

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年10月16日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/084569 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 39/395**, A61P 9/00, 29/00, 31/04, 31/12, 31/14, 35/00, 37/02, 37/04, 37/08, 43/00, G01N 33/15 // C12P 21/08, C12N 15/09, 5/10, C07K 16/18 // (C12P 21/08, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04503
- (22) 国際出願日: 2003年4月9日 (09.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-106949 2002年4月9日 (09.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丹羽 倫平 (NIWA, Rinpei) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 設楽 研也 (SHITARA, Kenya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG CONTAINING ANTIBODY COMPOSITION

(54) 発明の名称: 抗体組成物含有医薬

(57) Abstract: A drug containing, as the active ingredient, an antibody composition produced with the use of cells tolerant to a lectin recognizing a sugar chain structure in which an  $\alpha$ -bond is formed between the 6-position of N-acetylglucosamine at the reducing end of an N-glycoside bond-type complex sugar chain and the 1-position of fucose. This drug is appropriate for patients who cannot be treated with a drug containing, as the active ingredient, an antibody composition produced from cells not tolerant to a lectin recognizing a sugar chain structure in which an  $\alpha$ -bond is formed between the 6-position of N-acetylglucosamine at the reducing end of an N-glycoside bond-type complex sugar chain and the 1-position of fucose. A method of screening such a patient using the drug.

(57) 要約: N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者に適用する医薬、および該医薬を用いた該患者のスクリーニング方法。



WO 03/084569 A1

## 明 細 書

## 抗体組成物含有医薬

## 技術分野

本発明は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者または疾患に適応する医薬、および該医薬を用いた該患者のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

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

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒト IgG クラスの抗体が主として利用されている [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and

Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有していることが報告されている [ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販の抗 CD20 抗体リツキサンの (IDEC 社/Genentech 社製)、抗 HER2 抗体ハーセプチン (Roche 社/Genentech 社製) を始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

また ADCC 活性および CDC 活性の程度は、標的細胞上の抗原の発現量に正の相関を示すことが知られている [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 116, 253 (1976)、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート (J. Natl. Cancer Inst.), 72, 673 (1984)、ジャーナル・オブ・ヌクレアー・メディシン (J. Nucl. Med.), 27, 422 (1986)、キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 48, 6303 (1988)、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British J. Cancer), 78, 478 (1998)]。また市販されている抗体医薬は、標的細胞上にある程度の抗原量が存在しなければ治療効果を有さないことが、ハーセプチンを用いた検討により実証されている。

すなわち、ハーセプチンの ADCC 活性と、標的となる癌細胞上の HER2 抗原の発現量との相関について解析がなされた結果、標的細胞上の HER2 数が  $10^4$  乗個レベルでは ADCC 活性がほとんど誘導されず、有意な ADCC 活性の誘導が起こるのは標的細胞上の HER2 数が  $10^5$  乗個レベル以上であり、強い ADCC 活性が誘導されるのは標的細胞上の HER2 数が  $10^6$  乗個程度であることが示された。例えば、HER2 分子が  $9.0 \times 10^5$  個発現しているヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 に対してはハーセプチンは強い ADCC 活性を示すが、HER2 分子が  $2.2 \times 10^4$  個発現しているヒト乳癌細胞株 MCF7 に対してはハーセプチンは ADCC 活性を示さなかった [キャンサ

ー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 37, 255 (1993)、ハーセプチン™注射用 150 パンフレット, HER. PA. 1.2(2001年6月)]。

臨床試験においても、免疫組織化学法、または蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により腫瘍組織の HER2 が高発現と認められた患者に対する方が、HER2 が低発現の患者に対するよりもハーセプチンの治療効果が有意に高いことが知られている [プロシーディングス・オブ・アメリカン・ソサエティ・オブ・クリニカル・オンコロジー (Proc. Am. Soci. Clin. Oncol.), 20, 22a (2001)]。このように、HER2 低発現の患者に対してほとんど治療効果が示されないことより、ハーセプチンの適応は HER2 過剰発現患者に限定されている。

これまでに知られている抗体医薬としては、ハーセプチンの他にも抗 CD20 抗体 リツキサン、抗 CD52 抗体 Campath などがあげられる。これらの抗体はいずれも標的細胞を破壊することにより治療効果を得ることを目的としているが、いずれも ADCC 活性がその主なメカニズムとされている。これらの抗体の治療可能な標的細胞上の抗原数は、CD20 では  $1\sim 3\times 10^5$  個 [ジャーナル・オブ・クリニカル・パソロジー (J. Clin. Pathol.), 51, 364 (1998)]、CD52 でも  $1\sim 5\times 10^5$  個 [セミナーズ・イン・オンコロジー (Seminars in Oncology), 26 (5 Suppl 14), 52 (1999)] でいずれも 10 の 5 乗個以上である。したがって、これまでに知られている抗体医薬は ADCC 活性の発現に 10 の 5 乗個以上の抗原が標的細胞中に発現されていることを必要としているが、10 の 5 乗個未満の抗原を発現している標的細胞に対する抗体を有効成分とする治療薬は知られていない。

#### 発明の開示

本発明は、以下の (1)～(21) に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有

効成分として含有する医薬では治療できない患者に適応することを特徴とする医薬。

(2) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者が、該患者の標的細胞における、該抗体組成物が認識する抗原が、該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量しか発現していない患者である、(1) に記載の医薬。

(3) 該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量が、該抗体組成物が抗体依存性細胞障害活性を発揮するには十分ではない量である、(2) に記載の医薬。

(4) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない疾患に適応することを特徴とする医薬。

(5) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない疾患が、該疾患に関わる標的細胞における、該抗体組成物が認識する抗原が、該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量しか発現していない疾患である、(4) に記載の医薬。

(6) 該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量が、該抗体組成物が抗体依存性細胞障害活性を発揮するには十分ではない量である、(5) に記載の医薬。

(7) レクチンに耐性を有する細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、(1)～(6) のいずれか1項に記載の医薬。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

(8) レクチンが、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンである、(1)～(7) のいずれか1項に記載の医薬。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(9) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(8) のいずれか1項に記載の医薬。

(10) 細胞が、下記 (a)～(j) からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(9) のいずれか1項に記載の医薬。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

(j) 植物細胞。

(11) 抗体組成物が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子を有効成分として含有する抗体組成物である、(1)～(10) のいずれか1項に記載の医薬。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；

(d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(12) 抗体分子のクラスが IgG である、(11) に記載の医薬。

(13) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(1)～(12) のいずれか1項に記載の医薬。

(14) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物よりも高いことを特徴とする、(13) に記載の医薬。

(15) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、(14) に記載の医薬。

(16) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、(13)～(15) のいずれか1項に記載の医薬。

(17) 糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物が、CHO 細胞が生産した抗体組成物である、(16) に記載の医薬。

(18) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、(1)～(17) のいずれか 1 項に記載の医薬。

(19) (1)～(17) のいずれか 1 項に記載の医薬を製造するための、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物の使用。

(20) (i) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬あるいは (1)～(17) のいずれか 1 項に記載の医薬と患者から取得したこれら医薬の標的細胞とを接触させ、(ii) 該標的細胞と反応した医薬の活性を測定し、(iii) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬が示した活性と (1)～(17) のいずれか 1 項に記載の医薬が示した活性との測定値を比較し、(iv) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を含有する医薬が示した活性が低い患者を選択することにより、(1)～(17) のいずれか 1 項に記載の医薬が有効な患者をスクリーニングする方法。

(21) 標的細胞と反応した医薬の活性を測定する方法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる活性を測定する方法である、(19) に記載の方法。

- (a) 抗体依存性細胞障害活性；
- (b) Fc $\gamma$  受容体IIIa 結合活性；
- (c) 補体依存性細胞障害活性；
- (d) 増殖抑制活性。

本発明は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞（以下、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞と略記する）から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞（以下、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン不耐性細胞と略記する）から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬（以下、「従来の抗体医薬」と呼ぶ）では治療できない患者に適応することを特徴とする医薬に関する。

本発明の  $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など抗体組成物を製造することができる細胞であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチン耐性を有する細胞であればいかなる細胞でもよい。

具体的には、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する、ハイブリドーマ細胞、ヒト抗体およびヒト化抗体を製造するための宿主細胞、ヒト抗体を生産するためのトランスジェニック非ヒト動物を製造するための胚性幹細胞および受精卵細胞、ヒト抗体を生産するためのトランスジェニック植物を製造するための植物カルス細胞、ミエローマ細胞、トランスジェニック非ヒト動物由来の細胞などがあげられる。ミエローマ細胞はハイブリドーマ細胞を製造する際に融合細胞として用いることができる。また、トランスジェニック非ヒト動

物に抗原を免疫し、該動物の脾臓細胞を取り出し、ハイブリドーマ細胞を製造するために用いることができる。

レクチンに耐性を有する細胞とは、培養培地にレクチンを有効濃度与えて細胞培養を行ったときにも、生育が阻害されない細胞をいう。

本発明において、生育が阻害されないレクチン有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常  $10 \mu\text{g/ml}$ ~ $10.0\text{mg/ml}$ 、好ましくは  $0.5$ ~ $2.0\text{mg/ml}$  である。親株細胞に変異を導入した場合のレクチンの有効濃度とは、該親株細胞が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは親株細胞が正常に生育できない濃度と同濃度、より好ましくは 2~5 倍、さらに好ましくは 10 倍、最も好ましくは 20 倍以上の濃度をいう。

親株細胞とは、何らかの処理を施す前の細胞、すなわち本発明で用いる  $\alpha 1, 6$ -フコース/レクチン耐性細胞を選択する工程を行う前の細胞、上述した酵素活性を低下または欠失するために遺伝子工学的な処理を行う前の細胞をいう。

親株細胞としては、特に限定はないが、種々の細胞株の親株細胞の具体例として、以下に示す。

NS0 細胞の親株細胞としては、バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.), 73, 261, (2001) 等の文献に記載されている NS0 細胞があげられる。また、理化学研究所細胞開発銀行に登録されている NS0 細胞株 (RCB0213)、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

SP2/0-Ag14 細胞の親株細胞としては、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 126, 317 (1981)、ネイチャー (Nature), 276, 269 (1978)、ヒューマン・アンチボディーズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antibodies and Hybridomas), 3, 129 (1992) 等の文献に記載されている SP2/0-Ag14 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL-1581) あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株 (ATCC CRL-1581.1) などもあげられる。

チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞の親株細胞としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p883-900)等の文献に記載されている CHO 細胞などがあげられる。また、ATCC に登録されている CHO-K1 株 (ATCC CCL-61)、DUXB11 株 (ATCC CRL-9096)、Pro-5 株 (ATCC CRL-1781) や、市販の CHO-S 株 (Lifetechnologies 社 Cat#11619)、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞の親株細胞としては、Y3/Ag1.2.3 細胞 (ATCC CRL-1631) から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、J. Cell. Biol., 93, 576 (1982)、Methods Enzymol., 73B, 1 (1981) 等の文献に記載されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL-1662) あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンも包含される。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワソウレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) などがあげられる。

本発明において、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞としては、一定の有効濃度のレクチン存在下で生育が阻害されない細胞であれば、いずれでもよいが、例えば、以下にあげる少なくとも 1 つの蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞などがあげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質（以下、「GDP-フコース合成酵素」と表記する）；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質（以下、「 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素」と表記する）；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質（以下、「GDP-フコース輸送蛋白質」と表記する）。

GDP-フコース合成酵素としては、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含し、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素などがあげられる。

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

de novo の合成経路に関与する GDP-フコース合成酵素としては、GDP-mannose 4-dehydratase (GDP-マンノース 4-デヒドラターゼ；以下、GMD と表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase (GDP-ケト-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4-リダクターゼ；以下、Fx と表記する) などがあげられる。

Salvage 合成経路に関与する GDP-フコース合成酵素としては、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスフォリラーゼ；以下、GFPP と表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

$\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素

としては、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に影響を与える酵素であればいかなる酵素も包含される。具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼや  $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

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

GDP-フコース輸送蛋白質としては、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質であればいかなる蛋白質も包含され、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースをゴルジ体内へ輸送する反応に影響を与える蛋白質も GDP-フコース輸送蛋白質に包含され、具体的には上述の細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性に影響を与えたり、発現に影響を与える蛋白質などがあげられる。

本発明の製造方法に用いられる細胞を取得する方法としては、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞を選択することができる手法であればいかなる手法でも用いることができる。具体的には、上述した蛋白質の活性を低下または欠失させる手法などがあげられる。上述の蛋白質の活性を低下または欠失させる手法としては、

- (a) 蛋白質の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 蛋白質の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 蛋白質についての突然変異を導入する手法；
- (d) 蛋白質の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法；などがあげられる。

従来抗体医薬では治療できない患者としては、患者の標的細胞における、該抗体組成物が認識する抗原の発現量が、抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量しか発現していない患者があげられる。

本発明における抗原としては、標的細胞に発現する、抗体組成物が反応するいかなる抗原も包含される。

本発明における標的細胞とは、患者の疾患に関与する、抗体組成物が反応する抗原を発現するいかなる細胞も包含する。

本発明における疾患とは、標的細胞が病態形成に直接または間接的に関与する疾患であればいかなるものも包含される。例えば腫瘍細胞、新生血管細胞や間質細胞等が関与する悪性腫瘍、免疫細胞が関与するアレルギー、炎症や自己免疫疾患、血管細胞、血小板や平滑筋細胞等が関与する循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患や細菌感染を伴う疾患があげられる。

本発明の医薬が有効な、抗原の発現が少ない標的細胞の抗原の発現量の上限としては、標的細胞あたり好ましくは  $10^5$  個、より好ましくは  $5 \times 10^4$  個、さらに好ましくは  $2 \times 10^4$  個、特に好ましくは  $10^4$  個、最も好ましくは  $5 \times 10^3$  個があげられる。

具体的にはヒトケモカインレセプターの種類 CCR4 (以下 CCR4 と称す) の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは  $10^5$  個、より好ましくは  $5 \times 10^4$  個、さらに好ましくは  $2 \times 10^4$  個、特に好ましくは  $10^4$  個、最も好ましくは  $5 \times 10^3$  個があげられる。

ヒト CD20 (以下 CD20 と称す) の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは  $10^5$  個、より好ましくは  $5 \times 10^4$  個、さらに好ましくは  $3 \times 10^4$  個、特に好ましくは  $2 \times 10^4$  個、最も好ましくは  $10^4$  個があげられる。

ヒト HER2 (以下 HER2 と称す) の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは  $5 \times 10^5$  個、より好ましくは  $10^5$  個、さらに好ましくは  $5 \times 10^4$  個、特に好ましくは  $3 \times 10^4$  個、最も好ましくは  $2 \times 10^4$  個があげられる。

本発明の医薬が有効な、抗原の発現が少ない標的細胞の抗原の発現量の下限としては、標的細胞あたり好ましくは 1 個、より好ましくは  $10^2$  個、さらに好ましくは  $3 \times 10^2$  個、特に好ましくは  $10^3$  個、最も好ましくは  $3 \times 10^3$  個があげられる。

具体的には CCR4 の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは 1 個、より好ましくは  $10^2$  個、さらに好ましくは  $5 \times 10^2$  個、特に好ましくは  $10^3$  個、最も好ましくは  $3 \times 10^3$  個があげられる。

CD20 の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは 1 個、より好ましくは  $10^2$  個、さらに好ましくは  $10^3$  個、特に好ましくは  $2 \times 10^3$  個、最も好ましくは  $5 \times 10^3$  個があげられる。

HER2 の場合であれば、標的細胞あたり好ましくは 1 個、より好ましくは  $10^2$  個、さらに好ましくは  $10^3$  個、特に好ましくは  $5 \times 10^3$  個、最も好ましくは  $1 \times 10^4$  個があげられる。

本発明の医薬の治療対象である患者もしくは疾患における標的細胞の抗原の発現量は、フローサイトメトリー法、スキャッチャードプロット法、免疫組織染色法、イムノアッセイ法等の、抗体と抗原の結合反応を利用した免疫学的方法であればいかなる方法を用いても測定することができる。

また抗原に対するリガンドが既知の場合には、標的細胞に対するリガンドの結合活性をフローサイトメトリー法、スキャッチャードプロット法、免疫組織染色法、イムノアッセイ法等の方法で検出することにより測定することができる。

抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量としては、該抗体組成物が ADCC 活性を発揮するには十分ではない量をいう。

具体的に抗体組成物が ADCC 活性を発揮するには十分でないとは、患者において、該抗体組成物が標的細胞を障害できないことを意味する。

本発明において、抗体組成物としては、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子を含有してなる組成物であればいかなるものも包含される。

抗体分子とは、重鎖および軽鎖（以下、それぞれ H 鎖および L 鎖と表記する）の 2 種類のポリペプチド鎖がそれぞれ 2 分子ずつ会合した 4 量体である。H 鎖の N 末端側の約 4 分の 1 と L 鎖の N 末端側の約 2 分の 1（それぞれ 100 余アミノ酸）は V 領域と呼ばれ、多様性に富み、抗原との結合に直接関与する。V 領域以外の部分の大半は C 領域と呼ばれる。抗体分子は C 領域の相同性により IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の各クラスに分類される。



端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあげられる。

抗体分子の Fc 領域には、N-グリコシド結合糖鎖が 1 カ所ずつ結合する領域を有しているため、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体分子に結合する N-グリコシド結合糖鎖としては、前記構造式 (I) で示されるコア構造を含むいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する 2 本の N-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。

したがって、本発明において、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞を用いて製造された抗体組成物は、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

抗体分子としては、抗体の Fc 領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc 領域を含む融合蛋白質などがあげられる。

抗体としては、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

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

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

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域（以下、HV または VH とも称す）および抗体 L 鎖 V 領域（以下、LV または VL とも称す）とヒト抗体の H 鎖 C 領域（以下、CH とも称す）およびヒト抗体の L 鎖 C 領域（以下、CL とも称す）とからなる抗体をいう。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムス

ター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

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

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

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

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

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

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージ

ライブラリーならびにヒト抗体トランスジェニック非ヒト動物あるいはヒト抗体トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

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

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

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

トランスジェニック非ヒト動物としては、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルまたはウサギ等があげられる。

抗体の断片は、上記抗体の少なくとも Fc 領域の一部を含んだ断片をいう。Fc 領域とは、抗体の H 鎖の C 末端側の領域、CH2 領域および CH3 領域を意味し、天然型およびその変異型を包含する。少なくとも Fc 領域の一部とは、好ましくは CH2 領域を含む断片、より好ましくは CH2 領域内に存在する 1 番目のアスパラギン酸を含む領域をいう。IgG クラスの Fc 領域は、カバット (Kabat) らの EU

Index [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] のナンバリングで 226 番目の Cys から C 末端、あるいは 230 番目の Pro から C 末端までを意味する。抗体の断片としては、H 鎖の単量体、H 鎖の 2 量体などがあげられる。

Fc 領域の一部を有する融合蛋白質とは、抗体の Fc 領域の一部を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどの蛋白質とを融合させた物質（以下、Fc 融合蛋白質と称す）を意味する。

また、本発明は  $\alpha 1, 6$ -フコース/レクチン耐性細胞から生産された抗体組成物が、 $\alpha 1, 6$ -フコース/レクチン不耐性細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬にくらべて、ADCC 活性が高い抗体組成物である医薬に関する。

$\alpha 1, 6$ -フコース/レクチン不耐性細胞から生産された抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物は、上記の  $\alpha 1, 6$ -フコース/レクチン耐性細胞を用いて抗体組成物を製造することにより得ることができる。

ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する Fc 受容体との結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性をいう [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、顆粒球等の免疫細胞があげられる。また Fc 受容体は Fc  $\alpha$  受容体 I、Fc  $\epsilon$  受容体 I、Fc  $\epsilon$  受容体 II、Fc  $\gamma$  受容体 I、Fc  $\gamma$  受容体 IIa、Fc  $\gamma$  受容体 IIb、Fc  $\gamma$  受容体 IIc、Fc  $\gamma$  受容体 IIIa、Fc  $\gamma$  受容体 IIIb、Fc 受容体 n 等のタイプに分かれる。この内 Fc  $\gamma$  受容体 IIIa は主にナチュラルキラー細胞上に発現し、ADCC 活性に重要な Fc 受容体の一つである [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies:

principles and practice), Third Edition, Acad. Press, 1996 (以下、モノクローナル・アンティボディズと略す)]。

また、抗体組成物の有する細胞障害活性としては ADCC 活性の他に、CDC 活性 (モノクローナル・アンティボディズ) や、抗原に結合することによる抗原発現細胞の増殖抑制活性などがある。増殖抑制活性には標的細胞のアポトーシス誘導や分化誘導を促進するものも含まれる [キャンサー・リサーチ (Cancer Research) 60, 7170 (2000)、ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) 1, 644 (1995)、セル・グロース・ディファレンシエーション (Cell Growth Differ.) 3, 401 (1992)]。

抗体分子の Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、 $\alpha$  1, 6-フコース/レクチン不耐性細胞から生産された抗体組成物よりも高い場合、 $\alpha$  1, 6-フコース/レクチン不耐性細胞が生産する抗体組成物より高い ADCC 活性を有する。

抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が高いほど、抗体組成物の ADCC 活性が高くなる。ADCC 活性が高い抗体組成物としては、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは 20%以上、より好ましくは 30%以上、さらに好ましくは 40%以上、特に好ましくは 50%以上、最も好ましくは 100%の抗体組成物があげられる。

また、CHO 細胞が生産する ADCC 活性が高い抗体組成物としては、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは 20%以上、より好ましくは 30%以上、さらに好ましくは 40%以上、特に好ましくは 50%以上、最も好ましくは 100%の抗体組成物があげられる。

抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全ての N-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。また、糖鎖の割合は、好ましくは、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合をいう。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに  $\alpha$  結合していない糖鎖をいう。好ましくは、フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖があげられる。

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

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

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Anticancer Res., 13, 331-336, 1993)、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266,

1993)、抗 GM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗 CD52 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗 MAGE 抗体 (British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗 HM1.24 抗体 (Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF8 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 FGF8 受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗 PMSA 抗体 (J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997)、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

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

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 gp 120 抗体 (Structure, 8, 385-395, 2000)、抗 CD4 抗体 (J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗 CCR4 抗体、抗ペロ毒素抗体 (J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) などがあげられる。

また、本発明は、本発明の医薬を用いて患者を治療する方法に関する。医薬を用いて患者を治療するとは、医薬を投与することにより患者を治療することである。

さらに、本発明は、本発明の医薬を患者へ投与前に効果を予測するための判別方法に関する。具体的には、以下の工程を含む方法があげられる。

(i) 従来の抗体医薬または本発明の医薬と、患者から採取した標的細胞とを接触させ、(ii) 該標的細胞が反応した医薬の活性を測定し、(iii) 従来の抗体医薬が示した活性と本発明の医薬が示した活性とを比較する。

以下、本発明を詳細に説明する。

## 1. 宿主細胞の作製

本発明で用いられる抗体組成物を製造するための宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

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

(a) アンチセンス法またはリボザイム法による宿主細胞の作製

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097 (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Hum. Mol. Genet.), 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999) 等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製したあるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択することにより、宿主細胞を得ること

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

宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖タンパク質 (東京化学同人) 日本生化学会編 (1988)]、文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社製) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す) 等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

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

造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

#### DNA の調製方法

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA または mRNA を調製する。

調製した全 RNA または mRNA から以下のようにして cDNA ライブラリーを作製する。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法にて GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA を取得することができる。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞の mRNA は市販のもの（例えば Clontech 社製）を用いてもよいし、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などによりヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA を調製し、得られた得られた全 RNA からオリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等により poly(A)<sup>+</sup> RNA として mRNA を調製することができる。

または、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep

mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) などのキットを用いることにより mRNA を調製することもできる。

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

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

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

16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABIPRISM377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片を DNA をプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の DNA を取得することができる。

また、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース

輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いてスクリーニングを行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の DNA を取得することもできる。

取得した GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA の塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABIPRISM377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードしている遺伝子を決定することもできる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を取得することもできる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA は、例えば、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社製) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社製) などを用いることにより、調製することもできる。

また、発現ベクターを用いず、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計したアンチセンス

オリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 10~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

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

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3' -P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

(b) 相同組換え法による宿主細胞の作製

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、上記 1 の (1) の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、E S細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサージョン型いずれでも用いることができる。

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

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

#### (c) RDO 方法による細胞の作製

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1, 6$ -フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1, 6$ -フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1, 6$ -フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1, 6$ -フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質に変異が生じ

た形質転換体を選択することにより、宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載の「DNA の調製方法」などがあげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

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

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

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子に変異が生じた形質転換株を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) の (a) に記載の、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選

択する方法、後述の 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法を選択する方法も用いることができる。

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

#### (d) RNAi 方法による宿主細胞の作製

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子のコンストラクトを設計する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載された DNA の調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵

素、または GDP-フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計した RNAi 遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、宿主細胞を得ることもできる。

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

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

(e) トランスポゾンを用いた方法による、宿主細胞の作製

宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティック (Nature Genet.), 25, 35, (2000) 等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、宿主細胞を作製することができる。

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

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

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

## (2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

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

体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4 つのアミノ酸 (133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリシン) が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている (Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら 4 つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら 4 つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子 (以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する) を調製する。

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

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明に用いられる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

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

### (3) 酵素に突然変異を導入する手法

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

GDP-フコース合成酵素としては、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。α1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、α1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、GDP-フコース合成酵素、α1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

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

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

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

GDP-フコース合成酵素、α1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を測定する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

#### (4) 酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法

宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

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

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

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

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチ

ン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等をあげることができる。

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

レクチン耐性細胞であることを確認する方法としては、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1,6$ -フコース修飾酵素または GDP-フコース輸送蛋白質の発現を確認する方法、直接レクチンを加えた培地に細胞を培養する方法などがあげられる。具体的には細胞内の $\alpha 1,6$ -フコース修飾酵素の一つである $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼの mRNA の発現量を測定し、mRNA の発現が低下していればレクチン耐性の細胞であるといえる。

## 2. トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明で用いられる抗体組成物は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1,6$ -フコース修飾酵素および GDP-フコース輸送蛋白質からなる群から選ばれる蛋白質の少なくとも1つ以上の蛋白質の活性が低下または欠失するようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫を用いて、製造することができる。トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、上述の蛋白質の遺伝子を標的として、1. に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha 1,6$ -フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下ま

たは欠失された胚性幹細胞を作製することができる。

具体的には、染色体上の GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法 [例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987) 等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンをを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型、ジーントラップ型いずれでも用いることができる。

胚性幹細胞へのターゲットベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 (マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (日本特許第 2606856、日本特許第 2517813)、DEAE-デキストラン法 [バイオマニユアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 (マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版) 等をあげることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A

Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。具体的には、hprt 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、hprt 遺伝子を欠損した胚性幹細胞に導入後、胚性幹細胞をアミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、hprt 遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を G418 を含む培地で培養し、G418 耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。DT 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を培養し、生育してきた株を選別する（相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、DT 遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、DT の毒性により生育できない）ことにより、DT 遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）や PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] 等があげられる。

胚性幹細胞を集合キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に 8 細胞期以前の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。胚性幹細胞を注入キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に 8 細胞期から胚盤胞の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。

雌マウスへ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスに得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましく、偽妊娠雌マウスは自然交配によっても得られるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（以下、LHRH と略する）あるいはその類縁体を投与後、雄マウスと交配させることにより、受精能を誘起さ

れた偽妊娠雌マウスを得ることもできる。LHRH の類縁体としては、例えば [3,5-Dil-Tyr5]-LHRH 、 [Gln8]-LHRH 、 [D-Ala6]-LHRH 、 des-Gly10-[D-His(Bzl)6]-LHRH ethylamide 等があげられる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失した受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルスまたは細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法 [組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)] に準じてオーキシンおよびサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック植物を作製することができる。

### 3. 抗体組成物の製造方法

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

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

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

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できる前記1に記載した宿主細胞を用いる。

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

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

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

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、

gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

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

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

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

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

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開

昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 (マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (日本特許第 2606856、日本特許第 2517813)、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウィルスベクター法 (マニピュレイティング・マウス・エンブリオ第 2 版) 等をあげることができる。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

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

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

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

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

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

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

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

培養は、通常 pH6~8、30~40°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。

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

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30°C等の条件下で、1~5 日間行う。

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

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

培養は、通常 pH5~9、20~40°Cの条件下で3~60日間行う。

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

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

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

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

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平 5-336963、特開平 6-823021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を

挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に発現させることにより、目的とする抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

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

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

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

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

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

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

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

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

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

と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができ  
きる。

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

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

## A. ヒト化抗体組成物の製造

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子  
が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト  
抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより  
構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、  
例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC $\gamma$ 1 と表記する）  
およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域（以下、hC $\kappa$  と表記する）等があげら  
れる。

ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンか  
ら成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組  
込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、  
pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103  
[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、  
pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オ  
ブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.  
U. S. A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー  
(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに

用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

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

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

## (2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

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

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

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

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

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジ

ーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR 法と表記する; モレキュラー・クローニング第 2 版, Supplement 1-34) により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

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

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

### (3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することによって見出すことができる。

### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

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

### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を移植するヒト抗体の VH および VL のフレームワーク（以下、FR と表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、

Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さから成る数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

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

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の upstream に、本項 3 の (5) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 3 の (5) でヒト型 CDR 移植抗体の VH

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

#### (7) ヒト化抗体の安定的生産

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

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

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる上記 1 で作製された動物細胞を用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr<sup>-</sup>細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、5 に記載の宿主細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate（以下、G418 と表記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBS とも表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質

転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法（以下、ELISA 法と表記する；アンティボディズ，Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ）等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる（アンティボディズ，Chapter 8、モノクローナル・アンティボディズ）。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する；ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [アンティボディズ，Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ] 等で測定することができる。

## B. Fc 融合蛋白質の製造

### (1) Fc 融合蛋白質発現用ベクターの構築

Fc 融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子をクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の Fc 領域としては、CH2 と CH3 領域を含む領域のほか、ヒンジ領域、CH1 の一部が含まれるものも包含される。また CH2 または CH3 の少なくとも1つのアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入され、実質的に Fc $\gamma$  受容体への結合活性を有するものであればいかなるものでもよい。

ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いること

もできる。それら遺伝子と Fc 領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、PCR 法 (レキチャー・クローニング第 2 版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34) を行うことがあげられる。

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

## (2) ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする DNA の取得

ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする DNA は以下のようにして取得することができる。

目的の Fc と融合させる蛋白質を発現している細胞や組織より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、目的の蛋白質の遺伝子配列部分をプローブとして用い、目的の蛋白質をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドを単離する。組換えファージ或いは

組換えプラスミド上の目的の蛋白質の全塩基配列を決定し、塩基配列より全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、細胞や組織を摘出することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

細胞や組織から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソツズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。また、細胞や組織から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング第 2 版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

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

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであれ

ばいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからの目的の蛋白質をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法により目的の蛋白質をコードする cDNA を調製することもできる。

目的の蛋白質をヒト抗体の Fc 領域と融合させる方法としては、PCR 法があげられる。例えば、目的の蛋白質の遺伝子配列の 5' 側と 3' 側に任意の合成オリゴ DNA (プライマー) を設定し、PCR 法を行い PCR 産物を取得する。同様に、融合させるヒト抗体の Fc 領域の遺伝子配列に対しても任意のプライマーを設定し、PCR 産物を得る。このとき、融合させる蛋白質の PCR 産物の 3' 側と Fc 領域の PCR 産物の 5' 側には同じ制限酵素部位もしくは同じ遺伝子配列が存在するようにプライマーを設定する。この連結部分周辺のアミノ酸改変が必要である場合には、その変異を導入したプライマーを用いることで変異を導入する。得られた 2 種類の PCR 断片を用いてさらに PCR を行うことで、両遺伝子を連結する。もしくは、同一の制限酵素処理をした後にライゲーションすることでも連結することができる。

上記方法により連結された遺伝子配列を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シー

クエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から Fc 融合蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、目的のアミノ酸配列と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む Fc 融合蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

### (3) Fc 融合蛋白質の安定的生産

前記の (1) 項に記載の Fc 融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

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

Fc 融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、Fc 融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

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

Fc 融合蛋白質発現ベクターの導入後、Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に Fc 融合蛋白質を生産蓄積させることができる。培養上清中の Fc 融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性は

ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 遺伝子増幅系等を利用して Fc 融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

Fc 融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムやプロテイン G カラムを用いて精製することができる（アンチボディズ, Chapter 8、モノクローナル・アンティボディズ）。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した Fc 融合蛋白質分子全体の分子量は、SDS-PAGE [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロットリング法（アンチボディズ, Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ）等で測定することができる。

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

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

#### 4. 抗体組成物の活性評価

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

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法および蛍光抗体法 [キャンサー・免疫ロジー・免疫セラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC

活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [キヤンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

疾患に関与する細胞上の抗原数は、Scatchard 解析法 [イムノロジカル・メソッズ (Immunological Methods), Vol. 2, ニューヨーク・アカデミック・プレス出版 (1981)]、あるいは定量的フローサイトメトリー法 [コミュニケーションズ・イン・クリニカル・サイトメトリー (Communications in Clinical Cytometry), 26, 22 (1996)] によって定量することができる。

異なる薬剤の治療効果の比較は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ブタ、サル等の実験動物を用いた疾患モデルを用いた in vivo 実験より行うことができる。また疾患に関与する細胞あるいはその株化細胞を標的とした in vitro の細胞障害活性の測定によっても行うことができる。

in vivo 実験は疾患に関与する細胞あるいはその株化細胞等の標的細胞を実験動物の体内に移植し、薬剤を腹腔内、静脈内、皮下等に投与し、実験動物の病態を観察することにより行うことができる。例えば、腫瘍の増殖や実験動物の生存日数、薬剤の血中成分濃度や臓器重量等を測定することにより、薬剤の治療効果を調べることができる。

in vitro の細胞障害活性は、ADCC 活性や CDC 活性等を測定することにより得ることができる。

## 5. 各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

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

### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

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

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

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

### (2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター)、高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果

をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

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

## 6. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の治療剤に有効成分として含有される抗体組成物は、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上であり、高い ADCC 活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記 5. に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

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

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

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の

leukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

本発明で用いられる抗体組成物を識別するには、N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) をあげることができる。

#### 7. レクチン耐性細胞で製造された抗体医薬が有効な患者をスクリーニングする方法

本発明の医薬が有効な患者をスクリーニングする方法としては、疾患に関与する標的細胞を患者の体内より採取し、本発明の医薬あるいは従来 of 抗体医薬と接触させ、該標的細胞と反応した本発明の医薬あるいは従来 of 抗体医薬の活性

を測定し、従来の抗体医薬が示した活性と本発明の医薬が示した活性とを比較することにより、本発明の医薬が有効である患者を選抜する方法のことである。具体的には (i) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬あるいは本発明の医薬と患者から取得したこれら医薬の標的細胞とを接触させ、(ii) 該標的細胞と反応した医薬の活性を測定し、(iii) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬が示した活性と本発明の医薬が示した活性との測定値を比較し、(iv) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を含有する医薬が示した活性が低い患者を選択することにより、本発明の医薬が有効な患者をスクリーニングする方法があげられる。標的細胞を患者の体内より採取する方法としては、外科切除や体液からの採取があげられる。

本発明の医薬あるいは従来の抗体医薬の活性を測定する方法としては、ADCC 活性、Fc $\gamma$  受容体 IIIa 結合活性、CDC 活性や増殖抑制活性を測定する方法等があげられる。

ADCC 活性を測定する方法としては、未標識あるいは放射性同位体、蛍光物質や色素等で標識した標的細胞と抗体、エフェクター細胞を同時に接触させ、障害された標的細胞から遊離する酵素の生理活性や標識物質の活性を測定すること等があげられる。

Fc $\gamma$  受容体 IIIa 結合活性を測定する方法としては、リコンビナント Fc $\gamma$  受容体 IIIa 蛋白質、あるいはウイルス、細菌や細胞表面に発現させた Fc $\gamma$  受容体 IIIa と標的細胞に反応した抗体との結合量を測定すること等があげられる。測定する方法としては免疫組織染色法、エンザイムイムノアッセイ法やラジオイムノアッセイ法などのイムノアッセイ法、フローサイトメーターを用いた蛍光抗体法、

イムノブロットィング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法などのいかなる免疫学的測定法も含む。

また、Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に酵素、蛍光物質、色素、タグペプチド、放射性同位元素などの標識を付加することにより、より検出を容易にすることができる。

CDC 活性を測定する方法としては、未標識あるいは放射性同位体、蛍光物質や色素等で標識した標的細胞と抗体、補体成分を含む血清等を同時に接触させ、障害された標的細胞から遊離する酵素の生理活性や標識物質の活性を測定すること等があげられる。

増殖抑制活性を測定する方法としては、細胞内酵素の生理活性の測定、ヨウ化プロピジウムによる染色、細胞膜透過性の変化を利用した検出、TUNEL 法、アネキシン V の検出、DNA の断片化の検出、ミトコンドリア膜電位変化の検出、細胞内 ATP および ADP レベルの検出等があげられる。

#### 8. レクチン耐性細胞で製造された抗体医薬を用いて患者を治療する方法

本発明の医薬を用いて患者を治療する方法としては、上記 7 に示した方法により本発明の医薬が有効である患者を選抜した後、以下に示す治療薬を選抜された患者に投与する方法等があげられる。

治療薬として該医薬を単独で投与することも可能であるが、通常は該医薬を薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

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

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

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

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

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

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

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

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

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

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

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

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

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト IgG1 分子の模式図を示す。

第2図は、フローサイトメーターにより解析した CCR4 の発現量の異なるトランスフェクタント細胞および親株の EL-4 細胞の CCR4 発現のヒストグラムの図である。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数をそれぞれ示す。白抜きは抗体非添加、灰色はビオチン化 KM2760-1 添加時のヒストグラムを示す。

第3図は、CCR4 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いた KM2760-1 と KM3060 の ADCC 活性の図である。縦軸は細胞障害活性(%）、横軸は標的細胞上の CCR4 分子数をそれぞれ示す。○は KM2760-1、●は KM3060、△は抗体非添加時の細胞障害活性をそれぞれ示す。

第4図は、各抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析の結果を示す。第4A図は KM2760-1 の、第4B図は KM3060 の結果をそれぞれ示す。

第5図は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析の結果を示す。

第6図は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を ELISA 法で測定した図である。縦軸は CCR4 ペプチド結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●は抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)、○は抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、▲は抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、△は抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) の結合活性をそれぞれ示す。

第7図は、CCR4 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いた、 $\alpha$ 1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性の図である。縦軸は細胞障害活性(%）、横軸は標的細胞上の CCR4 分子数をそれぞれ示す。パネル A、B、C はそれぞれ健常人ドナー A、B、C の静脈血より採取した単核球をエフェクター細胞として用いた ADCC 活性を示す。●は抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)、○は抗

CCR4 キメラ抗体 (27%)、▲は抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、△は抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) の結合活性をそれぞれ示す。

第 8 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は 5-03 株、■は CHO/CCR4-LCA 株、◆は CHO/CCR4-AAL 株、▲は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す

第 9 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は YB2/0 株 (KM2760#58-35-16)、△は 5-03 株、●は CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 10 図は、プラスミド pKANTEXCD20 の構築過程を示した図である。hCκ はヒト κ 鎖 C 領域遺伝子、hCγ1 はヒト IgG1C 領域遺伝子、Pmo はモロニーマウス白血病ウイルスプロモーターを表す。

第 11 図は、フローサイトメーターにより解析した CD20 の発現量の異なるトランスフェクタント細胞および親株の EL-4 細胞の CD20 発現のヒストグラムの図である。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数をそれぞれ示す。白抜きはマウス IgG2a、灰色は抗 CD20 抗体添加時のヒストグラムを示す。

第 12 図は、CD20 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いた各種抗 CD20 キメラ抗体の ADCC 活性の図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に細胞あたりの CD20 分子数をそれぞれ示す。□は Rituxan™、●は抗 CD20 キメラ抗体 (44%)、○は KM3065、△は抗体非添加時の細胞障害活性をそれぞれ示す。

第 13 図は、プラスミド pBS-2B8L の構築過程を示した図である。

第 14 図は、プラスミド pBS-2B8Hm の構築過程を示した図である。

第 15 図は、プラスミド pKANTEX2B8P の構築過程を示した図である。

第 16 図は、蛍光抗体法を用いて、α1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が異なる 3 種類の抗 CD20 キメラ抗体の CD20 発現細胞に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CD20 との結合活性、横軸

は抗体濃度をそれぞれ示す。□が KM3065、■が抗 CD20 キメラ抗体 (44%)、○が Rituxan™ の活性をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. 抗 CCR4 キメラ抗体組成物の ADCC 活性による抗原発現量依存的な標的細胞障害活性

1. CCR4 の発現量の異なるトランスフェクタント細胞の作製

(1) CCR4 の発現量の異なるクローンの選択

CCR4 遺伝子の動物細胞安定発現ベクター CAG-CCR4/pcDNA3 (W001/64754) をエレクトロポレーション法でマウス胸腺腫細胞株 EL-4 細胞 (ATCC TIB-39) に導入した。まず EL-4 細胞を PBS (-) (GIBCO BRL 社製) にて  $1 \times 10^7$  個/500  $\mu$ L に懸濁し、CAG-CCR4/pcDNA3 を 10  $\mu$ g 加えて氷中で 10 分間放置した後、専用キュベット (バイオラッド社製) に入れ、260V、500  $\mu$ FD で遺伝子導入を行った。さらに 10 分間氷中にて放置した後、10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) 200mL に懸濁し、96 ウェル細胞培養用プレートに 100  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。24 時間後に培養上清を 100  $\mu$ L/ウェル除去し、1mg/mL の G418 を含む 10%FCS-RPMI 培地を 100  $\mu$ L/ウェルずつ分注し、最終濃度 0.5mg/mL とした。2 週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

(2) CCR4 の発現量の異なる細胞株の選択

参考例 1 で調製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 を用い、FACS による染色性の有無で CCR4 の発現量の異なる細胞株を選択した。本項 (1) で選択した数十株の遺伝子導入細胞各  $1 \times 10^6$  個を 96 ウェル U 字プレートに分注した。公知の方法 (酵素抗体法: 学際企画刊 1985 年) でビオチン標識した KM2760-1 を FACS 用緩衝液 (1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN<sub>3</sub>、pH7.4) で 3  $\mu$ g/mL に、また非特異的な染色を防ぐために、正常マウス血清 (CEDERLANE 社製) を 5% にそれぞれ希釈した溶液を 100  $\mu$ L/ウェルとして加え、氷中で 60 分間反応させた。陰性対象としてピ

オチン化 KM2760-1 を添加しないウェルも設定した。緩衝液にて 200  $\mu$ L/ウェルで 2 回洗浄後、FACS 用緩衝液で 200 倍に希釈した Streptavidin-RED670 (GIBCO BRL 社製) を 100  $\mu$ L/ウェルで加えた。遮光し氷中で 60 分間反応後、200  $\mu$ L/ウェルで 3 回洗浄し、最終的に 500  $\mu$ L の PBS (-) に懸濁して、フローサイトメーター EPICS Elite (COULTER 社製) で蛍光強度を測定した。様々な蛍光強度の株を合計 8 種類選択し、発現量の低い順に KC1058、KC1057、KC1068、KC1067、KC1065、KC1063、KC1055、KC1062 と名づけた。各細胞株および親株の EL-4 細胞の蛍光強度のヒストグラムを第 2 図に示す。

### (3) CCR4 の発現量の異なる細胞株に発現する CCR4 分子数の定量

本項(1)で得られた各細胞株に発現している CCR4 分子の数を、フローサイトメーターを用いて定量した。各細胞株  $1 \times 10^6$  個を、W001/64754 記載の抗 CCR4 マウスモノクローナル抗体 KM2160 を 60  $\mu$ g/mL、および非特異的染色を防ぐためにヒト IgG (ウェルファイド社製) を 3.75mg/mL で加えた FACS 用緩衝液 100  $\mu$ L に懸濁し、96 ウェルU字プレートに分注し、氷中で 60 分間反応させた。陰性対象としては KM2160 の代わりに抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 マウスモノクローナル抗体 KM1732 (W098/22616 ; ハイブリドーマ FERM BP-5698 により生産されたモノクローナル抗体) を添加した。緩衝液にて 200  $\mu$ L/ウェルで 2 回洗浄後、FACS 用緩衝液で 4 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG (DAKO 社製) を 100  $\mu$ L/ウェルで加えた。遮光し氷中で 60 分間反応後、200  $\mu$ L/ウェルで 3 回洗浄し、最終的に 500  $\mu$ L の PBS (-) に懸濁して、フローサイトメーター EPICS Elite (COULTER 社製) で蛍光強度を測定した。また CCR4 分子数の定量用の標準試料として、既知数のマウス IgG がコートされた標準ビーズ (DAKO QIFIKIT、DAKO 社製) を用い、FITC 標識抗マウス IgG を上記と同様の条件で反応させ、洗浄後フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。標準ビーズの添付説明書に従い蛍光強度とビーズに吸着したマウス IgG 分子数の相関式を算出し、KM2160 を反応させた各細胞株の蛍光強度を代入することにより各細胞株の CCR4 数を算出した。またバックグラウンドとして KM1732 を反応させた場合の CCR4 数も算出し、KM2160 を反応させた場合の CCR4 数

より差し引いて最終的に各細胞株に発現している CCR4 数とした。結果を第 1 表に記す。

第 1 表

細胞名	CCR4 数
EL-4 細胞	$6.57 \times 10^2$
KC1058	$1.28 \times 10^3$
KC1057	$1.63 \times 10^3$
KC1068	$2.61 \times 10^3$
KC1067	$4.65 \times 10^3$
KC1065	$5.80 \times 10^3$
KC1063	$1.53 \times 10^4$
KC1055	$1.71 \times 10^4$
KC1062	$5.42 \times 10^4$

単位：個／細胞

## 2. CCR4 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いた ADCC 活性の測定

KM2760-1 と KM3060 の ADCC 活性と抗原数との関係を、実施例 1. (2) で得られた CCR4 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いて以下のようにして測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS (10) 培地に  $500 \mu\text{g/ml}$  の濃度で G418 硫酸塩 (ナカライテスク製) を添加した培地で培養した CCR4 の発現量の異なる細胞株の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を  $3.7\text{MBq}$  当量加えて  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS (10) 培地で懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS (10) 培地を 5ml 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

## (2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2.5 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

## (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記 1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、参考例 1 で得られた抗 CCR4 キメラ抗体、KM2760-1 および KM3060 を最終濃度  $3 \mu\text{g/ml}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式 (1) により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100 \quad (1)$$

結果を第 3 図に示す。KM2760-1 および KM3060 は、ともに抗原数依存的な ADCC 活性を示したが、KM2760-1 の ADCC 活性は KM3060 の ADCC 活性を大幅に上回った。KM2760-1 のプロットはデータ解析ソフトウェア KaleidaGraph™（SYNERGY SOFTWARE 社製）を用いた結果、下式 (2) で近似された。

$$y = (-60.83 / (1 + (x/9996)^{2.22})) + 63.23 \quad (2)$$

式 (2) において、 $x$  は CCR4 数、 $y$  は細胞障害活性を表す。

KM3060 は最も CCR4 発現数の高い KC1062 (CCR4 数 : 54200 個/細胞) に対して 7.4% の細胞障害活性を示した。この値を数  $y$  に代入し、KM2760-1 が同等の細胞障害活性を示すのに必要な CCR4 数を算出すると 3360 個/細胞である。すなわち、KM2760-1 は KM3060 の約 16 分の 1 の CCR4 数で同等の ADCC 活性を示すことが明らかとなった。また細胞あたりの CCR4 数が高い条件でも KM3060 の細胞障害活性は KM2760-1 の細胞障害活性に到達せず、低い活性値で飽和してしまうことも明らかになった。

### 3. 抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析

参考例 1 で調製した、YB2/0 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 と、CHO/DG44 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060 の糖鎖分析を、以下の方法に従って行った。

100  $\mu$ g の抗体をヒドラクラブ S-204 用試験管に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させた試験管をホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行った。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110°C、1 時間反応させた [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。試験管にホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250  $\mu$ l、無水酢酸を 25  $\mu$ l 入れてよく攪拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent を 250  $\mu$ l、無水酢酸を 25  $\mu$ l 加えてよく攪拌させ、室温で 1 時間反応させた。試料を -80°C のフリーザーで凍結させ、約 17 時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa 社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984]。2-アミノピリジン溶液は 2-ア

ミノピリジン 1g に対し HCl760  $\mu$ l を加え (1 $\times$ PA 溶液)、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に希釈したものをを用いた (10 倍希釈 PA 溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1 $\times$ PA 溶液 20  $\mu$ l、逆浸透精製水 430  $\mu$ l を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67  $\mu$ l 入れて 100 $^{\circ}$ C、15 分間反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2  $\mu$ l 入れて 90 $^{\circ}$ C、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mM 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5ml/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製、 $\phi$ 6.0nm $\times$ 150nm) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55 $^{\circ}$ C、流速は 1ml/ml、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分間溶出した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS 分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった。

糖鎖含量は、逆相 HPLC 分析における各 PA 化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端が N-アセチルグルコサミンでない PA 化糖鎖は、不純物由来であるか、PA 化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。ピーク面積から計算すると、KM2760-1 の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖含量は 87%、KM3060 の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖含量は 8% であった。

第 4A 図は KM2760-1、第 4B 図は KM3060 から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した。緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液





還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、KM2760-1 は 87%、KM3060 は 8%であった。

以上、本実施例の結果は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の高い抗体組成物は、本実験に用いたすべての抗原発現量の標的細胞に対しても還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の低い抗体組成物よりも高い細胞障害活性を發揮することを示している。特に、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の低い抗体組成物が ADCC 活性を發揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対しても、ADCC 活性を發揮することができることを示している。

すなわち、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞から生産された抗体組成物は、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン不耐性細胞から生産された抗体組成物が ADCC 活性を發揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対して、ADCC 活性を發揮することができることを示している。

実施例 2. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性および標的細胞に対する効果

1. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 3 項に記載にあるように、YB2/0 細胞産生抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は 87%であり、CHO/DG44 細胞産生抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は 8%であった。以下、これらの試料を、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) と抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) を用い、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%):抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)=22:57、32:47、42:37 の割合

でそれぞれ混合した。これらの試料を実施例 1 の 7 項の方法にしたがって糖鎖分析を行なったところ、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、それぞれ 27%、39%、46%であった。以下、これらの試料を抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) と表記する。

第 5 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、2 回の結果を平均した値を用いた。

## 2. CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の評価 (ELISA 法)

本実施例 1 項で調製した抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%) および抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) ならびに抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性は実施例 1 の 2 項に記載の方法に従って測定した。

その結果、第 6 図に示したように、4 種類の抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

## 3. ヒト CCR4 細胞株に対する ADCC 活性の評価

本実施例 1 項で調製した抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%) および抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) ならびに抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の ADCC 活性を CCR4 の発現量の異なる細胞株を標的細胞として測定し、抗原数と還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の関係について調べた。標的細胞としては実施例 1 の 1 項で調製した 8 種類の CCR4 の発現量の異なる細胞株のうち、KC1067 (CCR4 分子発現量は 4650 個/細胞)、KC1063 (CCR4 分子発現量は 15300 個/細胞)、KC1062 (CCR4 分子発現量は 54200 個/細胞) の 3 種類を用いた。還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 4 種類の抗 CCR4 キメラ抗

体の ADCC 活性は実施例 1 の 2 項に記載の方法に従って測定した。エフェクター細胞は 3 名の健常人ドナー A、B、C の末梢血より採取し、ADCC 活性測定時の抗体濃度は最終濃度  $1 \mu\text{g/mL}$  とした。

第 7 図には、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を 3 名の健常人ドナー (A、B、C) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 7 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は抗原数、および還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合に相関して上昇する傾向を示した。

第 7 図に示した各ドナーの抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) のプロットを、KC1067 (CCR4 分子発現量 4650 個/細胞) と KC1063 (CCR4 は 15300 個/細胞) に対する ADCC 活性の 2 点を通る一次式で近似した。近似式 (3) は下式で記述される。

$$Y = A \times \ln(X) - B \quad (3)$$

式 (3) において、X は抗原数、Y は X に対応する ADCC 活性、A、B は係数である。表計算ソフト Excel (Microsoft 社製) を用いてそれぞれのプロットにおける A、B の値を算出した。それぞれのプロットにおける A、B の値と、その時の近似式の Y に抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の KC1062 (CCR4 は 54200 個/細胞) に対する ADCC 活性の値を代入して得られる X の値、および  $X \div 54200$  の値を第 3 表に示す。このとき得られた X の値は、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の抗原数 54200 個/細胞の標的細胞に対する ADCC 活性と等しい ADCC 活性を抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) を用いて得るために必要な抗原数を表す。また  $X \div 54200$  の値は、抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) がそれぞれ抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) に対し同じ ADCC 活性を示すことができる抗原数の比率を表す。

第3表

ドナーA		A	B	X	X÷54200
$\alpha$ 1,6-フコースを含まない糖鎖の割合					
	27%	34.3	283	5610	1/9.66
	39%	36.0	294	5190	1/10.4
	46%	34.2	272	4290	1/12.6
ドナーB		A	B	X	X÷54200
$\alpha$ 1,6-フコースを含まない糖鎖の割合					
	27%	40.7	335	5280	1/10.3
	39%	43.9	357	4650	1/11.6
	46%	40.1	321	4190	1/12.9
ドナーC		A	B	X	X÷54200
$\alpha$ 1,6-フコースを含まない糖鎖の割合					
	27%	30.2	225	6300	1/8.61
	39%	34.0	251	4980	1/10.9
	46%	27.3	193	4760	1/11.4

第3表に示したように、いずれのドナーにおいてもXの値は還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合が増加するにつれて減少し、X÷54200の値も減少したが、抗CCR4キメラ抗体(27%)、抗CCR4キメラ抗体(39%)、抗CCR4キメラ抗体(46%)のいずれも10分の1程度の抗原数で抗CCR4キメラ抗体(8%)と同等のADCC活性を示すことが明らかとなった。この結果は抗体組成物のFc領域に結合する還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合が20%以上の抗体組成物は、Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合が20%未満の抗体組成物よりも10分の1の抗原数で同等のADCC活性が得られることを示している。

このことは、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%未満の抗体組成物が ADCC 活性を発揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対しても、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の 20%以上の抗体組成物 ADCC 活性を発揮することができることを示している。

またこの結果は、患者の標的細胞を用いて本発明の抗体医薬が特に有効な、抗原発現量の低い標的細胞を有する患者を選抜することができることを示している。

### 実施例 3. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞で生産された抗 CCR4 抗体の ADCC 活性

#### 1. レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

CHO/DG44 細胞を、IMDM-FBS(10)-HT(1)培地 [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度含む IMDM 培地] にて接着培養用フラスコ 75cm<sup>2</sup> (グライナー社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5mL の PBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、PBS で希釈した 0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を 1.5mL 添加して 37°C にて 5 分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、 $1 \times 10^5$  細胞/mL の密度になるように IMDM-FBS(10)-HT(1)培地を添加して懸濁後、未添加または  $0.1 \mu\text{g/mL}$  のアルキル化剤である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNG と表記、Sigma 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ (TABAI 製) 内で 37°C にて 3 日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10)-HT(1)培地に懸濁後、接着培養用 96 ウェルプレート (岩城硝子社製) に  $1 \times 10^3$  細胞/ウェルの密度で播種した。各ウェルには培地中終濃度で 1mg/mL のレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCA と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/mL のヒロチャワンタケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AAL と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/mL のインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHA と表記、Vector 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37°C にて 2 週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性 CHO/DG44

株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性 CHO/DG44 株については、LCA 耐性株を CHO-LCA 株、AAL 耐性株を CHO-AAL 株、L-PHA 耐性株を CHO-PHA 株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA 株は AAL に対しても耐性であり、CHO-AAL 株は LCA に対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA 株および CHO-AAL 株は、LCA や AAL が認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン残基の 1 位とフコースの 6 位が  $\alpha$  結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度 1mg/mL のエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin ; 以下、PSA と表記、Vector 社製) が添加された培地でも CHO-LCA 株および CHO-AAL 株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤 MNNG 無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、これら株を以下の実施例に用いた。

## 2. 抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞の作製

本実施例 1 項で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、参考例 1 の 1 項に記載した方法で、抗 CCR4 キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 CCR4 キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は参考例 1 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて行い、CHO-LCA 株、CHO-AAL 株、CHO-PHA 株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-LCA 株、CHO-AAL 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-AAL 株、CHO-PHA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-PHA 株と名付けた。なお CHO/CCR4-LCA 株は Nega-13 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6) に FERM BP-7756 として寄託されている。

### 3. レクチン耐性 CHO 細胞による高 ADCC 活性抗体の生産

本実施例 2 項で得られた 3 種類の形質転換株を用い、参考例 1 の 3 項に記載した方法で精製抗体を取得した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性は参考例 1 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、参考例 1 で作製した通常の CHO/DG44 細胞を宿主とした生産株 5-03 株が生産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例 1 の 2 項に記載した方法に従って各抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した。その結果を第 8 図に示した。5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株および CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、約 100 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体では有意な ADCC 活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA 株と YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗体の ADCC 活性を実施例 1 の 2 項に記載した方法に従って比較したところ、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体は参考例 1 で作製した YB2/0 細胞由来生産株が生産した抗体 KM2760-1 と同様の高い ADCC 活性を示すことが明らかとなった（第 9 図）。

### 4. レクチン耐性 CHO 細胞が生産する抗体の糖鎖分析

本実施例 3 項で精製した抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 1 の 3 項に記載の方法に従って行った。

第 4 表には、各種レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析の結果得られた還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合 (%) を示す。

抗体生産細胞	$\alpha$ 1,6-フコースを持たない糖鎖の割合 (%)
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体では、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が、9%から 48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、 $\alpha$  1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 27%まで上昇していた。一方、CHO/CCR4-PHA 株では 5-03 株と比較して、糖鎖パターンおよび  $\alpha$  1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

実施例 2 の結果によると、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の 20%以上の抗体組成物は、実験に用いたすべての抗原発現量の異なる標的細胞に対しても還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の低い抗体組成物よりも高い細胞障害活性を発揮することを示している。特に、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%未満の抗体組成物が ADCC 活性を発揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対しても ADCC 活性を発揮することができることを示している。したがって、本実施例にあるレクチン耐性 CHO 細胞である CHO/CCR4-LCA 株または CHO/CCR4-AAL 株から生産された抗体組成物は、親株細胞である CHO/DG44 細胞 5-03 株が生産した抗体組成物では ADCC 活性を発揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対しても ADCC 活性を発揮することができる。

実施例 4. 抗 CD20 キメラ抗体組成物の ADCC 活性による抗原発現量依存的な標的細胞障害活性

#### 1. CD20 の発現量の異なるトランスフェクタント細胞の作製

##### (1) ヒト CD20 遺伝子のクローニング

ヒト CD20 (以下 CD20 と表記する) のアミノ酸配列をコードする領域を含む遺伝子のクローニングを、以下の手順にて行った。

まず、CD20 の塩基配列情報[ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 167, 1975 (1988)] を基に、翻訳開始コドンを含む特異的

なフォワードプライマー（配列番号 2 に示す）および翻訳終止コドンを含む特異的なリバースプライマー（配列番号 3 に示す）を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ KOD DNA polymerase（東洋紡績社製）を用いて、Human Leukocyte 5' -STRETCH PLUS cDNA Library（Clontech 社製）4  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液[KOD DNA polymerase 1  $\mu$ L、1 倍濃度の KOD buffer（東洋紡績社製）、0.2mmol/L dNTPs、1  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 2 および 3、合成はジェンセット社に委託）] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°Cで 40 秒間、55°Cで 40 秒間、74°Cで 75 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、45 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 950bp を約 70  $\mu$ L の滅菌水で回収した。回収した特異的増幅断片を鋳型に用いて、さらに PCR で DNA 断片の増幅を行った。DNA ポリメラーゼ Advantage cDNA PCR Kit（Clontech 社製）を用いて、上記の回収した特異的増幅断片 0.7  $\mu$ L を鋳型として含む 50  $\mu$ L の反応液 [Advantage polymerase mix 1  $\mu$ L、1 倍濃度の Advantage cDNA PCR Kit 添付バッファー、0.04mmol/L dNTPs、0.6  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 2 および 3）] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°Cで 30 秒間、72°Cで 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。PCR 後、反応液を QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社製）を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ L に溶解した。制限酵素 PstI（宝酒造社製）および BamHI（宝酒造社製）で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 950bp を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) 2.5  $\mu$ g（Stratagene 社製）を制限酵素 PstI（宝酒造社製）および BamHI（宝酒造社製）で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.9kbp の断片を回収した。

上記で得た CD20 の cDNA 由来増幅断片とプラスミド pBluescriptII SK(-) 由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver. 2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株（東洋紡績社製）を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、hFc $\gamma$ RIIIa の cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを pBSCD20 と称す。

取得した CD20 の cDNA 中のアミノ酸コード領域の塩基配列を配列番号 4、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 5 に示す。

## (2) CD20 発現ベクターの構築

CD20 の発現ベクターは、以下のようにして構築した。

本項(1)で得られたプラスミド pBSCD20 3.0  $\mu$ g を制限酵素 BsiWI (東洋紡績社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 920bp の断片を回収した。

一方、W097/10354 に記載のヒト型抗体の動物細胞安定発現用プラスミド pKANTEX93 2.0  $\mu$ g を制限酵素 BsiWI (東洋紡績社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 9.2kbp の断片を回収した。

上記で得た shFc $\gamma$ RIIIa cDNA を含む DNA 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver. 2.0 (宝酒造社製) を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全てのプラスミドが、目的の CD20 の cDNA を含むことを確認した。得られた発現ベクターを以下、pKANTEXCD20 と称す。なお、本項に記載した pKANTEXCD20 の構築法は第 10 図に示した。

### (3) CD20 の発現量の異なるクローンの選択

本項(2)で作製した、CD20 遺伝子の動物細胞安定発現ベクターpKANTEXCD20 をエレクトロポレーション法でマウス胸腺腫細胞株 EL-4 細胞 (ATCC TIB-39) に導入した。まず EL-4 細胞を PBS (-) (GIBCO BRL 社製) にて  $1 \times 10^7$  個/ $500 \mu\text{L}$  に懸濁し、pKANTEXCD20 を  $10 \mu\text{g}$  加えて氷中で 10 分間放置した後、専用キュベット(バイオラッド社製)に入れ、260V、 $500 \mu\text{FD}$  で遺伝子導入を行った。さらに 10 分間氷中にて放置した後、RPMI1640-FBS(10)培地 200mL に懸濁し、96 ウェル細胞培養用プレートに  $100 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。24 時間後に培養上清を  $100 \mu\text{L}$ /ウェル除去し、 $1\text{mg/mL}$  の G418 を含む 10%FCS-RPMI 培地を  $100 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注し、最終濃度  $0.5\text{mg/mL}$  とした。2 週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

一部のクローンに関しては、CD20 発現量の増加を目的として、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を  $0.5\text{mg/mL}$ 、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を  $50\text{nmol/L}$  含む RPMI1640-FBS(10)培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に  $2\text{mL}$  ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$  で 1~2 週間培養して、 $50\text{nmol/L}$  MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。さらに MTX 濃度を  $200\text{nmol/L}$ 、 $1000\text{nmol/L}$  と順次上昇させ、最終的に G418 を  $0.5\text{mg/mL}$ 、MTX を  $200\text{nmol/L}$  あるいは  $1000\text{nmol/L}$  の濃度で含む RPMI1640-SFM-FBS(10)培地で増殖可能な形質転換株を複数得た。得られた形質転換株に対して、2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。

### (4) CD20 の発現量の異なる細胞株の選択

本項(3)で得られた各細胞株に発現している CD20 分子の数を、フローサイトメーターを用いて定量した。各細胞株  $1 \times 10^6$  個を、マウス抗ヒト CD20 モノクローナル抗体 (Coulter 社製) を  $40 \mu\text{g/mL}$ 、および非特異的染色を防ぐために正常マウス血清 (CEDERLANE 社製) を 5%で加えた FACS 用緩衝液  $100 \mu\text{L}$  に懸濁し、96 ウェルU字プレートに分注し、氷中で 60 分間反応させた。陰性対象としてはマウス抗ヒト CD20 モノクローナル抗体の代わりにマウス IgG2a (DAKO 社製) を添加した。

緩衝液にて 200  $\mu$ L/ウェルで 2 回洗浄後、FACS 用緩衝液で 20 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG (DAKO 社製) を 100  $\mu$ L/ウェルで加えた。遮光し水中で 60 分間反応後、200  $\mu$ L/ウェルで 3 回洗浄し、最終的に 500  $\mu$ L の PBS (-) に懸濁して、フローサイトメーター EPICS XL-MCL (COULTER 社製) で蛍光強度を測定した。様々な蛍光強度の株を合計 7 種類選択し、発現量の低い順に KC1156、KC1157、KC1158、KC1160、KC1162、KC1163、KC1164 と名づけた。KC1160、KC1163 は MTX200nM 耐性株由来、KC1164 は MTX1000nM 耐性株由来のクローンである。各細胞株および親株の EL-4 細胞の蛍光強度のヒストグラムを第 11 図に示す。

#### (5) CD20 の発現量の異なる細胞株に発現する CD20 分子数の定量

本項(4)で選抜した各細胞株に発現している CD20 分子の数を、フローサイトメーターを用いて定量した。CD20 分子数の定量用の標準試料として、既知数のマウス IgG がコートされた標準ビーズ (DAKO QIFIKIT、DAKO 社製) を用い、FITC 標識抗マウス IgG を本項(4)記載の条件で反応させ、洗浄後フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。標準ビーズの添付説明書に従い蛍光強度とビーズに吸着したマウス IgG 分子数の相関式を算出し、本項(4)で得られた各細胞株の蛍光強度を代入することにより各細胞株の CD20 数を算出した。またバックグラウンドとしてマウス IgG2a を反応させた場合の CD20 数も算出し、マウス抗ヒト CD20 モノクローナル抗体を反応させた場合の CD20 数より差し引いて最終的に各細胞株に発現している CD20 数とした。測定の結果得られた、各細胞株に発現する CD20 分子の数を第 5 表に記す。

第 5 表

細胞名	CD20 数
EL-4 細胞	$6.11 \times 10^2$
KC1156	$1.18 \times 10^4$
KC1157	$1.45 \times 10^4$
KC1158	$2.50 \times 10^4$
KC1160	$4.12 \times 10^4$
KC1162	$6.69 \times 10^4$
KC1163	$2.05 \times 10^5$
KC1164	$5.75 \times 10^5$

## 2. CD20 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いた ADCC 活性の測定

参考例 2 で得られた各抗 CD20 キメラ抗体 KM3065、抗 CD20 キメラ抗体 (44%) および Rituxan™ の 3 種類 (Fc 領域に結合する還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合はそれぞれ 96%、44%、6%) の ADCC 活性と抗原数との関係を、本実施例 1 項で得られた CD20 の発現量の異なる細胞株を標的細胞に用いて以下のようにして測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS (10) 培地に  $500 \mu\text{g/ml}$  の濃度で G418 硫酸塩 (ナカライテスク製) を添加した培地で培養した CD20 の発現量の異なる細胞株の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3.7MBq 当量加えて  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS (10) 培地で懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS (10) 培地を 5ml 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS (10) 培地で 3 回

遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに本項(1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで本項(2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、参考例 2 で得られた 3 種の抗 CD20 キメラ抗体、Rituxan<sup>TM</sup>、抗 CD20 キメラ抗体(44%)および KM3065 を最終濃度 5ng/ml となるように加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は上記式 (1) により求めた。

得られた ADCC 活性と、本実施例 1 項で得られた各標的細胞に発現する CD20 分子数との関係を第 12 図に示す。3 種の抗 CD20 キメラ抗体は、ともに抗原数依存的な ADCC 活性を示したが、KM3065、抗 CD20 キメラ抗体(44%)の ADCC 活性はほぼ同等であり、いずれも Rituxan<sup>TM</sup> の ADCC 活性を大幅に上回った。KM3065 のプロットはデータ解析ソフトウェア KaleidaGraph<sup>TM</sup> (SYNERGY SOFTWARE 社製) を用いた結果、下式 (4) で近似された。

$$y = (-67.81 / (1 + (x/28942)^{1.58})) + 68.19 \quad (4)$$

式 (4) において、 $x$  は CD20 数、 $y$  は細胞障害活性を表す。

また同様に、抗 CD20 キメラ抗体(44%)のプロットは下式 (5) で近似された。

$$y = (-67.98 / (1 + (x/33601)^{1.55})) + 67.59 \quad (5)$$

Rituxan™ は KC1163 (CD20 数 : 205000 個/細胞) に対して 41.8% の細胞障害活性を示した。この値を式 (4)、(5) に代入し、KM3065 あるいは抗 CD20 キメラ抗体 (44%) が KC1163 に対する Rituxan™ の細胞障害活性と同等の細胞障害活性を示すのに必要な CD20 数を算出すると、それぞれ 38500 個/細胞、46100 個/細胞である。すなわち、KM3065 あるいは抗 CD20 キメラ抗体 (44%) は Rituxan™ の約 5 分の 1 の CD20 数で同等の ADCC 活性を示すことが明らかとなった。また CD20 数が高い条件でも Rituxan™ の細胞障害活性は KM3065 あるいは抗 CD20 キメラ抗体 (44%) の細胞障害活性に到達せず、低い活性値で飽和してしまうことも明らかになった。

この結果は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の高い抗体組成物は、実験で用いたすべての抗原発現量の異なる標的細胞に対しても還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の低い抗体組成物よりも高い細胞障害活性を発揮することを示しているが、特に、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の低い抗体組成物が ADCC 活性を発揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対しても ADCC 活性を発揮することができることを示している。

すなわち、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン耐性細胞から生産された抗体組成物は、 $\alpha$ 1,6-フコース/レクチン不耐性細胞から生産された抗体組成物が ADCC 活性を発揮することのできない抗原発現量の低い標的細胞に対して、ADCC 活性を発揮することができることを示している。

## 参考例 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の作製

### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

W001/64754 記載の抗 CCR4 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

## (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

10  $\mu$ g の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 (W001/64754) を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS (5) [FBS (PAA ラボラトリーズ社製) を 5% 含む Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を本実施例 2 項記載の ELISA 法により測定した。

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

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行い、得られたクローン化株を KM2760-1#58-35-16 と名付けた。尚、W000/61739 の実施例 8 に示された  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。選択された株はレクチン耐性株であった。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

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

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に  $1\sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nM に上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株を 5-03 株と名付けた。

## 2. CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 1) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、

100ml の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を攪拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした ( $A_{280}$  測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を攪拌下で添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4°C、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液を調製した。

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製した BSA-化合物 1 溶液を 0.05  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°C で一晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05% Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を 50  $\mu$ L/ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。本参考例 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

### 3. 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

#### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

本参考例 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760-1#58-35-16 を 200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に  $2 \times 10^5$  細胞/ml となる様に懸

濁し、スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて 37°C の恒温室内で Fed-Batch 攪拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A（ミリポア社製）カラムおよびゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-1 と名付けた。

#### (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

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

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

#### 4. 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

本参考例 1 項で得られた 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4 $\mu$ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, 1970] に従って SDS-PAGE により、分子量および精製度を解析した。精製した各抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖および L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖 : 約 49Kd、L 鎖 : 約 23Kd、分子全体 : 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ,

Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ] と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

## 参考例 2. 抗 CD20 ヒト型キメラ抗体の作製

### 1. 抗 CD20 ヒト型キメラ抗体発現ベクターの作製

#### (1) 抗 CD20 マウスモノクローナル抗体の VL をコードする cDNA の構築

W094/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の VL のアミノ酸配列をコードする cDNA (配列番号 6 に記載) を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、W094/11026 記載の VL の塩基配列の 5' 末端と 3' 末端に PCR 時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 7、8、9、10、11、および 12 の 6 本の合成 DNA を作製 (GENSET 社製へ委託) した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  となる様に、 $50 \mu\text{L}$  の反応液 [KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、 $0.2\text{mM}$  dNTPs、 $1\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer M4 (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer RV (宝酒造社製)] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$  にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、 $94^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  にて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行ない、更に  $72^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応させた。該反応液  $25 \mu\text{L}$  をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約  $0.44\text{kb}$  の VL の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 SmaI (宝酒造社製) して得られた DNA  $0.1 \mu\text{g}$  と、上記で得られた PCR 産物約  $0.1 \mu\text{g}$

を滅菌水に加えて 7.5  $\mu$ L とし、TAKARA ligation kit ver.2 の solution I (宝酒造社製) 7.5  $\mu$ L、制限酵素 SmaI (宝酒造社製) 0.3  $\mu$ L を加えて 22°C で 2 時間反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 13 図に示したプラスミド pBS-2B8L を得た。

## (2) 抗 CD20 マウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域をコードする cDNA の構築

W094/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の H 鎖 V 領域 (以下 VH と表記する) のアミノ酸配列をコードする cDNA (配列番号 13 に記載) を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。2B8 は市販の抗 CD20 キメラ抗体 Rituxan<sup>TM</sup> の元となる、Rituxan<sup>TM</sup> と同一の V 領域を有するモノクローナル抗体である。

まず、W094/11026 記載の VH の塩基配列の 5' 末端と 3' 末端に PCR 時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 14、15、16、17、18、および 19 の 6 本の合成 DNA を作製 (GENSET 社製へ委託) した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1  $\mu$ M となる様に、50  $\mu$ L の反応液 [KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M M13 primer M4 (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M M13 primer RV (宝酒造社製)] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、94°C にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒

間、74°Cにて1分間のサイクルを25サイクル行い、更に72°Cにて10分間反応させた。該反応液 25  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.49 kb の VH の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 SmaI (宝酒造社製) して得られた DNA 0.1  $\mu$ g と、上記で得られた PCR 産物約 0.1  $\mu$ g を滅菌水に加えて 7.5  $\mu$ L とし、TAKARA ligation kit ver.2 の solution I (宝酒造社製) 7.5  $\mu$ L、制限酵素 SmaI (宝酒造社製) 0.3  $\mu$ L を加えて 22°Cで一晩反応させた。

この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 14 図に示したプラスミド pBS-2B8H を得た。

次に、14 番目のアミノ酸残基を Ala から Pro へ置換するために、配列番号 20 で示した合成 DNA を設計し、LA PCR in vitro Mutagenesis Primer Set for pBluescriptII (宝酒造社製) を用いた PCR 法により、以下の様に塩基の置換を行った。上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50  $\mu$ L の反応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)、50nM 上記の変異導入用プライマー (配列番号 20、GENSET 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、94°Cにて30秒間、55°Cにて2分間、72°Cにて1分30秒間のサイクルを25サイクル行なった。該反応液 30  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.44kb の PCR 産物を回収し、30  $\mu$ L の水溶液とした。また、同様に、上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50  $\mu$ L の反応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、

2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T7 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)、50nM MUT B1 primer(宝酒造社製)]の PCR を行った。該反応液 30  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.63kb の PCR 産物を回収し、30  $\mu$ L の水溶液とした。続いて、上記で得られた 0.44kb の PCR 産物と 0.63kb の PCR 産物を 0.5  $\mu$ L ずつ 47.5  $\mu$ L の反応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、90°C にて 10 分間加熱した後、60 分間かけて 37°C まで冷却した後、37°C で 15 分間保持することによって DNA をアニーリングさせた。2.5 単位の TaKaRa LA Taq (宝酒造社製) を添加して 72°C にて 3 分間反応させた後、10pmol ずつの T3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製) と T7 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製) を添加して反応液を 50  $\mu$ L とし、94°C にて 30 秒間、55°C にて 2 分間、72°C にて 1 分 30 秒間のサイクルを 10 サイクル行った。該反応液 25  $\mu$ L を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN 社製) にて精製した後、半量を 10 単位の制限酵素 KpnI (宝酒造社製) と 10 単位の制限酵素 SacI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.59kb の KpnI-SacI 断片を回収した。

次に、pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) 1  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 KpnI (宝酒造社製) と 10 単位の SacI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.9kb の KpnI-SacI 断片を回収した。

上記で得られた PCR 産物由来の KpnI-SacI 断片とプラスミド pBluescriptII SK(-) 由来の KpnI-SacI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用

いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。

こうして目的の塩基配列を有する第 14 図に示したプラスミド pBS-2B8Hm を得た。

### (3) 抗 CD20 ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035, 2000) と本参考例の 1 項 (1) および (2) で得られたプラスミド pBS-2B8L および pBS-2B8Hm を用いて抗 CD20 ヒト型キメラ抗体(以下、抗 CD20 キメラ抗体と表記する)の発現ベクター pKANTEX2B8P を以下の様にして構築した。

本参考例の 1 項 (1) で得られたプラスミド pBS-2B8L の  $2\mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $55^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.41kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の  $2\mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $55^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8L 由来 BsiWI-EcoRI 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の BsiWI-EcoRI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、第 15 図に示したプラスミド pKANTEX2B8-L を得た。

次に、本参考例 1 項 (2) で得られたプラスミド pBS-2B8Hm の  $2\mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応

液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.45kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX2B8-L の 3 $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.16kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8Hm 由来の ApaI-NotI 断片とプラスミド pKANTEX2B8-L 由来の ApaI-NotI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製した。

得られたプラスミドを用い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を同社の DNA シークエンサー 377 を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされている第 15 図に示したプラスミド pKANTEX2B8P が得られたことを確認した。

## 2. 抗 CD20 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

### (1) ラットミエローマ YB/0 細胞を用いた生産細胞の作製

本参考例 1 項 (3) で得られた抗 CD20 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2B8P を用いて抗 CD20 キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

プラスミド pKANTEX2B8P の 10 $\mu$ g を 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の H-SFM (GIBCO-BRL 社製) 培地 (牛胎児血清 (FCS) を 5% 添加) に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に 200 $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1mg/ml になる様に添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コン

フルエントになったウェルより培養上清を回収し、培養上清中のヒト IgG 抗体の産生量を本参考例 2 項 (2) に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中にヒト IgG 抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 1mg/mL、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素（以下、DHFR と表記する）の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTX と表記する：SIGMA 社製）を 50nM 含む H-SFM 培地に  $1\sim 2\times 10^5$  細胞/ml になる様に懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 1mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中のヒト IgG 抗体の産生量を本参考例 2 項 (2) に示す ELISA 法により測定した。培養上清中にヒト IgG 抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 1mg/mL、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM 培地で増殖可能かつ、抗 CD20 キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗 CD20 キメラ抗体を発現するクローン KM3065 を取得した。尚、W000/61739 の実施例 8 に示す  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し、用いた。選択された株はレクチン耐性株であった。

このようにして得られた抗 CD20 キメラ抗体を生産する形質転換クローン KM3065 は平成 13 年 12 月 21 日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に FERM BP-7834 として寄託されている。

## (2) 培養上清中のヒト IgG 抗体濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体 (American Qualex 社製) を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) で希釈して 1  $\mu$ g/mL とし、96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) に、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°C で一晩放置して吸着

させた。PBSで洗浄後、1%牛血清アルブミン（以下、BSA と表記する；AMPC社製）を含むPBS（以下、1%BSA-PBS と表記する）を100 $\mu$ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清、精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ L/ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS（以下、Tween-PBS と表記する）で洗浄後、1%BSA-PBS で3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、それぞれ50 $\mu$ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム]の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 $\mu$ L/mlで添加した溶液を50 $\mu$ L/ウェルに加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415 と表記する）を測定した。

### 3. 抗CD20キメラ抗体の培養上清からの精製

本参考例の2項(1)で得られた抗CD20キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローンKM3065をMTXを200nM、Daigo's GF21（和光純薬製）を5%の濃度で含むH-SFM（GIBCO-BRL社製）に $1 \times 10^5$ 細胞/mlとなる様に懸濁し、182cm<sup>2</sup>フラスコ（Greiner社製）に50ml分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CD20キメラ抗体KM3065を精製した。得られた抗CD20キメラ抗体KM3065の約3 $\mu$ gを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065は、非還元条件下は約150キロダルトン（以下、Kd と表記する）であり、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの蛋白質の大きさは、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S結合と表記する）が切断され、約

50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告（アンティボディズ、モノクローナル・アンティボディズ）と一致し、市販の抗 CD20 キメラ抗体 Rituxan™ Rituxan™ の泳動パターンともほぼ一致することから、抗 CD20 キメラ抗体 KM3065 が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。

#### 4. 抗 CD20 キメラ抗体の糖鎖解析

本参考例 3 項で精製した抗 CD20 キメラ抗体の糖鎖解析を、実施例 1 の 3 項の方法に従って行った。その結果、CHO/DG44 細胞で生産された市販の抗 CD20 キメラ抗体 Rituxan™（ジェネンテック社より購入）の  $\alpha$ 1,6-フコースが結合しない糖鎖含量は 6%、 $\alpha$ 1,6-フコース結合糖鎖含量は 94%であった。KM3065 の  $\alpha$ 1,6-フコースが結合しない糖鎖含量は 96%、 $\alpha$ 1,6-フコース結合糖鎖含量は 4%であった。以上の結果から、KM3065 は  $\alpha$ 1,6-フコースが結合しない糖鎖含量の割合が Rituxan™と比較して多いことがわかった。

#### 5. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合が 44%である抗 CD20 キメラ抗体の調製

KM3065 と Rituxan™を用い、KM3065: Rituxan™=1:1 の割合で混合した試料を実施例 1 の 3 項の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。その結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は 44%であった。この試料を抗 CD20 キメラ抗体（44%）と名づけた。

#### 6. 抗 CD20 キメラ抗体の CD20 発現細胞に対する結合活性（蛍光抗体法）

本参考例 3 項で得られた 3 種の精製 CD20 キメラ抗体 KM3065、抗 CD20 キメラ抗体（44%）および Rituxan™ の抗原結合活性をフローサイトメトリーを用いた蛍光抗体法によって評価した。CD20 陽性細胞であるヒトリンパ腫細胞株 Raji 細胞(JCRB9012)を  $2 \times 10^5$  個ずつ、96 ウェル U 字プレート(Falcon 社製)に分注した。抗 CD20 キメラ抗体を FACS 用緩衝液（1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN<sub>3</sub>）に

て希釈した抗体溶液(濃度 0.039~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を 50  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ として加え、氷中で 30 分間反応させた。FACS 用緩衝液にて 200  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ で 2 回洗浄後、PE 標識抗ヒト IgG 抗体(コールター社製)を FACS 用緩衝液を用いて 100 倍希釈したものを 50  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ 加えた。遮光し氷中で 30 分間反応させた後、200  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ で 3 回洗浄し、最終的に 500  $\mu\text{L}$ に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。測定結果を第 16 図に示す。3 種類の抗 CD20 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明によって、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者または疾患に適応する医薬、および該医薬を用いた該患者のスクリーニング方法を提供することができる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 2-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 3-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 4-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 7-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 8-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 15-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者に適応することを特徴とする医薬。

2. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない患者が、該患者の標的細胞における、該抗体組成物が認識する抗原が、該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量しか発現していない患者である、請求の範囲 1 に記載の医薬。

3. 該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量が、該抗体組成物が抗体依存性細胞障害活性を発揮するには十分ではない量である、請求の範囲 2 に記載の医薬。

4. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない疾患に適応することを特徴とする医薬。

5. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬では治療できない疾

患が、該疾患に関わる標的細胞における、該抗体組成物が認識する抗原が、該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量しか発現していない疾患である、請求の範囲 4 に記載の医薬。

6. 該抗体組成物が治療効果を発揮するには十分ではない量が、該抗体組成物が抗体依存性細胞障害活性を発揮するには十分ではない量である、請求の範囲 5 に記載の医薬。

7. レクチンに耐性を有する細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、請求の範囲 1~6 のいずれか 1 項に記載の医薬。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

8. レクチンが、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンである、請求の範囲 1~7 のいずれか 1 項に記載の医薬。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワソタケレクチン。

9. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1~8 のいずれか 1 項に記載の医薬。

10. 細胞が、下記 (a)~(j) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1~9 のいずれか 1 項に記載の医薬。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞；
- (j) 植物細胞。

11. 抗体組成物が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子を有効成分として含有する抗体組成物である、請求の範囲 1~10 のいずれか 1 項に記載の医薬。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；
- (d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

12. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 11 に記載の医薬。

13. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲 1~12 のいずれか 1 項に記載の医薬。

14. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物よりも高いことを特徴とする、請求の範囲 13 に記載の医薬。

15. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、請求の範囲 14 に記載の医薬。

16. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、請求の範囲 13~15 のいずれか 1 項に記載の医薬。

17. 糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物が、CHO 細胞が生産した抗体組成物である、請求の範囲 16 に記載の医薬。

18. 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、請求の範囲 1~17 のいずれか 1 項に記載の医薬。

19. 請求の範囲 1~17 のいずれか 1 項に記載の医薬を製造するための、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞から生産された抗体組成物の使用。

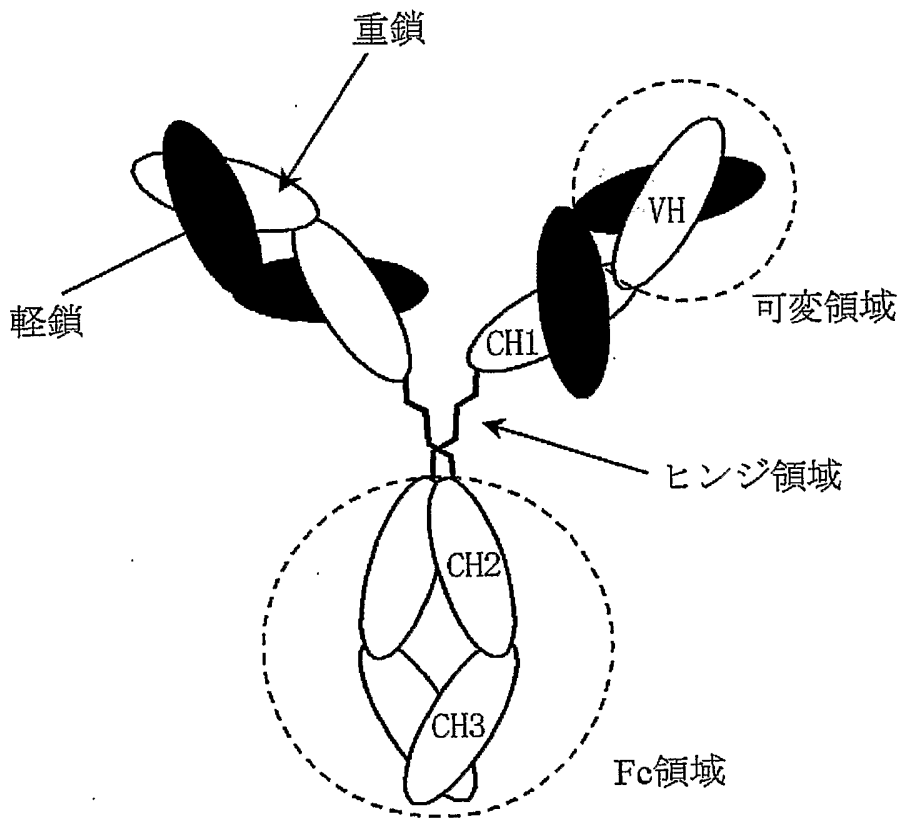
20. (i) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬あるいは請求の範囲 1~17 のいずれか 1 項に記載の医薬と患者から取得したこれら医薬の標的細胞とを接触させ、(ii) 該標的細胞と反応した医薬の活性を測定し、(iii) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を有効成分として含有する医薬が示した活性と請求の範囲 1~17 のいずれか 1 項に記載の医薬が示した活性との測定値を比較し、(iv) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6

位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有さない細胞から生産された抗体組成物を含有する医薬が示した活性が低い患者を選択することにより、請求の範囲 1~17 のいずれか 1 項に記載の医薬が有効な患者をスクリーニングする方法。

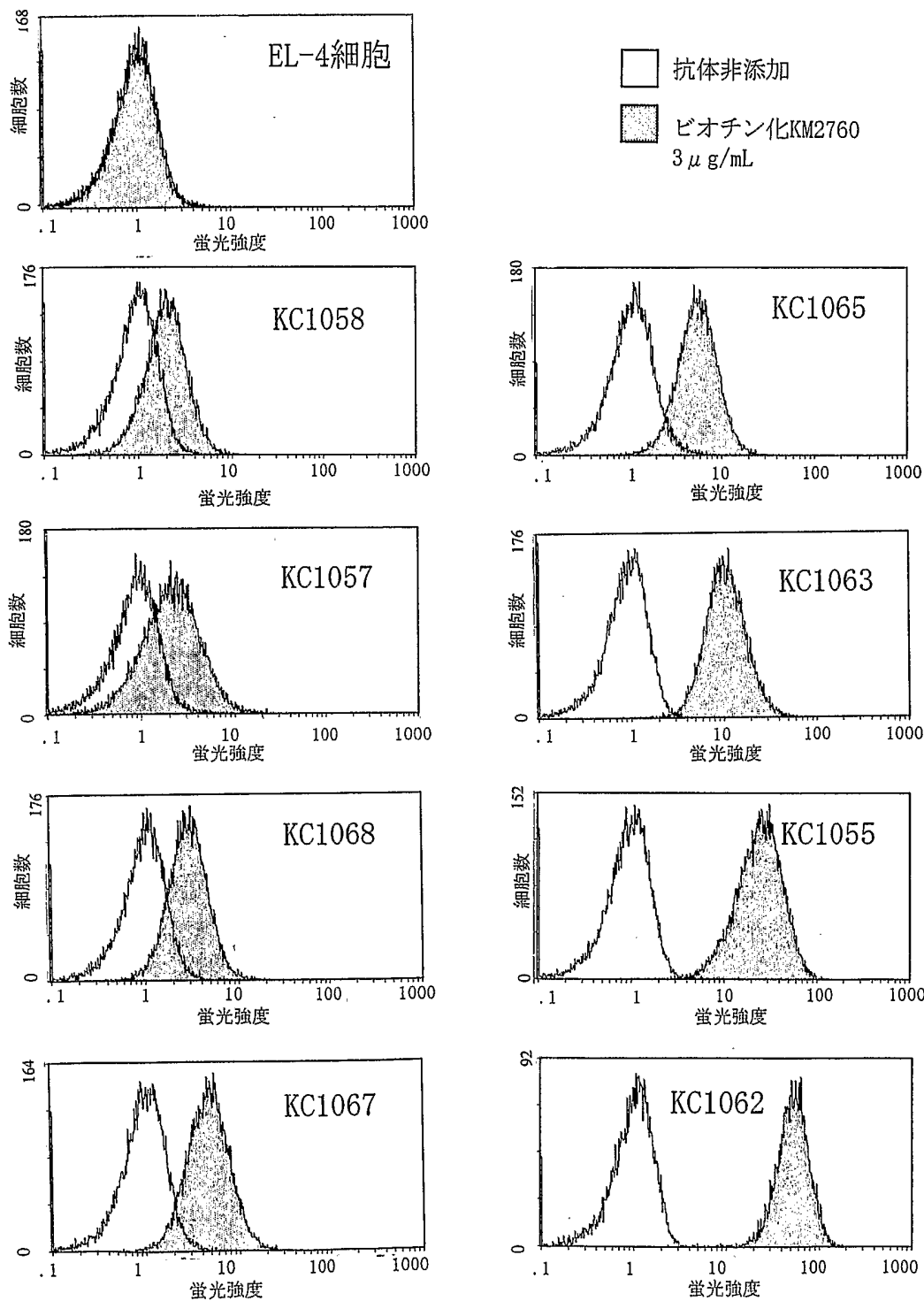
21. 標的細胞と反応した医薬の活性を測定する方法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる活性を測定する方法である、請求の範囲 19 に記載の方法。

- (a) 抗体依存性細胞障害活性；
- (b)  $Fc\gamma$  受容体 IIIa 結合活性；
- (c) 補体依存性細胞障害活性；
- (d) 増殖抑制活性。

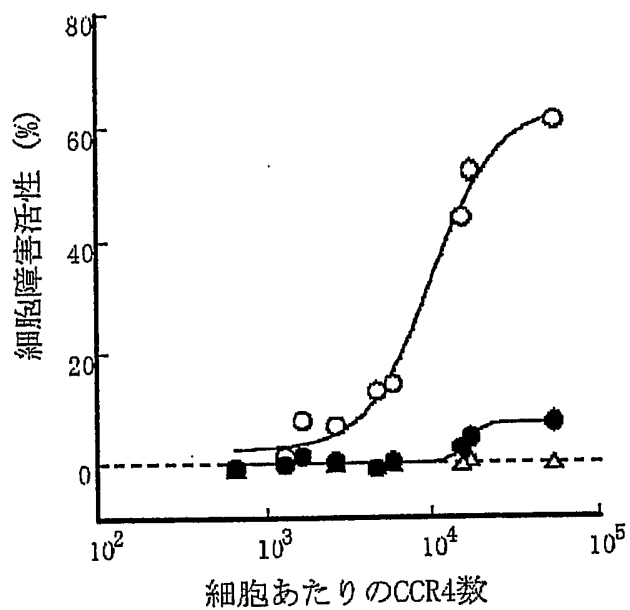
第1図



### 第2図

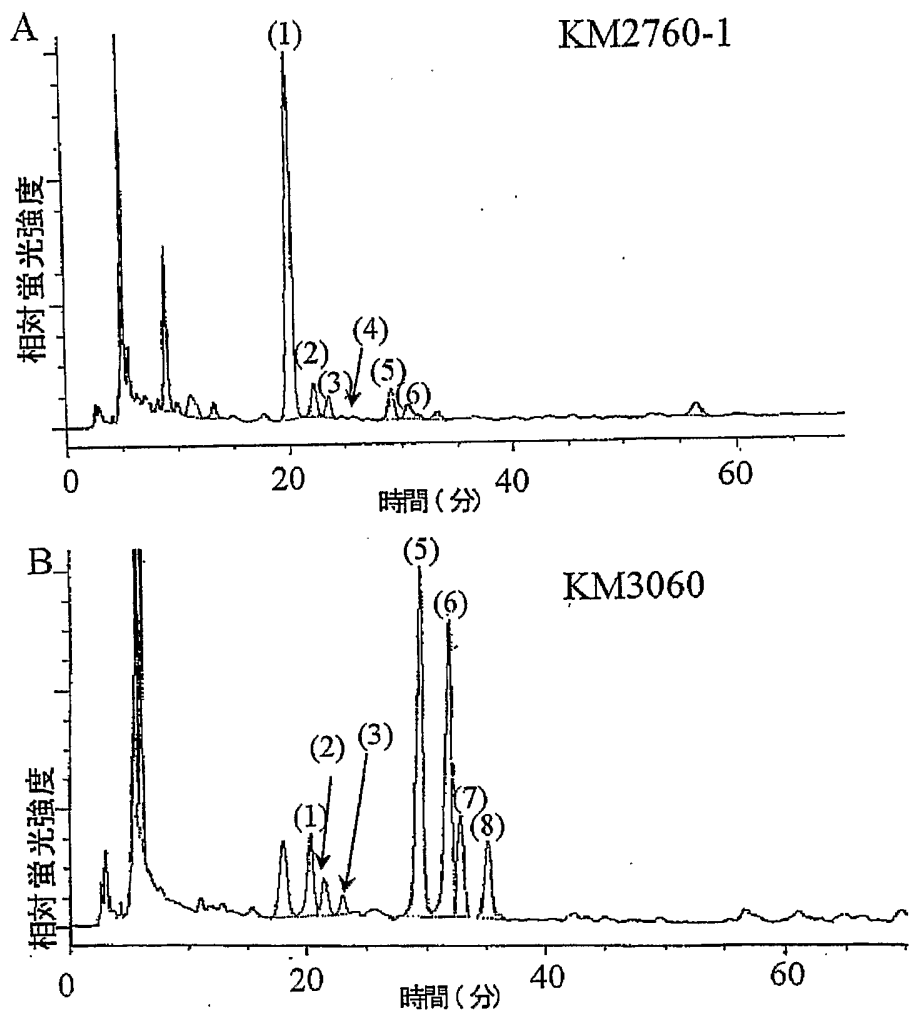


第3図

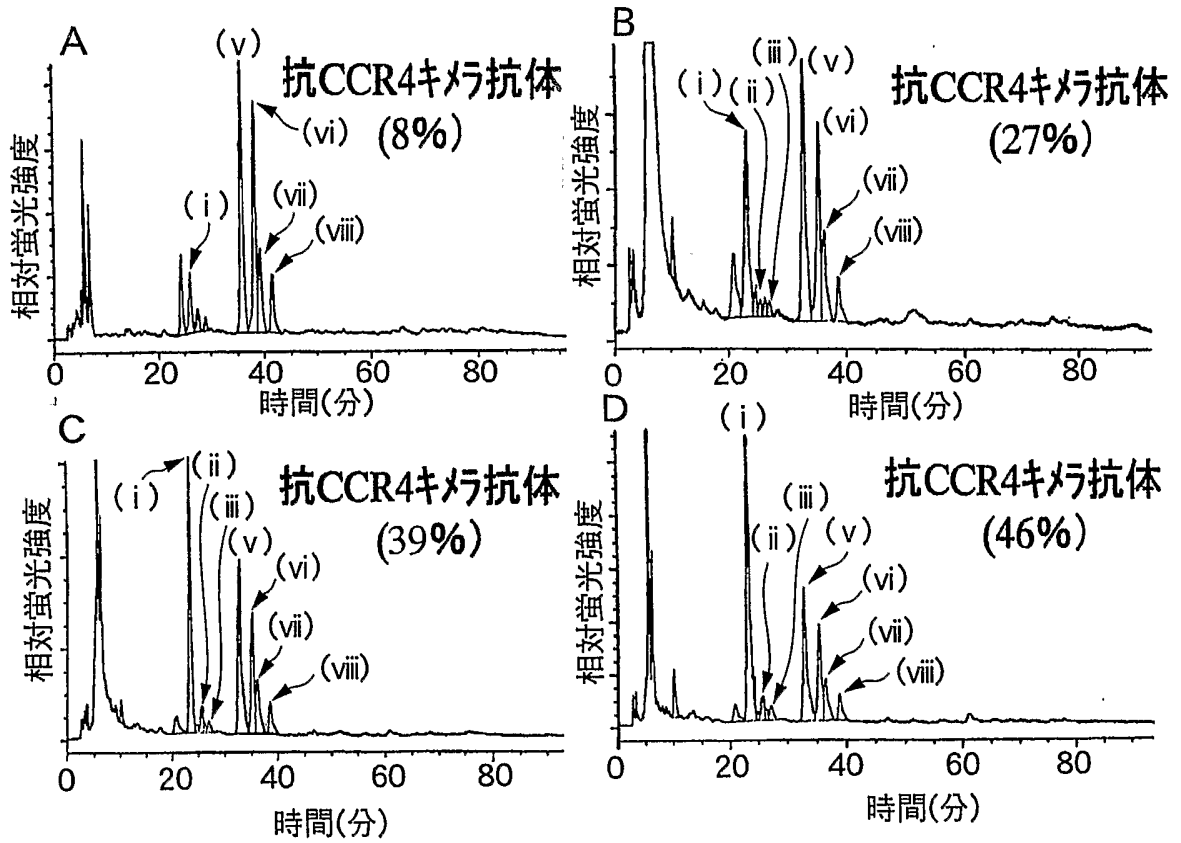


- KM2760-1 3 μg/mL
- KM3060 3 μg/mL
- △ 抗体非添加

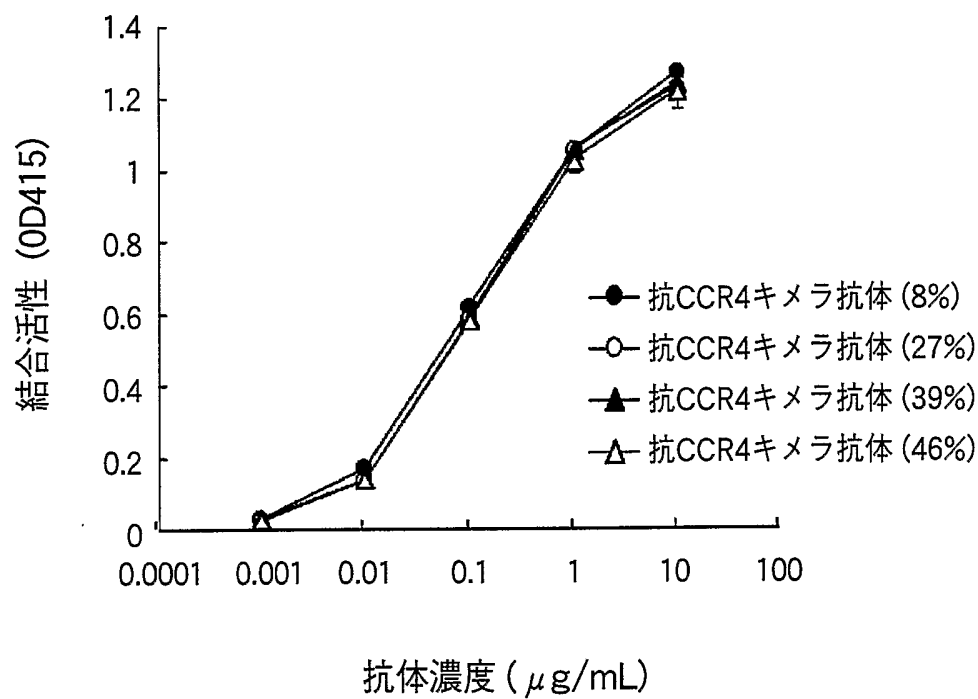
第 4 图



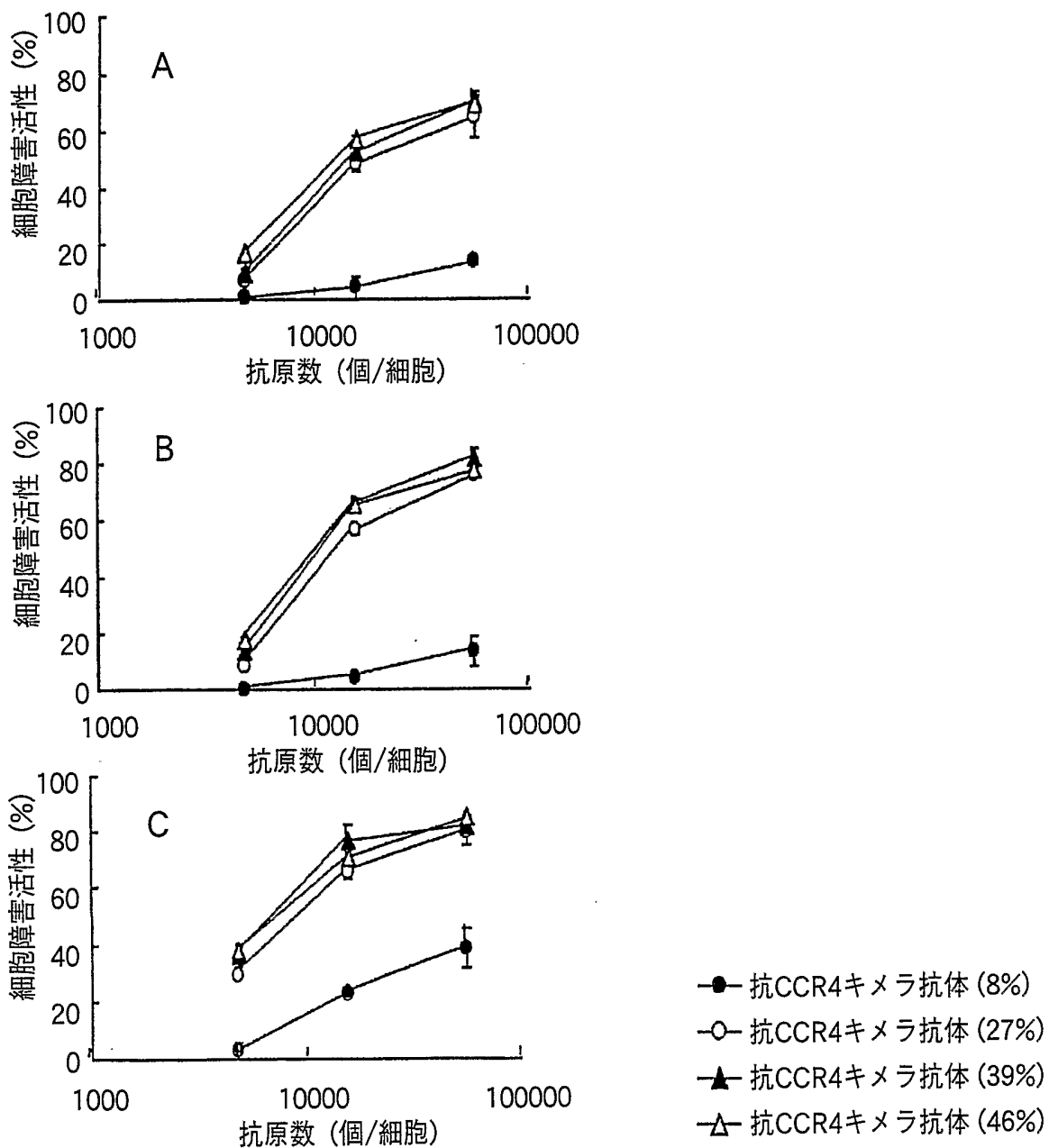
第5図



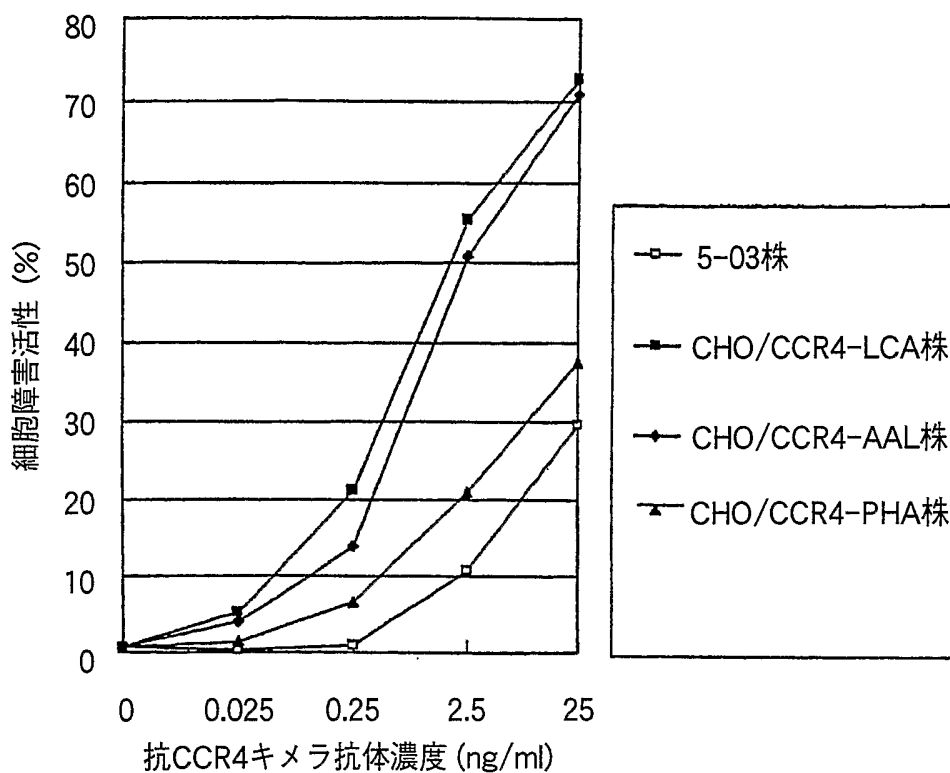
第6図



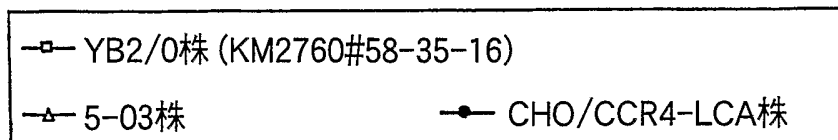
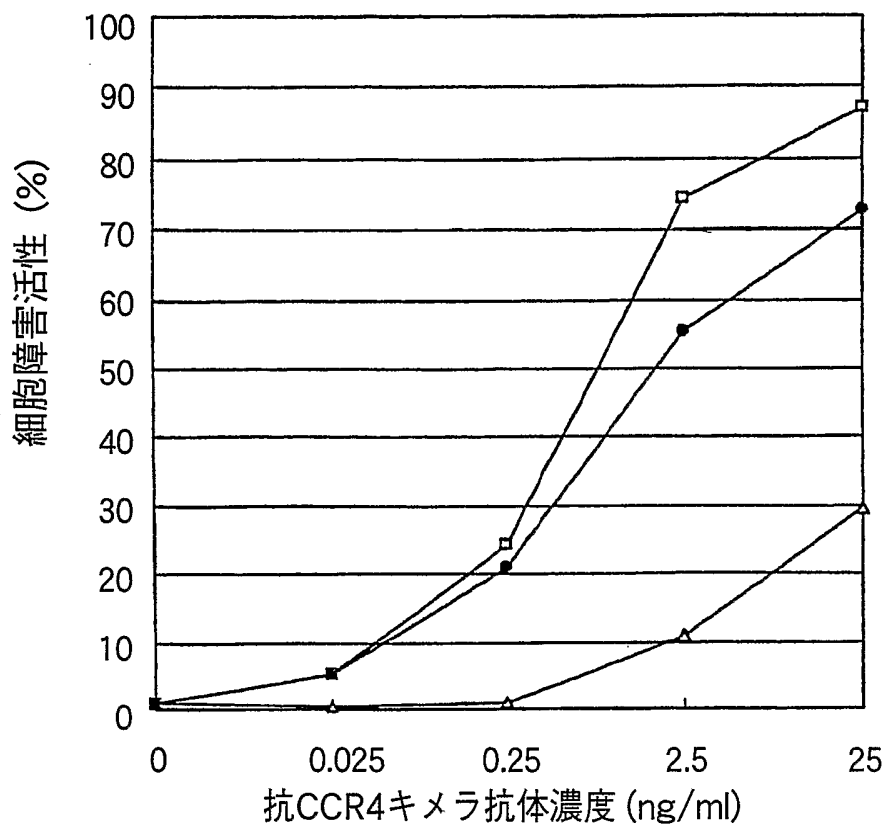
第7図



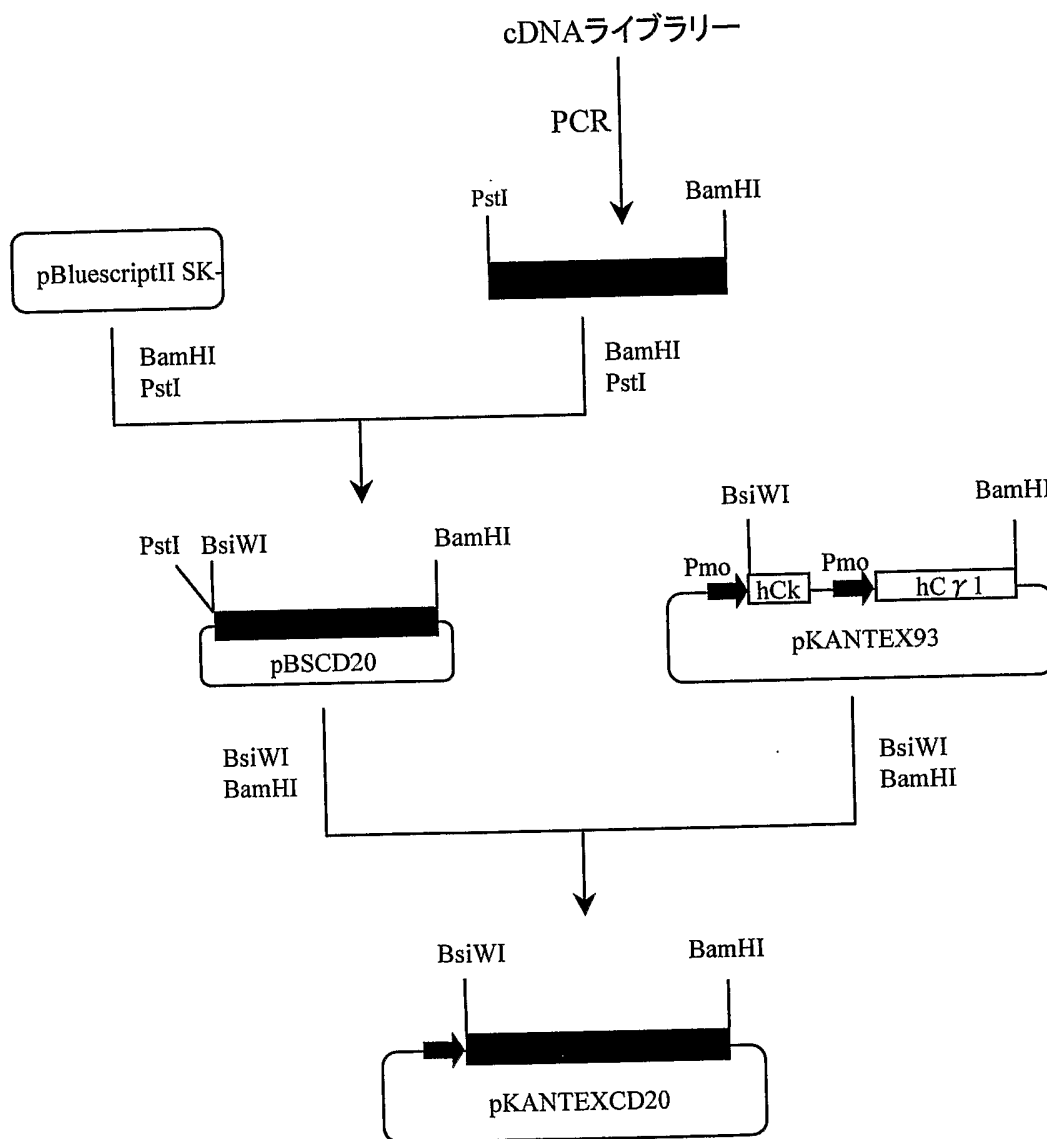
第 8 図



第9図

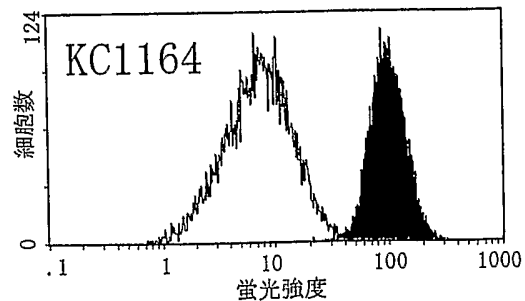
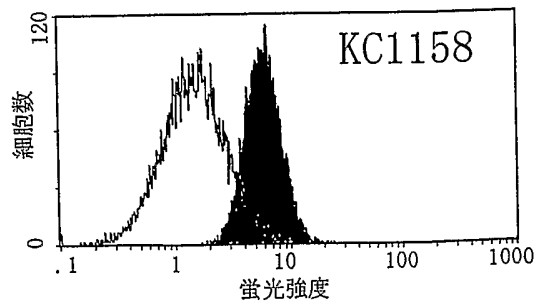
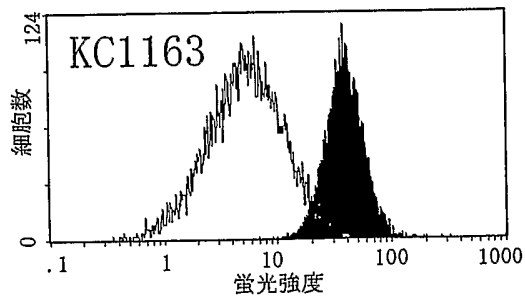
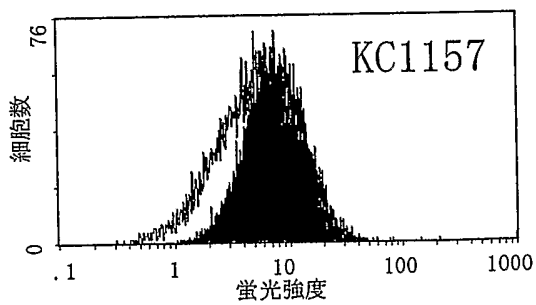
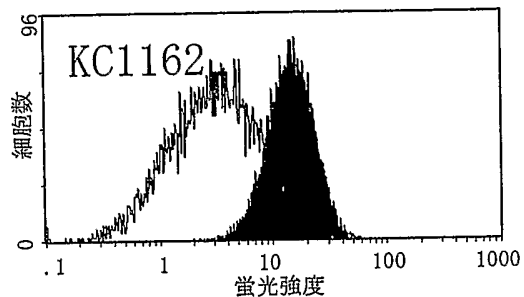
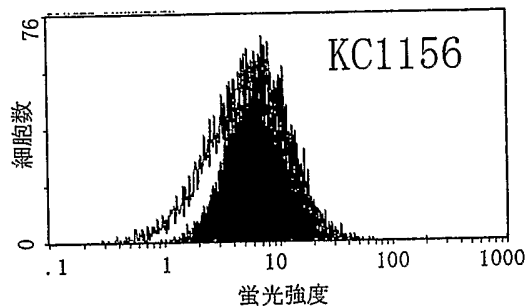
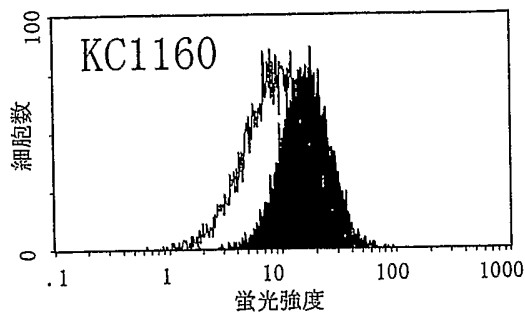
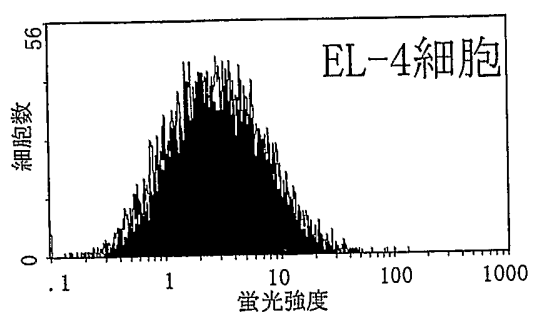


第10図

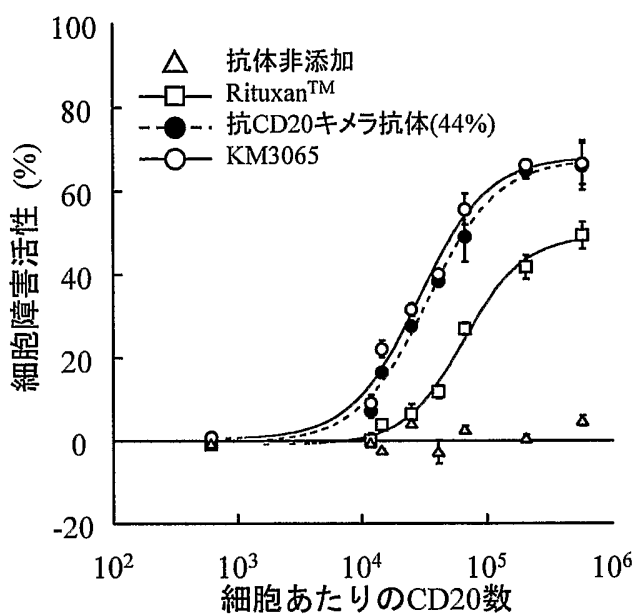


### 第 1 1 図

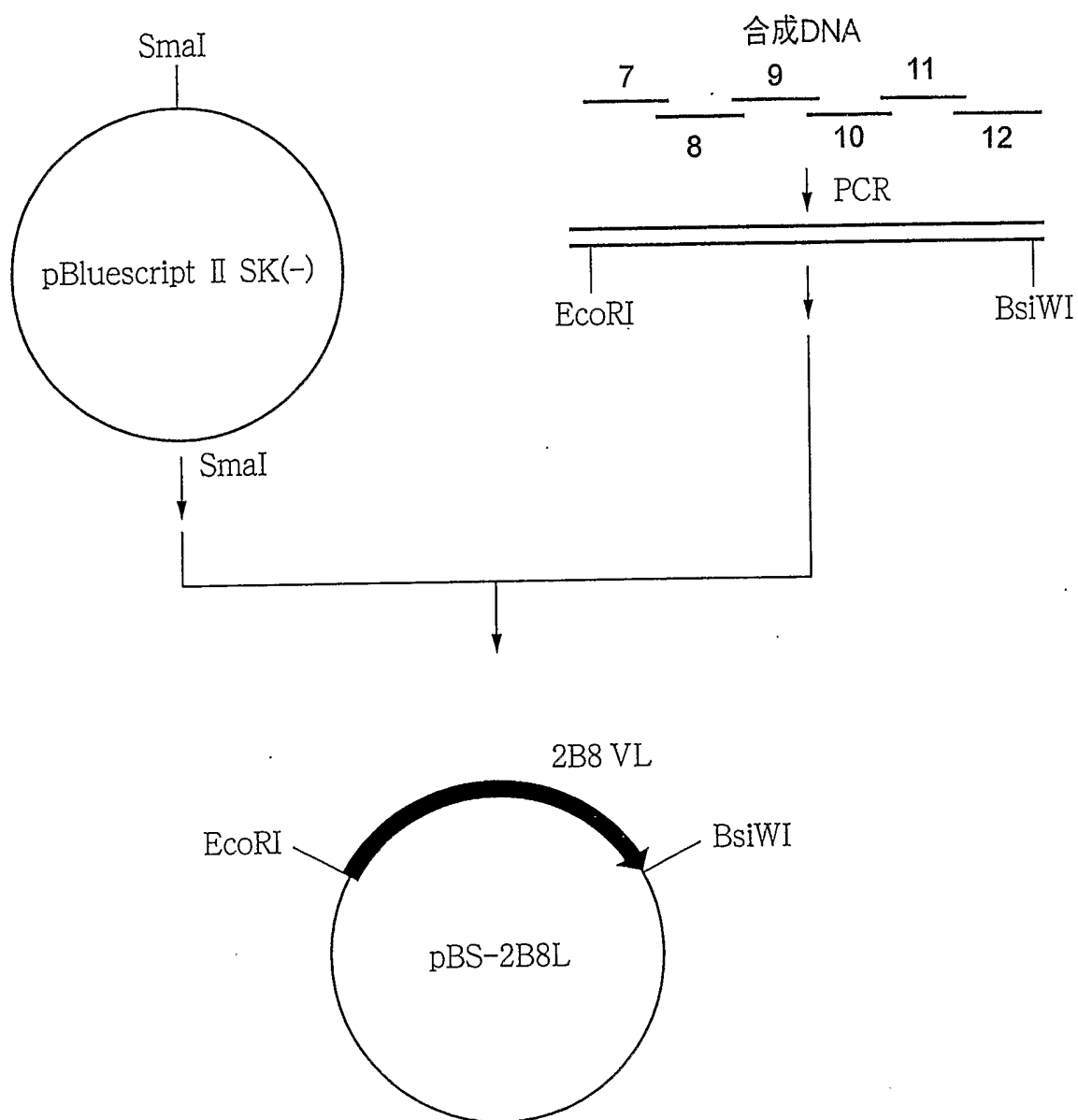
□ マウスIgG2a  
■ 抗CD20抗体 40  $\mu$ g/ml



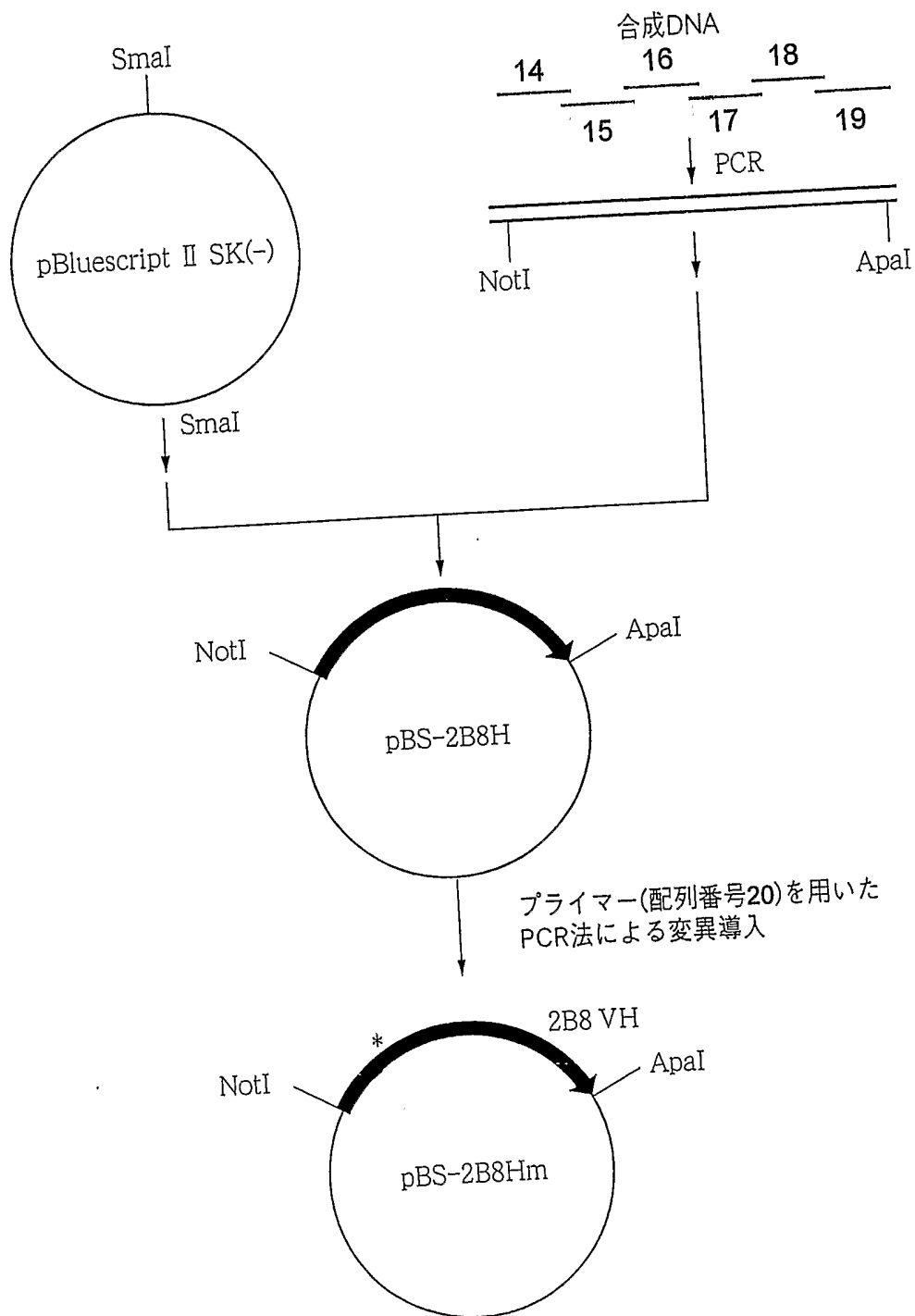
第 1 2 図



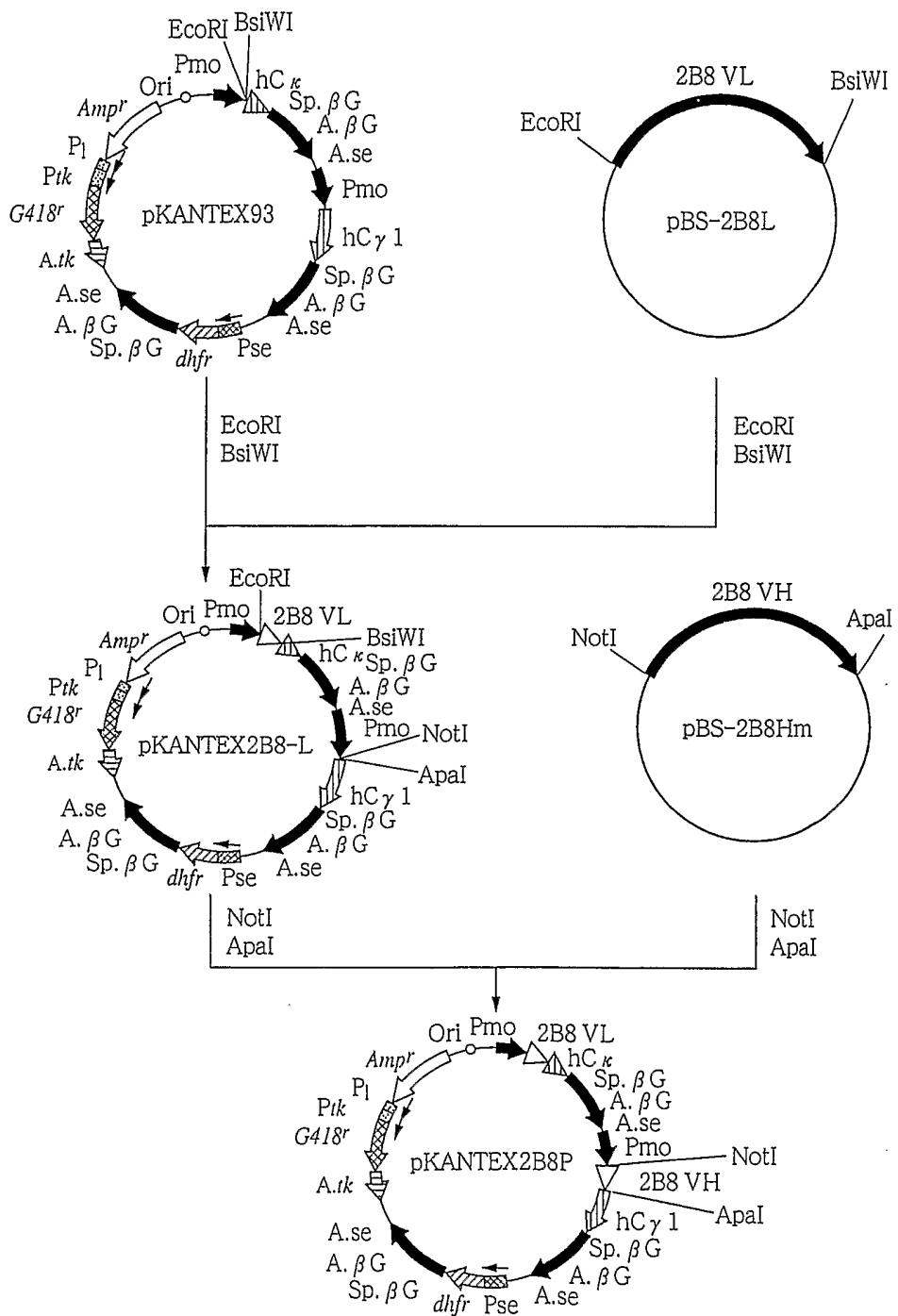
第 1 3 図



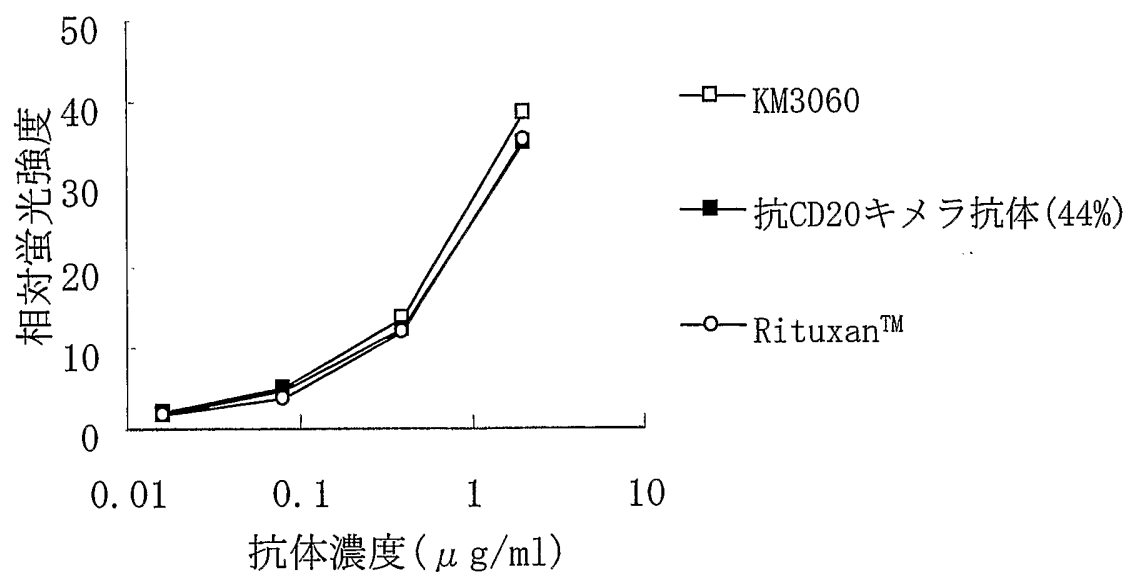
第14図



第 15 图



第16図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Antibody composition-containing medicament

<130> P044076

<150> 2002-106949

<151> 2002-04-09

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys

1

5

10

15

Pro Cys

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

taaaactagt ctgcagcgta cggaccctc accatgacaa cacccagaaa ttcagta 57

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

tagtggatcc aaatcactta aggagagctg tcattttcta ttggtgagg 49

<210> 4

<211> 894

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgacaacac ccagaaattc agtaaatggg actttcccgg cagagccaat gaaaggccct 60  
 attgctatgc aatctggtcc aaaaccactc ttcaggagga tgtcttcact ggtgggcccc 120  
 acgcaaagct tcttcatgag ggaatctaag actttggggg ctgtccagat tatgaatggg 180  
 ctcttcaca ttgccctggg ggtctctctg atgatcccag cagggatcta tgcaccatc 240  
 tgtgtgactg tgtgtgtacc tctctgggga ggcattatgt atattatttc cggatcactc 300  
 ctggcagcaa cggagaaaaa ctccaggaag tgtttgggtca aaggaaaaat gataatgaat 360  
 tcattgagcc tctttgctgc ctttctgga atgattcttt caatcatgga cataactaat 420  
 attaaaattt cccatttttt aaaaatggag agtctgaatt ttattagagc tcacacacca 480  
 tatattaaca tatacaactg tgaaccagct aatccctctg agaaaaactc cccatctacc 540  
 caatactgtt acagcataca atctctgttc ttgggcattt tgtcagtgat gctgatcttt 600  
 gccttcttcc aggaacttgt aatagctggc atcgttgaga atgaatggaa aagaacgtgc 660  
 tccagacca aatctaacat agttctcctg tcagcagaag aaaaaaaga acagactatt 720  
 gaaataaaag aagaagtgtg tgggctaact gaaacatctt cccaacaaa gaatgaagaa 780  
 gacattgaaa ttattccaat ccaagaagag gaagaagaag aaacagagac gaactttcca 840  
 gaacctcccc aagatcagga atcctcacca atagaaaatg acagctctcc ttaa 894

<210> 5

<211> 297

<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro  
 1 5 10 15  
 Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg  
 20 25 30  
 Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu  
 35 40 45  
 Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile  
 50 55 60  
 Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile  
 65 70 75 80  
 Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile  
 85 90 95  
 Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu  
 100 105 110  
 Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile  
 115 120 125  
 Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser  
 130 135 140  
 His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn  
 165 170 175  
 Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly  
 180 185 190  
 Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile  
 195 200 205  
 Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro  
 245 250 255  
 Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu  
 260 265 270  
 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser



<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

```
caggaaacag ctatgacgaa ttgcctcct caaatggat ttcaggtgc agattatcag 60
cttctgcta atcagtgtt cagtcataat g 91
```

<210> 8

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

```
gtgaccttct cccctggaga tgcagacagg attgctggag actgggagag acaatttgt 60
cctctggaca ttatgactga agcactgatt a 91
```

<210> 9

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

```
ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt tacatccact 60
ggttcagca gaagccagga tcctcccca 90
```

<210> 10

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

ccagaccac tgccactgaa gcaacaggg actccagaag ccaggttga tgtggcataa 60  
atccagggtt tgggggagga tcctggctt 89

<210> 11

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

tcagtggcag tgggtctggg acttcttact ctctaccat cagcagatg gaggtgaag 60  
atgctgccac ttattactgc cagcagtga c 91

<210> 12

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

gttttcccag tcacgaccgt acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgggt 60  
ggttactag tccactgctg gcagtaataa 90

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 420

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 13

```

atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt 48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
  1           5           10           15
gtc ctg tcc cag gta caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
          20           25           30
cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45
acc agt tac aat atg cac tgg gta aaa cag aca cct ggt cgg ggc ctg 192
Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
          50           55           60
gaa tgg att gga gct att tat ccc gga aat ggt gat act tcc tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
          65           70           75           80
cag aag ttc aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
          85           90           95
aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100           105           110
tat tac tgt gca aga tcg act tac tac ggc ggt gac tgg tac ttc aat 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
          115           120           125
gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tct gca 420
Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
          130           135           140

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

```
caggaaacag ctatgacgcg gccgcgaccc ctaccatgg gttggagcct catcttgctc 60
ttccttgctg ctgttgctac gcgtgtcctg tcccaggta 99
```

<210> 15

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

```
atgtgtagcc agaagccttg caggacatct tcactgaggc cccagccttc accagctcag 60
ccccaggctg ctgcagttgt acctgggaca ggacacgc 98
```

<210> 16

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

```
caaggcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac tgggtaaac agacacctgg 60
tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccgga 97
```

<210> 17

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gtaggctgtg ctggaggatt tgtctgcagt caatgtggcc ttgcctttga acttctgatt 60  
gtaggaagta tcaccatttc cgggataaat agtccaat 99

<210> 18

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct 60  
attactgtgc aagatcgact tactacggcg gtgactggt 99

<210> 19

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gttttccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgcaga gacggtgacc gtggtccctg 60  
cgccccagac attgaagtac cagtcaccgc cgtagtaa 98

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20


gagctggtga agcctggggc ctcag

25

出願人又は代理人の書類記号 P044076	国際出願番号 PCT/JP 03/04503
--------------------------	---------------------------

寄託された微生物に関する表示  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  <div style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">90</span> <span style="margin-right: 100px;">頁、</span> <span>24(最終行) 行</span> </div>	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）  <div style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)</div>	
寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
<p>ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  <div style="text-align: center;">EP</div>	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044076	国際出願番号 PCT/JP03/04503
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <p align="center">_____ 90 _____ 頁、 _____ 24(最終行) _____ 行</p>	
B. 寄託の表示 <span style="float:right">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 <p align="center">独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター</p>	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） <p align="center">日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)</p>	
寄託の日付 <p align="center">平成13年(2001) 9月26日</p>	受託番号 <p align="center">FERM BP-7756</p>
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float:right">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
<p align="center">オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタベスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前のみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合） <p align="center">AU</p>	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

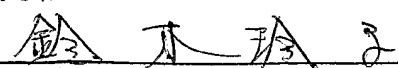
受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 <p align="center">鈴木 玲子</p>

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 <p align="center">02 MAY 2003 (02.05.03)</p>
権限のある職員 <p align="center">五十嵐 伸司</p>

出願人又は代理人の書類記号 P044076	国際出願番号 PCT/JP03/04503
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  <div style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">90</span> <span style="margin-right: 100px;">頁、</span> <span>24(最終行) 行</span> </div>	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名(郵便番号及び国名を含む)  日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)	
寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示(該当しない場合には記載しない) <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国(すべての指定国のために行わない場合)	
CA	
E. 追加事項の表示の届出(該当しない場合には記載しない)	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044076	国際出願番号 PCT/JP03/04503
--------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  <div style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">_____ 110 _____</span> 頁、 <span style="margin-right: 100px;">_____ 23 _____</span> 行 </div>	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）  日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成13年（2001）12月21日	受託番号 FERM BP-7834
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 鈴木玲子


様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐伸司

出願人又は代理人の書類記号 PO44076	国際出願番号 PCT/JP03/04503
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
_____ 110 _____ 頁、	_____ 23 _____ 行
B. 寄託の表示	他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名(郵便番号及び国名を含む) 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)	
寄託の日付 平成13年(2001)12月21日	受託番号 FERM BP-7834
C. 追加の表示(該当しない場合には記載しない)	この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>
オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。	
D. この表示を行うための指定国(すべての指定国のために行わない場合)	
AU	
E. 追加事項の表示の届出(該当しない場合には記載しない)	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044076	国際出願番号 PCT/JP03/04503
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

\_\_\_\_\_ 110 \_\_\_\_\_ 頁、 \_\_\_\_\_ 23 \_\_\_\_\_ 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付

平成13年(2001)12月21日

受託番号

FERM BP-7834

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている

カナダ特許法サブセクション104(4)及び  
同特許法規則160(4)の規定に基づき、  
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、  
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

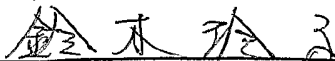
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員



様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日

02 MAY 2003

(02.05.03)

権限のある職員

五十嵐伸司

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04503

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395, A61P9/00, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12,  
A61P31/14, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04, A61P37/08,  
A61P43/00, G01N33/15//C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched: (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395, A61P9/00, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12,  
A61P31/14, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04, A61P37/08, A61P43/00,  
G01N33/15, C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 October, 2000 (19.10.00), & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	13-21/1-12
A	Ripka J. et al., Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch.Biochem. Biophys., 1986, 249(2), pages 533 to 545	8-10
X	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J.Immunol.Methods, 1994, 167(1-2), pages 271 to 278	13-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
23 May, 2003 (23.05.03)

Date of mailing of the international search report  
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04503

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Davies J. et al., Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, <i>Biotechnol.Bioeng.</i> , 2001, 74(4), pages 288 to 294	1-21
A	Hackett J. Jr. et al., Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>J. Clin.Microbiol.</i> , 1998, 36(5), pages 1277 to 1284	1-21
A	Elbashir SM. et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, <i>Nature</i> , 2001, 411(6836), pages 494 to 498	8-10
A	WO 97/27303 A (Toyobo Co., Ltd.), 31 July, 1997 (31.07.97), & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-21
A	Shields RL. et al., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, <i>J.Biol.Chem.</i> , 2001, 276(9), pages 6591 to 6604	1-21
P,X	Shields RL. et al., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, <i>J.Biol.Chem.</i> , 2002 Jul., 277(30), pages 26733 to 26740	1-21
P,X	SHINKAWA, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, <i>J.Biol.Chem.</i> , 2003, 278(5), pages 3466 to 3473	1-21
P,X	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 9419801 A	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP03/04503

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, (C12P21/08, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91)


(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup>

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>7</sup> A61K 39/395, A61P 9/00, A61P 29/00, A61P 31/04, A61P 31/12, A61P31/14, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 43/00, G01N 33/15 // C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, (C12P 21/08, C12R 1:91), (C12N 5/10, C12R 1:91)</p>		
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>7</sup> A61K 39/395, A61P 9/00, A61P 29/00, A61P 31/04, A61P 31/12, A61P31/14, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 43/00, G01N 33/15, C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 00/61739 A1(協和醗酵工業株式会社), 2000. 10. 19 & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	13-21 / 1-12
A	Ripka J et al, Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch Biochem Biophys, 1986, 249 (2), p. 533-545	8-10
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日 23. 05. 03	国際調査報告の発送日 22.07.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9359 

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Shitara K et al, A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J Immunol Methods, 1994, 167(1-2), p. 271-278	13-19
A	Davies J et al, Expression of GnTIII in a recombinant anti-C D20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, Biotechnol Bioeng, 2001, 74(4), p. 288-294	1-21
A	Hackett J Jr et al, Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, J Clin Microbiol, 1998, 36(5), p. 1277-1284	1-21
A	Elbashir SM et al, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411(6836), p. 494-498	8-10
A	WO 97/27303 A (東洋紡績株式会社), 1997. 7. 31 & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-21
A	Shields RL et al, High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, J Biol Chem, 2001, 276(9), p. 6591-6604	1-21
PX	Shields RL et al, Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J Biol Chem, 2002 Jul, 277(30), p. 26733-26740	1-21
PX	Shinkawa T et al, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J Biol Chem, 2003, 278(5), p. 3466-3473	1-21
PX	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002. 04. 18 & AU 9419801 A	1-21