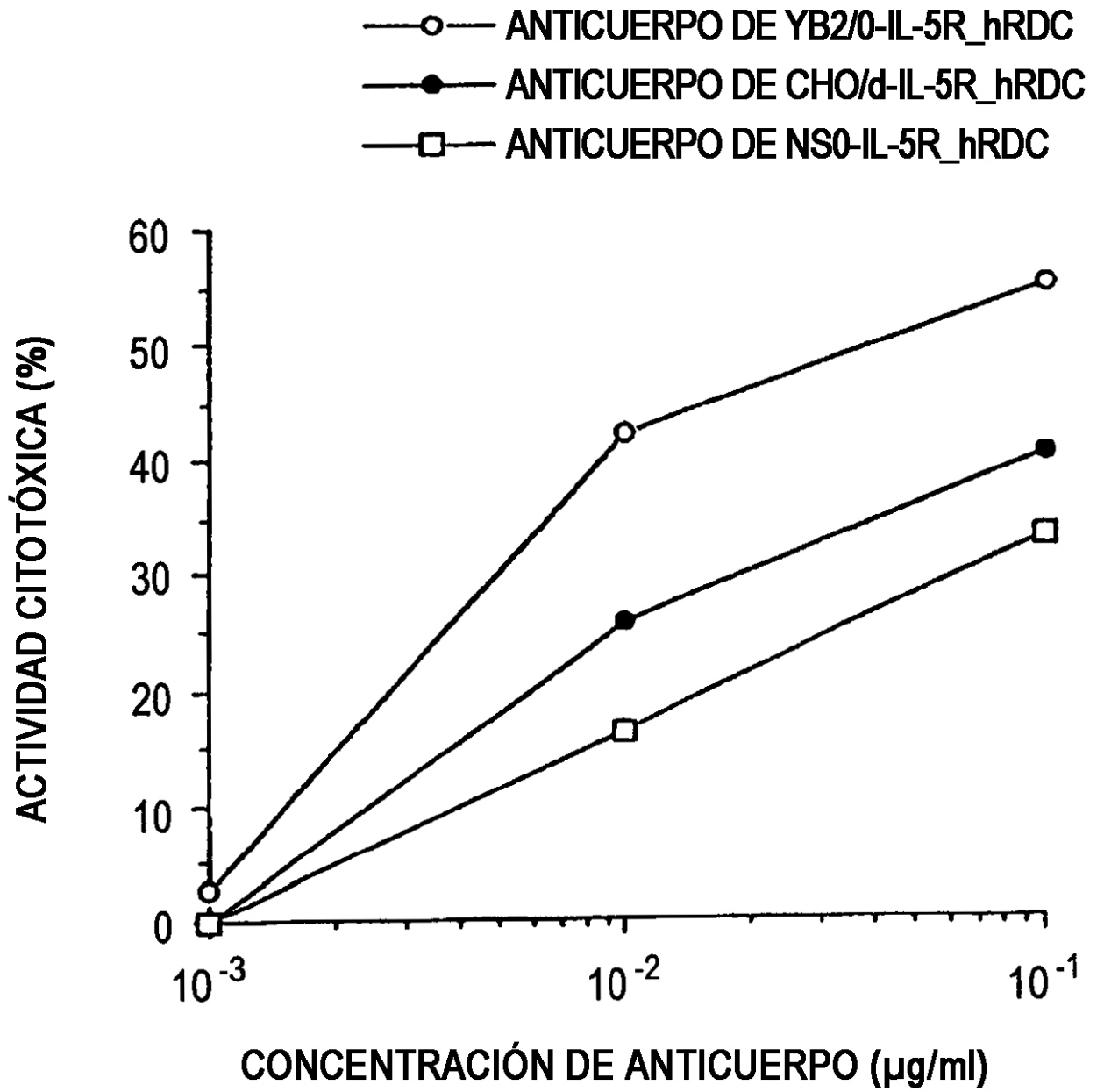


FIG. 7

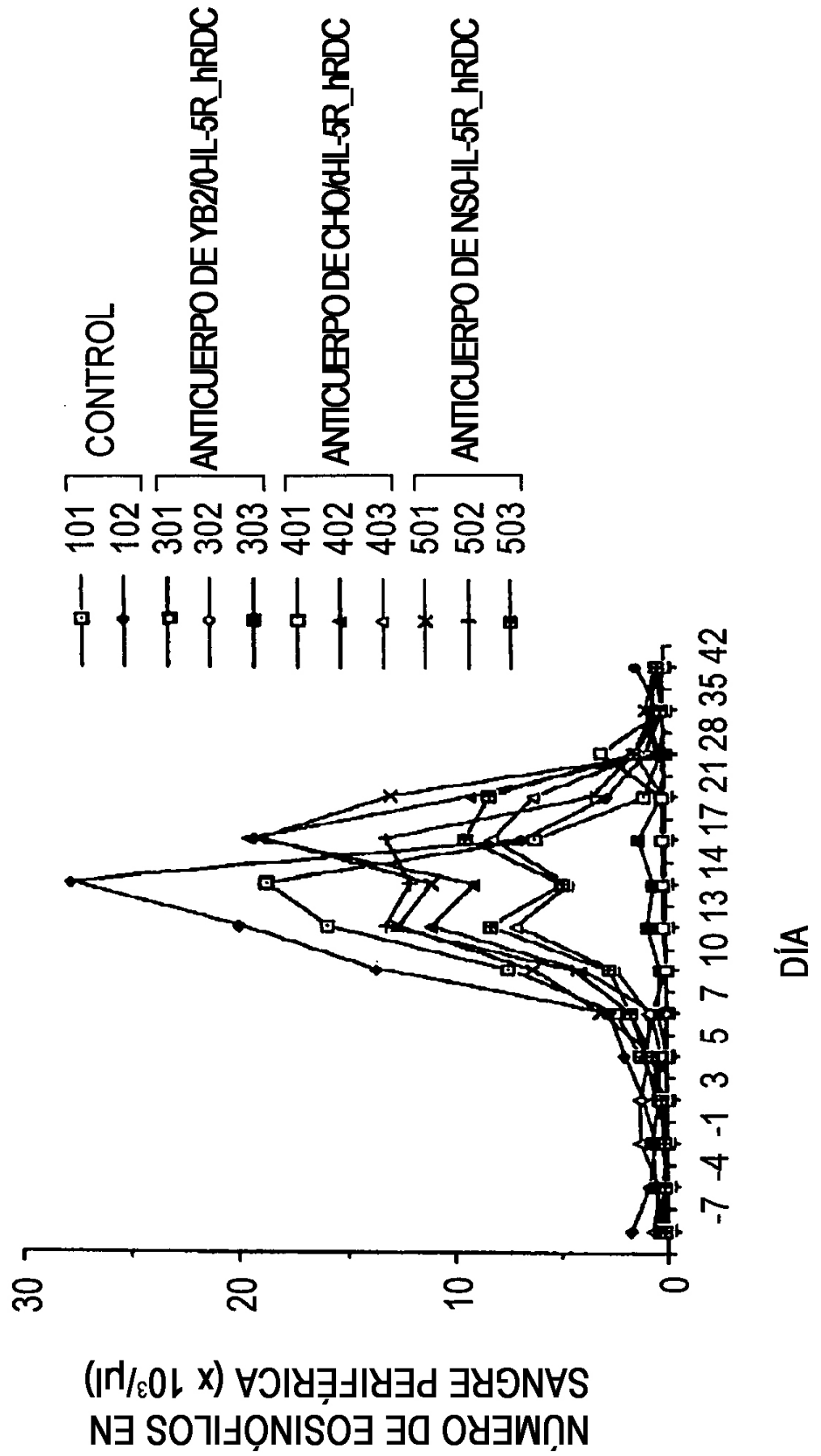


FIG. 8A

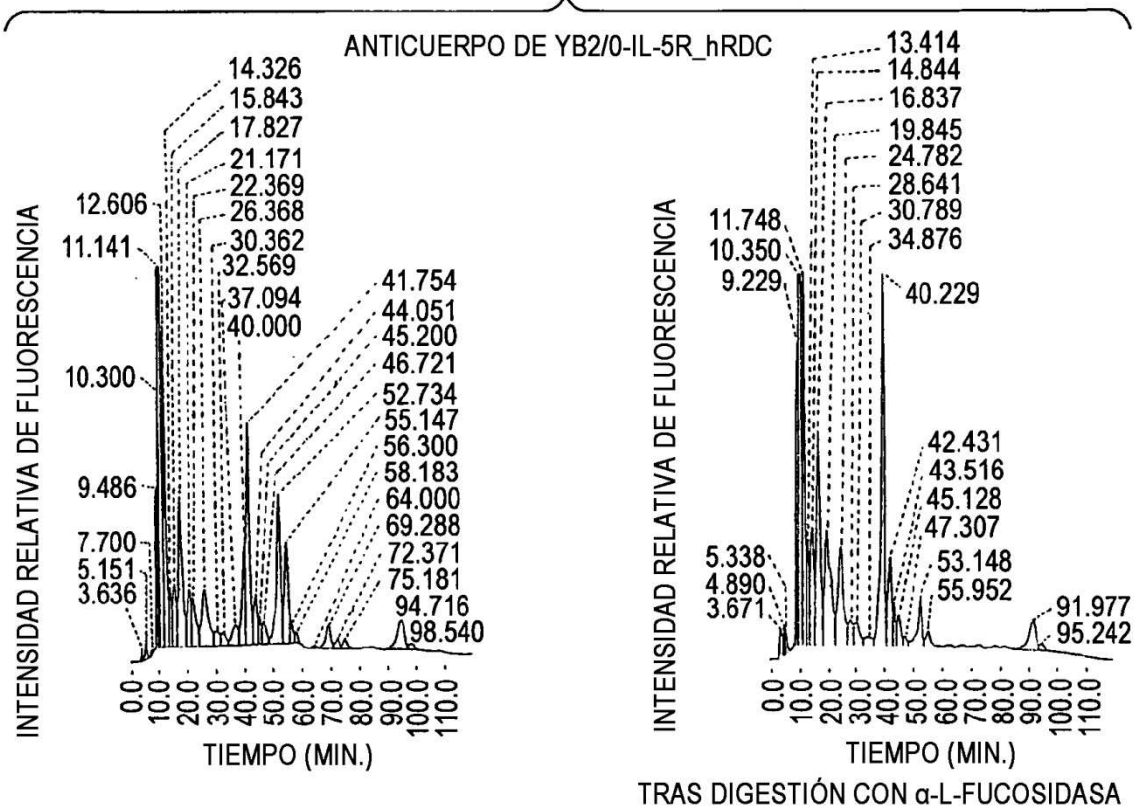


FIG. 8B

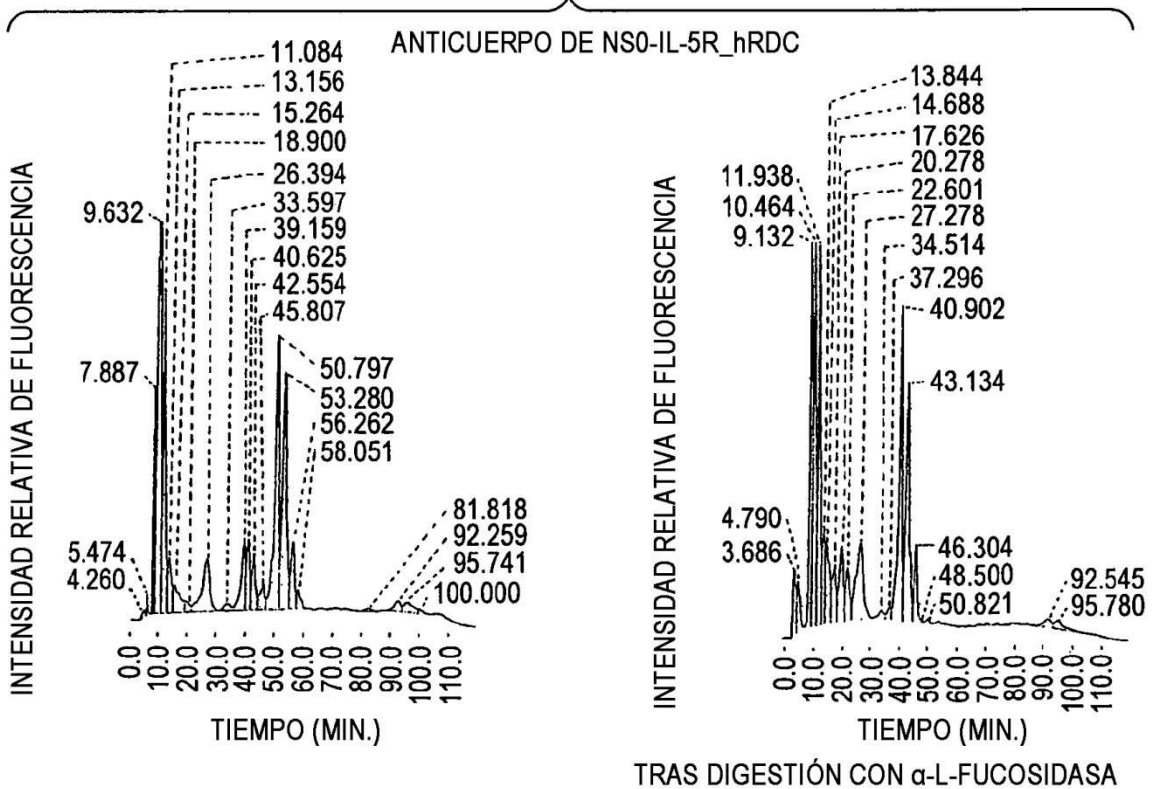


FIG. 9

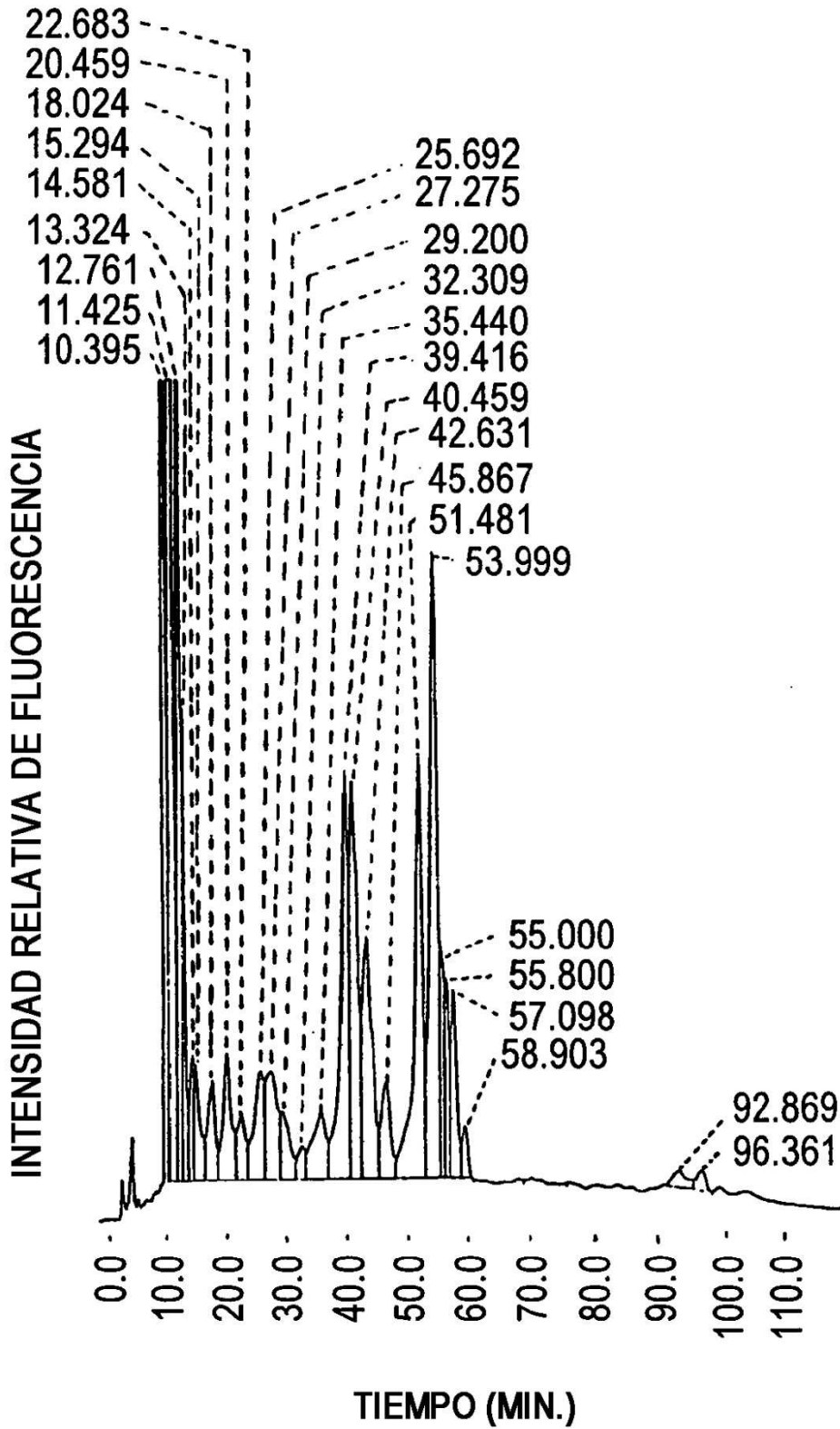


FIG. 10

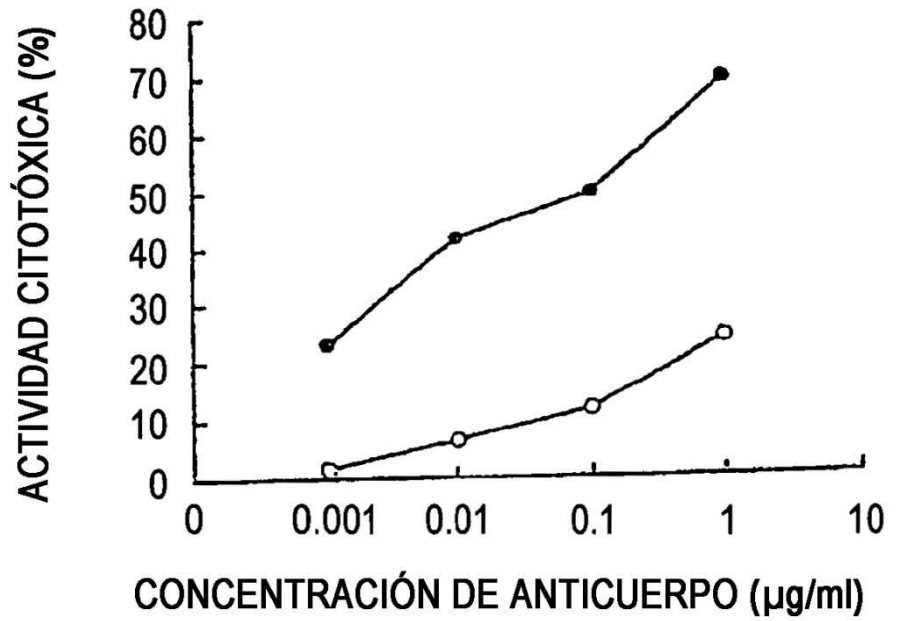
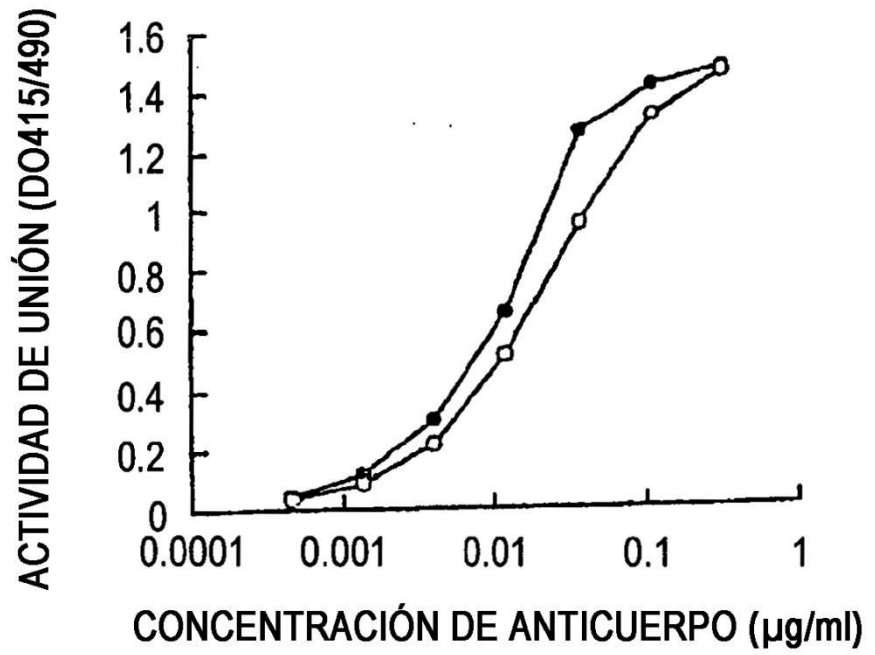


FIG. 11A

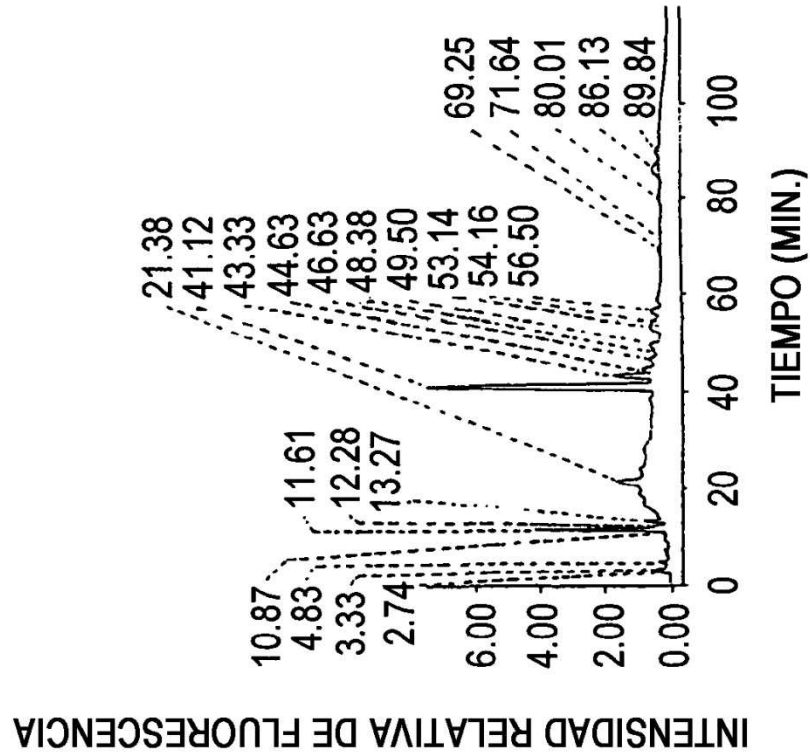


FIG. 11B

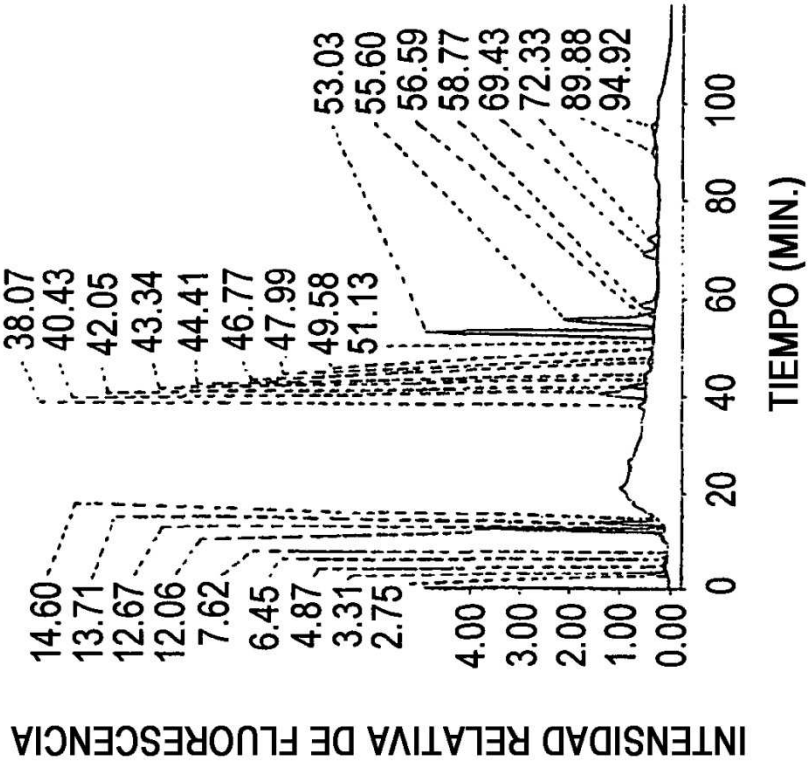


FIG. 12A

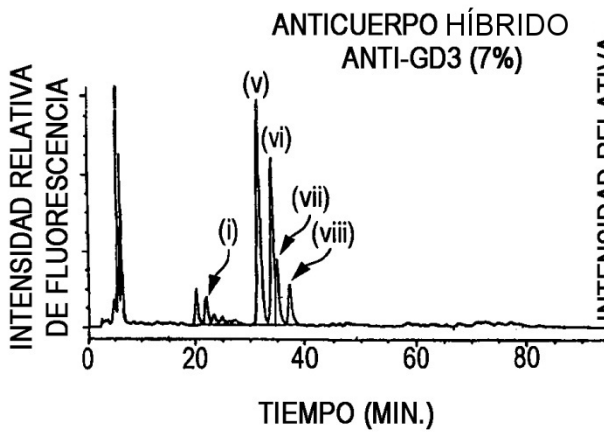


FIG. 12B

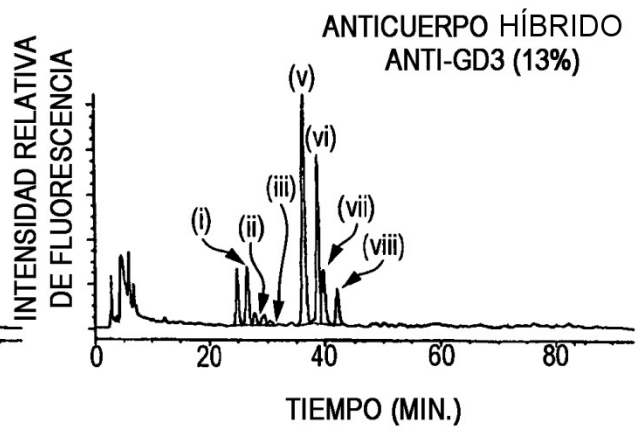


FIG. 12C

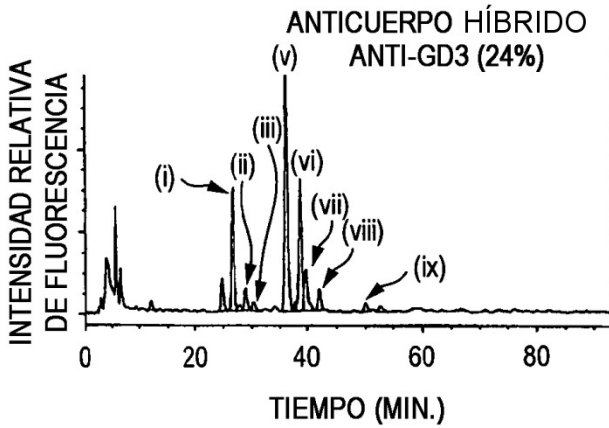


FIG. 12D

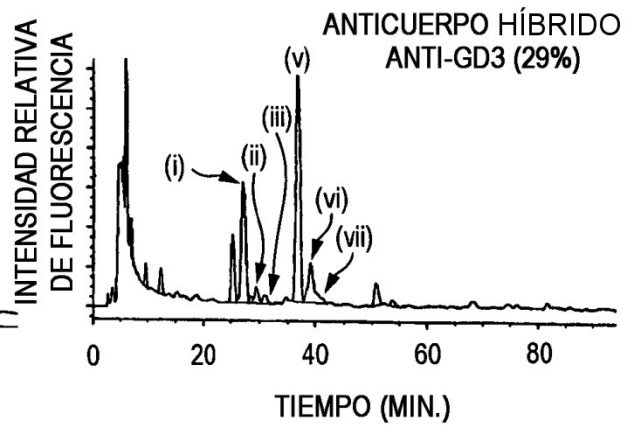


FIG. 12E

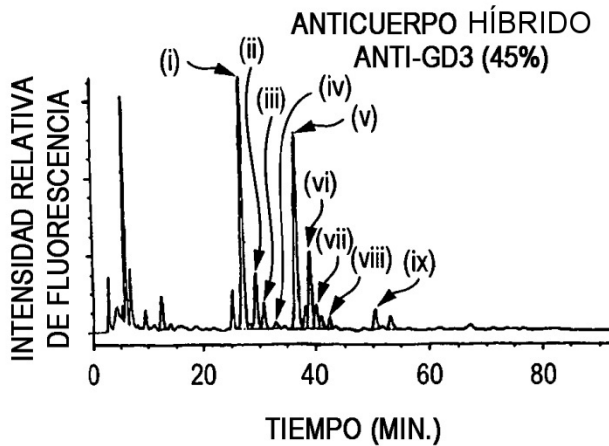


FIG. 12F

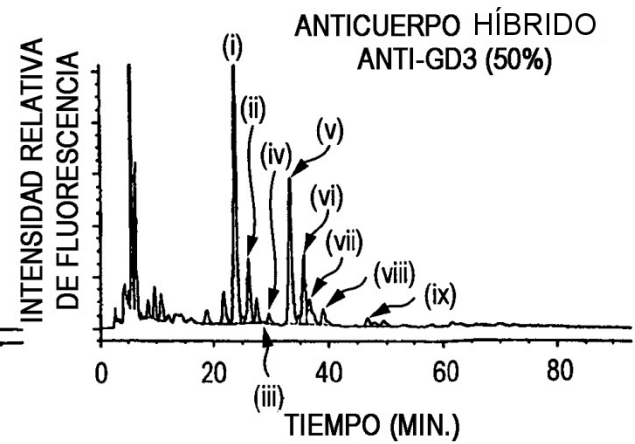


FIG. 13

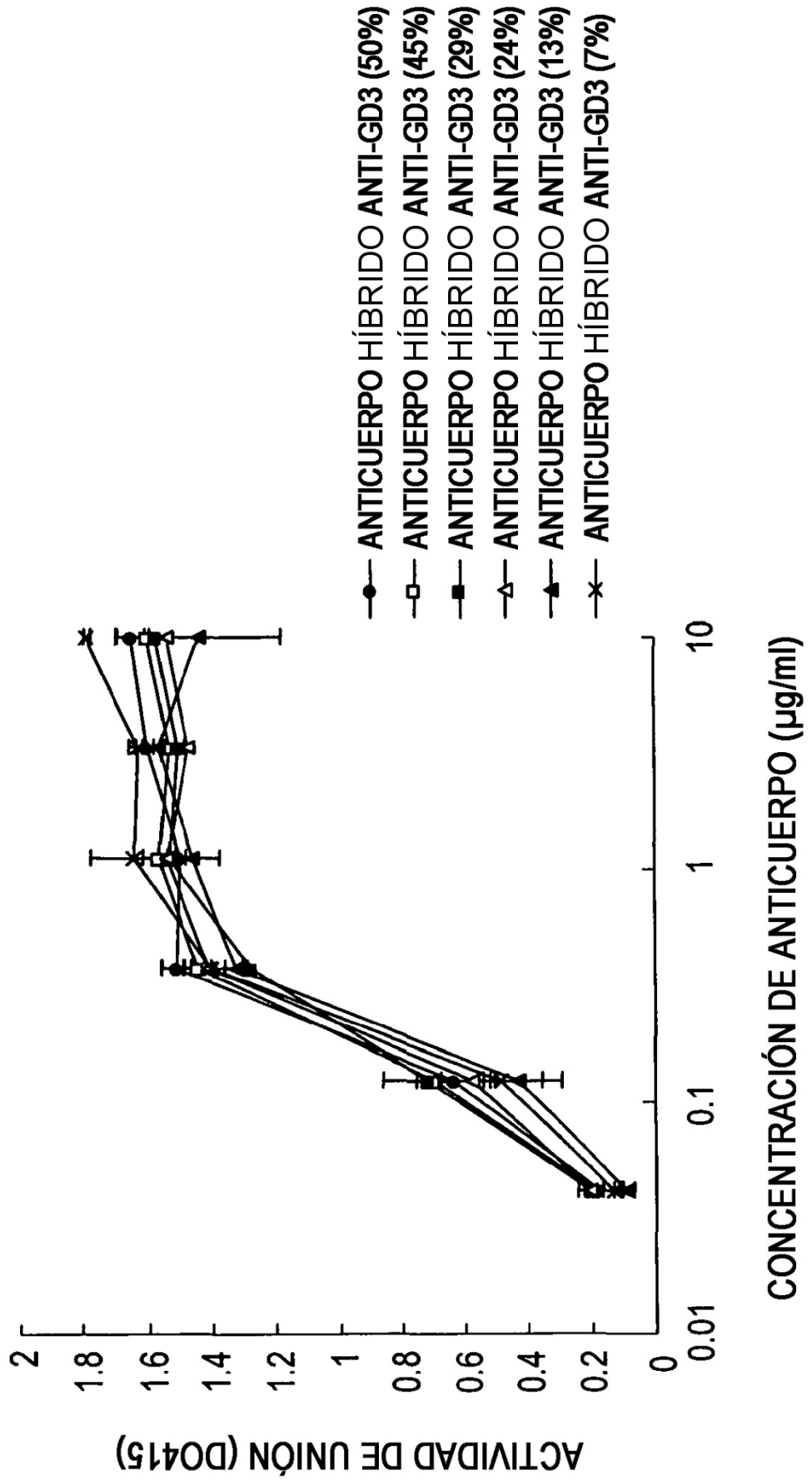


FIG. 14

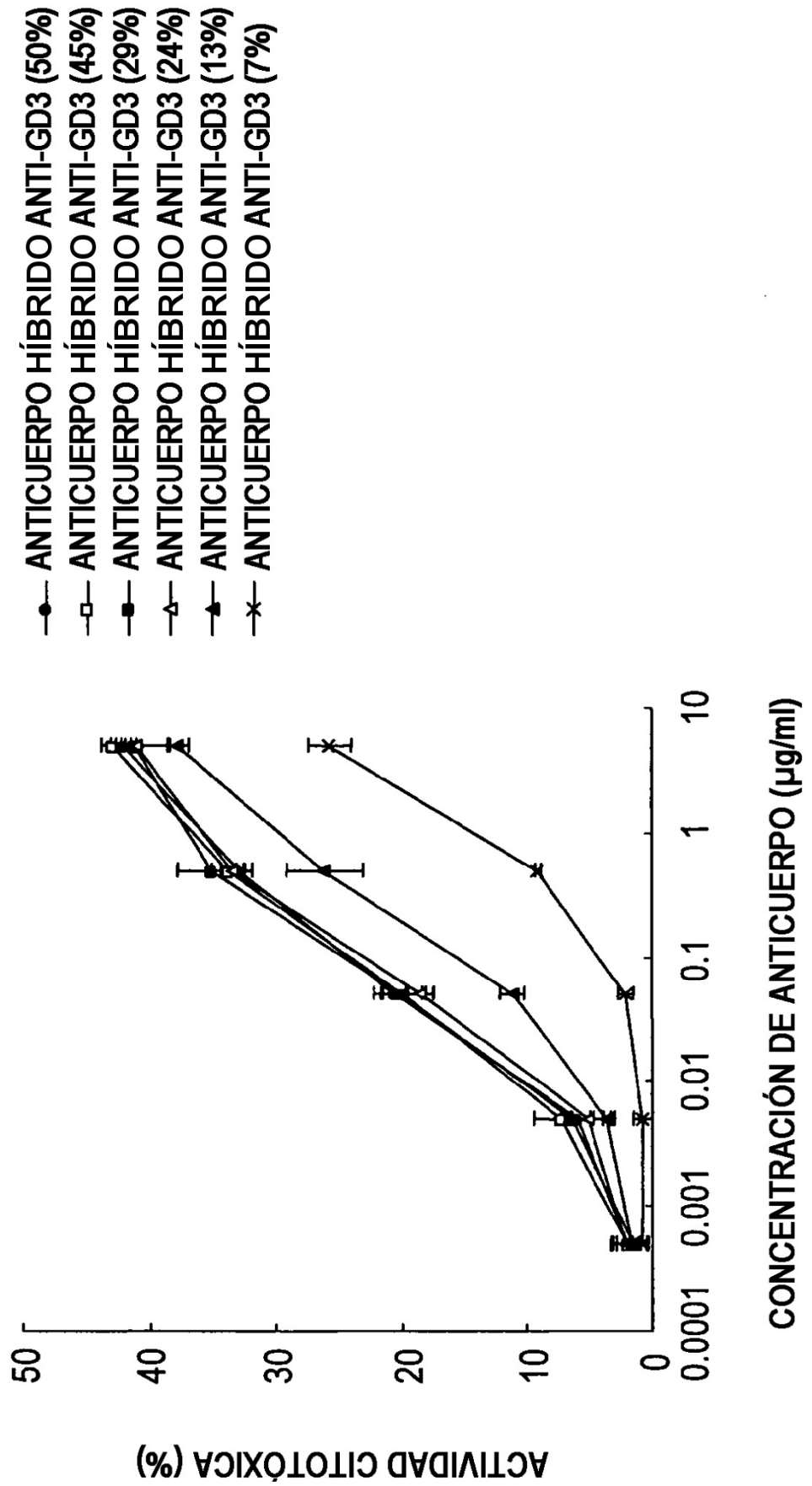


FIG. 15

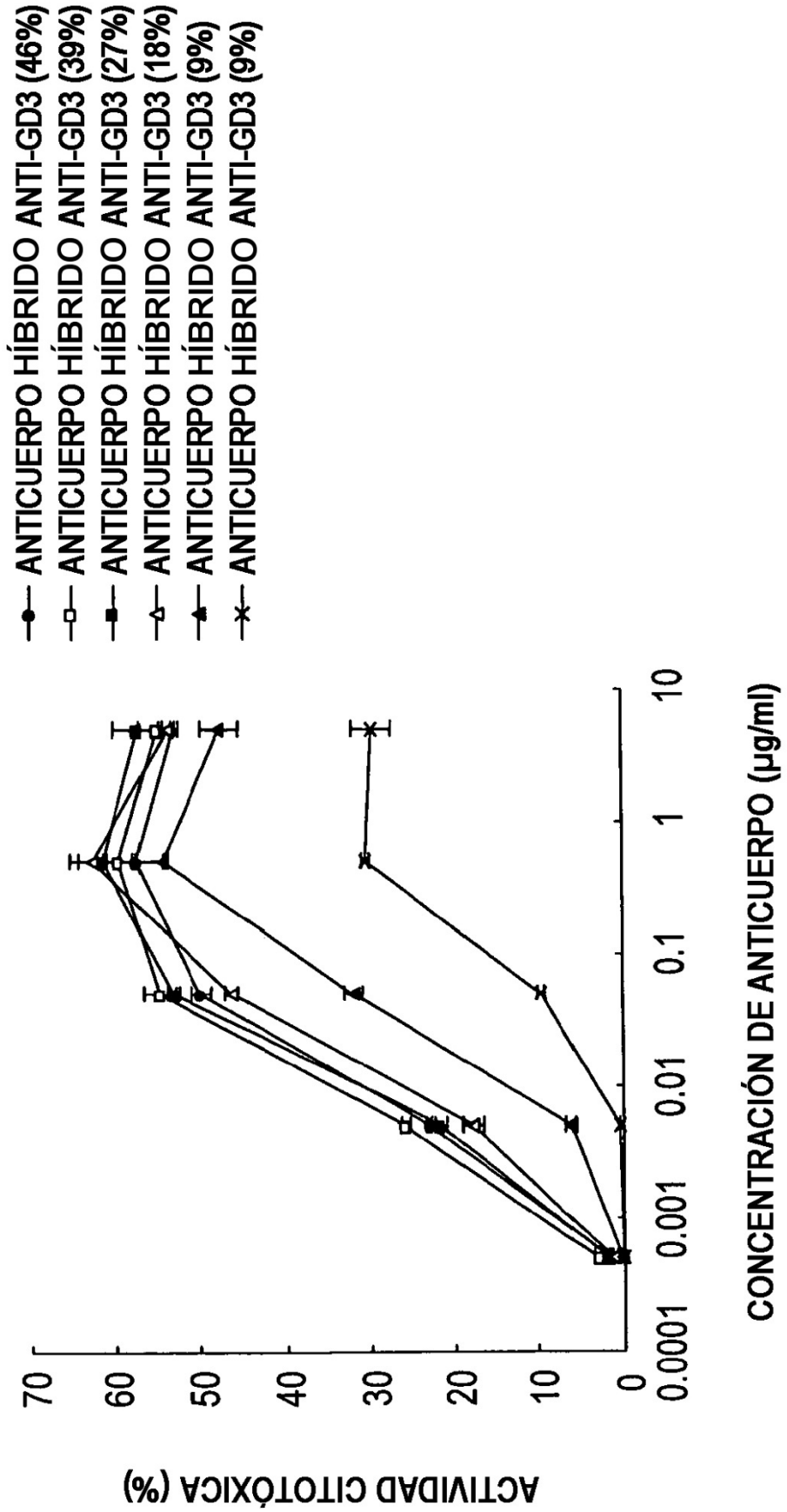


FIG. 16A

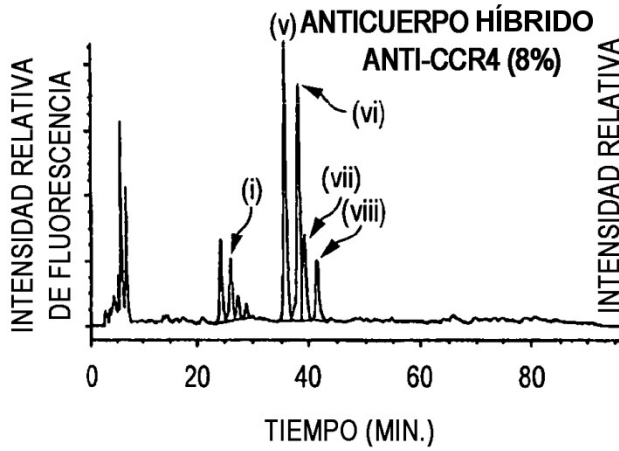


FIG. 16B

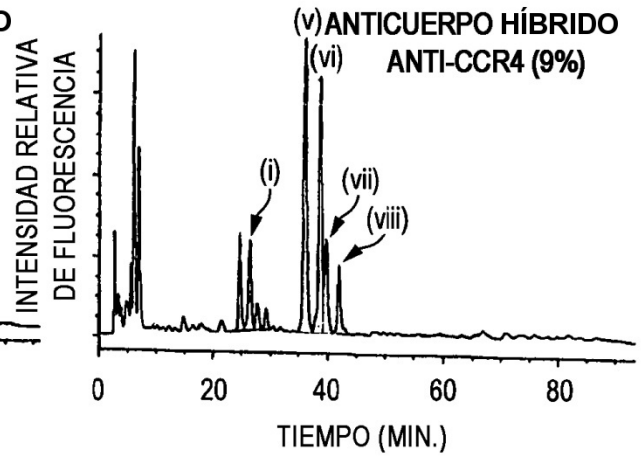


FIG. 16C

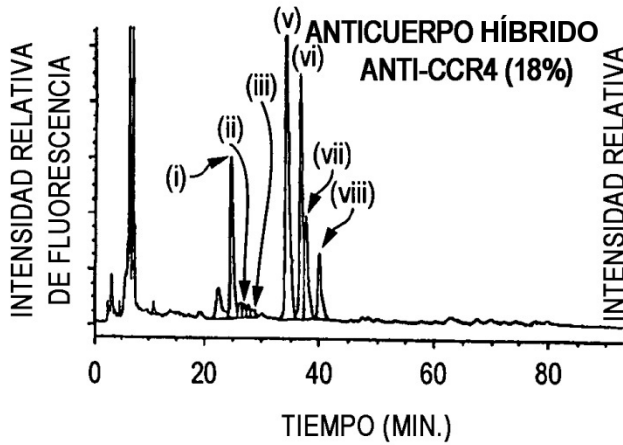


FIG. 16D

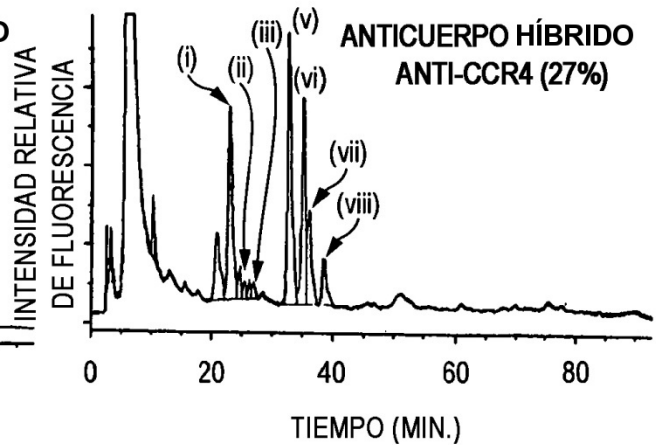


FIG. 16E

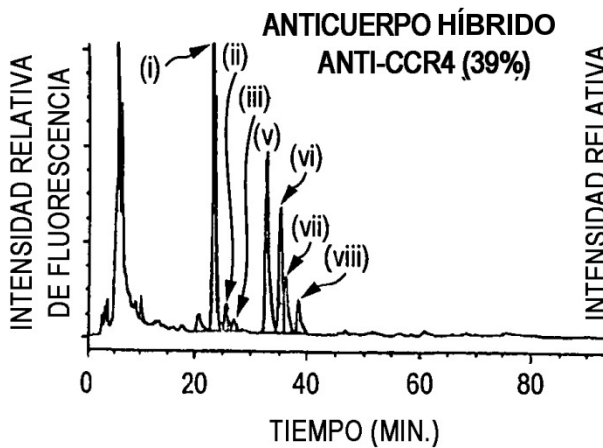


FIG. 16F

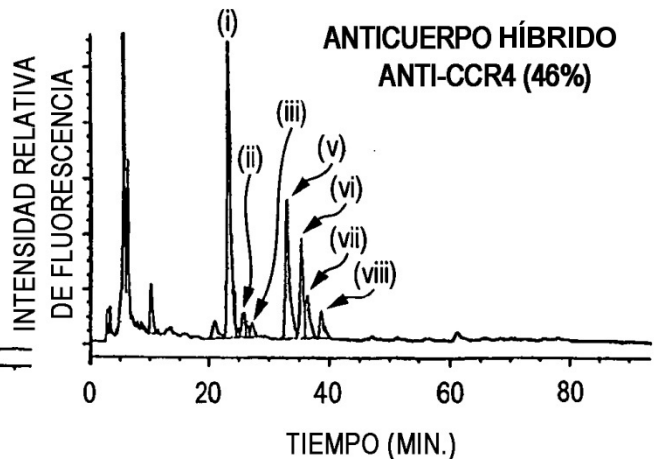


FIG. 17

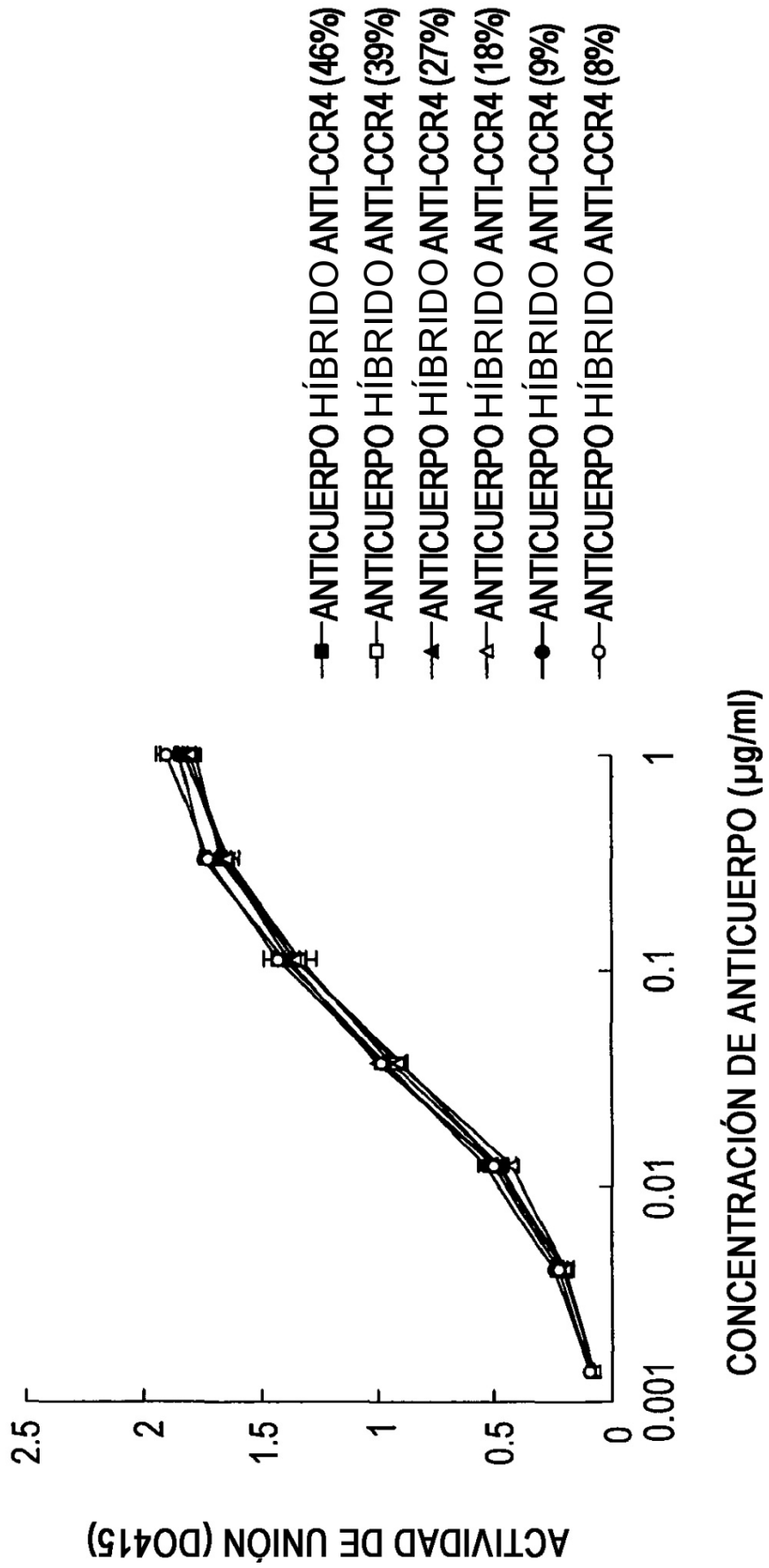


FIG. 18

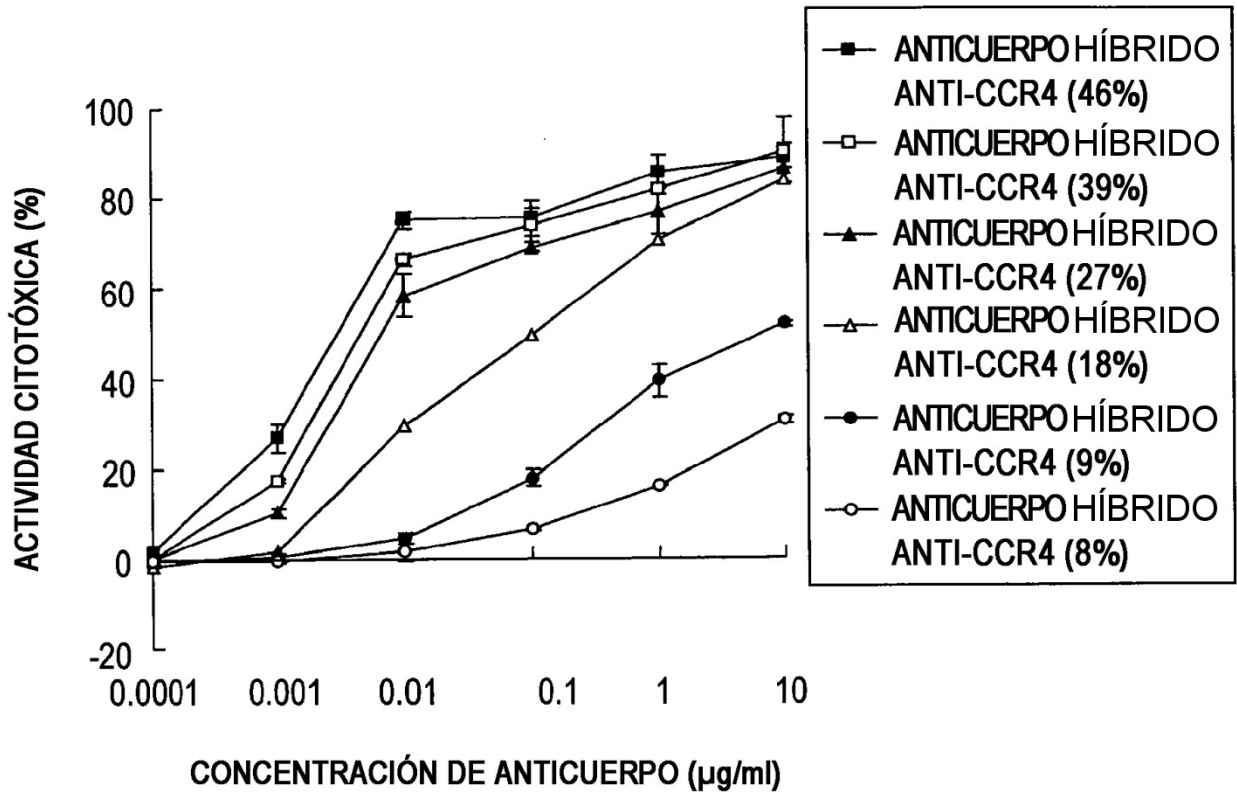


FIG. 19

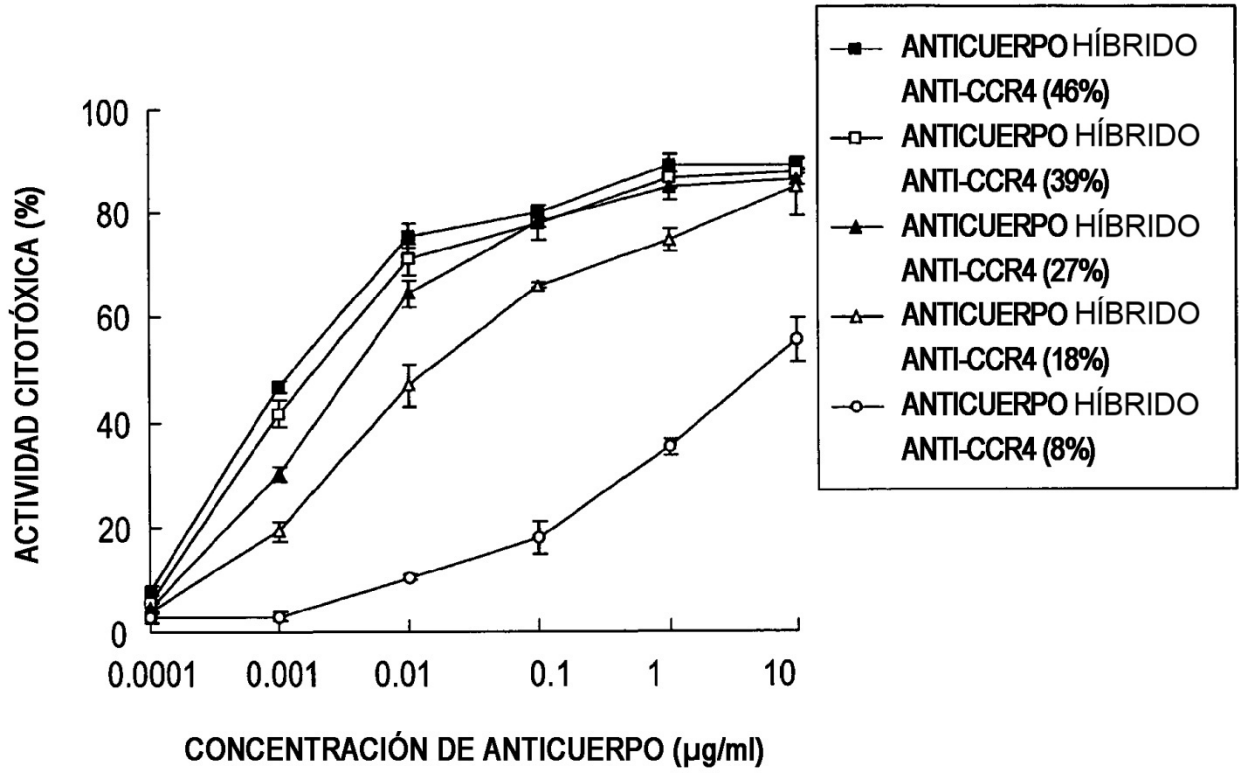


FIG. 20

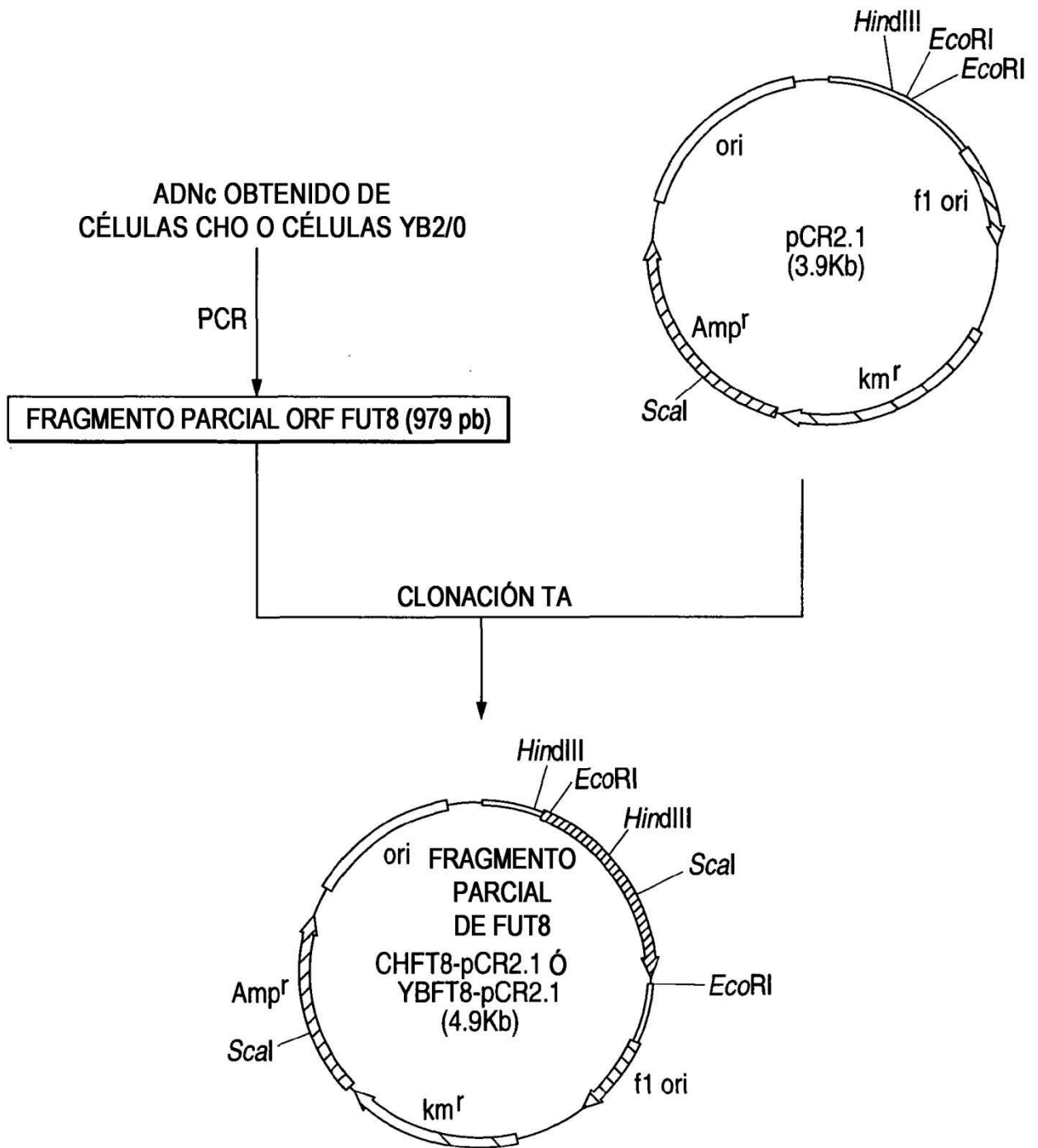


FIG. 21

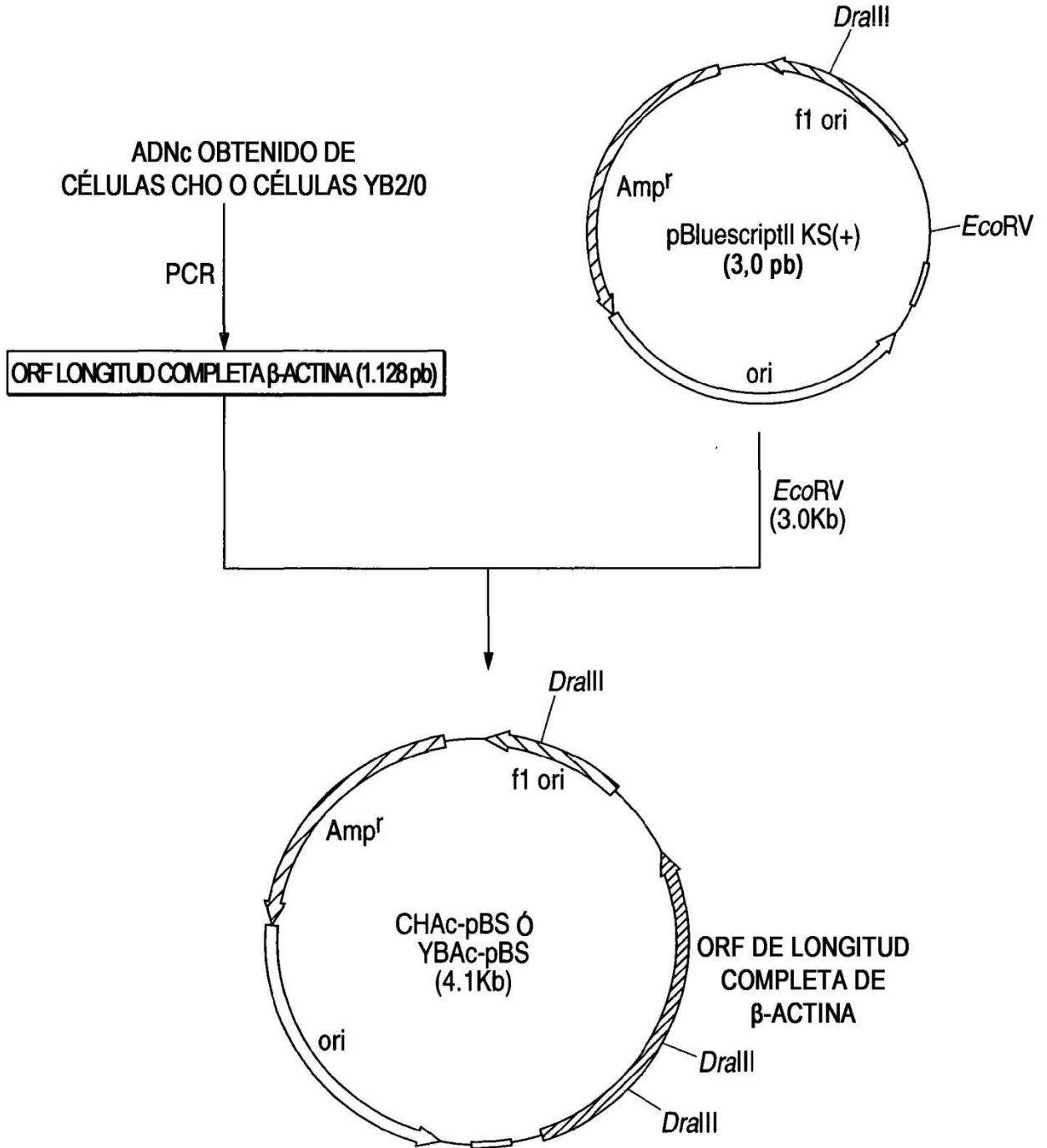


FIG. 22

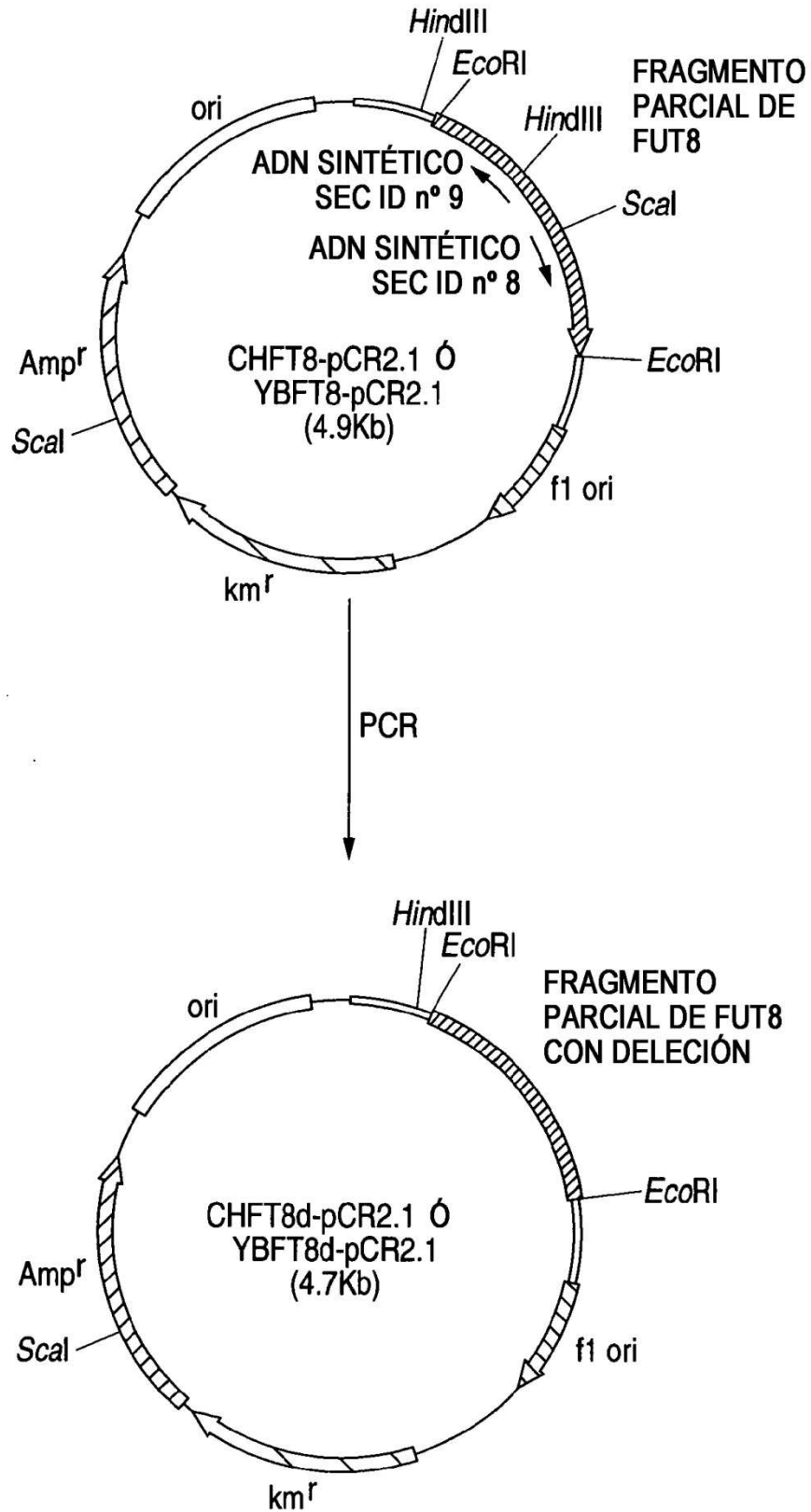


FIG. 23

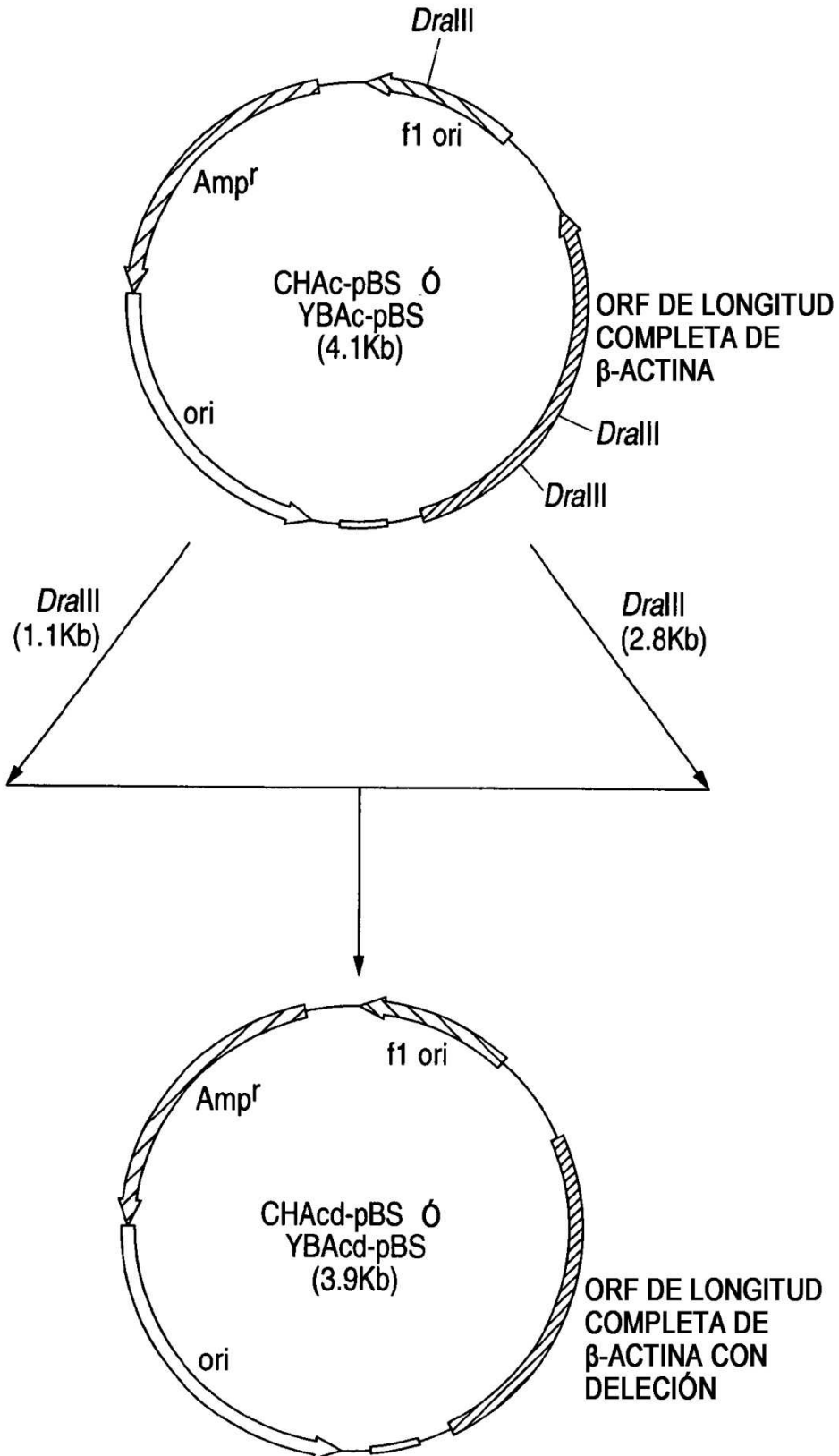


FIG. 24

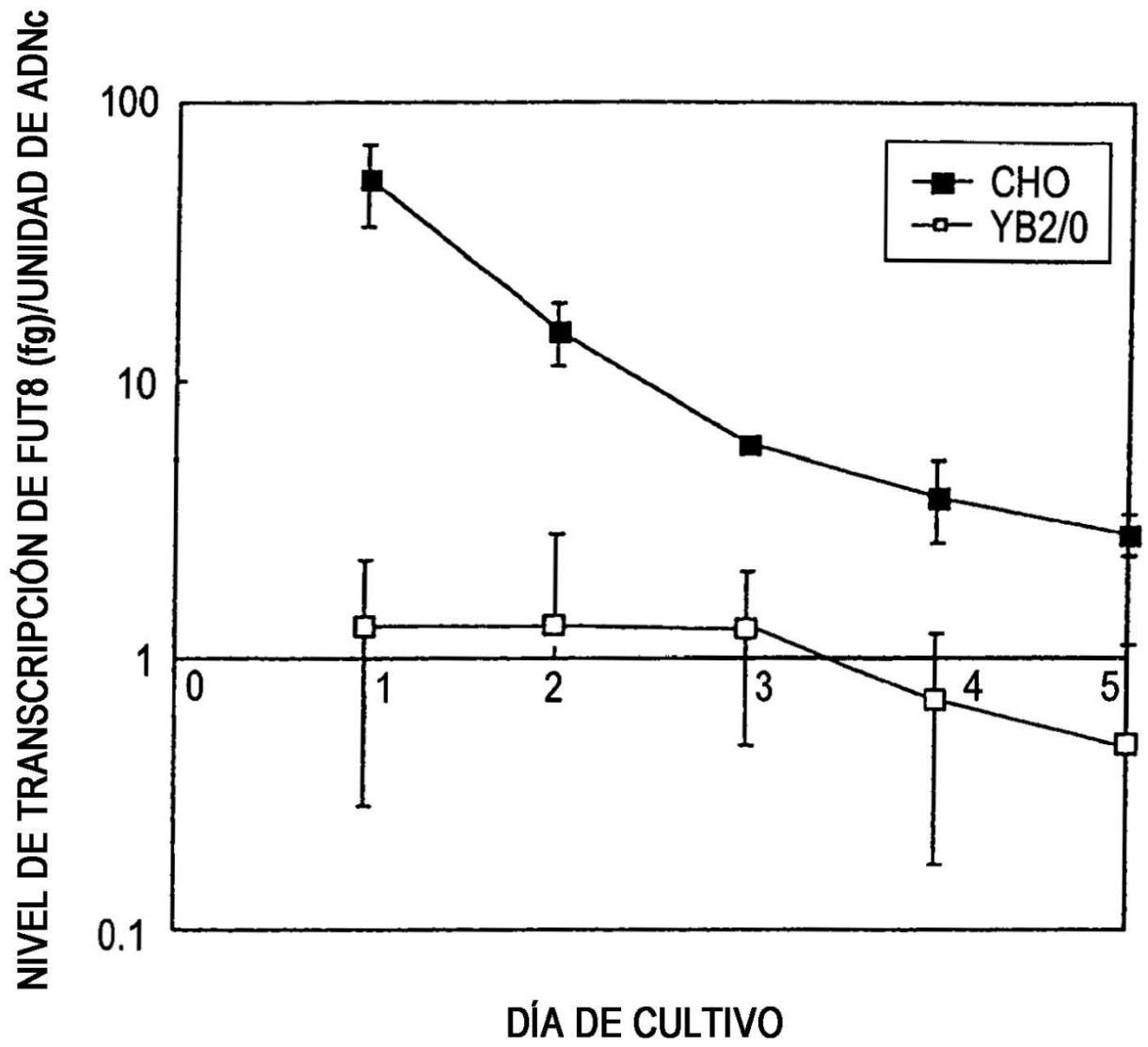


FIG. 25

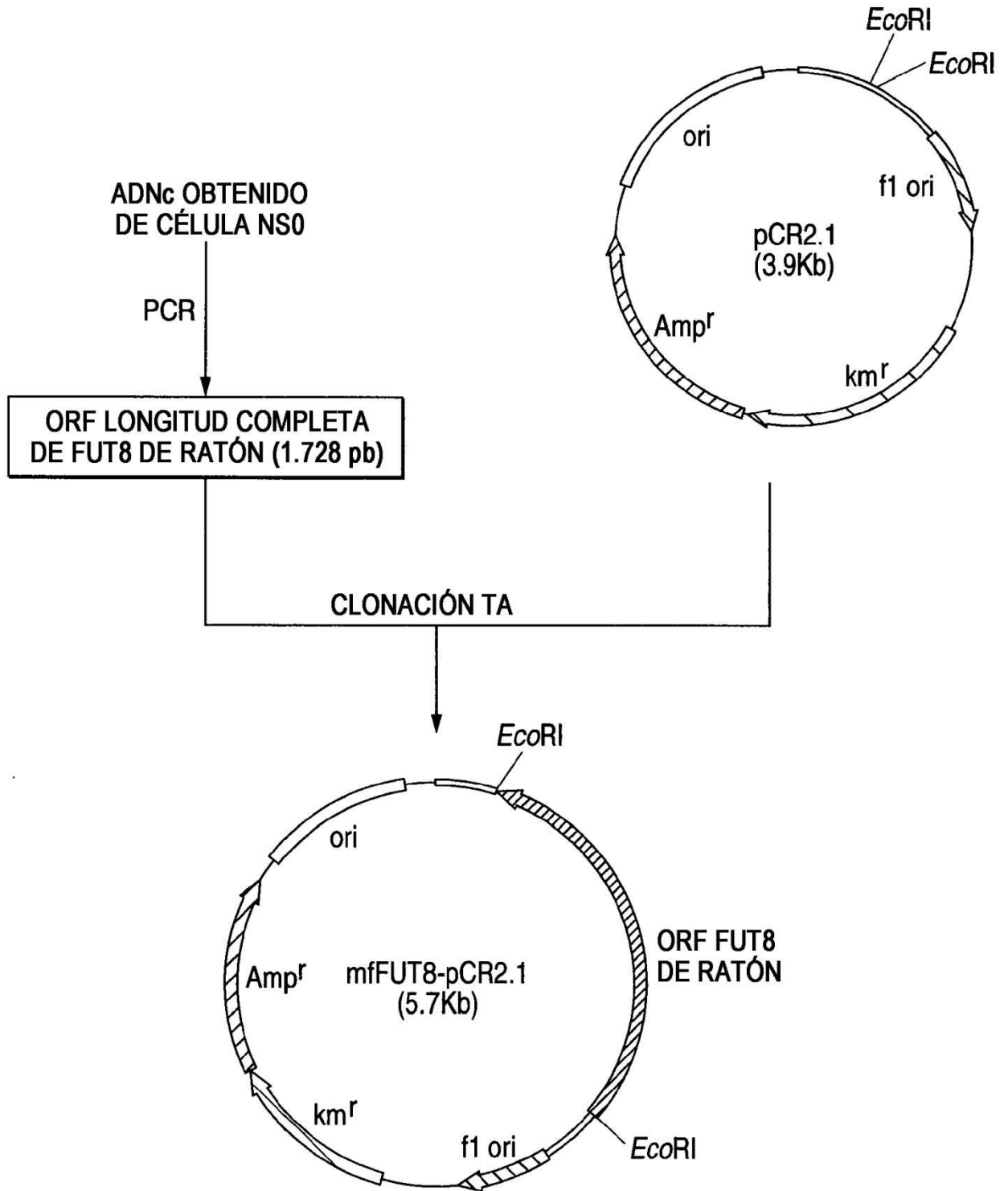


FIG. 26

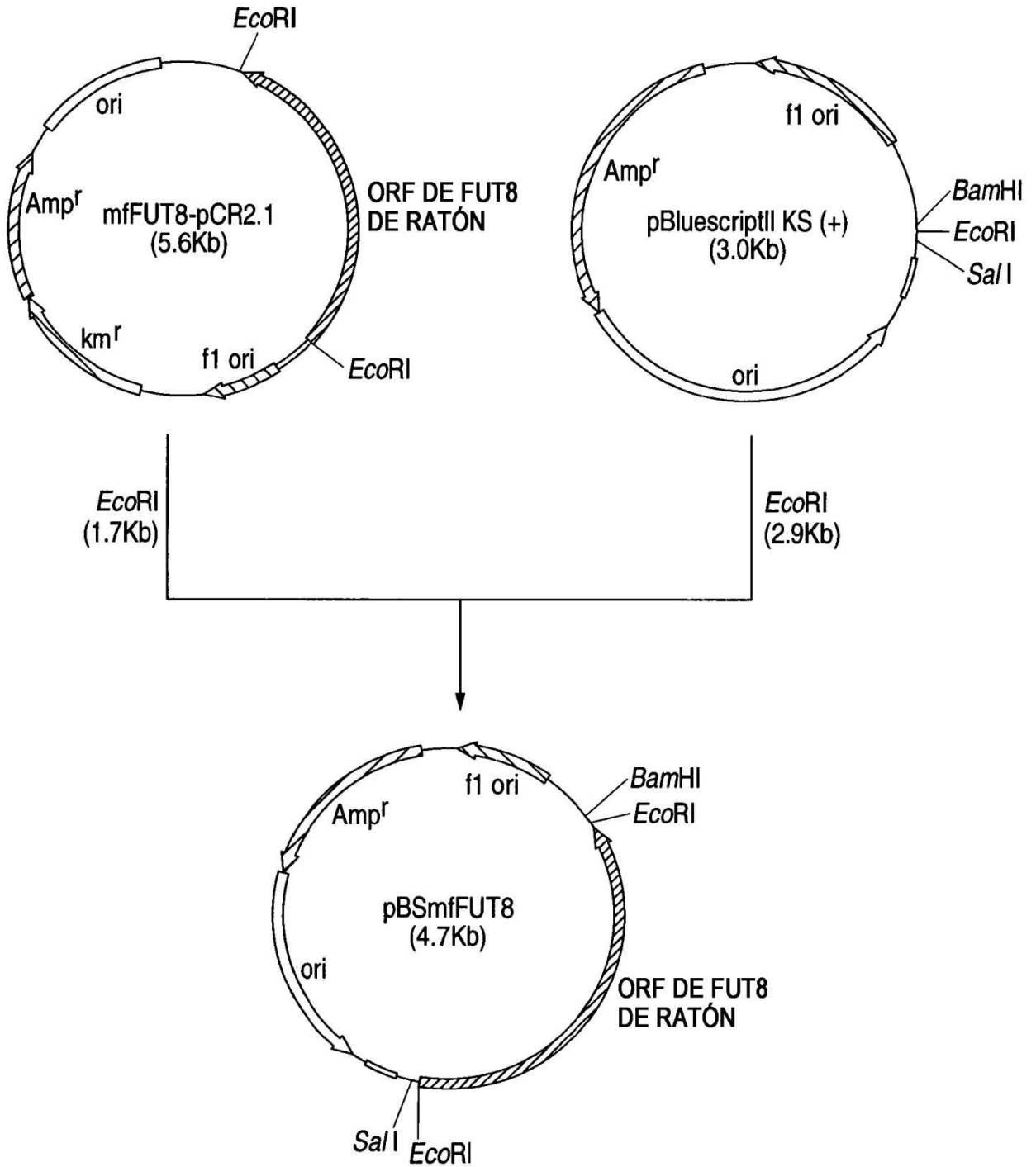


FIG. 27

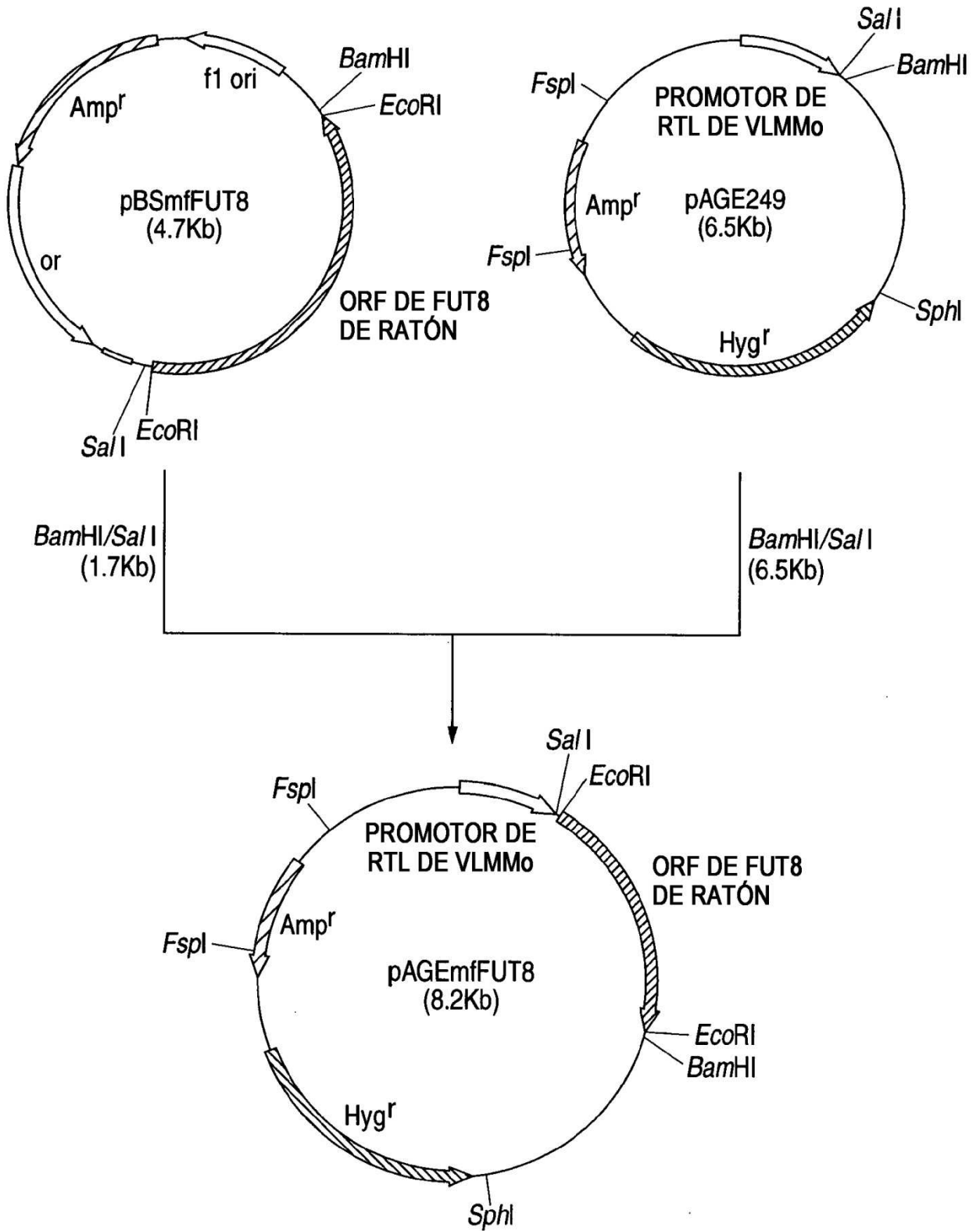


FIG. 28

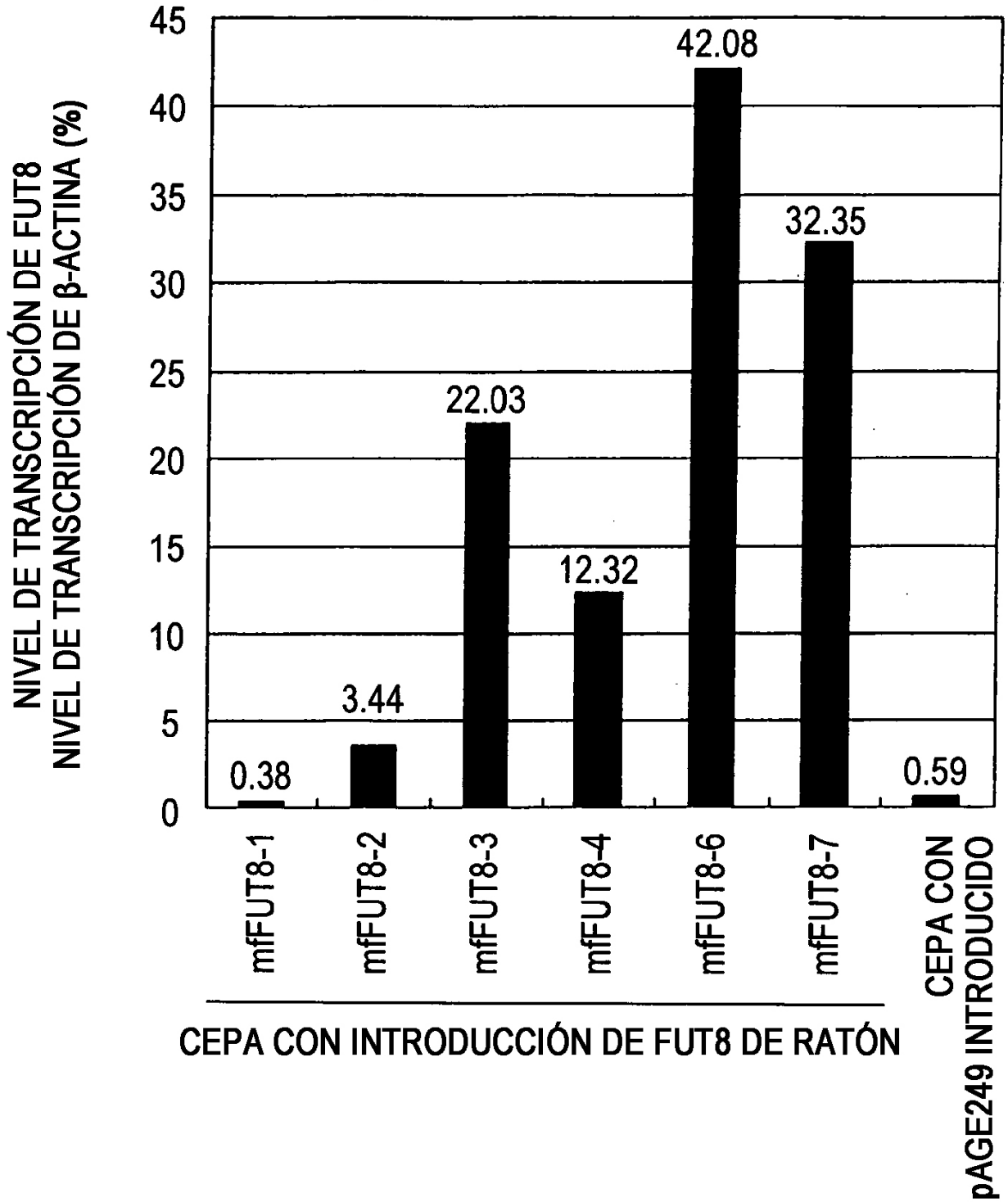
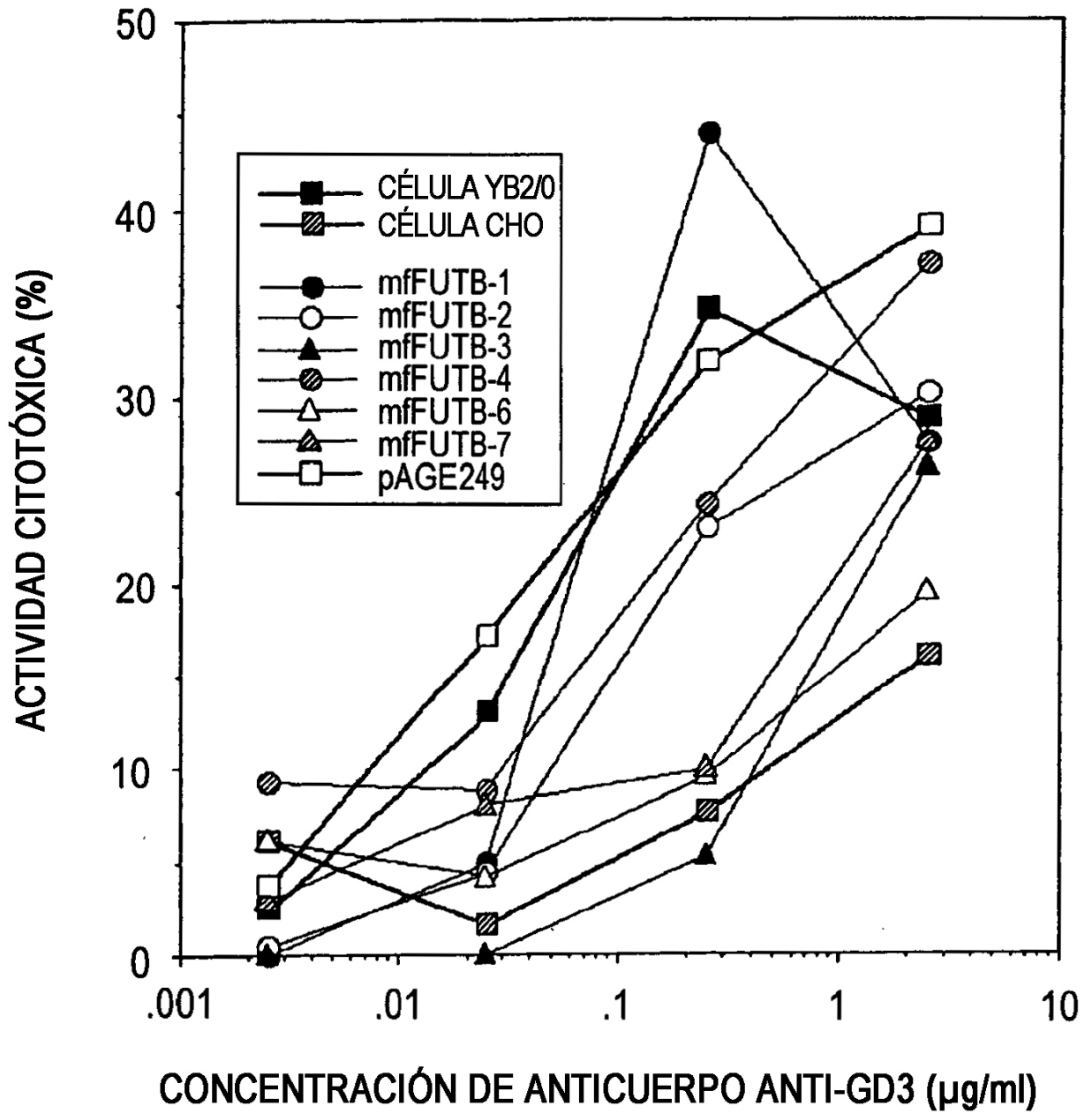


FIG. 29



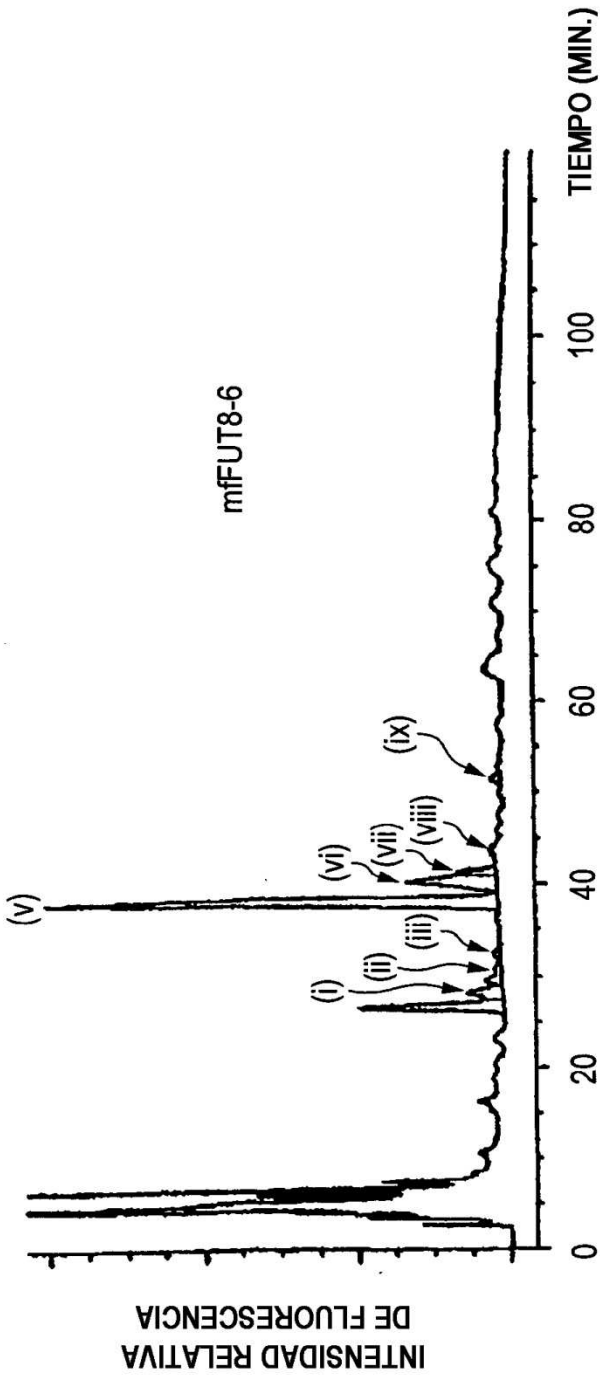


FIG. 30A

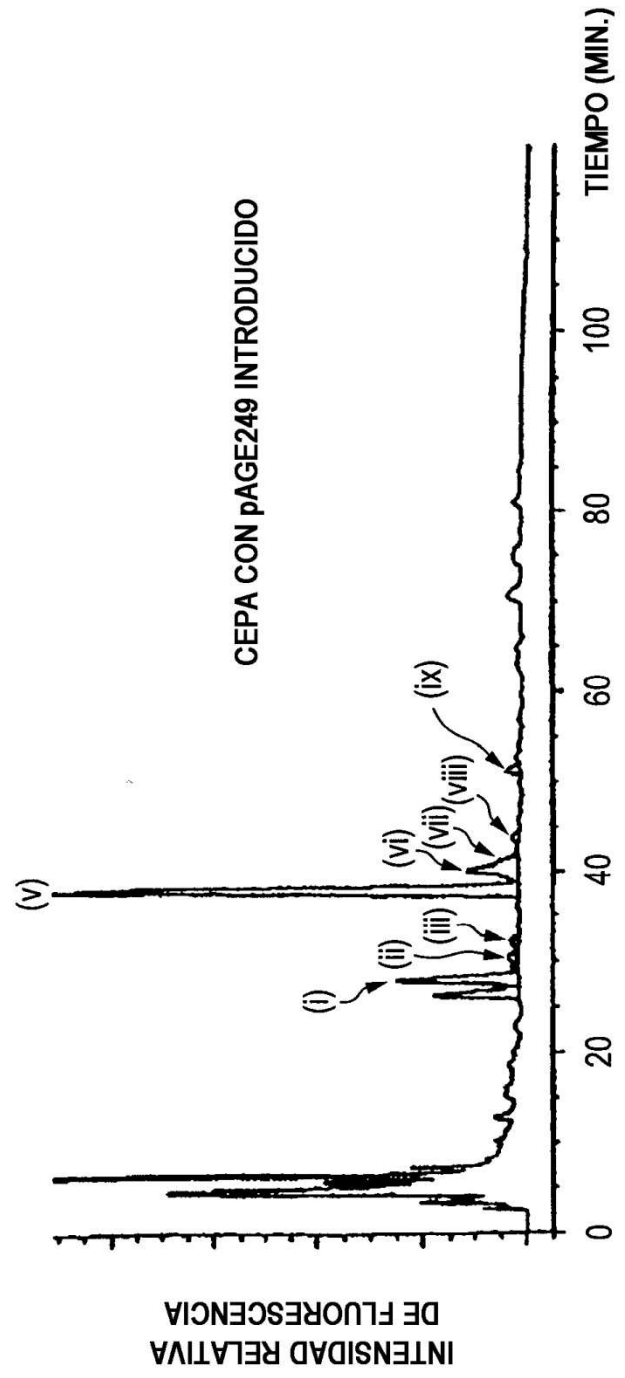


FIG. 30B

FIG. 31

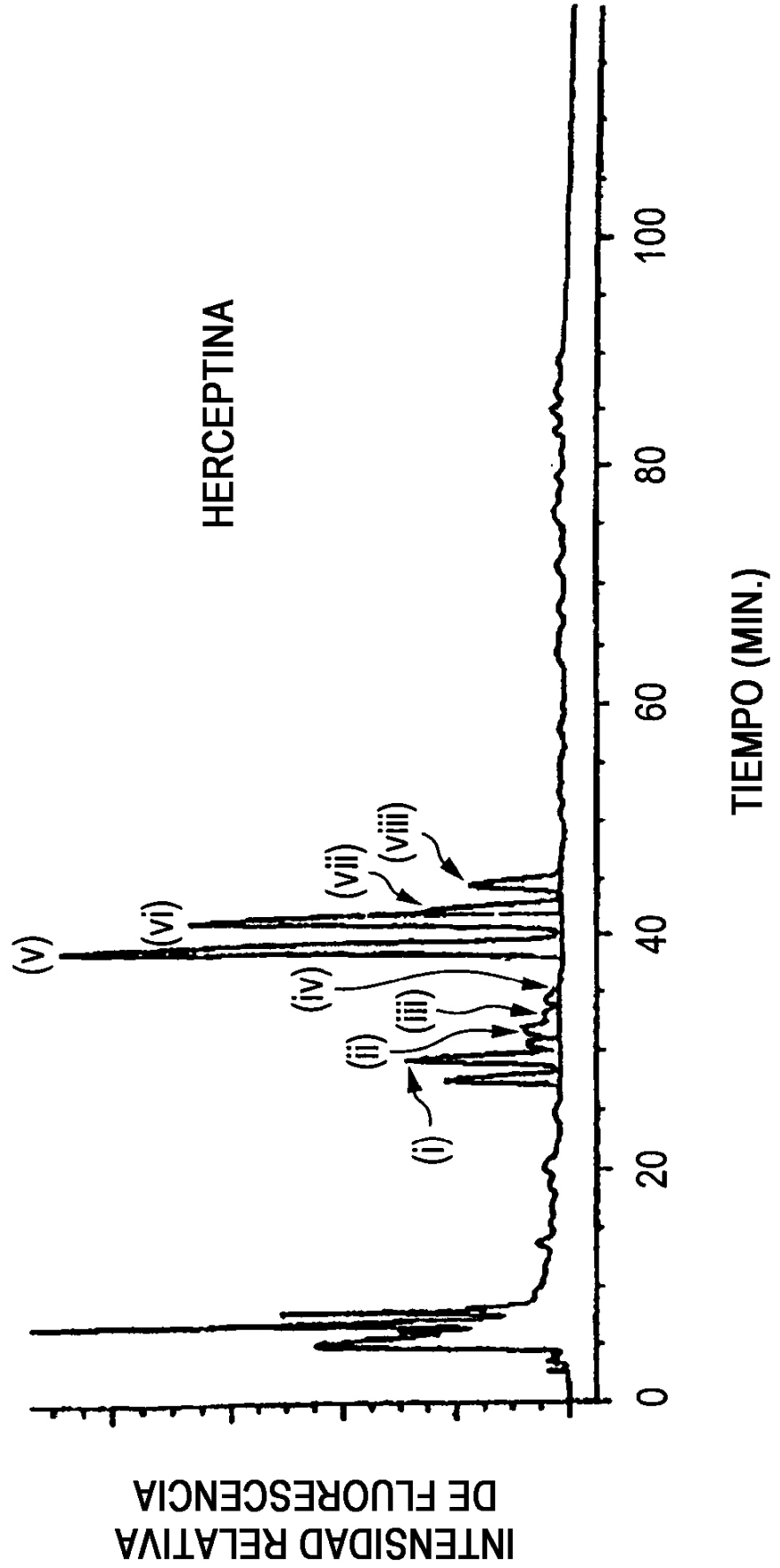


FIG. 32

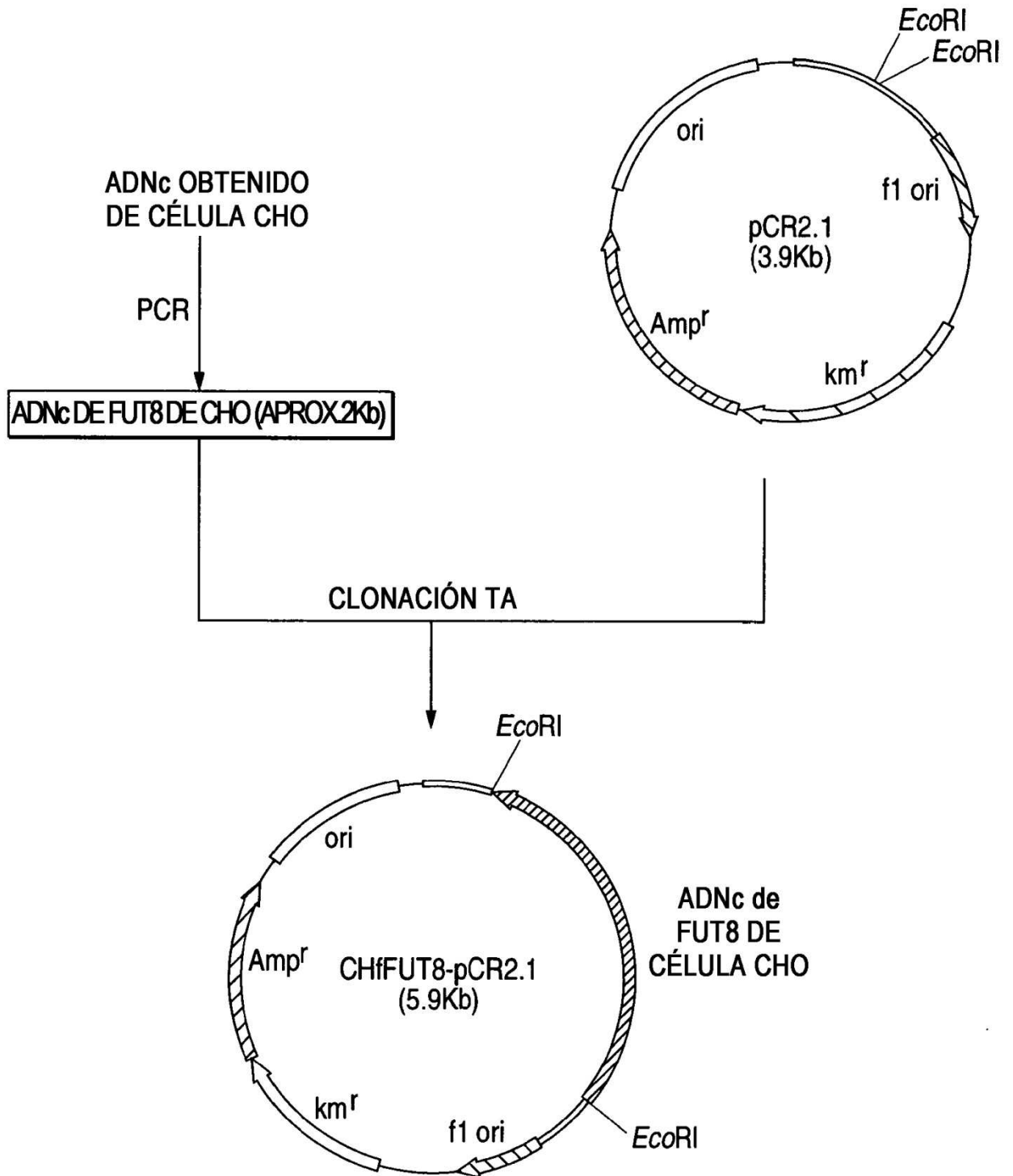


FIG. 33

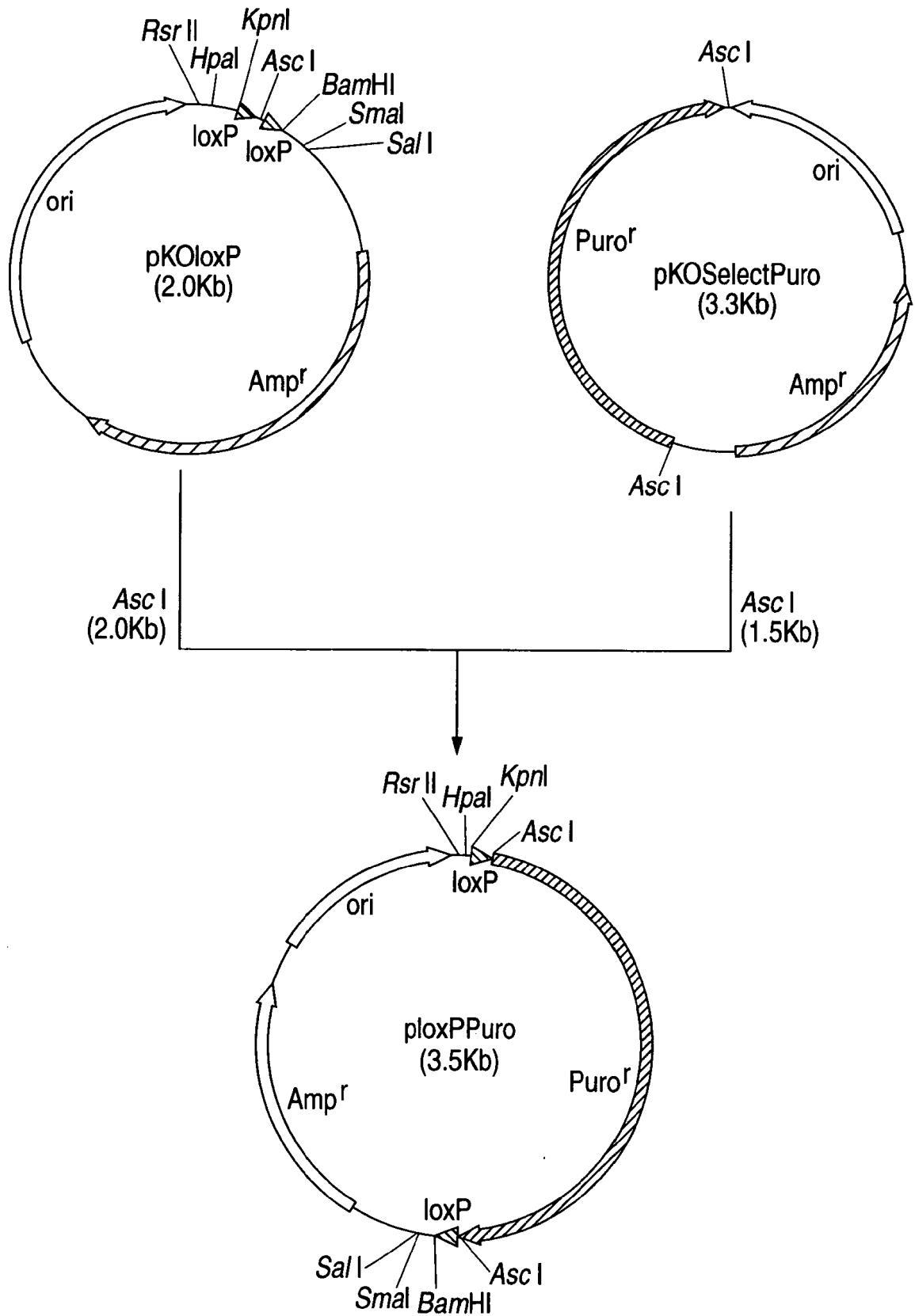


FIG. 34

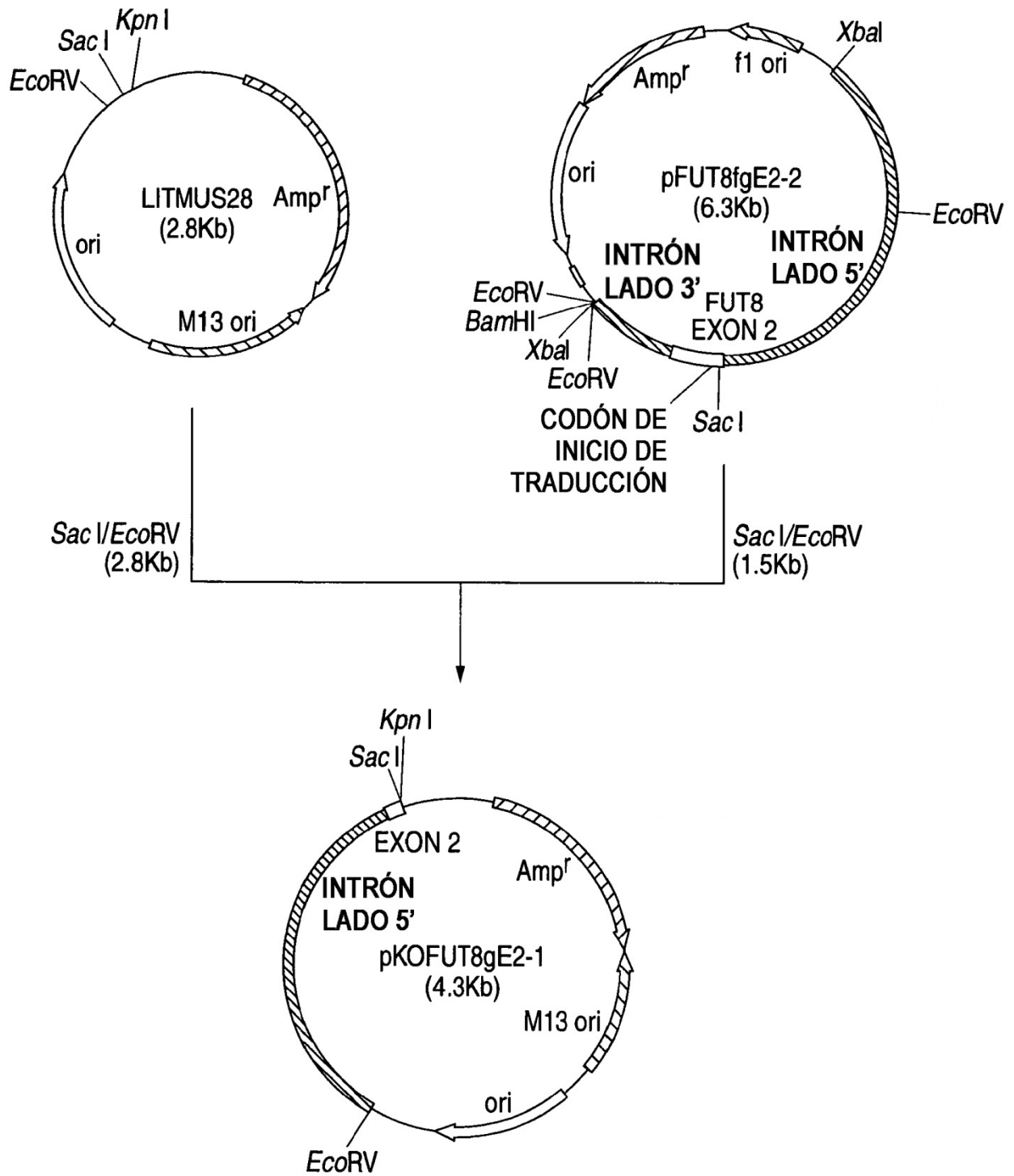


FIG. 35

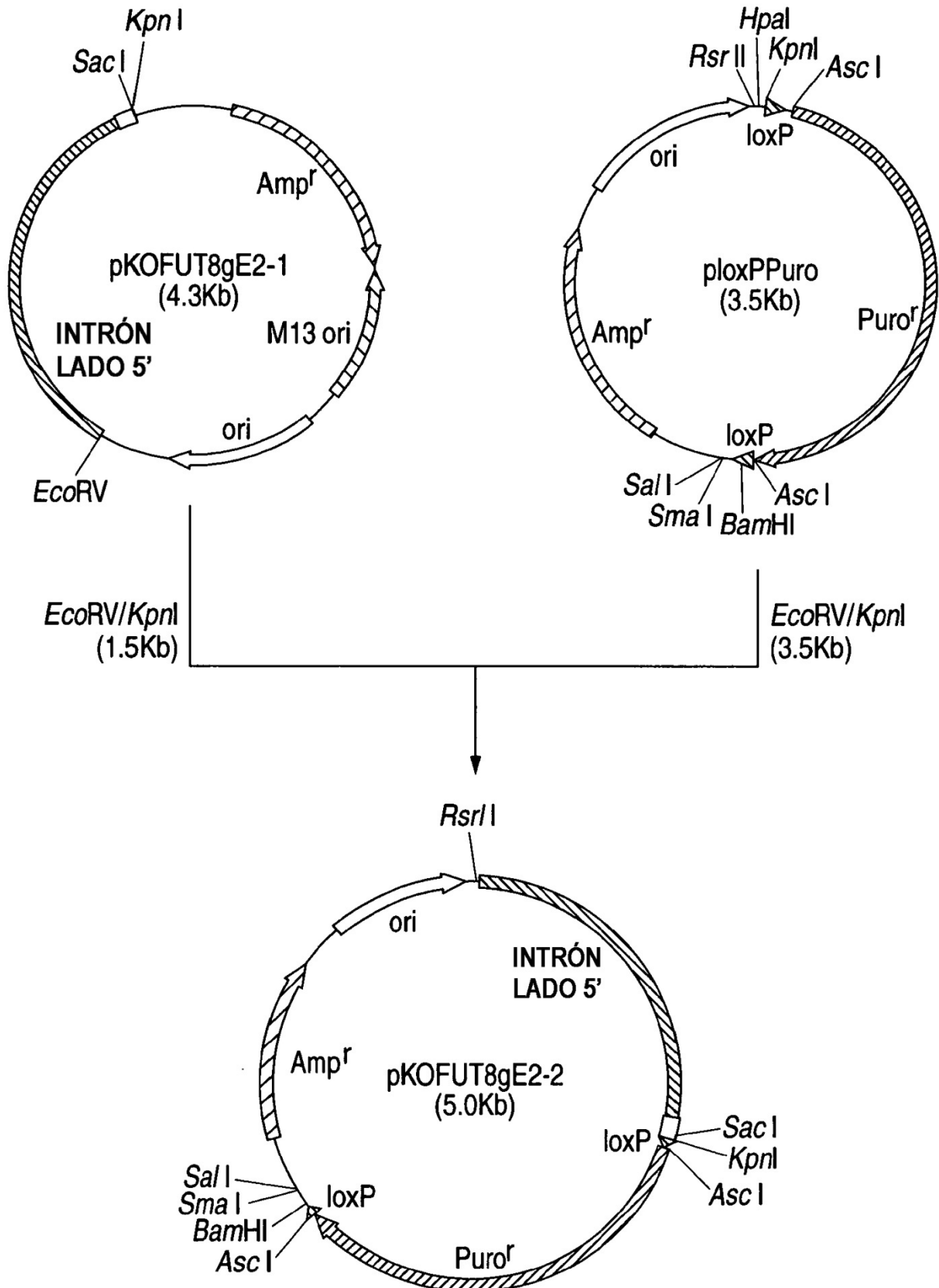


FIG. 36

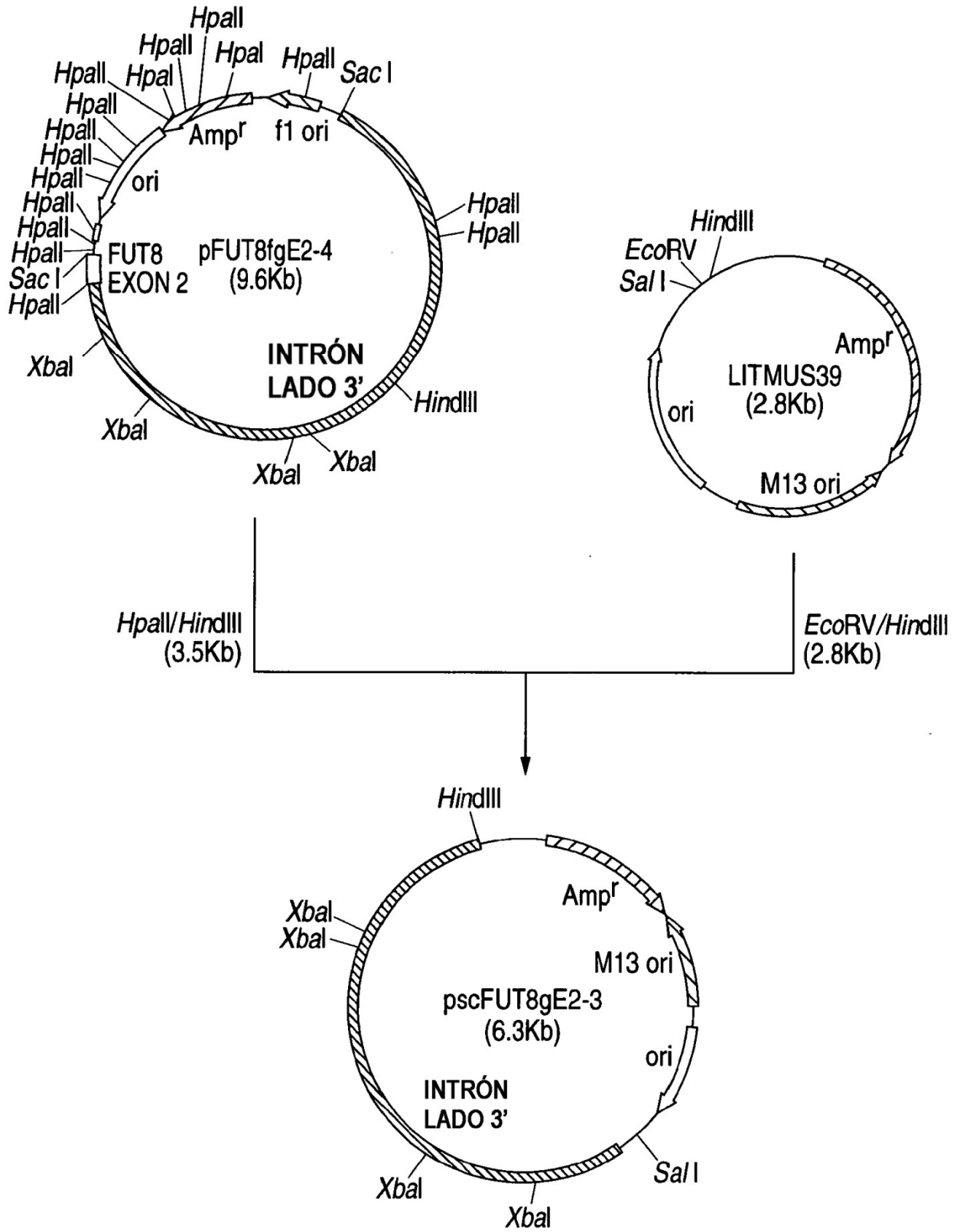


FIG. 37

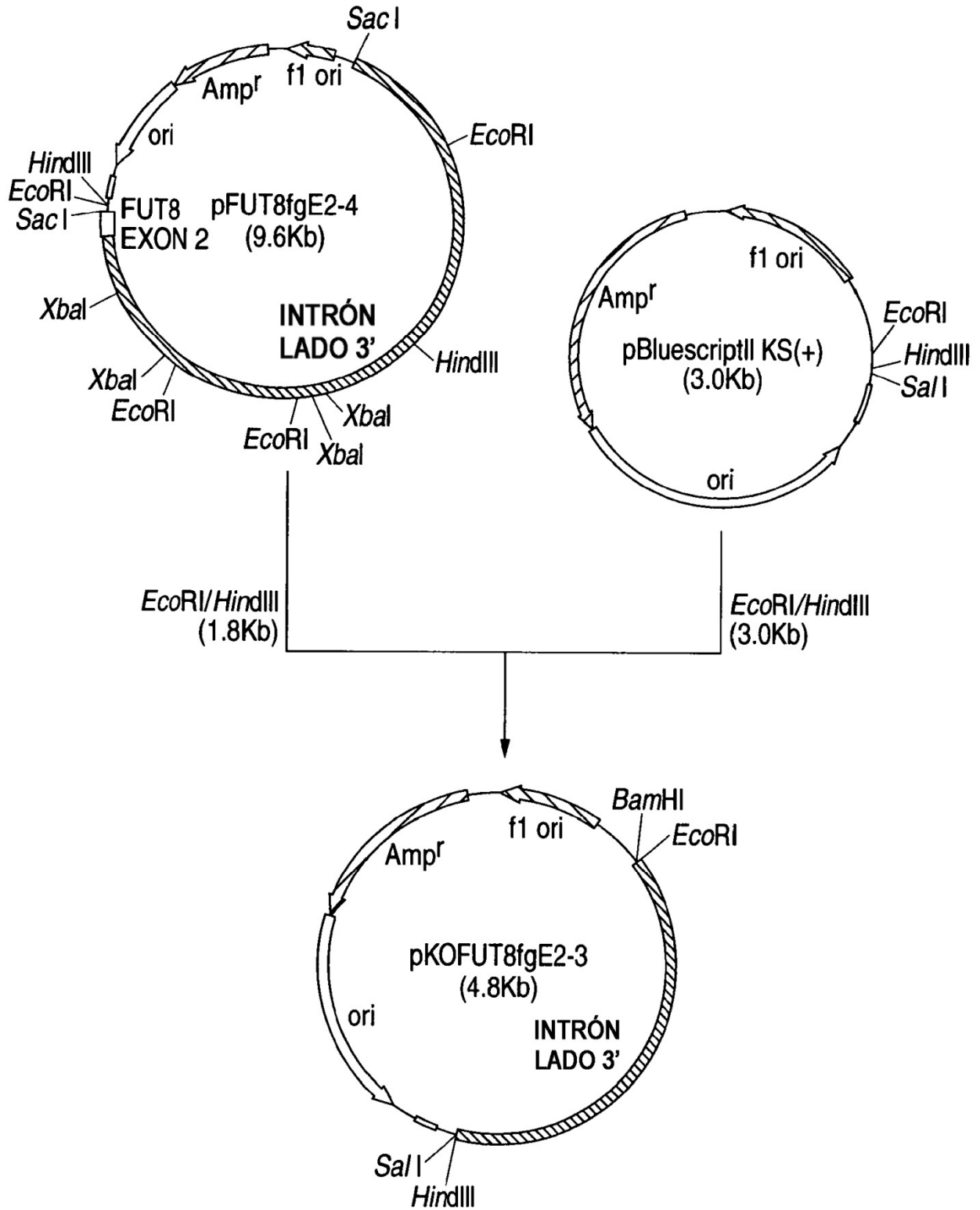


FIG. 38

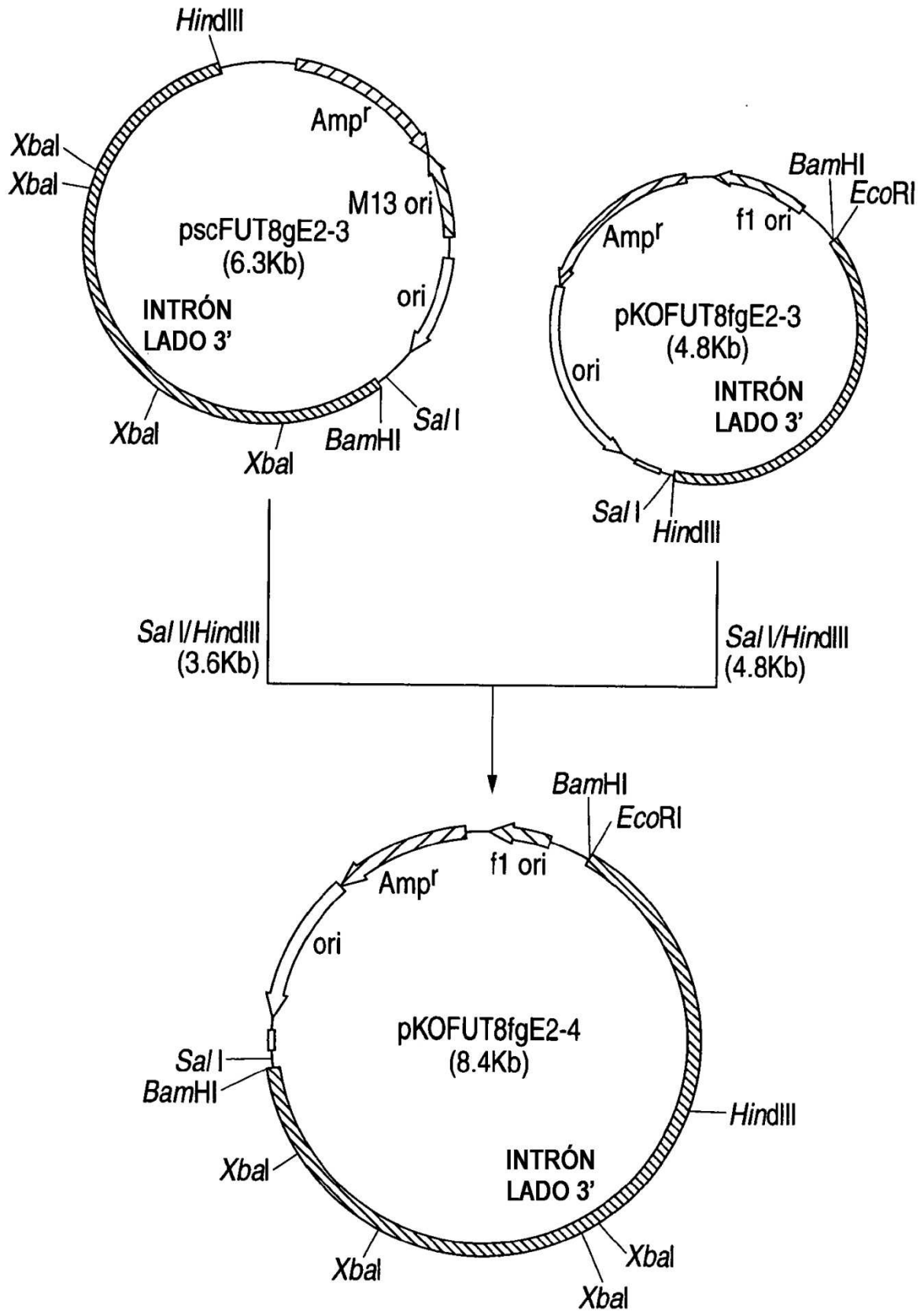


FIG. 39

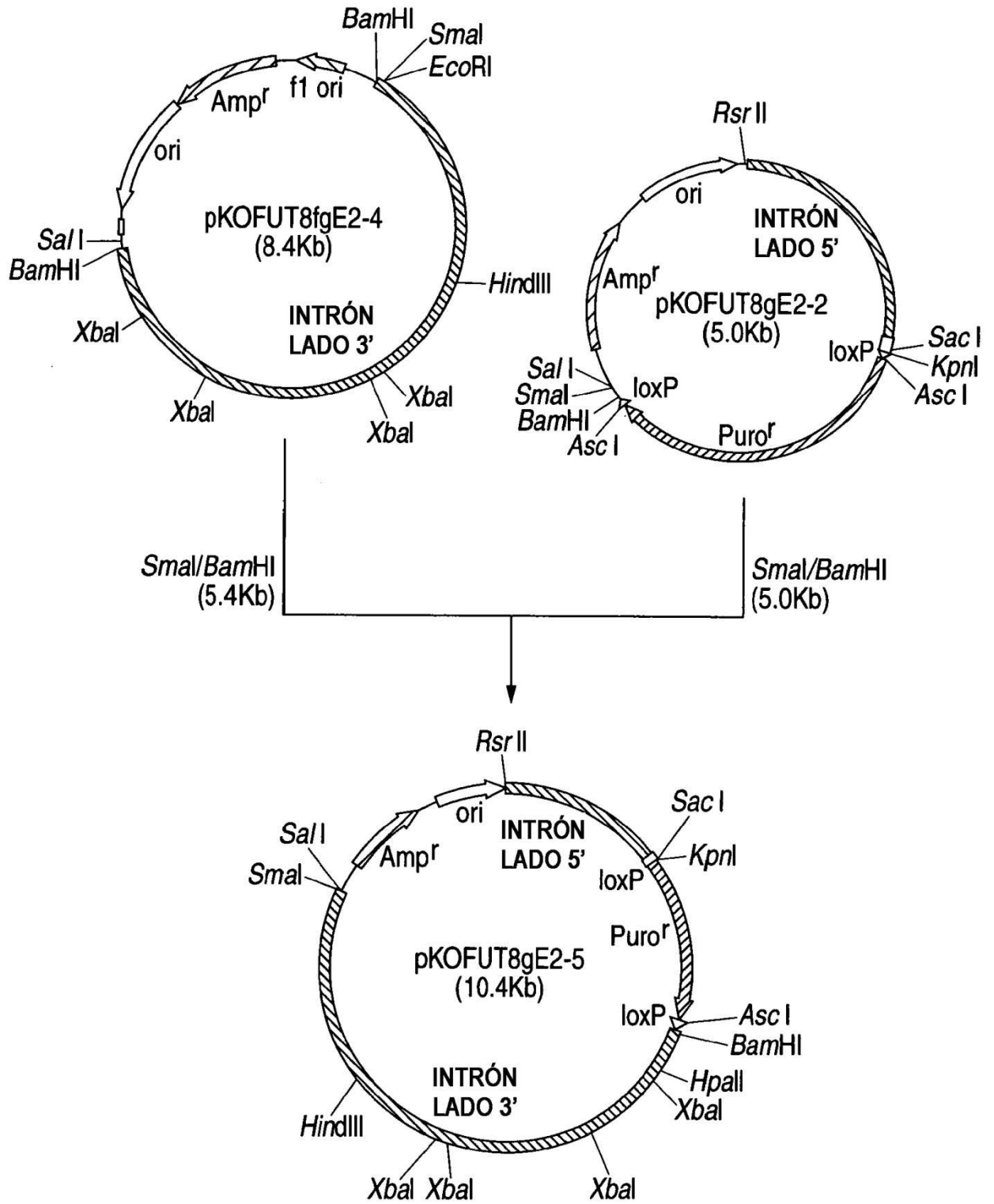


FIG. 40

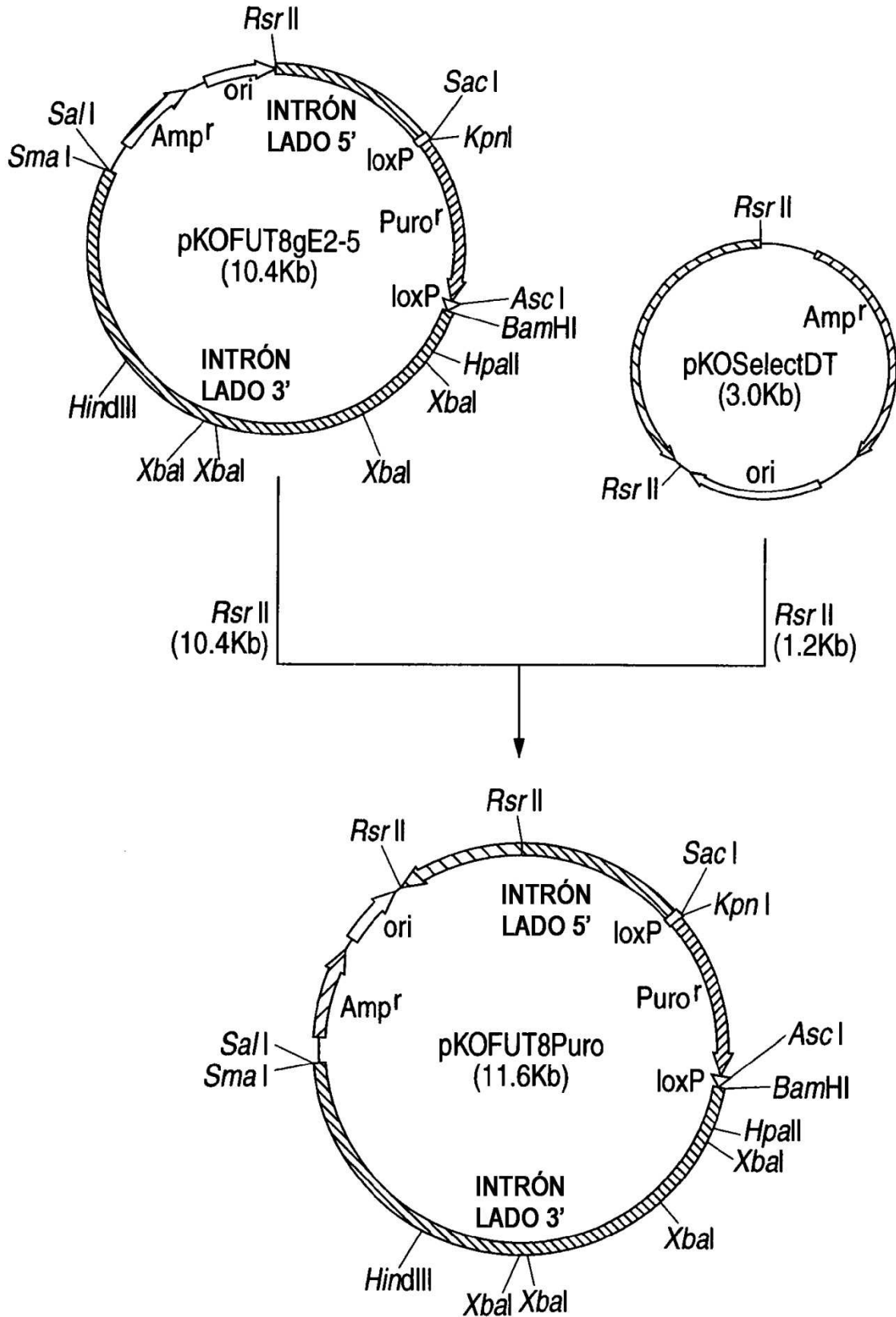


FIG. 41

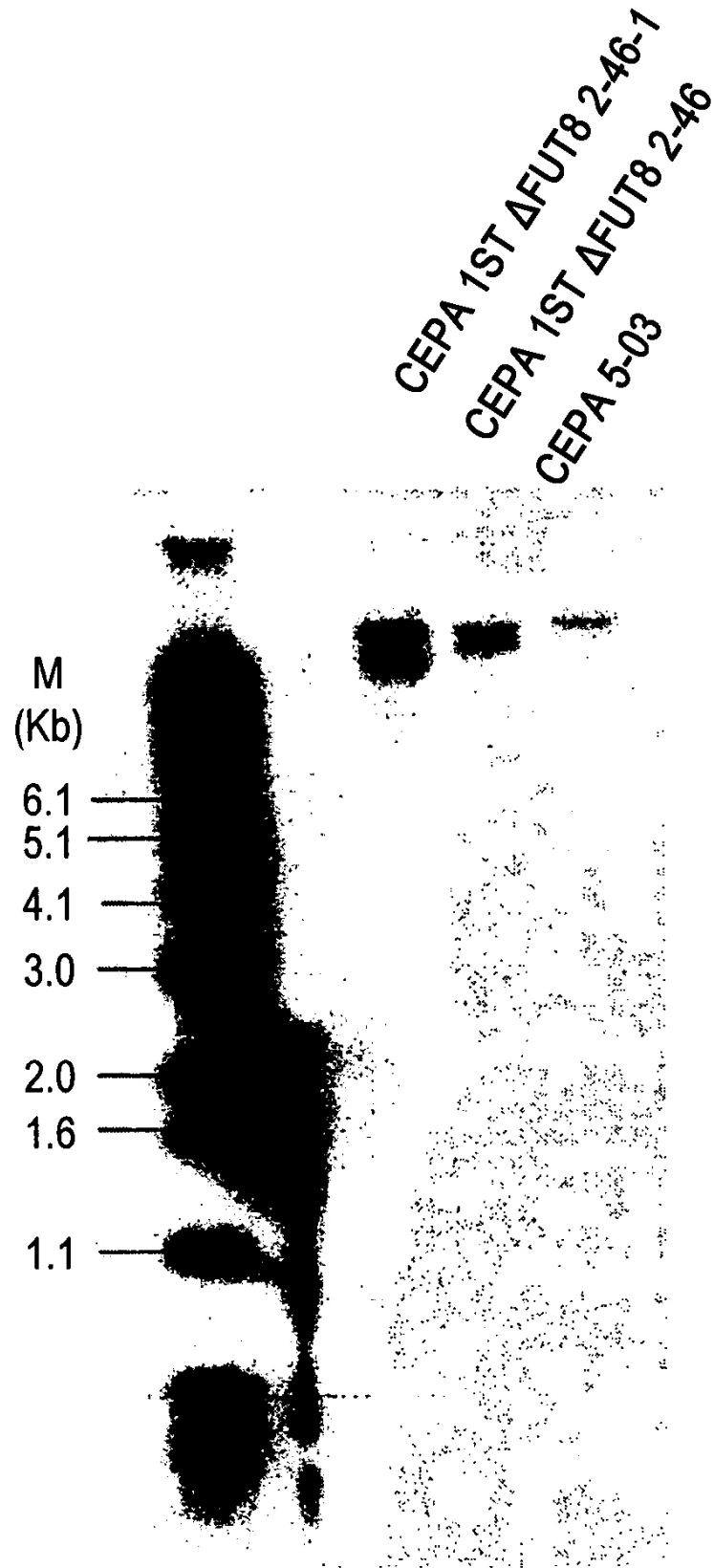


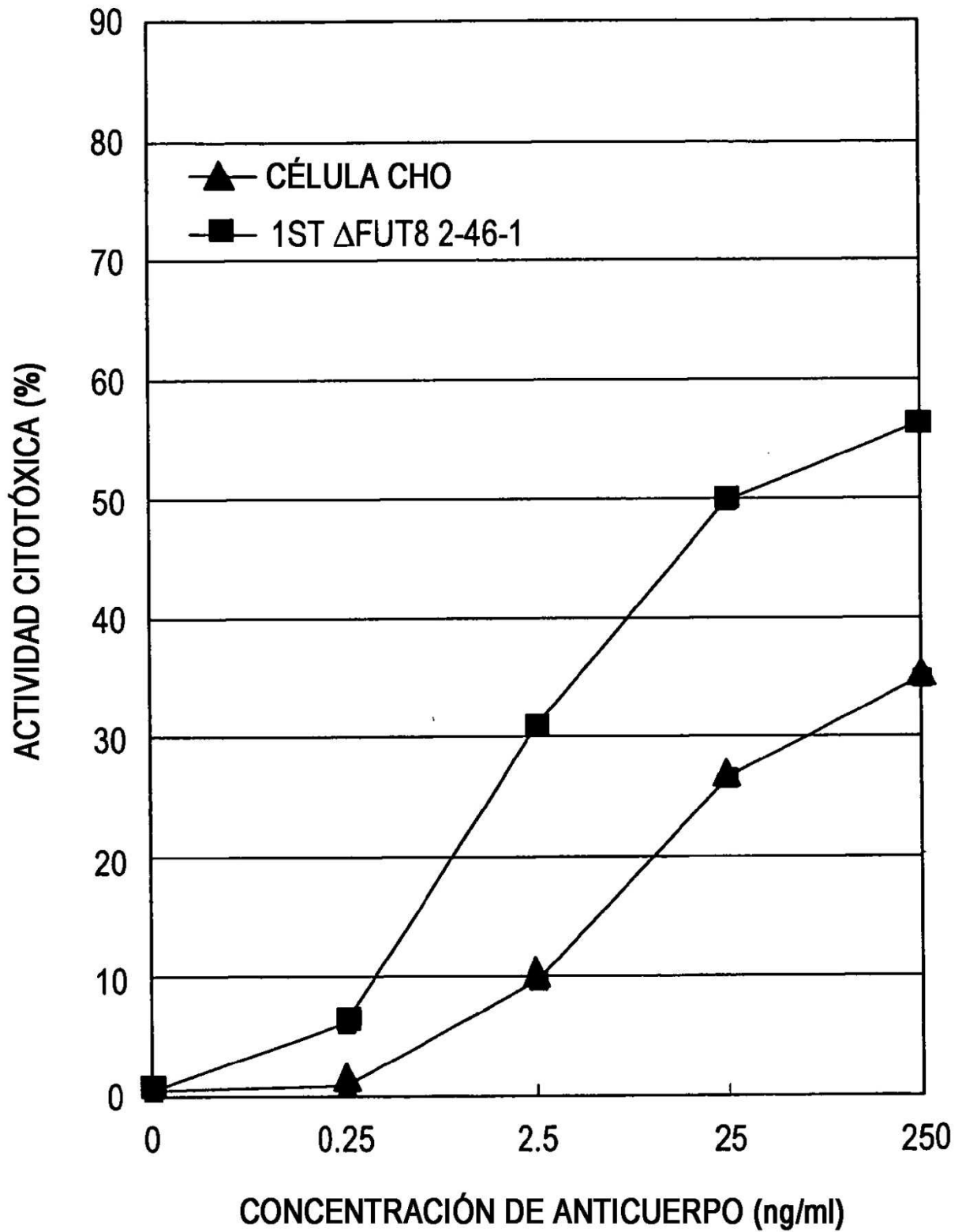
FIG. 42

FIG. 43

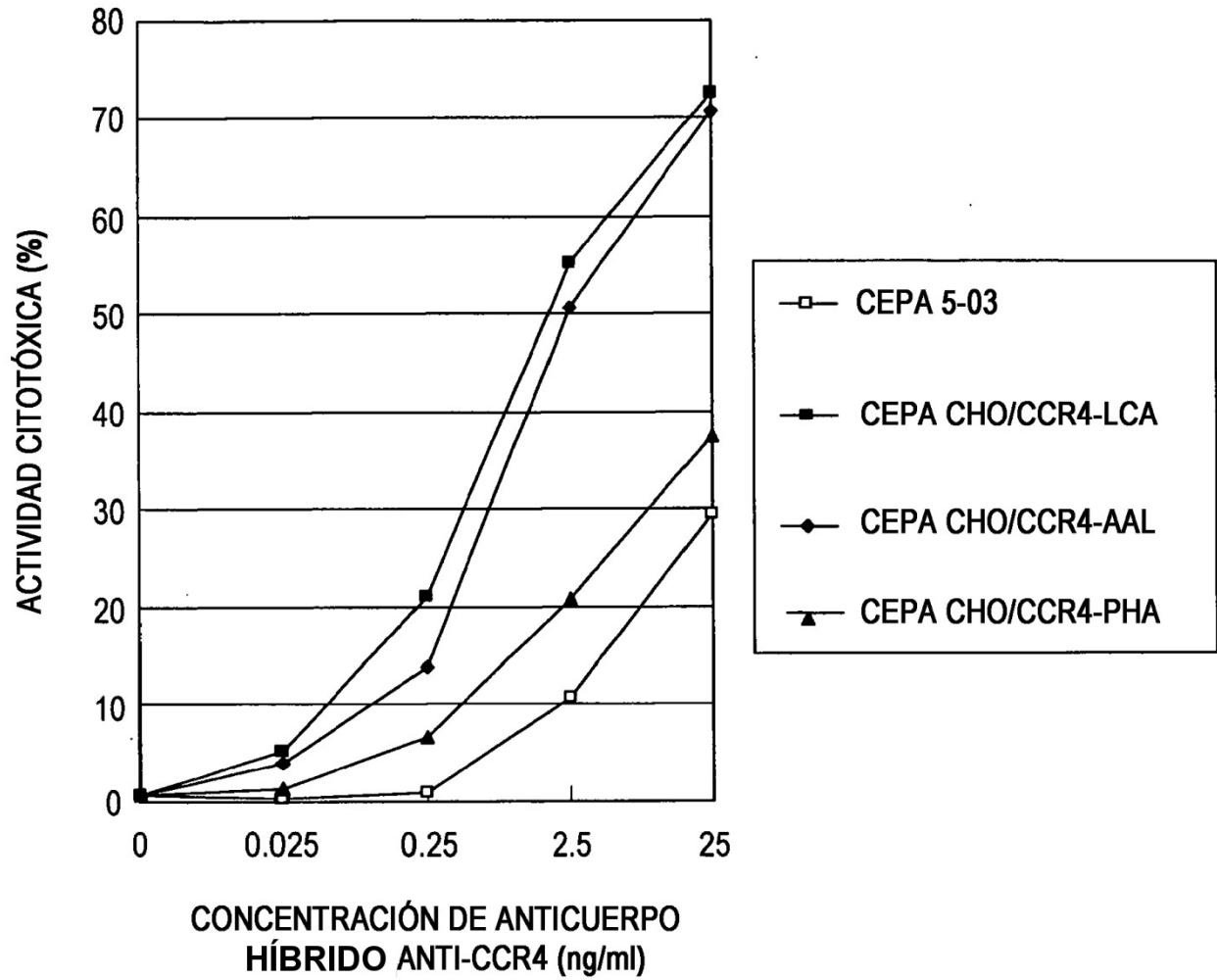


FIG. 44

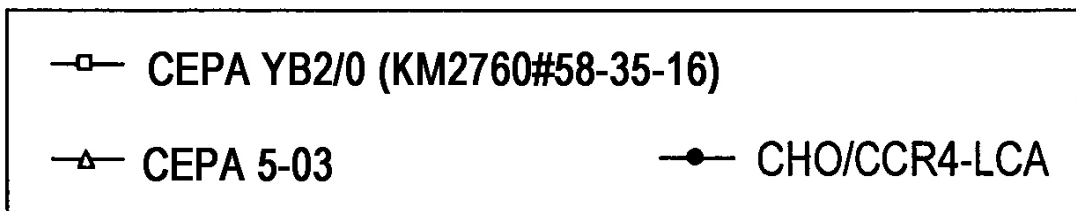
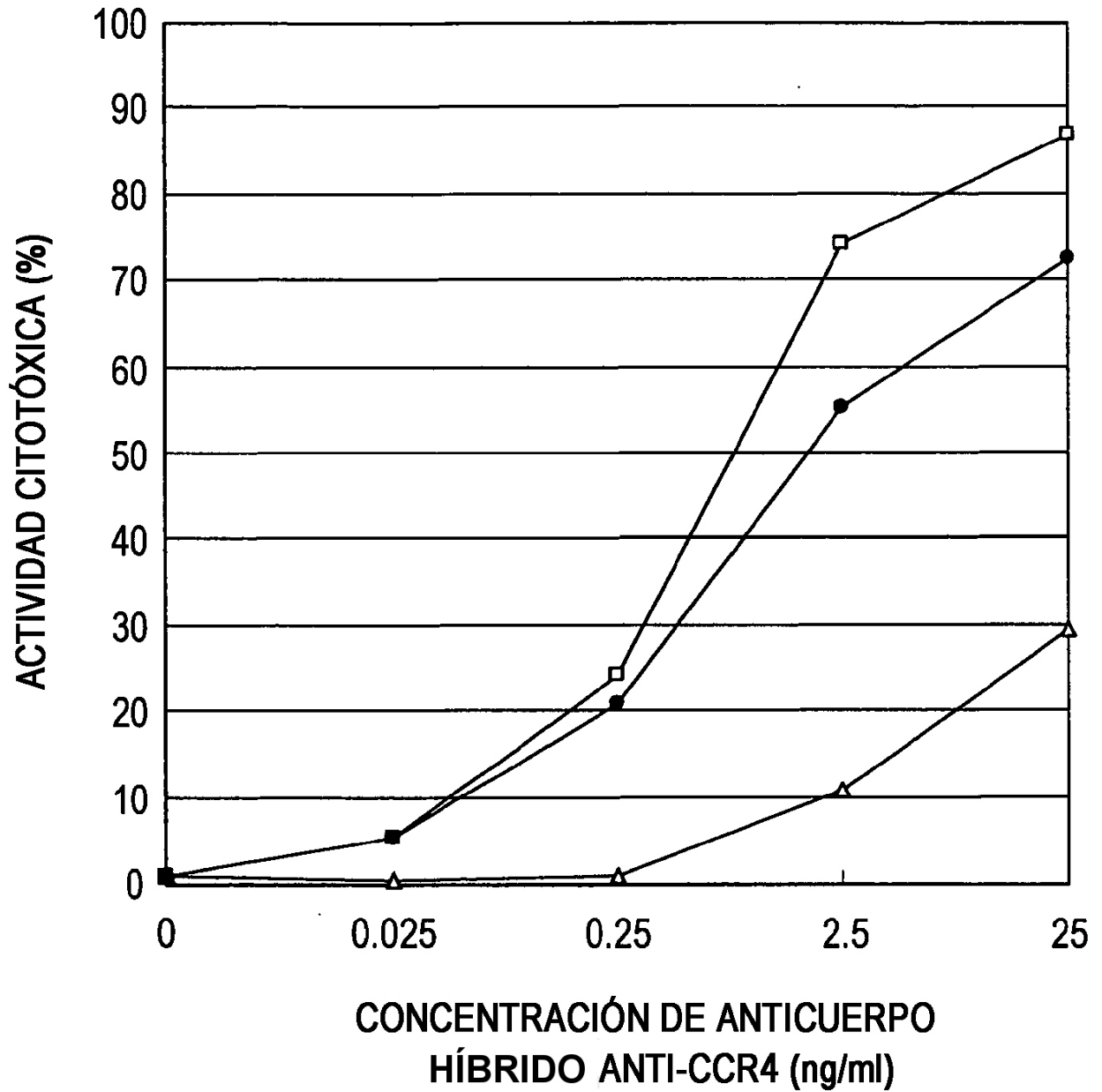


FIG. 45A

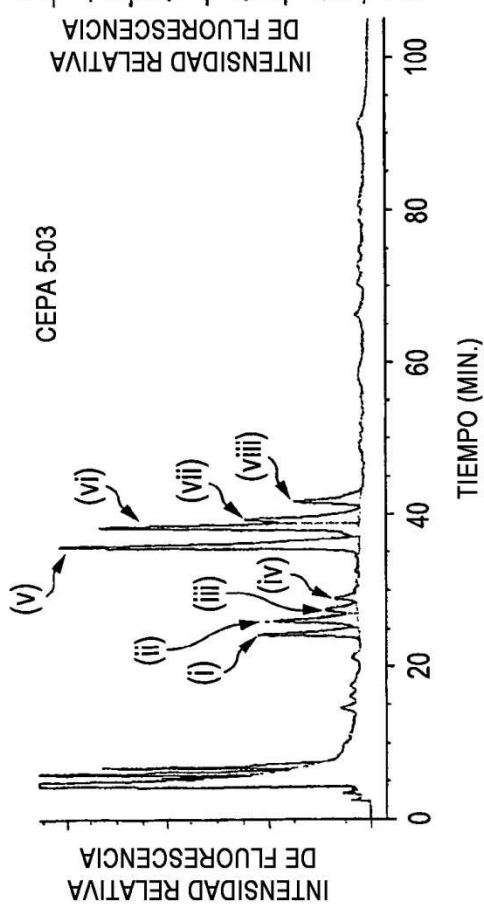


FIG. 45C

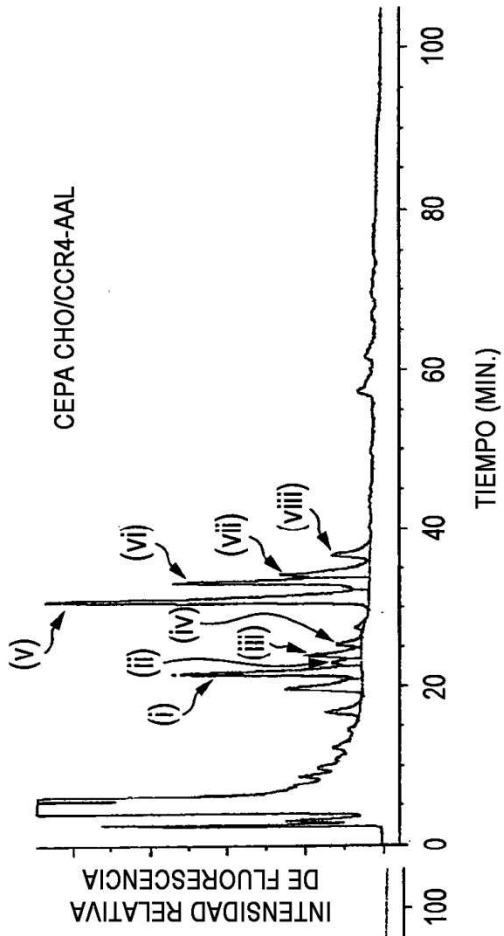


FIG. 45B

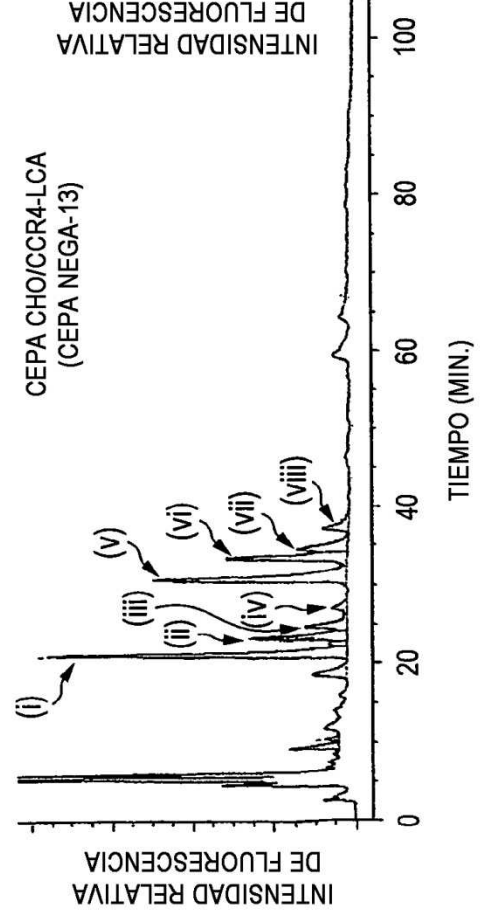


FIG. 45D

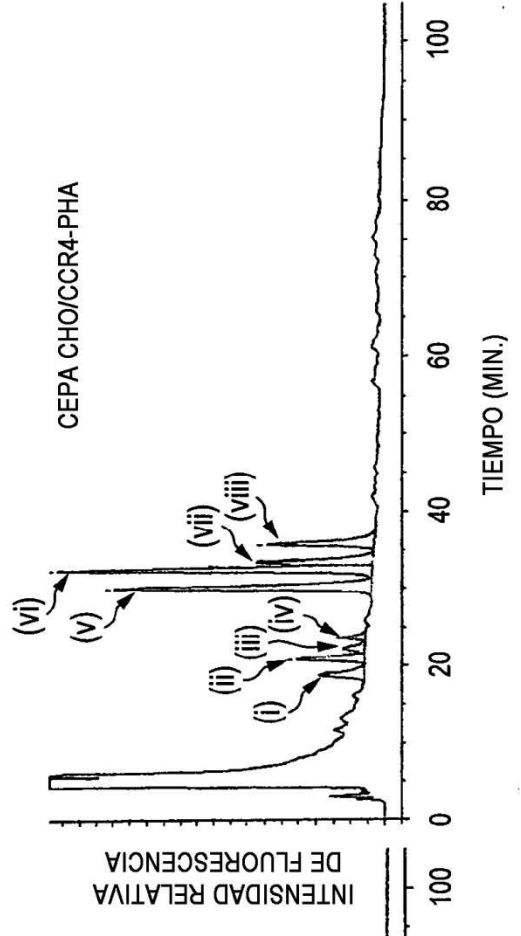


FIG. 46

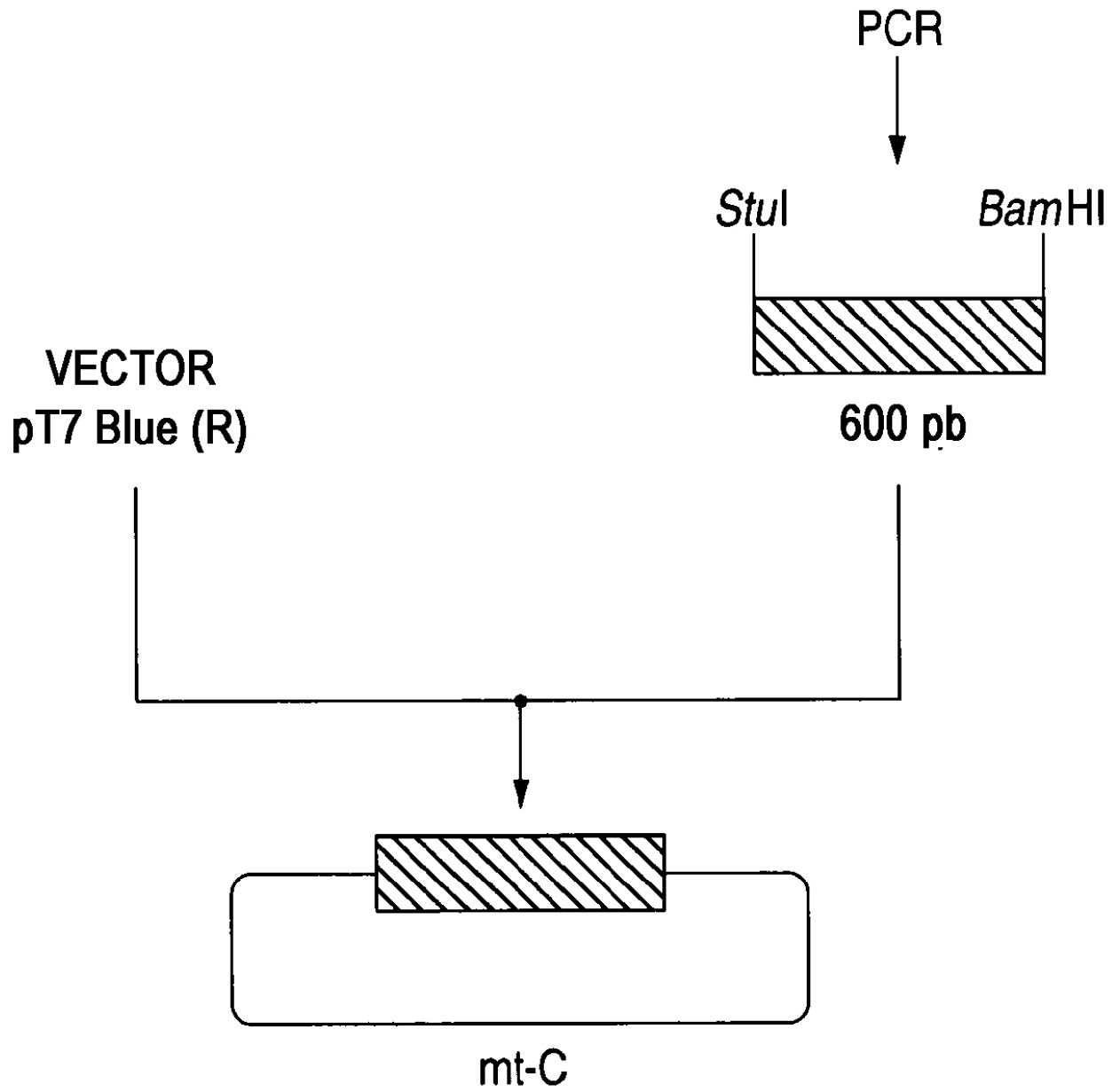


FIG. 47

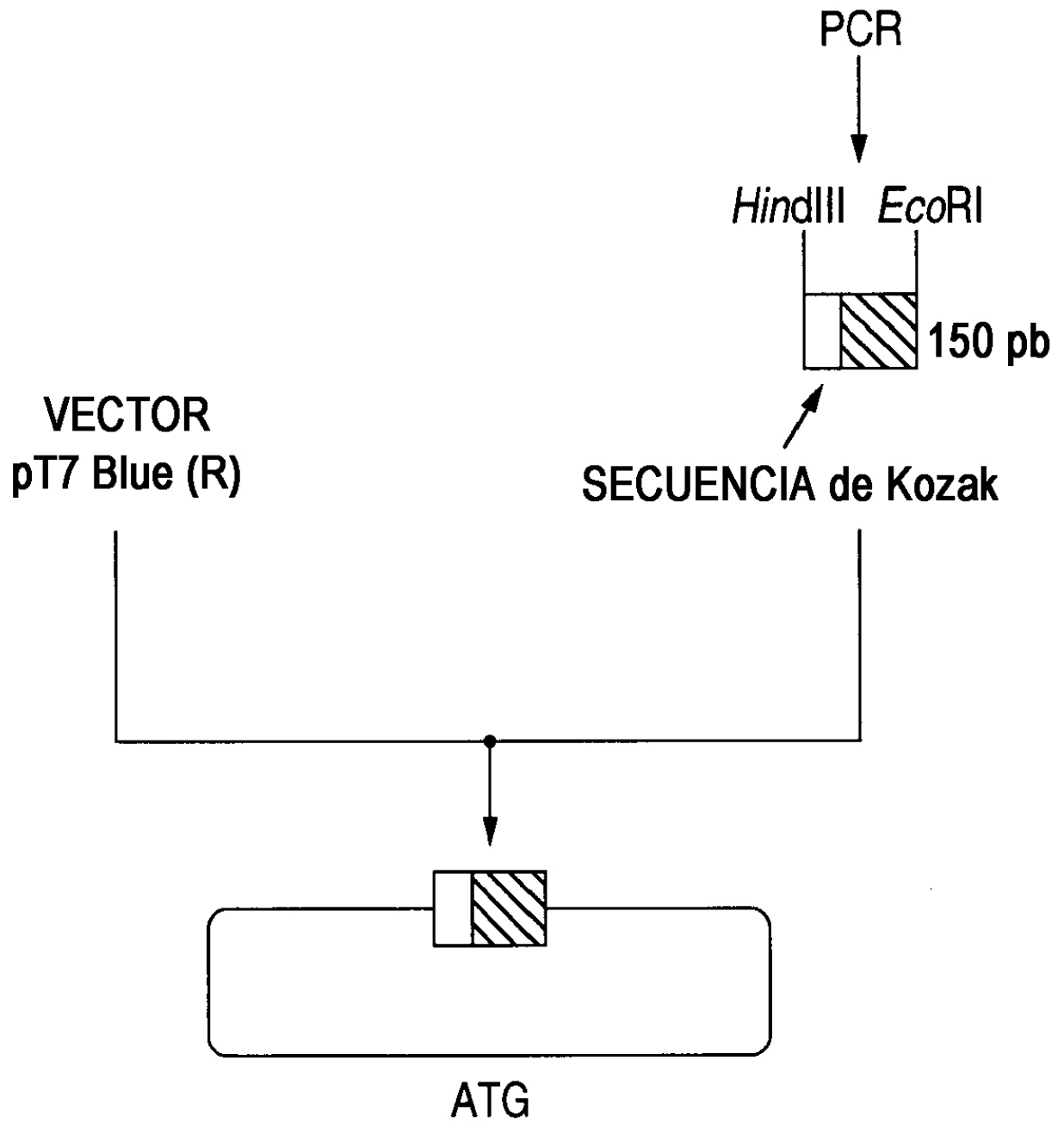


FIG. 48

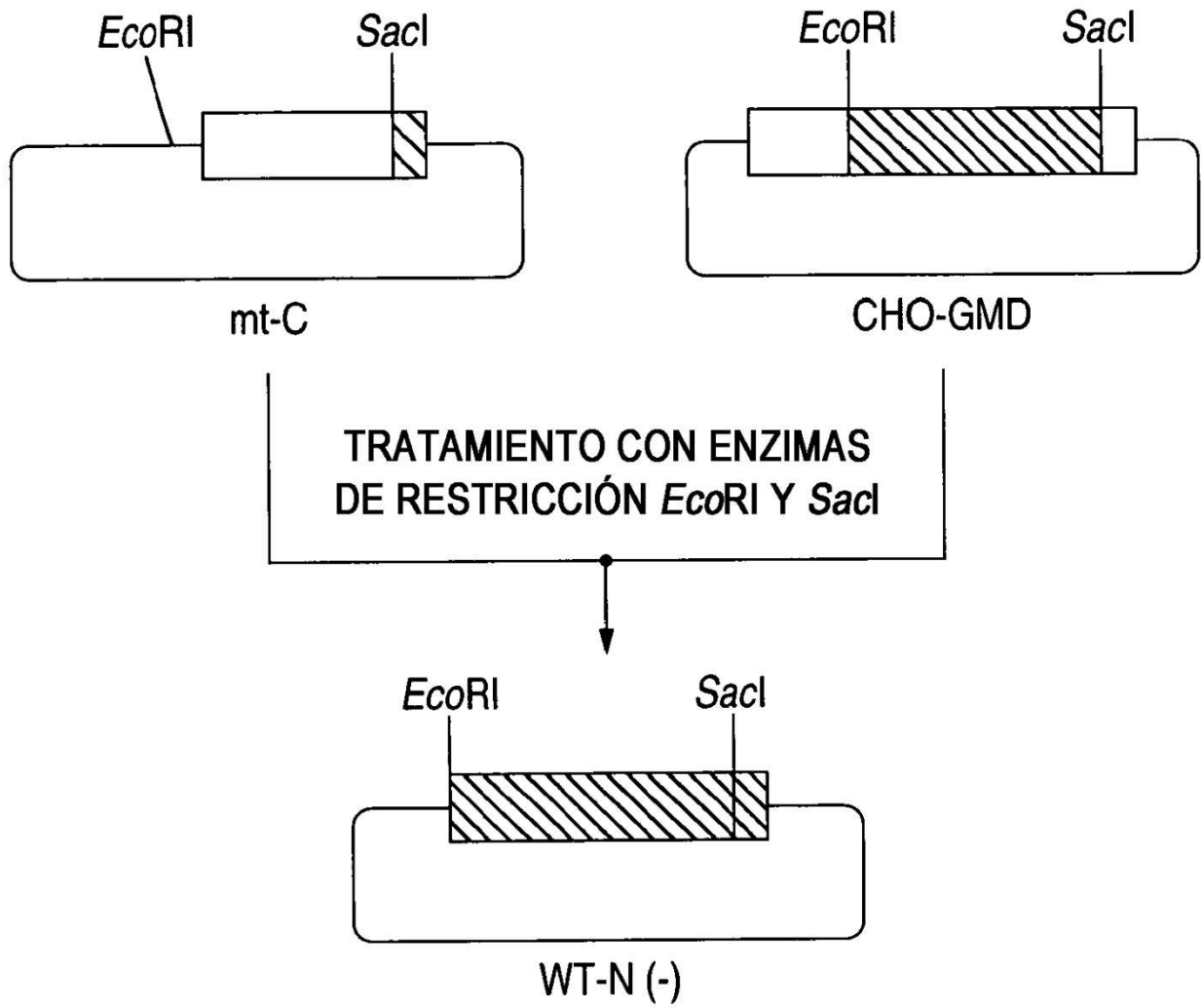


FIG. 49

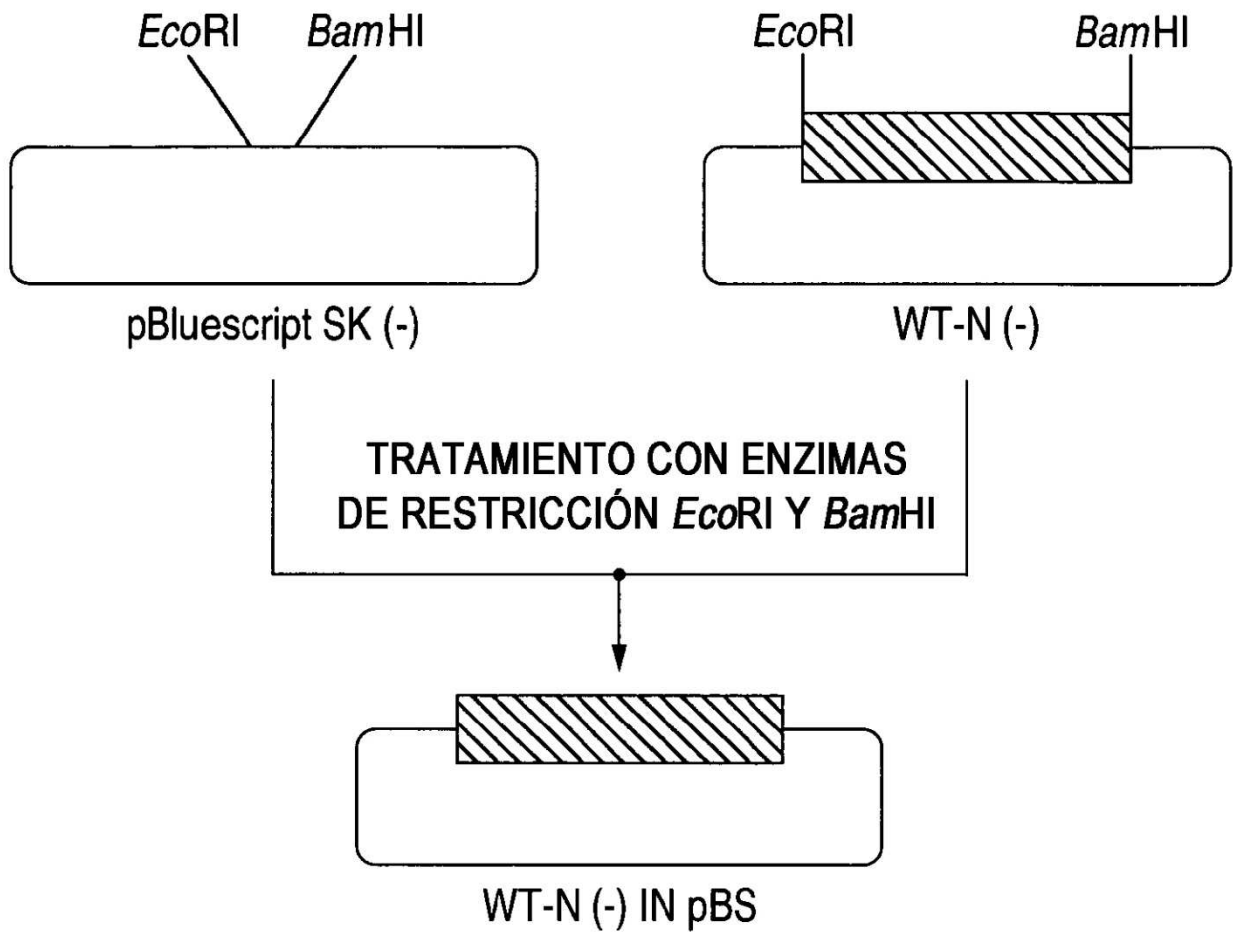


FIG. 50

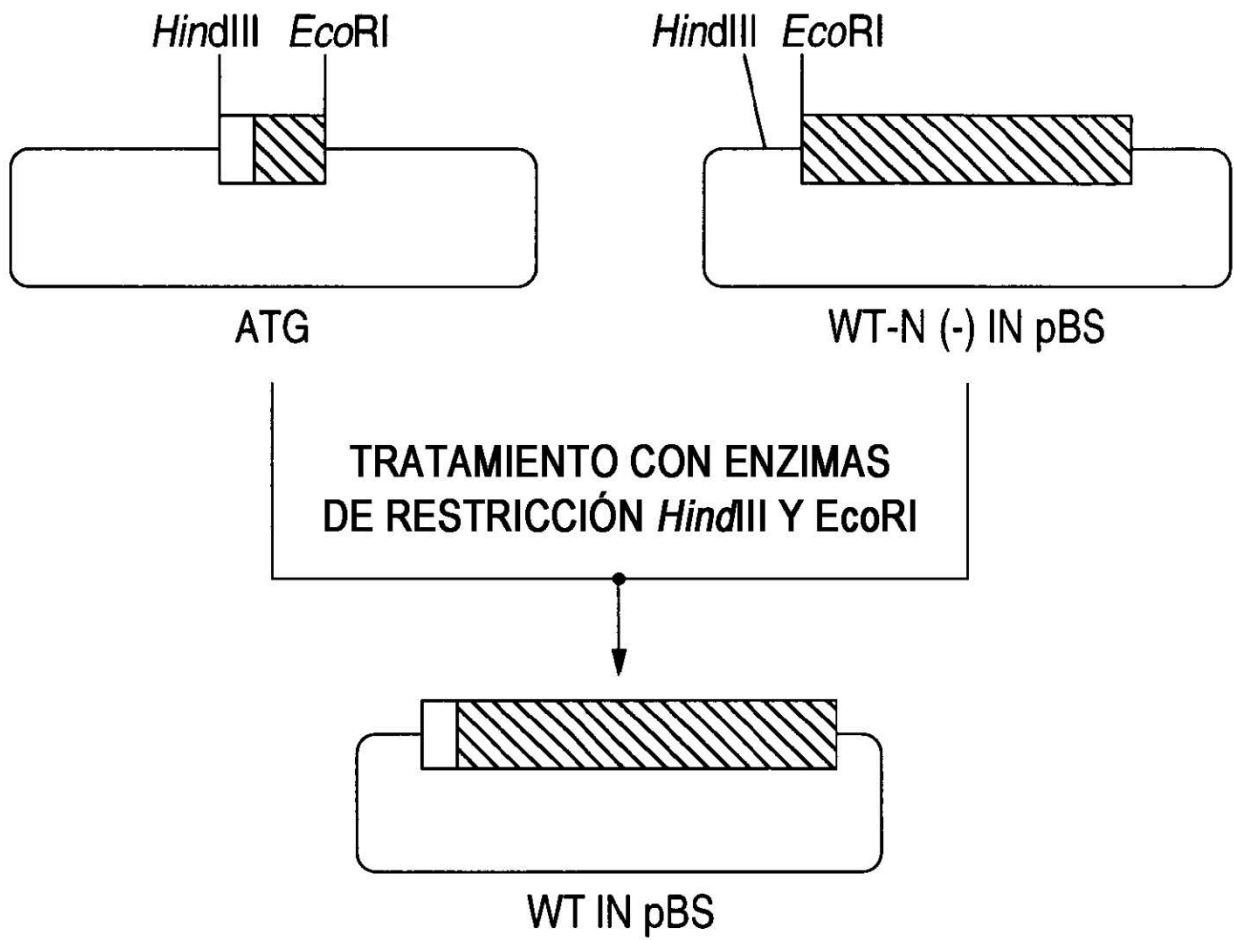


FIG. 51

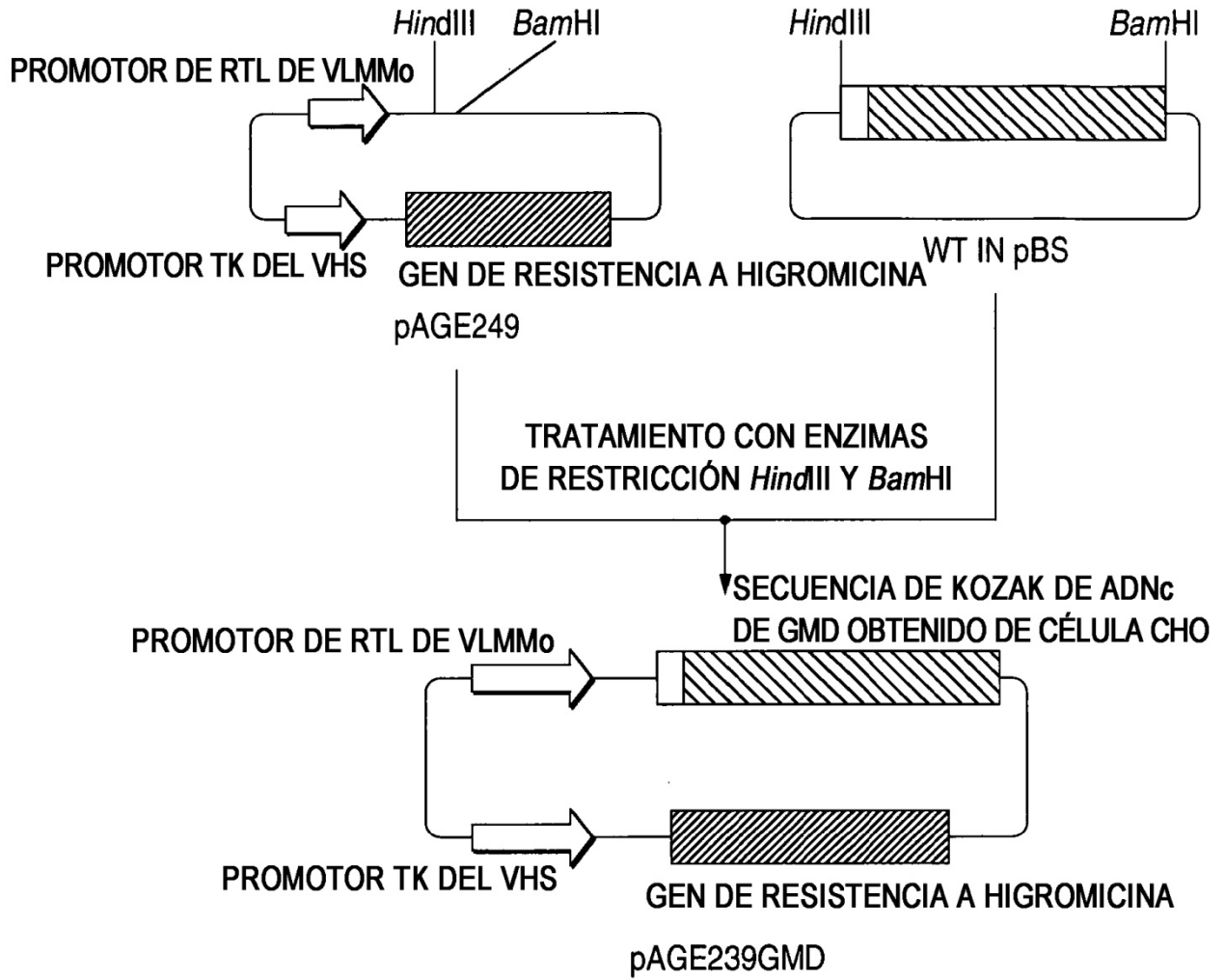


FIG. 52

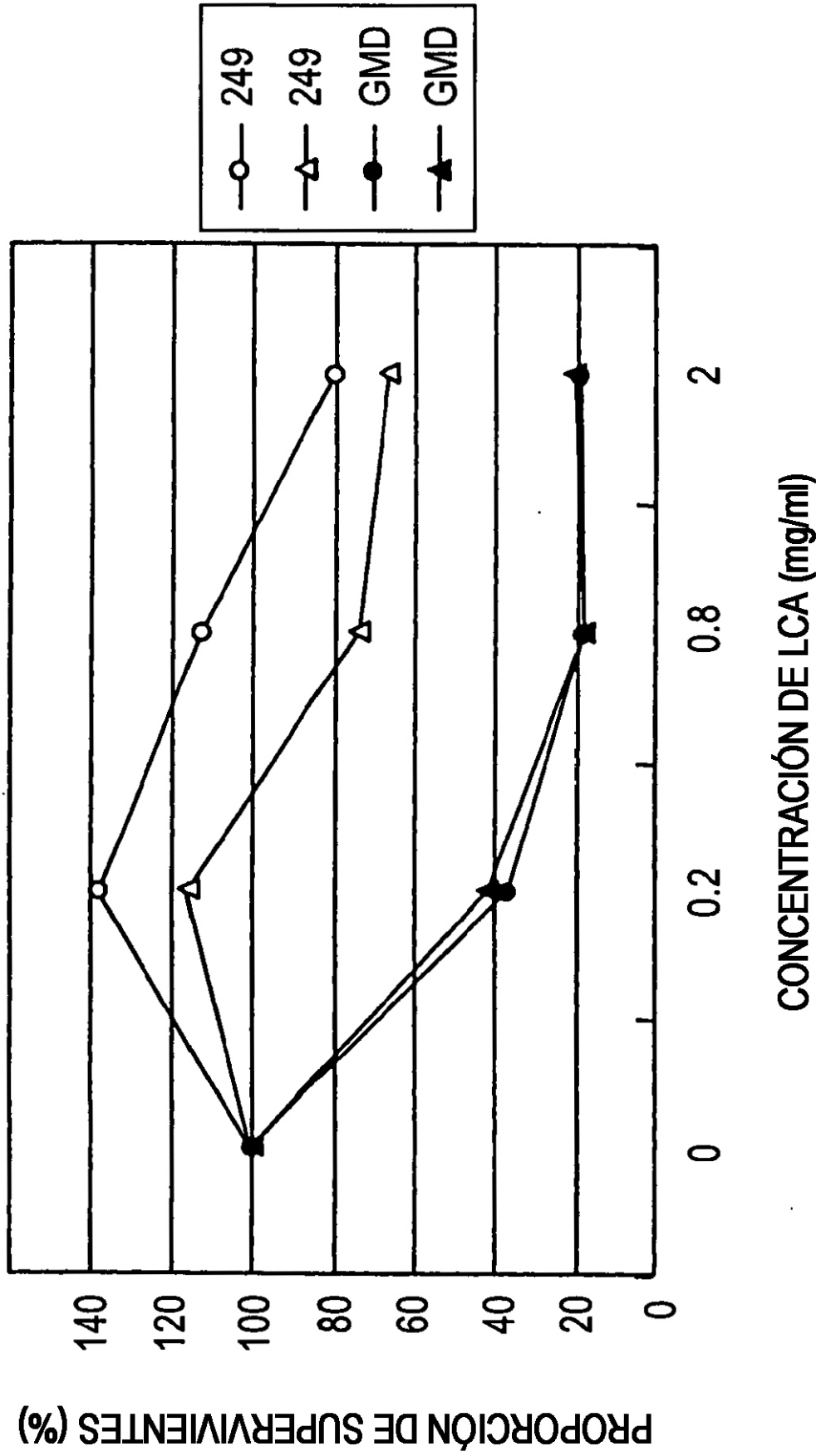


FIG. 53

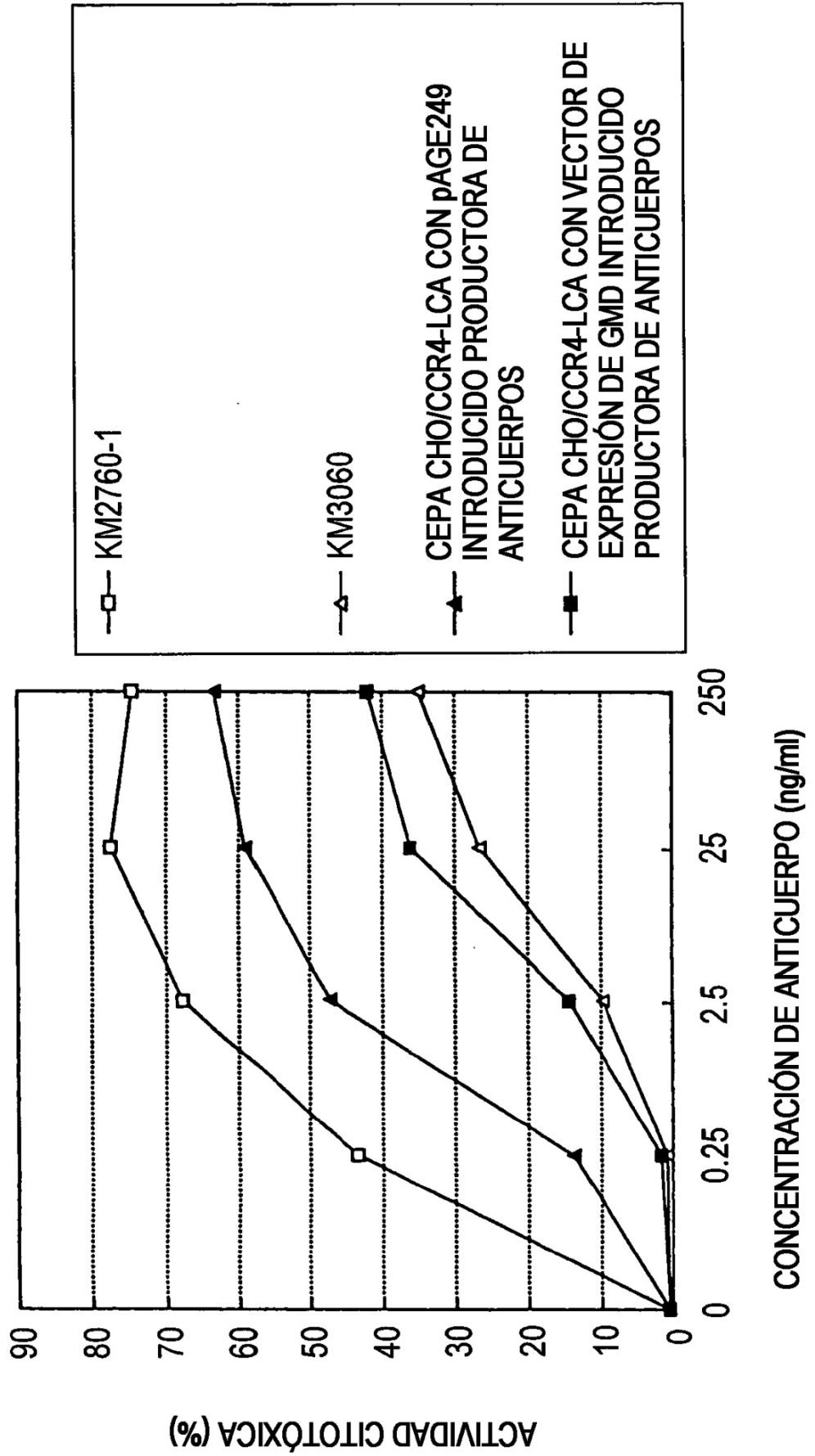


FIG. 54

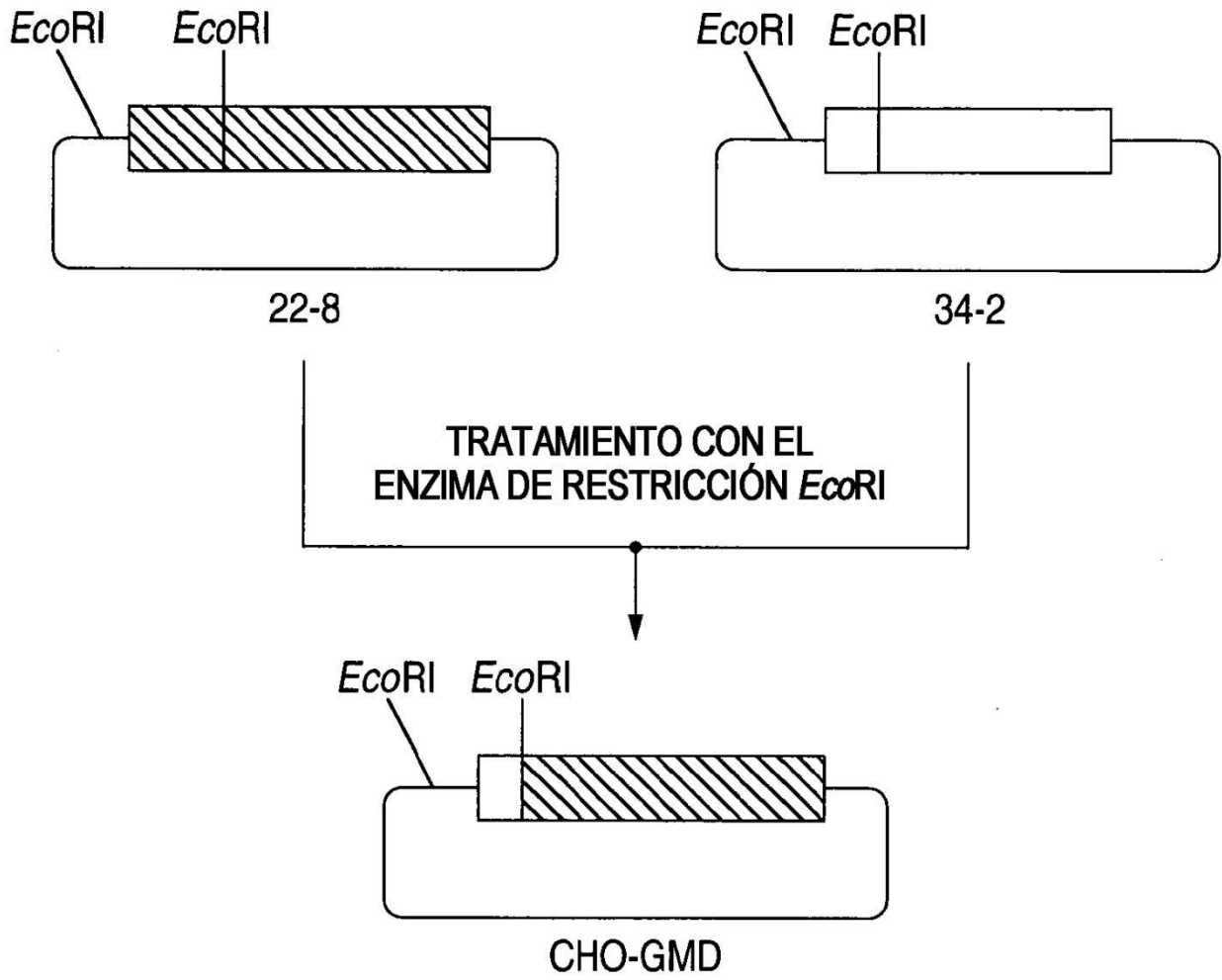


FIG. 55

