

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/035582 A1

(51) 国際特許分類: **C07K 16/28**, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, 29/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/015322

(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 8 日 (08.10.2004)

(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2003-350162 2003 年 10 月 8 日 (08.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 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): 飯田 茂 (IIDA, Shigeru). 佐藤 光男 (SATO, Mitsuo). 浦久保 美保 (URAKUBO, Miho). 脇谷 雅子 (WAKITANI, Masako). 内田 和久 (UCHIDA, Kazuhisa). 丹羽 倫平 (NIWA, Rinpei). 設楽 研也 (SHITARA, Kenya).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (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

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: COMPOSITION OF ANTIBODY CAPABLE OF SPECIFICALLY BINDING CCR4

(54) 発明の名称: C C R 4 に特異的に結合する抗体組成物

(57) Abstract: A composition of antibody molecules capable of specifically binding human CC chemokine receptor (CCR4), the antibody molecules having in the Fc region thereof a conjugated sugar chain with an N-glycoside linked therewith, wherein the conjugated sugar chain with an N-glycoside linked therewith is a sugar chain having fucose not linked with the N-acetylglucosamine being a reduced terminal of the conjugated sugar chain. There are further provided a transformant capable of producing the antibody composition, a process for producing the antibody composition and a medical drug containing the antibody composition.

(57) 要約: ヒト CC ケモカイン受容体 (CCR4) に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬を提供する。



WO 2005/035582 A1

明細書

CCR4 に特異的に結合する抗体組成物

技術分野

本発明は、ヒト CC ケモカイン受容体 4 (以下、CCR4 と表記する) に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造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

気管支喘息を始めとするアレルギー疾患は、好酸球、肥満細胞あるいは IgE、サイトカイン、ケモカインなどの様々な因子により病態が形成されている [Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152, 2059(1995)、Immunol. Today, 15, 19(1994)]。

サイトカインを産生する細胞は、主に CD4 陽性のヘルパー T 細胞 (以下、Th 細胞と表記する) であり、気管支喘息患者の気道細胞、末梢血中には活性化 Th 細胞が増加している [Am. Rev. Respir. Dis., 145, S22(1992)]。

アトピー性皮膚炎患者、喘息患者あるいはアレルギー性炎症動物モデルでは、IL-4、IL-5 が上昇している [Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 75(1995)]。これらのサイトカインは、ヘルパー T 細胞のうち Th2 細胞から産生される。したがって、Th2 細胞はアレルギー疾患と関連している。

Th2 細胞が介在する免疫疾患に対する治療法としては、1) サイトカイン・ケモカインに対する拮抗剤 2) サイトカイン・ケモカイン産生抑制剤 3) 炎症性細胞の機能制御剤 4) ケミカルメディエーター拮抗剤など、が開発されているが、これらは複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークの一部を阻害するだけであり、根治的ではない。

以上のことから、複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークのすべてを抑制するためには、アレルギー反応の上流部、すなわち Th2 細胞の制御が必要となる。

T 細胞を制御するものとしては抗 CD4 抗体があげられるが、CD4 は免疫担当細胞に広く発現しているため、特異性に欠け、強い免疫抑制作用を伴うという欠点を有する [Int. Arch. Allergy Immunol., 118, 133(1999)]。また、Th2 細胞が介在する免疫疾患に対する主な治療法はステロイド投与であるが、ステロイドは強い副作用を有する。

ヒト CC ケモカイン受容体 4 (以下、CCR4 と表記する) は、ヒト未熟好塩基球細胞株 KU-812 から K5-5 として遺伝子クローニングされた G 蛋白共役型の 7 回膜貫通型のケモカイン受容体である [WO96/23068、J. Biol. Chem., 270, 19495 (1995)]。CCR4 は Th2 細胞での発現が確認されており [J. Exp. Med., 187, 129(1998)、J. Immunol., 161, 5111(1998)]、また CCR4 はエフェクター/メモリー T 細胞 [Int. Immunol., 11, 81(1999)]、全身性免疫に関わるメモリー T 細胞に発現していることが報告されている [Nature, 400, 776(1999)]。以上のことから、炎症が誘発された場合に活性化を受けるメモリー T 細胞は、CCR4 を介してリガンドである MDC や TARC によって炎症局所に遊走し、他の炎症性細胞の活性化を促す可能性が強く示唆される。また、免疫疾患以外にも成人 T 細胞白血病、菌状息肉症をはじめとする白血病、リンパ腫

において、腫瘍細胞表面に CCR4 が発現していることが報告されている [Blood, 96, 685 (2000)]。

以上のことから、CCR4 を発現する細胞を患者の体内から除去するための治療剤は、Th2 細胞が介在する免疫疾患に限らず、CCR4 が介在する炎症性疾患および白血病の治療剤として有効であることが期待される。このような特異的な分子を標的とする治療剤として、以下に示す CCR4 に対する抗体が知られている。

CCR4 に対する抗体は、受容体の中和活性を有する 1G1 抗体および 2B10 抗体 (WO00/42074)、アンタゴニスト活性を有する抗体 (WO02/15666) などが報告されているが、これらの抗体はハイブリドーマにより生産された抗体である。また、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に反応し、血小板には反応性を有さず、ヒト CCR4 発現細胞に対して細胞傷害活性を示すヒト IgG1 型の抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体が知られている (WO03/18635)。

一般にヒト以外の動物の抗体をヒトに投与すると、異物として認識され、副作用を惹起すること [J. Clin. Oncol., 2, 881(1984)、Blood, 65, 1349(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932(1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242(1985)]、抗体の体内からの消失を速めることにより [Blood, 65, 1349(1985)、J. Nucl. Med., 26, 1011(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937(1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [J. Immunol., 135, 1530(1985)、Cancer Res., 46, 6489(1986)]。

これらの問題点を解決するために遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体をヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている [Nature, 321, 522(1986)]。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、免疫原性が低下し [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4220(1989)]、治療効果が延長することが報告されている [Cancer Res., 56, 1118(1996)、Immunol., 85, 668(1995)]。

ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、エフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができる [Cancer Res., 56, 1118(1996)]。

近年、Rituxan による非ホジキン白血病患者の治療、Herceptin による乳癌患者の治療において、抗体医薬が患者のエフェクター細胞に強い ADCC 活性を惹起した場合には、より高い治療効果が得られている (Blood, 99, 754, 2002; J. Clin. Oncol., 21, 3940, 2003; Clin. Cancer Res., 10, 5650, 2004)。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体は、その Fc 領域と抗体レセプター (以下、Fc γ R と表記する) あるいは各種補体成分との相互作用を介して、ADCC 活性および CDC 活性を発現する。抗体と Fc γ R との結合においては、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン (以下、C γ 2 ドメインと表記する) に結合している糖鎖の重要性が示唆されている [Chemical Immunology, 65, 88, (1997)]。

抗体 IgG 分子の Fc 領域に結合している N-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へ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おり [Biochemistry, 36, 130(1997)]、特に糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体の ADCC 活性が大きく低下することが報告されている [WO00/61739、J. Biol. Chem., 278, 3466(2003)]。

一般に、医薬品として利用される抗体組成物の多くは、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の CHO 細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体組成物の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。

抗体生産細胞内の α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ（以下、FUT8 と表記する）、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMD と表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fx と表記する）の活性を低下または欠失することにより、Fc 領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができる（WO02/31140）。

発明の開示

本発明の目的は、ヒト CC ケモカイン受容体 4（以下、CCR4 と表記する）に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の抗 CCR4 抗体組成物はフコースが結合した糖鎖を有する抗体分子を含まないためエフェクター機能が增強される。そのため、CCR4 を発現した Th2 細胞を患者の体内から減少させる治療に有用である。エフェクター機能が增強された抗体を治療に用いることにより、化学療法、放射性同位体元素標識体などと併用が不要となることから患者への副作用を軽減させることが期待される。また、患者への治療薬の投与量を減少させることで患者への負担の軽減などが期待される。

本発明は、以下の（１）～（５５）に関する。

（１） ヒト CC ケモカイン受容体 4（CCR4）に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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。

（２） N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合していない糖鎖である、（１）に記載の抗体組成物。

（３） ヒト CC ケモカイン受容体 4（CCR4）の細胞外領域に特異的に結合する、（１）に記載の抗体組成物。

（４） 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 および 271～284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である（３）に記載の抗体組成物。

（５） 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 2～29 番目に存在するエプトープである（３）または（４）項に記載の抗体組成物。

（６） 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13～29 番目に存在するエプトープである（３）～（５）のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

（７） 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目に存在するエプトープである（３）～（６）のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

（８） 配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目を含むペプチドのうち、16、19、20 および 22 番目の少なくとも 1 つのチロシン残基が硫酸化されたペプチドへの結合性が配列

番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目を含むペプチドへの結合性よりも低いことを特徴とする (7) に記載の抗体組成物。

(9) ヒト血小板に反応性を示さない (1) ～ (8) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(10) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に結合し、CCR4 リガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) の CCR4 への結合を阻害する活性を有さない (1) ～ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(11) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に特異的に結合する (1) ～ (10) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(12) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す (1) ～ (11) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(13) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す (1) ～ (12) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(14) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞が、ヘルパー T 細胞である、(11) ～ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(15) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である (12) または (13) に記載の抗体組成物。

(16) それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1) ～ (15) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(17) それぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1) ～ (16) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(18) それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1) ～ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(19) 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である (1) ～ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(20) ヒト型キメラ抗体がヒト CC ケモカイン受容体 (CCR4) に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、(19) に記載の抗体組成物。

(21) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む、(20) に記載の抗体組成物。

(22) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を含む (20) に記載の抗体組成物。

(23) 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を含む (20) ~ (22) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(24) ヒト型 CDR 移植抗体がヒト CC ケモカイン受容体 (CCR4) に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR)を含む、(19) に記載の抗体組成物。

(25) ヒト CC ケモカイン受容体 (CCR4) に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、(24) に記載の抗体組成物。

(26) ヒト CC ケモカイン受容体 (CCR4) に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H鎖定常領域 (C領域) および L鎖 C領域を含む、(24) または (25) に記載の抗体組成物。

(27) 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(28) 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(29) 抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目 Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(30) 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(24) ~ (27) および (29) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(31) 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の

Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26)、(28) および (29) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(32) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、それぞれ配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、(24) ~ (28)、(29) ~ (31) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(33) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、それぞれ配列番号 26、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26)、(29) ~ (31) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(34) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む (24) ~ (26)、(32) および (33) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(35) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 27 または 28 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を含む、(24) ~ (26) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(36) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、(1) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

(37) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、(36) に記載の形質転換体。

(38) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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細胞である、(36) に記載の形質転換体。

(39) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) および GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (F x) からなる群から選ばれる酵素である、(37) または (38) に記載の形質転換体。

(40) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(39) に記載の形質転換体。

(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 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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(41) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(39) に記載の形質転換体。

(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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

(42) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)および(b)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 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 とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(43) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)～(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 4 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

(44) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである (37) または (38) に記載の形質転換体。

(45) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)～(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(44)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA；

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；

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

(46) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)～(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、(44)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 7 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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(47) 形質転換体が FERM BP-8467 である (46) に記載の形質転換体。

(48) 宿主細胞が、下記の (a)~(i) からなる群から選ばれる細胞である (36) ~ (47) のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

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

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を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。

(49) (36) ~ (48) のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

(50) (49) に記載の製造方法により得られる、(1) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(51) (1) ~ (35) および (50) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(52) (1) ~ (35) および (50) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 関連疾患の治療薬。

(53) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 関連疾患が、癌または炎症性疾患である (52) に記載の治療薬。

(54) (1) ~ (35) および (50) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を患者に投与することを特徴とする、ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 関連疾患の治療方法。

(55) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 関連疾患の治療薬を製造するための (1) ~ (35) および (50) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の使用。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 10 月 8 日に出願された日本国特許出願 2003-350162 号の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書及び図面に記載される内容を包含する。

本発明のヒト CCR4 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元

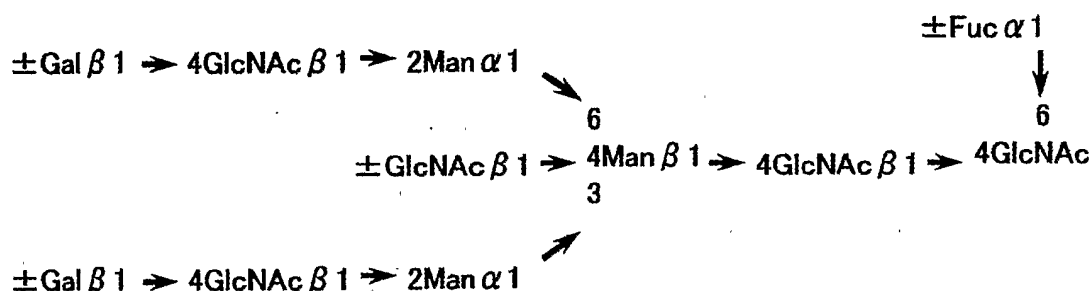
末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物としては、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合していない糖鎖である抗体組成物があげられる。

抗体分子にはFc領域があり、それらの領域にはN-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。

N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の側鎖を並行して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を有するコンプレックス型（複合型）糖鎖をあげることができる。

本発明において、N-グルコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式1で示される。

化学式 1



本発明において、フコースが結合していない糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側の N-アセチルグルコサミンにはフコースが結合されていないものであればよく、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものでもよい。

したがって、本発明の抗体組成物としては、上記の糖鎖構造を有していれば、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。

本発明において、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とは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない抗体組成物とは、具体的には、後述の 4 に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の抗体組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定を検出限界以下であることを意味する。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本発明の抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。

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抗体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を有する抗体分子の割合は、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—糖蛋白質糖鎖研究法(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体又は同位元素標識し、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で決定することができる。

本発明の抗体組成物としては、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に反応する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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などがあげられるが、そのなかでもヒト血小板に反応性を示さない抗体組成物が好ましい。

ヒト CCR4 の細胞外領域としては、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 1~39、98~112、176~206 または 271~284 番目を含むアミノ酸配列で表され、好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 2~29 番目 (配列番号 37)、より好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 12~29 番目 (配列番号 38)、さらに好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 12~25 番目で表されるポリペプチド又はペプチドがあげられる。したがって、本発明の抗体組成物としては、好ましくは、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 1~39、98~112、176~206 または 271~284 番目を含む領域、より好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 2~29 番目 (配列番号 37)、さらに好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 12~29 番目 (配列番号 38)、特に好ましくは配列番号 36 に示されるアミノ酸配列の 12~25 番目で表されるポリペプチド又はペプチドに、特異的に反応する抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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などがあげられる。

ヒト血小板に反応性を示さないとは、抗体がヒト血小板と実質的に反応しないことをいい、具体的には、フローサイトメーターなどの抗体と細胞の結合を検出できる装置による測定で反応性を示さないことをいう。

また、本発明の抗体組成物としては、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~25 番目を含むペプチドのうち、16、19、20 および 22 番目の少なくとも 1 つのチロシン残基が硫酸化されたペプチドへの結合性が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~25 番目を含む合成ペプチドへの結合性よりも、反応性が低い抗体組成物があげられる。

本発明の抗体組成物としては、CCR4 リガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) の CCR4 への結合を阻害する活性を有さない遺伝子組換え抗体組成物を包含する。CCR4 リガンドである TARC または MDC の CCR4 への結合を阻害する活性を有さないとは、抗体組成物がリガンドと受容体との結合を実質的に阻害できないことをいい、具体的には、抗体組成物が高濃度であってもリガンドと受容体との結合に影響を与えないことをいう。ここで、高濃度とは抗体の濃度が 50 μ g/mL 以上であることをいう。

また、本発明の抗体組成物としては、ヒト CCR4 を発現する細胞 (以下、ヒト CCR4 発現細胞と称す) に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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などがあげられるが、そのなかでもヒト CCR4 発現細胞に対し細胞傷害活性を有する抗体組成物が好ましい。

ヒト CCR4 発現細胞としては、ヘルパーT2 細胞（以下、Th2 細胞と称す）などがあげられる。Th2 細胞は、インターロイキン-4（以下、IL-4 と称す）、インターロイキン-5（以下、IL-5 と称す）およびインターロイキン-13（以下、IL-13 と称す）を産生する細胞である。

細胞傷害活性としては、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性と表記する）あるいは抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性と表記する）などがあげられる。

ヒト CCR4 発現細胞に対し細胞傷害活性を有する抗体組成物であって、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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は、該抗体組成物の有する細胞傷害活性によりヒト CCR4 発現細胞である Th2 細胞を傷害することにより、Th2 細胞を除去することができる。したがって、該抗体組成物は Th2 細胞から IL-4、IL-5、IL-13 などのインターロイキンの産生を抑制することができる。

本発明の抗体組成物は、ヒト型キメラ抗体組成物、ヒト型 CDR 移植抗体組成物およびヒト抗体組成物、ならびにそれらの抗体断片組成物を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL とヒト抗体の CH および CL 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。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物は、ヒト CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する動物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、動物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、さらに 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 に属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

本発明のヒト CCR4 に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物としては、それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる VH の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3、を含む抗ヒト CCR4 キメラ抗体、抗体の VH が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列および／または VL が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を含む抗ヒト CCR4 キメラ抗体、抗体の VH が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体の CH が hIgG1 サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体の VL が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体の CL が κ クラスのアミノ酸配列からなる抗ヒト CCR4 キメラ抗体組成物があげられる。

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 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。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物は、CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を任意のヒト抗体の VH および VL のフレームワーク（以下、FR と表記する）に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH と表記する）および軽鎖定常領域（以下、CL と表記する）をコードする DNA を有する動物細胞用発現ベクタ

一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、該発現ベクターを動物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、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank など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、またはヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられる。

本発明の抗体の 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、さらに 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 に属すればいずれのものでもよく、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。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3 を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物または該抗体断片組成物などがあげられる。

これらのヒト型 CDR 移植抗体組成物のなかでも、抗体の VH が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物が好ましく、抗体の VH が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物がより好ましい。

具体的には、抗体の VH が配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が、配列番号 26、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれる 1 つのアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示される

アミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が、配列番号 26、33、34 および 35 から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物などがあげられる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、抗体の VH が配列番号 27 または 28 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物組成物が最も好ましい。

これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換および／または挿入され、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に結合し、ヒト血小板に反応性を示さない抗体または抗体断片も本発明の抗体組成物に包含される。

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、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。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ 1 もしくは複数のアミノ酸配列中において、1 または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。以下の同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A 群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B 群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C 群：アスパラギン、グルタミン

D 群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E 群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F 群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G 群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の遺伝子組換え抗体断片組成物は、ヒト CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体組成物の抗体断片であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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 Fc 領域の一部または全部を含んでいる抗体断片組成物である。

本発明の抗体断片組成物としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどの抗体断片組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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 Fc 領域の一部または全部を含む抗体断片組成物があげられるが、該抗体断片組成物に抗体の Fc 領域の一部または全部を含まない場合は、該抗体断片と、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体 Fc 領域の一部または全部と融合させるか、または該 Fc 領域の一部または全部を含む、蛋白質との融合蛋白質組成物とすればよい。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される）、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

F(ab')₂ は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される）、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の F(ab')₂ は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記 F(ab')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab' は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する F(ab')₂ 組成物を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と表記する）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の scFv は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明の diabody は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体の VH 組成物および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法(Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明の dsFv は、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明のヒト CCR4 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の形質転換体としては、ヒト CCR4 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の抗体組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、ヒト CCR4 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失失活するようにゲノムが改変された細胞。

上述において、酵素が失活するようにゲノムが改変されたとは、該酵素の発現を欠失させるように該酵素をコードする遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、または該酵素を失活させるように該酵素をコードする遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入するとは、ゲノム上の塩基配列を欠失、置換、挿入および/または付加させるといった塩基配列の改変を行うことをいう。このように改変されたゲノム遺伝子の発現または活性が完全に抑制されることをゲノム遺伝子がノックアウトされるという。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

- (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 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;
- などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

- (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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;
 - (c) 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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;
- などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

- (a) 配列番号 3 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 とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;
- などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

- (a) 配列番号 4 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;
 - (c) 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;
- などがあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

- (a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA
- (b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA
- (c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 6 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 $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

$\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

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 とは、例えば配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列からなる 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、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来の 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°C でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、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°C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジェントな条件下で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、5 または 6 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 または 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、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号 7 または 8 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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・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 1、3、5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 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、7 または 8 であらわ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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号 2、4、7 または 8 で表されるアミノ酸配列と 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、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% 以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素を失活させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素を失活させる手法としては、

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

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が 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

ずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞（以下、親株とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が成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。

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は $10\mu\text{g/mL}$ ~ 10mg/mL 、好ましくは 0.5mg/mL ~ 2.0mg/mL である。

本発明の抗体組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の抗体組成物を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述 1 に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、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 NS0 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、受精卵細胞などが好ましい。

本発明の形質転換体としては、具体的には、本発明の抗 CCR4 抗体の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞由来の形質転換株 Ms705/CCR4 があげられる。なお、CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞由来の形質転換株 Ms705/CCR4 は、平成 15 年 9 月 9 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に FERM BP-8467 として寄託されている。

以下に、本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の抗体組成物の製造方法および本発明の抗体組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

1. 本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の抗体組成物を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称す）は、以下に述べる手法により、本発明の抗体組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述 2 に記載の方法により、抗ヒト CCR4 抗体をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

（1）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMD と表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fx と表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフ

コースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO 法と表記する）、RNA インターフェアレンス法（以下、RNAi 法と表記する）、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) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする 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。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする 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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または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、本発明の抗体組成物を作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の抗体組成物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、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1

位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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2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が可能であるか、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2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2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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活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, 糖蛋白質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖蛋白質・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を用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法があげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA を調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

cDNA の調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。

調製した全 RNA 又は mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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 法で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA を取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞の mRNA は市販のもの(例えば Clontech 社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソツズ・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) などがあげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社) などの市販のキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞 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、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 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)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社) 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)]、 λ ZAP II (STRATAGENE 社)、 λ gt10、 λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (Clontech 社)、 λ ExCell (Pharmacia 社)、pT7T318U (Pharmacia 社)、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)]、*Escherichiacoli* 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 *Escherichiacoli* JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げて、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)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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' 末端および 3' 末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、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied 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。

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやブラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖

修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied 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 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、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 3 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 5 または 6 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 DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム 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) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied 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。

決定したゲノム DNA 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、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法または DNA 合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 10~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴヌクレオチド) または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して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'-0-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抗体組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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て染色体を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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、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、染色体上の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、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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 2 に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム 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。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の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、置換型、挿入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 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抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、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、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を

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 2 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 2 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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の 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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (b) 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) 等のプラスミドにサブクローニングし、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、ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied 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。

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

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述 4 または後述 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 は、サイエンス (Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロジー (Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラピー (Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジーン・セラピー (Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン (J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー (Invest. Dermatol.), 111, 1172

(1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43 (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555 (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi 法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、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 cDNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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 cDNA 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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、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、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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 2 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への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 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 2 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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、本項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、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

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

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

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.), 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、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、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に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ゼの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼーゼは、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、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-ア

セチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素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2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2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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

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

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸(133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン)が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている(Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD のドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD (配列番号2)では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を用い、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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、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、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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2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2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2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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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、後述1(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、F_xなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 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 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が 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

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が 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用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が 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としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51 (1986) 等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が 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、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

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

2. 抗体組成物の製造方法

本発明の抗体組成物は、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。

抗ヒト CCR4 抗体分子の全長 cDNA を調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

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

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択するか、または前述 1 に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、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、前記 1. の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

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

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソーススキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

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

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

プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

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

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

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

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

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

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

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

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

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory

Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusiani の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社) 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、昆虫細胞への上記発現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) [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

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等に準じて、分泌生産、Fc 領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

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

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

酵母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、これらを含む糖蜜、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、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。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微生物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微生物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微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [ヴュウロロジー(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 pH6.0～8.0、30～40℃、5%CO₂ 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

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

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

培養は、通常 pH6.0～7.0、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。

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

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

培養は、通常 pH5.0～9.0、20～40℃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 を組み込んだ発現ベクターを保有する動物細胞、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。

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

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

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平 05-336963、W094/23021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に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させ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)または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-

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

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

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

以下に、本発明の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の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

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

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域 (以下、hC γ 1 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、hC κ 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、mRNA から逆転写して作製された 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み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 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鎖及び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鎖及び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)]。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターとしては、pKANTEX93 [モレキュラー・イムノロジー (Mol. Immunol.), 37, 1035 (2000)]、pEE18 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 17, 559 (1998)] などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 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。

ヒト CCR4 に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として用い、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挿入して 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領域或いはV領域をコードする DNA をプローブとして用い、H鎖V領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド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 CCR4 に特異的に結合できるヒト以外の動物の抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、配列番号 36 で示されるヒト CCR4 をヒト以外の動物に免疫し、周知の方法（アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998) に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製し、次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

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:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 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:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; 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(Current Protocols in Molecular Biology), 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)]、λZAP 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)]、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 クローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブラーク・ハイブリダイゼーション法[モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR [モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor

Lab. Press New York, 1989 ; 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 (Current Protocols in Molecular Biology), 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、ABI PRISM377 DNA シークエンサー (Applied 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 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 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 を完全に含んでいる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。

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードする DNA の塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、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 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードする DNA 配列を設計し、設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に 100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。

(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 のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体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、同様の方法で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 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、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なり、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 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベク

ターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、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 FR 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 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 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 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 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なる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率及び合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 4~6 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 2 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 2 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、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由来

す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は、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために 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)] 等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。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て来た。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。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 2 の (5) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について本項 2 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 2 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 2 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 を挿入し、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 2 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 2 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挿入し、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 2 の (4) 及び (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及びヒト型 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 NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ細胞 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 硫酸塩 (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、FCS 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及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法〔以下、ELISA 法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕。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。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、SDS 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔以下、SDS-PAGE と表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)〕やウエスタンブロッティング法〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等で測定することができる。

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

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

3. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいは細胞傷害活性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。

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 法及び蛍光抗体法〔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傷害活性は、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。

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。

4. 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

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

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

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

抗体組成物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による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。

5. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、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100%であり、高いADCC活性を示す。このような抗体組成物は、上記4.に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

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

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

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の leucoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

N-グ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る糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) を挙げることができる。

6. 本発明の抗体組成物の利用

本発明の抗体組成物は、ヒト CCR4 に特異的に結合し、高い抗体依存性細胞傷害活性を有する

ため、癌疾患、炎症性疾患をはじめとする各種 CCR4 発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

本発明の抗体組成物による治療が有効な癌疾患としては、血液癌、特に白血病あるいはリンパ腫を挙げることができる。具体的には成人 T 細胞白血病; ATL、菌状息肉症、セザリー症候群、未分化大細胞リンパ腫、非特定 T 細胞リンパ腫などなどがあげられる。

本発明の抗体組成物による治療が有効な炎症性疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏症または気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、慢性副鼻腔炎、Churg-Strauss 症候群、蕁麻疹、天疱瘡、好酸球性心筋炎、アレルギー性胃腸炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性鼻炎または花粉症、など、Th2 細胞が介在する免疫疾患があげられる。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖し、例えば B 細胞性リンパ腫においては特定の B 細胞が、異常増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体は、殺細胞効果により抗原を発現している癌細胞を傷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用である。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十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス (Science), 280, 1197 (1998)]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

慢性気道過敏性喘息や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患では、Th2 細胞から産生される IL-4、IL-5 および IL-13 などのサイトカイン・ケモカインによって好酸球や肥満細胞を始めとする炎症性細胞が増殖または分化し、これらの炎症性細胞が産生する生体機能分子を介して組織傷害やアレルギー反応が誘発される。これまでに知られている Th2 介在性免疫疾患の治療薬としては、Th2 細胞から産生される IL-4、IL-5 または IL-13 などの個々のサイトカインに対する拮抗剤、それらのサイトカインの産生抑制剤、炎症性細胞や炎症性生体機能分子に対する阻害剤などが開発されているが、これらの治療薬はサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間の機能の一部を阻害するだけで、根治的な治療薬ではない。本発明の抗体組成物は、CCR4 の細胞外領域に特異的に結合し、CCR4 発現細胞に対して強い細胞傷害活性を示すので、アレルギー反応の上流部にある CCR4 が発現した細胞である Th2 細胞を選択的に排除すること、さらに Th2 細胞から IL-4、IL-5 および IL-13 の産生を抑制することができる。したがって、上述の炎症性疾患の治療薬として有用である。

本発明の抗体組成物はフコースが結合した糖鎖を有する抗体分子を含まないため細胞傷害活性が増強されている。そのため、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子を含む抗体組成物では治癒することができない、上述の癌、炎症性疾患などの患者を治療することができる。

特に、上述の疾患の中でも、癌、気管支喘息、慢性副鼻腔炎などの疾患は、CCR4を発現した細胞の浸潤部位に薬物が届きにくいいため、少量の薬物でも治療効果を有することが好ましい。本発明の抗体組成物は少量でも高いADCC活性を有するためこれらの疾患の治療に有用である。

本発明の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、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 μ g/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。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pKOFUT8Neo の構築を示した図である。

第2図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。

第3図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローン WK704 のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

第4図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン 4-5-C3、ダブルノックアウトクローン WK704、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。

第5図は、作製した抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクターの概略図を示した図である。

第6図は、精製した Ms705/CCR4 抗体および DG44/CCR4 抗体の CCR4 部分ペプチドに対する ELISA 法における反応性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における吸光度を示す。□は DG44/CCR4 抗体、■が Ms705/CCR4 抗体をそれぞれ示す。

第7図は、精製した Ms705/CCR4 抗体および DG44/CCR4 抗体のヒト CCR4 高発現細胞 (CCR4/EL-4) に対する ADCC 活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における細胞傷害活性を示す。●が DG44/CCR4 抗体、○が Ms705/CCR4 抗体をそれぞれ示す。

第8図は、3.7ng/mL の Ms705/CCR4 抗体に、0~300ng/mL の DG44/CCR4 抗体もしくは Ms705/CCR4 抗体を添加して調製した抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の、CCR4/EL4 細胞に対する *in vitro* ADCC 活性を示した図である。グラフ縦軸に細胞傷害活性、横軸に添加した抗体濃度をそれぞれ示す。●は 3.7ng/mL の Ms705/CCR4 抗体に DG44/CCR4 抗体を添加して調製した抗体組成物、○は 3.7ng/mL の Ms705/CCR4 に Ms705/CCR4 抗体を添加して調製した抗体組成物の活性をそれぞれ示す。図中の※は、3.7ng/mL の Ms705/CCR4 抗体に DG44/CCR4 抗体を添加して調製した抗体組成物のうち、フコースが結合しない糖鎖を有する糖鎖を有する抗体の割合が 20%以上の抗体組成物を示す。

第9図は、Ms705/CCR4 抗体のみからなる抗体組成物と、Ms705/CCR4 抗体に 9 倍量の DG44/CCR4 抗体を混合した抗体組成物の、CCR4/EL4 細胞に対する *in vitro* ADCC 活性を示した図である。グラフ縦軸に細胞傷害活性を示す。グラフ横軸に示した数値は、上段から Ms705/CCR4 抗体の濃度 (ng/mL)、添加した DG44/CCR4 抗体の濃度 (ng/mL)、総抗体濃度 (ng/mL) をそれぞれ示す。□は Ms705/CCR4 抗体のみからなる抗体組成物、■は Ms705/CCR4 抗体に 9 倍量の DG44/CCR4 抗体を混合した抗体組成物の活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1 ゲノム上の $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8 と表記する) 両対立遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

FUT8 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させた CHO/DG44 細胞株を以下の手順で造成した。

1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクターpKOFUT8Neo の構築

W002/31140 の実施例 13 の 1 項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクターpKOFUT8Puro および pKOSelectNeo (Lexicon 社製)を用いて、以下の様にして pKOFUT8Neo を構築した。

pKOSelectNeo (Lexicon 社製)を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製)を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の AscI 断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puro を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)により、DNA 断片の末端を脱リン酸化させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA 断片を精製した。

上記で得た pKOSelectNeo 由来の AscI 断片 (約 1.6Kb)0.1 μ g と pKOFUT8Puro 由来の AscI 断片 (約 10.1Kb) 0.1 μ g に滅菌水を加えて 5 μ L とし、Ligation High (東洋紡社製) 5 μ L を加えて 16°C で 30 分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。この様にして第 1 図に示した pKOFUT8Neo を得た。pKOFUT8Neo は CHO 細胞の FUT8 遺伝子へミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

2. ゲノム上の FUT8 遺伝子の 1 コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

(1) ターゲティングベクターpKOFUT8Neo 導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に、実施例 1 の 1 項で構築したチャイニーズハムスターFUT8 ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Neo を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Neo を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製)で消化して線状化し、線状化した 4 μ g の pKOFUT8Neo を 1.6×10^6 個の 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)]により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析 FBS (インビトロジェン社製)を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製)を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製)を 600 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) [透析 FBS を 10%で含む IMDM 培地] 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、G418 耐性クローンを取得した。

(2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項(1)で取得した G418 耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いた PCR により、以下の様に行った。

96 穴プレート上の G418 耐性クローンに対してトリブシン処理を行った後、2 倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418 を 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含む IMDM-dFBS(10)で 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 30 μL の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A] に一晩溶解した。

ゲノム PCR に用いるプライマーは以下の様に設計した。まず、W003/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 39 または配列番号 40 でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、ターゲティングベクターの loxP 配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 41 または配列番号 42) をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いた。上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々 10 μL 含む 25 μL の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上記プライマー (フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせて使用する)] を調製し、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約 1.7Kb の特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

(3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(2)で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより、以下の様に行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、10 分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。G 418 を 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含む IMDM-dFBS(10)を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養し、細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 150 μL の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 μg を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20 μL の TE 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA] に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [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. N

atl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。WO03/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 43 および配列番号 44 でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下の PCR に用いた。WO02/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20 μ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を回収した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5 μ L を、[α -³²P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 2 図には、親株である CHO/DG44 細胞、および本項 (2) で取得した陽性クローンである 50-10-104 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片のみが検出された。一方、陽性クローン 50-10-104 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片が検出された。両断片の量比は 1:1 であったことから、50-10-104 株は、FUT8 対立遺伝子のうち 1 コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

3. ゲノム上の FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞の作製

(1) ターゲティングベクター pKOFUT8Puro 導入株の作製

本実施例の 2 項で得た FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方の FUT8 対立遺伝子を破壊するために、WO02/31140 の実施例 13 の 1 項に記載のチャイニーズハムスター FUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクターである pKOFUT8Puro を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Puro を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した 4 μ g の pKOFUT8Puro を 1.6×10^6 個の FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローン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、IMDM-dFBS (10)-HT(1) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5% CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の

濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 7 日毎に繰り返しながら 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(1)で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより以下の様に行った。

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 150 μ L の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 μ g を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20 μ L の TE 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [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. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 45 および配列番号 46) を作製し、以下の PCR に用いた。WO02/31140 の実施例 12 に記載のプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20 μ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5 μ L を、[α -³²P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [$2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$ SDS] に浸漬し、 65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [$0.2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$ SDS] に浸漬し、 65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 3 図には、50-10-104 株から本項(1)に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの 1 つである WK704 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。WK704 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片 (図中に矢印で示す) のみが検出された。この結果から WK704 株は、FUT8 両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の 3 項で取得した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を以下の様にして導入した。

$4\mu\text{g}$ の pBS185 を 1.6×10^8 個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン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、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 37°C 、10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノガラス社製) へ採取し、IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 37°C 、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリプシン処理を行い、2 倍容量の凍結培地 [$20\%\text{DMSO}$ 、 $40\%\text{ウシ胎児血清}$ 、 $40\%\text{IMDM}$] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノガラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418 を $600\mu\text{g/mL}$ 、ピューロマイシンを $15\mu\text{g/mL}$ の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 37°C 、一週間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418 およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 37°C 、10 分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて 1 週間培養した後、トリプシン処理を行い、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種して $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 37°C で培養し、増殖した細胞を回

収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々150 μ L の TE-RNase 緩衝液(pH8.0) に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 μ g を制限酵素 *Nhe*I(New England Biolabs 社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20 μ L の TE 緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [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. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 45 および配列番号 46) を用いて、以下の PCR を行った。WO02/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20 μ L の反応液[DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー]を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5 μ L を、[α -³²P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5%(w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーション後、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2×SSC-0.1%(W/V) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(W/V) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 4 図には、親株である CHO/DG44 細胞、本実施例の 2 項に記載の 50-10-104 株、本実施例の 3 項に記載の WK704 株、および WK704 株から本項(2)に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの 1 つである 4-5-C3 株のゲノム DNA を、本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子に由来する約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。また、50-10-104 株や WK704 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約 9.5Kb の DNA 断片が認められた。一方、4-5-C3 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去されて生じる約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。この結果から 4-5-C3 株は、Cre リコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去された FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン（以下、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する）は、4-5-C3 株以外にも複数株取得された。

実施例 2 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗 CCR4 ヒト CDR 移植抗体組成物の発現

1. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株である CHO/DG44 細胞を宿主細胞として用いて、抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の安定生産細胞を W002/31140 の実施例 1 の 2 項 (2) に記載の方法で作製した。なお、抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクターは W003/18635 の実施例 1 に記載の方法で作製した。第 5 図には、作製した抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の発現ベクターの概略図を示した。

最終的に G418 を 500 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株を取得した。親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を DG44/CCR4 株と、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を Ms705/CCR4 株と名付けた。

2. 培養上清中のヒト IgG 抗体濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体(American Qualex 社製)を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) (インビトロジェン社製) で希釈して 1 μ g/mL とし、96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) に、50 μ L/ウェルで分注し、4°C で一晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、BSA を 1% の濃度で含む PBS (以下、1% BSA-PBS と表記する) (和光純薬社製) を 100 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1% BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清、または培養上清から精製した抗体の各種希釈溶液を 50 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween20 を 0.05% の濃度で含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) (和光純薬社製) で各ウェルを洗浄後、1% BSA-PBS で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム(和光純薬社製)の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素(和光純薬社製)を 1 μ L/mL で添加した溶液]を 50 μ L/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

3. 抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の精製

実施例 2 の 1 項で得られた形質転換細胞株 DG44/CHO 株および Ms705/CCR4 株を用いて、それぞれが生産する抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を以下の様にして精製した。

各々の形質転換株を、G418を500 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)に懸濁し、30mLを182cm² フラスコ (グライナー社製) に播種して5%CO₂インキュベーター内で37°C、数日間培養した。細胞密度がコンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mLのPBSで細胞を洗浄後、EXCELL301培地 (JRH Biosciences社製) 30mLを注入した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、7日間培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4°Cの条件で5分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22 μ m孔径 Millex GV フィルター (ミリポア社製) を用いて濾過滅菌した。上述の方法により取得した培養上清より、Mab Select (Amersham Biosciences社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物を精製した。精製した抗CCRヒト型CDR

移植抗体組成物は、DG44/CCR4株より得られた抗体組成物をDG44/CCR4抗体と、Ms705/CCR4株より得られた抗体組成物をMs705/CCR4抗体と名付けた。なお、取得したMs705/CCR4株は、平成15年9月9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1中央第6)にFERM BP-8467として寄託されている。

実施例3 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の生物活性

1. 抗CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体のヒト CCR4 抗原に対する結合活性 (ELISA 法)

実施例2の3項で精製したDG44/CCR4抗体およびMs705/CCR4抗体のヒトCCR4抗原に対する結合活性を以下の様にして測定した。

抗CCR4 ヒト型 CDR 移植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38)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、10mgのBSAを含むPBS溶液900 μ Lに、100 μ Lの25mg/mL SMCC[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッドN-ヒドロキシサクシニミドエステル](シグマ社製)-DMSO溶液をボルテックスしながら滴下し、30分間ゆっくりと攪拌した。25mL PBS(インビトロジェン社製)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、0.5mgの化合物1に250 μ L PBSを加え、次いで250 μ L 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)をボルテックス下で添加して3時間ゆっくり攪拌した。反応液をPBSに対して4 $^{\circ}$ C、一晚透析し、最終濃度0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 μ mフィルターでろ過した後、BSA-化合物1溶液とした。

上述のように調製したBSA-化合物1溶液をPBSで希釈して1 μ g/mLとし、96穴のELISA用プレート(グライナー社製)に50 μ L/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、実施例2の3項で調製したDG44/CCR4抗体またはMs705/CCR4抗体の各種希釈溶液を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

第6図には、DG44/CCR4抗体およびMs705/CCR4抗体のCCR4細胞外領域部分ペプチドに対する結合活性を示した。両抗体はCCR4細胞外領域部分ペプチドに対して同等の結合活性を有していた。

2. 抗CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

実施例2の3項で得られたDG44/CCR4抗体およびMs705/CCR4抗体の*in vitro*細胞傷害活性を以下の様にして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754に記載のヒトCCR4を高発現させたマウス胸腺種細胞EL4細胞株であるCCR4/EL4細胞を、遠心分離操作及び懸濁によりRPMI1640-FCS(5)培地[5%FCSを含むRPMI1640培地(イ

ンピトロジェン社製)]で洗浄した後、RPMI1640-FCS(5) 培地によって 2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い単核球層を分離した。RPMI1640-FCS(5) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて 5×10^6 細胞/mL の濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を $50 \mu\text{L}$ (2.5×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体を各最終濃度 $0.1 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ となるように加えて全量を $150 \mu\text{L}$ とし、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度を測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および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うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液およびエフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了 45 分前に $15 \mu\text{L}$ の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。ADCC 活性を次式により求めた。

$$\text{細胞障害活性(\%)} = \frac{[\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]}{[\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]} \times 100$$

第 7 図には、DG44/CCR4 抗体および Ms705/CCR4 抗体の CCR4/EL4 細胞に対する細胞傷害活性を示した。Ms705/CCR4 抗体はいずれの抗体濃度においても DG44/CCR4 抗体よりも高い ADCC 活性を示した。

実施例 4 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の単糖組成分析

実施例 2 の 3 項で精製した DG44/CCR4 抗体および Ms705/CCR4 抗体の中性糖・アミノ糖組成分析を、以下の様にして行った。

抗体を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、 $2.0 \sim 4.0 \text{ M}$ のトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100°C 、2-4 時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解して Dionex 社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析を行った。CarboPac PA-1 カラム、CarboPac PA-1 ガードカラム (Dionex 社製) を用い、溶離液として $10 \sim 20 \text{ mM}$ 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として 500 mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、第 1 表に示した溶出プログラムで分析した。

第 1 表

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

得ら

れた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を4とした場合の各成分（フコース、ガラクトース、マンノース）の組成比を算出した。

第2表に各抗体の単糖組成比により計算される、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、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を示した。DG44/CCR4抗体ではフコースが結合していない糖鎖の割合が8%であった。一方、Ms705/CCR4抗体ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ100%と見積もられた。

以上の結果より、Ms705/CCR4抗体のN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

第 2 表

抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物のフコースが結合していない糖鎖の割合

抗体名	フコースが結合していない糖鎖の割合 (%)
DG44/CCR4 抗体	8%
Ms705/CCR4 抗体	~100%

実施例5 フコースが結合していない糖鎖を有する抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物の生物活性の解析

本発明の抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物の優位性をさらに明らかにするため、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体組成物と、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子とフコースが結合する糖鎖を有する抗体分子とが混合された抗体組成物との生物活性の比較を行った。具体的には、フコースが結合していない糖鎖を有する抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物であるMs705/CCR4抗体に、フコースが結合する糖鎖を有する抗CCR4ヒト型CDR移植抗体を混合させた抗体組成物の細胞傷害活性の変化を以下のようにして調べた。

(1) 標的細胞溶液の調製

実施例3の2項の(1)に記載の方法に従って行った。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

実施例3の2項の(2)に記載の方法に従って単核球層を分離し、RPMI1640-FCS(5)培地を用いて 4×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

3. ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート(Falcon社製)の各ウェルに、上記(1)で調製した標的細胞溶液を50 μ L(1×10^4 細胞/ウェル)分注した。次いで(2)で調製したエフェクター細胞溶液を50 μ L(2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる)添加した。更に、Ms705/CCR4抗体およびDG44/CCR4抗体をそれぞれ単独で、または両者を混合して加えて全量を150 μ Lとし、37°Cで4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性をLDH-Cytotoxic Test Wako(和光純薬社製)を用いて添付の説明書に従い測定した。ADCC活性は実施例3の2項に記載の方法に従って算出した。

一定量のMs705/CCR4抗体にDG44/CCR4抗体を添加することで、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体の割合を変化させた抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物を調製し、そのADCC活性を測定した。具体的には、3.7ng/mLのMs705/CCR4抗体に0~300ng/mLのDG44/CCR4抗体を添加した抗CCR4ヒト型CDR移植抗体組成物を調製した。調製した抗体組成物のADCC活性を第8図に示した。

3.7ng/mLのMs705/CCR4抗体にさらにMs705/CCR4抗体を添加すると、総抗体濃度の増加に伴ってADCC活性の上昇が観察されたが、3.7ng/mLのMs705/CCR4抗体にさらにDG44/CCR4抗体を添加しても、総抗体濃度が増加するにも関わらず調製した抗体組成物のADCC活性は逆に低下した。このことは、フコースが結合する糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子のADCC活性を阻害することを示している。また、フコースが結合する糖鎖を有する抗体分子とフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子が混合された抗体組成物においても、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合が20%以上の抗体組成物では、該割合が20%未満の抗体組成物に比べ顕著に高いADCC活性を示した。第9図に、10ng/mLのMs705/CCR4抗体サンプルと、10ng/mLのMs705/CCR4抗体に9倍量の90ng/mLのDG44/CCR4抗体を加えた抗体サンプルのADCC活性をグラフとして示した。Ms705/CCR4抗体のADCC活性はDG44/CCR4抗体を加えることで大幅に低下した。Ms705/CCR4抗体とDG44/CCR4抗体の存在比が1対9のまま抗体組成物の抗体濃度を100倍以上に上昇させても、10ng/mLのMs705/CCR4抗体サンプルのADCC活性には及ばなかった。以上のことから、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合しない糖鎖を有する抗体分子のADCC活性を阻害していること、従来の抗体組成物では、本発明の抗体組成物と同等のADCC活性を発揮することはできないことが明らかとなった。

したがって、本発明の抗体組成物によって、従来の抗体組成物では治療できなかった患者を治療することができる。

産業上の利用可能性

本発明によりヒト CCR4 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬提供される。

本発明の抗体組成物は、CCR4 が発現している細胞を傷害する活性が高いので、CCR4 が関連する癌または炎症性疾患等の疾患の治療のための医薬として臨床上有用である。

【配列表フリーテキスト】

配列番号 24-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 25-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 26-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 27-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 28-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 29-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 30-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 31-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 32-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 33-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 34-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 35-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA

請求の範囲

1. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の 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。
2. N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合していない糖鎖である、請求項 1 に記載の抗体組成物。
3. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体組成物。
4. 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 1~39、98~112、176~206 および 271~284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求項 3 に記載の抗体組成物。
5. 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 2~29 番目に存在するエピトープである請求項 3 または 4 項に記載の抗体組成物。
6. 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~29 番目に存在するエピトープである請求項 3~5 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
7. 細胞外領域が、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~25 番目に存在するエピトープである請求項 3~6 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
8. 配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~25 番目を含むペプチドのうち、16、19、20 および 22 番目の少なくとも 1 つのチロシン残基が硫酸化されたペプチドへの結合性が配列番号 36 で示されるアミノ酸配列の 13~25 番目を含むペプチドへの結合性よりも低いことを特徴とする請求項 7 に記載の抗体組成物。
9. ヒト血小板に反応性を示さない請求項 1~8 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
10. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に結合し、CCR4 リガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) の CCR4 への結合を阻害する活性を有さない請求項 1~9 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
11. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に特異的に結合する請求項 1~10 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
12. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す請求項 1~11 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
13. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求項 1~12 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
14. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) 発現細胞が、ヘルパー T 細胞である、請求項 1~13 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
15. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である請求項 12 または 13 に記載の抗体組成物。

16. それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体組成物。

17. それぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体組成物。

18. それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体組成物。

19. 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体組成物。

20. ヒト型キメラ抗体がヒト CC ケモカイン受容体(CCR4)に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、請求項19に記載の抗体組成物。

21. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗体組成物。

22. 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を含む請求項20に記載の抗体組成物。

23. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を含む請求項20～22のいずれか1項に記載の抗体組成物。

24. ヒト型 CDR 移植抗体がヒト CC ケモカイン受容体(CCR4)に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、請求項19に記載の抗体組成物。

25. ヒト CC ケモカイン受容体(CCR4)に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)を含む、請求項24に記載の抗体組成物。

26. ヒト CC ケモカイン受容体(CCR4)に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域(C領域)およびL鎖C領域を含む、請求項24または25に記載の抗体組成物。

27. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAlaから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項24～26のいずれか1項に記載の抗体組成物。

28. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 24～26 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

29. 抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目 Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 24～26 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

30. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列の 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 26、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 24～27 および 29 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

31. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列の 28 番目の Thr および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 26 で示されるアミノ酸配列の 2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 24～26、28 および 29 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

32. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 24～28、29～31 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

33. 抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 26、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 24～26、29～31 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

34. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 24、25、27、28、29、30、31 および 32 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号 26、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求項 24～26、32 および 33 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

35. 抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号 27 または 28 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 24～26 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

36. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

37. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、請求項 36 に記載の形質転換体。

38. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素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細胞である、請求項 36 に記載の形質転換体。

39. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4, 6-デヒドラターゼ (GMD) および GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) からなる群から選ばれる酵素である、請求項 37 または 38 に記載の形質転換体。

40. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求項 39 に記載の形質転換体。

(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 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

41. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 39 に記載の形質転換体。

(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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 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-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

42. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求項 39 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 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 とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

43. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 39 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 4 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 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-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

44. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求項37または38に記載の形質転換体。

45. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項44に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

46. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項44に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号7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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号8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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号7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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号8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 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

47. 形質転換体がFERM BP-8467である請求項46に記載の形質転換体。

48. 宿主細胞が、下記の(a)~(i)からなる群から選ばれる細胞である請求項36~47のいずれか1項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) 抗体を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。

49. 請求項36～48のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求項1～35のいずれか1項に記載の抗体組成物の製造方法。

50. 請求項49に記載の製造方法により得られる、請求項1～35のいずれか1項に記載の抗体組成物。

51. 請求項1～35および請求項50のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

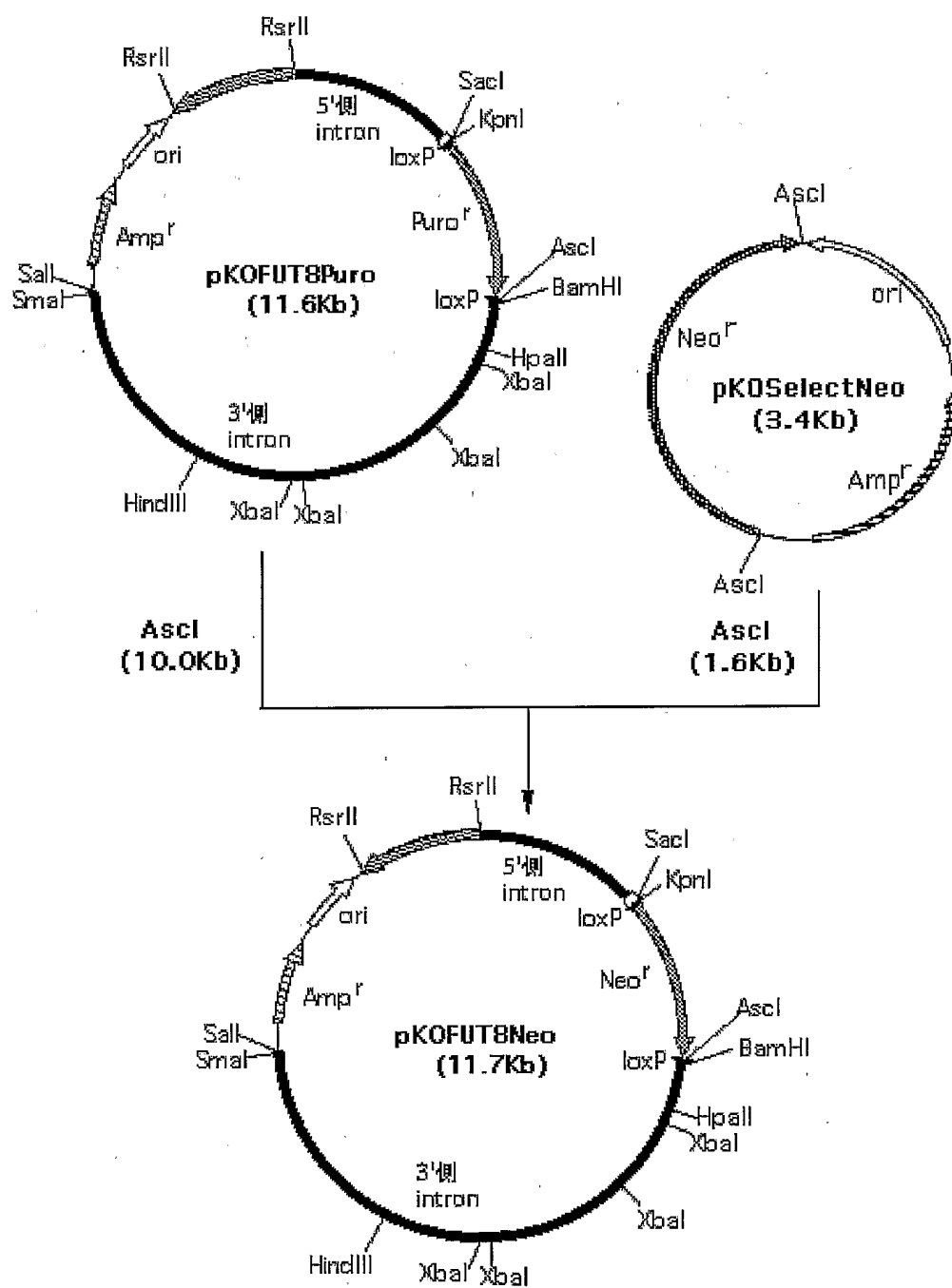
52. 請求項1～35および50のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) 関連疾患の治療薬。

53. ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) 関連疾患が、癌または炎症性疾患である請求項52に記載の治療薬。

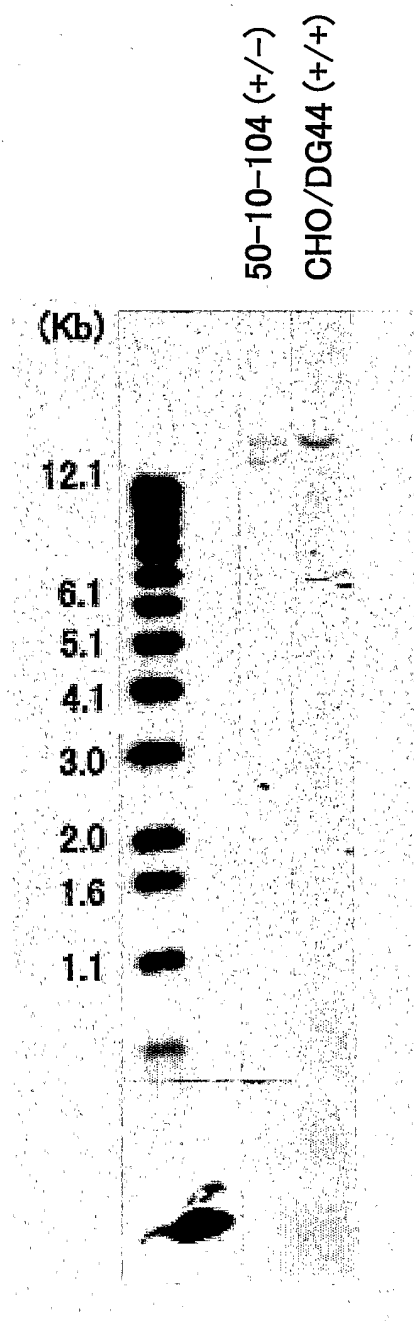
54. 請求項1～35および50のいずれか1項に記載の抗体組成物を患者に投与することを特徴とする、ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) 関連疾患の治療方法。

55. ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) 関連疾患の治療薬を製造するための請求項1～35および50のいずれか1項に記載の抗体組成物の使用。

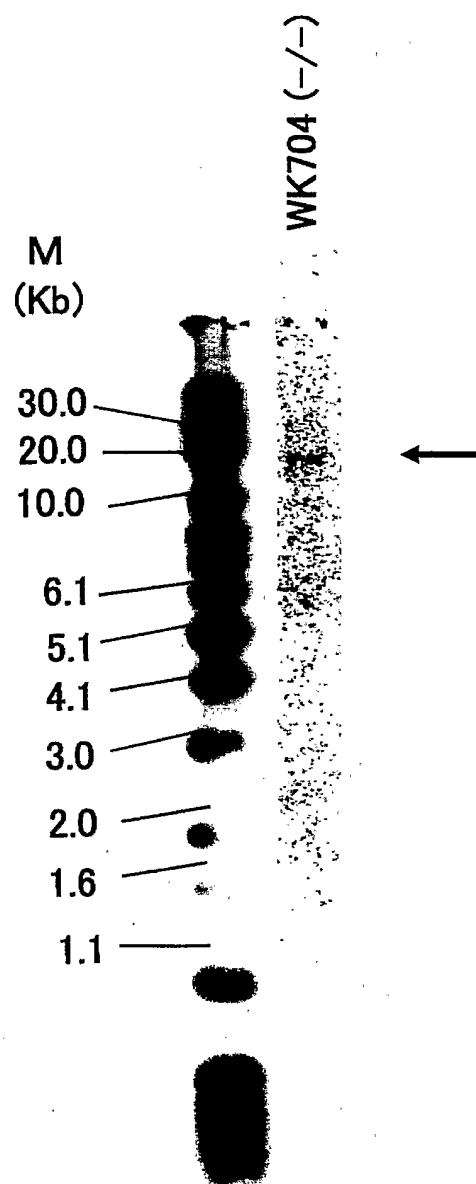
第 1 図



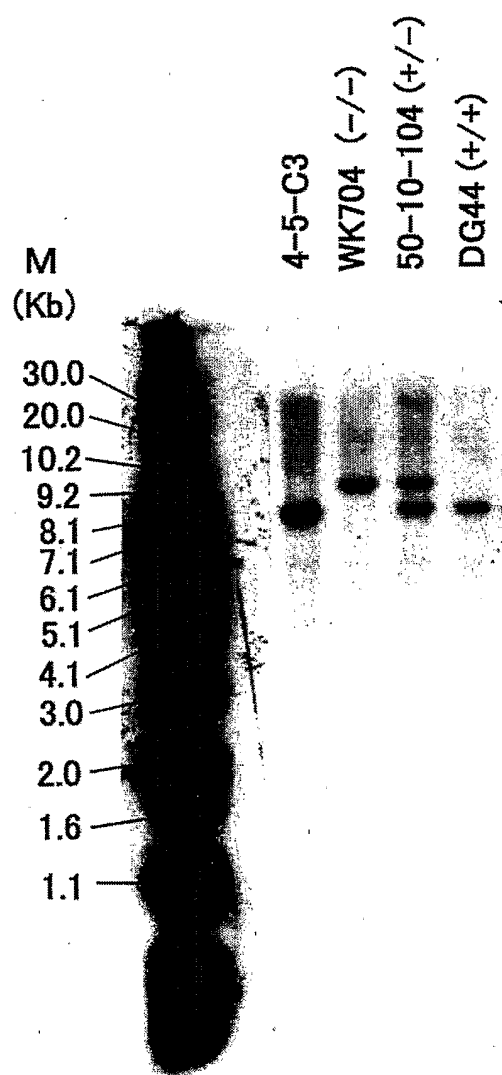
第 2 図



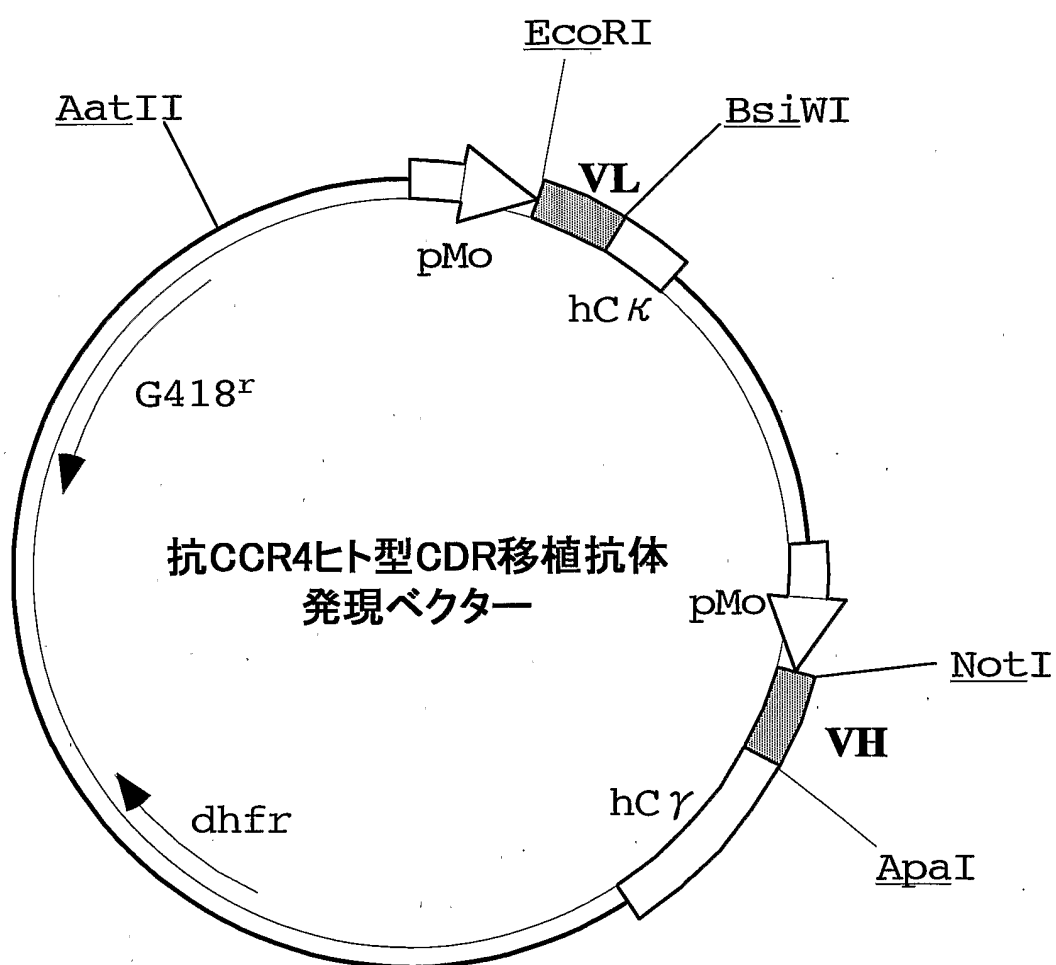
第 3 図



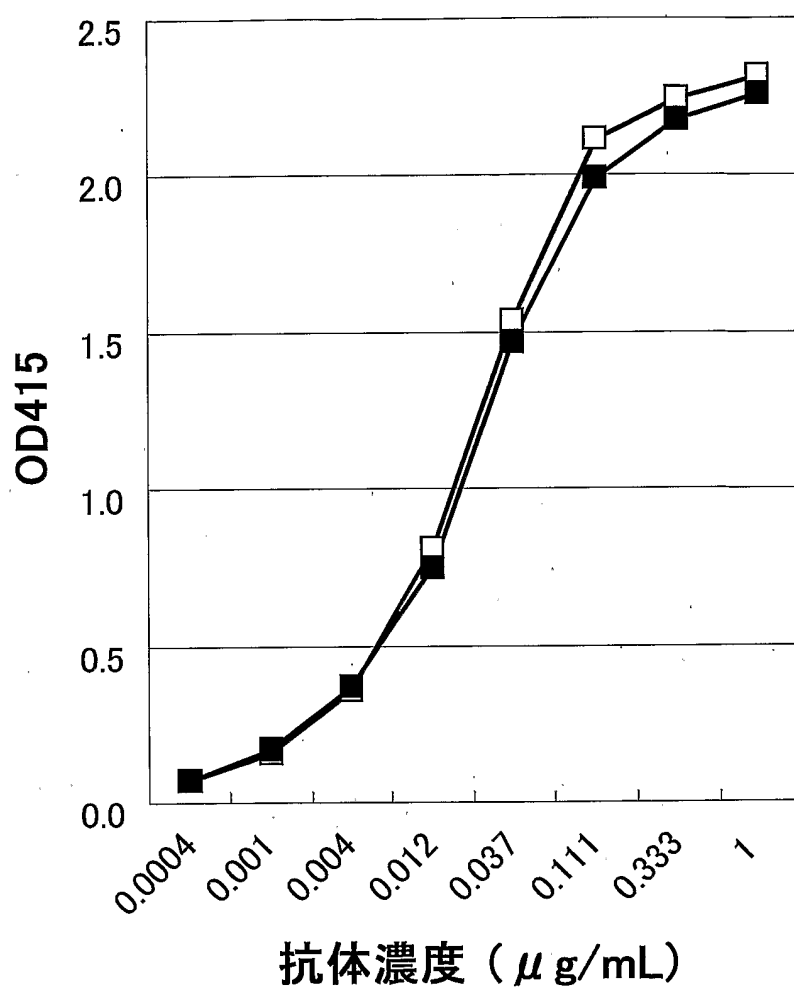
第 4 図



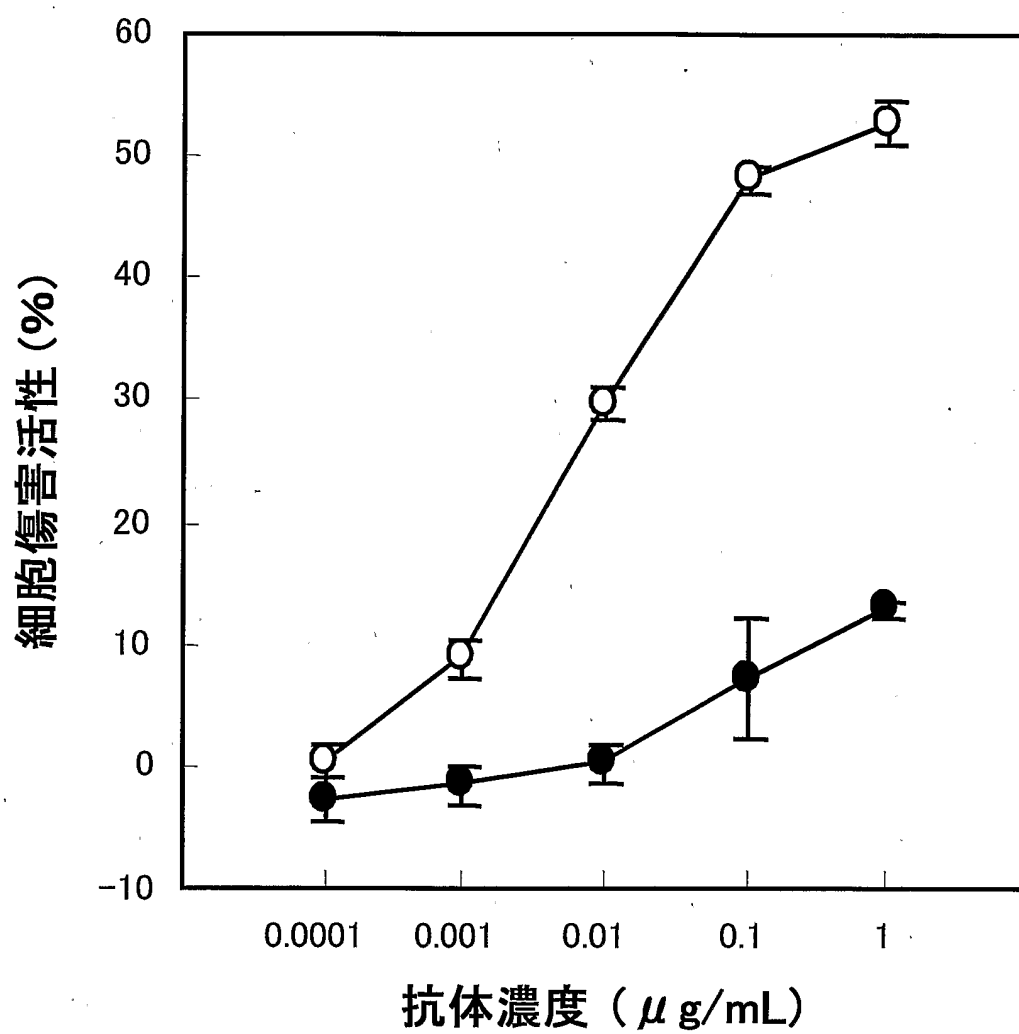
第5図



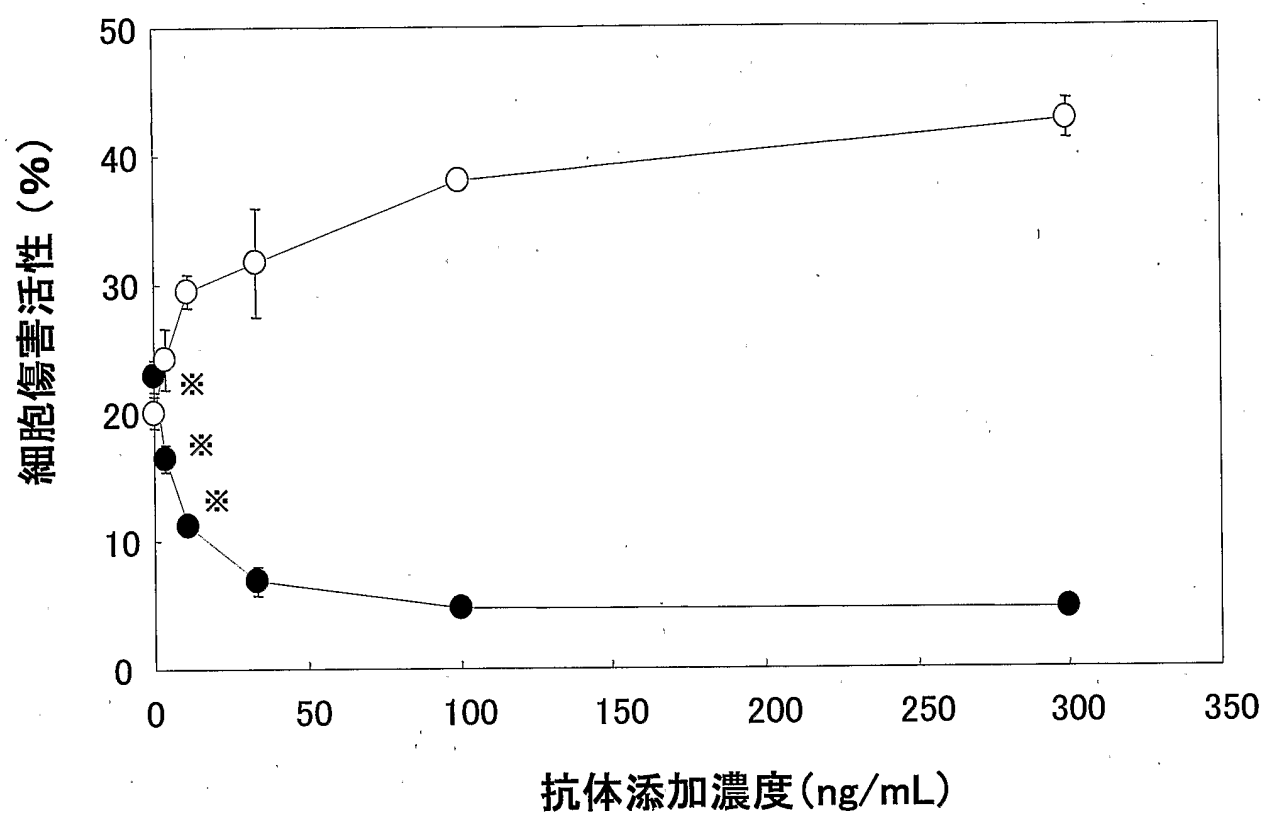
第 6 図



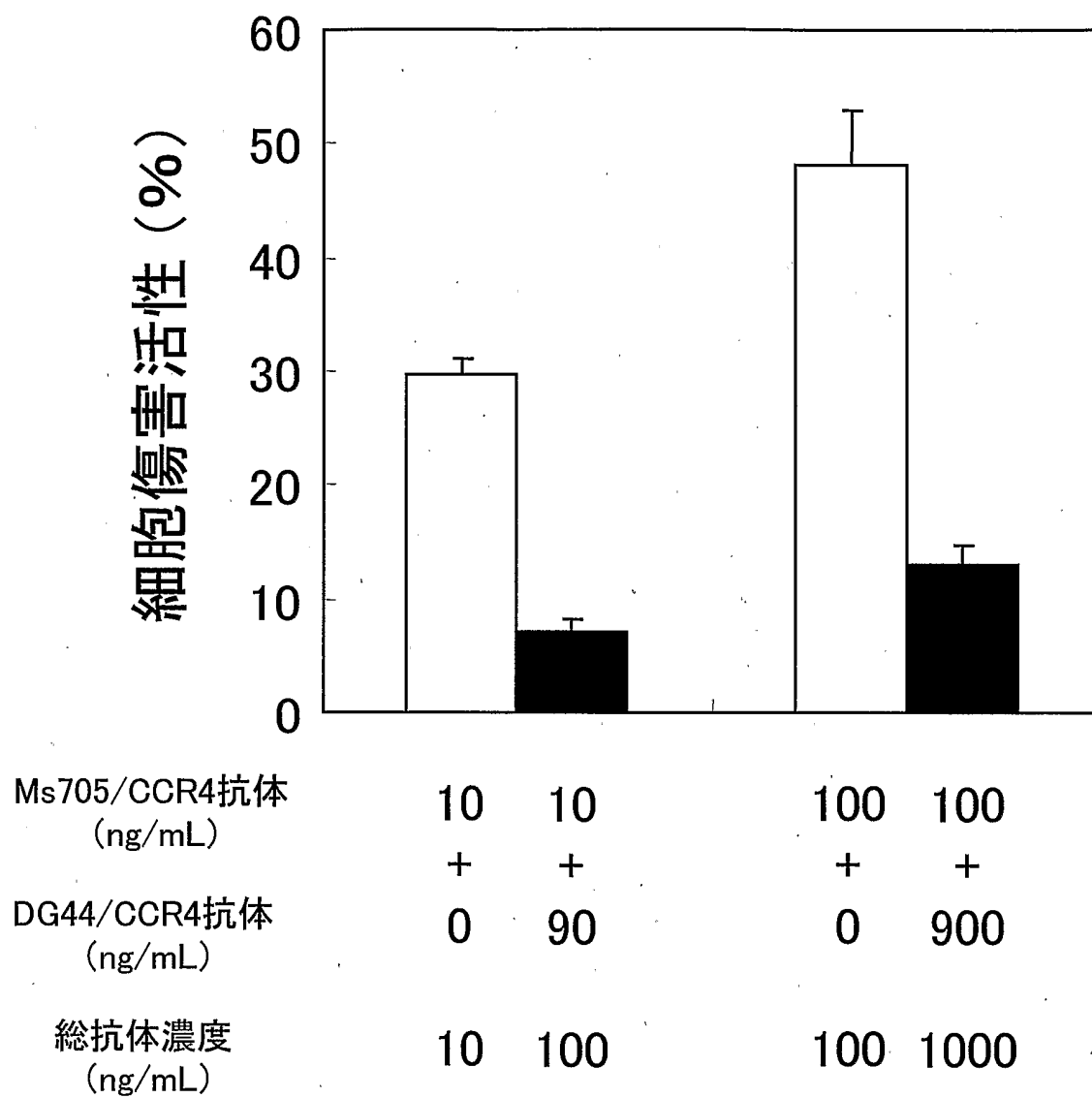
第7図



第8図



第9図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> CCR4-specific antibody composition

<130> 11617WO1

<150> JP2003-350162

<151> 2003-10-08

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 1

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48

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

1

5

10

15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr

20

25

30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45
 gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192
 Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60
 att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg 240
 Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80
 aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc 288
 Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95
 atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc 336
 Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 100 105 110
 cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat 384
 His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 115 120 125
 gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt 432
 Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 130 135 140
 ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga 480
 Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 145 150 155 160
 aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg 528
 Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175
 tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac 576

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 180 185 190

ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat 624
 Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 195 200 205

cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc 672
 His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 210 215 220

cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg 720
 Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 225 230 235 240

gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc 768
 Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255

gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc 816
 Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 260 265 270

ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca 864
 Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 275 280 285

ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat 912
 Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 290 295 300

gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat 960
 Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 305 310 315 320

ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335

tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 340 345 350

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 355 360 365

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaatc gcgagacatg gactatggtg 1159
 Asn Pro Asn Ala
 370

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagacat cgaccataaa ccctcgactg 1219
 cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
 actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
 caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaa 1399
 ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
 aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 2

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr

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

225 230 235 240
 Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255
 Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 260 265 270
 Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 275 280 285
 Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 290 295 300
 Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 305 310 315 320
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 340 345 350
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 355 360 365
 Asn Pro Asn Ala
 370

<210> 3

<211> 1316

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 3

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
tggactggtg gaaccctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gatcctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgtggtc ttaccgggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctacgcttcc gaggtgggca ctgcaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggc cctacttcca gcagcatggc tgcacattca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcctc cataaggtgc atctggccaa gagtaatgtt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaac ccaaggaggc agttcatcta ctactggac ctacccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggag aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcttggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080

tcagctggca atgccagtc agtaggctgc agtctcatca ttgcttgtc aagaactgag 1140

gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200

atccagtagg gccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca cctgtttgt 1260

ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 4

<211> 321

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly

20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu

35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr

50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile

65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn

85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys

100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 5

aacagaaact tatttttctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtcgg tgttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420

ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480

ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540

catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600

tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gaggggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720

agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggctctg gcctctccac tggacactgg tcagggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggctgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtgggtg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaaacttc attctttaga tgacatctac ttttttgag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaaet aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800

cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 6

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660

ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggt gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagt agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcagggtgaa 840
gtaaatacaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccacccctgg 900
cctccttact taccactggc tgttcagaa gaccttgag accgactcct aagagtccat 960
ggtgacctg cagtgtgtg ggtgtcccag ttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagt ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cagcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcgggtgtg atcctggata tacactttct ctacaggct 1380
gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcac ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
ggccaaaatg cccacaatca gattgtgtt tatcctcaca aacctgaac tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 7

<211> 575

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
165	170	175	
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
180	185	190	
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg			
195	200	205	
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu			
210	215	220	
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr			
225	230	235	240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
245	250	255	
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu			
260	265	270	
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val			
275	280	285	
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
290	295	300	
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His			
305	310	315	320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
325	330	335	
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys			

340 345 350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
385 390 395 400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
405 410 415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510
His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn

530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

 <210> 8
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 8
 Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 9

<211> 383

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 9

gttaactggg gctcttttaa accctgaatt tttctaaatc cccacctcca agagtttggt 60

ttaaactgat ttttttaatg aatacctttt gaagaataga gcattgtctc atcatgcaaa 120

gcttctcagg gattcagcta gcatgttgaa gaaacataag ggtgttaa at tgttgtcac 180

aagtgetgaa taaatattga cgtagtcttc agctattcta tactggaagt agatgatatt 240

ctcattggaa attctgtag gaagtaaccc ttctgtctt cttacctgca tagaatccca 300

ggatataaaa ctgtgcttg tcgcccttgc cattgtctct cactgggtggc ctttattgca 360

tctcatatct gccttctctt tcc 383

<210> 10

<211> 504

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 10

taagaattcc tgtgccagc tgtatgtgag gctctctgca ggtgtaggga tgtttctgct 60

ttctttctgc acatgcttca cagctgaagt cctttgggtg tgagattgac attcagatag 120

actaaagtga ctggacttgt tgggaaacat actgtatgca ttattgccgt tgcctccagg 180

tgaaattaac acctcattca ccaatccctg ttcattccaa ctttctaccc acatcacttt 240

aaatagaaat tagaccaat atgactcctt ttttcctaag ctgtttatag agattgtgct 320

ggagcagtga gcttttgtgt ttgtttgttt gttttgtaat tttcccatg aaaatttctc 300

taaactcaaa cctaagaggg aaaaaaaaaa aacagactta tatgtgccac acttgtaaaa 360

aaaaatcatg aaagatgtat atgatatattt taaacagttt gaatattaag atcacaattt 420

ctatttttaa aacaatcttg tttacatat caatcaccca attcccttgc ctteccatcc 480

tcccattecc cccactgate cccc

504

<210> 11

<211> 120

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 11

atgaatgttc attctttggg tatatgccca agagtagaat tgctaaatat tgaggtagac 60

tgattcccat tttcttgagg agtcgccata ttgatttcca aagtgactgt acaagttaac 120

<210> 12

<211> 274

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 12

aggcactagg taaatatttt tgaagaaaga atgagtatct cctatttcag aaaaactttt 60

attgacttaa atttaggata tcagaattag aaaacagtaa aaatttatag gagagttttt 120

aatgaatggt attttaaggt tccatacaaa tagtaattaa aacttacaca aactatttgt 180

agtaatgatt cagtctggta taccctgatg agcattatac acttttaaact tctttttgta 240

aatTTTTTTta ttagttcaaa ttaggaacaa gctt 274

<210> 13

<211> 9196

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 13

tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60

ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120

attacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctatit tggtatacat ttttgcgtaa 180

attattcttt ttgaaagtt ttgtgtcca taatagtcta gggaacata aagttataat 240

tttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300

ggtatgtaat agcttcaaca tgtggatga tagaattttt cagtgtata taagttgta 360
cagcaaagtg ttattaatc atagtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagcccaaaa tctgttcatt 480
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
ggtccaagaa tggagttatg taagggaat tacaagtgag agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgacctag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatt 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tttttttttt gccacatgca gcttgcctt 780
atgattttat acttggtgta ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagtggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggc aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggtt tgagaaagg agaaggtaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgctt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagt agtatcccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctgta cattctttg tagagaattt attttcttg ggttttgtg cattaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttattttg ggccatgtg tcaaagtata 1380

tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcataatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttggtta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattgggt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgattt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta attttgctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460

attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gggggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaataactcaa ggatttgatg aaatactgtg ctgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtga tccggaatgt gggttaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttgattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgttac tgcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagacttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540

tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aatgtctat ggatgataat gttgtatggt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tctcgggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcaggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
caggagggt tatgaaagt gtgtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtag 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttcta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gtcctgaat aatcactgaa ttttctccat gtccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatctgtt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagtggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620

cgatttccta tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatctttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat ttttaaggta taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tggctcttta agacacttct tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttatct taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatctt caaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700

gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctattttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgattttacg tgtttgcca aaatcttggt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggtatatat ttctatattc tgtatttttt tctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgcccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaa ttaatttggt 6300
ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
attttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780

cttgttttct gtgaattaac ccccttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
aacaagtta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcataac cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaaact gatttagaca acctctcatt gagaactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatggt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
aataggtttt ttagtggtcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgtatct tcaccccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaat agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccct cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctcccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggt 7680
cccaaagttc atttggttac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860

gtttccccag ccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgt tagctgtggg tgtctgcac tgcttccac agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct ctigattatt gcttagattg ttagttgggg tcaacctgt aggtctcttg 8100
acagtgcag aattctcttt aaacctataa tggtccctc tgtgtggta tcccttttct 8160
tgctctcac cgttctccc ctgactagat ctctctgct cctcatgtc tctctcccc 8220
tcccttctc ccttctctt tcttctaact ccctctccc tccaccacg atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcct attttagcaa aaccttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta taccaggtt attttgcta gtattgtat gtgtttggt agtgttttta 8400
acctaatg acatgtatc ttatattag acacagattt aaatattga agttttttt 8460
ttttttttt ttaaagattt atttatttt tatgtctct gcctgcatc cagaagagg 8520
caccagatc cattcaagt ggttgtgac caccatgtg ttgctggaa ttgaactcag 8580
gacctctga agaacagtc gtgctctta ccgtgagc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttcttta aagaggatg cagtgcaca ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt ttagccatt tatatgtaat gctgttaca ggtttacatt ttcttttacc 8760
ttgctaaatt tcttccctg ttgtctcac tctattttt gtctgttga ttatataggc 8820
ttttatttt ctgtttttac agtaagtat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgtgacct ggtcttgcc agaagaaggt 8940

gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000

aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060

caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120

atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180

aggatcccaa gagctc 9196

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Asn Tyr Gly Met Ser

1

5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr

1 5

<210> 20

<211> 414

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(414)

<400> 20

atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys

20

25

30

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe

35

40

45

agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu

50

55

60

gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca 240

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro

65

70

75

80

gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85

90

95

tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata 336

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
 100 105 110

tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg 384
 Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
 115 120 125

ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca 414
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 22

<211> 396

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(396)

<400> 22

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45

gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60

ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100

105

110

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu

115

120

125

gaa atc aga cgg

396

Glu Ile Arg Arg

130

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile

20

25

30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg
 100 105 110

Arg

<210> 24

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 33

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile

20

25

30

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

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 34

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile

```

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

```

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 36

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
 1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
 20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
 35 40 45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
 50 55 60

Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
 85 90 95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
 100 105 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
 115 120 125

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
 130 135 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
 165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15

Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Pro Cys

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25.

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 43

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 44

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

gtgagtccat ggctgtcact g

21

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46

cctgacttgg ctattctcag

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,
A61P35/00, A61P29/00

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.Cl⁷ C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,
A61P35/00, A61P29/00

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)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-53, 55
Y	WO 03/18635 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 06 March, 2003 (06.03.03), & US 2003/0175273 A1 & AU 2002338015 A1 & EP 1449850 A1 & KR 2004044492 A & BR 200212266 A	1-53, 55

☒ 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 application or patent 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
12 January, 2005 (12.01.05)

Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YAMANE-OHNUKI, N. et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity., Biotechnol. Bioeng., 05 September, 2004 (05.09.04), Vol.87, No.5, pages 614 to 622	1-53,55
P,X	WO 03/85107 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-53,55
P,X	WO 03/85118 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-53,55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015322

Box No. II 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.: 54
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 54 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
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 No. III 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:

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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 16/28, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 29/00

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. Cl⁷ C07K 16/28, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 29/00

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)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

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
Y	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002. 04. 18 & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-53, 55
Y	WO 03/18635 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 03. 06 & US 2003/0175273 A1 & AU 2002338015 A1 & EP 1449850 A1 & KR 2004044492 A & BR 200212266 A	1-53, 55

☒ 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

01. 2. 2004

国際調査を完了した日

12. 01. 2005

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	YAMANE-OHNUKI, N. et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol. Bioeng. 2004. Sep. 5, Vol. 87, No. 5, p. 614-622	1-53, 55
P, X	WO 03/85107 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 10. 16 & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-53, 55
P, X	WO 03/85118 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 10. 16 & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-53, 55

第Ⅱ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 54 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、

請求の範囲54は、人の身体の治療方法に関するものである。

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Ⅲ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。

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。