(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 03/085102 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 5/10, 15/09, C12P 21/08, A01K 67/027, A01H 5/00, C07K 14/47, 16/18, A61K 39/395, A61P 9/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04506

(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2002-106952 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): 協和醗酵工業株式会社 (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): 神田 豊 (KANDA,Yutaka) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 佐藤 光男 (SATOH,Mitsuo) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 森 勝弘 (MORI,Katsuhiro) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI,Shohei et al.); 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目１２番３２号 アーク森ビル２８階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則１３の２に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL WITH DEPRESSION OR DELETION OF THE ACTIVITY OF PROTEIN PARTICIPATING IN GDP-FUCOSE TRANSPORT

(54) 発明の名称: ＧＤＰ−フコースの輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞

(57) Abstract: A cell in which the activity of a protein participating in the transport of an intracellular sugar nucleotide GDP-fucose into Golgi bodies is depressed or deleted compared with its parent strain cells; a process for producing an antibody composition with the use of the above cell; a transgenic nonhuman animal or plant the genome of which has been modified so as to depress or delete the activity of a protein participating in the transport of an intracellular sugar nucleotide GDP-fucose into Golgi bodies, or offspring thereof; a process for producing an antibody composition from the above animal or plant; and a drug containing the antibody composition.

(57) 要約: 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫、該動物あるいは植物から抗体組成物を製造する方法、および該抗体組成物を含有する医薬。

WO 03/085102 A1

明 細 書

GDP-フコースの輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞

技術分野

本発明は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫、該動物あるいは植物から抗体組成物を製造する方法、および該抗体組成物を含有する医薬に関する。

背景技術

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

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

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

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

る）が 3 個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(Glc)_3$-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$-P-P-Dol ができる。この 14 個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギンーXーセリンまたはアスパラギンーXースレオニン配列（X は任意のアミノ酸残基を示す）を持ったポリペプチドへＥＲ内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸（P-P-Dol）は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、3 個の Glc と 1 ないし 2 個の Man がＥＲ上で除去され、この除去にはα1,2-グルコシダーゼ I、α1,3-グルコシダーゼ II およびα1,2-マンノシダーゼが関与することが知られている。ＥＲ上でトリミングを受けた糖蛋白質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加する N-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン 1-ホスホジエステルα-N-アセチルグルコサミニダーゼおよびα-マンノシダーゼ I が存在し、Man 残基を 5 個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型の N-グリコシド結合糖鎖の最初の外側の GlcNAc を付加する N-アセチルグルコサミン転移酵素 I（GnTI）、2 個の Man を除去するα-マンノシダーゼ II、外側から 2 個目の GlcNAc を付加する N-アセチルグルコサミン転移酵素 II（GnTII）、還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを付加するα1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体トランス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けて N-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

抗体の糖鎖に関しては、ボイド（Boyd）らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）或いはマウスミエローマ細胞由来の NSO 細胞で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性とも表記する）、補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性とも表記する）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ている［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、NSO 細胞或いはラットミエローマ YO 細胞で生産したヒ

ト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）の糖鎖の分析および ADCC 活性を測定した結果、YO 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ている［グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995)、WO99/54342］。

さらに、抗体の 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へのフコースの付加修飾によって、抗体の ADCC 活性が大きく変化することが報告されている（WO00/61739)。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いることを示している。

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

宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節し、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変する一つの方法として、糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤を応用することが試みられている。

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

ツニカマイシンなどの阻害剤を培地に添加することでハイブリドーマが産生するIgG の糖鎖構造が変化し、抗原結合性や ADCC 活性などが変化することが報告されている［モレキュラー・イムノロジー（Molecular. Immunol.), 26, 1113 (1989)]。しかしながら、これら阻害剤の特異性は弱く、また標的とする酵素を十分に阻害することも難しいため、生産抗体の糖鎖構造を確実に制御することは難しい。

また、糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子を導入することによって、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変することも試みられており、その具体的な例としては、1）ラットのβ-ガラクトシドα2,6-シアリルトランスフェラーゼを CHO 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加された蛋白質の製造が可能であること［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.), 261, 13848, 1989]、2）ヒトのβ-ガラクトシド 2-αフコシルトランスフェラーゼをマウスＬ細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース（以下、Fuc とも表記する）が付加された H 抗原（Fucα1-2Galβ1-）の発現が可能であること［サイエンス（Science), 252, 1668, 1991]、3）β1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III（GnTIII）を導入した CHO 細胞を用いて抗体を生産することで N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミンの付加の割合が高い抗体の生産が可能であること［グリコバイオロジー（Glycobiology), 5, 813 (1995)、WO99/54342] が報告されている。GnTIII を導入した CHO 細胞を用いて抗体を発現させた場合には、親株で発現させた抗体と比べて 16 倍高い ADCC 活性を示した。しかしながら、GnTIII あるいはβ1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V（GnTV）の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すと報告されているため、抗体医薬の生産には適切ではない。

糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の活性が変化した突然変異体を宿主細胞として用いることで、生産される糖鎖構造が変化した糖蛋白質の生産例も報告されており、その具体的な例としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I（GnTI）の活性が欠損している CHO 細胞変異株を用いてハイマンノース型糖鎖構造を有する抗体を生産した報告が挙げることができる［ジャーナル・オブ・イムノロジー（J. Immunol.), 160, 3393, 1998]。また、CMP-シアル酸トランスポーターや UDP-ガラクトーストランスポーターの欠損株を用いて、糖鎖非還元末端側にシアル酸が付加していない糖鎖構造を有する抗体の発現や、ガラクトースの付加のない抗体の発現例が報告されているが、医薬への応用に適したエフェクター作用が向上した抗体の発現には成功していない［ジャーナル・オブ・イムノロジー（J.

Immunol.), 160, 3393, 1998]。これら変異株は、変異剤処理によりランダムに変異が導入された結果の株として取得されており、医薬品製造に用いる株として適切ではない。

このように、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の修飾機構は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とは言い難いため試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、最適な糖鎖構造で修飾された抗体分子を産生しうる宿主細胞の取得には至っていない。

発明の開示

本発明は、以下の (1)～(70) に関する。

(1) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞。

(2) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した (1) に記載の細胞。

(3) 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる手法である、(2)～(5) のいずれか1項に記載の細胞。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(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についての突然変異を導入する手法；

(d) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法。

(4) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のドミナントネガティブ体が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のN末端欠失体である、(3) に記載の細胞。

(5) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のN末端欠失体が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のN末端30アミノ酸が欠失したN末端欠失体である、(4) に記載の細胞。

(6) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法が、RNAi (RNA interference) 法である、(3)に記載の細胞。

(7) RNAi 法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるRNA およびその相補 RNA で構成され、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の mRNA 量を減少させることが可能な 2 本鎖RNA を細胞内に導入または発現させる方法である、(6) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA ;

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA ;

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA。

(8) 以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる RNA およびその相補 RNA で構成される 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させることで、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の mRNA 量を減少させた、(6) または (7) に記載の細胞。

(a) 配列番号 33 で表される塩基配列からなる RNA ;

(b) 配列番号 33 で表される塩基配列において、1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列からなり、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に対して配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA。

(9) 2本鎖RNAが、(7) または (8) に記載のRNAに対応するDNAおよびその相補DNAを組み込んだベクターにより細胞内へ導入される、(7) または (8) に記載の細胞。

(10) 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が GDP-フコーストランスポーターである、(1)～(9) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(11) GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) および (h) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(10) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA；

(c) 配列番号29で表される塩基配列からなるDNA；

(d) 配列番号30で表される塩基配列からなるDNA;

(e) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ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3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ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29で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ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30で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ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。

(12) GDP-フコーストランスポーターが、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)および(l)からなる群から選ばれる蛋白質である、(10)に記載の細胞。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号31で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号32で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(e) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号4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；

(g) 配列番号31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；

(h) 配列番号32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；

(i) 配列番号 2 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；

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(l) 配列番号 32 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。

(13) 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α結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(1)～(12) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(14) 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、(13) に記載の細胞。

(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。

(15) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(14) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(16) 細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) および (j) からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(15) 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) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

(j) 植物細胞。

(17) (1)～(16) のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

(18) 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分子である、(17) に記載の細胞。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(19) 抗体分子のクラスが IgG である、(17) または (18) に記載の細胞。

(20) 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(17)～(19) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(21) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、該抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、(20) に記載の細胞。

(22) 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、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 20%以上である (21) に記載の細胞。

(23) 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α結合していない糖鎖である、(21) に記載の細胞。

(24) (17)～(23) のいずれか 1 項に記載の細胞を用いること特徴とする、抗体組成物を製造する方法。

(25) (17)～(23) のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(26) 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(24) または (25) に記載の方法。

(27) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、該抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、(26) に記載の方法。

(28) 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、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 20%以上である (27) に記載の方法。

(29) 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α結合していない糖鎖である、(27) に記載の方法。

(30) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(31) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の遺伝子がノックアウトされた、(30) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(32) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた、(31) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(33) 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が GDP-フコーストランスポーターである、(30)～(32) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(34) GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) および (h) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(33) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列からなる DNA ;

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列からなる DNA;

(e) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 29 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 30 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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。

(35) GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、

(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) および (l) からなる群から選ばれる蛋白質である、(33) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(e) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 4 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；

(g) 配列番号 31 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；

(h) 配列番号 32 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；

(i) 配列番号 2 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；

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(l) 配列番号 32 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。

(36) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルおよびウサギからなる群から選ばれる動物である、(30)～(35) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

(37) (30)～(36) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入した、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(38) 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

る分子である、(37) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(39) 抗体分子のクラスが IgG である、(37) または (38) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(40) (37)～(39) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物から抗体組成物を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(41) (35)～(37)のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫の抗体分子を産生する細胞を取得し、取得した抗体産生細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(42) 抗体組成物がゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(40) または (41) に記載の方法。

(43) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫が産生する抗体組成物より高いことを特徴とする、(42) に記載の方法。

(44) 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、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 20%以上である (43) に記載の方法。

(45) 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α結合していない糖鎖である、(43) に記載の方法。

(46) (24)～(29) のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(47) (40)～(45) のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(48) (46) または (47) に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(49) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自

己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、(48) に記載の医薬。

(50) 以下の (a) または (b) から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質。

(51) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA。

(52) 配列番号 1 に記載の全長あるいは一部 DNA を含む、GDP-フコーストランスポーターを標的とした相同組換えのためのターゲットベクター。

(53) GDP-フコーストランスポーターの機能を阻害する蛋白質。

(54) GDP-フコーストランスポーターの機能を阻害する蛋白質が、GDP-フコーストランスポーターのドミナントネガティブ蛋白質である、(53) に記載の蛋白質。

(55) GDP-フコーストランスポーターのドミナントネガティブ蛋白質が、GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体である、(54) に記載の蛋白質。

(56) GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体が、GDP-フコーストランスポーターの N 末端 30 アミノ酸が欠失した N 末端欠失体である、(55) に記載の蛋白質。

(57) GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) および (l) からなる群から選ばれる蛋白質である、(53)～(56) のいずれか 1 項に記載の蛋白質。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(e) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 4 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；

(g) 配列番号 31 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；

(h) 配列番号 32 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；

(i) 配列番号 2 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；

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(l) 配列番号 32 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。

(58) (53)～(57) のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

(59) 以下の(a)および(b)からなる群から選ばれる RNA およびその相補 RNA で構成される 2 本鎖 RNA。

(a) 配列番号 33 で表される塩基配列からなる RNA；

(b) 配列番号 33 で表される塩基配列において、1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列からなり、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に対して配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA。

(60) (59) に記載のRNAに対応するDNAおよびその相補DNA。

(61) RNAに対応するDNAが配列番号16で表される塩基配列からなるDNAである (60) に記載のDNA。

(62) (60) または (61) に記載のDNAおよびその相補DNAをベクターに含む、組換え体DNA。

(63) (59) に記載の 2 本鎖 RNA を発現させるために構築されている、(62 に記載の組換え体 DNA。

(64) (62) または (63) に記載の組換え体DNAを細胞に導入して得られる形質転換体。

(65) (59) に記載の 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させることにより、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α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作製する方法。

(66) 2本鎖RNAの細胞内への導入が、(62) または (63) に記載のRNAの相補DNAを組み込んだベクターの細胞内への導入である、(65) に記載の方法。

(67) 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α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を有する細胞である、(65)または(66)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。

(68) 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、(65)～(67)のいずれか1項に記載の方法。

(69) 細胞が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)および(j)からなる群から選ばれる細胞である、(65)～(68)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) マウスミエローマ細胞株NSO細胞;

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞;

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞;

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞;

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞;

(h) 胚性幹細胞;

(i) 受精卵細胞;

(j) 植物細胞。

(70) (48)または(49)に記載の医薬を製造するための、(43)または(44)に記載の抗体組成物の使用。

本発明の細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親細胞よりも低下または欠失した細胞(以下、「本発明の宿主細胞」と略記する)としては、親株細胞よりも細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質(以下、「GDP-フコース輸送蛋白質」と略記する)の活性を低下または欠失させた細胞であればいかなる細胞も包含される。

親株細胞とは、GDP-フコース輸送蛋白質の活性を低下または欠失させるための方法を施す前の細胞をいう。

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・アンチィボディズ・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 (p883-900)等の文献に記載されている CHO 細胞があげられる。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具体的な例としてあげられる。

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、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 細胞をあげることができる。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。

GDP-フコース輸送蛋白質の活性を低下または欠失させるための方法としては、GDP-フコース輸送蛋白質の活性を低下または欠失させるための方法であればいず

れの手法でも用いることができるが、遺伝子工学的な手法が望ましい。その具体的な方法としては、

(a) GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) GDP-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) GDP-フコース輸送蛋白質についての突然変異を導入する手法；

(d) GDP-フコース輸送蛋白質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α結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性な細胞株を選別する方法を用いることにより、本発明のGDP-フコース輸送蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞を取得することができる。

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

本発明において、生育が阻害されないレクチン有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常 10μg/ml～10.0mg/ml、好ましくは 0.5～2.0mg/ml である。親株細胞に変異が導入され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α結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンも包含される。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) などがあげられる。

GDP-フコース輸送蛋白質としては、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。また、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GDP-フコース輸送蛋白質に包含される。

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1で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列からなる DNA ;

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列からなる DNA ;

(e) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 29 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 30 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(j) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(k) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(l) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(m) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ 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 4 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 31 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 32 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 2 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 4 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 31 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 32 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。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA としては、例えば、配列番号 1、3、29 または 30 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ブ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 などがあげられる。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、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、3、29 または 30 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。

本発明において、配列番号 2、4、31 または 32 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とは、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 2、4、31 または 32 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蛋白質などがあげられる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、本発明において、配列番号 2、4、31 または 32 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有し、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質してとは、BLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕や FASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)〕等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号 2、4、31 または 32 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と少なくとも 80%以上、好ましくは 85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上、特に好ましくは 97%以上、最も好ましくは 99%以上の相同性を有し、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質などがあげられる。

本発明の宿主細胞としては、抗体分子を発現できる細胞であればいかなる細胞でもよいが、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられ、好ましくは、動物細胞があげられる。動物細胞の好ましい具体例としては、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞、マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞、マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などがあげられる。

本発明の宿主細胞に抗体分子をコードする遺伝子を導入することにより、あるいは、宿主細胞が抗体分子を生産する能力を有する場合は、そのまま当該宿主細胞を用いることにより抗体組成物を製造することができる。

本発明は、また、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下するようにゲノムが改変された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を用いることを特徴とする抗体組成物を製造する方法に関する。

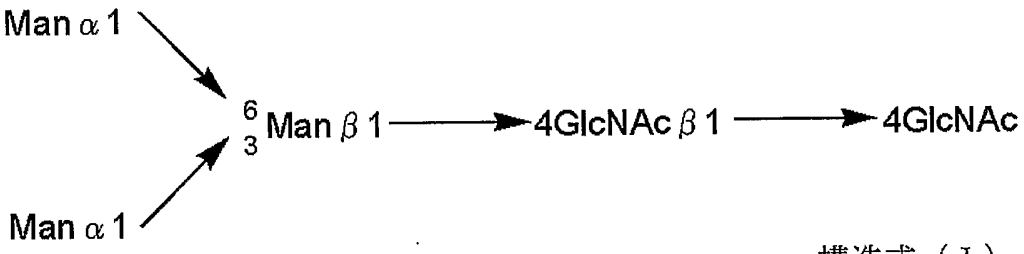
本発明において、抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子を含有する組成物をいう。

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

またIgGクラスはC領域の相同性により、さらにIgG1～IgG4のサブクラスに分類される。

H 鎖はN末端側より VH、CH1、CH2、CH3 の 4 つのイムノグロブリンドメインに分かれ、CH1 と CH2 の間にはヒンジ領域と呼ばれる可動性の高いペプチド領域があり、CH1 と CH2 とが区切られる。ヒンジ領域以降の CH2 と CH3 からなる構造単位はFc領域と呼ばれ、N-グリコシド結合型糖鎖が結合している。また、この領域は、Fc レセプター、補体などが結合する領域である（免疫学イラストレイテッド原書第5版、2000年2月10日発行、南江堂版、抗体工学入門、1994年1月25日初版、地人書館）。

抗体などの糖蛋白質の糖鎖は、蛋白質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖（N-グリコシド結合糖鎖）とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖（O-グリコシル結合糖鎖）の 2 種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、以下の構造式（I）に示す基本となる共通のコア構造を有する［生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年)］。



構造式（Ｉ）

上記構造式（Ｉ）において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

N-グリコシド結合糖鎖としては、上記構造式（Ｉ）のコア構造を有するものであればいかなるものでもよいが、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあげられる。

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

したがって、本発明において、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が欠失または低下した細胞を用いて製造した本発明の抗体組成物は、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。そのような本発明の抗体組成物として、好ましくは、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、GDP-フコース輸送蛋白質の活性を欠失または低下させるような処置が施されていない親株細胞が生産する抗体組成物よりも高い抗体組成物があげられる。

また、本発明において、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下するようにゲノムが改変された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を用いて製造した本発明の抗体組成物も、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。そのような本発明の抗体組成物として、好ましくは、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫（以下、親個体と称す）が生産する抗体組成物よりも高い抗体組成物があげられる。

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

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α結合していない糖鎖をいう。具体的には、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α結合していない糖鎖があげられる。

ADCC 活性が高い抗体組成物としては、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞または親個体が生産する抗体組成物の該割合よりも高いものがあげられる。具体的には、該割合が親株細胞または親個体よりも 2 倍以上、好ましくは 3 倍以上、より好ましくは 5 倍以上、特に好ましくは 10 倍以上高い抗体組成物があげられ、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全てが糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物が最も好ましい。

本発明の抗体組成物において、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、親株細胞または親個体が生産する抗体組成物よりも高い場合、本

発明の抗体組成物は、親株または親個体が生産する抗体分子からなる抗体組成物より高いADCC活性を有する。

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

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。

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

抗体としてはハイブリドーマ細胞が分泌するモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

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

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

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域（以下、HV または VH とも称す）および抗体 L 鎖 V 領域（以下、LV または VL とも称す）とヒト抗体の H

鎖 C 領域（以下、CH とも称す）およびヒト抗体の L 鎖 C 領域（以下、CL とも称す）とからなる抗体をいう。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

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

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

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

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

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、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、κクラスあるいはλ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 ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝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非ヒト動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることにヒト抗体酸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。

本発明の宿主細胞は、親株細胞が生産する抗体組成物より、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

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

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), 5th 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。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

(1) GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の宿主細胞は、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、標的とする蛋白質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細胞の作製

本発明の宿主細胞は、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、バイオ／テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097 (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Hum. Mol. Genet.), 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886

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

GDP-フコース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cDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

GDP-フコース輸送蛋白質をコードするゲノムDNAの例としては、配列番号34または35で表される塩基配列からなるGDP-フコーストランスポーターをコードするゲノムDNAがあげられる。

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

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

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

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

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

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

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

GDP-フコース輸送蛋白質のcDNAおよびゲノムDNAを取得する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

cDNAの調製方法

各種宿主細胞から全RNAまたはmRNAを調製する。

調製した全RNAまたはmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

GDP-フコース輸送蛋白質の既知アミノ酸配列、例えばヒトのアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて、GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、GDP-フコース輸送蛋白質をコードするcDNAを取得することができる。

各種宿主細胞のmRNAは、市販のもの(例えばClontech社製)を用いてもよいし、以下のごとく各種宿主細胞から調製してもよい。各種宿主細胞から全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)$^+$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。

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

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイッ

ク・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE 社製)、λgt10、λgt11 [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)]、λTriplEx (Clontech 社製)、λExCell (Pharmacia 社製)、pT7T318U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] および pUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

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

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

GDP-フコース輸送蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、GDP-フコース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-フコース輸送蛋白質をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法

[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABIPRISM377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片を DNA プローブとして、各種宿主細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、GDP-フコース輸送蛋白質の 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、各種宿主細胞に含まれる 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-フコース輸送蛋白質をコードする DNA を取得することもできる。

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

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で GDP-フコース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-フコース輸送蛋白質をコードしている遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1、3、29 または 30 に記載の塩基配列があげられる。

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

GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ゲノム DNA の調製方法

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

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、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失した細胞を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I , 糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編 (1988)]、文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社製), 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、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、GDP-フコースを基質として用いゴルジ体への輸送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、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析やＲＴ-PCR 法等があげられる。

また、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失した結果生じる形質の変化を指標に細胞を選択する方法としては、例えば、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や、細胞表面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などがあげられる。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、後述の 5. に記載の方法があげられる。細胞表面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、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α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挙げることができる。その具体的な例としては、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α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、好ましく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) 等があげられる。

具体的には、10μg/ml～10mg/ml、好ましくは 0.5～2.0mg/ml の濃度の上述のレクチンを含む培地に 1 日～2 週間、好ましくは 3 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採取後、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で、本発明の宿主細胞を選択することができる。

また、発現ベクターを用いず、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-フコース輸送蛋白質の cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5～150 塩基、好ましくは 5～60 塩基、より好ましくは 10～40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

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

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフ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 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宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, 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-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する。

該ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、GDP-フコース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-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、上記 1 の (1) の (a) に記載の「ゲノム DNA の調製方法」などがあげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、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) 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. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製 (羊土社) (1995) 等に記載のポジティブ選択、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宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、RDO (RNA-DNA oligonucleotide) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

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、標的とした蛋白質、すなわち 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-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

GDP-フコース輸送蛋白質のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「cDNAの調製方法」などがあげられる。

GDP-フコース輸送蛋白質のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「ゲノムDNAの調製方法」などがあげられる。

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

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした蛋白質、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記1の(1)の(a)に記載の、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、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5.に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDOのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dematol.), 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宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、 RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース輸送蛋白質の 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-フコース輸送蛋白質をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子のコンストラクトを設計する。

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

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

GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

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

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

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

GDP-フコース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、あるいは、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、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。また、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5. に記載の方法があげられる。

GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載された「cDNA 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。

本発明の RNAi 法に用いられる RNA としては、GDP-フコース輸送蛋白質などをコードする DNA に対応する RNA があげられる。好ましくは GDP-フコース輸送蛋白質が、上記記載の GDP-フコーストランスポーターである DNA に対応する RNA があげられる。

本発明の RNAi 法で使用される RNA としては、RNA およびその相補 RNA で構成され、かつ GDP-フコーストランスポーター等の GDP-フコース輸送蛋白質の mRNA 量を減少させることが可能な 2 本鎖 RNA であればいかなるものでもよいが、RNA の長さとしては、好ましくは 1～30、より好ましくは 5～29、さらに好ましくは 10～29、最も好ましくは 15～29 の連続した RNA があげられる。具体的には、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA；

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA；

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA、

さらに好ましくは、

(a) 配列番号 33 で表される塩基配列からなる RNA；

(b) 配列番号 33 で表される塩基配列において、1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列からなり、GDP-フコース輸送蛋白質に対して配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA

があげられる。

上述の「配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA」としては、配列番号 33 で表される RNA と、GDP-フコース輸送蛋白質に対する同様の RNAi 活性を有するものであればいかなるものでもよく、RNA の長さなどの量的要素は異なっていてもよい。

1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列とは、配列番号 33 の両端の塩基が 1 または数個欠失および／または付加された塩基配列をいう。塩基配列としては、好ましくは 1～30 塩基、より好ましくは 5～29 塩基、さらに好ましくは 10～29 塩基、最も好ましくは 15～29 塩基の連続した RNA があげられる。

また、これら RNA に対応する DNA およびその相補 DNA も本発明に包含され、RNA に対応する DNA として、具体的には配列番号 16 で表される塩基配列からなる DNA があげられる。さらに、該 DNA およびその相補 DNA をベクターに含む組換え体 DNA および該組換え体 DNA を細胞に導入して得られる形質転換体も、本発明に包含され、該 2 本鎖 RNA を発現させるために用いることができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の宿主細胞の作製

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

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿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-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース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、あるいは、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、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。また、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5. に記載の方法があげられる。

(2) GDP-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の宿主細胞は、GDP-フコース輸送蛋白質を標的とし、該蛋白質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。

細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターは、小胞体およびゴルジ体の膜上においてダイマーを形成して機能していることが知られている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 275, 17718 (2000)]。また、細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターの変異体を細胞内で強制発現させることにより、野生型トランスポーターとヘテロダイマーを形成し、形成したヘテロダイマーは野生型ホモダイマーに対して阻害活性を示すことが報告されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 275,

17718 (2000)]。従って、細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターの変異体を作製し細胞内に導入することで、ドミナントネガティブ体として機能させることが可能である。このような変異体の作製は、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。

上記方法で得られる、GDP-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体としては、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の N 末端欠失体、好ましくは、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の N 末端 30 アミノ酸が欠失した N 末端欠失体があげられる。具体的には、実施例 1 に記載の GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体があげられる。

本発明の宿主細胞は、上述のように作製した標的蛋白質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-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

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-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

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

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を

転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターがあげられる。

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

GDP-フコース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、あるいは、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、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。また、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5. に記載の方法があげられる。

(3) GDP-フコース輸送蛋白質についての突然変異を導入する手法

本発明の宿主細胞は、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、該蛋白質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-フコース輸送蛋白質の遺伝子としては、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

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

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版 (朝倉書店) 日本組織培養学会編 (1996)、ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genet.), 24, 314, (2000) 等に記載の方法を挙げることができる。

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

GDP-フコース輸送蛋白質の活性を測定する方法、あるいは、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、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 5. に記載の方法があげられる。

(4) GDP-フコース輸送蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、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。

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

GDP-フコース輸送蛋白質の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的として、1. に記載の手法を用いて作製した本発明の胚性幹細胞、受精卵細胞、または植物細胞より、公知の方法を用い作製することができる。

具体的な方法について、以下に記す。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1. に記載の手法を用いることにより、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体例としては、染色体上の GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法 [例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987) 等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンなどがあ

げられる。作製した胚性幹細胞（例えば、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-フコース輸送蛋白質の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

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

胚性幹細胞へのターゲットベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology), 3, 133 (1990)］、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075)、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)］、インジェクション法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版)、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第 2606856、日本特許第 2517813)、DEAE-デキストラン法［バイオマニュアルシリーズ 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プテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、hprt 遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を G418 を含む培地で培養し、G418 耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。

DT 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を培養し、生育してきた株を選別する（相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、DT 遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、DT の毒性により生育できない）ことにより、DT 遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）や PCR 法［ピーシーアール・プロトコールズ（PCR Protocols), Academic Press (1990)］等があげられる。

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

雌マウスへ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスに得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましく、偽妊娠雌マウスは自然交配によっても得られるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（以下、LHRH と略する）あるいはその類縁体を投与後、雄マウスと交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスを得ることもできる。LHRH の類縁体としては、例えば [3,5-Dil-Tyr5]-LHRH、[Gln8]-LHRH、[D-Ala6]-LHRH、des-Gly10-[D-His(Bzl)6]-LHRH ethylamide 等があげられる。

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

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もできる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルスまたは細胞に、1. に記載の手法を施すことで、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失した本発明の植物細胞からなる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，1993（以下、モノクローナルアンチボディズと略す）、Antibody Engineering，A Practical Approach，IRL Press at Oxford University Press，1996（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

抗体分子のcDNAを調製する。

調製した抗体分子の全長cDNA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cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

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

宿主細胞として、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が、好ましくは動物細胞があげられる。

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。

本発明の抗体組成物の製造方法に用いられる宿主細胞としては、上記1．で作製した、GDP-フコース輸送蛋白質の活性が親株細胞より欠失または低下した細胞をあげることができる。

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

cDNA は、上記 1. の (1) の (a) に記載の「cDNA 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を用いて調製することができる。

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

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、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、MFα1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

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

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [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 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840 (1987)]、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、SRα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［Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press（1994）（以下、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版と略す）］、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 Invitorogen 社製）等をあげることができる。

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

昆虫細胞としては、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、WO94/00977)、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。

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。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞等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。

酵母等の真核生物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、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

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

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マン癌、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℃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培地邊［ヴュウロロジー（Virology), 8, 396 (1959)］、199培地［プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン（Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)］、Whitten培地［発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（1987）］またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～8、30～40℃、5%CO_2存在下等の条件下で 1～7 日間行う。フェドバッチ培養、ホロファイバー培養などの培養法を用いて 1 日～数ヶ月培養を行うこともできる。

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

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

培養は、通常 pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。

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

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

培養は、通常 pH5～9、20～40℃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、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。

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

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

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

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αカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、β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、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia 社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

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

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物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領域を有する融合蛋白質などを挙げることができる。

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、他の抗体組成物を上述の方法および当該方法に準じ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、hCγ1と表記する）およびヒト抗体のL鎖のκクラスのC領域（以下、hCκ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 β 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ジン-トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymol.），154，3（1987）］、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第 2 版）等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit（Invitrogen 社製）、Quick Prep mRNA Purification Kit（Pharmacia 社製）等があげられる。

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

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express［ストラテジーズ（Strategies），5，58（1992）］、pBluescript II SK(+)［ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research)，17，9494（1989）］、λ zap II (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11［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）、λExCell、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プラーク・ハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction（以下、PCR 法と表記する； モレキュラー・クローニング第 2 版；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断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.,U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

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

(3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

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

既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項3の（1）に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流に、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、それぞれを本項3の（1）に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型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性（少なくとも60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・

オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さから成る数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

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

(6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。

ヒト型 CDR 移植抗体の作製において、該抗体と抗原との結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定することが、最も重要な点である。抗体と抗原との結合活性に関わる FR のアミノ酸を同定する方法としては、X 線結晶解析 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 112, 535 (1977)] 或いはコンピューターモデリング [プロテイン・エンジニアリング

(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)] 等の抗体の立体構造の構築及び解析方法があげられる。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらした。しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されていない。したがって、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて本項 3 の (5) に記載の PCR 法により行うことができる。PCR 後の増幅産物について本項 3 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流に、本項 3 の (5) および (6) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 3 の (5) および (6) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

(8) ヒト化抗体の安定的生産

本項 3 の (4) および (7) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体（以下、併せてヒト化抗体と称す）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

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

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、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 NSO 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、1. に記載の細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate（以下、G418 と表記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBS と表記する）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；アンチボディズ、モノクローナルアンチボディズ）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（アンチボディズ、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（アンチボディズ、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Fcγ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 β d2-4［サイトテクノロジー（Cytotechnology), 4, 173 (1990)］等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR［バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター［セル（Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー［セル（Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

(2) ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAの取得

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

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

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

細胞や組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・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™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express［ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)］、pBluescript II SK(+)［ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)］、λ zapII (Stratagene社製)、λgt10、λgt11［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)、λExCell、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プラーク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法により目的の蛋白質をコードするcDNAを調製することもできる。

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

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

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

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

(3) Fc 融合蛋白質の安定的生産

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

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

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

具体的には、マウスミエローマ細胞である NSO 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、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した Fc 融合蛋白質分子全体の分子量は、SDS-PAGE [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法（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製造することができる。

既に、宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有している場合には、前記 1. に記載の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採取することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

4. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合性あるいは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)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

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

5. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖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。

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

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

(2) 糖鎖構造解析

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

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイ

オケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2 次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

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

6. 本発明により得られる抗体組成物の利用

本発明により得られる抗体組成物は高い 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、すなわち悪性腫瘍では癌細胞が増殖している。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な場合が多く化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス (Science), 280, 1197, 1998]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもつながる。

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した細胞の増殖を、高い ADCC 活性を有する抗体を用いて抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患を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、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体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 (Anticancer Res., 13, 331-336, 1993)、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993)、抗 GM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗 CD52 抗体 (Nature, 332, 323-327, 1988)、抗 MAGE 抗体 (British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗HM1. 24 抗体 (Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗 FGF8 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗ＦＧＦ８ 受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗 PMSA 抗体 (J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン６抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン６受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン 5 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン４抗体 (Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン４受容体抗体 (J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗 CCR4 抗体 (Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) などがあげられる。

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 GpIIb／IIIa 抗体（J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994）、抗血小板由来増殖因子抗体（Science, 253, 1129-1132, 1991）、抗血小板由来増殖因子受容体抗体（J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997）または抗血液凝固因子抗体（Circulation, 101, 1158-1164, 2000）などがあげられる。

自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己 DNA 抗体（Immunol. Letters, 72, 61-68, 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（Structure, 8, 385-395, 2000）、抗 CD4 抗体（J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998）、抗 CCR4 抗体または抗ベロ毒素抗体（J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 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、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS 社、PharMingen 社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

本発明により得られる抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理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ることができる。

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

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

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

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

非経口投与に適当な製剤としては、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、通常成人1日当たり10μg/kg～20mg/kgである。

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

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

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、CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、および CHO/pcDNA-CCR4 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体と CCR4 部分ペプチドとの結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果を示したものである。グラフの縦軸は、CCR4 部分ペプチドとの結合活性を波長 490nm における吸光度で示している。横軸は抗 CCR4 キメラ抗体の反応液中の濃度を示している。▲は CHO/GDPftΔ30-CCR4 抗体、■は CHO/pcDNA-CCR4 抗体の抗原結合活性を示す。

第 2 図は、CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、および CHO/pcDNA-CCR4 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を抗体濃度を変化させて測定した結果を示したものである。グラフの縦軸に細胞障害活性、横軸に抗 CCR4 キメラ抗体の反応液中の濃度をそれぞれ示す。▲は CHO/GDPftΔ30-CCR4 抗体、■は CHO/pcDNA-CCR4 抗体の活性をそれぞれ示す。

第 3 図は、CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、および CHO/pcDNA-CCR4 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 4 図は、チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターの非翻訳部分および隣接する翻訳領域の塩基配列を示した図である。全長 cDNA 取得のために設計したプライマー部分を下線で示す。翻訳領域の塩基配列下部に塩基配列より推定されるアミノ酸配列を示す。

第 5 図は、プラスミド U6_pre_sense の構築工程を示す図である。

第 6 図は、プラスミド pBS_BglII の構築工程を示す図である。

第 7 図は、プラスミド U6_pre_antisense の構築工程を示す図である。

第 8 図は、プラスミド U6_sense_H の構築工程を示す図である。

第 9 図は、プラスミド U6_antisense_H の構築工程を示す図である。

第 10 図は、プラスミド U6_GFT_H の構築工程を示す図である。

第 11 図は、プラスミド U6_GFT_H_puro の構築工程を示す図である。

第 12 図は、siRNA 発現による β-アクチンと GDP-フコーストランスポーターの発現量の変化を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. GDP-フコーストランスポータードミナントネガティブ体発現細胞の作製と産生抗体の評価

(1) ヒト GDP-フコーストランスポーター遺伝子の単離

ネイチャー・ジェネティクス [Nature Genetics, 8, 73 (2001)] に記載のヒト GDP-フコーストランスポーターmRNA 配列を用いて、ヒト GDP-フコーストランスポーターmRNA 配列のオープンリーディングフレーム (以下、ORF と表記) の全長を増幅する為のプライマーセット [GDPfT-Fw Primer (配列番号 5) と GDPfT-Rv Primer (配列番号 6)] を設計し、DNA を合成した。

500μl 容のマイクロ遠心管 (エッペンドルフ社製) 中に、2.5μl のヒト胎児脳由来 Marathon-Ready-cDNA (クロンテック社製)、5μl の 20mM デオキシリボヌクレオチド混合液 (東洋紡績社製)、5μl の 10×PCR バッファー (クロンテック社製)、4μl の GDPfT-Fw Primer (20pmol 相当量)、4μl の GDPfT-Rv Primer (20pmol 相当量)、1μl の Advantage DNA ポリメラーゼ (クロンテック社製)、28.5μl の滅菌蒸留水 (インビトロジェン社製) を添加し、PCR 液を調製した。反応液を十分に混合後、ミネラルオイル (Sigma 社製) を 30μl 重層し、サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) にて、94℃で 2 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、64℃で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして、30 回反復させ、最後に 72℃にて 3 分間反応させた。反応液から 5μl を分取してアガロースゲル電気泳動を行い、全長約 1.1kbp の用いたプライマー特異的な DNA の増幅を確認した。

次に、500μl 容のマイクロ遠心管 (エッペンドルフ社製) 中に、4μl の PCR 液、1μl の TopoTA クローニングベクター (インビトロジェン社製)、1μL の Salt Solution (インビトロジェン社製) を混合し、室温にて 15 分間放置した。反応後の液から 1μl を分取して、50μl の大腸菌 XL-1 Blue コンピテントセル (Stratagene 社製) と混合し、氷上にて 15 分間放置後、42℃の温浴にて 45 秒間加熱して熱ショックによる大腸菌の形質転換を行った。形質転換後の大腸菌は、LB 培地 (DIFCO 社製) に懸濁後、50μg/ml のアンピシリン (和光純薬社製) を添加した LB 寒天培地プレート上に播種した。プレートを 37℃にて一晩培養し、寒天培地上に形質転換株のシングルコロニーを得た。得られたシングルコロニーを滅菌した爪楊枝で剥ぎ取り、50μg/ml のアンピシリン (和光純薬社製) を添加した 50ml の LB 培地中で、37℃、150rpm (往復振とう) の条件で一晩培養した。得られた培養液を遠心管 (ベクトンディッキンソン社製) に分取し、4℃にて

8000rpm、15 分間の遠心分離を行い、上清を除去し、大腸菌の菌体を取得した。得られた菌体に対し、Qiaprep Midi Plasmid DNA Purification Kit (QIAGEN 社製) を用い、キット添付のプロトコールに従ってプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミド DNA はアガロースゲル電気泳動にて純度を確認後、分光光度計(島津製作所社製) を用いて波長 260nm の吸光度を測定し、濃度を算出した。DNA シーケンサー377A (島津製作所社製) を用いて、1.1kbp の組換え DNA 配列を解読し、GDP-フコーストランスポーターの全長 ORF であることを確認した。配列決定したヒト GDP-フコーストランスポーターcDNA の塩基配列を配列番号 3 に、該塩基配列に基づくヒト GDP-フコーストランスポーターのアミノ酸配列を配列番号 4 に示した。得られたプラスミド DNA は、pCR/hGDPfT と名付けた。

(2) ヒト GDP-フコーストランスポーターN 末端欠失変異体とその発現ベクターの作製

ヒト GDP-フコーストランスポーターの N 末端側から 30 残基のアミノ酸を削除した cDNA 配列を増幅する為のプライマーセット [GDPfTΔ30-Fw Primer (配列番号 7) と GDPfTΔ30-Rv Primer (配列番号 8)] を設計し、DNA を合成した。なお、GDPfTΔ30-Fw Primer には、ヒト GDP-フコーストランスポーターの 31 番目のアミノ酸をコードする DNA 配列の 5' 末端側上流に、動物細胞用発現プラスミド pcDNA3.1Hyg(+) (Invitrogen 社製) に組込む為の制限酵素 HindIII サイト、翻訳効率化配列である Kozak 配列 (CCGCC) および翻訳開始コドン ATG を接続した形で設計した。

また、GDPfTΔ30-Rv Primer には、ヒト GDP-フコーストランスポーターの翻訳終止コドンをコードする DNA 配列の 5' 末端外側に、動物細胞用発現プラスミド pcDNA3.1Hyg(+) (Invitrogen 社製) に組込む為の制限酵素 XbaI サイトを接続した形で設計した。

500μl 容のマイクロ遠心管(エッペンドルフ社製)中に、本項 (1) で作製した 10ng の pCR/hGDPfT、5μl の 20mM デオキシリボヌクレオチド混合液 (東洋紡社製)、5μl の 10×PCR バッファー (クロンテック社製)、4μl の GDPfTΔ30-Fw Primer (20pmol 相当量)、4μl の GDPfTΔ30-Rv Primer (20pmol 相当量)、1μl の KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績社製)、28.5μl の滅菌蒸留水 (インビトロジェン社製) を添加し、PCR 液を調製した。反応液を十分に混合後、ミネラルオイル (Sigma 社製) を 30μl 重層し、サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社

製）にて、94℃で2分間の加熱の後、94℃で30秒間、64℃で3分間からなる反応を1サイクルとして、30回反復させ、最後に72℃にて3分間反応させた。反応液から5μl を分取してアガロースゲル電気泳動を行い、全長約 1kbp の用いたプライマー特異的なDNAの増幅を確認した。

次に、PCR 液をマイクロ遠心管に回収し、Qiaquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製）を用いてDNAを精製し、DNA溶液の1/10容のMバッファー（宝酒造社製）を添加後、各10unitsの制限酵素HindIIIとXbaI（共に宝酒造社製）を添加して37℃にて8時間処理した。なお、この制限酵素処理の際、10μgのプラスミドpcDNA3.1Hyg(+)（Invitrogen社製）も同様に処理した。

制限酵素処理したサンプルよりQiaquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いてDNAを精製し、N末欠失体のcDNA溶液5μLとpcDNA3.1Hyg(+)溶液1μLを混合後、Ligation High（東洋紡績社製）を6μL添加し、16℃にて30分間ライゲーション反応を行った。反応液を2μL分取し、50μlの大腸菌XL-1 Blue コンピテントセル（Stratagene 社製）と混合し、氷上にて 15 分間放置後、42℃の温浴にて45秒間加熱して熱ショックによる大腸菌の形質転換を行った。形質転換後の大腸菌は、LB培地（DIFCO社製）に懸濁後、50μg/mlのアンピシリン（和光純薬社製）を添加したLB寒天培地プレート上に播種した。プレートを37℃にて一晩培養し、寒天培地上に形質転換株のシングルコロニーを得た。得られたシングルコロニーを滅菌した爪楊枝で剥ぎ取り、50μg/mlのアンピシリン（和光純薬社製）を添加した50mlのLB培地中で、37℃、150rpm（往復振とう）の条件で一晩培養した。

得られた培養液を遠心管（ベクトンディッキンソン社製）に分取し、4℃にて8000rpm、15分間の遠心分離を行い、上清を除去し、大腸菌の菌体を取得した。得られた菌体に対し、Qiaprep Midi Plasmid DNA Purification Kit（QIAGEN社製）を用い、キット添付のプロトコールに従ってプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドDNAはアガロースゲル電気泳動にて純度を確認後、分光光度計（島津製作所社製）を用いて波長260nmの吸光度を測定し、濃度を算出した。DNAシーケンサー377A（島津製作所社製）を用いて、1kbpの組換えDNA配列を解読し、ヒトGDP-フコーストランスポーターのN末端欠失体であることを確認した。得られたプラスミドDNAは、pcDNA/hGDPfTΔ30と名付けた。

(3) CHO/DG44 細胞へのプラスミドの導入と形質転換体の取得

10μg の pcDNA/hGDPfTΔ30 と 10μg の CCR4 キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 (WO01/64754 に記載) を、1.6×10^6 個の CHO/DG44 細胞 [G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (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)] により共導入した。また、対照として、10μg の pcDNA3.1Hyg(+) と 10μg の pKANTEX2160 を CHO/DG44 細胞に同様に共導入した。

それぞれの細胞懸濁液を 10ml の IMDM -dFBS(10)-Hyg (500) [透析牛胎児血清を 10%、ハイグロマイシン (和光純薬社製) を 500μg/ml で含む IMDM 培地] に懸濁し、T75 フラスコ (グライナー社製) へ播種した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、2 週間培養し、ハイグロマイシン耐性形質転換株を得た。次に培地を IMDM -dFBS(10)-Hyg (500) に 50nM MTX を添加した培地に交換し、2 週間培養して 50nM MTX 耐性株を取得した。更に、引続き、培地を IMDM -dFBS(10)-Hyg (500) に 200nM MTX を添加した培地に交換し、2 週間培養して 200nM MTX 耐性株を取得した。これらの 200nM MTX 耐性株は、本実施例 (6) に記載の CCR4 ペプチド固相化プレートを用いた ELISA 法により抗 CCR4 キメラ抗体の発現を確認した。

ヒト GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体を導入した形質転換株を CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、pcDNA3.1Hyg(+)を導入した形質転換株を CHO/pcDNA-CCR4 株とそれぞれ称す。なお、CHO/GDPftΔ30-CCR4 株は Nega-13/GDPfTΔ30 の細胞名で、平成 14 年 3 月 14 日付けで独立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-7965 として寄託されている。

(4) 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

作製した CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、および CHO/pcDNA-CCR4 株が産生する抗 CCR4 キメラ抗体の精製は、以下のように行った。

CHO/GDPftΔ30-CCR4 株、および CHO/pcDNA-CCR4 株をそれぞれ T182 フラスコ (グライナー社製) に播種し、5%CO_2 インキュベーター内で 37℃にてコンフルエントになるまで増殖させた。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 (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、35ml の EXCELL301 培地 (JRH 社製) を添加した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃にて一週間培養後、培養上清を回収し、Prosep-A カラム (ミリポア社製) に

よる精製を添付の説明書に従い行った。精製抗体の蛋白質濃度を BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社製) で定量した。得られた精製抗体は、CHO/GDPft Δ30-CCR4 株の生産抗体を CHO/GDPft Δ30-CCR4 抗体と、CHO/pcDNA-CCR4 株の生産抗体を CHO/pcDNA-CCR4 抗体とそれぞれ名付けた。

(5) 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

本実施例の(4)で得られた、2 種類の精製抗 CCR4 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。精製した抗 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 (アンチボディズ, 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。

(6) CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の評価

本実施例の(4)で得られた 2 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、CCR4 ペプチド固相化プレートを用いた ELISA 法に従って以下の方法で測定した。

抗体 CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 15) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100ml の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリックアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を撹拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で

溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした（A_{280}測定から BSA 濃度を算出）。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液（BSA 換算 1.25mg）を撹拌しながら添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4℃、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 mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 穴の EIA 用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05μg/mL、50μl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS（以下、Tween-PBS と表記する）で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50μL/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、それぞれ 50μL/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 50μL/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を 50μL/ウェル加えて反応を停止した。その後 415nm の吸光度を測定した。

その結果、第 1 図に示したように、CHO/GDPftΔ30-CCR4 抗体と CHO/pcDNA-CCR4 抗体は、ほぼ同等の CCR4 ペプチドに対する抗原結合活性を示した。

(7) ヒト CCR4 高発現細胞株に対する ADCC 活性の評価

本実施例の(4)で得られた 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の、ヒト CCR4 高発現細胞である CCR4/EL-4 細胞（WO01/64754）に対する ADCC 活性は、以下に記載の方法に従って測定した。

(a) 標的細胞溶液の調製

WO01/64754 に記載のヒト CCR4 を発現している CCR4/EL-4 細胞の 1.5×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $Na_2{}^{51}CrO_4$ を 5.55MBq 当量加えて 37℃で 1 時間 30 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁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℃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 15mL 加え、2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(b) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

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

(c) 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（a）で調製した標的細胞溶液の 50μL（1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで上記（b）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を 100μL（5×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる）添加した。さらに、抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度 0.0001～10μg/mL となるように加え、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量をγ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性（%）は下式（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、第 2 図に示したように、CHO/GDPftΔ30-CCR4 抗体の ADCC 活性は、CHO/pcDNA-CCR4 抗体と比較して有意に高いことが明らかとなった。

(8) 抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖構造の解析

本実施例の(4)で得られた 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体について、糖鎖構造の解析を行った。精製したそれぞれの抗体を、ウリトラフリー0.5-10K（ミリポア社製）を用いて 10mM KH_2PO_4 に溶液を置換した。置換倍率は 80 倍以上になるように行なった。置換した抗体は、UV-1600（島津製作所製）を用いて濃度を測定した。

抗体のアミノ酸配列から下記式（2）［アドバンスズ・イン・プロテインケミストリー（Advances in Protein Chemistry), 12, 303 (1962)］を用いてモル吸光定数を算出し、280nmの吸光度1.0を1.38mg/mlとして濃度を決定した。

式（2）

$E_{1mol/l}=A\times n1+B\times n2+C\times n3$

$E_{1mol/ml} = E_{1mol/l} /MW$

$E_{1mol/l}$:280nmでの吸光係数（mg^{-1} ml cm^{-1}）

$E_{1mol/ml}$:280nmでのモル吸光係数（$M^{-1}cm^{-1}$）

A:トリプトファンの280nmでのモル吸光係数＝5550（$M^{-1}cm^{-1}$）

B:チロシンの280nmでのモル吸光係数＝1340（$M^{-1}cm^{-1}$）

C:シスチンの280nmでのモル吸光係数＝200（$M^{-1}cm^{-1}$）

n1:抗体1分子あたりのトリプトファンの数

n2:抗体1分子あたりのチロシンの数

n3:抗体1分子あたりのシスチンの数

MW:抗体の分子量（g/mol）

100μgの抗体をヒドラクラブS-204用試験管に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させた該試験管をホーネン社製ヒドラクラブを用いてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジン分解はホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110℃、1時間反応させることにより行った［メソッド・オブ・エンザイモロジー(Method of Enzymology), 83, 263 (1982)]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を30分間放置して室温に戻した。試験管にホーネン社製アセチル化試薬のacetylation reagentを250μl、無水酢酸を25μl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250μl、無水酢酸を25μl加えてよく攪拌させ、室温で1時間反応させた。試料を-80℃のフリーザーで凍結させ、約17時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。

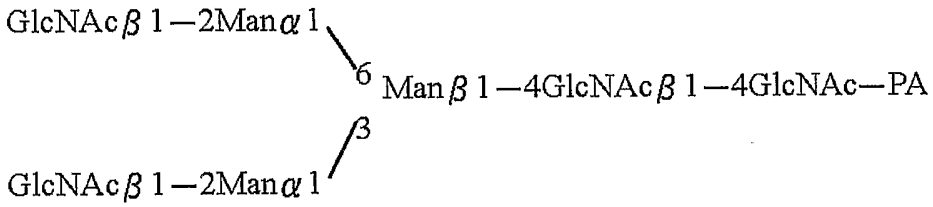
試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.), 95, 197 (1984)]。2-アミノピリジン溶液は2-アミノピリジン1gに対しHCl 760μlを加え(1×PA溶液)、その溶液を逆浸透精製水で10倍に希釈したものを用いた（10倍希釈PA溶

液)。シアン化水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアン化水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1×PA 溶液 20μl、逆浸透精製水 430μl を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67μl 入れて 100℃、15 分間反応させ、放冷後にシアン化水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2μl 入れて 90℃、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Superdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mM 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5ml／分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製φ6.0nm×150nm) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55℃、流速は 1ml/ml、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分間溶出した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS 分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった。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。HPLC の分析チャートを第 3 図に示す。緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B として 0.5%1-ブタノールを含むリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) を用い、以下のグラジエントで分析した。

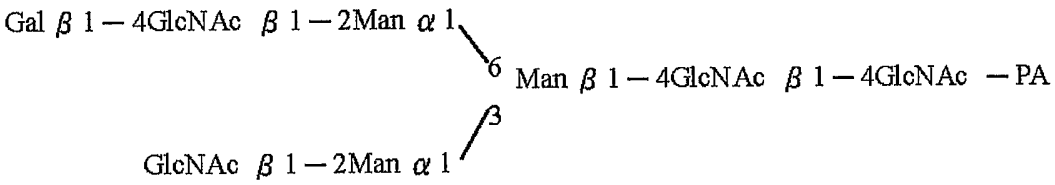
時間 (分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B (%)	0	60	60	0	0

なお、第 3 図で示した①～⑧のピークは、以下の構造 (1)～(8) にそれぞれ対応する。

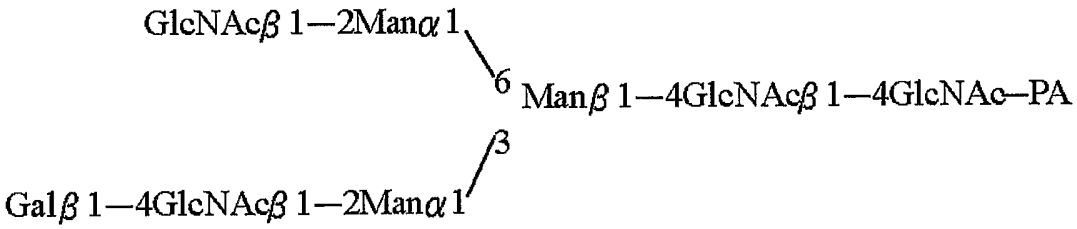
(1)


GlcNAcβ1—2Manα1
6
Manβ1—4GlcNAcβ1—4GlcNAc—PA
3
GlcNAcβ1—2Manα1

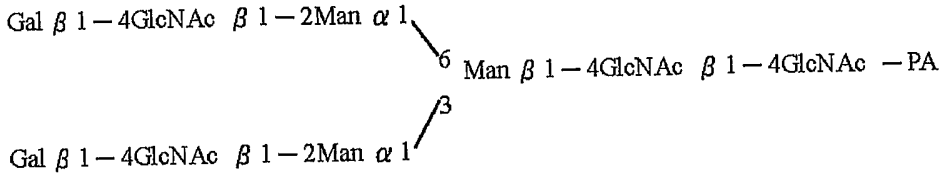
(2)


Galβ1—4GlcNAc β1—2Man α1
6
Man β1—4GlcNAc β1—4GlcNAc —PA
3
GlcNAc β1—2Man α1

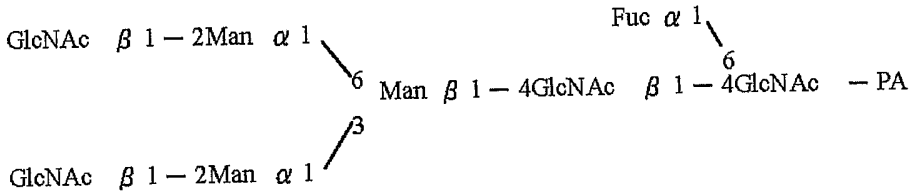
(3)


GlcNAcβ1—2Manα1
6
Manβ1—4GlcNAcβ1—4GlcNAc—PA
3
Galβ1—4GlcNAcβ1—2Manα1

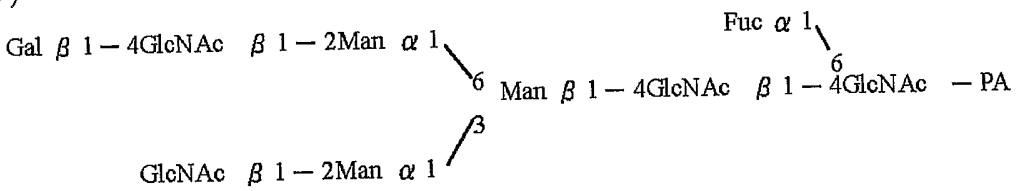
(4)



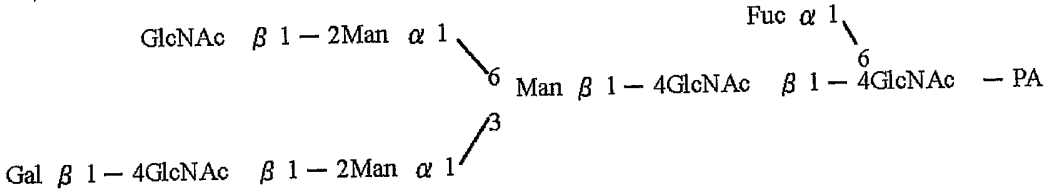
(5)



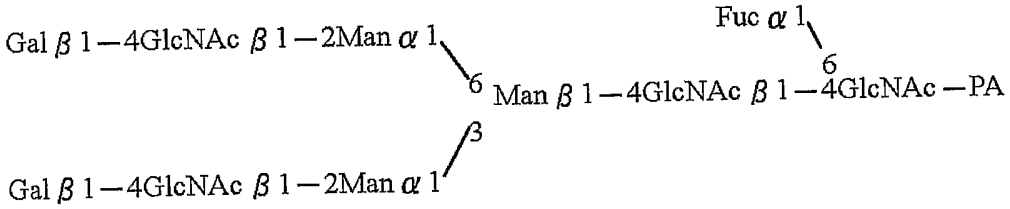
(6)



(7)



(8)



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 3 図において、α1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、①～⑧のうち①～④のピークが占める面積、α1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、①～⑧のうち⑤～⑧のピークが占める面積から算出した。その結果を第 1 表に示す。

第1表

抗体	α1,6-フコースを持たない糖鎖の割合（%）
CHO/GDPftΔ30-CCR4抗体	35
CHO/pcDNA-CCR4抗体	10

ピーク面積から計算すると、CHO/GDPftΔ30-CCR4 抗体のα1,6-フコースのない糖鎖含量は35%、α1,6-フコースが結合した複合型糖鎖の割合は65%であった。CHO/pcDNA-CCR4抗体のα1,6-フコースのない糖鎖含量は10%、α1,6-フコースが結合した複合型糖鎖の割合は90%であった。

以上の結果から、導入した GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体はGDP-フコーストランスポーターのドミナントネガティブ体として働き、産生抗体のα1,6-フコースが結合した複合型糖鎖の割合を低下させることが可能であることが分かった。

実施例 2. チャイニーズハムスター細胞からの GDP-フコーストランスポーター遺伝子の単離

(1) CHO/DG44細胞由来全RNAの抽出

CHO/DG44 細胞 [G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] を、10%ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。37℃の 5%CO_2インキュベーター内で培養し、培養 2 日目に 1×10^7 個を回収後、RNAeasy(QIAGEN 社製)により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

(2) CHO/DG44細胞由来全一本鎖cDNAの調製

上記 (1) で調製した全RNAを45μ1の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1μ1、付属の 10×DNase buffer 5μ1、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5μ1 をそれぞれに添加して、37℃で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy(QIAGEN社製)により全RNAを再精製し、50μ1の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA3μ1 に対し SUPERSCRIPT™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オ

リゴ(dT)をプライマーとした 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。PCR 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℃で保管した。

(3) ヒト/チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) キメラ GDP-フコーストランスポーターcDNA の取得

上記 (2) で作製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA に対し、実施例 1 の (1) に記載したヒト GDP-フコーストランスポーター配列に基づいて設計したプライマーセット GDPfT-Fw Primer と GDPfT-Rv Primer (配列番号 5 および配列番号 6) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行ないプライマー部分がヒト GFT 配列、増幅部分が CHO 配列となるキメラ GDP-フコーストランスポーターを増幅した。PCR は ExTaq (宝酒造社製) を用いて CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1μl を含む 25μl の反応液 [ExTaq buffer、0.2mM dNTPs、0.5μM 上記遺伝子特異的プライマーセット]を調製し、94℃で 5 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 5 分間加熱する条件で行った。PCR 終了後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 1100bp を GENECLEAN SPIN Kit (BIO101 社製) を用いて精製 (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) し、滅菌水 20μl で溶出した。上記増幅断片 9μl を Ligation High (東洋紡績社製) を用いた 20μl の反応系で T7blue T-Vector 50ng との連結反応を行ない、該反応液 2μl を用いて大腸菌 DH5α をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた)に従って、プラスミド DNA を単離した。インサートの有無は、アガロースゲル電気泳動によるサイズ比較により確認し、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 Raedy Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して添付のマニュアルに従い決定した。決定した 4 つのクローンの塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除いた後、本法より決定した挿入 DNA が

ヒト/CHO キメラ GDP-フコーストランスポーターをコードしていることを確認した。

(4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

上記 (1) で抽出した CHO/DG44 全 RNA からの 5'RACE 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、添付の説明書に従って行った。ただし PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

(5) RACE 法によるチャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターの非翻訳領域塩基配列の決定

上記 (3) で決定したヒト/CHO キメラ GDP-フコーストランスポーター塩基配列をもとにチャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターに特異的な 5'RACE 用プライマーCHO#GFT#GSP5'-1 (配列番号 9) および CHO#GFT#GSP5'-2 (配列番号 10)、チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーター特異的な 3'RACE 用プライマーCHO#GFT#GSP3'-1 (配列番号 11) および CHO#GFT#GSP3'-2 (配列番号 12) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit(CLONTECH 社製)を用いて、本実施例 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA を 1μl を含む 50μl の反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mM dNTPs、0.2μmol/l チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーター特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94℃で 5 秒間、64℃で 10 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。反応終了後、反応液より 1μl を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。1 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 2 表に示した。2 回目の PCR 終了後、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精製し、滅菌水 20μl で溶出した。

上記、5'RACE および 3'RACE により取得した PCR 産物の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Raedy Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用してダイレクトシークエン

ス法により決定した。方法は添付のマニュアルに従った。チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターのORFに隣接する5'および3'の非翻訳領域の塩基配列について第4図に示す。

第2表

チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターc DNA RACEに用いたプライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5' RACE	特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ（予測値）
1st PCR	GFT_GSP5'-1	UPM(Univarsal primer mix)	
2nd PCR	GFT_GSP5'-2	NUP(Nested Univarsal primer)	約 550bp（280bp 以上）

3' RACE	特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ（予測値）
1st PCR	GFT_GSP3'-1	UPM(Univarsal primer mix)	
2nd PCR	GFT_GSP3'-2	NUP(Nested Univarsal primer)	約 1400bp（270bp 以上）

(6) チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーターの全長 cDNA のクローニング

まず、本実施例（5）で決定したGDP-フコーストランスポーターの非翻訳領域の塩基配列に基づいて、チャイニーズハムスターGDP-フコーストランスポーター特異的増幅用プライマーセット、CHO#GFT#FW（配列番号 13）および、CHO#GFT#RV（配列番号 14）を設計した。次に KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡績社製）を用いて、本実施例（2）で調製したCHO/DG44由来一本鎖cDNAを1μl を含む20μl の反応液［KOD buffer、0.2mM dNTPs、1.6mM $MgCl_2$、0.5μM 上記遺伝子特異的プライマー（CHO#GFT#FW および CHO#GFT#RV）］を調製し、94℃で5分間の加熱の後、94℃で5秒間、60℃で10秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクル繰り返す条件でPCRを行った。独立した系で4回のPCRを実施後、それぞれの反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 1250bp を GENECLEAN SPIN Kit（BIO101社製）を用いて精製し、滅菌水20μl で溶出した。上記増幅断片4μl を Ligation High（東洋紡績社製）を用いた20μl の系で pCR-blunt vector（invitrogen 社製）5ng との連結反応を行ない、該反応液2μl を用いて DH5α を形質転換した。得られた複数のカナマイシン耐性コロニーからプ

ラスミドDNAを単離し、約100ngをEcoRI消化後、アガロースゲル電気泳動に供しインサートの存在を確認した。クローニングしたPCR増幅断片の塩基配列はDNAシークエンサー377（Perkin Elmer社製）およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Raedy Reaction Kit（Perkin Elmer社製）を使用して決定した。本法より配列決定したチャイニーズハムスターのGDP-フコーストランスポーターcDNAについて配列番号1に示した。さらに、決定した全長cDNA配列中に存在するORF（塩基番号117番～1214番）より推定されるチャイニーズハムスターのGDP-フコーストランスポーターアミノ酸配列（365アミノ酸）を配列番号2に示した。

実施例3. GDP-フコーストランスポーターを標的としたsiRNA発現プラスミド導入細胞の作製と該細胞を用いた抗体組成物の生産

1. GDP-フコーストランスポーターを標的としたsiRNA発現プラスミドU6_GFT_H_puroの構築

(1) RNAiの標的とするCHO由来遺伝子塩基配列の選別

配列番号16に示した19塩基をRNAiの標的配列とした。該配列は実施例2で取得したチャイニーズハムスター由来GDP-フコーストランスポーターcDNA（配列番号1）に示された塩基配列の803番目から821番目に相当する。該配列を標的としたショートインターフェアリングRNA（以下、siRNAと記載する）をsiRNA_GFT_Hと称す。以下にsiRNA_GFT_Hを動物細胞内で発現するプラスミドU6_GFT_H_puroの構築方法を記載する。なお、該発現プラスミドの基本構造はMiyagishiらの方法［ネイチャー・バイオテクノロジー（Nat. Biotechnol.），20，5（2002）］に準じて設計した。

(2) プラスミドU6_pre_senseの構築

以下の手順でプラスミドU6_pre_senseを構築した（第5図）。GenBankに登録されているヒトU6 snRNP遺伝子配列（GenBank No. X07425およびM14486）より設計したプライマー（配列番号17および配列番号18）を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行ない、ヒトU6 snRNP遺伝子のプロモーター領域を増幅した。PCRはHuman Genomic DNA（クロンテック社製）を200ng含む50μLの反応液[1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mMのdNTP's、2.5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μMの上記プライマー（配列番号17および配列番号18）]を調

製し、GeneAmp PCR system 9700（パーキンエルマー社製）を用いて 94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 液をフェノール/クロロホルム抽出した後、エタノール沈殿法により PCR 増幅断片を回収した。この増幅断片を XbaI（宝酒造社製）で切断後、フェノール/クロロホルム抽出を行ないエタノール沈殿法により DNA 断片を回収し、次に BamHI（宝酒造社製）で切断した。該反応溶液をアガロースゲル電気泳動後、約 300bp の DNA 断片を Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。回収した DNA 断片は DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめ XbaI（宝酒造社製）および BamHI（宝酒造社製）で切断した pBluescript SK(-)ベクター（STRATAGENE 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 DH5α株（東洋紡績社製）をコーエンらの方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)]（以下、大腸菌の形質転換はこの方法を用いた）により形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミド DNA を単離した。プラスミドに含まれる U6 プロモーター塩基配列を、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。決定したクローンより PCR に伴う塩基の変異が生じていないプラスミドを選択し、U6_pre_sense と命名した。

(3) プラスミド pBS_BglII の構築

以下の手順でプラスミド pBS_BglII を構築した（第 6 図)。配列番号 19 および配列番号 20 に示す合成オリゴ DNA（5'末端をリン酸化している）を各 10pmol ずつ蒸留水に溶解し、90℃で 10 分間熱したのち室温に戻るまで放置しアニーリングさせた。該反応液よりアニーリングした合成オリゴ 0.2pmol を、DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめ SacI（宝酒造社製）で切断した pBluescript SK(-)ベクター（STRATAGENE 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 DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミド DNA を単離した。各クローンの中から BglII（宝酒造社製）で切断されるプラスミドを選択し、pBS_BglII と命名した。

(4) プラスミドU6_pre_antisenseの構築

以下の手順でプラスミドU6_pre_antisenseを構築した（第7図）。GenBankに登録されているヒトU6 snRNP遺伝子配列（GenBank Accession No. X07425、M14486）より設計したプライマー（配列番号21および配列番号22）を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行ない、ヒトU6 snRNP遺伝子のプロモーター領域を増幅した。PCRはHuman Genomic DNA（クロンテック社製）を200ng含む50μLの反応液［1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mMのdNTP's、2.5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μMの上記プライマー（配列番号21および配列番号22)］を調製し、GeneAmp PCR system 9700（パーキンエルマー社製）を用いて94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

このPCR液をフェノール/クロロホルム抽出した後、エタノール沈殿法によりPCR増幅断片を回収した。この増幅断片をBamHI（宝酒造社製）で切断後、フェノール/クロロホルム抽出を行ないエタノール沈殿法によりDNA断片を回収し、次にEcoRI（宝酒造社製）で切断した。該反応溶液をアガロースゲル電気泳動後、約300bpのDNA断片をGel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。回収したDNA断片はDNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめBamHI（宝酒造社製）およびEcoRI（宝酒造社製）で切断したプラスミドpBS_BglIIに連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミドDNAを単離した。プラスミドに含まれるU6プロモーター塩基配列を、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。決定したクローンよりPCRに伴う塩基の変異が生じていないプラスミドを選択し、U6_pre_antisenseと命名した。

(5) プラスミドU6_sense_Hの構築

以下の手順でプラスミドU6_sense_Hを構築した（第8図）。配列番号23および配列番号24に示す合成オリゴDNA（5'末端をリン酸化している）を各10pmolずつ蒸留水に溶解し、90℃で10分間熱したのち室温に戻るまで放置しアニーリングさせた。該反応液よりアニーリングした合成オリゴ0.2pmolを、DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめPmaCI（宝酒造社製）およびBamHI（宝

酒造社製）で切断したプラスミドU6_pre_senseに連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミドDNAを単離した。プラスミドに含まれる合成オリゴ由来の塩基配列を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。決定したクローンより配列番号23および配列番号24の塩基が正しく導入されているプラスミドを選択し、U6_sense_Hと命名した。

(6) プラスミドU6_antisense_Hの構築

以下の手順でプラスミドU6_antisense_Hを構築した（第9図）。配列番号25および配列番号26に示す合成オリゴDNA（5'末端をリン酸化している）を各10pmolずつ蒸留水に溶解し、90℃で10分間熱したのち室温に戻るまで放置しアニーリングさせた。該反応液よりアニーリングした合成オリゴ0.2pmolを、DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめPmaCI（宝酒造社製）およびEcoRI（宝酒造社製）で切断したプラスミドU6_pre_antisenseに連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミドDNAを単離した。プラスミドに含まれる合成オリゴ由来の塩基配列を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。決定したクローンより配列番号25および配列番号26の塩基が正しく導入されているプラスミドを選択し、U6_antisense_Hと命名した。

(7) プラスミドU6_GFT_Hの構築

以下の手順でプラスミドU6_GFT_Hを構築した（第10図）。プラスミドU6_antisense_HをSalI（宝酒造社製）で切断後、フェノール/クロロホルム抽出を行ないエタノール沈殿法によりDNA断片を回収し、次にBglII（宝酒造社製）で切断した。該反応溶液をアガロースゲル電気泳動後、約370bpのDNA断片をGel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。回収したDNA断片はDNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめSalI（宝酒造社製）およびBamHI（宝酒造社製）で切断したプラスミドU6_sense_Hに連結し、得られた組

換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミド DNA を単離した。プラスミドに含まれる塩基配列を 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。決定したクローンより目的の塩基配列を有するプラスミドを選択し、U6_GFT_H と命名した。

(8) プラスミド U6_GFT_H_puro の構築

以下の手順でプラスミド U6_GFT_H_puro を構築した（第 11 図）。プラスミド U6_GFT_H を PvuII（宝酒造社製）で切断後、該反応溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約 1150bp の DNA 断片を Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。回収した DNA 断片は DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて、あらかじめ PvuII（宝酒造社製）で切断したプラスミド pPUR（クロンテック社製）に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて組換えプラスミド DNA を単離した。プラスミドに含まれる塩基配列を 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。決定したクローンより目的の塩基配列を有するプラスミドを選択し、U6_GFT_H_puro と命名した。

(9) 直鎖化したプラスミド U6_GFT_H_puro の作製

プラスミド U6_GFT_H_puro を制限酵素 FspI（NEW ENGLAND BIOLABS 社製）で切断することにより直鎖化した。切断後は反応液をアガロース電気泳動に供し、該プラスミドが正確に直鎖化されていることを確認した。

2. GDP-fucose transporter siRNA 発現プラスミド U6_GFT_H_puro を導入した抗体生産株の取得

(1) CHO/DG44 細胞を宿主とした、抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160(WO01/64754 に記載)の 4μg を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］により導入後、10ml の IMDM-dFBS(10)-HT (1)［透析牛胎児血清(以下、dFBS と表記する；インビトロジェン社製)を 10%、

HT supplement(インビトロジェン社製)を1倍濃度で含むIMDM培地(インビトロジェン社製)を]に懸濁し、96ウェル培養用プレート(旭テクノグラス社製)に100μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、IMDM-dFBS(10)(透析FBSを10%で含むIMDM培地)に培地交換し、1～2週間培養した。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キメラ抗体の濃度を実施例1.の(6)に記載のCCR4ペプチド固相化プレートを用いたELISA法により測定した。

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTXを50nM含むIMDM-dFBS(10)培地に1～2×10^5細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート(旭テクノグラス社製)に0.5mlずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を200nMに上昇させた。最終的にMTXを500nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株を、IMDM-dFBS(10)に500nM MTXを添加した培地に0.5細胞/ウェルの密度で懸濁し、96穴プレート(旭テクノグラス社製)に播種することにより、限界希釈法による単細胞分離を実施した。37℃で2週間培養後、各プレートを顕微鏡で観察し、シングルコロニーの増殖を確認したウェルを拡大培養し、抗CCR4キメラ抗体を発現するクローンである、32-05-09株を得た。

(2) 抗CCR4キメラ抗体生産細胞へのsiRNA発現ベクターU6_GFT_H_puroの導入

本実施例第1項で構築したsiRNA発現ベクターを、本実施例第2項の(1)で作製した32-05-09株へ導入した。

siRNA発現ベクターの32-05-09株への導入は、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]に準じて以下の手順で行った。まず、MTXを500nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で培養中の32-05-09株をダルベッコPBS(K-PBS緩衝液[137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$]に懸濁して8×10^6個/mlとし、細胞懸濁液200μl(1.8×10^6個)を本実施例第1項で調製した線状化プラスミド10μgと混和した。細胞-DNA混和液をGene Pulser Cuvette(電極間距離2mm)(BIO-RAD社製)へ移し

た後、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 0.35KV、電気容量 250μF の条件で導入を行った。

この細胞懸濁液を 30ml の基本培地 (10%ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) および 50μg/ml Gentamycin (ナカライテスク社製) を添加した Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen 社製)) に混和し、3 枚の組織培養用 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) に、100μL/ウエルで分注した。5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後に培地を吸引除去し、12μg/ml puromycin (SIGMA 社製) を添加した基本培地を 100μL/ウエルで分注した。引続き 6 日間培養後に培地を吸引除去し、0.4mg/ml LCA (Lens Curinalis Aggulutinin) (Vector 社製) と 12μg/ml puromycin (SIGMA 社製) を添加した基本培地を 100μL/ウエルで分注した。引続き 10 日間培養することにより生き残った株を取得した。なお、これら生き残った株については、実施例 1. の (6) に記載の CCR4 ペプチド固相化プレートを用いた ELISA 法により、培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現を確認した。

取得した株をトリプシン処理して培養器より剥離させ、組織培養用 24 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ移植し、12g/ml puromycin (SIGMA 社製) を添加した基本培地を用いて 5 日間培養した。培養後、上記プレート各ウエル中の各株に対し、12μg/ml puromycin (SIGMA 社製) を添加した基本培地を用いて、組織培養用フラスコ (旭テクノグラス社製) へ拡大培養を行いった。このようにして取得した、siRNA 発現ベクターU6_GFT_H_puro 導入株の一株を 32-05-09-H12 株と名付けた。なお、32-05-09-H12 株は、32-05-09-H12 株の細胞名で、平成 15 年 3 月 27 日付けで独立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-8345 として寄託されている。

3. GDP-フコーストランスポーターを標的とした siRNA_GFT_H 導入株における GDP フコーストランスポーターmRNA 量の測定

本実施例第 2 項で得た 32-05-09-H12 株を 12μg/ml puromycin (Sigma 社製) を添加した基本培地に 3×10^5 細胞/ml の細胞密度で懸濁し、接着細胞用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に播種して 3 日間培養した。トリプシン処理により各細胞懸濁液を回収し、懸濁液に対し 1200rpm、4℃の条件で 5 分間の遠心分離を行って上清を除去した。ダルベッコ PBS (Invitrogen 社製) に懸濁し、再度 1200rpm、4℃の条

件で 5 分間の遠心分離を行った後、-80℃で凍結した。siRNA 発現プラスミドを導入していない親株 32-05-09 株についても同様の操作を行い、凍結細胞を調製した。

調製した凍結細胞を室温で融解後、RNAeasy (QIAGEN 社製) を使用し全 RNA を抽出した。方法は添付の説明書に従った。全 RNA を 45μl の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1μl、付属の 10×DNase buffer 5μl、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5μl をそれぞれに添加して、37℃で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、40μl の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA3μg 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 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

次に、配列番号 1 に示したチャイニーズハムスターGDP - フコーストランスポーターcDNA の塩基番号 799 番から 1108 番の領域を増幅するよう設計したプライマーセット h_GFT_fw4 (配列番号 27) および h_GFT_rv2 (配列番号 28) を用い、100 倍に希釈した cDNA 溶液を鋳型として PCR を行なった。すなわち、20μL の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、2.5 単位の EX Taq polymerase ホットスタートバージョン (宝酒造社製)、0.5μM の上記プライマー (配列番号 27 および配列番号 28)] を調製し、GeneAmp PCR system 9700 (パーキンエルマー社製) を用いて 94℃にて 3 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 2 分間のサイクルを 32 サイクル行なった。PCR 溶液のうち、7ul 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 Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molcular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色し、フルオロイメージャー (FluorImager; Molecular Dynamics 社製) で PCR で増幅させた DNA 量を測定することで、GDP - フコーストランスポーターの mRNA 発現量を比較した。また、GDP - フコーストランスポーターの mRNA 量を測定した際に鋳型として用いた一本鎖 cDNA と同量の一本鎖 cDNA を用い、WO00/61739 記載の競合的 PCR による転写量の定量方法に従い、β-アクチン mRNA 発現量についても測定し比較した。

上記の方法により、32-05-09 株および 32-05-09-H12 株で発現する GDP-フコーストランスポーターとβ-アクチンの mRNA を比較した結果について第 12 図に示した。独立した 3 回の PCR において、比較した 2 株の間でβ-アクチンの mRNA 量に

変化はなかったが、32-05-09-H12 株において GDP-フコーストランスポーターmRNA の発現量が有意に減少していることが示された。

4. GDP-fucose transporter を標的とした siRNA 発現プラスミドを導入株が生産する抗体組成物の取得

取得した 32-05-09-H12 株および 32-05-09 株が生産する抗 CCR4 キメラ抗体の取得を以下の手順で行った。

32-05-09-H12 株を、12μg/ml puromycin を添加した基本培地へ 3×10^5 個/ml の密度で懸濁後、30ml を接着細胞培養用 T182 フラスコ（Greiner 社製）へ播種し、100%コンフルエントになるまで培養した 32-05-09 株も、puromycin 未添加基本培地を使用した以外は上記と同様に培養した。各株の培地全量を除去して、PBS (Invitrogen 社製) を同量入れてから再度除去することで洗浄し、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 30ml へ交換した。さらに 7 日間培養後、各細胞懸濁液を回収した。懸濁液に対し 3000rpm、4℃の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22 mm 孔径 PES Membrane（旭テクノグラス社製）を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Mab Select (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 0.5ml を充填し、精製水 3.0ml および 0.2mol/l ホウ酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH7.5) 3.0ml を順次通筒した。さらに、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.5) 2.0ml および 0.2mol/l ホウ酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH7.5) 1.5ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記濾過処理した培養上清 30ml をカラムに通筒した後、0.2mol/l ホウ酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH7.5) 3.0ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.5) 1.25ml を用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。始めに溶出する 0.25ml の画分を廃棄し、次に得られる溶出画分 1ml を回収して 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 0.2 ml と混合して中和した。このようにして取得した抗体組成物を含む溶出液に対し、10mol/l クエン酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH6.0) を用いて 4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22mm 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

5. GDP-fucose transporter を標的とした siRNA 発現プラスミド導入株が生産する抗体組成物の単糖組成分析

本実施例第 4 項で精製した抗 CCR4 キメラ化抗体に対し、公知の方法［ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (Journal of Liquid Chromatography), 6, 1577 (1983)］に従って単糖組成分析を行った。表 3 に各抗体の単糖組成比より計算される、全複合型糖鎖に占める、フコースを持たない複合型糖鎖の割合を示した。siRNA 導入に供した親株 32-05-09 株の生産する抗体のフコースを持たない糖鎖の割合が 8%であったのに対し、siRNA 導入株 32-05-09-H12 株の生産する抗体のフコースを持たない糖鎖は 56%となり、フコースを有さない糖鎖の割合が有為に上昇していることが示された。

以上の結果より、GDP-fucose transporter を標的とした siRNA の導入により、宿主細胞の生産する抗体における複合型糖鎖のフコース修飾を制御できることが示された。

6. GDP-fucose transporter を標的とした siRNA 発現プラスミド導入株が生産する抗体組成物の生物活性

本実施例第 4 項で精製した抗 CCR4 キメラ化抗体の生物活性を、実施例 1. の (7) に記載の ADCC 活性の測定方法および実施例 1. の (6) に記載の抗原結合活性の測定方法に従って測定した。その結果を第 3 表に示す。親株 32-05-09 株の生産する抗体と siRNA 導入株 32-05-09-H12 株が産生する抗体で抗原結合活性に違いは観察されなかったが、ADCC 活性は siRNA 導入株 32-05-09-H12 株が産生する抗体の方が大幅に上昇していることが確認された。

第 3 表　各株の産生する抗 CCR4 キメラ抗体のフコース非含有糖鎖の割合

株名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
32-05-09	8%
32-05-09-H12	56%

産業上の利用可能性

本発明によれば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送

に関与する蛋白質の活性が低下または欠失するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫、該動物あるいは植物から抗体組成物を製造する方法、および該抗体組成物を含有する医薬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 5-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 6-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 7-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 8-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 9-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 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 17-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 21-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 22-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 23-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 24-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 25-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 26-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 27-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 28-人工配列の説明:合成 DNA

配列番号 33-人工配列の説明:合成 RNA

請 求 の 範 囲

1. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞。

2. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した請求の範囲 1 に記載の細胞。

3. 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる手法である、請求の範囲 2～5 のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(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についての突然変異を導入する手法；

(d) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法。

4. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のドミナントネガティブ体が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の N 末端欠失体である、請求の範囲 3 に記載の細胞。

5. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の N 末端欠失体が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の N 末端 30 アミノ酸が欠失した N 末端欠失体である、請求の範囲 4 に記載の細胞。

6. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法が、RNAi (RNA interference) 法である、請求の範囲 3 に記載の細胞。

7. RNAi 法が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる RNA およびその相補 RNA で構成され、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の mRNA 量を減少させることが可能な 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させる方法である、請求の範囲 6 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA；

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA；

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA；

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列中連続した 10～30 の塩基配列で表される塩基配列からなる DNA に対応する RNA。

8. 以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる RNA およびその相補 RNA で構成される 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させることで、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の mRNA 量を減少させた、請求の範囲 6 または 7 に記載の細胞。

(a) 配列番号 33 で表される塩基配列からなる RNA；

(b) 配列番号 33 で表される塩基配列において、1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列からなり、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に対して配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA。

9. 2本鎖RNAが、請求の範囲7または8に記載のRNAに対応するDNAおよびその相補DNAを組み込んだベクターにより細胞内へ導入される、請求の範囲7または8に記載の細胞。

10. 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が GDP-フコーストランスポーターである、請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の細胞。

11. GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) および (h)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 10 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA；

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列からなる DNA；

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列からなる DNA;

(e) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 29 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 30 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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。

12. GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) および (l) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 10 に記載の細胞。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(e) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 4 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；

(g) 配列番号 31 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；

(h) 配列番号 32 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；

(i) 配列番号 2 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；

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(l) 配列番号 32 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。

13. 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α結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 1～12 のいずれか 1 項に記載の細胞。

14. 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 13 に記載の細胞。

(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。

15. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～14 のいずれか 1 項に記載の細胞。

16. 細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) および (j) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～15 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) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

(j) 植物細胞。

17. 請求の範囲 1～16 のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

18. 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分子である、請求の範囲 17 に記載の細胞。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

19. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 17 または 18 に記載の細胞。

20. 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲 17～19 のいずれか 1 項に記載の細胞。

21. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、該抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、請求の範囲 20 に記載の細胞。

22. 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、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 20%以上である請求の範囲 21 に記載の細胞。

23. 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α結合していない糖鎖である、請求の範囲 21 に記載の細胞。

24. 請求の範囲 17～23 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いること特徴とする、抗体組成物を製造する方法。

25. 請求の範囲 17～23 のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

26. 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲 24 または 25 に記載の方法。

27. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、該抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、請求の範囲 26 に記載の方法。

28. 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、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 20%以上である請求の範囲 27 に記載の方法。

29. 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α結合していない糖鎖である、請求の範囲 27 に記載の方法。

30. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性が低下または欠失するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

31. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の遺伝子がノックアウトされた、請求の範囲 30 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

32. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた、請求の範囲 31 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

33. 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が GDP-フコーストランスポーターである、請求の範囲 30～32 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

34. GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) および (h) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 33 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 29 で表される塩基配列からなる DNA ;

(d) 配列番号 30 で表される塩基配列からなる DNA;

(e) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 29 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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 30 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ 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。

35. GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) および (l) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 33 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(c) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(d) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(e) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;

(f) 配列番号 4 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 ;

(g) 配列番号 31 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 ;

(h) 配列番号 32 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 ;

(i) 配列番号 2 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 ;

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(1) 配列番号 32 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。

36. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルおよびウサギからなる群から選ばれる動物である、請求の範囲 30～35 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

37. 請求の範囲 30～36 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入した、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

38. 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分子である、請求の範囲 37 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

39. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 37 または 38 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

40. 請求の範囲 37～39 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物から抗体組成物を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

41. 請求の範囲 35～37 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫の抗体分子を産生する細胞を取得し、取得した抗体産生細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

42. 抗体組成物がゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲 40 または 41 に記載の方法。

43. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変さ

れていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫が産生する抗体組成物より高いことを特徴とする、請求の範囲 42 に記載の方法。

44. 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、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 20%以上である請求の範囲 43 に記載の方法。

45. 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α結合していない糖鎖である、請求の範囲 43 に記載の方法。

46. 請求の範囲 24～29 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

47. 請求の範囲 40～45 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

48. 請求の範囲 46 または 47 に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

49. 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、請求の範囲 48 に記載の医薬。

50. 以下の (a) または (b) から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質。

51. 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA。

52. 配列番号 1 に記載の全長あるいは一部 DNA を含む、GDP-フコーストランスポーターを標的とした相同組換えのためのターゲットベクター。

53. GDP-フコーストランスポーターの機能を阻害する蛋白質。

54. GDP-フコーストランスポーターの機能を阻害する蛋白質が、GDP-フコーストランスポーターのドミナントネガティブ蛋白質である、請求の範囲 53 に記載の蛋白質。

55. GDP-フコーストランスポーターのドミナントネガティブ蛋白質が、GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体である、請求の範囲 54 に記載の蛋白質。

56. GDP-フコーストランスポーターの N 末端欠失体が、GDP-フコーストランスポーターの N 末端 30 アミノ酸が欠失した N 末端欠失体である、請求の範囲 55 に記載の蛋白質。

57. GDP-フコーストランスポーターが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) および (l) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 53～56 のいずれか 1 項に記載の蛋白質。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 32 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(e) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 4 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；

(g) 配列番号 31 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；

(h) 配列番号 32 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；

(i) 配列番号 2 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；

(j) 配列番号 4 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;

(k) 配列番号 31 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;

(l) 配列番号 32 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。

58. 請求の範囲 53～57 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

59. 以下の(a)および(b)からなる群から選ばれる RNA およびその相補 RNA で構成される 2 本鎖 RNA。

(a) 配列番号 33 で表される塩基配列からなる RNA ;

(b) 配列番号 33 で表される塩基配列において、1 または数個の塩基が欠失または付加された塩基配列からなり、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に対して配列番号 33 と実質的に同一の RNAi 活性を有する RNA。

60. 請求の範囲59に記載のRNAに対応するDNAおよびその相補DNA。

61. RNAに対応するDNAが配列番号16で表される塩基配列からなるDNAである請求の範囲60に記載のDNA。

62. 請求の範囲60または61に記載のDNAおよびその相補DNAをベクターに含む、組換え体DNA。

63. 請求の範囲 59 に記載の 2 本鎖 RNA を発現させるために構築されている、請求の範囲 62 に記載の組換え体 DNA。

64. 請求の範囲62または63に記載の組換え体DNAを細胞に導入して得られる形質転換体。

65. 請求の範囲 59 に記載の 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させることにより、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α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作製する方法。

66. 2本鎖RNAの細胞内への導入が、請求の範囲62または63に記載のRNAの相補DNAを組み込んだベクターの細胞内への導入である、請求の範囲65に記載の方法。

67. 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α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を有する細胞である、請求の範囲 65 または 66 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。

68. 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 65～67 のいずれか 1 項に記載の方法。

69. 細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) および (j) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 65～68 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) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

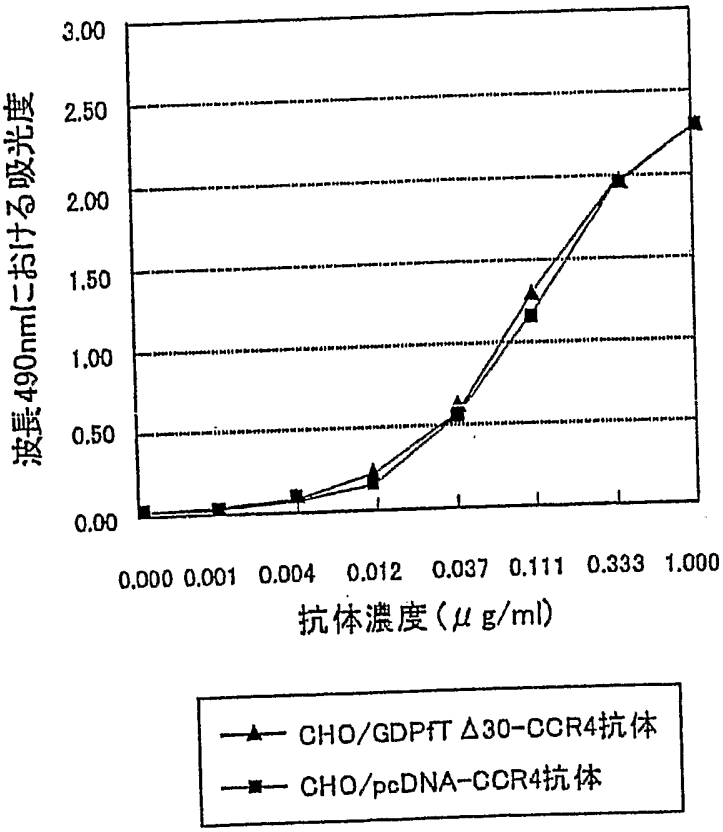
(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

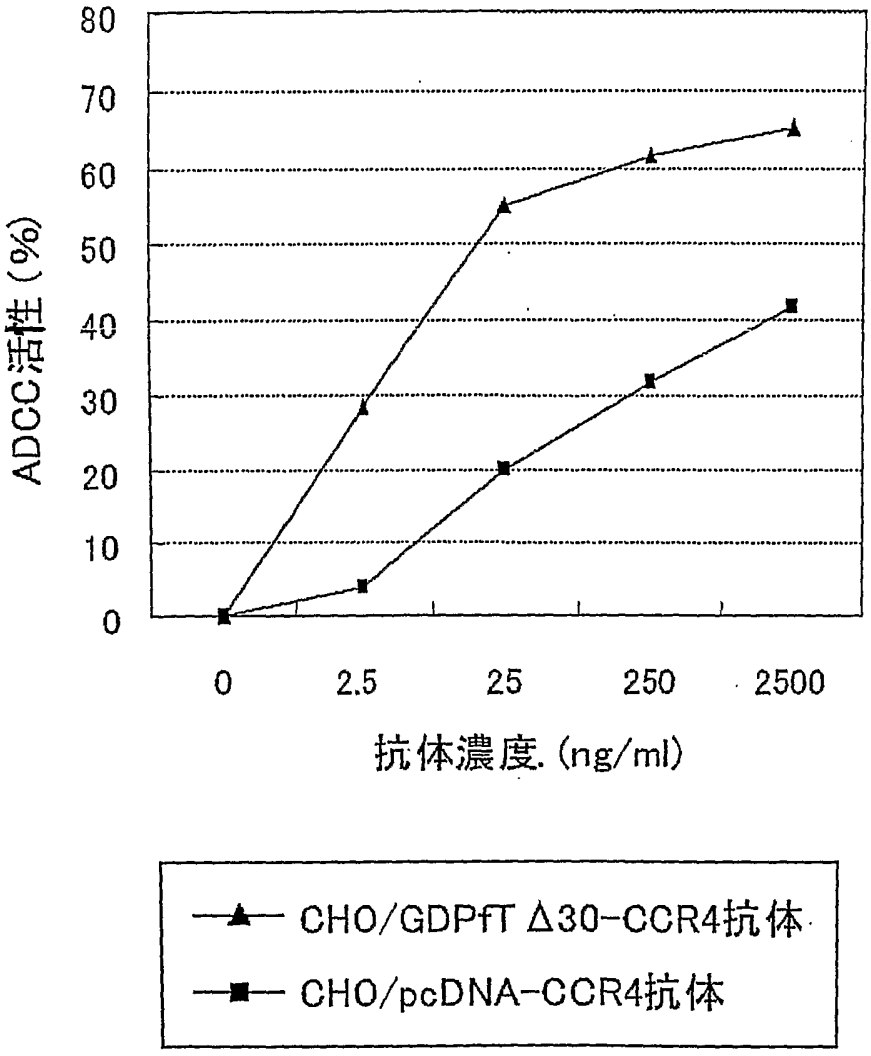
(j) 植物細胞。

70. 請求の範囲 48 または 49 に記載の医薬を製造するための、請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体組成物の使用。

第１図

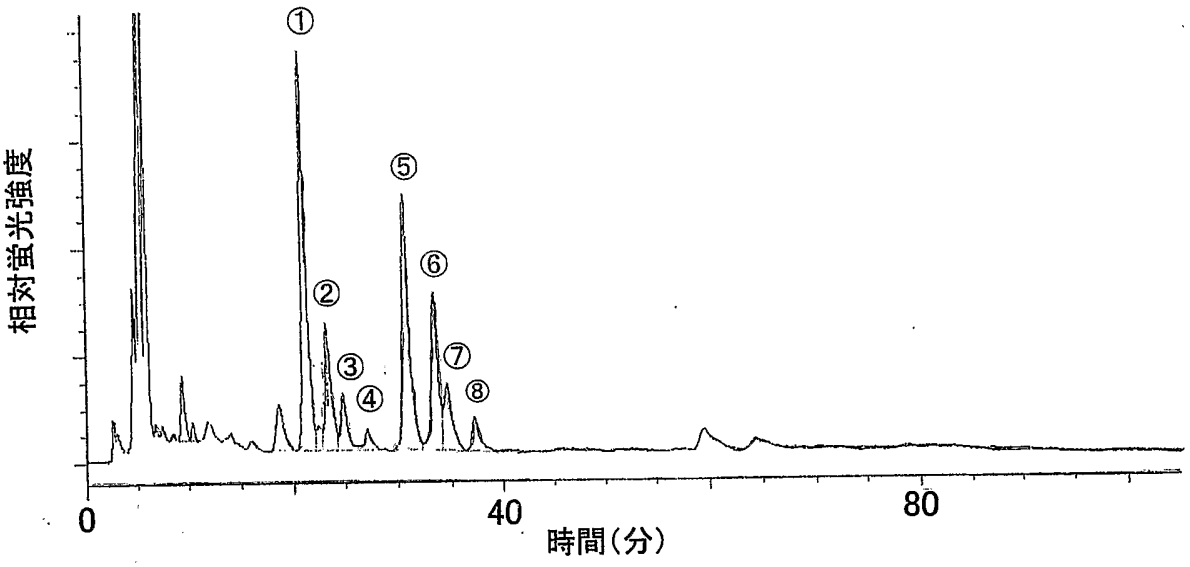

3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
波長490nmにおける吸光度
0.000 0.001 0.004 0.012 0.037 0.111 0.333 1.000
抗体濃度（μg/ml）
CHO/GDPfT Δ30-CCR4抗体
CHO/pcDNA-CCR4抗体

第２図

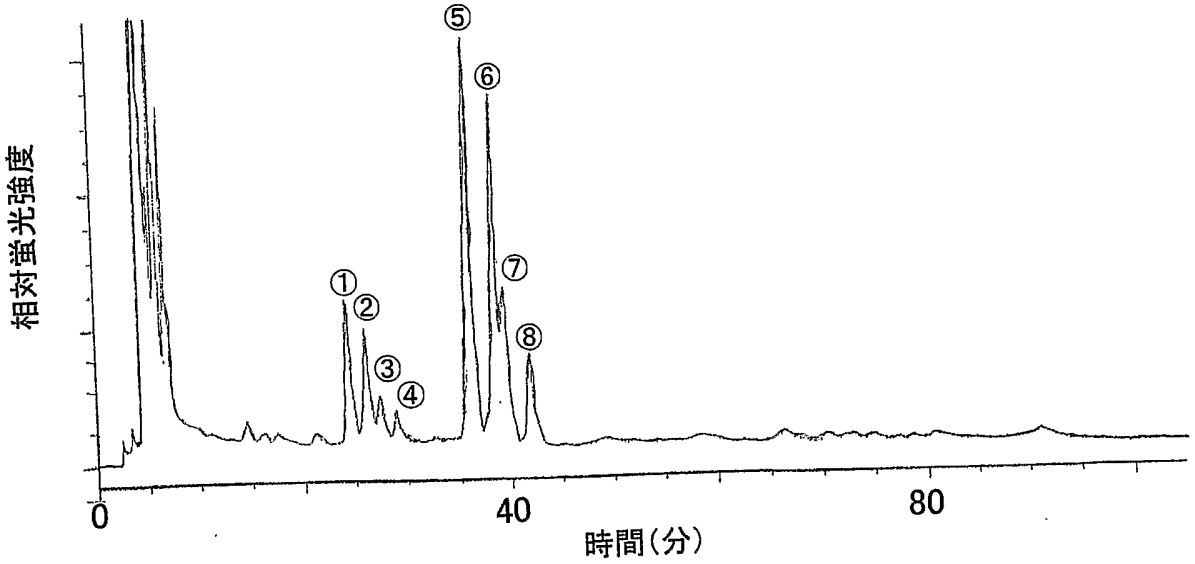

80
70
60
50
40
30
20
10
0
ADCC活性（%）
0
2.5
25
250
2500
抗体濃度.（ng/ml）
CHO/GDPfT Δ30-CCR4抗体
CHO/pcDNA-CCR4抗体

第３図

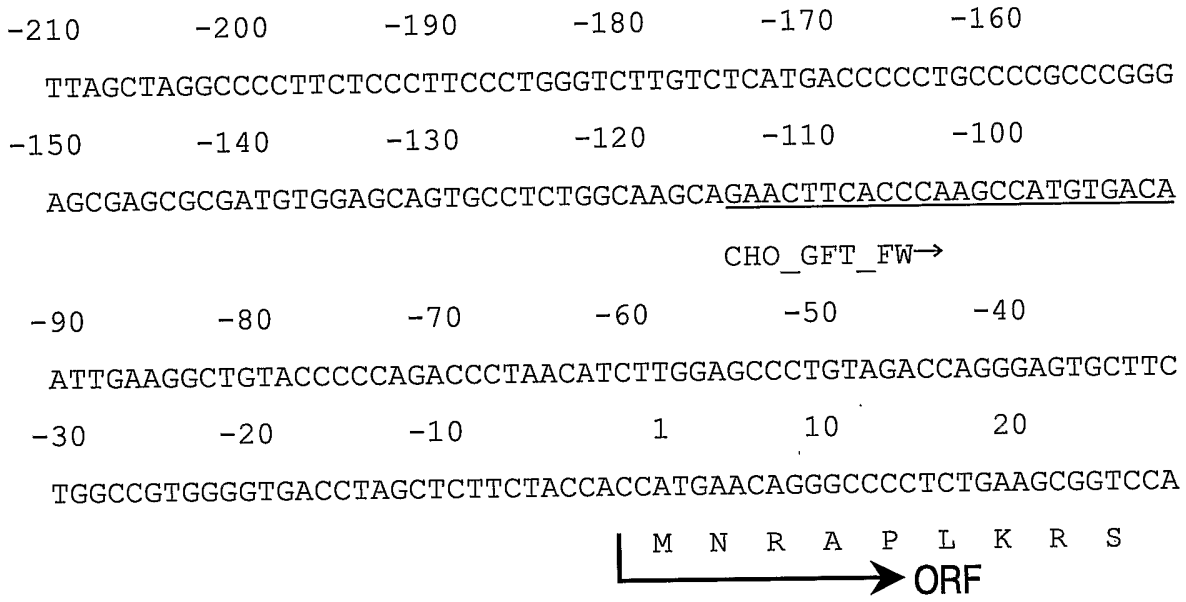
CHO/GDPfTΔ30-CCR4抗体



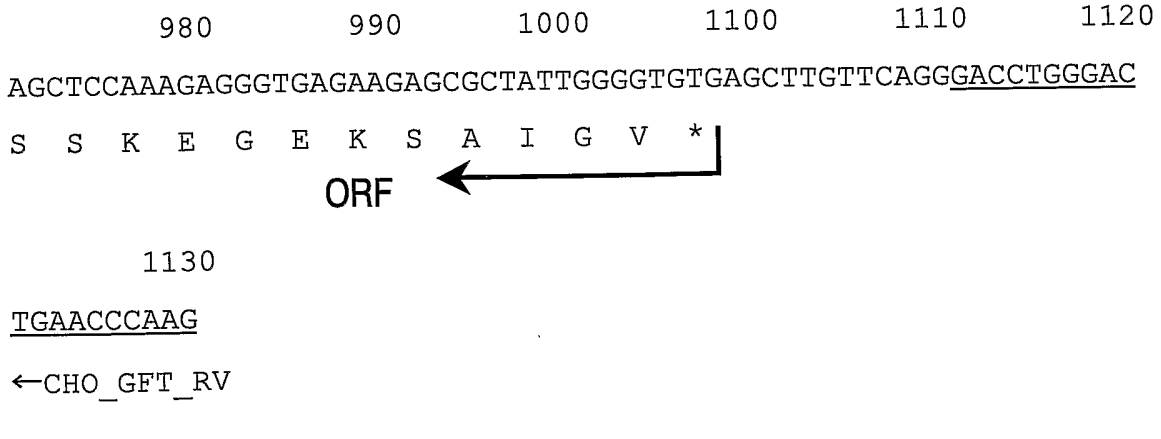
CHO/pcDNA-CCR4抗体



第4図

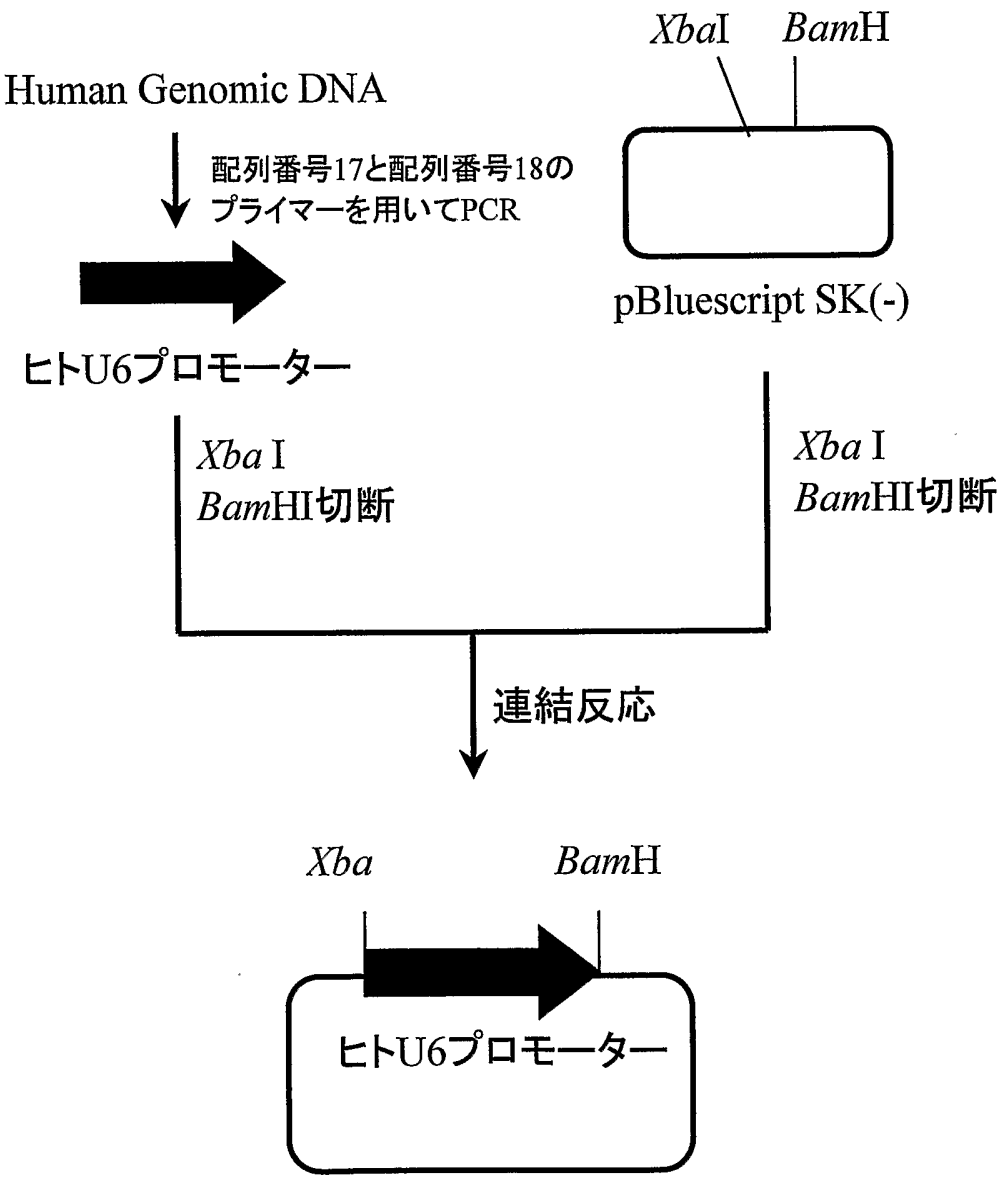


5'非翻訳領域塩基配列



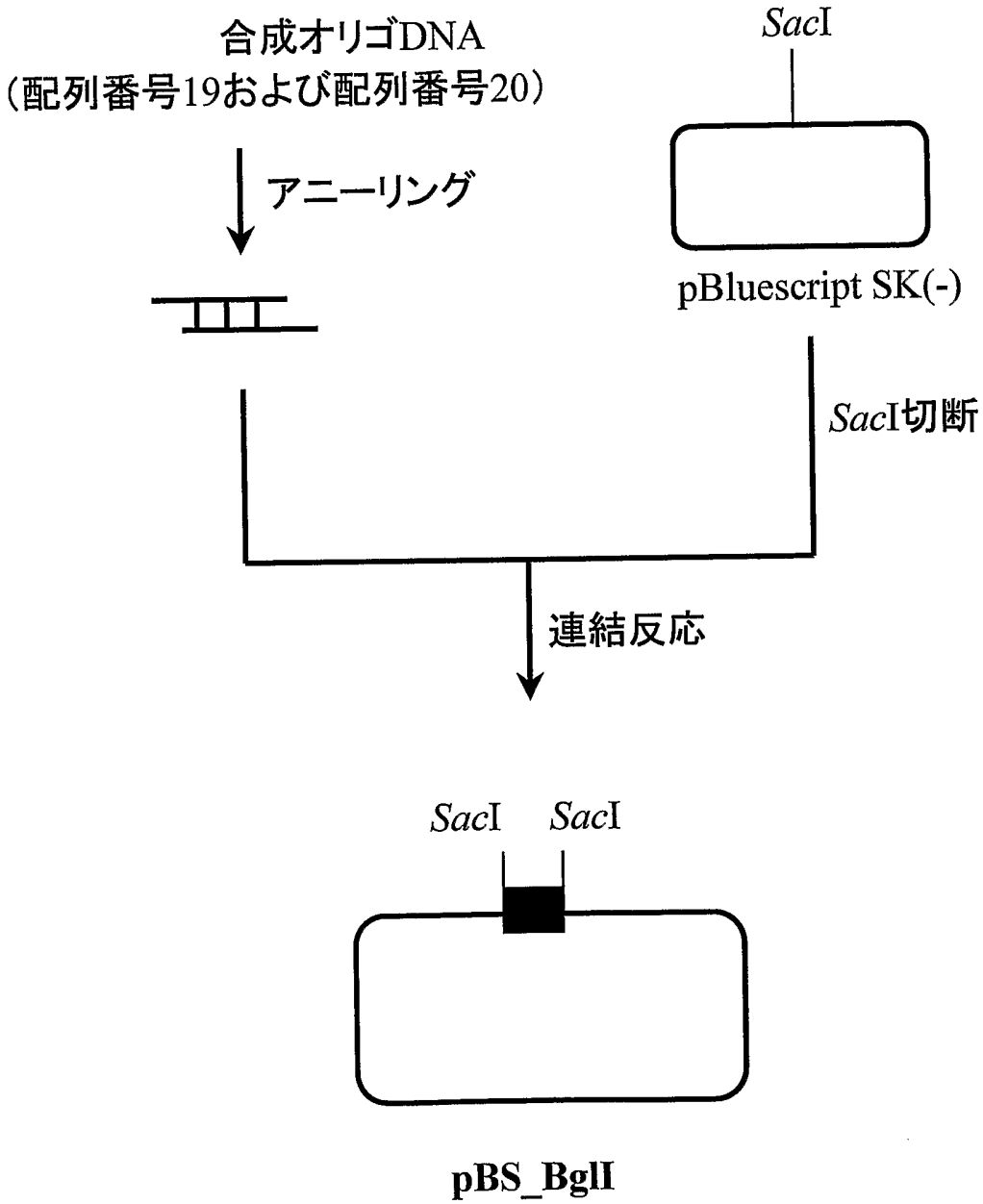
3'非翻訳領域塩基配列

第５図

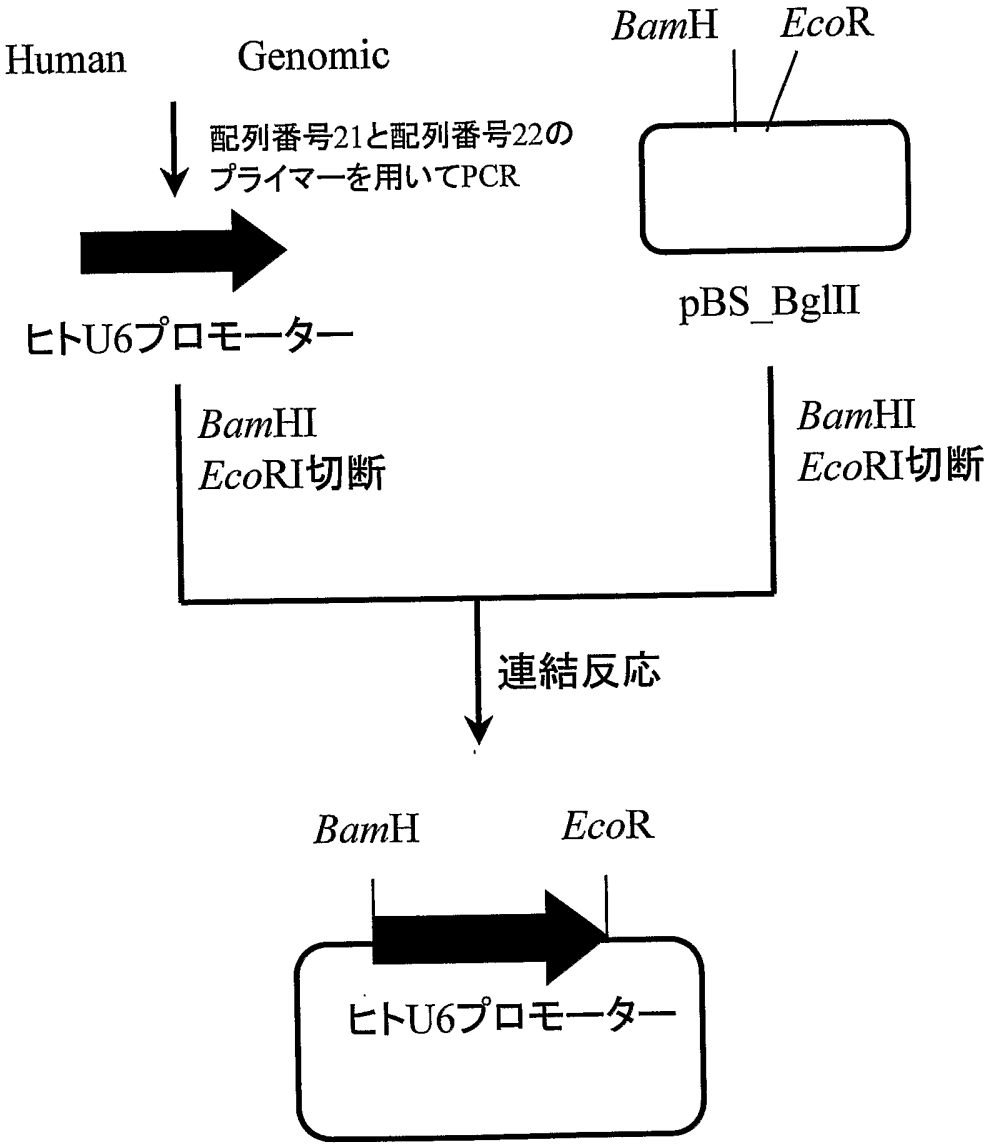


U6_pre_sense

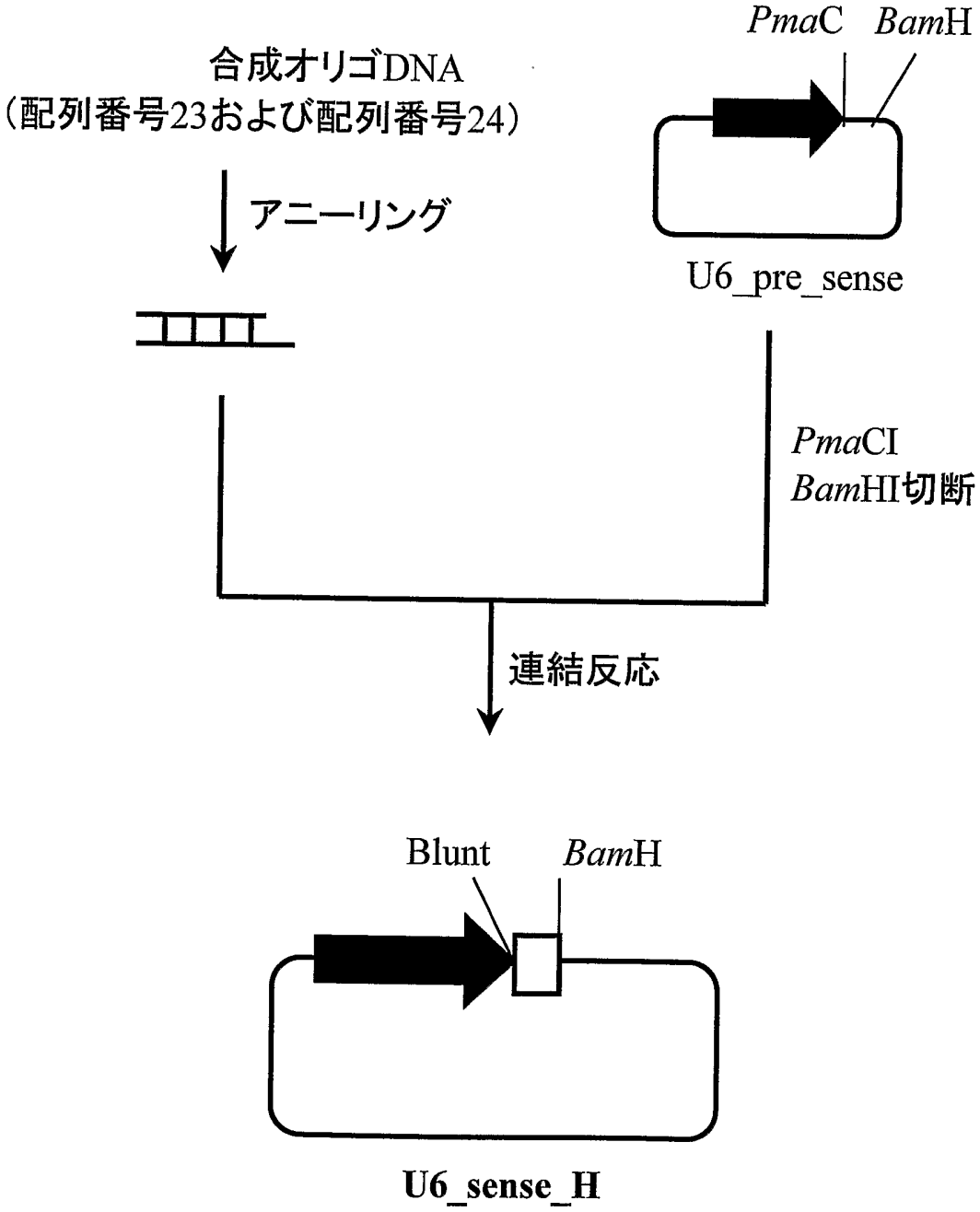
第６図


合成オリゴDNA
（配列番号19および配列番号20）
アニーリング
SacI
pBluescript SK(-)
SacI切断
連結反応
SacI
SacI
pBS_BglI

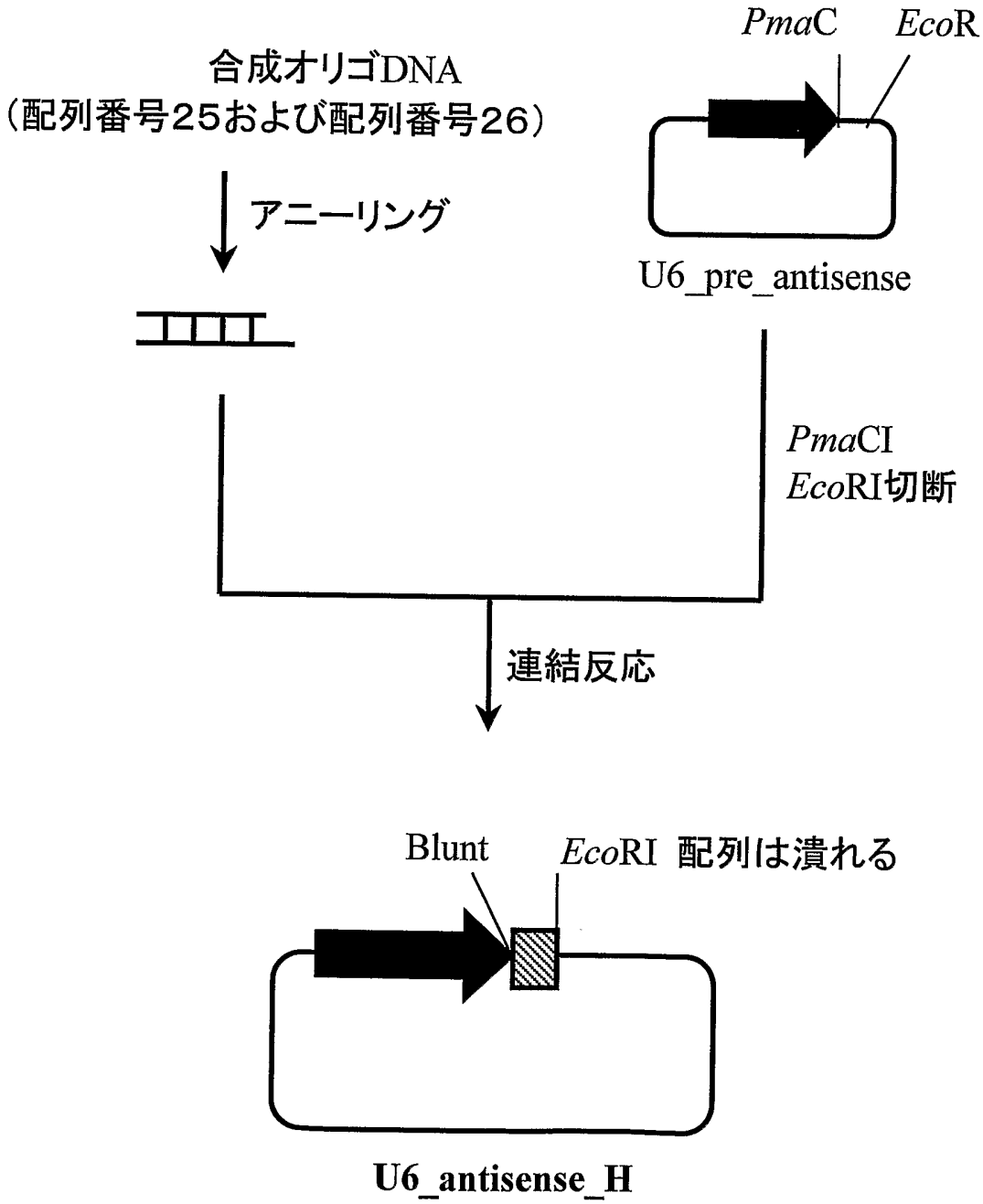
第７図


Human Genomic
配列番号21と配列番号22の
プライマーを用いてPCR
ヒトU6プロモーター
BamH EcoR
pBS_BglII
BamHI
EcoRI切断
BamHI
EcoRI切断
連結反応
BamH EcoR
ヒトU6プロモーター
U6_pre_antisense

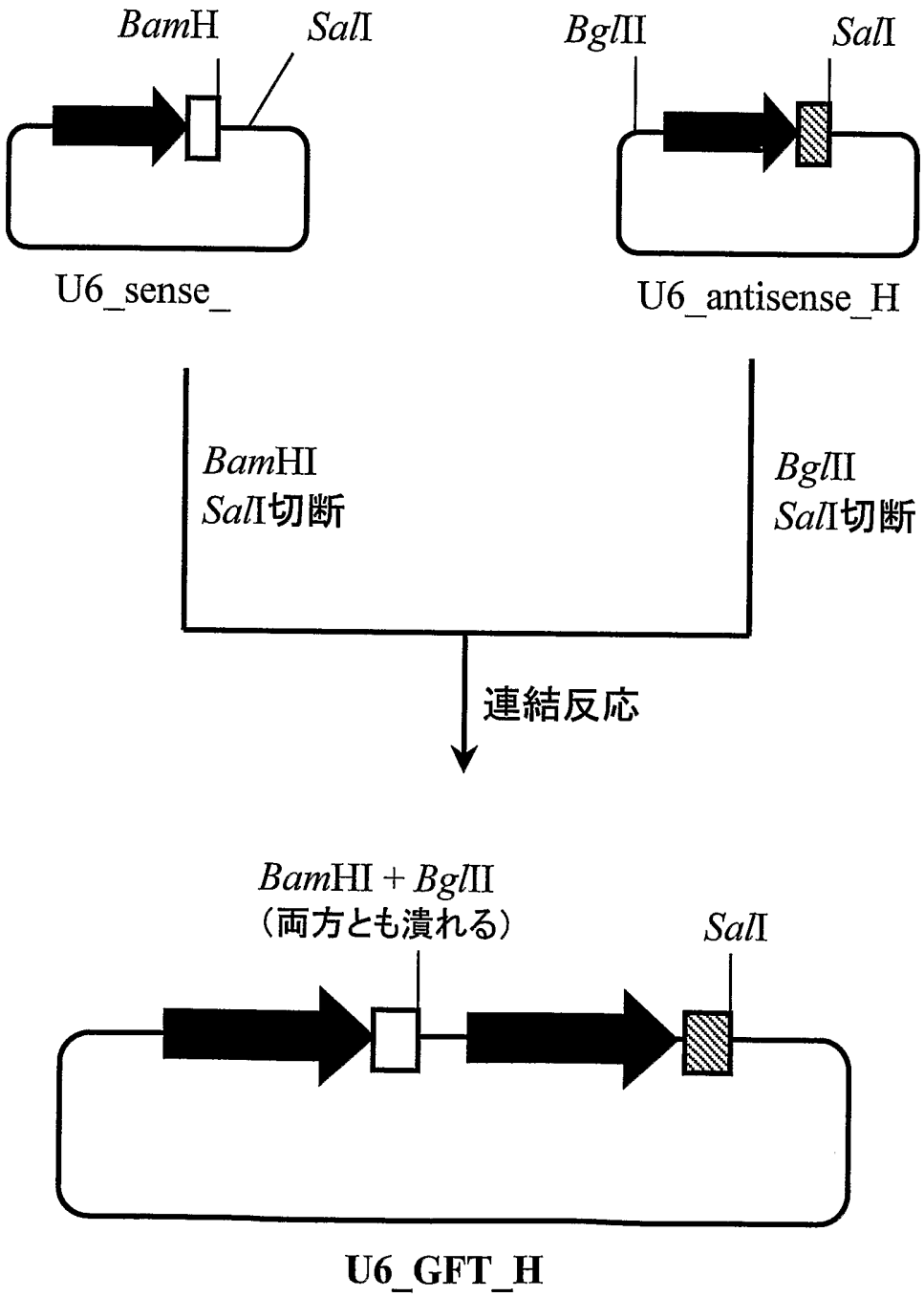
第８図


PmaC BamH
合成オリゴDNA
（配列番号23および配列番号24）
アニーリング
U6_pre_sense
PmaCI
BamHI切断
連結反応
Blunt BamH
U6_sense_H

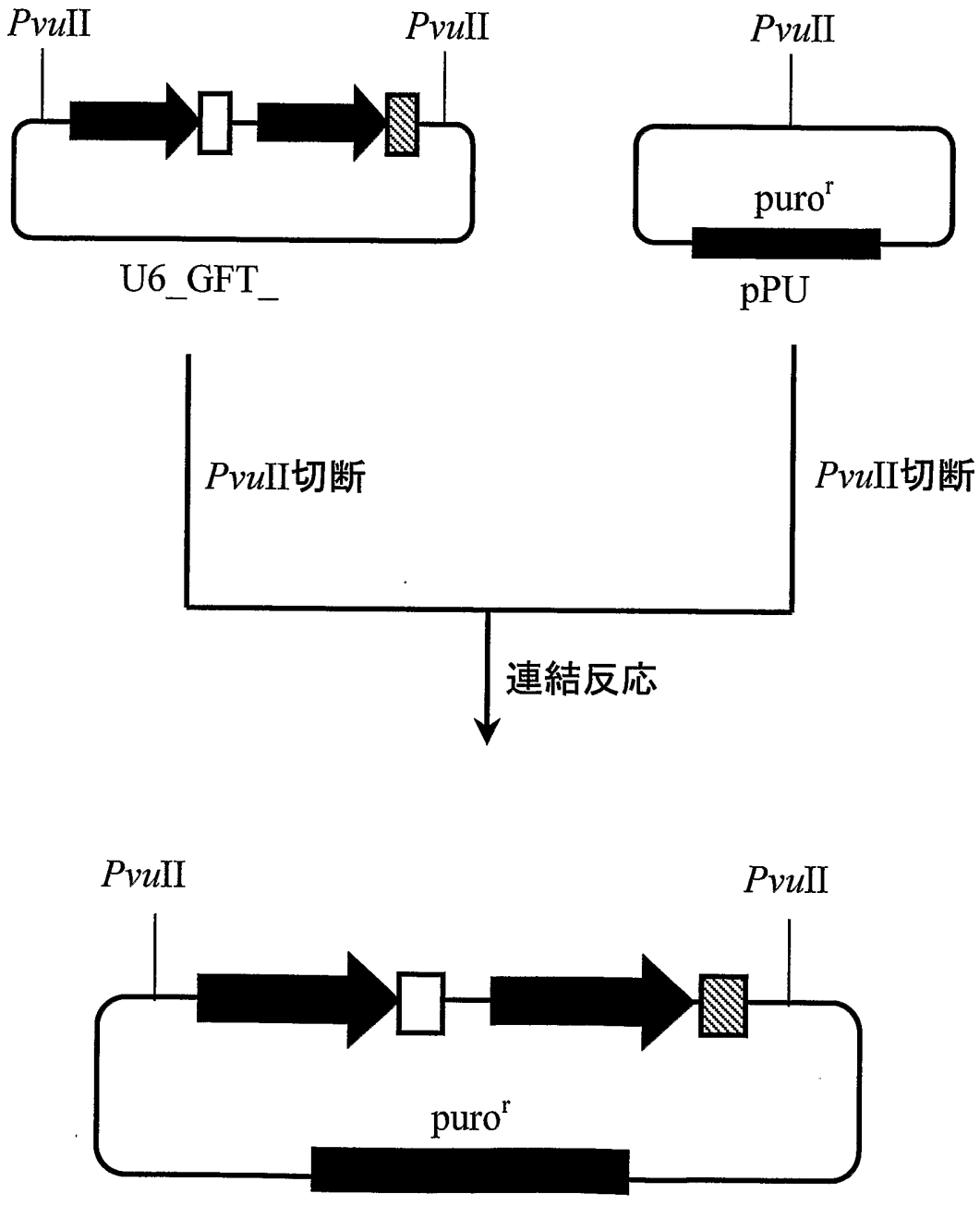
第９図


PmaC
EcoR
合成オリゴDNA
（配列番号25および配列番号26）
アニーリング
U6_pre_antisense
PmaCI
EcoRI切断
連結反応
Blunt
EcoRI 配列は潰れる
U6_antisense_H

第１０図

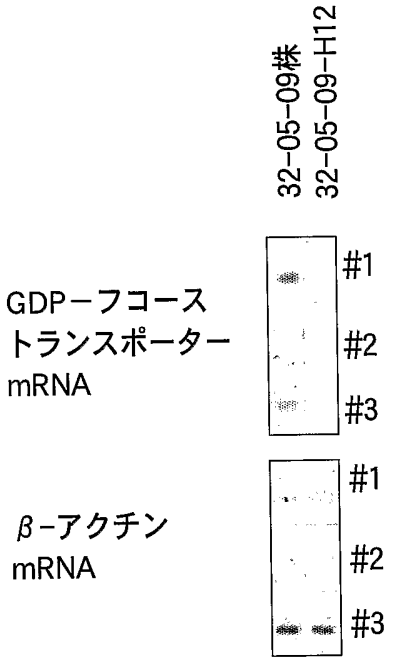

BamH
SalI
BglII
SalI
U6_sense_
U6_antisense_H
BamHI
SalI切断
BglII
SalI切断
連結反応
BamHI + BglII
（両方とも潰れる）
SalI
U6_GFT_H

第１１図



U6_GFT_H_puro

第１２図


32-05-09株
32-05-09-H12
GDP－フコース
トランスポーター
mRNA
#1
#2
#3
β－アクチン
mRNA
#1
#2
#3

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Cells in which activity of the protein involved in transportation of GDP-fucose is reduced or lost

<130> P044079

<150> JP 2002-106952
<151> 2002-04-09

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1245
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 1
gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga 60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tggggtgacc tagctcttct accaccatga 120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg 180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga 240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catggtattc ctcaacaagt 300
acctgctgga cagcccctcc ctgcagctgg ataccccтat cttcgtcact ttctaccaat 360
gcctggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca 420
ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt 480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttcaa tgtgcttctg tcctacctgc 600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtggtt 660
tctggctggg tatagaccaa gagggagctg agggcaccct gtccctcata ggcaccatct 720
tcggggtgct ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgccat ctataccaag aaggtgctcc 780
cagcagtgga caacagcatc tggcgcctaa ccttctataa caatgtcaat gcctgtgtgc 840
tcttcttgcc cctgatggtt ctgctgggtg agctccgtgc cctccttgac tttgctcatc 900
tgtacagtgc ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctcttcggc tttgccattg 960
gctatgtgac aggactgcag atcaaattca ccagtccccт gacccacaat gtatcaggca 1020
cagccaaggc ctgtgcgcag acagtgctgg ccgtgctcta ctatgaagag actaagagct 1080
tcctgtggtg gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctcagcctat acctgggtca 1140
ggggctggga gatgcagaag acccaagagg accccagctc caaagagggt gagaagagtg 1200
ctattggggt gtgagcttct tcagggacct gggactgaac ccaag 1245

<210> 2
<211> 365

<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 2

```
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

<210> 3
<211> 1095
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgaataggg cccctctgaa gcggtccagg atcctgcaca tggcgctgac cggggcctca 60
gacccctctg cagaggcaga ggccaacggg gagaagccct ttctgctgcg ggcattgcag 120
atcgcgctgg tggtctccct ctactgggtc acctccatct ccatggtgtt ccttaataag 180
tacctgctgg acagcccctc cctgcggctg gacaccccca tcttcgtcac cttctaccag 240
tgcctggtga ccacgctgct gtgcaaaggc ctcagcgctc tggccgcctg ctgccctggt 300
gccgtggact tccccagctt gcgcctggac ctcagggtgg cccgcagcgt cctgcccctg 360
tcggtggtct tcatcggcat gatcaccttc aataacctct gcctcaagta cgtcggtgtg 420
gccttctaca atgtgggccg ctcactcacc accgtcttca acgtgctgct ctcctacctg 480
ctgctcaagc agaccacctc cttctatgcc ctgctcacct gcggtatcat catcgggggc 540
ttctggcttg gtgtggacca ggaggggca gaaggcaccc tgtcgtggct gggcaccgtc 600
ttcggcgtgc tggctagcct ctgtgtctcg ctcaacgcca tctacaccac gaaggtgctc 660
ccggcggtgg acggcagcat ctggcgcctg actttctaca acaacgtcaa cgcctgcatc 720
ctcttcctgc ccctgctcct gctgctcggg gagcttcagg ccctgcgtga ctttgcccag 780
ctgggcagtg cccacttctg ggggatgatg acgctgggcg gcctgtttgg ctttgccatc 840
ggctacgtga caggactgca gatcaagttc accagtccgc tgacccacaa tgtgtcgggc 900
acggccaagg cctgtgccca gacagtgctg gccgtgctct actacgagga gaccaagagc 960
ttcctctggt ggacgagcaa catgatggtg ctgggcggct cctccgccta cacctgggtc 1020
aggggctggg agatgaagaa gactccggag gagcccagcc ccaaagacag cgagaagagc 1080
gccatggggg tgtga 1095

<210> 4
<211> 364
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
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 Leu Asp Leu Arg
100 105 110
Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met 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
145 150 155 160
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
225 230 235 240
Leu Phe Leu Pro Leu 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
305 310 315 320
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

<210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400>5
gcaagcttcc gccatgaata gggcccctct gaagcgg 37

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 6
gctctagatc acacccccat ggcgctcttc tcgc 34

<210> 7
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 7
gcaagcttcc gccatggaga agccctttct gctgcgggca ttgcagatcg cgc 53

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 8
gctctagatc acacccccat ggcgctcttc tcgc 34

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 9
gagatggagg tgacccagta gaga 24

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

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

<400> 10
gagagagacg accagcgcga tctg 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 11
gccattggct atgtgacagg actg 24

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 12
gcagatcaaa ttcaccagt cccc 24

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 13
gaacttcacc caagccatgt gac 23

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 14
cttgggttca gtcccaggtc 20

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Cys

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<220>
<400> 16
gcgcctaacc ttctataac 19

<210> 17
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 17
gctctagaga attcaaggtc gggcaggaag agggcctatt tc 42

<210> 18
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 18
cgggatcctt cacgtgtttc gtcctttcca caagatatat aaagcc 46

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 19
cagatctgcg gccgcgagct 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 20
cgcggccgca gatctgagct 20

<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 21
cgggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc tatttcc 37

<210> 22
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 22
cggaattctt cacgtgtttc gtcctttcca caagatatat aaagcc 46

<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 23
cgcgcctaac cttctataac tttttg 26

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 24
gatccaaaaa gttatagaag gttaggcgcg 30

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25
cgttatagaa ggttaggcgc tttttt 26

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 26
aattaaaaaa gcgcctaacc ttctataacg 30

<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 27
tctggcgcct gactttctac aacaa 25

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 28
accatcatgt tgctcgtcca ccaga 25

<210> 29
<211> 2609
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 29

gagccgaggg tggtgctgca ggtgcacccg agggcaccgc cgagggtgag caccaggtcc 60
ctgcatcagc caggacacca gagcccagtc gggtggacgg acgggcgcct ctgaagcggt 120
ccaggatcct gcgcatggcg ctgactggag tctctgctgt ctccgaggag tcagagagcg 180
ggaacaagcc atttctgctc cgggctctgc agatcgcgct ggtggtctct ctctactggg 240
tcacctccat ttccatggta ttcctcaaca agtacctgct ggacagcccc tccctgcagc 300
tggatacccc catttttgtc accttctacc aatgcctggt gacctcactg ctgtgcaagg 360
gcctcagcac tctggccacc tgctgccccg gcatggtaga cttccccacc ctaaacctgg 420
acctcaaggt ggcccgaagt gtgctgccgc tgtcagtggt ctttatcggc atgataacct 480
tcaataacct ctgcctcaag tacgtagggg tgcccttcta caacgtggga cgctcgctca 540
ccaccgtgtt caacgttctt ctctcctacc tgctgctcaa acagaccact tccttctatg 600
ccctgctcac ctgcggcgtc atcattggtg gtttctggct gggtatagac caagaaggag 660
ctgagggaac cttgtccctg acgggcacca tcttcggggt gctggccagc ctctgcgtct 720
ccctcaatgc catctatacc aagaaggtgc tccctgcagt agaccacagt atctggcgcc 780
taaccttcta taacaatgtc aatgcctgcg tgctcttctt gcccctgatg atagtgctgg 840
gcgagctccg tgccctcctg gccttcactc atctgagcag tgcccacttc tggctcatga 900
tgacgctggg tggcctgttt ggctttgcca tcggctatgt gacaggactg cagatcaaat 960
tcaccagtcc cctgacccat aacgtgtcag gcacggccaa ggcctgtgca cagacagtgc 1020
tggccgtgct ctactacgaa gagattaaga gcttcctgtg gtggacaagc aacctgatgg 1080
tgctgggtgg ctcctccgcc tacacctggg tcaggggctg ggagatgcag aagacccagg 1140
aggaccccag ctccaaagat ggtgagaaga gtgctatcag ggtgtgagct ccttcaggga 1200
gccagggctg agctcgggtg gggcctgccc agcacggaag gcttcccata gagcctactg 1260
ggtatggccc tgagcaataa tgtttacatc cttctcagaa gaccatctaa gaagagccag 1320
gttctttcct gataatgtca gaaagctgcc aaatctcctg cctgccccat cttctagtct 1380
tgggaaagcc ctaccaggag tggcaccctt cctgcctcct cctggggcct gtctacctcc 1440
atatggtctc tggggttggg gccagctgca ctctttgggc actggactga tgaagtgatg 1500
tcttactttc tacacaaggg agatgggttg tgaccctact atagctagtt gaagggagct 1560
gtgtaacccc acatctctgg ggccctgggc aggtagcata atagctaggt gctattaaca 1620
tcaataacac ttcagactac ctttggaggc agttgggagc tgagccgaga gagagagatg 1680
gccattctgc cctcttctgt gtggatgggt atgacagacc aactgtccat ggggtgactg 1740
acacctccac acttcatatt ttcaacttta gaaaaggggg agccacacgt tttacagatt 1800
aagtggagtg atgaatgcct ctacagcccc taaccccact ttccctgcct ggcttctctt 1860
ggcccagaag ggccaccatc ctgttctcca acacctgacc cagctatctg gctatactct 1920
ctttctgtac tcccttcccc ttcccccccc cattagcctc ctccccaaca cctccatctt 1980
caggcaggaa gtggggtcca ctcagcctct gttcccatct gcttggaccc ctgagcctct 2040
catgaaggta ggcttatgtt ctctgaggct ggggccggag gagcgcactg attctcggag 2100
ttatcccatc aggctcctgt cacaaaatag cctaggccgt gtgtctaaga acagtggagg 2160
ttggcttata actgttctgg gggcagcgaa gcccacatca aggtactcat agacccagta 2220
tttctgagga aacccctgtc cacatcctca cttggtaaag gcacagataa tctccctcag 2280
gcctcttgta taggagcact agccctggga gggctccgcc ccatgacctg atcaccccaa 2340
agccttcaac agaaggattc caacatgaat ttggggacag aagcactcag accacgatgc 2400
ccagcaccac accctcctat cctcagggta gctgtcactg tcctagtccc ttctgtttgg 2460
ccttttgtac cctcatttcc ttggcgtcat gtttgatgtc tttgtctctt tcgtgagaag 2520
atggggaaac catgtcagcc tctgcttccg acttcccatg ggttctaatg aagttggtgg 2580
ggcctgatgc cctgagttgt atgtgattt 2609

<210> 30
<211> 1053
<212> DNA
<213> Rattus norvegiucus

<400> 30
atggcgctga ctggagcctc tgctgtctct gaggaggcag acagcgagaa caagccattt 60
ctgctacggg ctctgcagat cgcgctggtg gtttctctct actgggtcac ctccatctcc 120
atggtattcc tcaacaagta cctgctggac agcccctccc tgcagctgga taccccatc 180
ttcgtcacct tctaccaatg cctggtgacc tcactgctgt gcaagggcct cagcactctg 240
gccacctgct gccctggcat ggtagacttc cccaccctaa acctggacct caaggtggcc 300
cgaagtgtgc tgccgctgtc cgtggtcttt atcggcatga taaccttcaa taacctctgc 360
ctcaagtacg tgggggtggc cttctacaac gtgggacgct cgctcactac cgtgttcaat 420
gtgcttctct cctacctgct gcttaaacag accacttcct tttatgccct gctcacctgt 480
gccatcatca ttggtggttt ctggctggga atagatcaag agggagctga gggcaccctg 540
tccctgacgg gcaccatctt cggggtgctg gccagcctct gtgtctcact caatgccatc 600
tacaccaaga aggtgctccc tgccgtagac cacagtatct ggcgcctaac cttctataac 660
aacgtcaacg cctgtgtgct cttcttgccc ctgatggtag tgctgggcga gctccatgct 720
ctcctggcct tcgctcatct gaacagcgcc cacttctggg tcatgatgac gctgggtgga 780
ctcttcggct ttgccattgg ctatgtgaca ggactgcaga tcaaattcac cagtcccctg 840
acccataatg tgtcgggcac agccaaggcc tgtgcacaga cagtgctggc tgtgctctac 900
tatgaagaga ttaagagctt cctgtggtgg acaagcaact tgatggtgct gggtggctcc 960
tctgcctaca cctgggtcag gggctgggag atgcagaaga cccaggagga ccccagctcc 1020
aaagagggtg agaagagtgc tatcggggtg tga 1053

<210> 31
<211> 360
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31
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> 32
<211> 350
<212> PRT
<213> Rattus norvegiucus

<400> 32

```
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
145 150 155 160
Ala Ile 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 Val Val Leu Gly Glu Leu His Ala
225 230 235 240
Leu Leu Ala Phe Ala His Leu Asn Ser Ala His Phe Trp Val 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 Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val
340 345 350

<210> 33
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 33
gcgccuaacc uucuauaac 19

<210> 34
<211> 7752
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 34
agcgttgcaa gttcagccga gggtggtgct gcaggtgcac ccgagggcac cgccgagggt 60
gagcaccagg tccctgcatc agccaggaca ccagagccca gtcgggtgga cggacggtac 120
gttctggaag ggaaagggcc ccgggaaggg gatacagcat tgagaagctc agaggctttg 180
gtctgggcat ccagaatgga ctttatctgg aggaggtgac atggcttctc gcctctggaa 240
gtgctgcttg gatctccggg acttcatgtc ctgactaggt ctggaagcgg tgaaaatagg 300
ggtaggaaaa aaggagagga ctgcaacaag gtcttcccga gtggcctgag ctcgagggac 360
gagggaggtg caacggtggg gagccgggcg caagggctgg gcggagggag gggggggtc 420
tccctaagca gaaaggtggt attccatttt ctgggtagat ggtgaagatg cacctgaccg 480
agtctggtcg atctgaagat atcaggggaa aagatagtgc gggtggaggg gagaatgaca 540
gaaccttcca gaaaatggga gaggctatag cacttgcaaa cccttccctg atctccgggg 600
actcccggaa gaagagggca ggtctgtggg cataggtgca gacttgccgg ggagctcttg 660
acggccgcgg gaagtggcaa cggcctgcga gctggccctt taaggcggct cgtaggcgtg 720
tcaggaaatg cgcgcagggc ccgccctgct cggtaagtgg cccgggaccc gcgtcgctga 780
gccggaactt gaattcggct cgtggcaacc gcagggcctt gctccggtca ggcccctgtc 840
cgtgtccctc gagacgcctt cctgagcctc ggtgatctcc ctgcagcacg ccctcctttc 900
ggctctgcgg gtgcttccgg gggttcccgc agcccatgct tcccacgcgg tccgcgtcca 960
gttatttcct cctccgctcc gtccttcctt cgctctctcg cttcctttct ccctgcgact 1020
cacgtgtccc ctgtcctcaa actggccatg gctgtcaaag cccacatcct tagttaggcc 1080
ccttctccct tccctgggtc ttgtttcgtg acaccacctc cctcccccgc cccgggagcg 1140
agcaagatga ggagcggtgc acctcggcaa atccggaagc agaacttcat ccaagaagga 1200
ggggaccgat aggtcatccc atgtgacagt tgaaggctgc agccacagac cctagctgct 1260
tgaagccctg tagtccaggg actgcttctg gccgtaaggt gacccagctc ttctgccacc 1320
atgaacaggg cgcctctgaa gcggtccagg atcctgcgca tggcgctgac tggagtctct 1380
gctgtctccg aggagtcaga gagcgggaac aagccatttc tgctccgggc tctgcagatc 1440
gcgctggtgg tctctctcta ctgggtcacc tccatttcca tggtattcct caacaagtac 1500
ctgctggaca gcccctccct gcagctggat acccccattt ttgtcacctt ctaccaatgc 1560
ctggtgacct cactgctgtg caagggcctc agcactctgg ccacctgctg ccccggcatg 1620
gtagacttcc ccaccctaaa cctggacctc aaggtggccc gaagtgtgct gccgctgtca 1680
gtggtcttta tcggcatgat aaccttcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtgccc 1740
ttctacaacg tgggacgctc gctcaccacc gtgttcaacg ttcttctctc ctacctgctg 1800
ctcaaacaga ccacttcctt ctatgccctg ctcacctgcg gcgtcatcat tggtgagtgg 1860
gactgggggc gtggggagca ggaatcgtaa agatcaatac cacattactc attatctgtc 1920
ccaggtcttt tgcaccacca gtcataggga gagacctgta gagaacaaat aacttcctta 1980
ctgtgactca gtaagttagg gatccagcca aggtgaacat aataatgtta ggcagacact 2040
acagcaaagc cagccagaca ctcagatcta gctaagcatt tgagccatgt taatgtaacg 2100
gatccccatt acaaggtata atatagctgc gttttatgga gagaaaccca aggcacagag 2160
aagctaagta gctgggatca cacaggtaat cactgacgta gcagaaattt gcacataagc 2220
agttacctcc ataggttaca ctcttgacca acacaccact gttctcaaga ggtcaagggt 2280
gaactcaggt catcacaatt ggcacaagta cctctaccca ctgagccatt tcagtggtcc 2340
agtcaatatg tgtgtgcttt aagaggcttt aactaccttc tcagatgtga ccataagtaa 2400

ttaattaccg ataggagcgt tgtgctgatc attacacttg tagcatcctc tttattgtac 2460
ccataagctc tctgagtggc ggcatctctg tgaaactgca gctcggagag gctgcgctcc 2520
ttgccacagc cccacaacta agaagcagat agtctgggac gcagtcccca gttggtcata 2580
ctccctggcc tgtgtttcaa gccagtctgc tttgctcctg acccttggga gttagcgcaa 2640
tgaaaaccaa cactatcact acagtctaaa tgtgctttta aatgaaagcc caggaacttt 2700
gaagcatccg gccccttaac ggcagccact atgtcctgat tccgccaaca tcttttcagt 2760
gcccggcagt cacatggagc aagggcctct tggcttggac agcatgtgtt agggaacatg 2820
tttgccactt tgaatgaatt tagtggctgc tgggttacag agaccagggc atctttcccc 2880
tcagagtcct gaatgaacga aaagcaacct tcatttgtac ctgctctgga ttttagttcg 2940
tcttgtttgg cctatttaga tgtccctggt gtctctgagg cccaggctgg gtgctctaga 3000
tgtagggacc aggccaacct gtactgtctt ccctagaaac attgccctgg ttgggcagct 3060
cctggatcca gggttaaggg gtctgggcgg agagaggtca gatagtggca ggatgcctcc 3120
cactgccccc acatacatac cctaagagat ctggtactcc tccttccagc ctacaagcta 3180
ccgtggggtc ccacttcagt ccaccagccc tgccaacgtt agaggggatg ggcctcctag 3240
taggagaact tacatgcagg aaggtacagt ctctggagaa cctgagcccg ggtccccaaa 3300
gggacaagta gctgatagtg aggcagctga gccccatggc ggcctgccca agtggcacgg 3360
gaaagtggag ctctctgctg cccccactac tggccccatc tcttggctct cccctccctt 3420
cctcctgtgg agaaggccca tctctggaaa ggcctcctag acatgcggca ctttgcaaag 3480
cctgtcgggc tcacagcccc tctagggtct aggaccttga gaatgaagaa tggagtcact 3540
tctagactct agtggtaacc accaggaggt acagggtgct ctgactgtgc agggaaaccc 3600
accgtgggct ctgctgagcc aagtgcctgt gaggctggag agtctggtgc ccttgttctg 3660
agatagcatc ttgctatgtt gccctcaagt cccaggcaac tggggctgca ggagcaccac 3720
cttgcctctc tccagcttct tgaagacttg taccttctc ctagcagtct ctatctgctc 3780
tcactccatc cattgagcag ctattagctt gtggccaagt attttccagg ccctgtactg 3840
agttttaggg tacaagtttg agaaaggaag ggtggggtcc ttgctcctgg tccgtgaatg 3900
atgttgatgg cagaaacgat agttacacta gatgctaagg gctgtgggta tctagaggga 3960
gcagggagca tgtgggataa cctgagcagg cctagctgaa aagtcattgc tggcatgaga 4020
ctgctccagt agtacaggct gggaacacac atttgaatgt ttcctgaaga cagttgggag 4080
ccacaggaaa tatccactgt agaaagatta tttagttgta agacagagta gtagattggt 4140
taacatagta gcaaaaacgt ggccccagtt tttacagatg aagggaattg gaactcagag 4200
aggttaagta acttctccca agcagctcag ctacaaaaat cacagaacag gcaggggcct 4260
gatggctctg atgcctgtgc tggtcccact attccatgtt gctaattcct gcagcagcag 4320
taaacctctg ccttgtggaa atgaggagtc taaataaaga gaccatagca ttgccacaag 4380
caggtttcta ccaactgggg gtggcaagga atgctgtgtt agcagcagga agctgggaag 4440
aggctgagta ctgggggggat gaggaaggga tccccaggag aggctgactt tggccttgaa 4500
gaatggtgga gtccctggaa agatgcagat acacagagct ctgtggatat acagagaagt 4560
ggggagctaa gtaggtggct tggggccatc atgtgacaga ggaagtcggg ctagatgcag 4620
gaagcccggt gctgtggcct agggagccat gtaggttctt tgagcagggg gcgggggggg 4680
ggggggggtga cccaggagtg actgtaaaca acatcaggcc atgagcagct ctgacctaat 4740
gttctcacca agggagccag aaccaaggct tagagccctg tccctttta gtgtccaagg 4800
tcactttact ggccctcttc ctttacagct gttggccccc acaggccatc aggcacctat 4860
gctattttat tttatagcct tcattacaat gactacaatt gtaattagag agttgacagg 4920
gtcacatctg tccttatata ttccccctct gctaagttct gcctgggaga atgtggaggg 4980
tattggtgaa atttggggaa gttataaccc ccccacccct gcccccaccc cctgctttgc 5040
tccctttatc tgcagggcat ttctgtgccc actttagccc atatagctcc caaataaatg 5100
acacagaaac ctggtatttt cattaacaaa ctgctggcac tctgctgggc aggttctgag 5160
ctgttctaac cctctaagct gctaatgccc agatagatgc cccaatgctt gccatccgag 5220

tctttctctg gcttgctctg ctccatgtgt gacctcatgg tgaatcctcc tgatttcccc 5280
acatggcctc tccacacttt tccttctccc ctctctctac cagggaccct ctcactggga 5340
cccgatgtcc catctgtact gtcctctccc acccagtcat aggctgattg agtctttatt 5400
aaccaatcag agatgatgga aaaacagttt ttacatagca ctgaggatgg agatgcttga 5460
cccttgagat gcttgcccgt aacctgtact gtatccagat gtctgggccc ccaaatcagc 5520
aggtgaatac acagtacaca ggactgaccc ccaacagagg gggaacacag gttctcactc 5580
tgggctccac gccctcggcc ctttcttagt gcaggggtta gactttgtat gtgttgatga 5640
tgaggtaagg gccatggaac agtcagaacg gtggtgtcag aatcctgtcc ctctccctcc 5700
tgtcctcatc cctccttacc gtgtcactct tctgtctgtt gcaggtggtt tctggctggg 5760
tatagaccaa gaaggagctg agggaacctt gtccctgacg ggcaccatct tcggggtgct 5820
ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgccat ctataccaag aaggtgctcc ctgcagtaga 5880
ccacagtatc tggcgcctaa ccttctataa caatgtcaat gcctgcgtgc tcttcttgcc 5940
cctgatgata gtgctgggcg agctccgtgc cctcctggcc ttcactcatc tgagcagtgc 6000
ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctgtttggc tttgccatcg gctatgtgac 6060
aggactgcag atcaaattca ccagtcccct gacccataac gtgtcaggca cggccaaggc 6120
ctgtgcacag acagtgctgg ccgtgctcta ctacgaagag attaagagct tcctgtggtg 6180
gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctccgcctac acctgggtca ggggctggga 6240
gatgcagaag acccaggagg accccagctc caaagatggt gagaagagtg ctatcagggt 6300
gtgagctcct tcagggagcc agggctgagc tcgggtgggg cctgcccagc acggaaggct 6360
tcccatagag cctactgggt atggccctga gcaataatgt ttacatcctt ctcagaagac 6420
catctaagaa gagccaggtt ctttcctgat aatgtcagaa agctgccaaa tctcctgcct 6480
gccccatctt ctagtcttgg gaaagcccta ccaggagtgg caccttcct gcctcctcct 6540
ggggcctgtc tacctccata tggtctctgg ggttggggcc agctgcactc tttgggcact 6600
ggactgatga agtgatgtct tactttctac acaagggaga tgggttgtga ccctactata 6660
gctagttgaa gggagctgtg taaccccaca tctctggggc cctgggcagg tagcataata 6720
gctaggtgct attaacatca ataacacttc agactacctt tggaggcagt tgggagctga 6780
gccgagagag agagatggcc attctgccct cttctgtgtg gatgggtatg acagaccaac 6840
tgtccatggg gtgactgaca cctccacact tcatattttc aactttagaa aagggggagc 6900
cacacgtttt acagattaag tggagtgatg aatgcctcta cagcccctaa ccccactttc 6960
cctgcctggc ttctcttggc ccagaagggc caccatcctg ttctccaaca cctgacccag 7020
ctatctggct atactctctt tctgtactcc cttccccttc ccccccccat tagcctcctc 7080
cccaacacct ccatcttcag gcaggaagtg gggtccactc agcctctgtt cccatctgct 7140
tggacccctg agcctctcat gaaggtaggc ttatgttctc tgaggctggg gccggaggag 7200
cgcactgatt ctcggagtta tcccatcagg ctcctgtcac aaaatagcct aggccgtgtg 7260
tctaagaaca gtggaggttg gcttataact gttctggggg cagcgaagcc cacatcaagg 7320
tactcataga cccagtattt ctgaggaaac ccctgtccac atcctcactt ggtaaaggca 7380
cagataatct ccctcaggcc tcttgtatag gagcactagc cctgggaggg ctccgcccca 7440
tgacctgatc accccaaagc cttcaacaga aggattccaa catgaatttg gggacagaag 7500
cactcagacc acgatgccca gcaccacacc ctcctatcct cagggtagct gtcactgtcc 7560
tagtcccttc tgtttggcct tttgtaccct catttccttg gcgtcatgtt tgatgtcttt 7620
gtctctttcg tgagaagatg gggaaaccat gtcagcctct gcttccgact tcccatgggt 7680
tctaatgaag ttggtggggc ctgatgccct gagttgtatg tgatttaata aaaaaaaaat 7740
ttttttaaaa ac 7752

<210> 35
<211> 4039

<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 35
gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga 60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tggggtgacc tagctcttct accaccatga 120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg 180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga 240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catggtattc ctcaacaagt 300
acctgctgga cagcccctcc ctgcagctgg atacccctat cttcgtcact ttctaccaat 360
gcctggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca 420
ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt 480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttcaa tgtgcttctg tcctacctgc 600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtgagt 660
ggggcccggg ggctgtggga gcaggatggg catcgaactg aagccctaaa ggtcaacact 720
gtaggtacct ttacttactg tcccaggtcc cttgcatcag cagttacagg aagagccctg 780
tagaaaacaa ataacttcct tatggtcatt caacaagtta gggacccagc cagggtgaaa 840
ataatgttag cagcaactac agcaaagatg gctctcgcca cttgcatgat taaaatgtgc 900
caggtactca gatcyaagca ttggatccac attaactcaa ctaatcccta ttacaaggta 960
aaatatatcc gaattttaca gagggaaaac caaggcacag agaggctaag tagcttgacc 1020
aggatcacac agctaataat cactgacata gctgggattt aaacataagc agttacctcc 1080
atagatcaca ctatgaccac catgccactg ttccttctca agagttccag gatcctgtct 1140
gtccagttct ctttaaagag gacaacacat ctgacattgc taccttgagg taacatttga 1200
aatagtgggt agacatatgt tttaagtttt attcttrctt tttatgygtg tgtgtttggg 1260
gggccaccac agtgtatggg tggagataag gggacaactt aagaattggt cctttctccc 1320
accacatggg tgctgaggtc tgaactcagg tcatcaggat tggcacaaat ccctttaccc 1380
actgagccat ttcactggtc caatatatgt gtgcttttaa gaggctttaa ctattttccc 1440
agatgtgaat gtcctgctga tcattatccc cttttacccg gaagccctct gggaggtgcc 1500
atccctgtgg tcgtctgcat acaaatgggg aaactgcaac tcagagaaac aaggctactt 1560
gccagggccc cacaagtaag ataggctggg atgccatccc agactggcca cactccctgg 1620
cctgtgcttc aagccagttt actttgttcc tgcccattgg aagttagcat gttgcagtca 1680
aacacaataa ctacaggcca aaagtgcttt taaattaaag tcagatgaac ttttaaacat 1740
ccagagctcc tcaactgcag gagttacaac ctgattctgc aaccatcttt gcagtgcccg 1800
gtagtcatat gtagctagag gctcttggct aggacagcat gtgttaggaa acatctggcc 1860
ctgagatcat tgaattgagt gactgctggg tgacaaagac caaggcatcc gttccctgag 1920
agtcctgggc aagcagcaat gtgaccttca tttgtaccta ctcaggttct ttatctgtcc 1980
tgtttgacct acttagtctc ctctggtgtc tcagaggccc aggctgggta ctctggatgt 2040
caggatcagg ccaatgcgca catctgccct agaaatgtcc ccctggttga gcagctcctg 2100
aatccatcgg taaagggtct ggaccaggga ggagtcagat aaaaagctga cagcactggg 2160
ggactccatg gggaactccc acctgccccc acacatccat cctaagagaa ctggtattcc 2220
ttgtttcctc tttgtcctac aaggcaccct gggatcccac ttcagtctcc cagccttgcc 2280
agggttagag ggcatgagcc tccttgtggg gaatttagat gcaagaaggt acagtcacta 2340
gagaacctga gctcagatcc ccaaagtaac cagtacctga tagtgaggca gctgagaacc 2400
gcagcagcct gcctgagtgg ctgaactctg cggcctccgg aactggcccc aactgttggg 2460
tctcctcttc cttcctcctg tgagggaggg cccatctctg ataagtgctg tggggactct 2520
agagtaggga ggaggaggag caatctaagc aggccttact gagaagtcct tgctggcatg 2580

tggctgcctg aggagtacag actgggaaca cccatttgaa tgagtaaggt ttttcctgaa 2640
ggccatgggg agccacggag gaaaatcatt ttagttacaa gacaaagagt agattggtta 2700
acatgggagc arggacatgg ccccaatttt cattgatgaa ggaaattgga actcrgagag 2760
gttaagtaac ttctcccaaa tagctcagct tcataatcac agaacagtca gagtctagat 2820
ctctctgatg cctgtgatgg tcctgccatt ccatgttgct gatccctgtg gcatcagtaa 2880
gcctctacct tgtgggaatg caggatctaa atgaagagag raagtgctgg ccccatgctg 2940
tggtctggaa agctatgcag gctctttgag cagagagtga cccacaagtg aatagagtcc 3000
tatgagactc aaagcaacat ccacccttaa gcagctctaa ccaaatgctc acactgaggg 3060
agccaaagcc aagttagagt cctgtgcttg cccaaggtca ctttgcctgg ccctcctcct 3120
atagcacccg tgttatctta tagccctcat tacagtgatt acaattataa ttagagaggt 3180
aacagggcca cactgtcctt acacattccc ctgctagatt gtagctggga gaggggggaga 3240
tgtaggtggc tgggggagtg ggagggaaga tgcagatttt cattctgggc tctactccct 3300
cagccatttt ttggtgtggg agttagactt tggatatgtt gatgatgagg taagggccac 3360
agaacagtct gaactgtggt atcagaatcc tgtccctctc cctctctcct catccctctt 3420
caccttgtca ctcctctgtc tgctacaggt ggtttctggc tgggtataga ccaagaggga 3480
gctgagggca ccctgtccct cataggcacc atcttcgggg tgctggccag cctctgcgtc 3540
tccctcaatg ccatctatac caagaaggtg ctcccagcag tggacaacag catctggcgc 3600
ctaaccttct ataacaatgt caatgcctgt gtgctcttct tgcccctgat ggttctgctg 3660
ggtgagctcc gtgccctcct tgactttgct catctgtaca gtgcccactt ctggctcatg 3720
atgacgctgg gtggcctctt cggctttgcc attggctatg tgacaggact gcagatcaaa 3780
ttcaccagtc ccctgaccca caatgtatca ggcacagcca aggcctgtgc gcagacagtg 3840
ctggccgtgc tctactatga agagactaag agcttcctgt ggtggacaag caacctgatg 3900
gtgctgggtg gctcctcagc ctatacctgg gtcaggggct gggagatgca gaagacccaa 3960
gaggacccca gctccaaaga gggtgagaag agtgctattg gggtgtgagc ttcttcaggg 4020
acctgggact gaacccaag 4039

出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
P044079	PCT/JP03/04506

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。

76 頁、 21 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	受託番号
平成14年（2002）3月14日	FERM BP－7965

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	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木 祐子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
P044079	PCT/JP03/04506

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。

76 頁、 21 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	受託番号
平成14年（2002）3月14日	FERM BP－7965

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、ブダ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
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木 [illegible]	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT／RO／134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
P044079	PCT/JP03/04506

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。

76 頁、 21 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	受託番号
平成14年(2002) 3月14日	FERM BP－7965

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	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木玲子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
P044079	PCT/JP03/04506

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。

94 頁、 23 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年(2003) 3月27日	FERM BP－8345

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	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木玲子	権限のある職員 中村由紀里

様式PCT／RO／134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044079	国際出願番号	PCT/JP03/04506

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。

94 頁、 23 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6(郵便番号305−8566)

寄託の日付	受託番号
平成15年(2003) 3月27日	FERM BP−8345

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
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木珠子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044079	国際出願番号	PCT/JP03/04506

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。

94 頁、 23 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月27日	FERM BP－8345

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	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ 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 鈴木珍子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, A01K67/027, A01H5/00, C07K14/47, C07K16/18, A61K39/395, A61P9/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00
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[7] C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, A01K67/027, A01H5/00, C07K14/47, C07K16/18, A61K39/395, A61P9/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00

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)
SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Lubke, T. et al., Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. Nat.Genet., Vol.28(1), pages 73 to 76 (2001)	1-7,9-19,24, 25,30-41, 46-58,70 8,20-23, 26-29,42-45, 59-69
X A	Luhn, K. et al., The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. Nat.Genet., Vol.28(1), pages 69 to 72 (2001)	1-7,9-19,24, 25,30-41, 46-58,70 8,20-23, 26-29,42-45, 59-69

[X] 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
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 July, 2003 (02.07.03)	15 July, 2003 (15.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04506

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Roos, D. et al., Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency. Blood Cells Mol.Dis., Vol.27(6), pages 1000 to 1004 (2001)	1-7,9-19,24, 25,30-41, 46-58,70 8,20-23, 26-29,42-45, 59-69
X	Puglielli, L. et al., Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. J.Biol.Chem., Vol.274, No.50, pages 35596 to 35600 (1999)	50-58
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. J.Biol.Chem., Vol.278, No.5, pages 3466 to 3473 (2003)	1-58,70
A	Zhou, Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA. Nucleic Acids Res., Vol.30(7), pages 1664 to 1669 (2002 Apr.1)	59-69

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04506

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims have the following groups of inventions:
(1) the inventions relating to "A cell in which the activity - - - is depressed or deleted compared with its parent strain cells" as set forth in claims 1 to 49 and 70 (excluding the parts relating to SEQ ID NO:1 or 2);
(2) the inventions relating to a specific amino acid sequence or a base sequence as set forth in claims 50 to 52 and the parts relating to SEQ ID NO:1 or 2 in claims 1 to 49 and 70;
(3) the inventions relating to a protein inhibiting the GDP-fucose transporter function as set forth in claims 53 to 58; and
(4) the inventions relating to (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

double-stranded RNA as set forth in claims 56 to 69.

However, it does not appear that there is a technical relationship among these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, the application has 4 groups of inventions.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０４５０６

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl[7] C12N5/10、C12N15/09、C12P21/08、A01K67/027、A01H5/00、C07K14/47、C07K16/18、A61K39/395、A61P9/00、29/00、31/00、35/00、37/00

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[7] C12N5/10、C12N15/09、C12P21/08、A01K67/027、A01H5/00、C07K14/47、C07K16/18、A61K39/395、A61P9/00、29/00、31/00、35/00、37/00

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）
SwissProt/PIR/Geneseq、GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq、
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、MEDLINE(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	Lubke, T. et al., Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. Nat. Genet., Vol. 28(1), pp. 73-76 (2001)	1-7, 9-19, 24, 25, 30-41, 46-58, 70
A		8, 20-23, 26-29, 42-45, 59-69
X	Luhn, K. et al., The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter.	1-7, 9-19, 24, 25, 30-41, 46-58, 70

☒ 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	国際調査報告の発送日
０２．０７．０３	15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
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	田村明照	４Ｂ	８４１２
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

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
A	Nat. Genet., Vol. 28(1), pp. 69-72 (2001)	8, 20-23, 26-29, 42-45, 59-69
X	Roos, D. et al., Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency. Blood Cells Mol. Dis., Vol. 27(6), pp. 1000-1004 (2001)	1-7, 9-19, 24, 25, 30-41, 46-58, 70
A		8, 20-23, 26-29, 42-45, 59-69
X	Puglielli, L. et al., Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. J. Biol. Chem., Vol. 274, No. 50, pp. 35596-35600 (1999)	50-58
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., Vol. 278, No. 5, pp. 3466-3473 (2003)	1-58, 70
A	Zhou, Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA. Nucleic Acids Res., Vol. 30(7), pp. 1664-1669 (2002 Apr. 1)	59-69

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０４５０６

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☐ 請求の範囲 _____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2．☐ 請求の範囲 _____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲には、
（１）請求の範囲１－４９，７０に記載の「・・・活性が親株細胞よりも低下または欠失した細胞」に関連する発明（ただし、配列番号１又は２に関連する部分は除く。）。
（２）請求の範囲５０－５２に記載の特定のアミノ酸配列又は塩基配列に関連する発明、及び、請求の範囲１－４９，７０のうち、配列番号１又は２に関連する部分。
（３）請求の範囲５３－５８に記載のＧＤＰ－フコーストランスポーターの機能を阻害する蛋白質に関連する発明。
（４）請求の範囲５９－６９に記載の２本鎖RNAに関連する発明。
が記載されているが、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関するものとは認められない。よって、本出願に係る発明の数は４である。

1．☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。