

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(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 03/085119 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 21/08, C12N 15/09, 5/10, C07K 16/18, G01N 33/50, C07K 16/46 // 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, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04504
- (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2002-106950 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): 中村 和靖 (NAKAMURA,Kazuyasu) [JP/US]; 20852 メリーランド州ノースベセスダ ニコルソン レーン 5801 アパートメントナンバー416 MD (US). 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ドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ENHANCING ACTIVITY OF ANTIBODY COMPOSITION OF BINDING TO Fc $\gamma$  RECEPTOR IIIa

(54) 発明の名称: 抗体組成物のFc $\gamma$ 受容体IIIaに対する結合活性を高める方法

WO 03/085119 A1

(57) Abstract: A method of enhancing the activity of an antibody of binding to Fc $\gamma$  receptor IIIa; a method of enhancing the antibody-dependent cytotoxic activity of an antibody composition; a method of detecting the ratio of sugar chains having no fucose bonded to N-acetylglucosamine at the sugar chain reducing end among total N-glycoside bond-type complex sugar chains binding to the Fc region contained in an antibody composition; a method of detecting an antibody-dependent cytotoxic activity; an Fc-fused protein composition produced with the use of cells having tolerance 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; and a process for producing the same.

(57) 要約: 抗体組成物のFc $\gamma$ 受容体IIIaに対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、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を検出する方法、抗体依存性細胞障害活性を検出する方法、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を用いて製造されたFc融合蛋白質組成物、およびその製造方法。

## 明細書

### 抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法

#### 技術分野

本発明は、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、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を検出する方法、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を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物、およびその製造方法に関する。

#### 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：プリンシップルズ・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 V 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：プリンシップルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG

クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有していることが報告されている [ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチニンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体の ADCC 活性および CDC 活性の発現には、抗体 Fc 領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、Fc $\gamma$ R と表記する）および各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域および C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、CH2 ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性 [ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー(Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] の他、CH2 ドメインに結合している糖鎖の重要性 [ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] が示唆されている。

糖鎖に関しては、ボイド (Boyd) らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（以下、CHO 細胞と表記する）或いはマウスミエローマ NS0 細胞（以下、NS0 細胞と表記する）で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の ADCC 活性、CDC 活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することで CDC 活性のみが影響を受け、約 50% 程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)]。また、ライフリー (Lifely) らは、CHO 細胞、NS0 細胞或いはラットミエローマ Y0 細胞（以下、Y0 細胞と表記する）で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）の糖鎖の分析および ADCC 活性を測定した結果、Y0 細胞由来の CAMPATH-1H が最も高い ADCC 活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc とも表記する）が重要であることを示唆した [グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342]。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な

役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

以上のように、IgG クラスの抗体の CH2 ドメインに結合している糖鎖は、抗体のエフェクター機能の発現に大きな影響を与える。先にも述べたように、抗体のエフェクター機能のいくつかは、エフェクター細胞表面上に存在する Fc $\gamma$ R との相互作用を介して発揮される[アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 18, 709 (2000)、アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

Fc $\gamma$ R は、3 つの異なるクラスが存在することが明らかとなっており、それぞれ Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RII (CD32)、Fc $\gamma$ RIII (CD16) と呼ばれている。ヒトにおいては、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、さらに、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb と Fc $\gamma$ RIIIa、Fc $\gamma$ RIIIb に分類される。Fc $\gamma$ R は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、2 つのイムノグロブリン様ドメイン、Fc $\gamma$ RI は、3 つのイムノグロブリン様ドメインからなる細胞外領域を持つ $\alpha$ 鎖を構成成分として持ち、 $\alpha$ 鎖が IgG 結合活性を担っている。さらに、Fc $\gamma$ RI と Fc $\gamma$ RIII は、 $\alpha$ 鎖と会合してシグナル伝達機能を有する $\gamma$ 鎖あるいは $\zeta$ 鎖を構成成分として有している[アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 18, 709 (2000)、アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

Fc $\gamma$ RI は、 $10^8\sim10^9 M^{-1}$  の結合定数（以下、K<sub>A</sub> と表記する）を持つ高親和性受容体であり、単量体の IgG に対しても高い結合活性を有している[アナルズ・オブ・ヘマトロジー (Ann. Hematol.), 76, 231 (1998)]。一方、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、単量体の IgG に対しては、 $10^5\sim10^7 M^{-1}$  の低い K<sub>A</sub> を示す低親和性受容体であり、抗原などと結合して多量体化した IgG 免疫複合体と効率的に結合する[アナルズ・オブ・ヘマトロジー (Ann. Hematol.), 76, 231 (1998)]。Fc $\gamma$ R は、その機能から、活性化受容体と抑制性受容体に分けられる[アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

活性化受容体は、 $\alpha$ 鎖あるいは会合する $\gamma$ 鎖、 $\zeta$ 鎖の細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based activation motif (以下、ITAM と表記する) と呼ばれる 19 アミノ酸残基からなる配列が存在する。IgG 免疫複合体の結合に伴つ

て ITAM と相互作用する Src や Syk などのチロシンキナーゼが活性化して、種々の活性化反応が惹起される。

抑制性受容体は、 $\alpha$ 鎖の細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (以下、ITIM と表記する) と呼ばれる 13 アミノ酸残基からなる配列が存在する。活性化受容体との会合を介して ITIM がリン酸化されることにより、SHIP と呼ばれるホスファターゼの活性化を始めとして種々の反応が惹起され、活性化受容体からの活性化シグナルを抑制する。

ヒトでは、高親和性の Fc $\gamma$ RI および低親和性の Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIIa は、活性化受容体として機能している。Fc $\gamma$ RI は、会合している $\gamma$ 鎖の細胞内領域に ITAM 配列が存在している。Fc $\gamma$ RI は、マクロファージ、単球、樹状細胞、好中球、好酸球などに発現している。Fc $\gamma$ RIIa は、単一の $\alpha$ 鎖からなり、細胞内領域に ITAM 様配列が存在している。Fc $\gamma$ RIIa は、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好中球、好酸球、血小板および一部の B 細胞に発現している。Fc $\gamma$ RIIIa は、会合している $\gamma$ 鎖あるいは $\delta$ 鎖の細胞内領域に ITAM 配列が存在し、NK 細胞、マクロファージ、単球、マスト細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好酸球などに発現しているが、好中球、B 細胞および T 細胞には発現していない。

一方、低親和性受容体の Fc $\gamma$ RIIb は、単一の $\alpha$ 鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列において Fc $\gamma$ RIIa と約 90% の相同性を有する。しかしながら、細胞内領域に ITIM 配列が存在し、抑制性受容体として機能している。Fc $\gamma$ RIIb は、B 細胞、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好塩基球、好中球、好酸球に発現しているが、NK 細胞や T 細胞には発現していない。Fc $\gamma$ RIIIb は、単一の $\alpha$ 鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列において Fc $\gamma$ RIIIa と約 95% の相同性を有する。しかしながら、グリコシルホスファチジルイノシトール (以下、GPI と表記する) 結合型の膜蛋白質として、好中球に特異的に発現している。Fc $\gamma$ RIIIb は、IgG 免疫複合体を結合するが、単独では細胞を活性化できず、Fc $\gamma$ RIIa などの ITAM 配列を有する受容体との会合を介して機能していると考えられている。このように、生体内における IgG クラスの抗体のエフェクター機能は、様々なエフェクター細胞上に発現している活性化および抑制性の Fc $\gamma$ R との複雑な相互作用の結果、発揮されている。

IgG クラスの抗体のエフェクター機能の 1 つである ADCC 活性は、NK 細胞、好中球、単球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化の結果、生じると考

えられており、中でも NK 細胞が、主要な役割を果たしている [ブラッド (Blood), 76, 2421 (1990)、トレンドス・イン・イムノロジー (Trends in Immunol.), 22, 633 (2001)、インターナショナル・レビュー・オブ・イムノロジー (Int. Rev. Immunol.), 20, 503 (2001)]。

NK 細胞上に発現している Fc $\gamma$ R は、Fc $\gamma$ RIIIa である。したがって、NK 細胞に発現している Fc $\gamma$ RIIIa からの活性化シグナルを増強させることにより、ADCC 活性を高めることができると考えられている。

Fc 融合蛋白質としては、Etanercept (商品名 Enbrel、Immunex 社製) (USP 5,605,690)、Alefagept (商品名 Amevive、Biogen 社製) (USP 5,914,111) などが知られている。また、抗体の CH2 ドメインが存在しなければ ADCC 活性を有しないことが知られている (J. Immunol., 152, 2753(1994))。

## 発明の開示

本発明は、以下の (1)～(48) に関する。

- (1) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法。
  - (2) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、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 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、(1) に記載の方法。
  - (3) 糖鎖が、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フコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成することを特徴とする、(1 または 2) に記載の方法。
  - (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にフコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(3) に記載の方法。
    - (a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関する蛋白質；
    - (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する蛋白質；
    - (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する蛋白質。

- (5) 細胞が、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である、(3) または (4) に記載の方法。
- (6) 細胞が、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の一つに耐性である、(3)～(5) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (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。
- (7) 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、(3～6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- (8) 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、(3)～(7) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
  - (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
  - (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
  - (f) 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。
- (9) 抗体分子が、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である、(1)～(8) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (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。
- (10) 抗体分子のクラスが IgG である、(1)～(9) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (11) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、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、(1) ~ (10) のいずれか 1 項に記載の方法。

(12) (1) ~ (11) のいずれか 1 項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。

(13) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。

(14) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、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 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、(13) に記載の方法。

(15) 糖鎖が、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フコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または消失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、(13) または (14) に記載の方法。

(16) 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を結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(15) に記載の方法。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関する蛋白質；

(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する蛋白質；

(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する蛋白質。

(17) 細胞が、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である、(15) または (16) に記載の方法。

(18) 細胞が、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の一つに耐性である、(15) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の方法。

(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。

(19) 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、(15)～(18) のいずれか 1 項に記載の方法。

(20) 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、(15)～(19) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
- (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
- (f) 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。

(21) 抗体分子が、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である、(13)～(20) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (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。

(22) 抗体分子のクラスが IgG である、(13～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

(23) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、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)～(22) のいずれか 1 項に記載の方法。

(24) (12) の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。

(25) (13)～(24) のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。

(26) 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc  $\gamma$  受容体 IIIa と接触させて Fc  $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc  $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、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を検出する方法。

(27) 抗原と被験抗体組成物とを反応させたて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を  $Fc\gamma$  受容体 IIIa と接触させ、 $Fc\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

(28) 被験抗体組成物と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、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を検出する方法。

(29) 被験抗体組成物と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と  $Fc\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

(30) 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を用いて製造された  $Fc$  融合蛋白質組成物。

(31) 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、(30) に記載の  $Fc$  融合蛋白質組成物。

- (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。

(32) 細胞が、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の一つに耐性である、(30) または (31) 記載の  $Fc$  融合蛋白質組成物。

- (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。
- (33) 細胞が、Fc 融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、(30)～(32) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (34) Fc が抗体分子の IgG クラス由来である、(33) に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (35) 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、(30)～(34) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (36) 細胞が、マウスミエローマ細胞である、(30)～(35) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (37) マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である (36) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (38) 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、(30)～(37) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
  - (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
  - (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
  - (f) 胚性幹細胞；
  - (g) 受精卵細胞。
- (39) N-グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子の Fc 領域に有する Fc 融合蛋白質からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20% 以上である Fc 融合蛋白質組成物。
- (40) 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、(39) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (41) 抗体分子のクラスが IgG である、(39) または (40) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (42) Fc 融合蛋白質組成物が、Fc 融合纖維芽細胞増殖因子-8 である (30)～(41) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

- (43) (30)～(42)のいずれか1項に記載のFc融合蛋白質組成物を生産する細胞。
- (44) 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、(43)記載の細胞。
- (45) 細胞が、マウスミエローマ細胞である、(43)または(44)記載の細胞。
- (46) マウスミエローマ細胞が、NS0細胞またはSP2/0-Ag14細胞である(45)記載の細胞。
- (47) 細胞が、以下の(a)～(g)からなる群から選ばれる細胞である、(43)～(46)のいずれか1項に記載の細胞。
- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；
  - (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
  - (c) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
  - (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
  - (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
  - (f) 胚性幹細胞；
  - (g) 受精卵細胞。
- (48) (43)～(47)のいずれか1項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中にFc融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物からFc融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Fc融合蛋白質組成物の製造方法。

本発明は、抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のFc $\gamma$ 受容体IIIaに対する結合活性を高める方法に関する。

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

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

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

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

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖 V 領域（以下、重鎖は H 鎖として HV または VH とも表記する）および抗体軽鎖 V 領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とも表記する）とヒト抗体の H 鎖 C 領域（以下、CH とも表記する）およびヒト抗体の軽鎖 C 領域（以下、CL とも表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、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、該発現ベクターを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意味する。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、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意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

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

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

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。

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、またはウィルスあるいは

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 であることが好ましい。

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。

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

抗体分子の Fc 領域には、N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ 1 箇所ずつ結合する領域を有しているので、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体に結合する 2 本の N-グリコシド結合糖鎖には多数の構造の糖鎖が存在することになるので、Fc 領域に結合した糖鎖構造の観点から抗体分子の同一性を判断することができる。

抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であり、該組成物は、单一の糖鎖構造を有する抗体分子で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。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾は、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にフコースが結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることが好ましい。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、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をいう。

該糖鎖は、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にフコースが結合していない糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞により合成される。

本発明において、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の修飾に関する酵素蛋白質としては、

- (a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関する酵素蛋白質（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する蛋白質（以下、「GDP-フコース輸送蛋白質」と表記する）などがあげられる。

本発明において、GDP-フコース合成酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関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のことをいう。

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

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

GMD としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

- (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (d) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

Fx としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

- (a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (c) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (d) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

GFPP としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

- (a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (c) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (d) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

本発明において、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  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を意味する。

$\alpha$  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や  $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

また、上述の N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたる、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-フコシルトランスフェラーゼとしては、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (e)、(f)、(g)、(h)、(i) および (j) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

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

- (d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;
- (e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (h) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (i) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

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する蛋白質、または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であればいかなる蛋白質も含まれられる。

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。

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としては、上述の GDP-フコース輸送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も含まれされる。

本発明の GDP-フコーストランスポーターとしては、以下の (a)～(h) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質があげられる。

- (a) 配列番号 91 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 93 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (c) 配列番号 95 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (d) 配列番号 97 で表される塩基配列からなる DNA ;

- (e) 配列番号 91 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (f) 配列番号 93 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (g) 配列番号 95 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (h) 配列番号 97 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA。

さらに、本発明の GDP-フコーストランスポーターとしては、以下の (i)～(t) からなる群から選ばれる蛋白質があげられる。

- (i) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (j) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (k) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (l) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (m) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (n) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (o) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (p) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (q) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

- (r) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (s) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
- (t) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質。

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、2、48、51、65、91、93、95 または 97 で表される塩基配列を有する DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/L の塩化ナトリウム存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mmol/L 塩化ナトリウム、15mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、2、48、51、65、91、93、95 または 97 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

配列番号 19、20、23、24、71、92、94、96 または 98 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性、GFPP 活性または GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラ

一・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1、2、48、51 または 65 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、用いられる蛋白質が、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性、GFPP 活性または GDP-フコーストランスポーター活性を有するためには、それぞれ配列番号 19、20、23、24、71、92、94、96 または 98 で表されるアミノ酸配列と BLAST[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 215, 403 (1990)] や FASTA[メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80%以上、好ましくは 85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上、特に好ましくは 97%以上、最も好ましくは 99%以上の相同意を有する。

上述の細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または消失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または消失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法；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  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を選択する方法もあげられる。

レクチン耐性を有する細胞は、細胞培養時に一定の有効濃度のレクチンが存在しても、生育が阻害されない。

本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常  $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10.0\text{mg}/\text{ml}$ 、好ましくは  $0.5 \sim 2.0\text{mg}/\text{ml}$  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、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 倍以上である。

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としては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒ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。

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レクチンに耐性を有する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消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、具体例としては、以下の細胞があげられる。

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・アンチイボディズ・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 (p. 883-900) 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含まれる。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。

本発明において、Fc $\gamma$ R とは、IgG クラスの抗体に対する Fc 受容体（以下、FcR とも表記する）をいう。FcR とは、抗体の Fc 領域に結合する受容体を意味する [アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 9, 457 (1991)]。Fc $\gamma$ R には、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII サブクラスおよびそれらの対立遺伝子変異体およびオルターナティブスプライシングによって生じるアイソフォームも含まれる。さらに、Fc $\gamma$ RII は、Fc $\gamma$ RIIa および Fc $\gamma$ RIIb を、Fc $\gamma$ RIII は、Fc $\gamma$ RIIIa および Fc $\gamma$ RIIIb を包含する [アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 9, 457 (1991)]。

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%となるように糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることにより Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を高めることができる。

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によっても決定することができる。本発明の方法により、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。

本発明において、ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する FcR 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：プリンシブルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等があげられる。

以下、本発明の方法に用いられる、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にフコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または消失した宿主細胞の製造方法について詳細に説明する。

## 1. 本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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當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、または全長を適當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、本発明の方法に用いられる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產生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の方法に用いられ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 項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 項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 項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) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、モレキュラー・クローニング第 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) 項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 6 項または後述の 7 項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、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。

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）を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアヌ酸グアニジン-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)]、酸性チオシアヌ酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学、9, 1937 (1991)] などがあげられる。

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

さらに、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 を調製することができる。

調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全 RNA または mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

cDNA ライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー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 ライブライ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(+) [ヌクレイン・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 ライブライ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 ライブライリーを、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ヤップ法 [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); 遺伝子ライブライリーの作製法 (羊土社) (1994)]を用いて調製した cDNA ライブライ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ネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブライリーを鑄型として 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 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、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 ライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブ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 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。

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。上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列と

しては、例えば、配列番号 48、51 または 65 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 2 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 91、93、95 または 97 記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 Model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、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 ライブライ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、調製することができる。

上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 99 または 100 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、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、本発明の方法に用いられる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 5~40 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ォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド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本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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・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 ジーンターゲッティング, 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-

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、本発明の方法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 項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) 項の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$ 1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 99 または 100 に記載の塩基配列があげられる。

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)、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、インサーション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の 3 項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)、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。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。

### (c) RDO 方法による本発明の細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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、本発明の方法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 項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 項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) 項の (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) 項の (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)]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。

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体を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の、導入した 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) 項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、あるいは、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の產生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

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 方法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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 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、または全長を適當な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

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

導入した 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、あるいは產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、本発明の方法に用いられる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 項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 項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 項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) 項の (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) 項に記載の方法があげられる。產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 6 項また

は後述の 7 項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) 項の (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、本発明の方法に用いられる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、本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク (Nature Genet.), 25, 35 (2000) 等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、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、あるいは產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、本発明の方法に用いられる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ま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 項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 項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) 項の (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) 項に記載の方法があげられる。產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 6 項または後述の 7 項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

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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سفエラーゼ、 $\alpha$ -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 番目のリジン）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 [ストラクチャー (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、例えば、CHO 細胞由来の GMD（配列番号 65）では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリジンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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ドミナントネガティブ体をコードする遺伝子をもとにして、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。

白質の活性、あるいは產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、本発明の方法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 項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 項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 項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) 項の (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) 項に記載の方法があげられる。產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 6 項または後述の 7 項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

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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。 $\alpha$ 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。

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的に生じた突然変異体から、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3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。

自然発的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発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、 $\alpha$ 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測定する方法としては、例えば、前記1の(1)項の(a)に記載の方法があげられる。生産抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の6項または後述の7項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)項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

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、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  $\mu$  g/mL～1mg/mL の濃度の上述のレクチンを含む培地で 1 日～2 週間、好ましくは 1 日～1 週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  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

本発明の方法に用いられる細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素蛋白質および 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、前記 1 項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本発明の方法に用いられる胚性幹細胞を作製することができる。

具体的は、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 (1987)、Cell, 51, 503 (1987) 等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(Blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で 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、インサーション型、ジーントラッ

プ型いざ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ざ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)、パーテイクルガン (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ブテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノブ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-Gly<sup>10</sup>-[D-His(Bz1)<sup>6</sup>]-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、前記 1 項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本発明の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、マニピューレーティング・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、前記 1 項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位あるいは 3 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

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）、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1996（以下、モノクローナル・アンチボディズと略す）、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

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當な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適當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ものであればいずれも用いることができる。

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

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) 項の (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)、YEpl24 (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、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、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poron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)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)]に記載の方法等をあげることができる。

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、pcDNAI、pcDM8 (フナコシ社製)、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 (Nature), 329, 840 (1987)]、pcDNAI/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・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。

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、夜盜蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・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、*Spodopterafrugiperda* 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。

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

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、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、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、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、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、プロパンノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーブリカーカー、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気的条件下で行う。培養温度は 15~40°C 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 の調製は、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-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した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・アソシエイション (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 [ヴィロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199 培地 [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

エニック・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 pH6.0～8.0、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 pH6.0～7.0、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 pH5.0～9.0、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 [プロシードィングス・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、該発現ベクターを発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

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、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、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。該可溶化液を希釀または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等

の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

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 領域の一部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、VH 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 を鑄型として合成した 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・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene 社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング : ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λ 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 [ジェネティックス (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ブラーク・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 ライブラリーを鑄型として、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；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]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斷後、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 シーケンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

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・インタレストと略す] 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

前記 3 の (1) 項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、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、それぞれを前記 3 の (1) 項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 VH および VL 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意性（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、前記 3 の (1) 項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、增幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene

社製) 等のプラスミドにクローニングし、前記 3 の (2) 項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

前記 3 の (1) 項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、前記 3 の (5) 項で構築したヒト型 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、前記 3 の (5) 項でヒト型 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、前記 3 の (1) 項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

前記 3 の (4) 項および (6) 項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表記する）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

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

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

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-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。

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（日本製薬社製）、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）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ー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、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<sup>TM</sup> 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 を鑄型として合成した 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(+) [ヌクレオタノイド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zapII (Stratagene 社製)、λ gt10、λ 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)、λ 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 [ジェネティックス (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 ライブラリーを鑄型として、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 シーケンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

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-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filtration、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ティング法 (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 項に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、抗体組成物を製造することができる。

#### 4. Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性の測定

抗体組成物の Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性は、以下に述べる手法により測定することができる。

##### (1) Fc<sub>γ</sub>RIIIa の調製

Fc<sub>γ</sub>RIIIa としては、ヒトまたは非ヒト動物の末梢血リンパ球の細胞表面に存在する Fc<sub>γ</sub>RIIIa、Fc<sub>γ</sub>RIIIa をコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞へ導入して細胞表面へ発現させた Fc<sub>γ</sub>RIIIa あるいは該細胞から分泌させた Fc<sub>γ</sub>RIIIa などを用いることができる。

以下に Fc<sub>γ</sub>RIIIa をコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞に導入して、宿主細胞上に Fc<sub>γ</sub>RIIIa を発現させる方法および該細胞から Fc<sub>γ</sub>RIIIa を分泌させることにより Fc<sub>γ</sub>RIIIa を取得する方法を述べる。

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。

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)を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。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 Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

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

さらに、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 を調製することができる。

調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全 RNA または mRNA から cDNA ライブラーを作製する。

cDNA ライブラー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー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。

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ヤップ法 [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。

各種 Fc $\gamma$ RIIIa の塩基配列に基づいて、5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鑄型として 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、Fc $\gamma$ R をコードする遺伝子を取得することができる。

取得した遺伝子が Fc $\gamma$ RIIIa 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 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、確認することができる。

上記の方法で得られる Fc $\gamma$ RIIIa をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 27 に記載の Fc $\gamma$ RIIIa の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 Model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、Fc $\gamma$ RIIIa をコードする遺伝子を取得することもできる。

取得した Fc $\gamma$ RIIIa をコードする cDNA を適當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ものであればいずれも用いることができる。

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の組込が可能で、目的とする Fc $\gamma$ RIIIa 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。

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)、YEpl24 (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微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius 等をあげることができる。

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

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 (フナコシ社製)、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・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。

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、夜盜蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodopterafrugiperda* 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)]、*Trichoplusiani* 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等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium) 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、他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

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 Fc $\gamma$ RIIIa を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、Fc $\gamma$ RIIIa 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、酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、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、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、これらを含有する糖蜜、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、プロパンノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーピリカーカー、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気的条件下で行う。培養温度は 15~40°C 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 の調製は、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-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した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・アソシエイション (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 [ヴィロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199 培地 [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 pH 6.0~8.0、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 pH6.0~7.0、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 pH5.0~9.0、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、Fc $\gamma$ RIIIa をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、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、Fc $\gamma$ RIIIa を生成蓄積させ、該培養物より Fc $\gamma$ RIIIa を採取することにより、Fc $\gamma$ RIIIa を製造することができる。

Fc $\gamma$ RIIIa 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。

Fc $\gamma$ RIIIa 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 Fc $\gamma$ RIIIa 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。

Fc $\gamma$ RIIIa 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 [プロシードィングス・オブ・ザ・ナシ

ヨナル・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  $Fc\gamma RIIIa$  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、 $Fc\gamma RIIIa$  をコードする DNA、および  $Fc\gamma RIIIa$  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、該発現ベクターを発現させることにより、目的とする  $Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma R$  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、 $Fc\gamma RIIIa$  を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該  $Fc\gamma RIIIa$  を採取することにより、該  $Fc\gamma RIIIa$  を製造することができる。

動物個体を用いて  $Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma R$  を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、 $Fc\gamma RIIIa$  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、 $Fc\gamma RIIIa$  を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より  $Fc\gamma RIIIa$  を採取することにより、 $Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma RIIIa$  を製造する方法としては、例えば  $Fc\gamma R$  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、 $Fc\gamma RIIIa$  を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該  $Fc\gamma R$  を採取することにより、 $Fc\gamma RIIIa$  を生産する方法があげられる。

$Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma RIIIa$  は、例えば  $Fc\gamma RIIIa$  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、水系緩衝液にけん渦後、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、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、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、アフィニティーコ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、 $Fc\gamma RIIIa$  の精製標品を得ることができる。

また、 $Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma RIIIa$  の不溶体を回収する。回収した  $Fc\gamma RIIIa$  の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釀または透析することにより、該  $Fc\gamma RIIIa$  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  $Fc\gamma RIIIa$  の精製標品を得ることができる。

$Fc\gamma RIIIa$  が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該  $Fc\gamma RIIIa$  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、 $Fc\gamma RIIIa$  の精製標品を得ることができる。

## (2) $Fc\gamma RIIIa$ に対する結合活性の測定

細胞膜上に発現している  $Fc\gamma RIIIa$  に対する抗体組成物の結合活性は、蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] などにより測定することができる。また、前記 4 の (1) 項に記載の方法により調製した精製  $Fc\gamma RIIIa$  に対する結合活性は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシブルズ・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。

EIA 用のプラスティックプレートに  $Fc\gamma RIIIa$  を固定化する。抗体組成物を含む試料反応させる。次に、適当な二次抗体を用いて結合した抗体組成物の量を測定する。

また、精製  $Fc\gamma RIIIa$  に対する結合活性は、バイオセンサー [例えば、BIAcore (BIACORE 社製)] を用いた測定 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 200, 121 (1997)] や Isothermal Titration Calorimetry 法 [プロシードィングス・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.), 97, 9026 (2000)] 等によっても測定できる。

## 5. 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、 $Fc\gamma RIIIa$  との結合活性、エフェクター機能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および  $Fc\gamma RIIIa$  との結合活性は、ELISA 法および蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]、バイオセンサー [例えば、BIAcore (BIACORE 社製)] を用いた測定 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ

(J. Immunol. Methods), 200, 121 (1997)]、Isothermal Titration Calorimetry 法 [プロシードィングス・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.), 97, 9026 (2000)] 等により測定できる。エフェクター機能のうち、例えば、抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

## 6. 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、通常の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 (Agric. Biol. Chem.), 55, 283 (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。

## 7. 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。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を有する抗体組成物は、前記6項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：プリンシブルズ・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。

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)、ヒイロ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。

## 8. 抗体組成物の $Fc\gamma RIIIa$ に対する結合活性を測定する方法

本発明は、抗原と被験抗体組成物とを反応させた後に、抗原と抗体組成物との複合体を  $Fc\gamma RIIIa$  とを接触させることを特徴とする測定方法を用いて、抗体組成物の糖鎖還元末端の 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を検出すること、さらに抗体依存性細胞障害活性を検出することに関する。

以下に、本発明で用いる測定方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体組成物を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒト  $Fc\gamma RIIIa$  を反応させる。

反応させるヒト  $Fc\gamma RIIIa$  に酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノプロッティング法、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、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも含まれるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒト  $Fc\gamma RIIIa$  をコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒト  $Fc\gamma RIIIa$  を取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒト  $Fc\gamma RIIIa$  を用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

本発明の検出法は、抗原と被験抗体組成物とを反応させずに、被験抗体組成物を直接  $Fc\gamma RIIIa$  と接触させて行うこともできる。例えば、タグに対する抗体を固相化し、タグ入りのヒト  $Fc\gamma RIIIa$  と反応させた後に被験抗体組成物を反応させて、ヒト Fc 領域を認識する標識抗体で検出することができる。

抗体組成物の糖鎖還元末端の 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を検出する方法としては、以下の方法で行う。

最初に、ある抗体組成物について糖鎖分析を行い、検量線を引くために必要な数だけ糖鎖還元末端の 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の異なる抗体組成物（スタンダード）を用意する。その際に用いる抗体組成物の濃度は予め一定にする。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定

方法を用いて、Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性をそれぞれ測定し、糖鎖の割合と Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性を測定することにより、サンプルの抗体組成物の糖鎖還元末端の 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を求めることができる。

さらに ADCC 活性を検出するためには、以下の方法で行う。

上述の抗体組成物の糖鎖還元末端の 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を検出する方法で用いた検量線を作成するために用いたスタンダードについて ADCC 活性を測定する。測定方法としては、後述の ADCC 測定方法を用いる。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定方法を用いて、Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性をそれぞれ測定し、ADCC 活性と Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性を測定することにより、ADCC 活性を求めることができる。

## 8. 抗体組成物のスクリーニング方法

本発明は、抗原と被験抗体とを反応させた後に、Fc<sub>γ</sub>RIIIa とを接触させることを特徴とする、Fc<sub>γ</sub>RIIIa に対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングする方法に関する。

以下に、本発明のスクリーニング方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒト Fc<sub>γ</sub>RIIIa を反応させる。

反応させるヒト Fc<sub>γ</sub>RIIIa に酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノプロッティング法、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、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも含まれるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒト Fc $\gamma$ RIIIa をコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒト Fc $\gamma$ RIIIa を取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒト Fc $\gamma$ RIIIa を用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

## 10. 本発明の抗体組成物の利用

本発明のスクリーニング方法で得られた抗体組成物は高い ADCC 活性を有する。高い ADCC 活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウィルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

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

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

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

ウィルスまたは細菌に感染細胞を、高い ADCC 活性を有する抗体を用いてウィルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

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

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 [アンチ・キャンサー・リサーチ (Anticancer Res.), 13, 331 (1993)]、抗 GD3 抗体 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 260 (1993)]、抗 GM2 抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 54, 1511 (1994)]、抗 HER2 抗体 [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), 89, 4285 (1992)]、抗 CD52 抗体 [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), 89, 4285 (1992)]、抗 MAGE 抗体 [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British J. Cancer), 83, 493 (2000)]、抗 HM1.24 抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 36, 387 (1999)]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 [キャンサー (Cancer), 88, 2909 (2000)]、抗塩基性線維芽細胞増殖因子抗体、抗線維芽細胞増殖因子 8 抗体 [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), 86, 9911 (1989)]、抗塩基性纖維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗線維芽細胞増殖因子 8 受容体抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 265, 16455 (1990)]、抗インスリン様増殖因子抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗 PMSA 抗体 [ジャーナル・オブ・ウロロジー (J. Urology), 160, 2396 (1998)]、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 57, 4593 (1997)]、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 [オンコジーン (Oncogene), 19, 2138 (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 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン 6 受容体抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 31, 371 (1994)]、抗インターロイキン 5 抗体 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (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 [サイトカイン (Cytokine), 3, 562

(1991)]、抗インターロイキン 4 受容体抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 217, 41 (1998)]、抗腫瘍壞死因子抗体 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 13, 183 (1994)]、抗腫瘍壞死因子受容体抗体 [モレキュラー・ファーマコロジー (Molecular Pharmacol.), 58, 237 (2000)]、抗 CCR4 抗体 [ネイチャー (Nature), 400, 776, (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 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Exp. Med.), 186, 1373 (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 [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [サイエンス (Science), 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 272, 17400 (1997)]、抗血液凝固因子抗体 [サーキュレーション (Circulation), 101, 1158 (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 gp120 抗体 [ストラクチャー (Structure), 8, 385 (2000)]、抗 CD4 抗体 [ジャーナル・オブ・リューマトロジー (J. Rheumatology), 25, 2065 (1998)]、抗 CCR5 抗体、抗ペロ毒素抗体 [ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー (J. Clin. Microbiol.), 37, 396 (1999)] などがあげられる。

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

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

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ができる。

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

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

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

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。

非経口投与に適当な製剤としては、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  $10 \mu\text{g/kg}$  ~  $20\text{mg/kg}$  である。

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

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

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、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した写真である。第 1A 図が非還元条件、第 1B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った写真である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-GD3 キメラ抗体、3 が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、4 が SP2/0-GD3 キメラ抗体、5 が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、6 が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT)、7 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 2 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 3 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 4 図は、ロット 2 の抗 GD3 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

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が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗

体(45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 6 図は、各ドナーのエフェクター細胞を用いた ADCC 活性の結果である。第 6A 図はドナーA、第 6B 図はドナーB のエフェクター細胞を用いた、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が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 7 図は、ドナーA およびドナーB 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と ADCC 活性とを示した図である。

第 8 図は、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 9 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が異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 10 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、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が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーA のエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 11 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、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が異なる抗 CCR4

キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーB のエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 12 図は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 13 図は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

第 14 図は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 15 図は、プラスミド CHAcd-pBS および YBAcd-pBS の構築を示した図である。

第 16 図は、競合的 PCR 法を用いた各宿主細胞株における  $\alpha$ 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/0 細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第 17 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 18 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 19 図は、精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。27A 図は 5-03 株が生産する抗体、27B 図は CHO/CCR4-LCA 株が生産する抗体、27C 図は CHO/CCR4-AAL 株が生産する抗体、および 27D 図は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の分析結果を示す。

第 20 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 1 の工程を示した図である。

第 21 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 2 の工程を示した図である。

第 22 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 3 の工程を示した図である。

第 23 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 4 の工程を示した図である。

第 24 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 5 の工程を示した図である。

第 25 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 6 の工程を示した図である。

第 26 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示した図である。LCA レクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を 100% とし、2 回測定を行った図である。図中 249 は、発現ベクター pAGE249 を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する生存率を示す。GMD は GMD 発現ベクター pAGE249GMD を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示す。

第 27 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の細胞群が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 28 図は、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 29 図は、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の還元条件下での SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した写真である。レーン 1 が shFc $\gamma$ RIIIa、レーン M が分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 30 図は、各種抗 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、●が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 31 図は、各種抗抗線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%)、●が抗 FGF-8 キメラ抗体 (13%) の活性をそれぞれ示す。

第 32 図は、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。第 32A 図は、縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、■が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、×が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。第 32B 図は、縦軸に結合活性、横軸に還元末端の 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をそれぞれ示した結果である。●が抗体濃度が 40  $\mu$ g/mL、○が抗体濃度が 4  $\mu$ g/mL の活性をそれぞれ示す。

第 33 図は、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (48%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 34 図は、各種抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲が抗 GD3 キメラ抗体 (42%)、●が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 35 図は、FGF-8/Fc 融合蛋白質の KM1334 に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が YB2/0 細胞株、○が CHO/DG44 細胞株を宿主細胞として生産された FGF-8/Fc 融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。

第 36 図は、各種の FGF-8/Fc 融合蛋白質の shFc $\gamma$ RIIIa (V) に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が YB2/0 細胞株、○が CHO/DG44 細胞株を宿主細胞として生産された FGF-8/Fc 融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。

第 37 図は、CHO 細胞由来の GMD cDNA クローン 22-8 の 5' 末端にクローン 34-2 の 5' 末端を導入したプラスミド CHO-GMD の作製工程を示した図である。

第 38 図は、プラスミド pKANTEX1334H およびプラスミド pKANTEX1334 の造成工程を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 の構築

抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 GD3 キメラ抗体と表記する）の L鎖の発現ベクター pChi641LGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 4.03kb の断片と動物細胞用発現ベクター pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる G418 耐性遺伝子およびスプライシングシグナルを含む約 3.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB101 株 (モレキュラー・クローニング第 2 版) を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクター pChi641HGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる H 鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB101 株 (モレキュラー・クローニング第 2 版) を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5 μg を 4×10<sup>6</sup> 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジ

ー (J. Cell. Biol.), 93, 576 (1982)] ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の RPMI1640-FBS(10) [10%牛胎児血清 (以下、FBS と表記する; GIBCO BRL 社製) を含む RPMI1640 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200 μL/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 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子增幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、DHFR の阻害剤であるメソトレキセト (以下、MTX と表記する; SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に 1~2×10<sup>5</sup> 細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL ずつ分注した。5%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、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L、200nmol/L と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローニング) を行った。

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

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 4 μg を 1.6×10<sup>6</sup> 細胞の CHO/DG44 細胞 [プロシーディング・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), 77, 4216 (1980)] へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mL の IMDM-FBS(10)-HT(1) [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 200 μL/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 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子增幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 10nmol/L 含む IMDM-dFBS(10) 培地 [10%透析牛胎児血清 (以下、dFBS と表記する ; GIBCO BRL 社製) を含む IMDM 培地] に 1~2 × 10<sup>5</sup> 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、10nmol/L 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 100nmol/L に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 100nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法によるクローニングを行った。

### (3) マウスマエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5 μg を 4 × 10<sup>6</sup> 細胞のマウスマエローマ NS0 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の EX-CELL302-FBS(10) [10%FBS、2mmol/L L-グルタミン (以下、L-Gln と表記する ; GIBCO BRL 社製) を含む EX-CELL302 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200 μL/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 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 50nmol/L 含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地（10%dFBS、2mmol/L L-Gln を含む EX-CELL302 培地）に  $1\sim2\times10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 2mL 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、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L、200nmol/L と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法によるクローニングを行った。

### 3. 抗体の GD3 に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の GD3 に対する結合活性は以下のようにして測定した。

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

#### 4. 抗 GD3 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

上記実施例 1 の 2 項 (1) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを BSA を 0.2%、MTX を 200nmol/L、トリヨードチロニン（以下、T3 と表記する；SIGMA 社製）を 100nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM 培地に  $3 \times 10^6$  細胞/mL となるように懸濁し、2.0L スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて 50rpm の速度で攪拌培養した。37°C の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、YB2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

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

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

##### (3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

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

また、該形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ（Greiner

社製)に200mLずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A(Bioprocessing社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、NS0-GD3キメラ抗体(GIT)と名付けた。

#### (4) SP2/0細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

特開平5-304989(EP533199)に記載の抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローニング(KM-871(FERM BP-3512))をG418を0.5mg/mL、MTXを200nmol/Lの濃度で含むGIT培地に3×10<sup>5</sup>細胞/mLとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ(Greiner社製)に200mLずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで8日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A(Bioprocessing社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、SP2/0-GD3キメラ抗体と名付けた。

### 5. 精製した抗GD3キメラ抗体の解析

上記実施例1の4項で得られた各種動物細胞で生産、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体の各4μgを公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]に従ってSDS-PAGEし、分子量および精製度を解析した。その結果を第1図に示した。第1図に示したように、精製した各抗GD3キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150キロダルトン(以下、Kdと表記する)の単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖および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, Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ]と一致し、各抗GD3キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

## 実施例 2. 抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

### 1. 抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性 (ELISA 法)

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

### 2. 抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性を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) 培地で培養したヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) 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°C で 1 時間反応させ、細胞を放射性物質標識した。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°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 20:1 となる) 添加した。更に、各種抗 GD3 キメラ抗体を各種濃度で加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  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、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  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  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  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。

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

その結果を第 3 図に示した。第 3 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3 キメラ抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで SP2/0-GD3 キメラ抗体、NS0-GD3 キメラ抗体、CHO-GD3 キメラ抗体の順に高い ADCC 活性を示した。培養に用いた培地の異なる NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) では、それらの ADCC 活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体の Fc 領域の構造の差に起因していることが推測された。

### 実施例 3. 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 GD3 キメラ抗体の活性評価

#### 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 GD3 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 2 項 (1) に記載した方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体を生産する YB2/0 細胞由来の形質転換クローンを複数得た。それぞれの YB2/0 細胞由来の形質転換クローンより精製抗体を調製し、それぞれをロット 1、ロット 2、ロット 3

とした。抗 GD3 キメラ抗体ロット 1、ロット 2、ロット 3 の糖鎖分析を、以下の方  
法に従って行った。

精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー0.5-10K（ミリポア社製）を用いて  
10mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> に溶液を置換した。置換倍率は 80 倍以上になるようになつた。

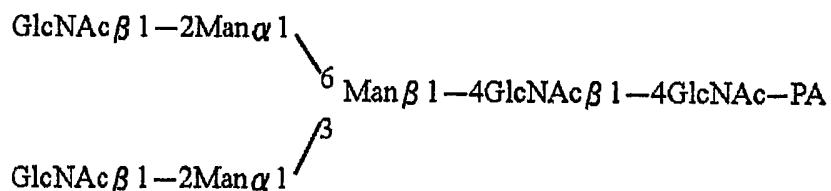
100 μg の抗体をヒドラクラブ S-204 用試験管に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。  
サンプルを乾固後、ホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なつた。  
ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110°C、1 時間反応させた  
[メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263 (1982)]。  
反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。  
ホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250 μL、無水酢酸を 25 μL  
入れてよく攪拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent  
を 250 μL、無水酢酸を 25 μL 加えてよく攪拌させ、室温で 1 時間反応させた。試  
料を-80°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つた [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  
対し塩酸溶液の 760 μL を加え (1×PA 溶液)、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に  
希釈したもの用いた (10 倍希釈 PA 溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液  
は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1×PA 溶液 20 μL、逆浸透精製水  
430 μL を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67 μL 入れて 100°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 μL 入れて 90°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 10mmol/L 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 で行なつた。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、Φ 6.0mm × 150mm) を用いて、精製 PA 化  
糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行つた。カラム温度は 55°C、流速は 1mL/分、蛍光検出  
器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なつた。10mmol/L 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

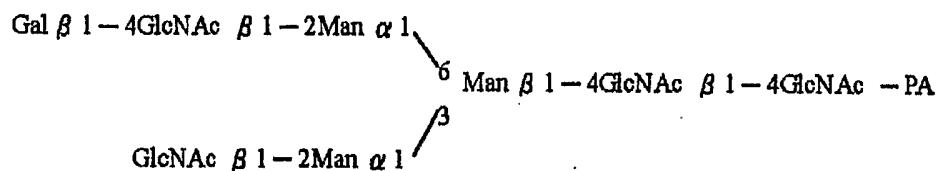
間溶出した。第4図にロット2の抗GD3キメラ抗体の精製PA化糖鎖群の溶離図を示した。各PA化糖鎖の同定は、分取した各PA化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS分析)におけるポストソース分解(Post Source Decay)分析、TaKaRa社製PA化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各PA化糖鎖を消化後、逆相HPLC分析により行なった。

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。なお、図中の(i)～(ix)のピークは、それぞれ以下の糖鎖構造(1)～(9)を示す。

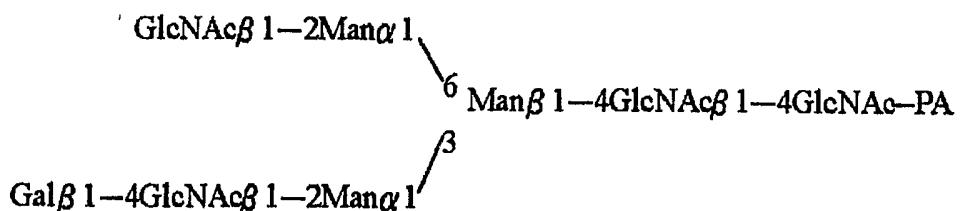
(1)



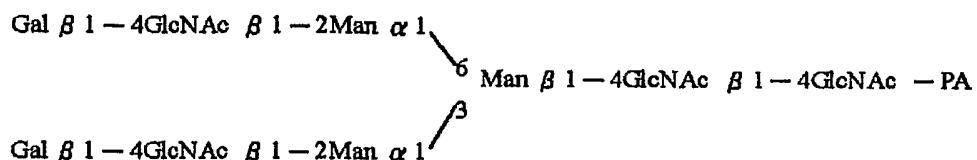
(2)



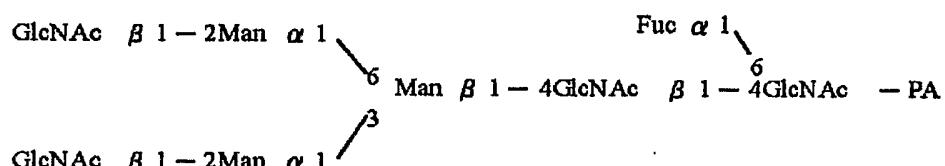
(3)



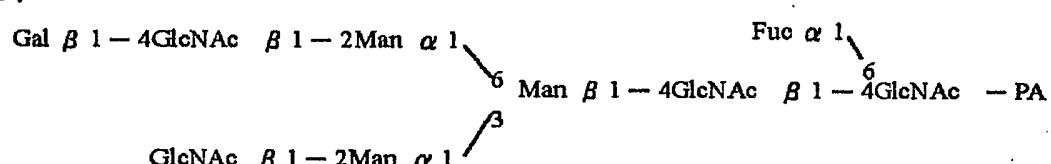
(4)



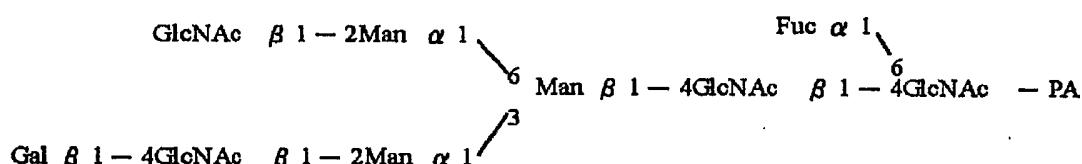
(5)



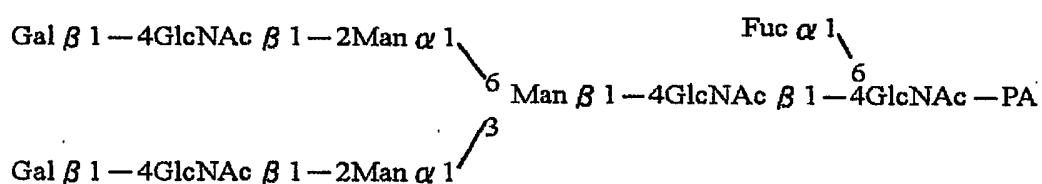
(6)



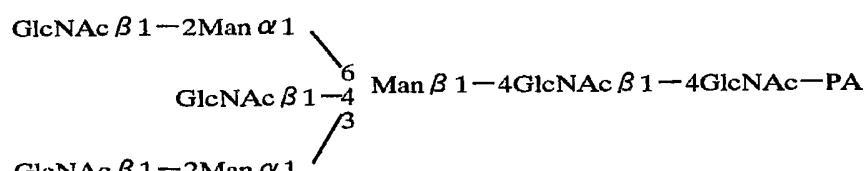
(7)



(8)



(9)



GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。第 4 図において、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  $\alpha$  結合していない群の割合は、(i)～(ix) のうち (i)～(iv) のピークが占める面積、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  $\alpha$  結合した糖鎖群の割合は、(i)～(ix) のうち (v)～(ix) のピークが占める面積から算出した。それぞれの糖鎖群の割合は、2 回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

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、ロット 1、ロット 2、ロット 3、それぞれ 50%、45%、29% であった。以下、これらの試料を、抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、抗 GD3 キメラ抗体 (29%) と表記する。

また、実施例 1 の 2 項 (2) で調製した CHO/DG44 細胞由来の抗 GD3 キメラ抗体の糖鎖分析を上記記載の方法に従って行った結果、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、7% であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (7%) と表記する。

さらに、抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) を用い、抗 GD3 キメラ抗体 (45%):抗 GD3 キメラ抗体 (7%) = 5:3 および 1:7 の割合で混合した。これらの試料を、上記記載の方法に従って糖鎖分析を行った結果、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、24% および 13% であった。これらの試料を以下、抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、抗 GD3 キメラ抗体 (13%) と表記する。

## 2. 抗体の GD3 に対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 3 の 1 項で調製した還元末端の 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の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性は、実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。その結果、第 5 図に示したように、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも同等の GD3 に対する結合活性を示し、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. ヒトメラノーマ細胞株に対する ADCC 活性の評価

実施例 3 の 1 項で調製した還元末端の 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の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) に対する ADCC 活性は、実施例 2 の 2 項に記載の方法に従って測定した。

第 6 図および第 7 図には、2 名の健常人ドナー (A、B) のエフェクター細胞を用いて ADCC 活性を測定した結果をそれぞれ示した。第 6 図および第 7 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性は、いずれの抗体濃度においても還元末端の 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に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。

抗体濃度が  $0.05 \mu\text{g/mL}$  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が 24%、29%、45% および 50% の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、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が 20% 未満の抗体である、13% および 7% では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なつても同様であった。

### 実施例 4. 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 キメラ抗体の活性評価

#### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

WO01/64754 に記載の抗 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

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の  $10 \mu\text{g}$  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  $200 \mu\text{L}$  / ウェルずつ分注した。5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、G418 を  $1\text{mg/mL}$  になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清

を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、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 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に  $1\sim2\times10^5$  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、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nmol/L 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クローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンを KM2760#58-35-16 と名付けた。

## (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 μg を  $1.6\times10^6$  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 (インビトロジエン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジエン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジエン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 100 μL/ウェルずつ分注した。5%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) (dFBS 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、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、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 50nmol/L 含む IMDM-dFBS(10) 培地に  $1\sim2\times10^5$  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

一内で 37°Cで 1~2 週間培養して、50nmol/L 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 200nmol/L に上昇させ、最終的に MTX を 200nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。

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

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 25) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (ナカライトスク社製)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-カルボキシリックアシッド 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 の 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、一晩透析し、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 μm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05 μg/mL、50 μL/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100 μL/ウェルで加え、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 Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50 μL/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(γ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50 μL/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 μL/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を 50 μL/ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。実施例 4 の 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

### 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

実施例 4 の 1 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローニング KM2760#58-35-16 を 200nmol/L MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジョン社製) 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 と名づけた。

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

実施例 4 の 1 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を生産する形質転換細胞株 5-03 株を IMDM-dFBS(10) 培地中で、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 キメラ抗体は KM3060 と名付けた。

KM2760-1 および KM3060 の CCR4 に対する結合活性を実施例 4 の 2 項に記載の ELISA 法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

実施例 4 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4 μg を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量および製精度を解析した。精製した各抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H鎖および 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。

### 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の異なる抗CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 4 の 3 項で調製した 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、実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行なった。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、KM2760-1 は 87%、KM3060 は 8% であった。以下、これらの試料を、抗CCR4 キメラ抗体 (87%)、抗CCR4 キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗CCR4 キメラ抗体 (87%) と抗CCR4 キメラ抗体 (8%) を用い、抗CCR4 キメラ抗体 (87%):抗CCR4 キメラ抗体 (8%) = 1:39、16:67、22:57、32:47、42:37 の割合で混合した。これらの試料を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って糖鎖分析を行なった。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、それぞれ 9%、18%、27%、39%、46% であった。以下、これらの試料を抗CCR4 キメラ抗体 (9%)、抗CCR4 キメラ抗体 (18%)、抗CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗CCR4 キメラ抗体 (46%) と表記する。

第 8 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。

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

実施例 4 の 5 項で調製した還元末端の 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の異なる 6 種類の抗CCR4 キメラ抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性は実施例 4 の 2 項に記載の方法に従って測定した。

その結果、第 9 図に示したように、6 種類の抗CCR4 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、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。

## 7. ヒト CCR4 高発現細胞株に対する ADCC 活性の評価

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト CCR4 高発現細胞に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754 に記載のヒト CCR4 を高発現している CCR4/EL-4 細胞の  $1.5 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 5.55MBq 当量加えて 37°Cで 1 時間 30 分間反応させ、細胞を放射性物質標識した。反応後、培地を用いた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°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、培地を 7.5mL 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

健常人末梢血 60mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を 0.6mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20 分間) して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離 (1400rpm、5 分間) して洗浄後、培地を用いて  $5 \times 10^6$  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。次いで上記 (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる) 添加した。さらに、抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度  $0.0001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  となるように加え、37°Cで 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離

$^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性 (%) は前記式 (1) により求めた。

第 10 図および第 11 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 キメラ抗体の各種濃度 (0.001~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー (A, B) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 10 図および第 11 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性はいずれの抗体濃度においても還元末端の 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に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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が 27%、39% および 46% の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、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が 20% 未満の抗体では、ADCC 活性は低かつた。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

#### 実施例 5. 宿主細胞株における $\alpha$ 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の転写産物の定量

##### 1. 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

dhfr 遺伝子を欠損した CHO/DG44 細胞およびラットミエローマ YB2/0 細胞より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。

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

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

得られた各々の全 RNA  $3 \mu\text{g}$  に対し、SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした  $20 \mu\text{L}$  の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。各宿主細胞由来 FUT8、 $\beta$ -アクチンのクローニングには該反応液の 1 倍濃度液を、競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量には該反応液の 50 倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した。

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

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得は、以下の手順で行った（第 12 図）。

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

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 5 の 1 項で調製した培養 2 日目の CHO/DG44 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA を各々  $1 \mu\text{L}$  を含む  $25 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2 \text{ mmol/L}$  dNTPs、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 4 および配列番号 5）] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR と表記する）を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$ で 1 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$ で 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$ で 30 秒間、 $72^\circ\text{C}$ で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに  $72^\circ\text{C}$ で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的增幅断片 979bp を GENECLEAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて精製し、滅菌水  $10 \mu\text{L}$  で溶出した（以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた）。上記增幅断片  $4 \mu\text{L}$  を、TOP0 TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プ

ラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株をコーベンらの方法 [プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法 [ヌクレオティック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた) 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 がチャイニーズハムスター FUT8 および ラット FUT8 (配列番号 6 および 7 に示す) のオープソリーディングフレーム (以下、ORF と表記する) 部分配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 と称す。

### 3. チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチン cDNA の取得

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの取得は、以下の手順で行った (第 13 図)。

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

次に DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、実施例 5 の 1 項で調製した培養 2 日目の CHO/DG44 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA 1  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2 mmol/L dNTPs、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.4  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 8 および 9、または配列番号 8 および 10)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 4 分間の加熱の後、98°C で 15 秒間、65°C で 2 秒間、74°C で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクルを行った。

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 1128bp を精製した。この DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い 5' 末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 10 μL に溶解した。

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

上記で得たチャイニーズハムスター cDNA 由来増幅断片およびラット cDNA 由来増幅断片 (1192bp) 4 μL、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRV-EcoRV 断片 (約 3.0Kb) 1 μL、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μL を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性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、チャイニーズハムスター β-アクチンおよびラット β-アクチン各 cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHAc-pBS および YBAc-pBS と称す。

#### 4. FUT8 スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内の FUT8 遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。FUT8 定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-

HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切斷し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

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

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールの調製は次のように行った (第 14 図)。DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の 5ng を含む 25 μL の反応液 [1 倍濃度の KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.4 μmol/L 遺伝子特異的プライマー (配列番号 11 および 12)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 4 分間の加熱の後、98°C で 15 秒間、65°C で 2 秒間、74°C で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 4.7Kb を精製した。該 DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い 5' 末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 50 μL に溶解した。上記で得た DNA 断片 (約 4.7Kb) 5 μL および Ligation High (東洋紡績社製) 5 μL を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 DH5α 株を形質転換し、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 DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Perkin Elmer 社製) および BigDye

Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列 ScaI-HindIII 間 203bp が欠失したことを確認した。得られた各プラスミドを CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 と称す。

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

## 5. β-アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の β-アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 3 項で得たチャイニーズハムスター β-アクチンおよびラット β-アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+)に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。β-アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBAc-pBS のうち、チャイニーズハムスター β-アクチンおよびラット β-アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAcd-pBS および YBAcd-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスター β-アクチンおよびラット β-アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS の 2 μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40 μL に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 3 時間消化反応を行つ

た。一方、プラスミド YBAc-pBS の  $2\ \mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\ \mu\text{L}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.2Kb) がプラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $2\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $200\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $100\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $20\text{fg}/\mu\text{L}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードとした。

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った (第 15 図)。CHAc-pBS の  $2\ \mu\text{g}$  を  $100\text{ng}/\mu\text{L}$  BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製)  $100\ \mu\text{L}$  に溶解し、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った後、反応液を 2 等分した。まず一方の反応液には、pH8.0 の  $1\text{mol/L}$  Tris-HCl 緩衝液  $35\ \mu\text{L}$  および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)  $3.5\ \mu\text{L}$  を添加し、 $65^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水  $10\ \mu\text{L}$  に溶解した。残る他方の反応液は 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン ORF 部分断片を含む約 1.1Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化 DraIII-DraIII 断片  $0.5\ \mu\text{L}$ 、約 1.1Kb の DraIII-DraIII 断片  $4.5\ \mu\text{L}$ 、Ligation High (東洋紡績社製)  $5\ \mu\text{L}$  を混合し、 $16^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、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 DNA に対し 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) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したことを確認した。本プラスミドを CHAcd-pBS と称す。

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

次にプラスミド CHAcd-pBS の  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{L}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAcd-pBS  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{L}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン およびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長の内部塩基配列 180bp が欠失した断片を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.0Kb) がプラスミド CHAcd-pBS および YBAcd-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{L}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $200\text{fg}/\mu\text{L}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールとした。

## 6. 競合的 PCR による転写量の定量

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

FUT8 の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 ORF 部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット (配列番号 13 および 14 に示す) を設計した。

次に、実施例 5 の 1 項で得た各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液  $5\mu\text{L}$  および内部コントロール用プラスミド  $5\mu\text{L}$  ( $10\text{fg}$ ) を含む総体積  $20\mu\text{L}$  の反応液

[1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μmol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5%DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°Cで 3 分間の加熱の後、94°Cで 1 分間、60°Cで 1 分間、72°Cで 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

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

β-アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例 5 の 3 項で得たチャイニーズハムスター β-アクチンおよびラット β-アクチン ORF 全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット (前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す) をそれぞれ設計した。

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

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、実施例 5 の 5 項で得た β-アクチントンダードプラスミド 5 μL(10pg、5pg、1pg、500fg、100fg) を添加した系で PCR をそれぞれ行い、β-アクチン転写量の検量線作成に用いた。

第1表

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

\*F : フォワードプライマー、R : リバースプライマー

第1表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第1表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第1表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

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

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

ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を第16図に示した。培養期間を通じてCHO/DG44細胞株はYB2/0細胞株の10倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第2表に $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じてYB2/0細胞株のFUT8転写量が $\beta$ -アクチンの0.1%前後であるのに対し、CHO/DG44細胞株は0.5%～2%であった。

以上の結果より、YB2/0細胞株のFUT8転写産物量はCHO/DG44細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第2表

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

#### 実施例6. 抗GD3キメラ抗体生産細胞株におけるFUT8遺伝子の転写物の定量

##### 1. 各種生産細胞株由来一本鎖cDNAの調製

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

DCHI01-20株を3mmol/L L-Gln(Life Technologies社製)、0.3%PLURONIC F-68(Life Technologies社製)および0.5%脂肪酸濃縮液(Life Technologies社製)を添加したEXCELL302培地(JRH BIOSCIENCES社製)に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mLの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ(Greiner社製)に15mL播種した。また、61-33株を0.2%BSAを添加したHybridoma-SFM培地(Life Technologies社製)に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mLの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ(Greiner社製)に15mL播種した。これらを37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、培養1日目、2日目、3日目、4日目および5日に各宿主細胞 $1 \times 10^7$ 個を回収し、RNAeasy(QIAGEN社製)により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

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

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

## 2. 競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量

実施例 6 の 1 項で得た抗体生産細胞株由来 cDNA に対し、実施例 5 の 6 項に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量を行った。

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

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 5 の 4 項で調製した CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

実施例 6 の 1 項で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液  $5 \mu\text{L}$  および内部コントロール用プラスミド  $5 \mu\text{L}$  (10fg) を含む総体積  $20 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$ で 3 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$ で 1 分間、 $60^\circ\text{C}$ で 1 分間、 $72^\circ\text{C}$ で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

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

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

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 3 項で調製したチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS (+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

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

上記で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μL および内部コントロール用プラスミド 5 μL(1pg) を含む総体積 20 μL の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2 mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L  $\beta$ -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°Cで 3 分間の加熱の後、94°Cで 30 秒間、65°Cで 1 分間、72°Cで 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、 $\beta$ -アクチスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作成に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1 μ g/mL パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 1 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 1 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 1 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

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

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

第 3 表に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0 細胞由来抗体生産株 61-33 株の FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチンの 0.3% 以下であるのに対し、CHO 細胞由来抗体生産株 DCHI01-20 株は 0.7~1.5% であった。この結果より、YB2/0 細胞由来抗体生産株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 3 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

#### 実施例 7. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

##### 1. レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

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 (インビトロジエン社製) にて細胞を洗浄後、PBS で希釈した 0.05% トリプシン (インビトロジエン社製) 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、 $1(10^5 \text{ 細胞}/\text{mL}$  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 ウエルプレート (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 のヒイ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、これら株を解析に用いた。

## 2. 抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞の作製

実施例 7 の 1 項で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、実施例 4 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 による遺伝子增幅を行い、抗 CCR4 キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例 4 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 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

実施例 7 の 2 項で得られた 3 種類の形質転換株を用い、実施例 4 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実施例 4 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、実施例 4 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 4 の 7 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 17 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 4 の 7 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実施例 4 の 1 項で作製した 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 18 図）。

### 4. レクチン耐性 CHO 細胞が生産する抗体の糖鎖分析

実施例 7 の 3 項で精製した抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行った。第 19 図に各種抗 CCR4 キメラ抗体の精製 PA 化糖鎖群の溶離図を示した。

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。

第 4 表

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 8. レクチン耐性 CHO 細胞株の解析

##### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株における GMD 酵素の発現量解析

実施例 7 で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株における、フコース生合成酵素として知られる GMD、GFPP、FX、およびフコース転移酵素である FUT8 の各遺伝子の発現量を、RT-PCR 法を用いて解析した。

###### (1) 各種細胞株からの RNA 調製

CHO/DG44 細胞、実施例 4 の 1 項(2)で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞株 5-03 株、実施例 7 の 2 項で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA 株をそれぞれ 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて継代後 4 日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キヤゲン社製) を用いて、各  $1 \times 10^7$  細胞より添付の使用説明書に従って RNA を調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL 社製) を用い、添付の使用説明書に従って各 RNA 5  $\mu$ g より 20  $\mu$ L の反応液中にて一本鎖 cDNA を合成した。

###### (2) RT-PCR 法を用いた GMD 遺伝子の発現量解析

GMD cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 2 の 1 項で示す CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 32 で示される塩基配列を有する 24mer の合成

DNA プライマーと配列番号 33 で示される塩基配列を有する 26mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μL を鑄型として含む 20 μL の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μmol/L の配列番号 32 と 33 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μL をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 350bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (3) RT-PCR 法を用いた GFPP 遺伝子の発現量解析

GFPP cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 1 の 2 項で取得した CHO 細胞由来 GFPP の cDNA 配列に基づいて、配列番号 34 で示される塩基配列を有する 27mer の合成 DNA プライマーと配列番号 35 で示される塩基配列を有する 23mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μL を鑄型として含む 20 μL の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μmol/L の配列番号 34 と 35 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 24 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μL をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (4) RT-PCR 法を用いた FX 遺伝子の発現量解析

FX cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 1 の 1 項で取得した CHO 細胞由来 FX の cDNA 配列に基づいて、配列番号 36 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーと配列番号 37 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA  $0.5 \mu\text{L}$  を鋳型として含む  $20 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  の配列番号 36 と 37 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$ にて 5 分間加熱した後  $94^\circ\text{C}$ にて 1 分間、 $68^\circ\text{C}$ にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液  $10 \mu\text{L}$  をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 300bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (5) RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA  $0.5 \mu\text{L}$  を鋳型として含む  $20 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  の配列番号 13 と 14 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$ にて 5 分間加熱した後  $94^\circ\text{C}$ にて 1 分間、 $68^\circ\text{C}$ にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液  $10 \mu\text{L}$  をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (6) RT-PCR 法を用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量解析

$\beta$ -アクチン cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA  $0.5 \mu\text{L}$  を鋳型として含む  $20 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  の配列番号 15 と 16 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$ にて 5 分間加熱した後、 $94^\circ\text{C}$ にて 1 分間、 $68^\circ\text{C}$ にて 2 分間のサイクルを 14 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液  $10 \mu\text{L}$  をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 800bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

## (7) 各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 遺伝子の発現量

実施例 8 の 1 項(2)から(6)で測定した各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値を、各細胞株における  $\beta$ -アクチンの cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値で割り、CHO/DG44 細胞における PCR 增幅断片量を 1 とした場合の 5-03 株および CHO/CCR4-LCA 株における各遺伝子の PCR 増幅断片量を求めた。結果を第 5 表に示す。

第 5 表

	GMD	GEPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
CHO/DG44 株 抗 CCR4 抗体生産細胞 5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞	0.160	0.886	0.920	0.875
CHO/CCR4-LCA				

第 5 表で示したように CHO/CCR4-LCA 株の GMD 遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ 1/10 程度に低下していた。なお、本実験は独立して 2 回行い、その平均値を使用した。

## 2. GMD 遺伝子を強制発現させた抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株を用いた解析

## (1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の構築

参考例 2 の 1 項で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 38 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、および配列番号 39 で示される塩基配列を有する 29mer のプライマーを作製した。続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2 mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 38 と 39 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用い

て、94°Cにて5分間加熱した後94°Cにて1分間、58°Cにて1分間、72°Cにて1分間のサイクルを8サイクル反復した後、さらに94°Cにて1分間、68°Cにて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約600bpのDNA断片を回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit(宝酒造社製)を用いてpT7Blue(R)ベクター(Novagen社製)に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミドmt-Cを得た(第20図)。

次に、参考例2の1項で取得したCHO細胞由来GMDのcDNA配列に基づいて、配列番号40で示される塩基配列を有する45merのプライマー、および配列番号41で示される塩基配列を有する31merのプライマーを作製した。続いて、実施例8の1項(1)で作製したCHO細胞由来一本鎖cDNA0.5 $\mu$ Lを鋳型として含む20 $\mu$ Lの反応液[1倍濃度のEX Taq Buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5単位のEX Taq polymerase(宝酒造社製)、0.5 $\mu$ mol/Lの配列番号40と41の合成DNAプライマー]を調製し、DNAサーマルサイクラー480(パーキンエルマー社製)を用いて、94°Cにて5分間加熱した後94°Cにて1分間、57°Cにて1分間、72°Cにて1分間のサイクルを8サイクル反復した後、さらに94°Cにて1分間、68°Cにて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約150pのDNA断片を回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit(宝酒造社製)を用いてpT7Blue(R)ベクター(Novagen社製)に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミドATGを得た(第21図)。

次に、参考例2の1項に記載のプラスミドCHO-GMDの3 $\mu$ gを制限酵素SacI(宝酒造社製)で37°Cにて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で37°Cにて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約900bpのDNA断片を回収した。上記で得られたプラスミドmt-Cの1.4 $\mu$ gを制限酵素SacI(宝酒造社製)で37°Cにて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で37°Cにて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約3.1kbpのDNA断片を回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation kit(宝酒造社製)を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、プラスミドWT-N(-)を得た(第22図)。

次に、プラスミド WT-N(-) の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド pBluescriptSK(-) (Stratagene 社製) の  $3\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3kbp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) in pBS を得た (第 23 図)。

次に、プラスミド WT-N(-) in pBS の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を回収した。上記で得られたプラスミド ATG の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT in pBS を得た (第 24 図)。

次に、プラスミド pAGE249 の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 6.5kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド WT in pBS の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1.2kbp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド pAGE249GMD を得た (第 25 図)。

## (2) CHO/CCR4-LCA 株における GMD 遺伝子の安定発現

制限酵素 FspI (NEW ENGLAND BIOLABS 社製) で切断することにより直鎖状とした CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の  $5 \mu\text{g}$ 、 $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/CCR4-LCA 株へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$  の濃度で含む  $30\text{mL}$  の IMDM-dFBS (10) 培地 [ $10\%$  dFBS を含む IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)] に懸濁し、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$ 、MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地に培地交換してさらに 19 日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニ一群を取得した。

また同様に、pAGE249 ベクターを上記と同じ方法で CHO/CCR4-LCA 株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニ一群を取得した。

## (3) GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の培養および抗体の精製

実施例 8 の 2 項(2)で取得した GMD を発現している形質転換細胞群を MTX (SUGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地を用いて、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、 $25\text{mL}$  の PBS (GIBCO BRL 社製) にて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を  $35\text{mL}$  注入した。 $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗 CCR4 キメラ抗体を回収、精製した。

## (4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

実施例 8 の 2 項(2)で取得した GMD 遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX (SUGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地に  $6 \times 10^4$  細胞/ $\text{mL}$  になるように懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に  $50 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。続いて、このウェルに MTX (SUGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む

IMDM-dFBS(10) 培地に 0mg/mL、0.4mg/mL、1.6mg/mL、4mg/mL の濃度で LCA (LENS CULINARIS AGGLUTININ : Vector Laboratories 社製) を添加した培地を 50 μL ずつ加え、37°Cの 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 96 時間培養した。培養後、WST-1 (ベーリンガー社製) を 10 μL/ウェルになるよう加え、37°Cの 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー (BIORAD 社製) にて 450nm と 595nm の吸光度 (以下 OD450、OD595 と表記する) を測定した。また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して 2 回行なった。

上記で測定した OD450 から OD595 を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCA を加えていないウェルの細胞生存数を 100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を % で表記し第 26 図に示した。第 26 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株では LCA 耐性度の低下が観察され、0.2mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は約 40%、0.8mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は約 20% であった。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株では、0.2mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は 100%、0.8mg/mL の LCA 存在下においても細胞生存率は約 80% であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 LCA に対する耐性を獲得していることが示唆された。

#### (5) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性

実施例 8 の 2 項(3)で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を以下に示す方法に従い、測定した。

##### i) 標的細胞溶液の調製

WO01/64754 に記載の CCR4/EL-4 細胞の 1×10<sup>6</sup> 細胞を調製し、放射性物質である Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> を 3.7MBq 当量加えて 37°Cで 90 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁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°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、2.0×10<sup>5</sup> 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

### ii) エフェクター細胞溶液の調製

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

### iii) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記 i) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで ii) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^6$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体を最終濃度  $0.0025 \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  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  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、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 活性は前記式 (1) により求めた。

ADCC 活性測定の結果を第 27 図に示した。第 27 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、実施例 4 で取得した通常の CHO 細胞由来の生産株が生産した KM3060 と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と同程度の ADCC 活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 ADCC 活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

### (6) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株由来の抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析

実施例 8 の 2 項(3)で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 3 の 1 項に示す方法に従って行ない、その解析結果を第 28 図に示した。実施例 7 で作製した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と比較して、GMD 遺

伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体では、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% に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA 株に GMD 遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の還元末端の 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 5-03 株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

#### 実施例 9. 抗線維芽細胞増殖因子-8 ヒト型キメラ抗体の作製

##### 1. 抗線維芽細胞増殖因子-8 ヒト型キメラ抗体の安定生産細胞の作製

参考例 3 に記載の抗線維芽細胞増殖因子-8（以下、FGF-8 と表記する）ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX1334 を用いて抗 FGF-8 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 FGF-8 キメラ抗体と表記する）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

抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 の  $10 \mu\text{g}$  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 (インビトロジエン社製)] に懸濁し、96 ウエル培養用プレート（住友ベークライト社製）に  $200 \mu\text{L}$  / ウエルずつ分注した。5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、G418 を  $0.5\text{mg}/\text{mL}$  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 FGF-8 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 9 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 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 遺伝子增幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を  $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を  $50\text{nmol}/\text{L}$  含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ $\text{mL}$  になるように懸濁し、24 ウエルプレート (Greiner 社製) に  $1\text{mL}$  ずつ分注した。5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$  で 1~2 週間培養して、 $50\text{nmol}/\text{L}$  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 FGF-8 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 9 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 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 G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 FGF-8 キメラ抗体を高生産する形質転換株 5-D を得た。得られた形質転換株について、限界希釈法によるクローニングを行い、得られた形質転換細胞クローニングを 5-D-10 と名付けた。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

実施例 4 に記載した方法に従い、抗 FGF-8 キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX1334 を CHO/DG44 細胞に導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 FGF-8 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。抗体発現量の測定は実施例 9 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて行いった。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法によるクローニングを行い、得られた形質転換細胞クローニングを 7-D-1-5 と名付けた。

## 2. 抗体の FGF-8 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 FGF-8 キメラ抗体が反応し得るヒト FGF-8 ペプチドとして化合物 2 (配列番号 21) 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 (ナカライトスク社製) 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 液 900 mL に、100mL の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリックアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 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 の 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 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 2 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 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、一晩透析し、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  $\mu$ m フィルターでろ過した後 BSA-化合物 2 液とした。

96 ウェルの ELISA 用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを  $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で分注し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、 $1\%$ BSA-PBS を  $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 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 Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製抗体を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 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 3000 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、 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 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  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で加えて発色させ、10 分後に  $5\%$ SDS 溶液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。

### 3. 抗 FGF-8 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

実施例 9 の 1 項 (1) で得られた抗 FGF-8 キメラ抗体を発現する形質転換株 5-D を  $200\text{nmol/L}$  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) 培地中で、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ にて培養した。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) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 FGF-8 キメラ抗体を精製した。精製した抗 FGF-8 キメラ抗体を YB2/0-FGF8 キメラ抗体と名付けた。

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

実施例 9 の 1 項 (2) で得られた抗 FGF-8 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-D-1-5 を IMDM-dFBS (10) 培地中で、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 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、 $25\text{mL}$  の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を  $35\text{mL}$  注入した。 $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 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 FGF-8 キメラ抗体を精製した。精製した抗 FGF-8 キメラ抗体は CHO-FGF8 キメラ抗体と名付けた。

YB2/0-FGF8 キメラ抗体および CHO-FGF8 キメラ抗体の FGF-8 に対する結合活性を実施例 9 の 2 項に記載の ELISA 法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 FGF-8 キメラ抗体の解析

実施例 9 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 FGF-8 キメラ抗体の各  $4\mu\text{g}$  を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量および製精度を解析した。精製した各抗 FGF-8 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 FGF-8 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。

#### 5. 精製した抗 FGF-8 キメラ抗体の糖鎖分析

実施例 9 の 4 項で調製した YB2/0 細胞由来の抗 FGF-8 キメラ抗体である YB2/0-FGF8 キメラ抗体と CHO/DG44 細胞由来の抗 FGF-8 キメラ抗体である CHO-FGF8 キメラ抗体の糖鎖分析を、実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行なった。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、YB2/0-FGF8 キメラ抗体は 58%、CHO-FGF8 キメラ抗体は 13% であった。以下、これらの試料を、抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%)、抗 FGF-8 キメラ抗体 (13%) と表記する。

### 実施例 10. 可溶性ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質の作製

#### 1. 可溶性ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質の発現ベクターの構築

##### (1) ヒト末梢血单核球 cDNA の作製

健常人の静脈血 30mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mL を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30mL と混合した。混

合後、各 10mL をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4mL 上に穩やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて混合し、RPMI1640-FBS(10) 30mL に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20mL に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて  $2 \times 10^6$  個/mL の末梢血単核球懸濁液を調製した。

上記のようにして調製した末梢血単核球懸濁液の 5mL を室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、5mL の PBS に懸濁した。室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、全 RNA を抽出した。

得られた全 RNA  $2 \mu\text{g}$  に対し、SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした  $40 \mu\text{L}$  の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

## (2) ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質をコードする cDNA の取得

ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質（以下、hFc $\gamma$ RIIIa と表記する）の cDNA の取得は、以下のようにして行った。

まず、hFc $\gamma$ RIIIa の cDNA の塩基配列 [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 170, 481 (1989)] より、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 22 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 26 に示す）を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 10 の 1 項 (1) で調製したヒト末梢血単核球由来の cDNA 溶液の 20 倍希釈液  $5 \mu\text{L}$  を含む  $50 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $1 \mu\text{mol/L}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 22 および 26）] を調製し、PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$ で 30 秒間、 $56^\circ\text{C}$ で 30 秒間、 $72^\circ\text{C}$ で 60 秒間からなる反応を 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  $20 \mu\text{L}$  に溶解した。制限酵素 EcoRI (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、特異的增幅断片約 800bp を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) 2.5 μg (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI (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 2.9 kbp の断片を回収した。

上記で得たヒト末梢血単核球 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 pBSFc $\gamma$ RIIIa5-3 と称す。

決定した hFc $\gamma$ RIIIa の全長 cDNA 配列を配列番号 27、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 28 に示す。

### (3) 可溶性 hFc $\gamma$ RIIIa をコードする cDNA の取得

hFc $\gamma$ RIIIa の細胞外領域 (配列番号 28 の 1~193 番目) と C 末端に His-tag 配列を持つ可溶性 hFc $\gamma$ RIIIa (以下、shFc $\gamma$ RIIIa) をコードする cDNA は、以下のようにして構築した。

まず、hFc $\gamma$ RIIIa の cDNA の塩基配列 (配列番号 27) より、細胞外領域に特異的なプライマー FcgR3-1 (配列番号 29 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 10 の 1 項 (2) で作製したプラスミド pBSFc $\gamma$ RIIIa5-3 を 5ng を含む 50 μL の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2 mmol/L dNTPs、1 μmol/L プライマー FcgR3-1、1 μmol/L プライマー M13M4 (宝酒造社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 30 秒間、56°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間からなる反応を 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 μL 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、特異的增幅断片約110bpを回収した。

一方、プラスミド pBSFc  $\gamma$  RIIIa5-3 2.5  $\mu$ g 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3.5kbpの断片を回収した。

上記で得た hFc  $\gamma$  RIIIa cDNA 由来增幅断片とプラスミド pBSFc  $\gamma$  RIIIa5-3 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、目的の shFc  $\gamma$  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 pBSFc  $\gamma$  RIIIa+His3 と称す。

決定した shFc  $\gamma$  RIIIa の全長 cDNA 配列を配列番号 30、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 31 に示す。

#### (4) shFc $\gamma$ RIIIa の発現ベクターの構築

shFc  $\gamma$  RIIIa の発現ベクターは、以下のようにして構築した。

実施例 10 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pBSFc  $\gamma$  RIIIa+His3 3.0  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI (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 620bp の断片を回収した。

一方、W097/10354 に記載のプラスミド pKANTEX93 2.0  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI (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 10.7kbp 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 shFc  $\gamma$  RIIIa 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、pKANTEXFc  $\gamma$  RIIIa-His と称す。

## 2. shFc $\gamma$ RIIIa の安定生産細胞の作製

実施例 10 の 1 項で構築した shFc  $\gamma$  RIIIa の発現ベクター pKANTEXFc  $\gamma$  RIIIa-His をラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー (J. Cell. Biol.), 93, 576 (1982)] に導入し、shFc  $\gamma$  RIIIa の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

制限酵素 AatII で消化し、線状化した pKANTEXFc  $\gamma$  RIIIa-His の  $10 \mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のヘ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(10) [10%FBS を含む Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 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  $200 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。 $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、G418 を  $1.0\text{mg/mL}$  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 shFc  $\gamma$  RIIIa の発現量を実施例 10 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に shFc  $\gamma$  RIIIa の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子增幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を  $1.0\text{mg/mL}$ 、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を  $50\text{nmol/L}$  含む Hybridoma-SFM-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。 $5\% \text{CO}_2$  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。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の shFc  $\gamma$  RIIIa の発現量を実施例 10 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に shFc  $\gamma$  RIIIa 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  $100\text{nmol/L}$ 、 $200\text{nmol/L}$  と順次上昇させ、最終的に G418 を  $1.0\text{mg/mL}$ 、MTX を  $200\text{nmol/L}$  の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、shFc  $\gamma$  RIIIa を高生産する形質転換

株を得た。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ニングを行った。このようにして得られた形質転換株を KC1107 株と名付けた。

### 3. shFc $\gamma$ RIIIa の検出 (ELISA 法)

培養上清中あるいは精製した shFc $\gamma$ RIIIa の検出、定量は、以下に示す ELISA 法により行った。

His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を PBS を用いて 5  $\mu$ g/mL に調製した溶液を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) に 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°C、12 時間以上反応させた。反応後、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。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製した shFc $\gamma$ RIIIa の各種希釈溶液を 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 50 倍に希釈したビオチン標識マウス抗ヒト CD16 抗体溶液 (PharMingen 社製) を 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、1%BSA-PBS で 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識 Avidin D 溶液 (Vector 社製) を 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、OD415 を測定した。

### 4. shFc $\gamma$ RIIIa の精製

実施例 10 の 2 項で得られた shFc $\gamma$ RIIIa を生産する形質転換細胞クローニング KC1107 を G418 を 1.0mg/mL、MTX を 200nmol/L で含む Hybridoma-SFM-GF (5) [5% Daigo's GF21 (和光純薬社製) を含む Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製)] に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、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 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Ni-NTA agarose (QIAGEN 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、shFc $\gamma$ RIIIa を精製した。

### 5. 精製した shFc $\gamma$ RIIIa の解析

実施例 10 の 4 項で得られた精製 shFc $\gamma$ RIIIa の濃度は、以下のようにしてアミノ酸組成分析を行い、算出した。精製 shFc $\gamma$ RIIIa の一部を 6mol/L 塩酸、1% フェノール溶液に懸濁し、110°C で 20 時間、気相中で加水分解を行った。加水分解

には、Waters 社製ワークステーションを使用した。加水分解後のアミノ酸を Bidlingmeyer らの方法 [ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J. Chromatogr.), 336, 93 (1984)]に従い、PTC-アミノ酸誘導体として、PicoTag アミノ酸分析装置 (Waters 社製) を用いて分析した。

次に、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の約  $0.5\mu\text{g}$  を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, (1970)]に従って還元条件下での SDS-PAGE を行い、分子量および精製度を解析した。その結果を第 29 図に示した。第 29 図に示したように、精製した shFc $\gamma$ RIIIa は、分子量 36~38Kd のブロードなバンドが検出された。hFc $\gamma$ RIIIa の細胞外領域には、5箇所の N-グリコシド型の糖鎖結合可能部位が存在していることが知られており [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 170, 481 (1989)]、精製した shFc $\gamma$ RIIIa のブロードな分子量の分布は、糖鎖付加の不均一性に起因すると考えられた。一方、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (島津製作所製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、shFc $\gamma$ RIIIa の cDNA より予想される配列が得られたことより、目的の shFc $\gamma$ RIIIa が精製できたことが確認された。

#### 実施例 11. 各種キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

##### 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 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 3 の 1 項に記載の還元末端の 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の異なる 2 種類の抗 GD3 キメラ抗体である抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 1 の 3 項に記載の方法に従い、96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナ一社製) に、100pmol/well で GD3 を固定化した。1% BSA-PBS を  $100\mu\text{L}$ /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 Tween-PBS で洗浄後、各種抗 GD3 キメラ抗体の 1% BSA-PBS による希釈溶液を  $50\mu\text{L}$ /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  $2.3\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した shFc $\gamma$ RIIIa 溶液を  $50\mu\text{L}$ /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、His-tag に対するマ

ウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて 1  $\mu$  g/mL に調製した溶液を 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、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を 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、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 GD3 キメラ抗体を添加し、実施例 1 の 3 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 GD3 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 30 図に、各種抗 GD3 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 30 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、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 GD3 キメラ抗体 (45%) の方が 10 倍以上高かった。

## 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の異なる抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 9 の 5 項に記載の還元末端の 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の異なる 2 種類の抗 FGF-8 キメラ抗体である抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%) と抗 FGF-8 キメラ抗体 (13%) の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 9 の 2 項で調製したヒト FGF-8 ペプチドコンジュゲートを 96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、1.0  $\mu$  g/mL で 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%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 Tween-PBS で洗浄後、各種抗 FGF-8 キメラ抗体の 1%BSA-PBS による希釈溶液を 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、His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて 1  $\mu$  g/mL に調製した溶液を 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、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を 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、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 FGF-8 キメラ抗体を添加し、実施例 9 の 2 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 FGF-8 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 31 図に、各種抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 31 図に示したように、抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、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 FGF-8 キメラ抗体 (58%) の方が 100 倍以上高かった。

### 3. 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 shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 4 の 5 項で調製した還元末端の 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の異なる 7 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 4 の 2 項で調製したヒト CCR4 細胞外領域ペプチドコンジュゲートを 96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、1.0  $\mu$ g/mL で 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%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 Tween-PBS で洗浄後、各種抗 CCR4 キメラ抗体の 1%BSA-PBS による希釈溶液を 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 3.0  $\mu$ g/mL に希釈した shFc  $\gamma$  RIIIa 溶液を 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、His-tag に対するマウス抗体 Tetra·His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて 1  $\mu$ g/mL に調製した溶液を 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、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を 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、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 CCR4 キメラ抗体を添加し、実施例 4 の 2 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 CCR4 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 32A 図に、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 32A 図に示し

たように、抗 CCR4 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、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に比例して上昇した。第 32B 図に、抗体濃度が 4  $\mu$ g/mL および 40  $\mu$ g/mL における還元末端の 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（横軸）と shFc $\gamma$ RIIIa 結合活性（縦軸）との関係をプロットした図を示した。第 32B 図に示したように、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% 未満の抗体である、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (18%) では、shFc $\gamma$ RIIIa 結合活性は、ほとんど検出されなかつた。

以上の結果は、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を持つ抗体は、 $\alpha$  1, 6-フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも、高い Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性を有することを明確に示したものである。そして、実施例 3 および 4 に示したように、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を持つ抗体は、 $\alpha$  1, 6-フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも高い ADCC 活性を示したことから、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を持つ抗体の高い ADCC 活性は、高い Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性に起因することが強く示唆された。また、第 32B 図に示すように Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性と還元末端の 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との間には比例関係があるので、このような検量線を予め作成しておくことにより、Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性を測定することにより抗体組成物の還元末端の 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を定量することができる。この方法により、抗体組成物の有する細胞障害活性の測定をすることなく、簡便に細胞障害活性の予測を行うことができる。

#### 実施例 12. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞が生産する抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 7 の 3 項で精製したレクチン耐性 CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体[以下、抗 CCR4 キメラ抗体 (48%) と表記する]、実施例 4 の 3 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1[抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)]および CHO/DG44 細胞由来の生産株 5-03 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060[抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)]の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を

実施例 11 の 3 項に記載の方法に従って測定した。その結果、第 33 図に示したように、レクチン耐性 CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (48%) は、5-03 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と比較して 100 倍以上高い shFc $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を示した。また、その活性は、YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) の約 1/3 であった。

以上の結果は、レクチン耐性 CHO/DG44 細胞を用いることにより、親株細胞である CHO/DG44 細胞を用いるよりも、100 倍以上 Fc $\gamma$  RIIIa に対する結合活性の高い抗体を作製することが可能であることを明確に示すものである。

### 実施例 13. shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を指標とした高い ADCC 活性を有する抗体組成物のスクリーニング法

実施例 7 の 1 項で得られた LCA 耐性株 CHO-LCA 株に、実施例 1 の 2 項 (2) に記載の方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体発現プラスミド pCHi641LHGM4 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換株を作製した。

得られた形質転換株を用いて限界希釈法によるクローニングを行い、複数個のクローンを得た。各クローンを培養し、コンフルエントになった時点で培養液を回収し、培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の濃度が 1  $\mu$ g/mL となるように希釈し、該希釈抗体溶液を用いて実施例 11 の 1 項に記載の ELISA 法により、shFc $\gamma$  RIIIa 結合活性を測定した。同時に、実施例 1 の 4 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体および CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体を 1  $\mu$ g/mL に希釈した溶液を調製し、それらの shFc $\gamma$  RIIIa 結合活性も測定した。

測定結果に基づき、CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体の結合活性以上で、かつ YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体の結合活性以下の活性を示す抗体を生産する形質転換細胞クローニングを選択した。

選択した形質転換細胞クローニングを実施例 1 の 4 項 (2) に記載の方法に従って培養し、培養上清より精製抗体を取得した。精製抗体の单糖組成分析を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行った結果、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 42% であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (42%) と表記する。精製した抗 GD3 キメラ抗体 (42%) の抗原結合活性は実施例 1 の 3 項に記載した ELISA 法を用いて評価した結果、実

施例 1 の 4 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体および CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体と同等であった。さらに、実施例 2 の 2 項に記載した方法に従って各抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した。比較のために、CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体で、単糖組成分析の結果、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が 12% の試料[以下、抗 GD3 キメラ抗体 (12%) と表記する]の ADCC 活性を測定した。その結果を第 34 図に示した。CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体 (12%) と比較して、shFc  $\gamma$  RIIIa に対する高い結合活性を指標に選択した生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体 (42%) では、約 30 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。

以上の結果から、shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングすることで、高い ADCC 活性を有する抗体組成物をスクリーニングできることが明らかとなった。

#### 実施例 14. FGF-8b/Fc 融合蛋白質の作製

##### 1. FGF-8b/Fc 融合タンパクの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)) を制限酵素 ApaI と BamHI で切断して QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて約 1.0 kbp のヒト IgG1 サブクラス CH (hC  $\gamma$  1) を含む断片を得た。プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切断して約 2.9 kbp の断片を得た。これらの断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 の solution I (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡社製) を形質転換してプラスミド phC  $\gamma$  1/SK (-) を構築した。

hC  $\gamma$  1 と FGF8 の cDNA を連結するために配列番号 86 で示した塩基配列を有する合成 DNA を設計した。この合成 DNA は 5' 末端に pBluescript II SK(-) ヘクローニングするための複数の制限酵素認識配列を含んでおり、DNA の合成はプロリゴ社に委託した。TaKaRa Ex Taq 添付 EX Taq Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) (宝酒造社製) を 1 倍濃度で含む 50  $\mu$ L の溶液中にプラスミド phC  $\gamma$  1/SK (-) を 1ng、0.25mM dNTPs、0.5  $\mu$  mol/L の配列番号 86 に示した塩基配列を有する合成 DNA、0.5  $\mu$  M の M13 primer RV、1.25Unit の TaKaRa Ex Taq を含むように添加し、DNA サーマルサイクライ GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°Cにて 30 秒間、56°Cにて 30 秒間、72°Cにて 1 分間のサイクルを 35 サイクル行った。該反応液全

量を QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて PCR 増幅断片を精製した。精製断片を制限酵素 KpnI と BamHI で切斷し、約 0.75 kbp の断片を得た。また、プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切斷して約 2.9 kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド p $\Delta$ hC $\gamma$  1/SK(-) を構築した。

FGF-8b 遺伝子がクローニングされているプラスミド pSC17 (Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 8928 (1992)) を鋳型として、下記のように PCR を行い FGF-8b の構造遺伝子領域断片を得た。TaKaRa Ex Taq 添付 EX Taq Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) (宝酒造社製) を 1 倍濃度で含む 50  $\mu$ L の溶液中にプラスミド pSC17 を 1ng、0.25 mM dNTPs、10  $\mu$ mol/L の配列番号 87、88 に示した塩基配列を有する合成 DNA、2.5 Unit の TaKaRa Ex Taq を含むように添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°Cにて 1 分間、55°Cにて 1 分間、72°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行い、さらに 72°C 10 分間反応させた。該反応液全量から PCR 増幅断片を精製し、精製断片を制限酵素 EcoRI と BamHI で切斷し、約 0.66 kbp の断片を得た。また、プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切斷して約 2.9 kbp の断片を得た。これらの断片を T4 DNA Ligase (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド pFGF-8b/SK(-) を構築した。

次に、プラスミド p $\Delta$ hC $\gamma$  1/SK(-) を制限酵素 ApaI と EcoRI で切斷し、約 3.7 kbp の断片を得た。また、プラスミド pFGF-8b/SK(-) も同様の制限酵素で切斷し、約 0.6 kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド pFGF8b+hIgG/SK(-) を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pFGF8b+hIgG/SK(-) を制限酵素 EcoRI と BamHI で切斷し、約 1.34 kbp の断片を得た。また pKANTEX93 も同様の制限酵素で処理し、約 8.8 kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換して配列番号 89 に示される FGF8b-Fc 融合蛋白質の cDNA を含む動物細胞用発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc を構築した。

## 2. FGF-8b/Fc 融合タンパクの動物細胞を用いた安定発現

上記実施例 14 の 1 項で構築した FGF8-Fc 融合蛋白質の動物細胞用発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc を各種細胞に導入し、優良株を選択することで FGF8-Fc 融合蛋白質の安定発現株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

FGF8-Fc 融合蛋白質発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc の  $10 \mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法により導入後、20~40mL の RPMI1640-FBS(10) に懸濁し、96 ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に  $200 \mu\text{L}$ /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、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の抗 FGF-8 抗体への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。抗 FGF-8 抗体としては、KM1334 (USP5952472) を用いた。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の產生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融合蛋白質の產生量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に拡大培養した。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、50nmol/L 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 FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の產生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 G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、FGF8-Fc 融合蛋白質を高生産する形質転換株 KC1178 を得た。KC1178 は、WO 00/61739 の実施例 8 に示された FUT8 遺伝子の転写物の定量法を用いて該転写物の量が比較的低い株であり、レクチン耐性であった。なお、KC1178 は、平成 15 年 4 月 1 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（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-8350 として寄託されている。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

FGF8-Fc 融合蛋白質発現ベクターpKANTEX/FGF8Fc の  $10 \mu\text{g}$  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により導入後、30mL の IMDM-dFBS(10)-HT(1) 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  $100 \mu\text{L}$ /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) 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、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 FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF8-Fc 融合蛋白質の產生が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子增幅系を利用して抗体產生量を増加させる目的で、MTX(SIGMA 社製)を 50nmol/L 含む IMDM-dFBS(10) 培地に懸濁し、24 ウェルプレート(Greiner 社製)に拡大培養した。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、50nmol/L 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培養上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF8-Fc 融合蛋白質の產生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、MTX を 500nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、FGF8-Fc 融合蛋白質を高生産する形質転換株 KC1179 を得た。なお、KC1179 は、平成 15 年 4 月 1 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 中央第 6）に FERM BP-8351 として寄託されている。

## 3. FGF8-Fc 融合蛋白質の精製

上記実施例 14 の 2 項で作製した FGF8-Fc 融合蛋白質の生産細胞を適当な培地(YB2/0 細胞由来の細胞は 5% GF21(和光純薬製))、0.5mg/mL G418、200nmol/L MTX を含む H-SFM、CHO/DG44 細胞由来の細胞は MTX を 500nmol/L を含む EXCELL301 培地 (JRH 社製) を用いて 100~200mL のスケールで培養した。培養上清より Prosep G (ミリポア社製) カラムを使用説明書に従い、用いて FGF8-Fc 融合蛋白質を精製した。精製蛋白質の推定アミノ酸配列を配列番号 90 に示した。

#### 4. 抗 FGF-8 抗体に対する結合活性

実施例 14 の 2 項に記載の YB2/0 產生の FGF-8/Fc 融合蛋白質と、CHO 產生の FGF-8/Fc 融合蛋白質の KM1334 に対する結合活性を以下の様にして ELISA 法を用いて測定した。96 ウェルの ELISA 用プレート (Greiner 社製) に、KM1334 を  $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で分注し、 $4^\circ\text{C}$  で 1 晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、 $1\%\text{BSA-PBS}$  を  $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 1 時間反応させて活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製蛋白質を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、 $1\%\text{BSA-PBS}$  で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ )抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、ABTS 基質液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加えて反応させ、充分な発色後に  $5\%\text{SDS}$  溶液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  加えて反応を停止した。その後測定波長  $415\text{nm}$ 、参照波長  $490\text{nm}$  にて吸光度を測定した。第 35 図に示したように、実施例 14 の 2 項で得られた FGF-8/Fc 融合蛋白質は、KM1334 に対する結合活性を示した。

#### 5. Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性

実施例 14 の 2 項に記載の YB2/0 產生の FGF-8/Fc 融合蛋白質と、CHO 由来の FGF-8/Fc 融合蛋白質の Fc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を以下の様にして ELISA 法を用いて測定した。

96 ウェルの ELISA 用プレート (Greiner 社製) に、His-tag に対するマウス抗体 Tetra•His Antibody (QIAGEN 社製) を  $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$  で分注し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、 $1\%\text{BSA-PBS}$  を  $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  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 Tween-PBS で洗浄後、 $1\%\text{BSA-PBS}$  で  $5 \mu\text{g/mL}$  に希釈した shFc  $\gamma$  RIIIa(V) 溶液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、精製 FGF-8/Fc 融合蛋白質を  $1\%\text{BSA-PBS}$  で各濃度に希釈した溶液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、 $1\%\text{BSA-PBS}$  で  $1 \mu\text{g/mL}$  に希釈したビオチン化 KM1334 をそれぞれ  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識 Avidin-D (Vector 社製) を  $1\%\text{BSA-PBS}$  で 4000 倍に希釈した溶液を  $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$  で加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄し、

ABTS 基質液を 50 μL/ウェルで加えて発色させ、15 分後に 5%SDS 溶液を 50 μL/ウェル加えて反応を停止した。その後測定波長 415nm、参照波長 490nm にて吸光度を測定した。

第 36 図には、各種の FGF-8/Fc 融合蛋白質の shFc γ RIIIa (V)に対する結合活性を測定した結果を示した。第 36 図に示したように、YB2/0 產生の FGF-8/Fc 融合蛋白質は CHO/DG44 細胞が產生する FGF-8/Fc 融合蛋白質よりも高い shFc γ RIIIa(V)に対する結合活性を有していた。

#### 参考例 1. CHO 細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

##### 1. CHO 細胞の FX cDNA 配列の決定

###### (1) CHO/DG44 細胞由来全 RNA の抽出

CHO/DG44 細胞を 10%FBS (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 2 日目に  $1 \times 10^7$  個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

###### (2) CHO/DG44 細胞由来一本鎖 cDNA の調製

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

得られた各々の全 RNA 3 μL に対し SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20 μL の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。GFPP および FX のクローニングには該反応液の 50 倍希釈水溶液を使用した。使用するまで -80°C で保管した。

###### (3) チャイニーズハムスター FX の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスター FX の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒト FX の cDNA (Genebank 登録番号 U58766) およびマウスの cDNA (Genebank 登録番号 M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 42 および配列番号 43 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(2)で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 42 および配列番号 43)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°Cで 5 分間の加熱の後、94°Cで 1 分、58°Cで 2 分間、72°Cで 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°Cで 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的增幅断片 301bp を QiaexII Gel Extraction kit (キヤゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ L で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記增幅断片 4  $\mu$ L を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、得られたカナマイシン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。その結果、FX cDNA 部分断片が組み込まれた 2 クローンを得た。各々 pCRFX クローン 8、pCRFX クローン 12 と称す。

FX クローン 8、FX クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Perkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの FX の ORF 部分配列をコードすることを確認した。

#### (4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

参考例 1 の 1 項(1)で抽出した CHO/DG44 細胞全 RNA からの 5' および 3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただし PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の錆型として用いた。

## (5) RACE 法によるチャイニーズハムスターFX 全長 cDNA の決定

参考例 1 の 1 項(3)項で決定したチャイニーズハムスターFX の部分配列をもとにチャイニーズハムスターFX に特異的な 5' RACE 用プライマー FXGSP1-1 (配列番号 44) および FXGSP1-2 (配列番号 45)、チャイニーズハムスターFX 特異的な 3' RACE 用プライマー FXGSP2-1 (配列番号 46) および FXGSP2-2 (配列番号 47) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(4)で調製した CHO/DG44 細胞由来 RACE 用一本鎖 cDNA を 1 μL を含む 50 μL の反応液 [1 倍濃度の Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.2 μmol/L チャイニーズハムスターFX 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°C で 5 秒間、68°C で 10 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1 μL をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1 μL をテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 6 表に示した。

第 6 表  
チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCR に用いた  
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Universal primer)	300bp

3' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Universal primer)	1100bp

PCR 後、反応液を 1% アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水 20 μL で溶出した。上記増幅断片 4 μL を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターFX の 5' 領域を含む cDNA5 クロー

ンを得た。各々を FX5' クローン 25、FX5' クローン 26、FX5' クローン 27、FX5' クローン 28、FX5' クローン 31、FX5' クローン 32 と称す。

同様にチャイニーズハムスターFX の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々 FX3' を FX3' クローン 1、FX3' クローン 3、FX3' クローン 6、FX3' クローン 8、FX3' クローン 9 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFXcDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列を配列番号 48 に示す。

## 2. CHO 細胞の GFPP cDNA 配列の決定

### (1) チャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片を取得した。まず公的データベースに登録されているヒト GFPP の cDNA (Genebank 登録番号 AF017445)、該配列と相同性の高いマウス EST 配列 (Genebank 登録番号 AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、および Rat EST 配列 (Genebank 登録番号 BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3 種間で保存性の高い領域にラット GFPP に特異的なプライマー GFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(2)で調製した CHO/DG44 細胞由来一本鎖 cDNA を 1 μL を含む 25 μL の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2 mmol/L dNTPs、0.5 μmol/L 上記 GFPP 特異的プライマー GFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°C で 5 分間の加熱の後、94°C で 1 分、58°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的增幅断片 1.4Kbp を回収し、滅菌水 20 μL で溶出した。上記增幅断片 4 μL を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプ

ラスミド DNA を単離し、GFPP cDNA 部分断片が組み込まれた 3 クローンを得た。各々 GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 と称す。

GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Perkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの GFPP の ORF の部分配列をコードすることを確認した。

## (2) RACE 法によるチャイニーズハムスター GFPP 全長 cDNA の決定

参考例 1 の 2 項(1)で決定したチャイニーズハムスター FX の部分配列をもとにチャイニーズハムスター FX に特異的な 5' RACE 用プライマー GFPP GSP1-1 (配列番号 52) および GFPP GSP1-2 (配列番号 53)、チャイニーズハムスター GFPP 特異的な 3' RACE 用プライマー GFPP GSP2-1 (配列番号 54) および GFPP GSP2-2 (配列番号 55) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(4)で調製した CHO/DG44 細胞由来 RACE 用一本鎖 cDNA 1 μL を含む 50 μL の反応液 [1 倍濃度の Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2 mmol/L dNTPs、0.2 μmol/L チャイニーズハムスター GFPP 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°C で 5 秒間、68°C で 10 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1 μL をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1 μL をテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 7 表に示した。

第7表  
チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCRに用いた  
プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Universal primer)	1100bp

3' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP (Nested Universal primer)	1400bp

PCR 後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水 20 μL で溶出した。上記増幅断片 4 μL を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターGFPP の 5' 領域を含む cDNA4 クローンを得た。各々を GFPP5' クローン 1、GFPP5' クローン 2、GFPP5' クローン 3、GFPP5' クローン 4 と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPP の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を GFPP3' クローン 10、GFPP3' クローン 16、GFPP3' クローン 20 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列を配列番号 51 に示す。

#### 参考例 2. CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の取得

##### 1. CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列の決定

(1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の cDNA 取得 (5' および 3' 末端配列を除く部分 cDNA の取得)

GenBank に登録されているヒト GMD cDNA 配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来 GMD cDNA を公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3 種類のマウス EST 配列が得られた (GenBank

Accesssion No. BE986856、BF158988、BE284785)。これら EST 配列を連結させることにより、推定されるマウス GMD cDNA 配列を決定した。

このマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 56 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、配列番号 57 で示される塩基配列を有する 27mer のプライマー、配列番号 58 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、配列番号 59 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、配列番号 60 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。

続いて、CHO 細胞由来 GMD cDNA を增幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5 μL を鋸型として含む 20 μL の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ mol/L の合成 DNA プライマー 2 種類] を調製した。なお、合成 DNA プライマーには配列番号 56 と配列番号 57、配列番号 58 と配列番号 57、配列番号 56 と配列番号 59、配列番号 56 と配列番号 60 の組み合わせを用いた。該反応液を DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製)を用いて 94°Cにて 5 分間加熱した後、94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.2 kbp、配列番号 57 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.1 kbp、配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 350 bp、配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1 kbp の DNA 断片が増幅された。これら DNA 断片を回収し、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 22-8 (配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.2 kbp の DNA 断片を有する)、23-3 (配列番号 58 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.1 kbp の DNA 断片を有する)、31-5 (配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーから増幅された約 350 bp の DNA 断片を有する)、34-2 (配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1 kbp の DNA 断片を有する) を得た。これらプラスミドに含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列を、DNA シークエンサー ABI PRISM 377 (パーキンエルマー社製) を用い、常法に従って決定した (5' 末端側の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列、および 3' 末端側の終了コド

ンより上流 27 塩基の配列は合成オリゴ DNA 配列由来のため、マウス GMD cDNA 配列である)。

さらに、プラスミド 22-8 と 34-2 に含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA を組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。プラスミド 22-8 の 1  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°Cにて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド 34-2 の 2  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI で 37°Cにて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド CHO-GMD を得た (第 37 図)。

## (2) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 5' 末端配列の決定

ヒトおよびマウス GMD cDNA の 5' 末端側非コード (non-coding) 領域の塩基配列より配列番号 61 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、および CHO 由来 GMD cDNA 配列より配列番号 62 で示される塩基配列を有する 32mer のプライマーを作製し、cDNA を増幅するために以下の方で PCR を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で得られた CHO 細胞由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 61 と配列番号 62 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後、94°Cにて 1 分間、55°Cにて 1 分間、72°Cにて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった後、さらに 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 18 サイクル行なった。該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 300bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 5' GMD を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列を決定した。

### (3) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 3' 末端配列の決定

CHO 細胞由来 GMD の 3' 末端 cDNA 配列を得るため、以下の方法で RACE 法を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で取得した CHO 細胞由来 RNA より、3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素には PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を用いた。調製後一本鎖 cDNA は、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釀したものを PCR の鋳型として用いた。

続いて、上記 3' RACE 用一本鎖 cDNA 1  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 63 で示す 24mer の合成 DNA プライマー [参考例 2 の 1 項(1)で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、1 倍濃度の Universal Primer Mix (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後、94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液より 1  $\mu$ L を取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH 社製) で 20 倍希釀した水溶液 1  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 64 で示す 25mer の合成 DNA プライマー [参考例 2 の 1 項(1)で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、0.5  $\mu$ mol/L の Nested Universal Primer (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後、94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 700bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue (R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 3' GMD を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の終止コドンより上流 27 塩基の配列、および 3' 側の non-coding 領域 415bp の塩基配列を決定した。

以上、参考例 2 の 1 項(1)、(2)、(3) より決定した CHO 由来 GMD 遺伝子の全長 cDNA 配列を配列番号 65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 71 に示す。

## 2. CHO/DG44 細胞の GMD 遺伝子を含むゲノム配列の決定

参考例 2 の 1 項で決定したマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 66 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、以下の方法で CHO 細胞由来ゲノム DNA を取得した。CHO/DG44 細胞由来 KC861 株を IMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地 [HT supplement (インビトロジエン社製)] を 1 倍濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地] に  $3 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、接着細胞用平底 6 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL/ウェルずつ分注した。37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法 [ヌクレオイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従ってゲノム DNA を調製し、TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 μg/mL RNase A) 150 μL に一晩溶解した。

上記で取得した CHO/DG44 細胞由来ゲノム DNA を 100ng、20 μL の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μmol/L の配列番号 59 と配列番号 66 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°C にて 5 分間加熱した後 94°C にて 1 分間、68°C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 100bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex3 を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 67 に示した。

次に、参考例 2 の 1 項で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 68 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、および配列番号 69 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44 由来ゲノム DNA を 100ng、20 μL の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μmol/L の配列番号 68 と配列番号 69 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイ

クラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94°Cにて5分間加熱した後、94°Cにて1分間、68°Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約200bpのDNA断片を回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue (R)ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドex4を得た。DNAシーケンサー377（パーキンエルマー社製）を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定し、配列番号70に示した。

### 参考例3. 抗FGF-8キメラ抗体の作製

#### 1. FGF-8に対するマウス抗体のV領域をコードするcDNAの単離、解析

##### (1) FGF-8に対するマウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

FGF-8に対するマウス抗体（抗FGF-8マウス抗体）を生産するハイブリドーマKM1334(FERM BP-5451)の $1 \times 10^7$ 細胞より、mRNAの調製キットであるFast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、mRNAを約 $8 \mu\text{g}$ 調製した。

##### (2) 抗FGF-8マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

参考例3の1項(1)で取得したKM1334のmRNAの $5 \mu\text{g}$ から、Time Saver cDNASynthesis Kit(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNAを合成した。作製したcDNA全量を $20 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgGクラスの抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片と $\kappa$ クラスのL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約 $0.1 \mu\text{g}$ 回収した。次に、各々の約1.5kbのcDNA断片 $0.1 \mu\text{g}$ および約1.0kbのcDNA断片 $0.1 \mu\text{g}$ と、制限酵素EcoRIで消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで末端を脱リン酸化した $\lambda$ ZAPIIベクター $1 \mu\text{g}$ を $\lambda$ ZAPII Cloning Kit(Stratagene社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、連結した。

連結後の各々の反応液のうち $4 \mu\text{l}$ をGigapack II Packaging Extracts Gold(Stratagene社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、 $\lambda$ ファージにパッケージングし、適当量を大腸菌株XL1-Blue(Biotechniques, 5, 376, 1987)に感染させて、KM1334のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーとしてそれぞれ約 $8.1 \times 10^4$ 個と、 $5.5 \times 10^4$ 個のファージクローンを取得した。次に各々の

ファージを常法（モレキュラー・クローニング第2版）に従い、ナイロンメンブレン上に固定した。

### (3) 抗 FGF-8 マウス抗体の H鎖および L鎖 cDNA のクローニング

参考例3の1項(2)で作製したKM1334のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーのナイロンメンブレンを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のC領域のcDNA〔H鎖はマウスC $\gamma$ 1cDNAを含むDNA断片 (J. Immunol., 146, 2010, 1991)、L鎖はマウスC $\kappa$ cDNAを含むDNA断片 (Cell, 22, 197, 1980)〕をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンをH鎖、L鎖各10クローン取得した。次に、λ ZAPII Cloning Kit (Stratagene社製)の使用説明書に従い、in vivo excision法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれるcDNAの塩基配列をBig Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems社製)を用いてジデオキシ法（モレキュラー・クローニング第2版）により決定した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長の機能的なH鎖cDNAを含むプラスミドpKM1334H7-1およびL鎖cDNAを含むプラスミドpKM1334L7-1を得た。

### (4) 抗 FGF-8 マウス抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

配列番号72にプラスミドpKM1334H7-1に含まれていたVHの全塩基配列を、配列番号73に推定された全アミノ酸配列を、配列番号74にプラスミドpKM1334L7-1に含まれていたVLの全塩基配列を、配列番号75に推定された全アミノ酸配列をそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)との比較および精製した抗FGF-8マウス抗体KM1334のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-10(島津製作所製)を用いて自動エドマン分解により解析した結果との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗FGF-8マウス抗体KM1334をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号73に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号75に記載のアミノ酸配列の1から19番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL のアミノ酸配列（分泌シグナル配列を除いた配列）の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG Package (version 9.1, Genetics Computer Group 社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース (PIR-Protein (Release 56.0)) を BLAST 法 (J. Mol. Biol., 215, 403, 1990) により検索した。その結果、H 鎖、L 鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 76、77 および 78 に、VL の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 79、80 および 81 に示した。

## 2. 抗 FGF-8 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

### (1) 抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 の構築

W097/10354 に記載のヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と参考例 3 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334H7-1 および pKM1334L7-1 を用いて抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 を以下の様にして構築した。

参考例 3 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334H7-1 の 50ng を鋳型とし、配列番号 24、25 に記載の塩基配列を有する合成 DNA (GENSET 社製) をプライマーとして終濃度  $0.3 \mu M$  となるように加え、KOD plus polymerase (TOYOB0 社製) に添付の取扱説明書に従い、 $50 \mu l$  の系でまず  $94^{\circ}C$  で 2 分間加熱した後、 $94^{\circ}C$  15 秒間、 $55^{\circ}C$  30 秒間、 $68^{\circ}C$  1 分間の条件で 30 サイクルの PCR を行った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}C$  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 0.47kb の ApaI-NotI 断片を約  $0.3 \mu g$  回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の  $3 \mu g$  を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}C$  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 ApaI-NotI 断片を約  $2 \mu g$  回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の NotI-ApaI 断片  $0.1 \mu g$  とプラスミド pKANTEX93 由来の NotI-ApaI 断片  $0.1 \mu g$  を全量  $10 \mu l$  の滅菌水に加え、Ligation

High (TOYOB0 社製) を用いて連結した。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 JM109 株を形質転換し、第 38 図に示したプラスミド pKANTEX1334H を得た。

次に、参考例 1 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334L7-1 の 50ng を鑄型とし、配列番号 82、83 に記載の塩基配列を有する合成 DNA(GENSET 社製)をプライマーとして終濃度  $0.3 \mu M$  となるように加え、KOD plus polymerase(TOYOB0 社製)に添付の取扱説明書に従い、 $50 \mu l$  の系でまず  $94^{\circ}C$  で 2 分間加熱した後、 $94^{\circ}C$  15 秒間、 $55^{\circ}C$  30 秒間、 $68^{\circ}C$  1 分間の条件で 30 サイクルの PCR を行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}C$  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 0.44kb の EcoRI-BsiWI 断片を約  $0.3 \mu g$  回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX1334H の  $3 \mu g$  を 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}C$  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 13.20kb の EcoRI-BsiWI 断片を約  $2 \mu g$  回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の EcoRI-BsiWI 断片  $0.1 \mu g$  とプラスミド pKANTEX1334H 由来の EcoRI-BsiWI 断片  $0.1 \mu g$  を全量  $10 \mu l$  の滅菌水に加え、Ligation High (TOYOB0 社製) を用いて連結した。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 JM109 株を形質転換し、第 38 図に示したプラスミド pKANTEX1334 を得た。

得られたプラスミドの 400ng を用い、Big Dye Terminator Kit ver. 2 (Appliedbiosystems 社製) を用いてジデオキシ法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) による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たプラスミドが得られたことを確認した。

### 産業上の利用可能性

本発明は、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、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を検出する方法、

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を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物、およびその製造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 4-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 8-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 15-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 26-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 29-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 35-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 47-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 52-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 53-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 54-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 55-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 56-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 57-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 58-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 59-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 60-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 61-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 62-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 63-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 64-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 66-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 68-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 69-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 82-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 83-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 84-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 85-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 86-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 87-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 88-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 89-人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法。
2. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、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 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 糖鎖が、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フコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または消失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲 1 または 2 に記載の方法。
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にフコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 3 に記載の方法。
  - (a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関する蛋白質；
  - (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する蛋白質；
  - (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する蛋白質。
5. 細胞が、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である、請求の範囲 3 または 4 に記載の方法。
6. 細胞が、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の一つに耐性である、請求の範囲 3~5 のいずれか 1 項に記載の方法。
  - (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。
7. 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 3~6 のいずれか 1 項に記載の方法。

8. 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 3～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
- (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
- (f) 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。

9. 抗体分子が、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である、請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (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。

10. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

11. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、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、請求の範囲 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

12. 請求の範囲 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。

13. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。

14. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、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 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、請求の範囲 13 に記載の方法。

15. 糖鎖が、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フコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲 13 または 14 に記載の方法。

16. 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を結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 15 に記載の方法。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関する蛋白質；

(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する蛋白質；

(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する蛋白質。

17. 細胞が、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である、請求の範囲 15 または 16 に記載の方法。

18. 細胞が、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の一つに耐性である、請求の範囲 15~17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(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。

19. 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 15~18 のいずれか 1 項に記載の方法。

20. 細胞が、以下の (a)~(i) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 15~19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞

(e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞

(f) 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。

21. 抗体分子が、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である、請求の範囲 13～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (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。

22. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 13～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

23. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、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、請求の範囲 13～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

24. 請求の範囲 12 の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。

25. 請求の範囲 13～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。

26. 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$ 受容体 IIIa と接触させて Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、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を検出する方法。

27. 抗原と被験抗体組成物とを反応させたて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$ 受容体 IIIa と接触させ、Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc $\gamma$ 受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

28. 被験抗体組成物と Fc $\gamma$ 受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc $\gamma$ 受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc

$\gamma$ 受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、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を検出する方法。

29. 被験抗体組成物と Fc  $\gamma$ 受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc  $\gamma$ 受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc  $\gamma$ 受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

30. 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を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物。

31. 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消失した細胞である、請求の範囲 30 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

- (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。

32. 細胞が、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の一つに耐性である、請求の範囲 30 または 31 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

- (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。

33. 細胞が、Fc 融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、請求の範囲 30～32 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

34. Fc が抗体分子の IgG クラス由来である、請求の範囲 33 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

35. 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 30～34 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

36. 細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲 30～35 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
37. マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である請求の範囲 36 記載の Fc 融合蛋白質組成物。
38. 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 30～37 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
- (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) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
  - (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
  - (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
  - (f) 胚性幹細胞；
  - (g) 受精卵細胞。
39. N-グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子の Fc 領域に有する Fc 融合蛋白質からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である Fc 融合蛋白質組成物。
40. 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 39 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
41. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 39 または 40 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
42. Fc 融合蛋白質組成物が、Fc 融合纖維芽細胞増殖因子-8 である請求の範囲 30～41 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。
43. 請求の範囲 30～42 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物を生産する細胞。
44. 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、請求の範囲 43 に記載の細胞。
45. 細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲 43 または 44 に記載の細胞。
46. マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である請求の範囲 45 に記載の細胞。

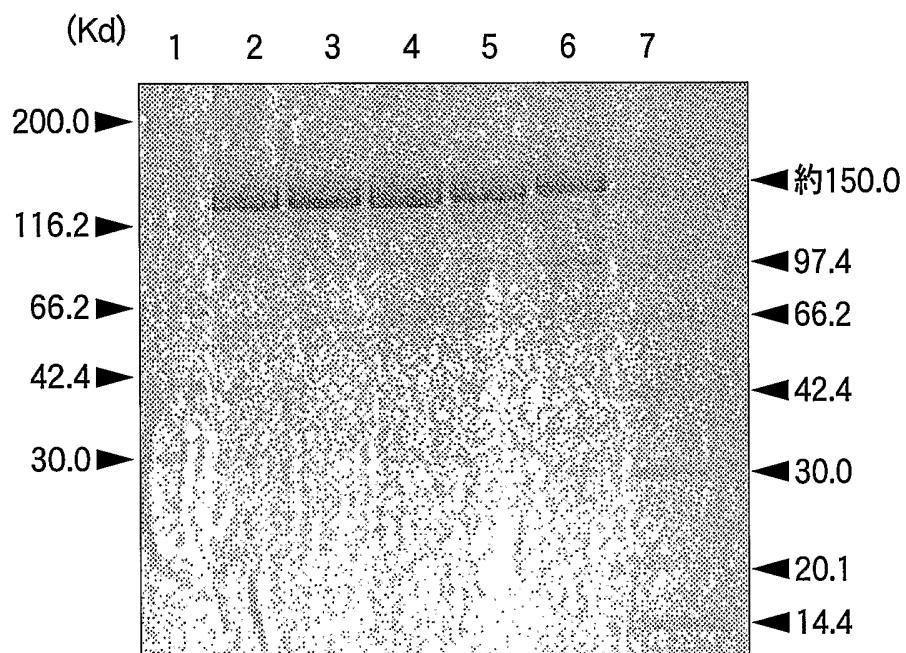
47. 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 43～46 のいずれか 1 項に記載の細胞。

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

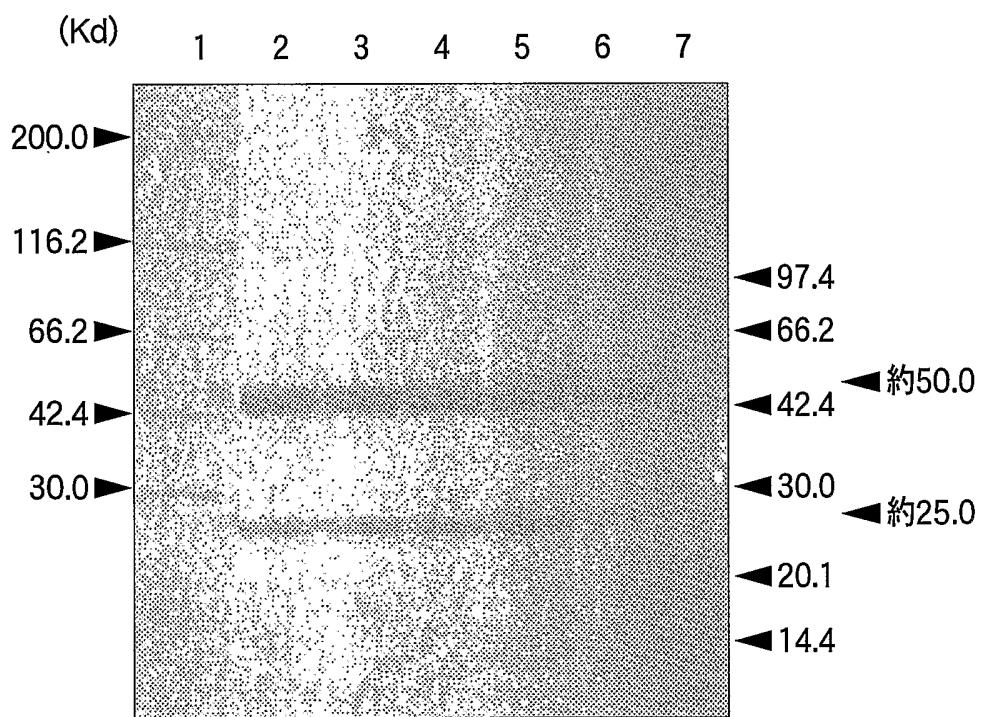
48. 請求の範囲 43～47 のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に Fc 融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から Fc 融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Fc 融合蛋白質組成物の製造方法。

## 第1図

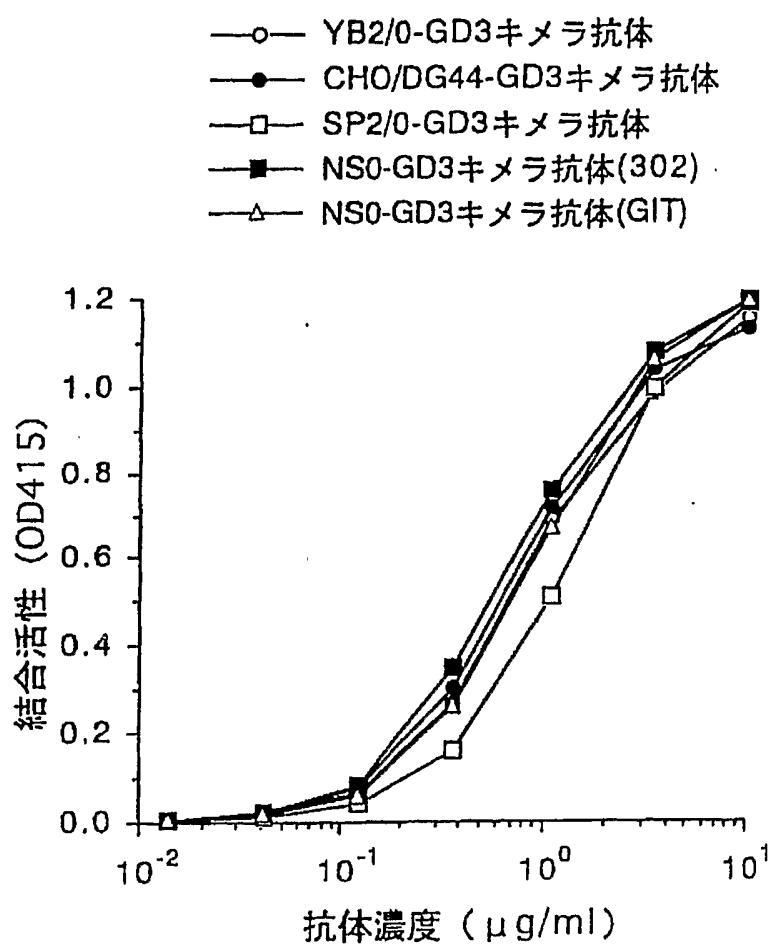
1A



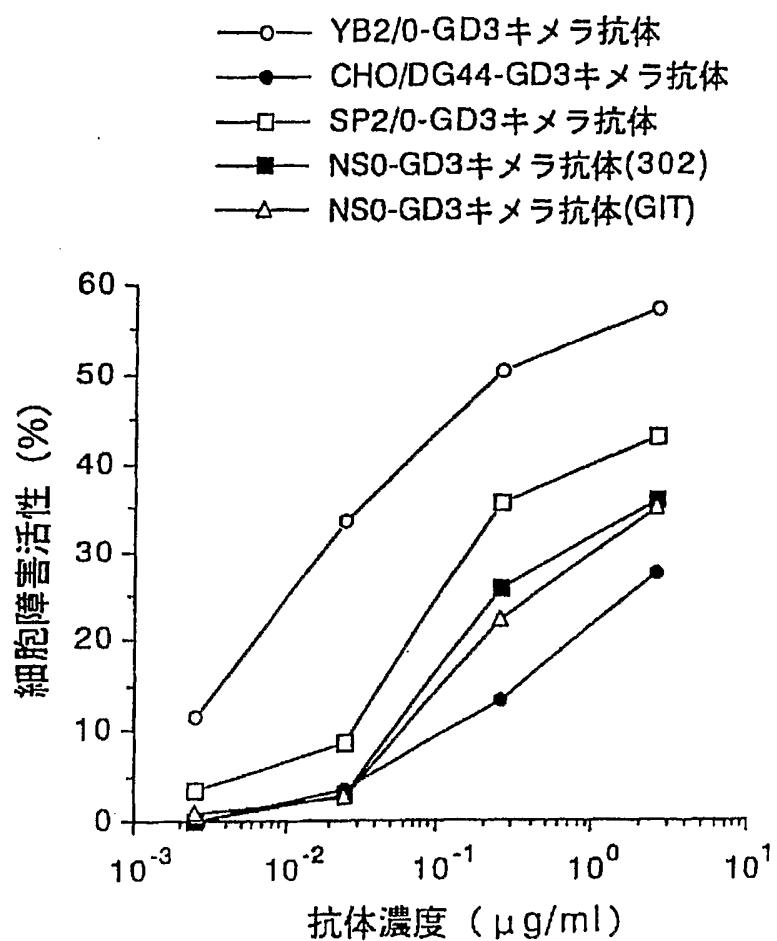
1B



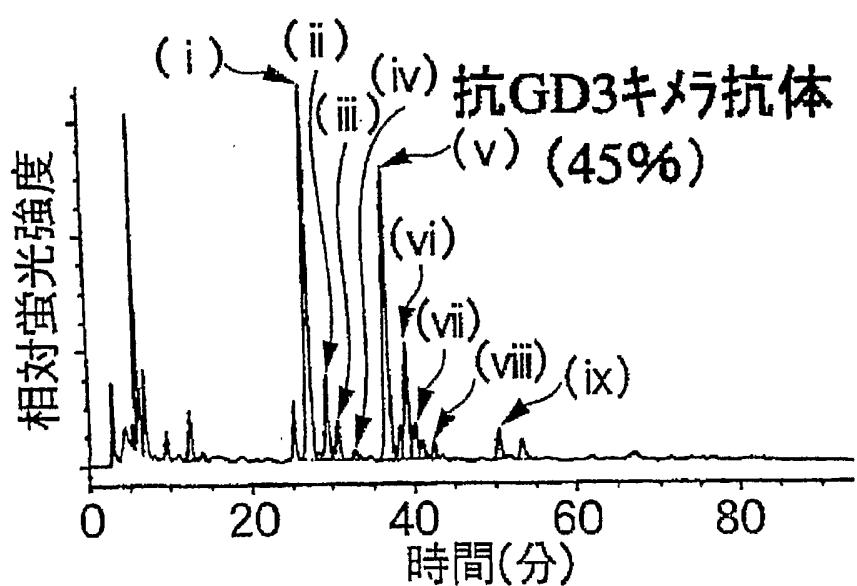
第2図



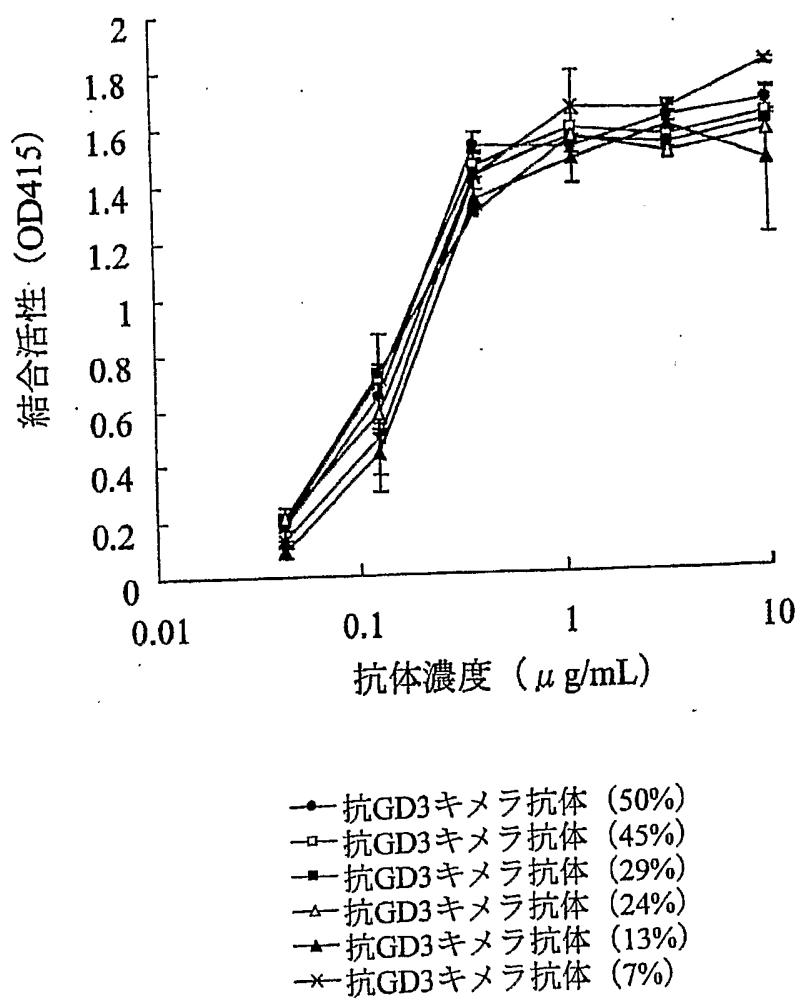
第3図



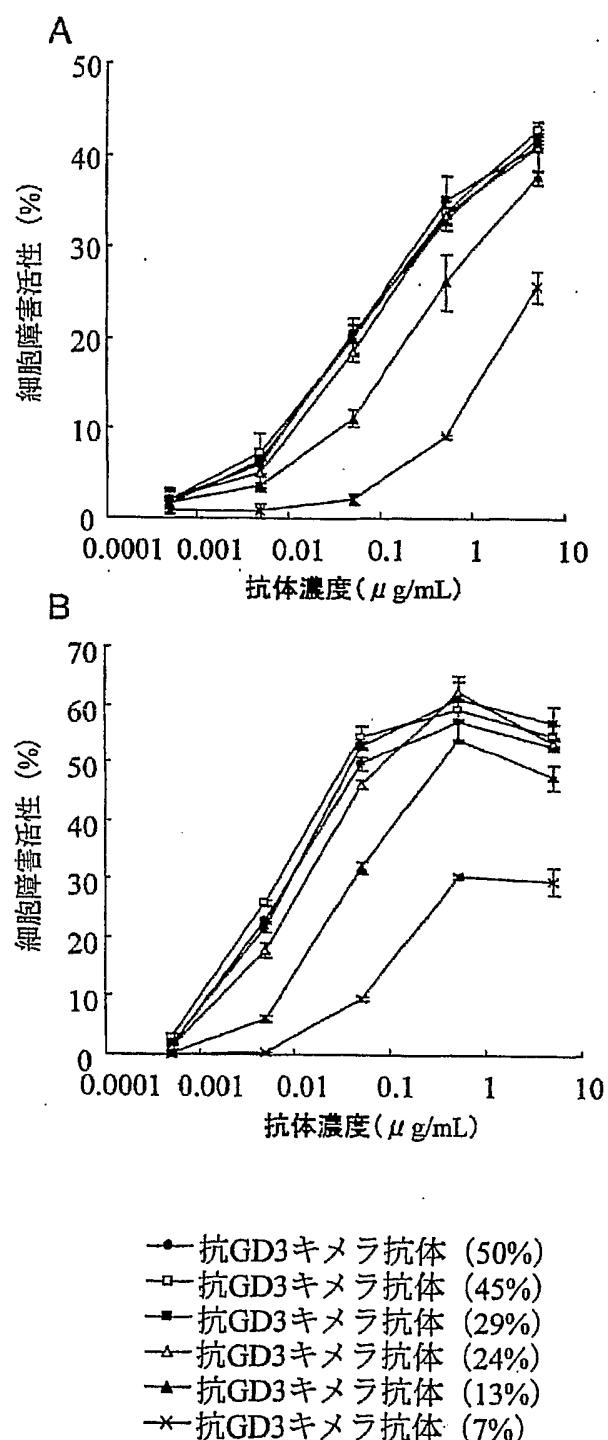
第4図



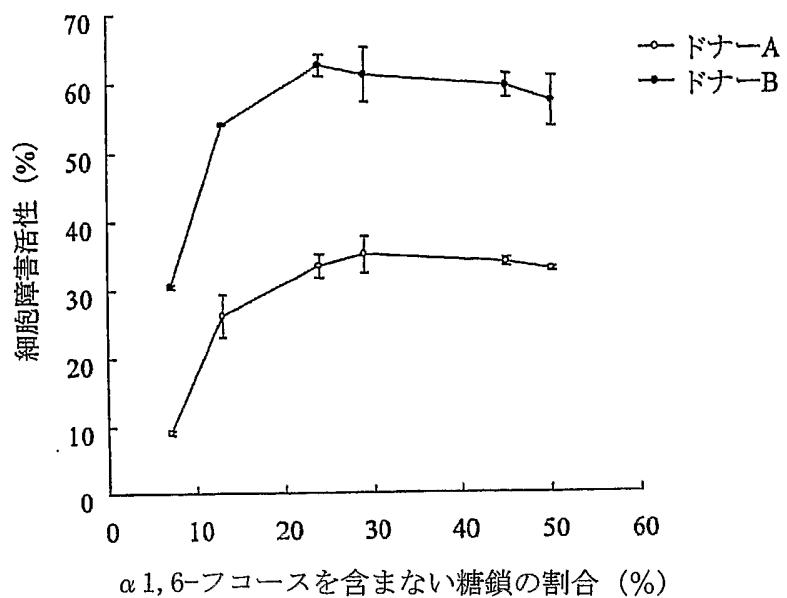
第5図



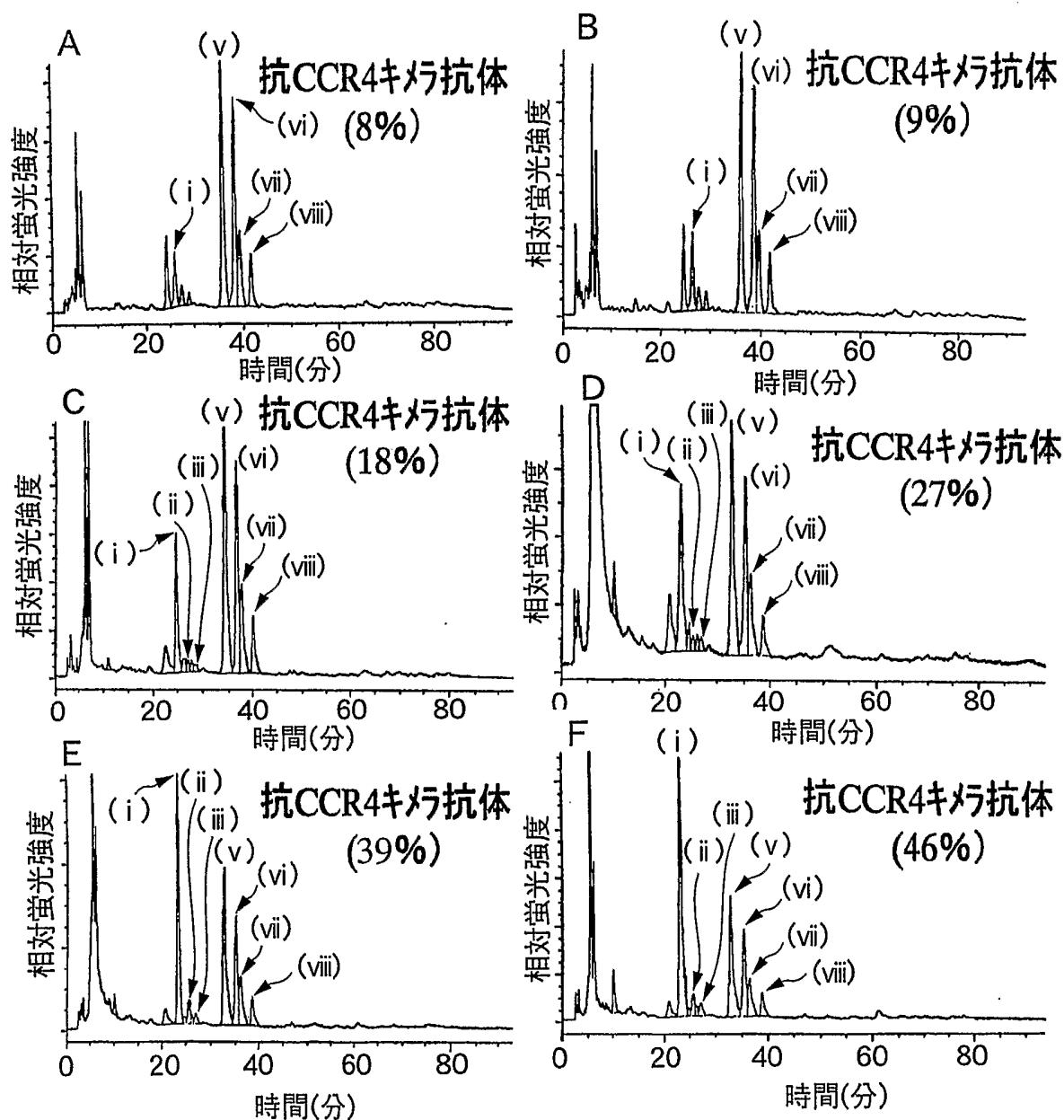
第6図



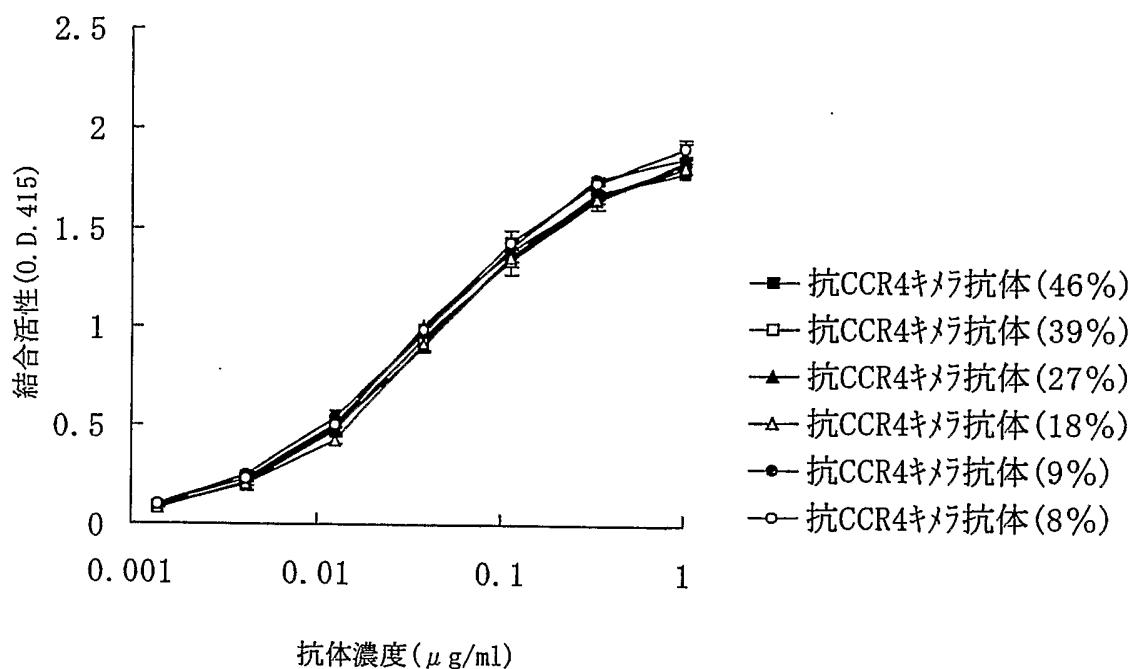
第7図



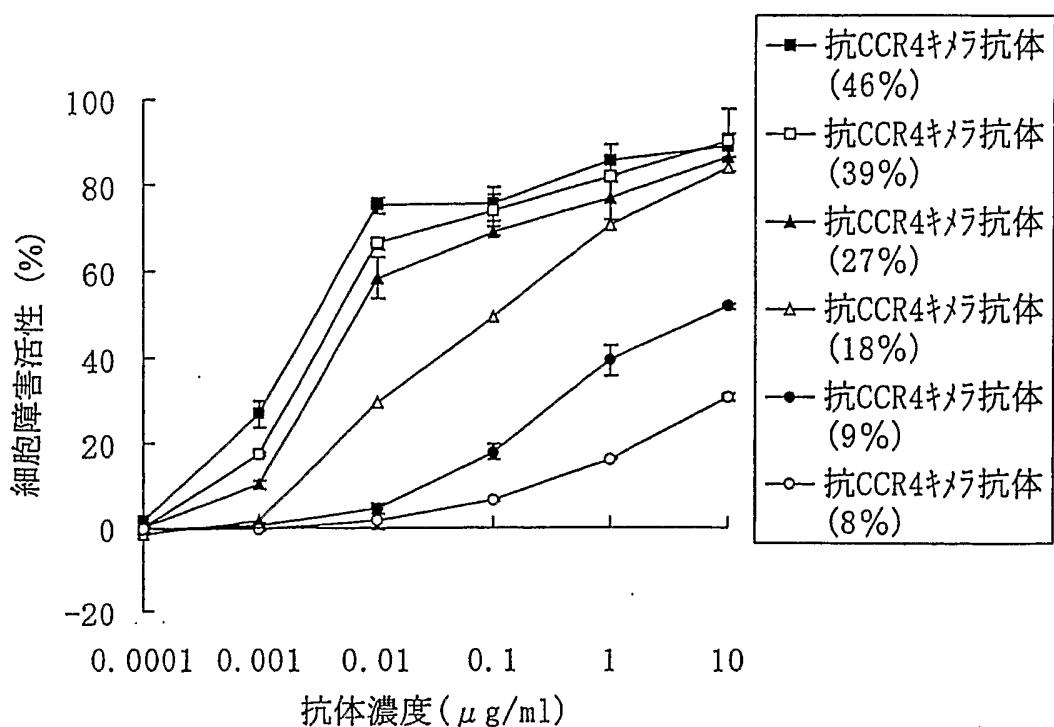
第8図



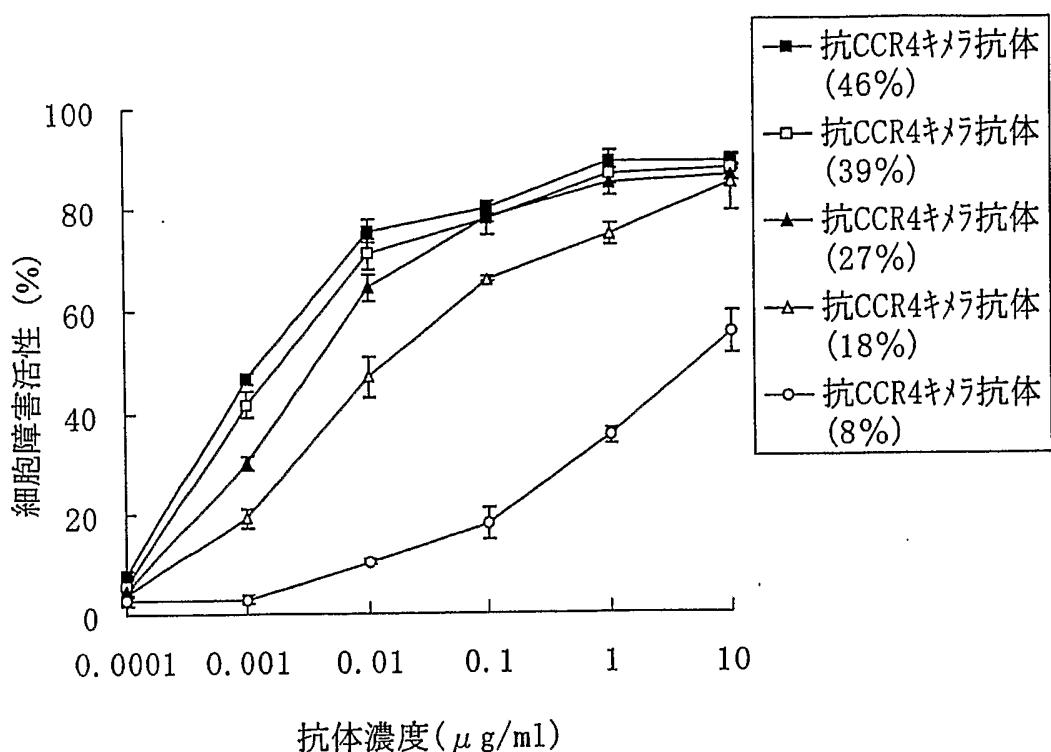
第9図



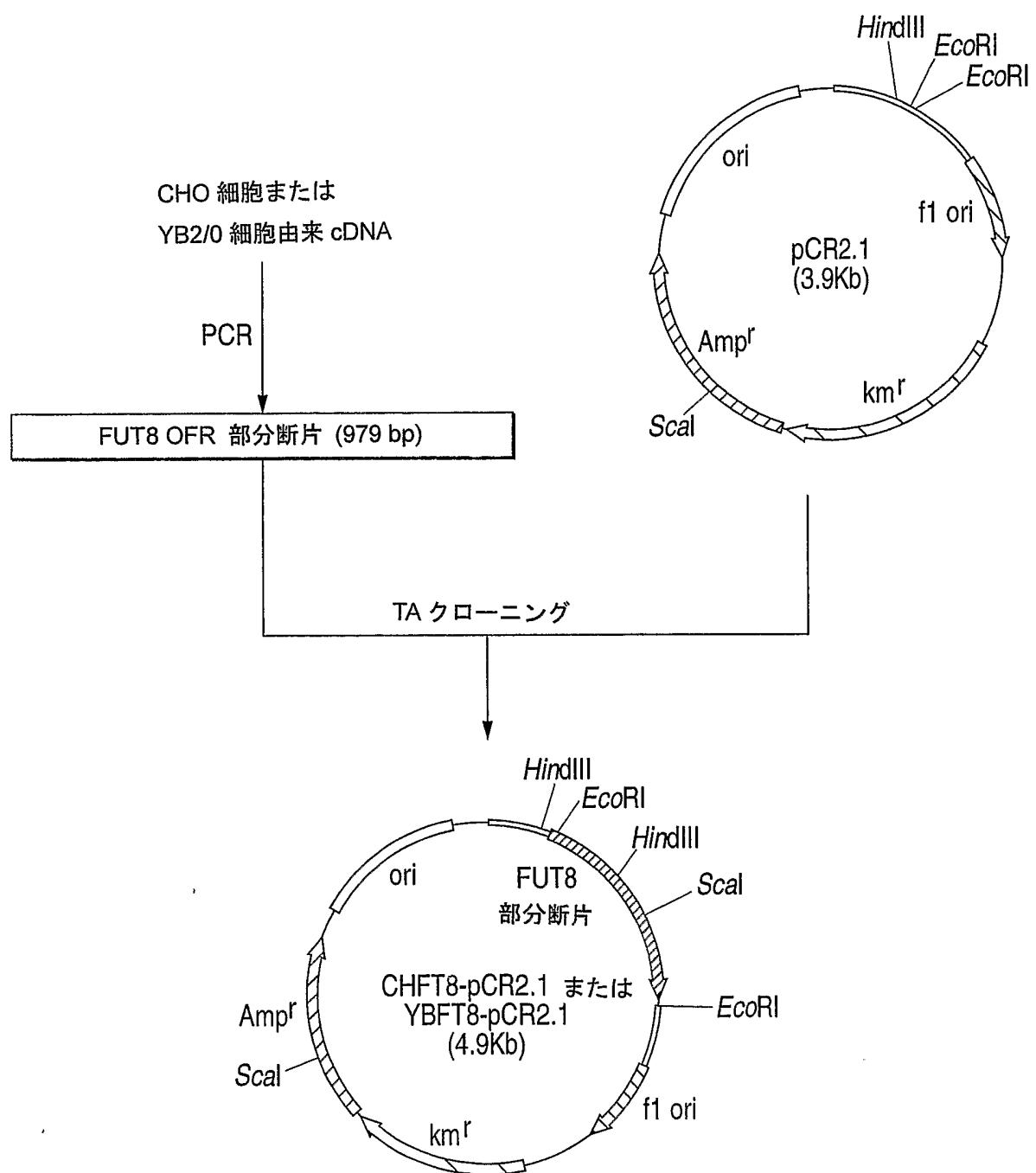
第10図



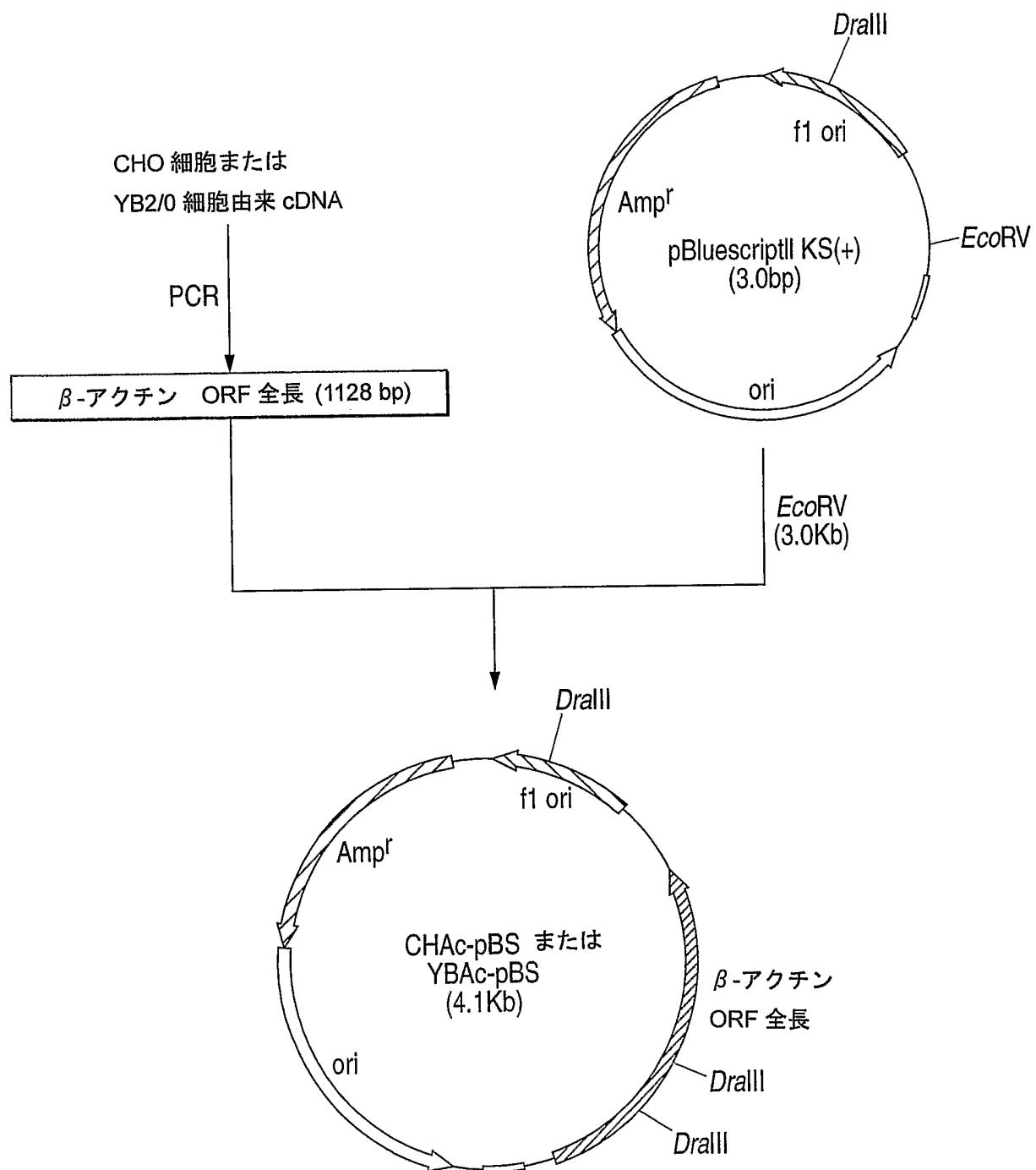
第11図



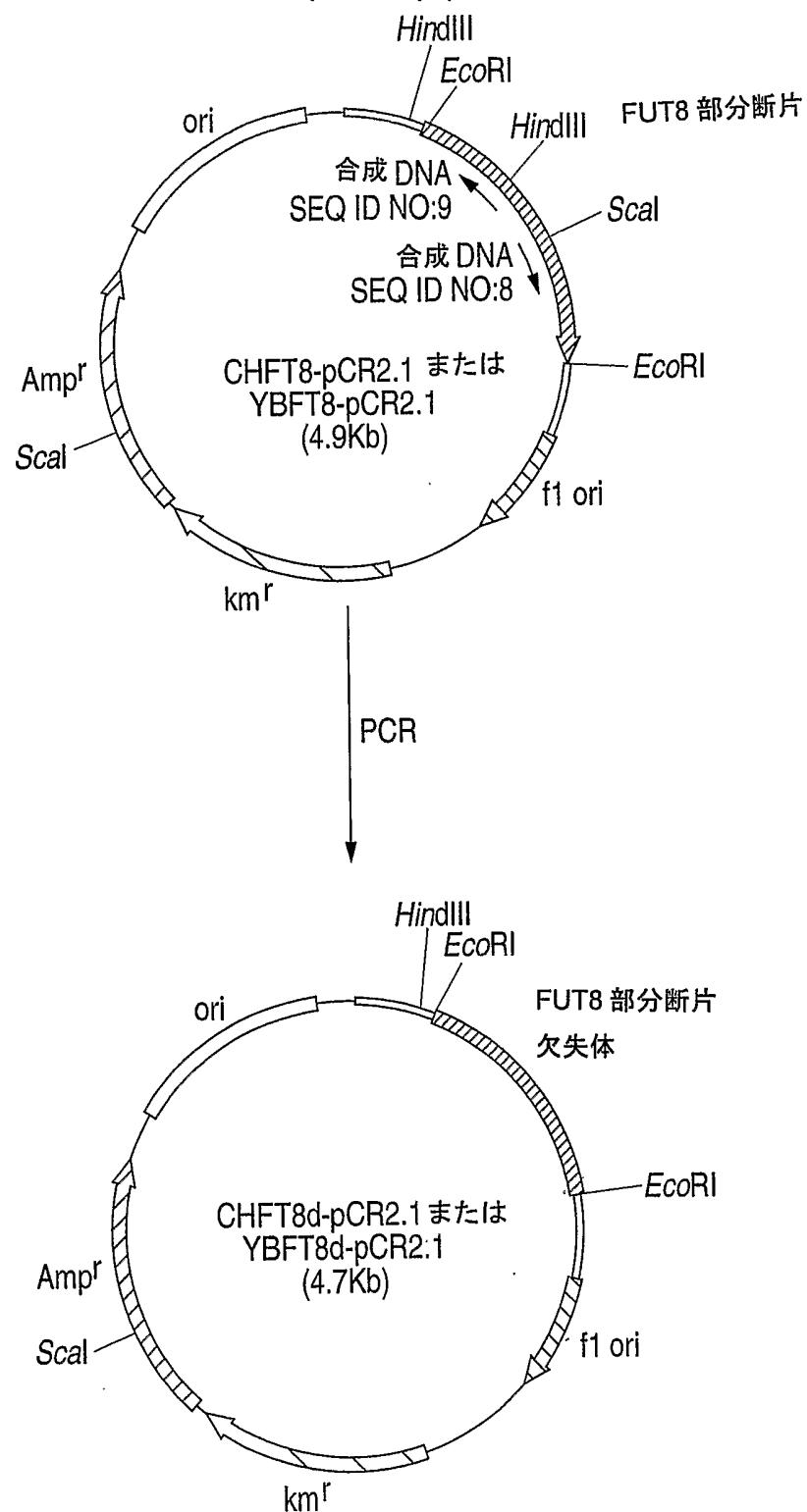
## 第12図



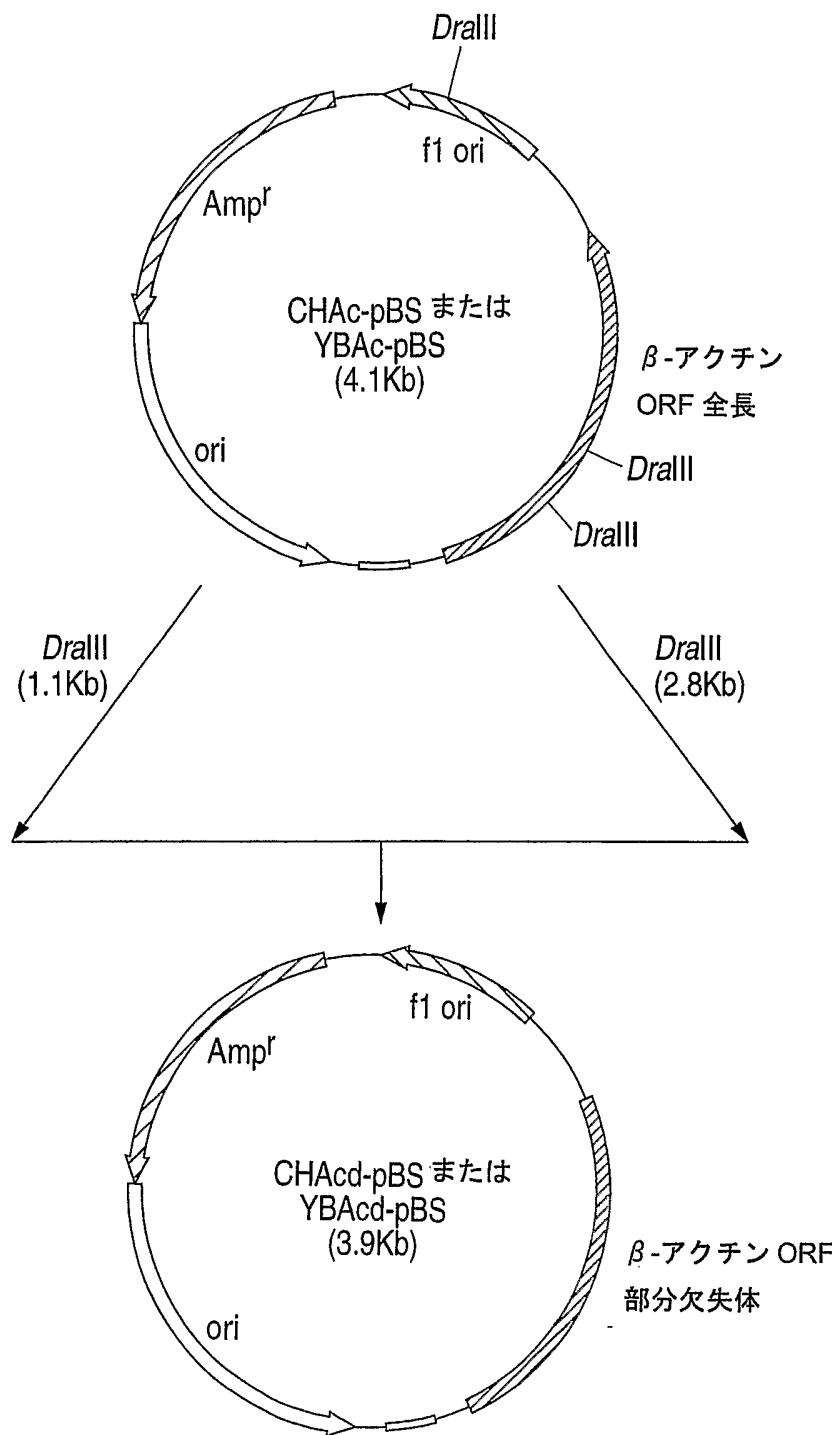
## 第13図



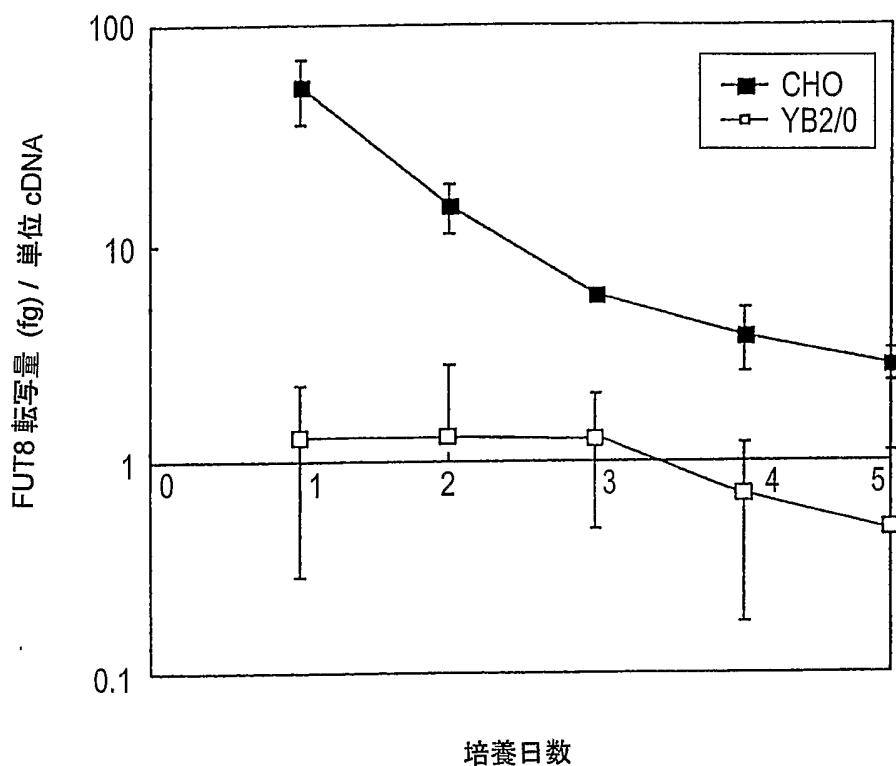
第14図



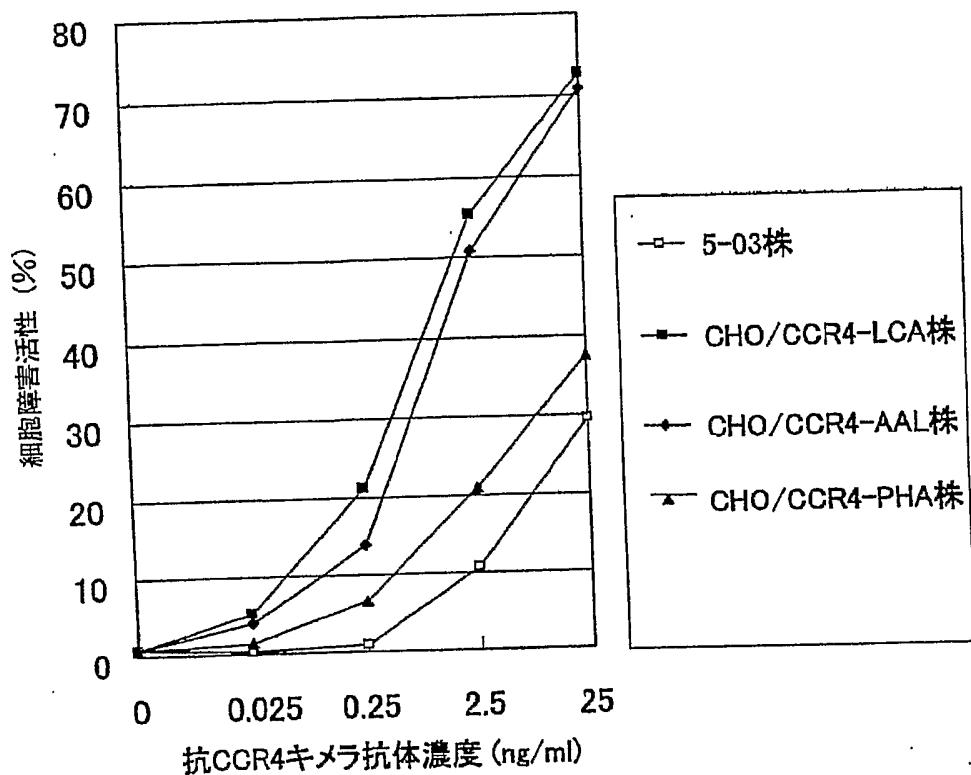
第15図



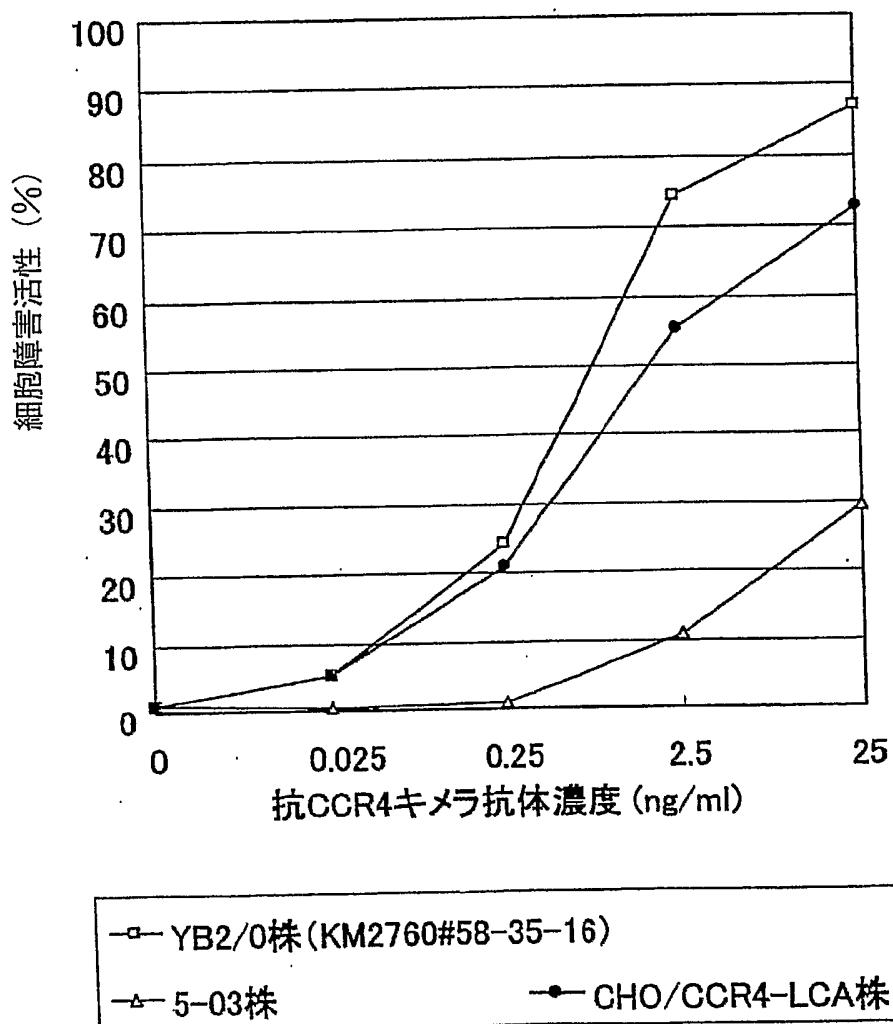
第16図



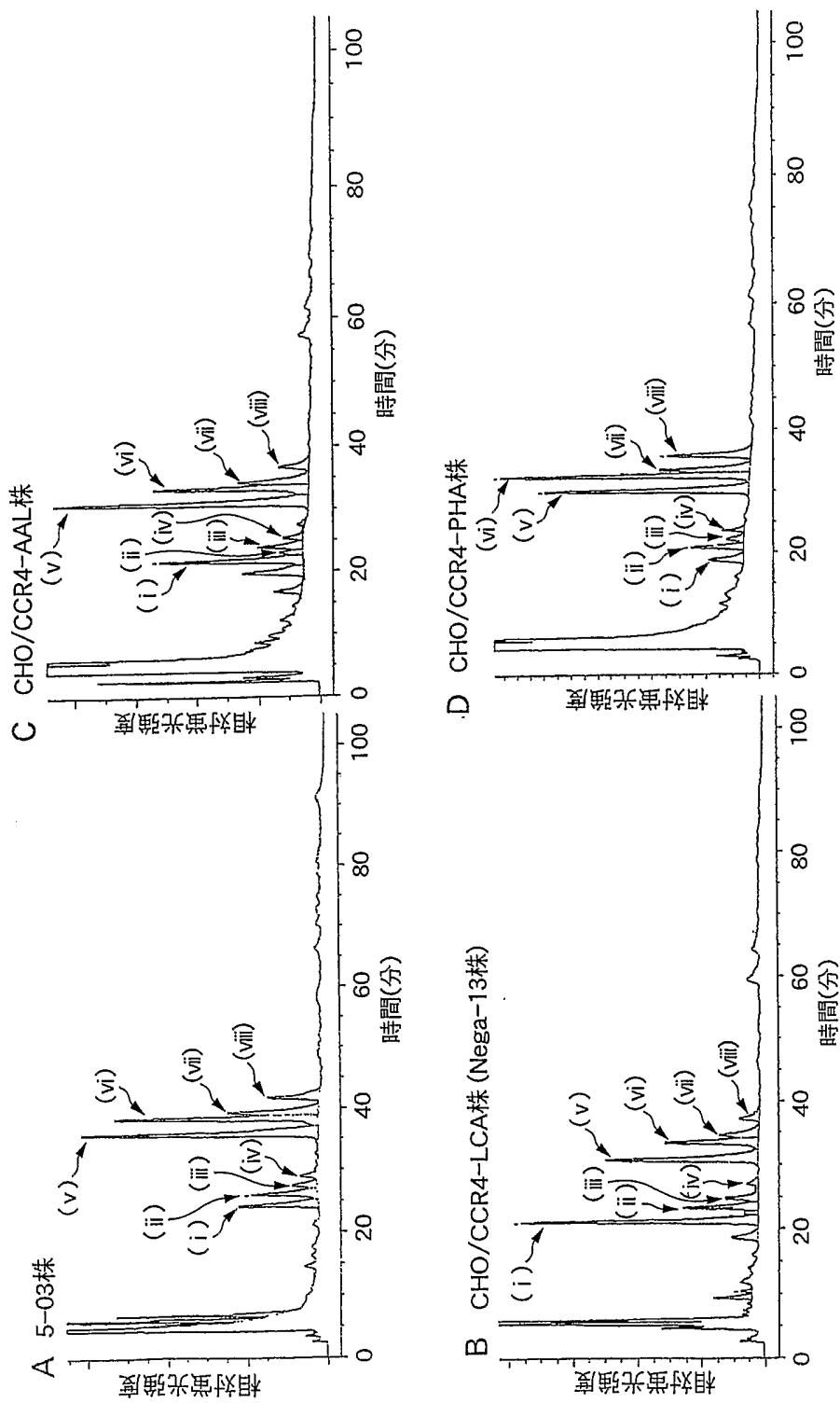
第17図



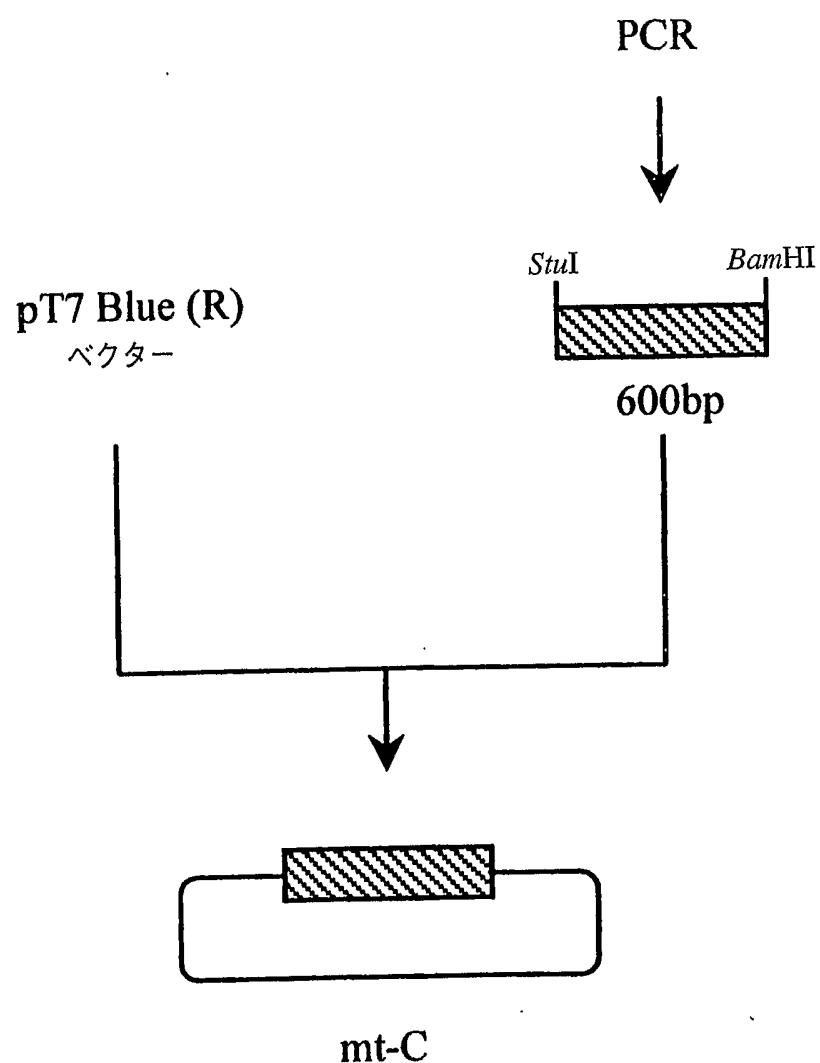
第18図



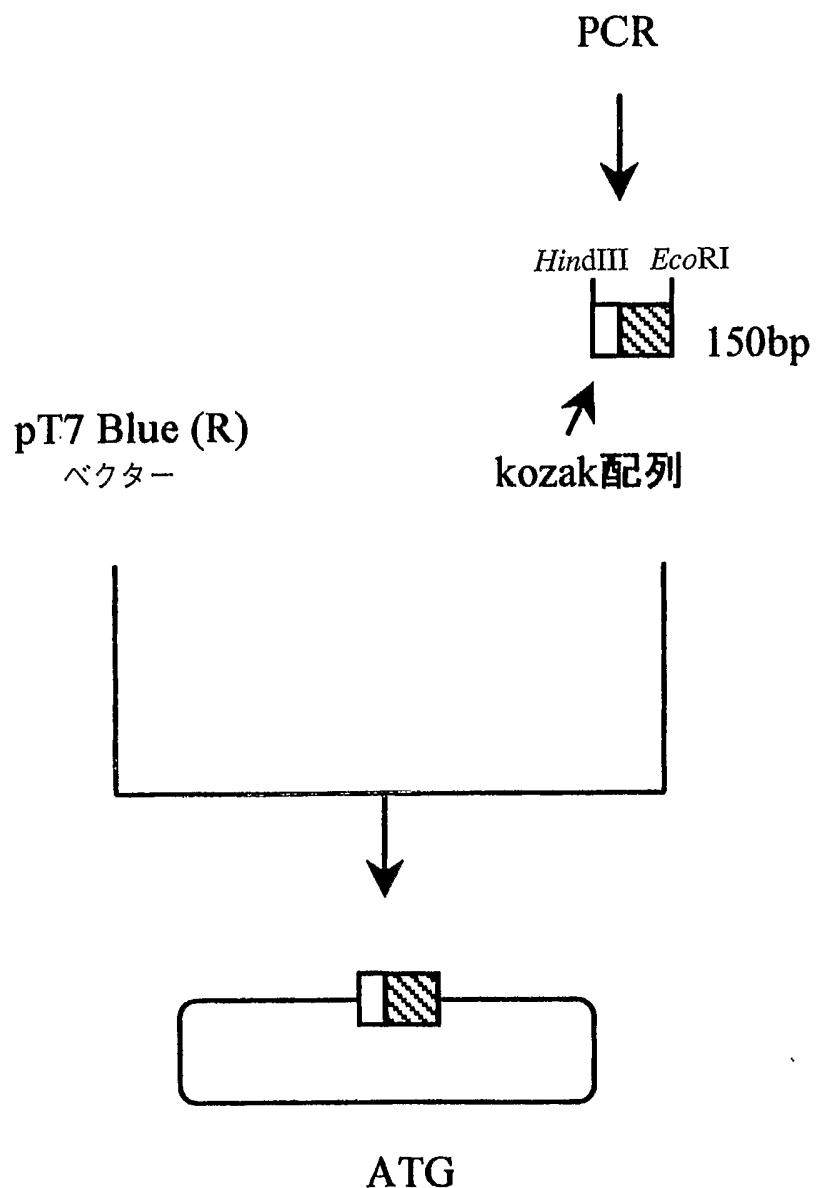
第19図



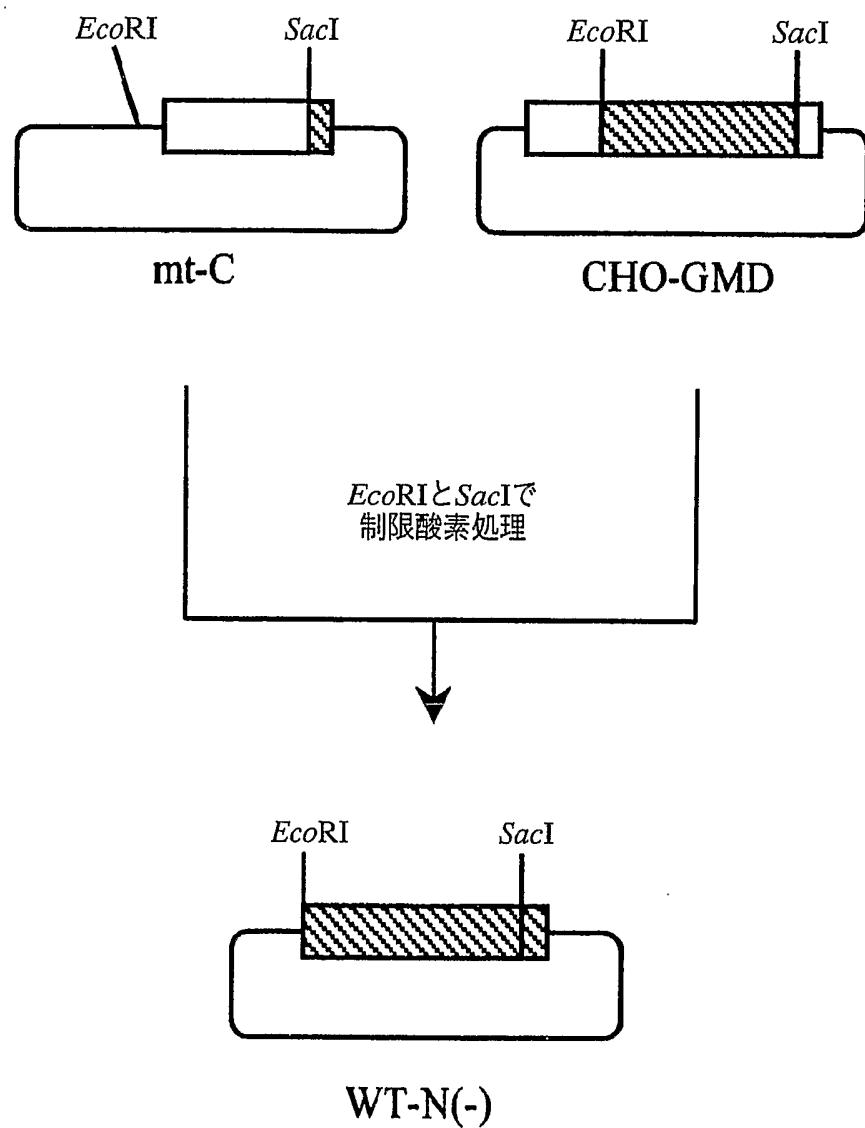
## 第20図



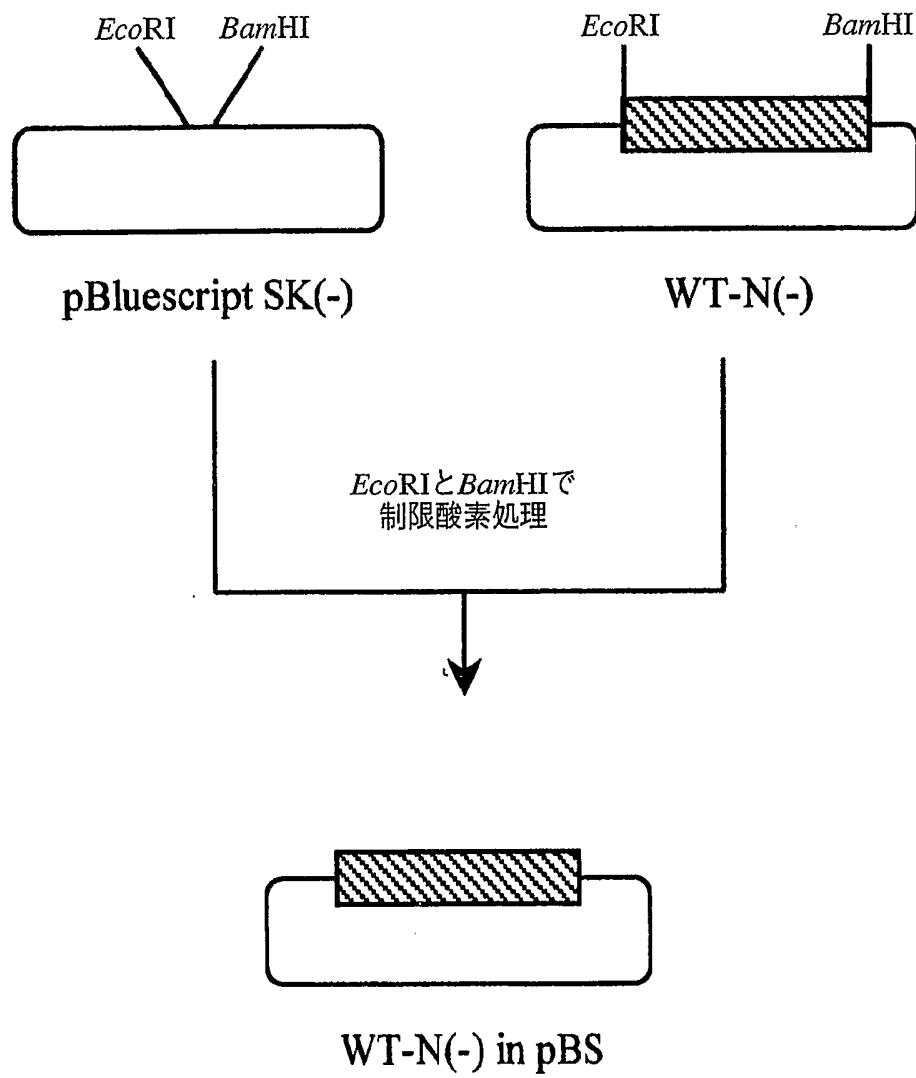
## 第21図



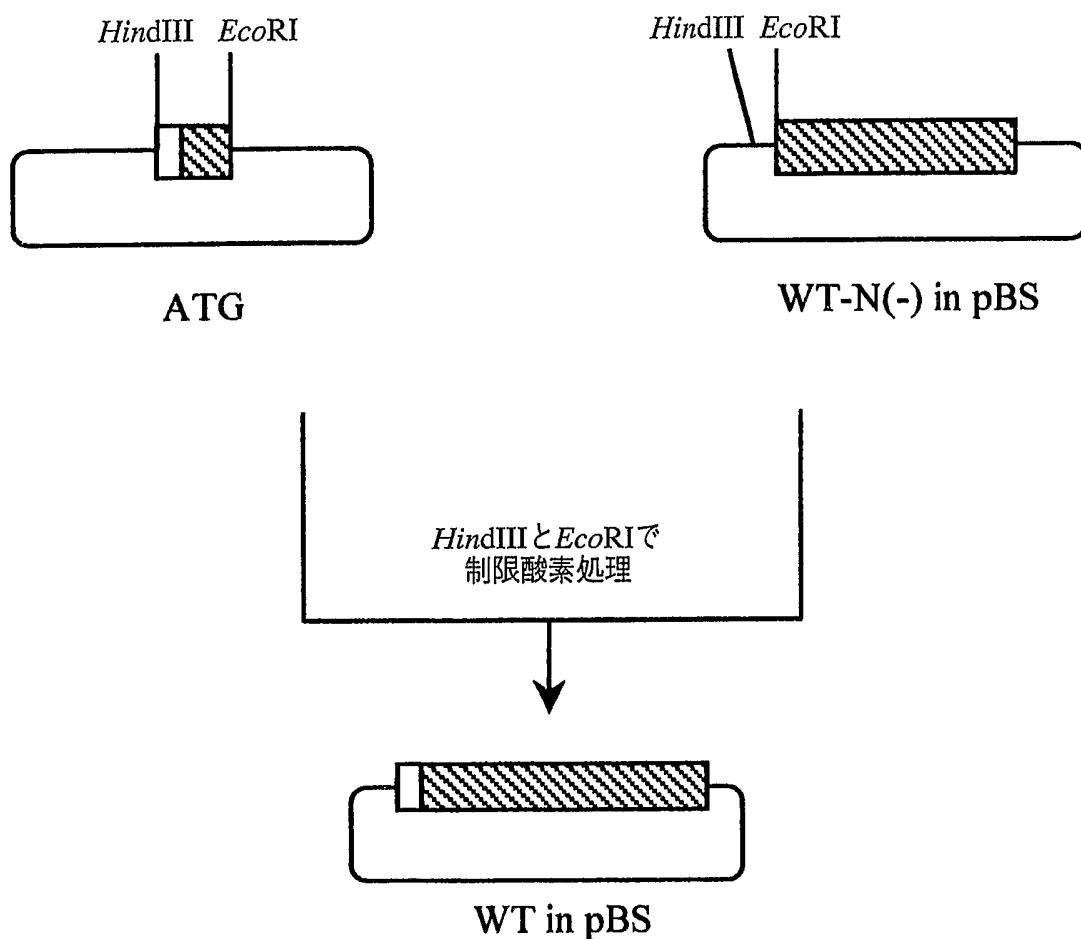
## 第22図



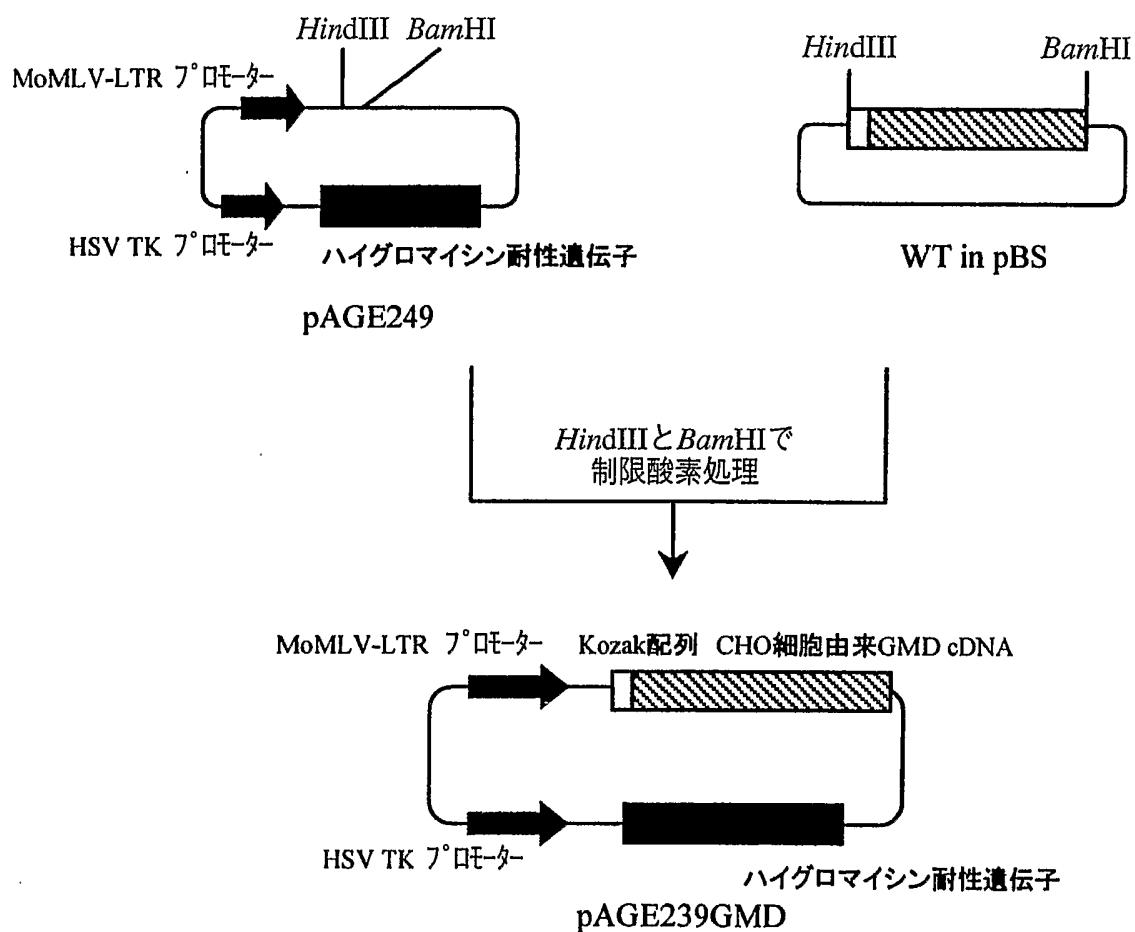
## 第23図



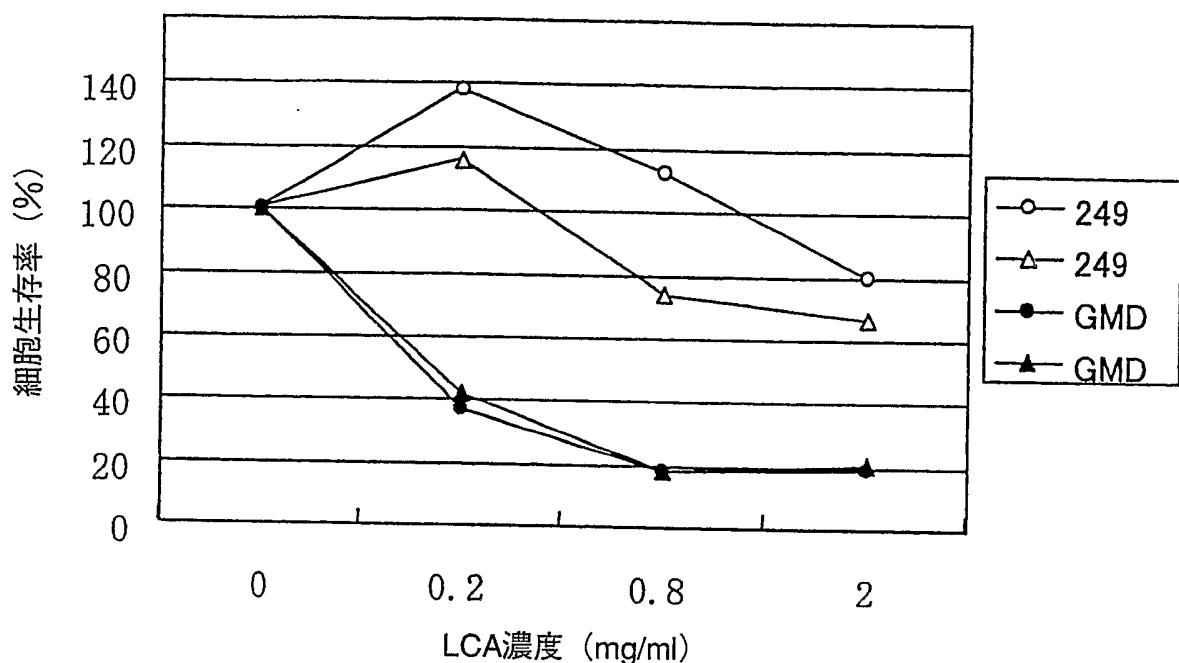
## 第24図



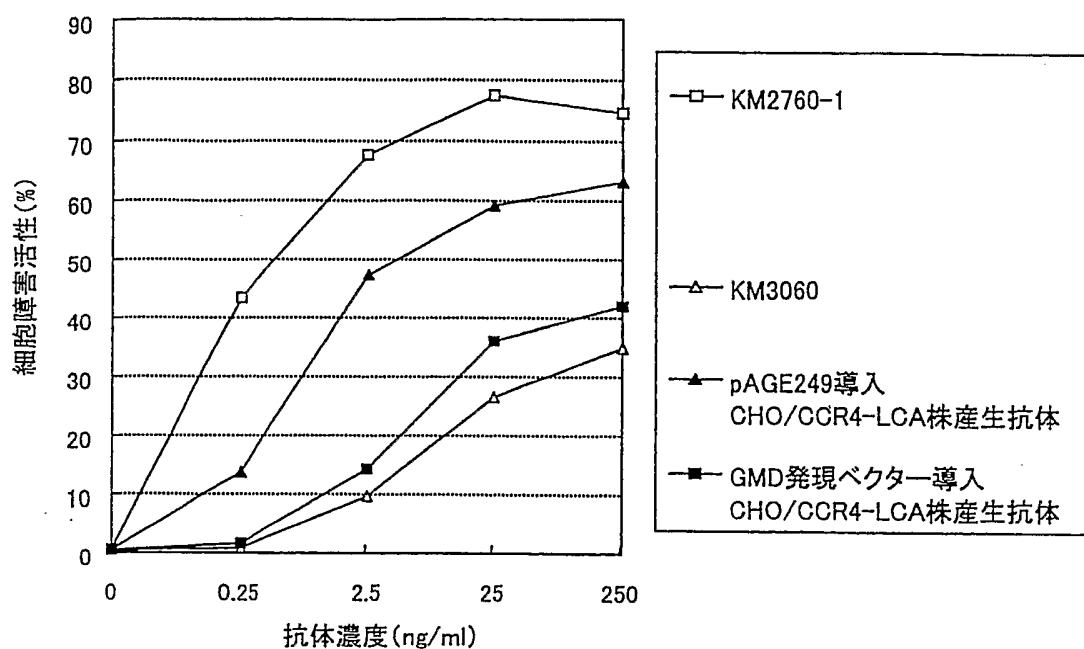
## 第25図



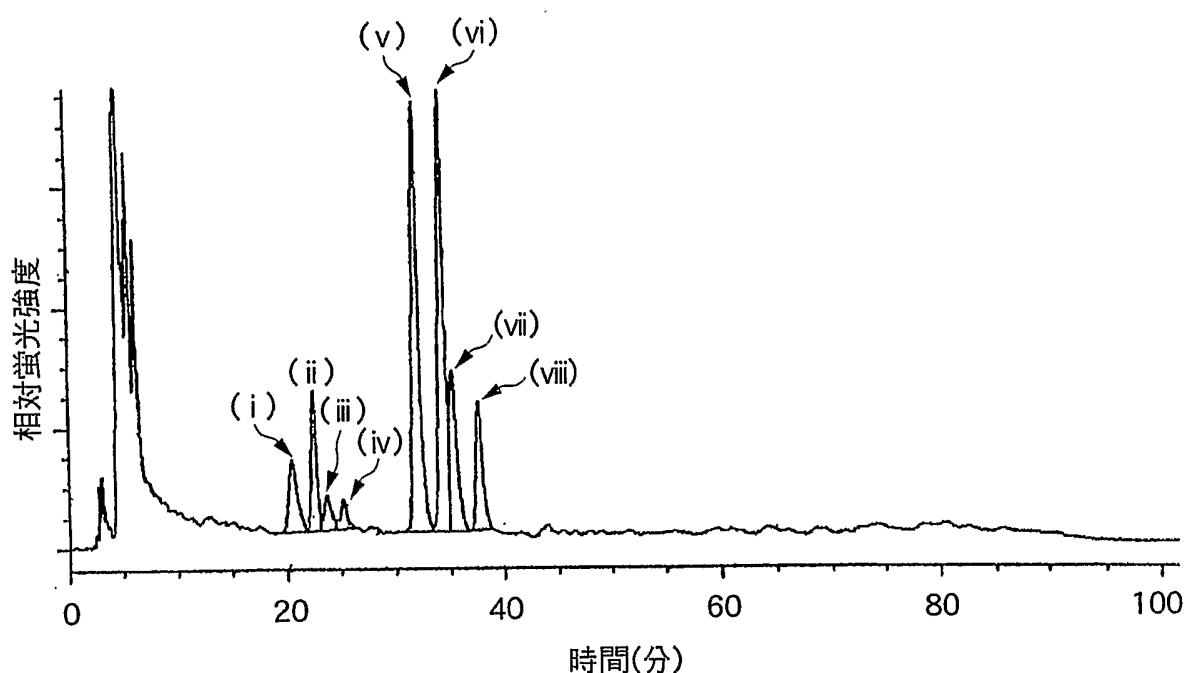
第26図



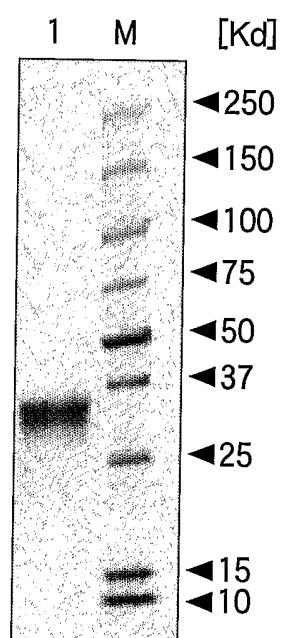
第27図



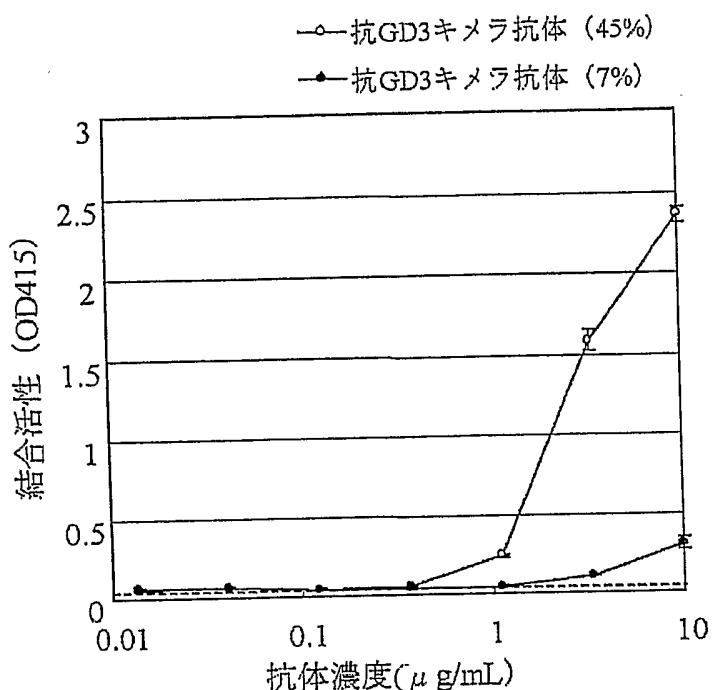
第28図



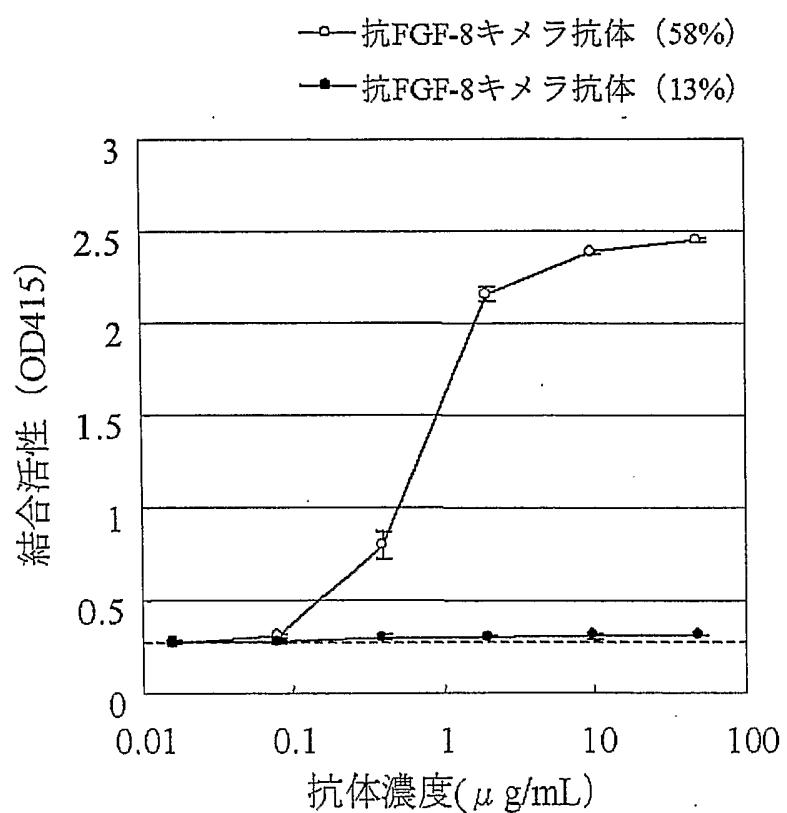
## 第29図



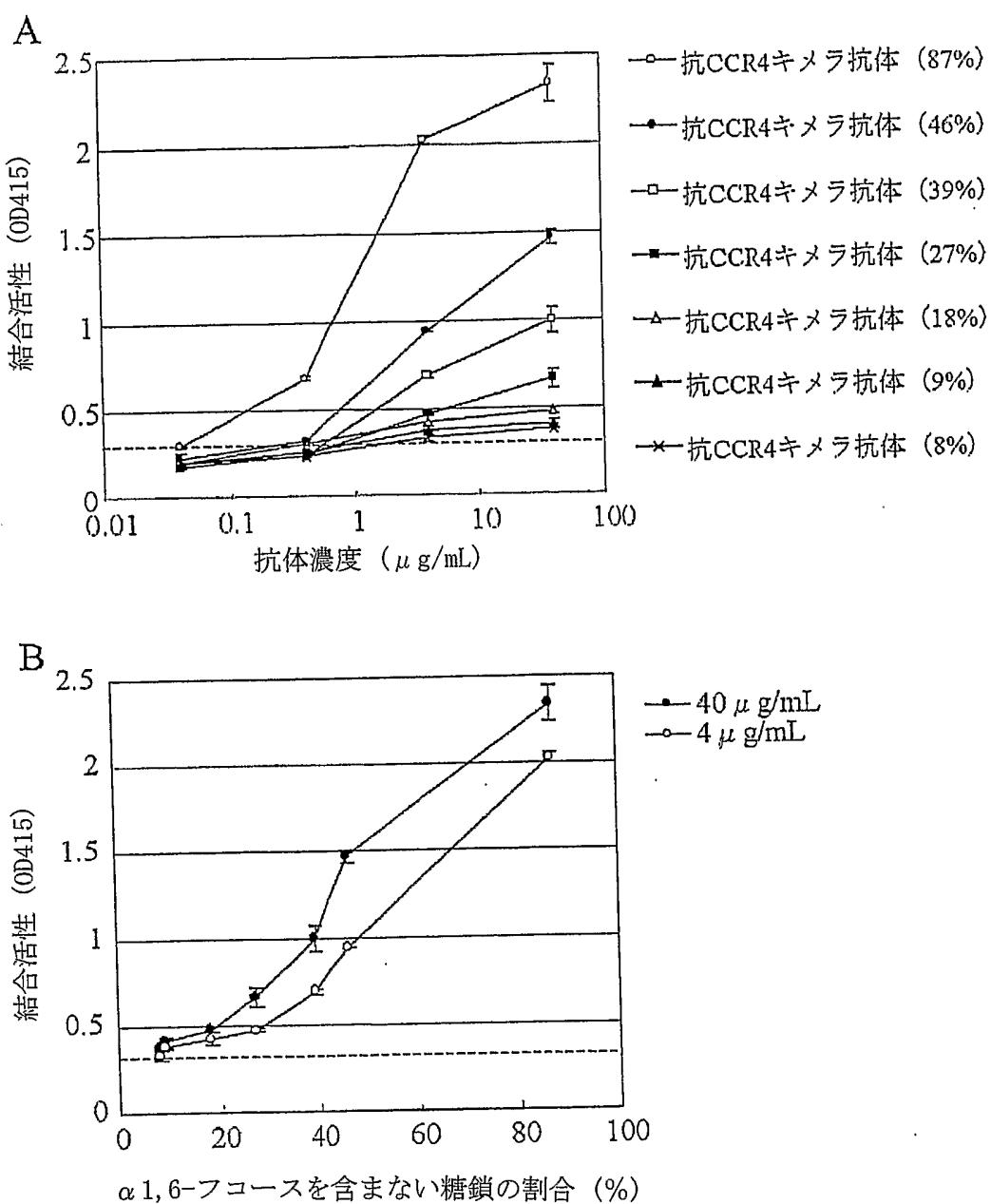
第30図



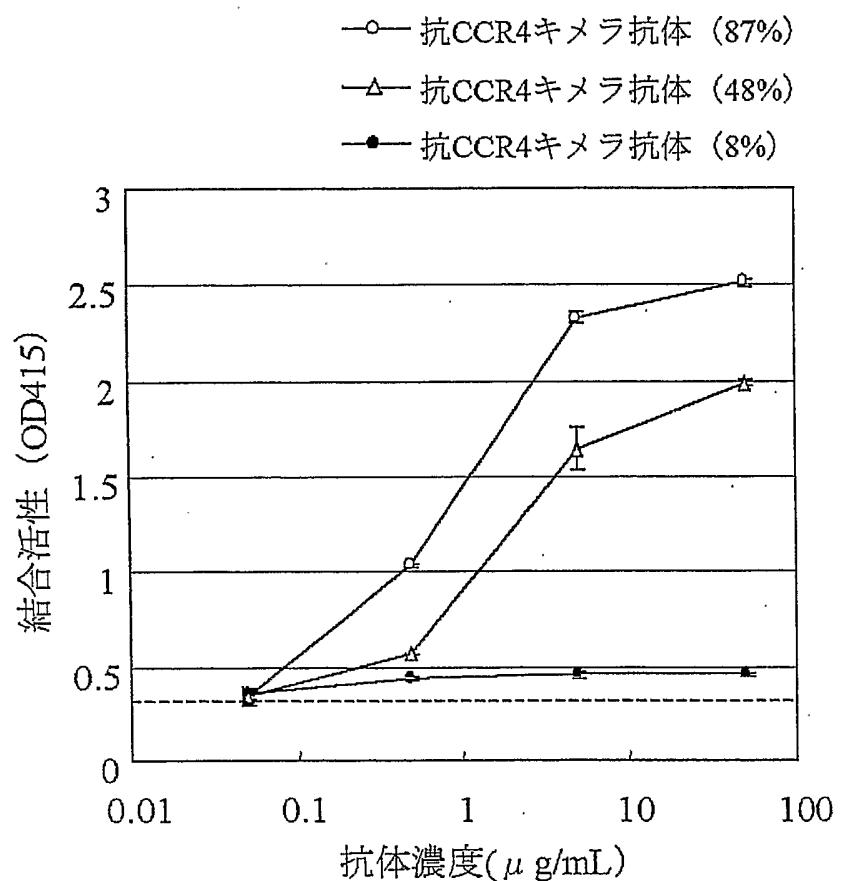
第31図



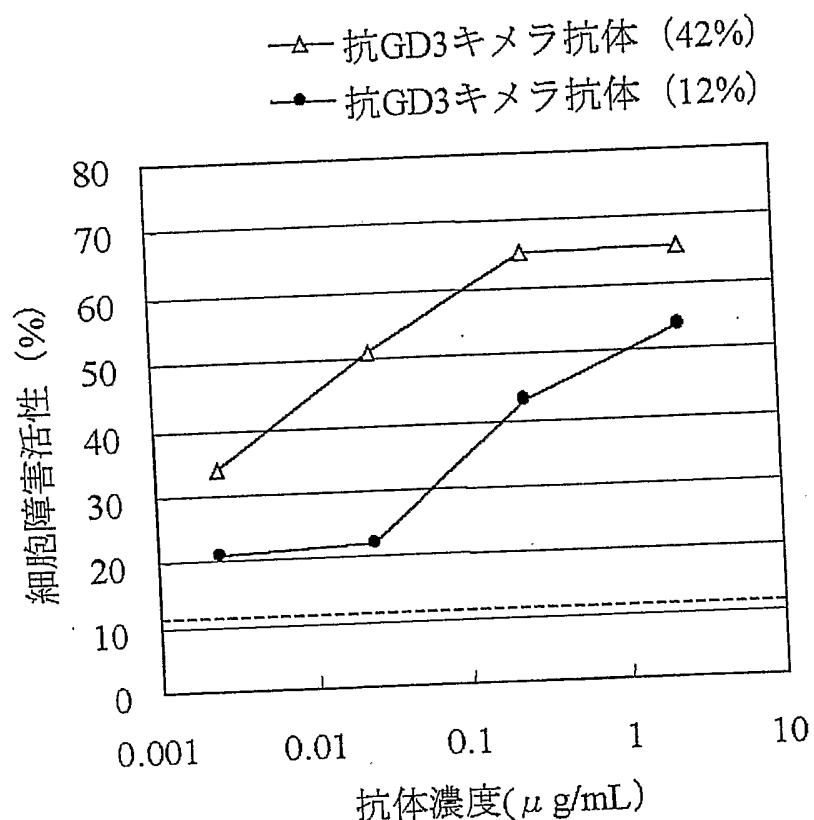
第32図



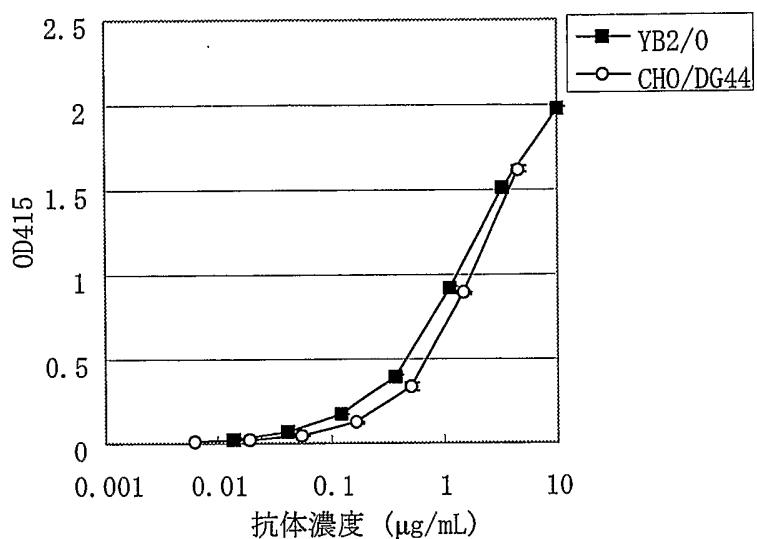
第33図



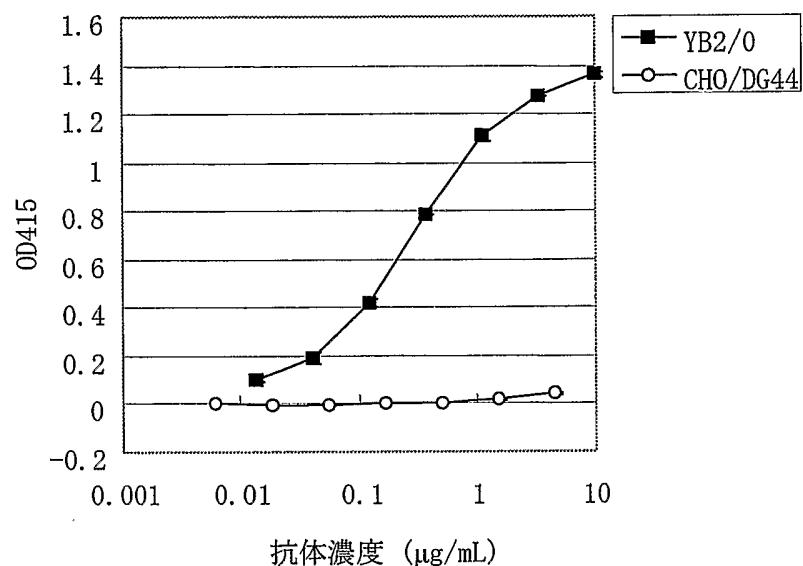
第34図



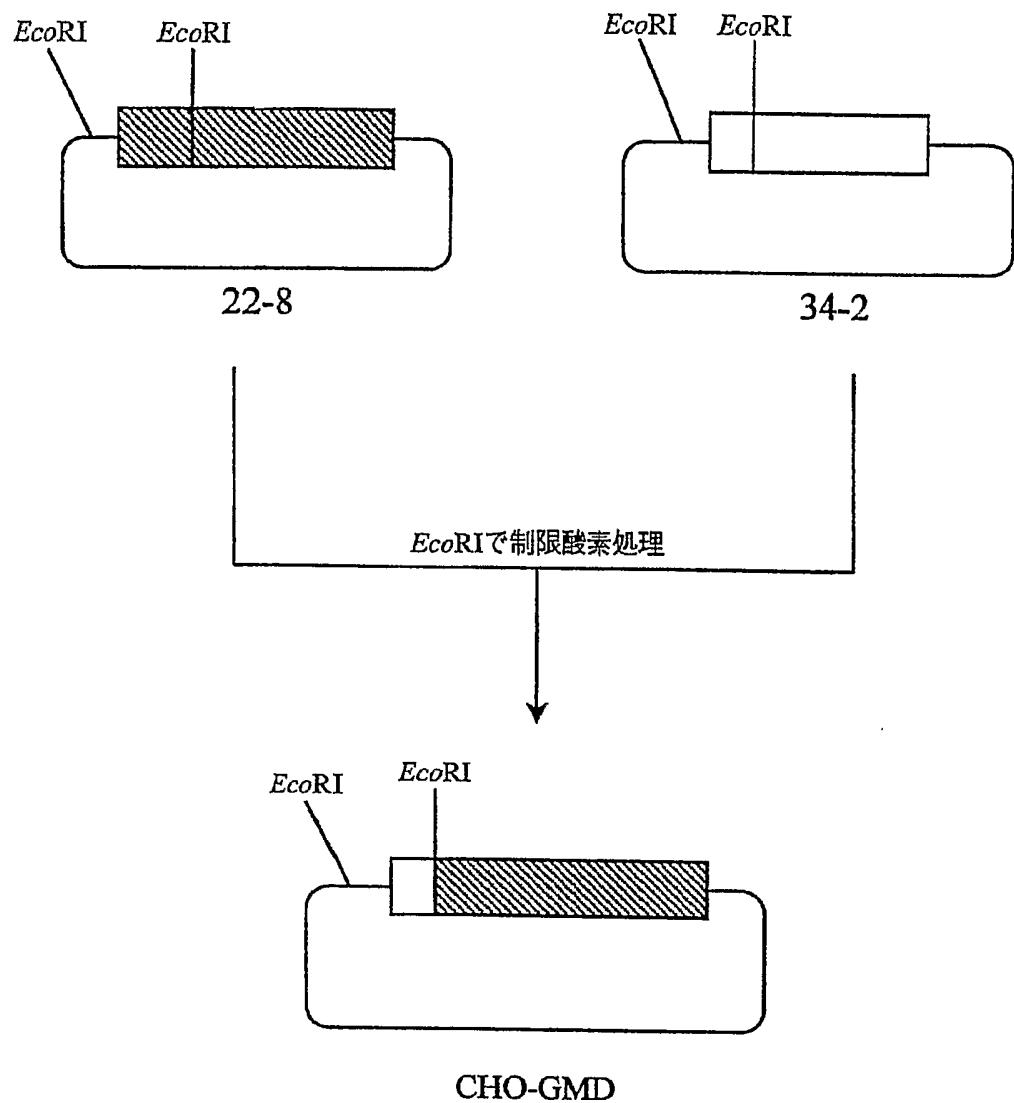
第35図



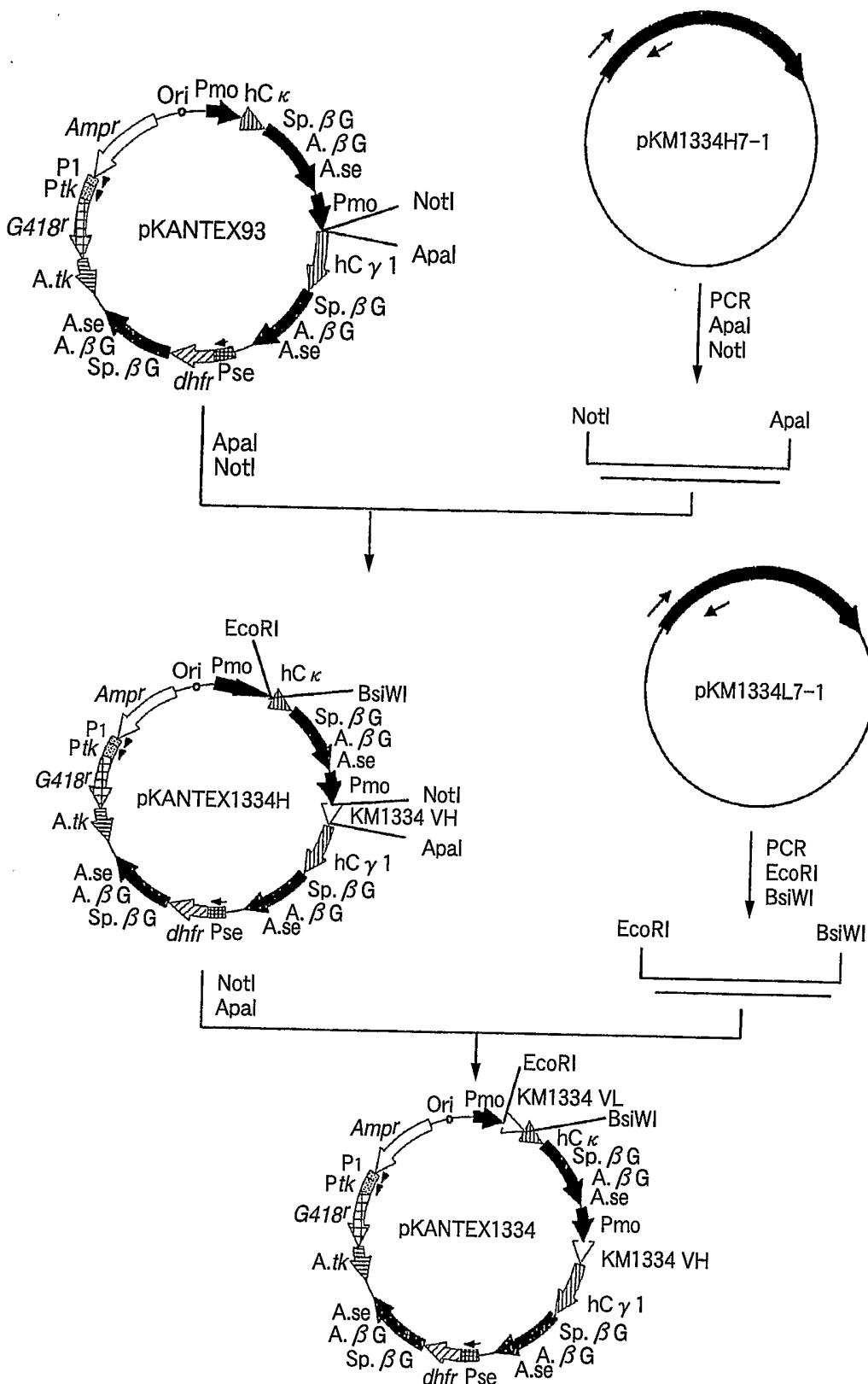
第36図



第37図



第38図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Method of enhancing of binding activity of antibody composition to Fc $\gamma$  receptor IIIa

<130> P044077

<150> P2002-106950

<151> 2002-04-09

<160> 100

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

aacagaaaact tattttcctg tgtggcta ac tagaaccaga gtacaatgtt tccaaatttt 60  
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120  
tggcgttgga ttatgctcat tcttttgcc tggggcacct tattgtttta tataggttgtt 180  
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattcttagca gagaactctc caagatttt 240  
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtcttc 300  
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tggtttagaa 360  
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgtat 420  
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480  
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540  
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtcttatcat gacagatcta 600  
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660  
acagagctgg tccagcggag aataacatct ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720  
agaaaagctgg tatgtatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780  
gtttactgct tcattgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatttgga atctcagaat 840  
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgttaagtga gacatgcaca 900  
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttgct 1020  
 gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080  
 gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag gaaaaatagaa 1140  
 gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattt gagttccatgt cagacgcact 1200  
 gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttcaa 1260  
 gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320  
 actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttattt 1380  
 agtgataact ctatttcttgc gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440  
 cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgc gtgtactttt 1500  
 tcatcccagg tcttagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560  
 gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620  
 attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680  
 atcattggtg tggctggaaa ccatttggaaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740  
 gaaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800  
 cctacatatac ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860  
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920  
 gctccgcacc aagagcaagt ggaaaccctc agatgtgca ctgggtggaaac gcctcttgc 1980  
 gaaggcgtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcggccat ggactgggttc ctggcggtgg attatgctca ttcttttgc ctgggggacc 60  
 ttgttatttt atatagggtgg tcattttgggtt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120  
 agagaactct ccaagattct tgcaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180  
 aggcaaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggccccca ttgaccaggg gacagctaca 240  
 ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300  
 aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360  
 aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaattt aaagcattta 420  
 gaagggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480  
 aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540  
 gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcggaa gaataacata tctccagaat 600  
 cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaaca tcaataaaagg ctgtggctat 660  
 ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattt cttatggcac ccagcgaaca 720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780  
cctgttaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840  
gttaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatacctcg 900  
cctccttact taccactggc tggtccagaa gaccttgcag accgactctt aagagtccat 960  
ggtgcacctg cagtggtgt ggtgtccag tttgtcaaattt acttggattcg tccacaacct 1020  
tgtggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttgc gcttcaaaca tccagttatt 1080  
ggagtcctatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140  
gagttacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200  
aaaaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaag 1260  
tactccaattt atgaatttt tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320  
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttctt ctcacaggct 1380  
gactttcttag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggtt ttgcttatga aatcatgca 1440  
accctgcacatc ctgatgcctc tgcgaacttc catttttgg atgacatcta ctatggaa 1500  
ggccaaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560  
attccaatgg aacctggaga tatcattgtt gtggctggaa accattggaa tggttattct 1620  
aaaggtatca acagaaaaact tgaaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680  
aagatagaaaa cagtcagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

〈210〉 3

〈211〉 9196

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 3

tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacccg cctctgccac ctgagtgcgt 60  
ggattaaagg tgtgcaccac cacccggcgg cgtaaaatca tatttttgaat tatttgtata 120  
atttacatta taattgtaaag taaaaatttt cagcctattt ttttatacat ttttgctaa 180  
attattcttt ttgaaaagg ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240  
ttttgtctat gtatttgcata atatatctat ttaatctctt aatgtccagg aaataaaatag 300  
ggtatgtaat agctcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgcata taagttgtta 360  
cagcaaagtgttattaaatc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420  
atcccttaagc tgccagaact agaattttt ttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480  
ctttctatataatgtggaaag gtggcctca ctaactgatt cttcacctgt ttttagaacat 540  
ggtccaaagaa tggagttatg taagggaat tacaagtgtg agaaaaactcc tagaaaacaa 600  
gatgagtctt gtgacccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaaatg tgtttcatg 660  
ttcccccag gtggatagga gtgagttat ttcaagattat ttattacaac tggctgtgt 720  
tacttgttcaatgtctta tagaaaaaca tattttttt gccacatgca gcttgtcctt 780

atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840  
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900  
cccaccacct ccagagtggt aaacaactg aaccattaaa cagactttag tctttatgg 960  
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggtt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020  
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaaactat ttattaaagt 1080  
agtagacaag acattaaata ttccttggga tttagtgcctt ttgaattttg ctttcaaata 1140  
atagtcagt agtataccccc tccccccattc tatattttag cagaatcag aataaatgg 1200  
gtttctggta cattctttt tagagaattt atttctttg ggaaaaatgtg catttaaagt 1260  
caataaaaat taagttcg taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320  
cagctttctt atttaatctc ttaatgataa ttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380  
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440  
tctataat atgactttc ttccatagct tttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500  
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560  
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620  
tttaaaat acatggccaccc taagggtta actgtgtta gccttcttt ggaattttt 1680  
tttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataataatatt 1740  
tacatcatat ccacctgtaa ttatttagtgt ttttaaatat atttggaaaaa ataatggct 1800  
ggtttgcattt atttgaacct tttgatgtt ggtgtgggtt ccaattgggt gatgggtatg 1860  
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920  
gttgcagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980  
ttcacttata ctgagaactt gttttgcctt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040  
tagccgaatt gattaattat tcaaagatata aatctttaa tccctataaa agaggtatta 2100  
cacaacaatt caagaaagat agaatttagac ttccagttt ggagtgaacc atttggatc 2160  
aggttagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220  
agctaattgt ctttcagcct cttggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280  
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actcttcca cagcatgttag agcccaggaa 2340  
gcacaggaca agaaagctgc ctccctgtat caccaggaag atcttttgc aagagtcatac 2400  
acagtataacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tggtaaaaca acagaaaactt 2460  
atttccctgt gtggcttaact agaaccagag tacaatgtt ccaattctt gagctccgag 2520  
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actgggtcct ggcgttggat 2580  
tatgctcatt cttttgcct gggggacctt attgtttat ataggtggtc atttggttcg 2640  
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttgc caaagctgg 2700  
gchgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggttaggtt 2760  
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgacctt aggtataggg tctcagtctg 2820  
ctgttggaaa atataatttc tacaatccgt ctttgaaaat ttttaagtat tgttagcagac 2880  
ttttttaaaaatg tcagtgatac atcttatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctt 2940  
ttttgcataat gaatcagtat atagaagcag tggcattttat atgctttagt tgcatttaca 3000  
attatgttta gaccaacaca aactttatgt gatttggatt agtgcattt aaattttttt 3060

attctatgga ctacaacaga gacataaaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120  
tgcataaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgc tccggaatgt gggtaattat 3180  
tgccatattt ctagtctact aaaaatttgt gcataactgt tcaaagtcat cagttgttg 3240  
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagataacct 3300  
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360  
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420  
tgcagatatg aagacttga cattagatgt ggttaattggc actaccagca agtggttatta 3480  
agatacagct gaatatattt ctttttggagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540  
tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600  
cttttagaac tcagatgtt catatggtat attgtgttaac tcaccatcag ttttatctt 3660  
aaatgtctat ggtatgataat gttgtatgtt aacactttt caaaaacaaa tgaagccata 3720  
tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780  
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840  
cagggagggt tatgaaagtt gtggctttt aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900  
gatttaggcc ttgctaatacg taactatcat ttattggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960  
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtagc 4020  
tgtttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagttgccc 4080  
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tcttgaatt ctggcagttat ggctacacag 4140  
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgacccaga aaattttatt 4200  
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc tttcccttt tataatttag 4260  
gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320  
tcctttttc ttaccacaaa gtagttgtt tttgtgtat gaaagaaaaat gtgttattgt 4380  
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgccc tcaatcccaa ataaacacac 4440  
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500  
ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatctac 4560  
caaggaaagg gtccaggggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620  
cgatttccta tttgtctctg cttatttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680  
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740  
gactcccccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtagt ctittaaatac 4800  
taattttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860  
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgccagaa gagggaatca gatttttt taagggacaa 4920  
agagtttatt cagattacat tttaagggtga taatgtatga ttgcaagggtt atcaacatgg 4980  
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040  
gatgcatgca ttctgtgtc cagctcactt ttccctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100  
tgcataaaat gctggaaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160  
catctctcca gtcctcata tggtctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220  
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt aaaaaatagt ttttaaaagc tgcataataa 5280  
aatgtaaata caatctgaa cattttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340

gcatggttat ttcccttcat tagggaagta tgtctcccc 5400  
tagtaatgct gtttgacac catccacagg ggtttattt taaagctaag acatgaatga 5460  
tggacatgtc tgtagcatt tagactttt tccttactat aattgagcta gtattttgt 5520  
gctcagttt atatctgtt attcagataa atgtaatagt aggttaattt tttgtgataa 5580  
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttt agattcagaa 5640  
caataattt caaaagcagt tacccaaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700  
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgattttt 5760  
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtt tggctgaaa catcttgac 5820  
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tggttggcca aaatcttgtt ccattctggg 5880  
tttcttcct atcttaggt tagcacaag ttaaaggtt ggttagtattt gaaggctc 5940  
aggtatataat ttctatattt tgtattttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttt 6000  
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttcttggga ttattttgc 6060  
tggtaaaga tttcttagca agttcatatc actgattttt acagttgctt cttttgtaat 6120  
atagactgaa tgcccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaactttc 6180  
tttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240  
gaaatgcctt gaaatctgaa acttttagag tgataaaagct tccctttaaa ttaatttg 6300  
ttctataattt tttgacaatg tcaacccctt attgttatcc aatgagtgaa catatttca 6360  
attttttgt ttgatctgtt atatttgat ctgaccatattt ttataaaattt ttatthaattt 6420  
tgaatgtgt gctgttactt atctttattt ttattttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480  
attatattct gtattttttt agtttgaattt ttactttgtg gcttagtaac tgcctttgt 6540  
tggtaatgc ttaagaaaaa cgtgtggct actgatattt gttctaatct tatatacgat 6600  
gttgggtttt aggttagtttga ttatgtgtt cagattgtct tgagttttagt caaatgtaaa 6660  
atatttagat gcttgggtttt tggtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720  
ctgggttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaataactaac tccgtactat 6780  
cttgggtttct gtgaattaac ccctttcaa aggtttctt tctttttttt tttaaggac 6840  
aacaagtttta ttcagatttcc attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900  
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatca catccacatg gagtcaagag cagagacgag 6960  
tgaattaatg catgcattcc tgggtcagc tcactttcc tattcttaga tagtcttagga 7020  
tcataaaacct gggaaatgtt gctaccacaa tggcatatc cacttacttcc agttcatgca 7080  
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140  
ccagatgattt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcaacta 7200  
gttaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgatccctt tggttattgtt 7260  
gattttgtga agtttctt caagtccctg ttccttcattt aaaaacctgt ttttttagtta 7320  
aatagttttt ttagtgttcc tgggtgttcaaa tacttttttta aagtttagata ttattttcaa 7380  
gtatgttctc ccagtctttg gcttgttattt tcattccctt aatacatata tttttgtat 7440  
ttatttttt tatttaaattt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500  
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agcccaattt ccaactccctt tcttctcccc 7560  
aggaagggtt agggccctcca tggggaaat cttcaatgtc tggcatatca tttggagcag 7620

ggcctagacc ctccccagtgttgtctaggct gagagagttat ccctctatgt ggagagggct 7680  
cccaaagttc atttgtgtac tagggtaaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740  
tgtccggacc tccaaactga ctteccctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800  
tcccagatat cagtcgggg tccatgagca acccccttggtt caggtcagtt gtttctgttag 7860  
gtttccccag cccggctttgc acccccttgtc tcatacttc tccctctctg caactggatt 7920  
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcattc tgcttccatc agctactgga 7980  
tgagggctct aggatggcat ataaggttagt catcagtctc attatcagag aagggtttt 8040  
aaggttagcct cttgatttatt gtttagattt tttagttgggg tcaaccttgtt aggtctctgg 8100  
acagtgcacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtgta tccctttct 8160  
tgctctcatc cgttcccccctc ctgactagat cttccctgctc cctcatgtcc tccctcccc 8220  
tccccttctc cccttctttt tcttctaact ccctctcccc tccacccacg atccccatttt 8280  
gcttatgaga tcttgcctt attttagcaa aaccttttg gctataaaaat taattaattt 8340  
aatatgccta tatcagggtt atttggcta gtatttgat gtgtttgggtt agtgtttta 8400  
accttaattt acatgtatcc ttatatttag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460  
ttttttttt ttaaagattt atttttttt tatgtcttct gcgtgcattc cagaagagg 8520  
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctggaa ttgaactcag 8580  
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640  
gtttctttta aagaggatag cagtgcattca tttttccctt tgaccaatga ctcctacatt 8700  
actgaattgt ttagccatt tataatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttac 8760  
ttgctaaatt tctccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgtggta ttatataggc 8820  
ttttttttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatittt tggaatgggt 8880  
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacccat gtgctgaccc ggtctggcc agaagaaggt 8940  
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gcttaggaatc 9000  
aaaccccccac tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060  
caggtgatgc caactttaa tggattaccag tggataagag tgcttgatc tctagcaccc 9120  
atgaaaattt atgcattgct atatggcattt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180  
aggatcccaa gagctc 9196

210 4

<211> 25

〈212〉 DNA

### <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg 25

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

cttgaccgtt tctatcttct ctcg 24

<210> 6

<211> 979

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 6

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgttag 60  
acctgttaagt gagacatgca cagacaggc tggcctctcc actggacact ggtcaggta 120  
agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gttagacagcc tccatcctcg 180  
tcctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgcgatcgactcc tgagagtcca 240  
tggtgatccct gcagtgttgtt gggtatccca gtttgtcaaa tacttgatecc gtccacaacc 300  
ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360  
tggagtcctat gtcagacgccttgcataaactt ccatttttc gacgcagaa tgaaagtgg 420  
gaaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagtttcgatggaa tgaaagtgg 480  
taaaaaaaaga gtgtatctgg ccactgtatgc cccttcttgc ttaaaggagg caaagacaaa 540  
gtactccat tatgaatttta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600  
ccgatacaca gaaaatttcac ttccggcggt gatcctggat atacacttcc tctccaggc 660  
tgacttcctt gtgtgtactt tttcatccca ggtctgttagg gttgctttagt aaatcatgca 720  
aacactgcat cctgatgccttgcataaactt ccatttttgc gatgacatct actatgg 780  
aggccaaaat gcccacaacc agattgcagt ttatccac caacctcgaa ctaaagaggg 840  
aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctggaa aaccattggaa atggttactc 900  
taaagggtgtc aacagaaaac taggaaaaac aggctgtac cttcctaca aagtccgaga 960  
gaagatagaa acggtaag 979

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

actcatcttgcagaatctcagaattggcgctatgtactgggtggatgggaga ctgtgttttag 60  
acctgttaagt gagaatgcacagacatgcacagacatgtccactggacact ggtcagggtga 120  
agtgaatgac aaaaatatttc aagtggtgaa gtcggccatt gttagacagcc ttcatcctcg 180  
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agacattgcagatcgactcg taagagtcca 240  
tgggtatcct gcagtgtgggt ggggtgtccca gttcgtcaaa tatttgatttgc 300  
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtc 360  
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggAACAGAG gcagccttccatccatcg 420  
agagtacatg gtacatgttgc 480  
aaaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgcttgc 540  
gtactccaat tatgaatttataatgtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600  
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacacttgc 660  
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720  
aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccacttttgc 780  
aggccaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840  
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900  
taaaggtgtc aacagaaaaac ttggaaaaac aggcttataat ccctcctaca aagtccgaga 960  
gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

aagtataagcttacatggat gacgatatcg ctgcgcgtcgt

40

<210> 9  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9  
attnaactgc aggaagcatt tgcgggtggac gatggagggg 40

<210> 10  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10  
attnaaggta ccgaagcatt tgcgggtgcac gatggagggg 40

<210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11  
ctccaatttat gaatttatta gtg 23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggatgttga agccaagctt cttgg

25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gtccatggtg atcctgcagt gtgg

24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gatatcgctg cgctcggtt gt cgac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagc

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gatatcgctg cgctcggtcgt cgac

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 19

Met	Gly	Glu	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Ser
1		5							10					15	
Gly	Leu	Val	Gly	Arg	Ala	Ile	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Gly	Ala	Gly
									20					30	
Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Trp	Val	Phe	Val	Ser	Ser	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu
									35					45	
Thr	Asp	Ala	Ala	Gln	Thr	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Lys	Val	Gln	Pro	Thr
									50					60	
His	Val	Ile	His	Leu	Ala	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Leu	Phe	Arg	Asn	Ile
								65					80		
Lys	Tyr	Asn	Leu	Asp	Phe	Trp	Arg	Lys	Asn	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn
								85					95		
Val	Leu	His	Ser	Ala	Phe	Glu	Val	Gly	Thr	Arg	Lys	Val	Val	Ser	Cys
								100					110		
Leu	Ser	Thr	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Lys	Thr	Thr	Tyr	Pro	Ile	Asp	Glu
								115					125		
Thr	Met	Ile	His	Asn	Gly	Pro	Pro	His	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Tyr	Ser
								130					140		
Tyr	Ala	Lys	Arg	Met	Ile	Asp	Val	Gln	Asn	Arg	Ala	Tyr	Phe	Gln	Gln
								145					160		
His	Gly	Cys	Thr	Phe	Thr	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Asn	Val	Phe	Gly	Pro
								165					175		
His	Asp	Asn	Phe	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	His	Val	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile
								180					190		
His	Lys	Val	His	Leu	Ala	Lys	Ser	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Trp
								195					205		

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala  
 210                    215                    220  
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile  
 225                    230                    235                    240  
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala  
 245                    250                    255  
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260                    265                    270  
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275                    280                    285  
 Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290                    295                    300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305                    310                    315                    320  
 Lys

<210> 20

<211> 590

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 20

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

115	120	125
Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met		
130	135	140
Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp		
145	150	155
Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu		
165	170	175
Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly		
180	185	190
Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His		
195	200	205
Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser		
210	215	220
Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe		
225	230	235
Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His		
245	250	255
Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser		
260	265	270
Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys		
275	280	285
Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala		
290	295	300
Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser		
305	310	315
His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr		
325	330	335
Pro Leu Asn Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly		
340	345	350
Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln		
355	360	365
Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val		
370	375	380
Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn		
385	390	395
Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu		
405	410	415
Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val		

420	425	430
Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser		
435	440	445
Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met		
450	455	460
Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met		
465	470	475
Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn		
485	490	495
Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser		
500	505	510
Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser		
515	520	525
Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro		
530	535	540
Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu		
545	550	555
Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu		
565	570	575
Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser		
580	585	590

<210> 21  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe Thr Gln His Val Arg Glu  
1               5               10               15  
Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Cys  
20               25

<210> 22  
<211> 32  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

taaatagaat tcggcatcat gtggcagctg ct

32

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 23

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr  
65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln  
85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His  
100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe  
115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu  
130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu  
145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala  
165 170 175

Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln

180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		
225	230	235
240		
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu		
245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val		
275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu		
290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His		
305	310	315
320		
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile		
325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys		
340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp		
355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val		
370	375	380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp		
385	390	395
400		
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu		
405	410	415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile		
420	425	430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg		
435	440	445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val		
450	455	460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln		
465	470	475
480		
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile		

485	490	495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro		
500	505	510
His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile		
515	520	525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn		
530	535	540
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu		
545	550	555
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys		
565	570	575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
165	170	175	
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
180	185	190	
Gly Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg			
195	200	205	
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu			
210	215	220	
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr			
225	230	235	240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
245	250	255	
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu			
260	265	270	
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val			
275	280	285	
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
290	295	300	
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His			
305	310	315	320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
325	330	335	
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
340	345	350	
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
355	360	365	
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
370	375	380	
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu			
405	410	415	
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile			
420	425	430	
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg			
435	440	445	
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val			

450	455	460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln		
465	470	475
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile		
485	490	495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro		
500	505	510
His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile		
515	520	525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn		
530	535	540
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu		
545	550	555
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys		
565	570	575

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys			
1	5	10	15
Pro Cys			

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

aataaaaggat cctgggtca tttgtcttga gggt

34

<210> 27

<211> 788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (774)

<400> 27

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu

1 5 10

cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96

Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val

15 20 25

ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144

Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr

30 35 40

ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192

Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp

45 50 55 60

ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240

Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile

65 70 75

gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288

Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn

80 85 90

ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336

Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp

95 100 105

ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384

Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile

110 115 120

cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432

His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr

125	130	135	140
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480			
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp			
145	150	155	
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528			
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys			
160	165	170	
agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576			
Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile			
175	180	185	
acc atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca 624			
Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro			
190	195	200	
cct ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca 672			
Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala			
205	210	215	220
gtg gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca 720			
Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser			
225	230	235	
aca aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa 768			
Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln			
240	245	250	
gac aaa tga ccc cag gat cc 788			
Asp Lys			

<210> 28  
<211> 254  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala  
1 5 10 15  
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
20 25 30  
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
35 40 45

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

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

tgttggatcc tgtcaatgat gatgatgatg atgaccttga gtgatggta t

51

<210> 30

<211> 620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(609)

<400> 30

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48  
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu  
1 5 10

cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96  
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val  
15 20 25

ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144  
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr  
30 35 40

ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192  
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp  
45 50 55 60

ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240  
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile  
65 70 75

gac get gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288  
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn  
80 85 90

ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336  
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp  
95 100 105

ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384  
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile  
110 115 120

cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432  
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr

125	130	135	140
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480			
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp			
145	150	155	
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528			
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys			
160	165	170	
agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576			
Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile			
175	180	185	
acc atc act caa ggt cat cat cat cat tga cag gat cc 620			
Thr Ile Thr Gln Gly His His His His His			
190	195		

<210> 31  
 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31			
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala			
1	5	10	15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro			
20	25	30	
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln			
35	40	45	
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu			
50	55	60	
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr			
65	70	75	80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu			
85	90	95	
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln			
100	105	110	
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys			
115	120	125	
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn			

130                    135                    140  
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
145                    150                    155                    160  
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe  
165                    170                    175  
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
180                    185                    190  
Gly His His His His His  
195

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

aggaagggtgg cgctcatcac gggc

24

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

taaggccaca agtcttaatt gcatcc

26

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

caggggttgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

cccttcacgc atgaaggctg gag

23

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

ggcaggagac caccttgcga gtgccac

28

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

ggcgctggct tacccggaga ggaatggg

28

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg

28

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

cgcggatcct caagcggtgg ggttgggtcc

29

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

cccaagcttg ccaccatggc tcacgctccc gcttagctgcc cgagc

45

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

ccggaattct gccaaagtatg agccatcctg g

31

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gccatccaga aggtgg

17

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43  
gtcttgcag ggaagat 17

<210> 44  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44  
ggcaggagac caccttgcga gtgcccac 28

<210> 45  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45  
gggtgggctg taccttctgg aacagggc 28

<210> 46  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46  
ggcgctggct taccggaga ggaatggg 28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

ggaatgggtg tttgtctcctc caaagatgc

28

<210> 48

<211> 1316

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 48

cccccgcccc ctccacactgg accgagaga gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60  
tggactggtg gaaccctcgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120  
gatcctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180  
tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240  
ggatgcagca caaaccgaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcataccatct 300  
tgctgcaatg gtaggggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360  
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagcttc gaggtggca ctcgcaaggt 420  
ggtctccitgc ctgtccacact gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480  
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgatg ccaagaggat 540  
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcacccatca ctgctgtcat 600  
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660  
tggcctcatc cataagggtgc atctggccaa gagtaatgggt tcagccatgca ctgtttgggg 720  
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcactggac ctagccggc tcttcatctg 780  
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtggcg aggaagatga 840  
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaaatg 900  
cactttgtat tcaacaaatg cagatggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960  
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020  
tgcctgggttc accgacaact atgagcagggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080

tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca ttgcttgta aagaactgag 1140  
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200  
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaaggc cagaccaaca ccttgttgt 1260  
ctgcttctgc cccaacctca gtgcattccat gctggcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

gatcctgctg ggaccaaaat tgg

23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg

22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 51

acggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgct cgaagcgagc ctgcggaaagc 60  
tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tggaaattc tggatgttag 120

ttgttaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcgaga 180  
agctgaagag aaaggaattg ccccttggag ttaactacca tgtttcact gatcctcctg 240  
gaaccaaaat tggaaatgga ggatcaacac ttgttctct tcagtgcctg gaaagccct 300  
atggagacaa gtgaaattcc ttcacagtcc tgttaattca ctctggtggc tacagtcaac 360  
gacttccaa tgcaagcgct ttagaaaaa tcttcacggc ttaccactt ggtgagccca 420  
tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcatgaagc 480  
ctggagttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540  
ccattgcatt tgagcagcct ggcttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgttag 600  
gcaccacaca tggagtattt gtattggact ctgcccgttc ttgcaacat ggtgacctag 660  
agtacaggca atgccaccgt ttcctccata agcccagcat tggaaacatg caccacttta 720  
atgcccgtca tagacttagga agctttggc aacaggactt gagtggggt gacaccacct 780  
gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840  
cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgttaggccc actgaactgt gaaatagatg 900  
cctatggta ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960  
cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tggacat gaggcagaaa atattccacc 1020  
tcctcaaggg aacacccctg aatgttggc tccttaataa ctccaggttt ttcacattt 1080  
gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca ctccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140  
gcttgcaatc catagcttc agtgtcttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200  
cctgtgtcat tcacagcatc ctgaatttag gatgctgtgt ggccctggc tcagtggtag 1260  
aatattccag attaggacat gaggtgtcca tctcgaaaaa ctgcattatc agcggtctg 1320  
tcatagaaaa agctgttctg cccccatgtt cttcgtgtg ctcttaagt gtggagataa 1380  
atggacactt agaataattca actatgggt ttggcatgga agacaacttg aagaacagt 1440  
ttaaaaccat atcagatata aagatgcttc agttcttgg agtctgttcc ctgactgtt 1500  
tagatatttgc aaccttaaa gctatggaag aactatttc aggaagtaag acgcagctga 1560  
gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttctctct gaggtagtc gttgcagcat 1620  
cccttggat gttaaatgcc attcgaaacc attccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680  
tgctgtccat ccagggaaatg cttctctgca aagatgttagg agacatgctt gcttacaggg 1740  
agcaacttctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatctaaa 1800  
tacaatggat ttgcctgga aacaggatttgc caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860  
gttcttctt ctttctcccc tctctcctt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920  
aaatggccac ttctgtatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52

caggggtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

cactgagcca ggggccacac agcatcc

27

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

ccctcacgc atgaaggctg gag

23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55  
tgccaccgtt tcctccataa gcccagc 27

<210> 56  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56  
atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga 28

<210> 57  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57  
tcaaggcgttt gggttggtcc tcatgag 27

<210> 58  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

tccggggatg gcgagatggg caagc

25

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

cttgacatgg ctctgggctc caagc

24

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60

ccacttcagt cggtcggtag tattt

25

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61

cgctcaccccg cctgaggcgatgc

24

<210> 62  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62  
ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc 32

<210> 63  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63  
ggggccatgc caaggactat gtcg 24

<210> 64  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64  
atgtggctga tgttacaaaa tgatg 25

<210> 65

&lt;211&gt; 1504

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1119)

&lt;400&gt; 65

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac	48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp	
1                  5                  10                  15	
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc	96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr	
20                  25                  30	
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac	144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr	
35                  40                  45	
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga	192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg	
50                  55                  60	
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg	240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met	
65                  70                  75                  80	
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac acc tgc cta gta aaa atc	288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile	
85                  90                  95                  100	
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc	336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser	
105                110                115	
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat	384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp	
120                125                130	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt	432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu	
135                140                145	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga	480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly	

150	155	160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg			528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac			576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
185	190	195	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat			624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
200	205	210	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc			672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
215	220	225	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg			720
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu			
230	235	240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc			768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val			
245	250	255	260
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc			816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val			
265	270	275	
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca			864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser			
280	285	290	
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat			912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn			
295	300	305	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat			960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp			
310	315	320	
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc			1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys			
325	330	335	340
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac			1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp			
345	350	355	
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc			1104

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr  
360 365 370  
aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg 1159  
Asn Pro Asn Ala  
375  
cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219  
cctgtgtcgt ccccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279  
actccagagc taaggccact tcgctttgt caaaggctcc tctcaatgat tttggaaat 1339  
caagaagttt aaaatcacat actcattta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat 1399  
ttttgagtct tgagattgtt tttctcttt cttattaaat gatcttcta tgaccagca 1459  
aaaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaaaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66

atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67

<211> 59

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 67

ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

accttggata gaaaggggtg gtctc 25

<210> 70

<211> 125

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 70

ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60

ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120

agaaaa 125

<210> 71

<211> 376

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 71

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp

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

310	315	320
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys		
325	330	335
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp		
345	350	355
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr		
360	365	370
Asn Pro Asn Ala		
375		

<210> 72  
 <211> 420  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(420)

<400> 72		
atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48		
Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly		
1	5	10
15		
gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96		
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg		
20	25	30
.		
ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144		
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
35	40	45
.		
act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192		
Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu		
50	55	60
.		
gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240		
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn		
65	70	75
80		
gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288		
Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser		

85	90	95	
aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc			336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc			384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val			
115	120	125	
tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca			420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr			
130	135	140	

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 73

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

<210> 74  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(393)

<400> 74

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
1                       5                       10                       15	
tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
20                      25                      30	
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu	
35                      40                      45	
gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct	192
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
50                      55                      60	
ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser	
65                      70                      75                      80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85                      90                      95	
ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys	
100                    105                    110	
ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg	384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu	
115                    120                    125	
gaa ata aaa	393
Glu Ile Lys	
130	

<210> 75

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Met Phe Trp Ile Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu  
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser  
65 70 75 80

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys  
100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Asp Tyr Tyr Leu Asn

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

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

1

5

10

15

Gly

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr

1

5

10

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

1

5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 81  
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 82  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 82  
ctgaattcgc ggccgctagt cc 22

<210> 83  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 83  
atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag 39

<210> 84  
<211> 22  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 84

ctgaattcgc ggccgctgct gt

22

<210> 85

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 85

atcgtagtt ttatttccag cttgggtcc

28

<210> 86

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 86

ttgttggtag cgaattcttt cagggccccg gagcccccag agcccaaatac ttgtgac

57

<210> 87

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 87

gcgaattcca ccatggcag ccccgctcc g

31

<210> 88

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 88

cgggatccct atcggggctc cggggcccaa gt

32

<210> 89

<211> 1341

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 89

atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg 48  
Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu  
1 5 10 15

gtt ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt 96  
Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe  
20 25 30

aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc 144  
Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg  
35 40 45

cgc ctc atc cgg acc tac cag ctc tac agc cgc acc agc ggg aag cac 192  
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His

50	55	60	
gtg cag gtc ctg gcc aac aag cgc atc aac gcc atg gca gaa gac gga			240
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly			
65	70	75	80
gac ccc ttc gcg aag ctc att gtg gag acc gat act ttt gga agc aga			288
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg			
85	90	95	
gtc cga gtt cgc ggc gca gag aca ggt ctc tac atc tgc atg aac aag			336
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys			
100	105	110	
aag ggg aag cta att gcc aag agc aac ggc aaa ggc aag gac tgc gta			384
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val			
115	120	125	
ttc aca gag atc gtg ctg gag aac aac tac acg gcg ctg cag aac gcc			432
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala			
130	135	140	
aag tac gag ggc tgg tac atg gcc ttt acc cgc aag ggc cgg ccc cgc			480
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg			
145	150	155	160
aag ggc tcc aag acg cgc cag cat cag cgc gag gtg cac ttc atg aag			528
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys			
165	170	175	
cgc ctg ccg cgg ggc cac cac acc acc gag cag agc ctg cgc ttc gag			576
Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu			
180	185	190	
ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg			624
Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg			
195	200	205	
act tgg gcc ccg gag ccc cga gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac			672
Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
210	215	220	
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc			720
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc			768
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
245	250	255	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag			816

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
260	265	270	
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag			864
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
275	280	285	
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc			912
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
290	295	300	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag			960
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc			1008
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
325	330	335	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc			1056
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
340	345	350	
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg			1104
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
355	360	365	
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat			1152
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
370	375	380	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc			1200
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
385	390	395	400
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg			1248
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
405	410	415	
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg			1296
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
420	425	430	
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa			1341
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	

<211> 447  
<212> protein  
<213> homo sapiens

<400>90

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

260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210> 91

<211> 1245

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 91

gaacttcacc	caagccatgt	gacaattgaa	ggctgtaccc	ccagacccta	acatcttgga	60
gccctgtaga	ccagggagtg	cttctggccg	tgggtgacc	tagctttct	accaccatga	120
acagggcccc	tctgaagcgg	tccaggatcc	tgcgcattgc	gctgactgga	ggctccactg	180
cctctgagga	ggcagatgaa	gacagcagga	acaagccgtt	tctgctgcgg	gcgctgcaga	240
tcgcgcgtgt	cgtctctctc	tactgggtca	cctccatctc	catggtattc	ctcaacaagt	300
acctgctgga	cagccctcc	ctgcagctgg	atacccstat	cttcgtcaact	ttctaccaat	360
gcctggtgac	ctctctgctg	tgcaagggcc	tcagcactct	ggccacactgc	tgccctggca	420

cggttgactt ccccacccctg aacctggacc ttaagggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt	480
cggtagtctt cattggcatg ataagttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg	540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgtcaa tgtgcttctg tcctacatgc	600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attgggtggtt	660
tctggctggg tatagaccaa gagggagctg agggcaccct gtccctata ggcaccatct	720
tcgggggtct ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgecat ctataccaag aagggtgtcc	780
cagcagtggaa caacagcatc tggcgcttaa ccttctataa caatgtcaat gcctgtgtc	840
tcttcttgc cctgatggtt ctgctgggtg agctccgtgc cctccttgcac tttgctcatc	900
tgtacagtgc ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctcttcggc tttgccattg	960
gctatgtgac aggactgcag atcaaattca ccagttccct gaccacaaat gtatcaggca	1020
cagccaaggc ctgtgcgcag acagtgttgg ccgtgtctta ctatgaagag actaagagct	1080
tcctgtgttg gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctcagcctat acctgggtca	1140
ggggctggga gatgcagaag acccaagagg accccagctc caaagagggt gagaagagtg	1200
ctattggggt gtgagctct tcaggaccc gggactgaac ccaag	1245

<210> 92

<211> 365

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 92

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu Arg Met Ala Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Gly Gly Ser Thr Ala Ser Glu Glu Ala Asp Glu Asp Ser Arg Asn

20	25	30
----	----	----

Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu

35	40	45
----	----	----

Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu

50	55	60
----	----	----

Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu Ala

85	90	95
----	----	----

Thr Cys Cys Pro Gly Thr Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp Leu

100	105	110
-----	-----	-----

Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met

115	120	125
-----	-----	-----

Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr  
 130                    135                    140  
 Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly  
 165                    170                    175  
 Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala Glu  
 180                    185                    190  
 Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu  
 195                    200                    205  
 Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala Val  
 210                    215                    220  
 Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys  
 225                    230                    235                    240  
 Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu Arg Ala Leu  
 245                    250                    255  
 Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met Thr  
 260                    265                    270  
 Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln  
 275                    280                    285  
 Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys  
 290                    295                    300  
 Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys  
 305                    310                    315                    320  
 Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser Ser  
 325                    330                    335  
 Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu Asp  
 340                    345                    350  
 Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val  
 355                    360                    365

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 1095

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 93

atgaataggg cccctctgaa	60
gcgggtccagg atcctgcaca	
tggcgctgac cggggccta	
gaccctctg cagaggcaga	120
ggccaacggg gagaagccct	
ttctgctgctg ggcattgcag	
atcgcgctgg tggtctccct	180
ctactgggtc acctccatct	
ccatggtgtt ccttaataag	
tacctgctgg acagcccc	240
cctgcggctg gacacccc	
tcttcgtcac cttctaccag	
tgcctggtga ccacgctgct	300
gtgcaaaggc ctcagcgctc	
tggccgcctg ctgcccgtt	
gccgtggact tccccagctt	360
gcgcctggac ctcagggtgg	
cccgccagcg cctgccttgc	
tcgggtgtct tcatcgccat	420
gatcaccc	
aataacctct gcctcaagta	
cgtcggtgt	
gccttctaca atgtggccg	480
ctcactcacc accgtctca	
acgtgtctgt ctcctacctg	
ctgctcaagc agaccaccc	540
cttctatgcc ctgctcacct	
gcccgtatcat catcgcccc	
ttctggcttg gtgtggacca	600
ggagggggca gaaggcaccc	
tgtcggtgtt gggcaccgtc	
ttcggcgtgc tggttagcct	660
ctgtgtctcg ctcaacgcca	
tctacaccac gaaggtgctc	
ccggcggtgg acggcagcat	720
ctggcgccctg actttctaca	
acaacgtcaa cgcctgcata	
ctcttcctgc ccctgctcct	780
gctgctcggg gagcttcagg	
ccctgcgtga cttingccag	
ctggcagtgc cccacttctg	840
ggggatgatg acgctggcg	
gcctgtttgg cttingccatc	
ggctacgtga caggactgca	900
gatcaagttc accagtcgc	
tgacccacaa tgtgtcgcc	
acggccaagg cctgtcccc	960
gacagtgcg cccgtgtct	
actacgagga gaccaagagc	
ttcctctgtt ggacgagcaa	1020
catgatggt ctggcggtt	
cctccgccta cacctgggtc	
agggctggg agatgaagaa	1080
gactccggag gagcccagcc	
ccaaagacag cgagaagagc	
gccatggggg tgtga	1095

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 364

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 94

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu His Met Ala Leu

1 5 10 15

Thr Gly Ala Ser Asp Pro Ser Ala Glu Ala Glu Ala Asn Gly Glu Lys

20 25 30

Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu Tyr

35 40 45

Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu Asp

50 55 60

Ser Pro Ser Leu Arg Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr Gln

65 70 75 80

Cys Leu Val Thr Thr Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Ala Leu Ala Ala

85	90	95
Cys Cys Pro Gly Ala Val Asp Phe Pro Ser Leu Arg		
100	105	110
Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe	Ile	
115	120	125
Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val	Ala Phe Tyr Asn	
130	135	140
Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu	Leu Ser Tyr Leu	
145	150	155
Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu	Thr Cys Gly Ile	
165	170	175
Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Val Asp Gln Glu	Gly Ala Glu Gly	
180	185	190
Thr Leu Ser Trp Leu Gly Thr Val Phe Gly Val Leu	Ala Ser Leu Cys	
195	200	205
Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Thr Lys Val Leu	Pro Ala Val Asp	
210	215	220
Gly Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val	Asn Ala Cys Ile	
225	230	235
Leu Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Glu Leu Gln	Ala Leu Arg	
245	250	255
Asp Phe Ala Gln Leu Gly Ser Ala His Phe Trp Gly	Met Met Thr Leu	
260	265	270
Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr	Gly Leu Gln Ile	
275	280	285
Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly	Thr Ala Lys Ala	
290	295	300
Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr	Glu Glu Thr Lys Ser	
305	310	315
Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Met Met Val Leu Gly	Gly Ser Ser Ala	
325	330	335
Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Lys Lys Thr	Pro Glu Glu Pro	
340	345	350
Ser Pro Lys Asp Ser Glu Lys Ser Ala Met Gly Val		
355	360	364

&lt;211&gt; 2609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 95

gagccgaggg tggtgctgca ggtgcacccg agggcaccgc cgagggttag caccagg	tcc 60
ctgcatacagc caggacacca gagcccagtc gggtggacgg acgggcgcct ctgaagcggt	120
ccaggatctt gcgcattggcg ctgactggag tctctgtgt ctccgaggag tcagagagcg	180
ggaacaagcc atttctgctc cgggctctgc agatcgcgct ggtggtctct ctctactgg	240
tcacacctcat ttccatggta ttccatcaaca agtacactgt ggacagcccc tccctgcagc	300
tggataacccc cattttgtc accttctacc aatgcctggt gacactactg ctgtgcaagg	360
gcctcagcac tctggccacc tgctgccccg gcatggtaga cttcccccacc ctaaacctgg	420
acctcaaggt ggcccgaagt gtgctgccgc tgtcaatggt ctttatcgcc atgataacct	480
tcaataaccc tgcctcaag tacgttaggg tgccctcta caacgtggga cgctcgctca	540
ccaccgtgtt caacgttctt ctctcctacc tgctgctcaa acagaccact tccttctatg	600
ccctgctcac ctgcggcgctc atcattggtg gtttctggct gggatagac caagaaggag	660
ctgagggAAC ctgtccctg acggcacca tttcgggt gctggccagc ctctgcgtct	720
ccctcaatgc catctatacc aagaaggtgc tccctgcagt agaccacagt atctggcgcc	780
taaccttcta taacaatgtc aatgcctgcg tgctcttctt gcccctgatg atagtgtgg	840
gcgagctccg tgccctcctg gccttcactc atctgagcag tgcccacttc tggctcatga	900
tgacgctggg tggcctgttt ggcttgcca tcggctatgt gacaggactg cagatcaa	960
tcaccagtcc cctgacccat aacgtgtcag gcacggccaa ggcctgtgca cagacagtgc	1020
tggccgtgct ctactacgaa gagattaaga gcttcctgt gttggacaagc aacctgatgg	1080
tgctgggtgg ctccctcgcc tacacctggg tcagggctg ggagatgcag aagaccagg	1140
aggaccccaag ctccaaagat ggtgagaaga gtgctatcag ggtgtgagct cttcaggga	1200
gccaggcgctg agctcggtt gggcctgccc agcacggaaag gcttcccata gaggctactg	1260
ggtatggccc tgagaataa ttttacatc ctttcagaa gaccatctaa gaagagccag	1320
gttcttcct gataatgtca gaaagctgcc aaatctctg cttggccat cttctgtct	1380
tggaaagcc ctaccaggag tggcaccctt cctgcctcct cttggggccct gtctacctcc	1440
atatggtctc tgggttggg gccagctgca ctcttgggc actggactga tgaagtgtat	1500
tcttactttc tacacaaggg agatgggtt tgaccctact atagcttagtt gaagggagct	1560
gtgttaacccc acatctctgg ggcctggc aggtgcata atagcttaggt gctattaaca	1620
tcaataaacac ttcaagactac ctttggaggc agttggagc tgagccgaga gagagagatg	1680
gccattctgc cctttctgt gtggatgggt atgacagacc aactgtccat ggggtgactg	1740
acacccac acttcatatt ttcaactta gaaaaggggg agccacacgt tttacagatt	1800
aagtggagtg atgaatgcct ctacagcccc taacccact ttccctgcct ggcttcttt	1860
ggcccagaag gcccaccatc ctgttctcca acacctgacc cagctatctg gctatactct	1920
ctttctgtac tccctccccc ttcccccccc cattagcctc ctcccaaca cctccatctt	1980

caggcagggaa gtgggtcca ctcagcctct gttcccatct gcttggaccc ctgagcctct 2040  
 catgaaggtta ggcttatgtt ctctgaggct ggggcggag gagcgcactg attctcgag 2100  
 ttatcccatac aggtcttgtt cacaaaatag cctaggccgt gtgtctaaga acagtggagg 2160  
 ttggcttata actgttctgg gggcagcgaa gcccacatca aggtactcat agacccagta 2220  
 tttctgagga aaccctgtc cacatcctca cttggtaaag gcacagataa tctcccttag 2280  
 gcctcttgc taggagcaact agccctggga gggctccgccc ccatgacactg atcacccaa 2340  
 agccttcaac agaaggattc caacatgaat ttggggacag aagcactcag accacgatgc 2400  
 ccagcacccac accctcctat cctcaggta gctgtcactg tcctagtc 2460  
 cctttgtac ctcatttcc ttggcgtcat gtttgatgtc tttgtcttt tcgtgagaag 2520  
 atggggaaac catgtcagcc tctgctccg acttcccatg gttctaatg aagttggtgg 2580  
 ggcctgatgc cctgagttgt atgtgattt 2609

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 96

Met Ala Leu Thr Gly Val Ser Ala Val Ser Glu Glu Ser Glu Ser Gly

1 5 10 15

Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser

20 25 30

Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu

35 40 45

Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe

50 55 60

Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu

65 70 75 80

Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp

85 90 95

Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly

100 105 110

Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Pro Phe

115 120 125

Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser

130 135 140

Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys

145	150	155	160
Gly Val Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala			
165	170	175	
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser			
180	185	190	
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala			
195	200	205	
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala			
210	215	220	
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Ile Val Leu Gly Glu Leu Arg Ala			
225	230	235	240
Leu Leu Ala Phe Thr His Leu Ser Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met			
245	250	255	
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu			
260	265	270	
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala			
275	280	285	
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile			
290	295	300	
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser			
305	310	315	320
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu			
325	330	335	
Asp Pro Ser Ser Lys Asp Gly Glu Lys Ser Ala Ile Arg Val			
340	345	350	

<210> 97

<211> 1053

<212> DNA

<213> Rattus norvegiucus

<400> 97

atggcgctga	ctggaggcctc	tgctgtctct	gaggaggcag	acagcgagaa	caagccattt	60
ctgctacggg	ctctgcagat	cgcgctgggt	gtttctctct	actgggtcac	ctccatctcc	120
atggtattcc	tcaacaagta	cctgctggac	agccccctccc	tgcagctgga	taccccccata	180
ttcgtcacct	tctaccaatg	cctggtgacc	tcactgctgt	gcaagggcct	cagcactctg	240
gccacctgct	gccctggcat	ggtagacttc	cccaccctaa	acctggaccc	caaggtggcc	300

cgaagtgtgc	tgccgctgtc	cgtggtcttt	atcgcatga	taacctcaa	taacctctgc	360
ctcaagtagc	tgggggtggc	cttctacaac	gtgggacgct	cgctcaactac	cgtgttcaat	420
gtgcttctct	cctacctgct	gcttaaaacag	accacttcct	tttatgccct	gctcacctgt	480
gccatcatca	tttgtggitt	ctggctggga	atacatcaag	agggagctga	gggcaccctg	540
tccctgacgg	gcaccatctt	cggggtgctg	gccagcctct	gtgtctcaact	aatgccatc	600
tacaccaaga	agggtgtccc	tgccgttagac	cacagtatct	ggccctaacc	tttctataac	660
aacgtcaacg	cctgtgtgct	cttcttgccc	ctgatggtag	tgctggcga	gctccatgt	720
ctcctggcct	tcgctcatct	gaacagcgcc	cacttctggg	tcatgatgac	gctgggtgga	780
ctcttcggct	ttgccattgg	ctatgtgaca	ggactgcaga	tcaaattcac	cagtcctctg	840
accataatg	tgtcgccac	agccaaggcc	tgtgcacaga	cagtgcgtgc	tgtctctac	900
tatgaagaga	ttaagagctt	cctgtggtgg	acaagcaact	tgtgtgtct	gggtggctcc	960
tctgcctaca	cctgggtcag	gggctgggag	atgcagaaga	cccaggagga	ccccagctcc	1020
aaagagggtg	agaagagtgc	tatcggttg	tga			1053

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 350

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegiucus

&lt;400&gt; 98

Met Ala Leu Thr Gly Ala Ser Ala Val Ser Glu Glu Ala Asp Ser Glu

1 5 10 15

Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser

20 25 30

Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu

35 40 45

Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe

50 55 60

Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu

65 70 75 80

Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp

85 90 95

Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly

100 105 110

Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe

115 120 125

Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser

130	135	140
Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys		
145	150	155
Ala Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala		160
165	170	175
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser		
180	185	190
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala		
195	200	205
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala		
210	215	220
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Val Leu Gly Glu Leu His Ala		
225	230	235
Leu Leu Ala Phe Ala His Leu Asn Ser Ala His Phe Trp Val Met Met		240
245	250	255
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu		
260	265	270
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala		
275	280	285
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile		
290	295	300
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser		
305	310	315
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu		320
325	330	335
Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val		
340	345	350

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 7752

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 99

agcgttgcaa gttcagccga gggtggtgct gcaggtgcac ccgagggcac cgccgagggt	60
gagcaccagg tccctgcatac agccaggaca ccagagccca gtcgggtgga cggacggtac	120
gttctggaag ggaaagggcc ccgggaaggg gatacagcat tgagaagctc agaggcttg	180

gtctggcat ccagaatgga ctttatctgg aggaggtgac atggcttctc gcctctggaa	240
gtgctgctt gatctccggg acttcatgtc ctgacttaggt ctggaagcgg taaaaatagg	300
ggtagaaaaa aaggagagga ctgcaacaag gtctcccga gtggcctgag ctcgagggac	360
gagggaggtg caacggtggg gagccggcg caagggctgg gcggagggag ggggggggtc	420
tccctaagca gaaaggtggt attccatttt ctggtagat ggtgaagatg cacctgaccg	480
agtctggtcg atctgaagat atcagggaa aagatagtgc gggtggaggg gagaatgaca	540
gaacttcca gaaaatggga gaggctatac cactgcaaa ccctccctg atctccggg	600
actccggaa gaagagggca ggtctgtggg cataggtgca gacttgccgg ggagctttg	660
acggccgcgg gaagtggcaa cggcctgcga gctgccctt taaggcggct cgtaggcgt	720
tcaggaatg cgccgaggcgc cggccctgtc cggttaagtgg cccgggaccc gcgtcgctga	780
gccggactt gaattcggct cgtggcaacc gcagggcctt gctccggtca ggccctgtc	840
cgtgtccctc gagacgcctt cctgagcctc ggtgatctcc ctgcagcacg ccctcccttc	900
ggctctgcgg gtgctccgg gggttccgc agccatgct tcccacgcgg tccgcgtcca	960
gttatttcct cctccgcctc gtccttcctt cgctctctcg cttcccttct ccctgcgact	1020
cacgtgtccc ctgtctcaa actggccatg gctgtcaaag cccacatcct tagttaggcc	1080
ccttccctt tccctggc ttgtttcgta acaccaccc cctccccccgc cccgggagcgc	1140
agcaagatga ggagcggtgc acctcgccaa atccggaagc agaacttcat ccaagaagga	1200
ggggaccgat aggtcatccc atgtgacagt tgaaggctgc agccacagac cctagctgt	1260
tgaagccctg tagtccaggg actgcttctg gccgttagt gacccagctc ttctgccacc	1320
atgaacaggg cgcctctgaa gcgggtccagg atcctgcgc tggcgctgac tggagtctct	1380
gctgtctccg aggagtcaaga gagcgggaac aagccatttc tgctccggc tctgcagatc	1440
gchgctggtgg tctctctcta ctgggtcacc tccatttcca tggatttcct caacaagtac	1500
ctgctggaca gcccctccct gcagctggat acccccattt ttgtcacctt ctaccaatgc	1560
ctgggtgacct cactgctgtc caagggcctc agcactctgg ccacctgctg cccggcatg	1620
gtagacttcc ccaccctaaa cctggaccc aaggtggccc gaagtgtgct gccgctgtca	1680
gtggcttta tcggcatgt aacccatcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtgccc	1740
ttctacaacg tgggacgctc gctcaccacc gtgttcaacg ttcttctctc ctacctgctg	1800
ctcaaacaga ccacccctt ctatgcctg ctcacccgtcg gcgtcatcat tggtagtgg	1860
gactggggc gtggggagca ggaatcgtaa agatcaatac cacattactc attatctgtc	1920
ccaggtcttt tgcaccacca gtcatalogga gagacctgta gagaacaaat aacttcctta	1980
ctgtgactca gtaagttagg gatccagcca aggtgaacat aataatgtta ggcagacact	2040
acagcaaaacg cagccagaca ctcagatcta gctaagcatt tgagccatgt taatgtaacg	2100
gatccccatt acaaggata atatagctgc gttttatgga gagaacccca aggcacagag	2160
aagctaagta gctggatca cacaggtaat cactgacgta gcagaaaattt gcacataagc	2220
agttacccctc ataggatata ctcttgacca acacaccact gttctcaaga ggtcaagggt	2280
gaactcaggt catcacaatt ggcacaagta cctctaccca ctgagccatt tcagtggtcc	2340
agtcaatatg tgtgtgctt aagaggctt aactacccctc tcagatgtga ccataagtaa	2400
ttaattaccg ataggagcgt tgtgctgatc attacacttg tagcatccctc tttattgtac	2460

ccataagctc tctgagtggc ggcatctcg tgaactgca gctcgagag gctgcgtcc	2520
ttgccacaga cccacaacta agaaggagat agtctggac gcagtcggc gttggtcata	2580
ctccctggcc tgtgttcaa gccagtcgc tttgctctg accctggaa gtttagcgaa	2640
tgaaaaccaa cactatcact acagtctaaa tgtgctttt aatgaaagcc caggaacttt	2700
gaagcatccg gcccctaacc ggcagccact atgtcctgat tccgccaaca tccttcagt	2760
gcccggcagt cacatggagc aaggccctt tggcttggac agcatgtttt agggAACATG	2820
tttgccactt tgaatgaatt tagtggctgc tgggttacag agaccaggc atcttcccc	2880
tcagagtctt gaatgaacga aaagcaacct tcattgtac ctgctctgaa tttagttcg	2940
tcttggggcc cctattttaga tgtccctgggt gtctctgagg cccaggctgg gtgctctaga	3000
tgttagggacc aggccaacct gtactgtttt ccctagaaac attgcccggg ttggcagct	3060
cctggatcca gggtaaggg gtctggcgg agagaggta gatagtggca ggatgcctcc	3120
cactgcccccc acatacatac cctaagagat ctggtaactcc tccttcagc ctacaagcta	3180
ccgtggggc ccacttcagt ccaccagccc tgccaaacgtt agaggggatg ggcctccctag	3240
taggagaact tacatgcagg aaggtacagt ctctggagaa cctgagcccg ggtccccaaa	3300
gggacaagta gctgatagtg aggcaagttt gcccattggc ggcctgcca agtggcacgg	3360
gaaagtggag ctctctgctg ccccaactac tggcccccattc tcttggctt cccctccctt	3420
cctcctgtgg agaaggccca tctctggaaa ggcctccctag acatgcggca ctttgaaag	3480
cctgtcgccc tcacagcccc tctagggtctt aggaccttga gaatgaagaa tggagtcaact	3540
tctagactctt agtgtaacc accaggaggtt acagggtgtt ctgactgtgc agggaaaccc	3600
accgtggctt ctgctgagcc aagtgcctgtt gaggctggag agtctgggtc ctttggcttgc	3660
agatagcattt ttgctatgtt gcccctcaagt cccaggcaac tggggctgca ggagcaccac	3720
cttgcctctc tccagcttctc tgaagactt taccttctc cttagcgtt ctatctgctc	3780
tcactccatc cattgagcag ctattagttt gtggccaaatg atttccagg ccctgtactg	3840
agtttttaggg tacaagttt agaaaggaag ggtgggtcc ttgctctgg tccgtaaatg	3900
atgttgatgg cagaaacgtt agttacacta gatgctaagg gctgtggta tctagaggaa	3960
gcagggagca tgtggataa cctgagcagg cctagctgaa aagtcttgc tggcatgaga	4020
ctgctccagt agtacaggctt gggAACACAC atttgaatgtt ttcctgaaga cagttggag	4080
ccacagggaa tatccactgtt agaaagatta ttttagtttta agacagagta gtagattgg	4140
taacatagta gcaaaaacgtt ggccccctt tttacagatg aaggaaattt gaaactcagag	4200
aggtaagta acttctccca agcagctcag ctacaaaaat cacagaacag gcagggcct	4260
gatggctctg atgcctgtgc tggccactt attccatgtt gctaattcct gcagcagcag	4320
taaacctctg ctttggaa atgaggagtc taaataaaga gaccatagca ttggccacaag	4380
caggtttcta ccaactgggg gtggcaagga atgctgtttt agcagcaggaa agctggaaag	4440
aggctgagta ctggggggat gaggaaggaa tccccaggag aggctgactt tggcccttggaa	4500
aatgggtggaa gtccctggaa agatgcagat acacagagctt ctgtggat atacagaaatg	4560
ggggagctaa gtaggtggct tggggccatc atgtgacaga ggaagtcggg ctagatgcag	4620
gaagcccggt gctgtggcctt agggagccat gtaggttctt tgagcagggg gcgggggggg	4680
gggggggtga cccaggagtg actgttaaaca acatcaggcc atgagcagct ctgacctaatt	4740

gttctcacca	agggagccag	aaccaaggct	tagagccctg	tccctttita	gtgtccaagg	4800
tcactttact	ggccctttc	ctttacagct	gttggcccc	acaggccatc	aggcacctat	4860
gctattttat	tttatagcct	tcattacaat	gactacaatt	gtaatttagag	agttgacagg	4920
gtcacatctg	tccttatata	ttccccctct	gctaagtct	gcctgggaga	atgtggaggg	4980
tatttgtaa	atttgggaa	gttataaccc	ccccacccct	gccccaccc	cctgcttgc	5040
tccctttatc	tgcaaggcat	ttctgtgcc	acttagccc	atatagctcc	caaataaatg	5100
acacagaaac	ctggtatitt	cattaacaaa	ctgctggcac	tctgtggc	aggttctgag	5160
ctgttctaac	cctctaagct	gctaattgccc	agatagatgc	ccaaatgctt	gccatccgag	5220
tctttctctg	gcttgctctg	ctccatgtgt	gacctcatgg	tgaatcctcc	tgatttcccc	5280
acatggcctc	tcacacactt	tccttctccc	ctctctctac	cagggaccct	ctcactggga	5340
cccgatgtcc	catctgtact	gtcctctccc	acccagtcat	aggctgattt	agtctttatt	5400
aaccaatcag	agatgatgga	aaaacagttt	ttacatagca	ctgaggatgg	agatgcttga	5460
cccttgagat	gcttgccgt	aacctgtact	gtatccagat	gtctgggccc	ccaaatcagc	5520
aggtgaatac	acagtacaca	ggactgaccc	ccaacagagg	ggaaacacag	gttctcactc	5580
tgggctccac	gcctctggcc	ctttcttagt	gcaggggtta	gactttgtat	gtgttgatga	5640
tgaggtaagg	gcacatggAAC	agtcaagac	gtgggtgtcag	aatctgtcc	ctctccctcc	5700
tgtcctcatc	cctccttacc	gtgtcactct	tctgtctgtt	gcaggtgggtt	tctggctggg	5760
tatagaccaa	gaaggagctg	agggAACCTT	gtccctgacg	ggcaccatct	tcggggtgct	5820
ggccagcctc	tgcgcttccc	tcaatgccat	ctataccaag	aagggtgtcc	ctgcagtaga	5880
ccacagtatc	tggcgcttaa	ccttctataa	caatgtcaat	gcctgcgtgc	tcttcttgcc	5940
cctgatgata	gtgctggcgc	agctccgtgc	cctccctggcc	ttcaactcatc	tgagcagtgc	6000
ccacttctgg	ctcatgatga	cgctgggtgg	cctgtttggc	tttgcacatcg	gctatgtgac	6060
aggactgcag	atcaaattca	ccagttccct	gaccataac	gtgtcaggca	cggccaaggc	6120
ctgtgcacag	acagtgtctgg	ccgtgctcta	ctacgaagag	attaagagct	tcctgtgggt	6180
gacaagcaac	ctgatgggtc	tgggtggctc	ctccgcctac	acctgggtca	ggggctggga	6240
gatgcagaag	acccaggagg	acccagctc	caaagatggt	gagaagagtg	ctatcagggt	6300
gtgagctcct	tcagggagcc	agggctgagc	tcgggtgggg	cctgcccagc	acggaaggct	6360
tcccataatag	cctactgggt	atggccctga	gcaataatgt	ttacatcctt	ctcagaagac	6420
catctaagaa	gagccaggtt	ctttcctgtat	aatgtcagaa	agctgcca	tctcctgcct	6480
gccccatctt	ctagtcttgg	gaaagcccta	ccaggagtgg	cacccttcct	gcctcctcct	6540
ggggcctgtc	tacctccata	tggctctgg	ggttggggcc	agctgcactc	tttggcact	6600
ggactgtatga	agtgtatgtct	tactttctac	acaagggaga	tggttgtga	ccctactata	6660
gctagttgaa	gggagctgtg	taacccacaa	tctctggggc	cctgggcagg	tagcataata	6720
gctaggtgct	attaaacatca	ataacacttc	agactacctt	tggaggcagt	tgggagctga	6780
gccgagagag	agagatggcc	attctgcctt	cttctgtgt	gatgggtatg	acagaccaac	6840
tgtccatggg	gtgactgaca	cctccacact	tcatatttc	aactttagaa	aagggggagc	6900
cacacgtttt	acagattaag	tggagtgtatg	aatgcctcta	cagccccctaa	ccccacttcc	6960
cctgcctggc	ttctcttggc	ccagaaggc	caccatcctg	ttctccaaca	cctgacccag	7020

ctatctggct atactcttct tctgtactcc cttcccccttc cccccccat tagcctcctc	7080
cccaacacct ccatcttcag gcaggaagt gggtccactc agcctctgtt cccatctgct	7140
tggaccctg agcctctcat gaaggttaggc ttatgttctc tgaggctggg gccggaggag	7200
cgcactgatt ctcggagttta tcccatcagg ctcctgtcac aaaatagcct aggccgtgt	7260
tctaagaaca gtggaggttg gcttataact gttctggggg cagcgaagcc cacatcaagg	7320
tactcataga cccagtattt ctgaggaaac ccctgtccac atcctcactt ggtaaaggca	7380
cagataatct ccctcaggcc tcttgtatag gagcactagc cctgggaggg ctccgcccc	7440
tgacctgate accccaaagc cttaaacaga aggattccaa catgaattt gggacagaag	7500
cactcagacc acgatgccca gcaccacacc ctcctatcct cagggtagct gtcactgtcc	7560
tagtcccttc tgggtggcct tttgtaccct catttccttgc ggtcatgtt tgatgtctt	7620
gtctcttgc tgagaagatg gggaaaccat gtcagcctct gcttccgact tccatgggt	7680
tctaataaag ttggtgggc ctgatgcctt gagttgtatg tgatttaata aaaaaaaaaat	7740
ttttttaaaa ac	7752

<210> 100

<211> 4039

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 100

gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgaa	60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tgggtgacc tagctttctt accaccatga	120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcattggc gctgactggg ggctccactg	180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg ggcgtgcaga	240
tcgcgcgtgt cgctctcttc tactggtca cctccatctc catggtattt ctcaacaagt	300
acctgctgaa cagccccctcc ctgcagctgg atacccttat cttcgtaact ttctaccaat	360
gcctggtgac ctctctgttg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca	420
ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgcccactgt	480
cggtagtctt cattggcatg ataagttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg	540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgcaccca ccgtgttcaa tgtgttctg tcctacactgc	600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtgagt	660
ggggccccggg ggctgtggga gcagggatggg catcgaactg aagccctaaa ggtcaacact	720
gtaggtacct ttacttactg tcccaggctcc ttgcacatc cagttacagg aagaggccctg	780
tagaaaaaaaataacttc tatggtcatt caacaagttt gggacccagc cagggtgaaa	840
ataatgttag cagcaactac agcaaagatg gctctcgcca cttgcacatgt taaaatgtgc	900
caggtactca gatcyaagca ttggatccac attaactcaa ctaatcccta ttacaaggta	960
aaatatatcc gaattttaca gagggaaaaac caaggcacag agaggctaag tagcttgacc	1020

aggatcacac agctaataat cactgacata gctggattt aaacataagc agttacctcc	1080
atagatcaca ctatgaccac catgccactg ttccttctca agagttccag gatcctgtct	1140
gtccagttct ctttaaagag gacaacacat ctgacattgc taccttgggg taacatttgaa	1200
aatagtgggt agacatatgt tttaagttt attcttrctt tttatgygtg tgtgttggg	1260
gggccaccac agtgtatggg tggagataag gggacaacctt aagaattggt ccttctccc	1320
accacatggg tgctgaggc tgaactcagg tcattcaggat tggcacaat cccttaccc	1380
actgagccat ttcaactggc caatatatgt gtgcattaa gaggcttaa ctatttccc	1440
agatgtaat gtctgtga tcattatccc cttttacccg gaagccctt gggaggtgcc	1500
atccctgtgg tcgtctgcat acaaattggg aaactgcaac tcagagaaac aaggctactt	1560
gccagggccc cacaagtaag ataggctggg atgcccattttt agactggcca cactccctgg	1620
cctgtgtttc aagccagttt actttgttcc tgccattgg aagtttagcat gttgcagtca	1680
aacacaataa ctacaggcca aaagtgcattt taaattaaag tcagatgaac ttttaaacat	1740
ccagagctcc tcaactgcag gagttacaac ctgattctgc aaccatctt gcagtgcgg	1800
gtagtcataat gtagcttagag gctcttgct aggacagcat gtgttaggaa acatctggcc	1860
ctgagatcat tgaatttgagt gactgctggg tgacaaagac caaggcatcc gttccctgag	1920
agtccctggc aagcagcaat gtgacettca tttgtaccta ctcaggttct ttatctgtcc	1980
tgtttgaccc acttagtctc ctctgggttc tcagaggccc aggctggta ctctggatgt	2040
caggatcagg ccaatgcgca catctgcctt agaaatgtcc ccctgggttga gcagctcctg	2100
aatccatcggtt taaaagggtt ggaccaggga ggagtcagat aaaaagctga cagcactggg	2160
ggactccatg gggaaactccc acctgcccccc acacatccat cctaagagaaa ctggattcc	2220
ttgtttctc tttgtctac aaggcacccctt gggatcccac ttcaacttc cagccttgcc	2280
agggttagag ggcatgagcc tccttggttggg gaatttagat gcaagaaggta acagtcacta	2340
gagaaccctga gctcagatcc ccaaagtaac cagttacctga tagtgaggca gctgagaacc	2400
gcagcagccctt gcctgagttt ctgaactctg cggcctccgg aactggcccc aactgttggg	2460
tctcctcttc cttcctctt tgagggaggg cccatctctg ataagtgcctt tggttgcactt	2520
agagtagggaa ggaggaggag caatctaagc aggccctact gagaagtcct tgctggcatg	2580
tggctgcctg aggatcacatg actgggaaca cccatggaa tgtagtaaggat ttttctgaa	2640
ggccatgggg agccacggag gaaaatcatt tttagttacaa gacaaaggat agattggta	2700
acatgggagc arggacatgg ccccaattttt cattgtgaa gggaaattggaa actcrgagag	2760
gttaagtaac ttctccaaa tagtcagct tcataatcac agaacagtca gagtcttagat	2820
ctctctgtt cctgtgtatgg tcctgcccattt ccatgttgcctt gatccctgtt gcatcgtt	2880
gcctctaccc ttgtggaaatg caggatctaa atgaagagag raagtgcctt cccatgttgc	2940
tggctggaa agctatgcag gcttttgag cagagatgtt cccacaagtg aatagatcc	3000
tatgagactc aaagcaacat ccaccctttaa gcagctctaa ccaaattgttcc acactgaggg	3060
agccaaagcc aagtttagatg cctgtgtttt cccaaaggtaa ctttgcctt ccctcttccct	3120
atagcaccctt ttttatctta tagccctcat tacagtgtt acaattataa tttagagatgtt	3180
aacagggcca cactgtcctt acacattccc ctgcttagatt gtagctggg gagggggaga	3240
tgttaggtggc tgggggagtg ggagggaaaga tgcagatttt cattctggc tctactccct	3300

cagccatittt ttgggtgtggg agtttagactt tggatatatgtt gatgatgagg taagggccac	. 3360
agaacagtct gaactgtgggt atcagaatcc tgtccctctc cctcttcctt catccctctt	3420
caccttgta ctcctctgtc tgctacaggt ggtttctggc tgggtataga ccaagaggga	3480
gctgagggca ccctgtccct cataggcacc atcttcgggg tgctggccag cctctgcgtc	3540
tccctcaatg ccatctatac caagaaggtg ctcccagcag tggacaacag catctggcgc	3600
ctaaccctct ataacaatgt caatgcctgt gtgctcttct tgcccctgat gttctgctg	3660
ggtgagctcc gtgccctcct tgactttgtc catctgtaca gtgcccactt ctggctcatg	3720
atgacgctgg gtggcctctt cggcttgcatttggctatg tgacaggact gcagatcaa	3780
ttcaccagtc ccctgaccca caatgttatca ggcacagcca aggccctgtgc gcagacagt	3840
ctggccgtgc tctactatga agagactaag agcttctgt gttggacaag caacctgatg	3900
gtgctgggtg gctcctcagc ctataccctgg gtcaggggct gggagatgca gaagacccaa	3960
gaggacccca gctccaaaga gggtgagaag agtgctattt gggtgtgagc ttcttcaggg	4020
acctgggact gaacccaag	4039

出願人又は代理人の書類記号

P044077

国際出願番号

PCT/JP 03/04504

**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。

122 頁、 4 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) 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）

この情報は別紙に続いている 

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

 この用紙は国際出願とともに受理した

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

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

P044077

国際出願番号

PCT/JP03/04504

## 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。

122

頁、

4

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) 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）

この情報は別紙に続いている 

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

 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

## 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

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**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。

122 頁、 4 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) 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）  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

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**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。

148 頁、 30 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15年(2003) 4月 1日	受託番号 FERM BP-8350
----------------------------	----------------------

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"/>
--------------------------	--

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

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

金木 伸司

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

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**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。

148 頁、 30 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15年(2003) 4月 1日	受託番号 FERM BP-8350
----------------------------	----------------------

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

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	国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した	<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 	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 PO44077	国際出願番号 <b>PCT/JP 03/04504</b>
--------------------------	----------------------------------

**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。

148 頁、 30 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15年(2003) 4月 1日

受託番号

FERM BP-8350

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**

出願人又は代理人の書類記号 PO44077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**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。

149 頁、 22 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15年(2003) 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
----------------------------	----------------------

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

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

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

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**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。

149 頁、 22 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15年(2003) 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
----------------------------	----------------------

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

オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、  
 本願に關し、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、  
 本発明に利害關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		国際事務局記入欄	
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した		<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 		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 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

## 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。

149 頁、 22 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15年(2003) 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
----------------------------	----------------------

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"/>
--------------------------	--

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	国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した	<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 	権限のある職員 五十嵐伸司

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04504

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50, C07K16/46//A61K39/395, A61P9/00, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/14, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04,

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> C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50, C07K16/46

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/WPIIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 October, 2000 (19.10.00), & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4, 9-16, 21-25, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 39-43, 45, 48/ 5-8, 17-20, 30, 32, 35, 37, 38, 44, 46, 47/ 26, 28
Y	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	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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/JP03/04504

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, <i>J.Immunol.Methods</i> , 1994, 167(1-2), pages 271 to 278	1-25, 30-45, 47, 48
X	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, 27, 29
Y	Hackett J. Jr. et al., Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, <i>J.Clin.Microbiol.</i> , 1998, 36(5), pages 1277 to 1284	37, 46
Y	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	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47
A	WO 97/27303 A (Toyobo Co., Ltd.), 31 July, 1997 (31.07.97), & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-48
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	1-48
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	1-48
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	1-48
P,X	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 9419801 A	1-48

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04504

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))Int.Cl<sup>7</sup> A61P37/08, A61P43/00, G01N33/15, (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)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/04504

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46 // 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, C12R 1:91), (C12N 5/10, C12R 1:91)

## 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' C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46

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

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)

## C. 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/Y/A	WO 00/61739 A1(協和醸酵工業株式会社), 2000. 10. 19 & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4, 9-16, 21-25, 27, 2 9, 31, 33, 34, 36, 39-4 3, 45, 48 / 5-8, 17-2 0, 30, 32, 35, 37, 38, 4 4, 46, 47/26, 28
Y	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	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 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

の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
- 「&」同一パテントファミリー文献

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 印 4 B 9359 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	1-25, 30-45, 47, 48
X	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, 27, 29
Y	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	37, 46
Y	Elbashir SM et al, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411 (6836), p. 494-498	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47
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	1-48
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	1-48
PX	Shields RL et al, Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J Biol Chem, 2002 Jul, 277(30), p. 26733-26740	1-48
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	1-48
PX	WO 02/31140 A1 (協和醣酵工業株式会社) 2002.04.18 & AU 9419801 A	1-48