

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02827570.5

C12N 5/10

C12N 15/00

A01K 67/027

A01H 5/00

C07K 16/28

A61K 39/395

A61P 35/00

[43] 公开日 2005 年 5 月 18 日

[11] 公开号 CN 1617922A

[22] 申请日 2002.12.25 [21] 申请号 02827570.5

[30] 优先权

[32] 2001.12.25 [33] JP [31] 392753/2001

[32] 2002.4.9 [33] JP [31] 106948/2002

[32] 2002.11.1 [33] JP [31] 319975/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2002/013534 2002.12.25

[87] 国际公布 WO2003/055993 日 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.26

[71] 申请人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 设乐研也 樱田干子 内田和久

新川丰英 佐藤光男 中野了辅

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 龙 淳 彭益群

A61P 37/00

权利要求书 10 页 说明书 106 页 序列表 56 页
附图 22 页

[54] 发明名称 与 CD20 特异结合的抗体组合物

[57] 摘要

本发明提供一种特异结合于 CD20，包含抗体分子的抗体组合物，其中抗体分子有结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链，产生抗体组合物的方法，和包含抗体组合物的药剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种产生抗体组合物的细胞，所述抗体组合物包含与 CD20 特异结合，并具有与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子，其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多。

2. 根据权利要求 1 所述的细胞，其中岩藻糖不与 N-糖苷键合的复合糖链结合的糖链中岩藻糖的 1 位不与还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位通过 α 键结合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的细胞，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶活性降低或消失。

4. 根据权利要求 3 所述的细胞，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的酶：

(a) GMD (GDP-甘露糖 4,6-脱水酶)；

(b) Fx (GDP-酮-6-脱氧甘露糖 3,5-差向异构酶, 4-还原酶)；

(c) GFPP (GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶)。

5. 根据权利要求 4 所述的细胞，其中 GMD 是以下(a)或(b)中的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 GMD 活性的蛋白质的 DNA。

6. 根据权利要求 4 所述的细胞，其中 GMD 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列, 其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加, 有 GMD 活性的蛋白质;

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列, 有 GMD 活性的蛋白质。

7. 根据权利要求 4 所述的细胞, 其中 FX 是以下(a)或(b)中的 DNA 编码的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA;

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 FX 活性的蛋白质的 DNA。

8. 根据权利要求 4 所述的细胞, 其中 FX 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列的蛋白质;

(b) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列, 其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加, 有 FX 活性的蛋白质;

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列, 有 FX 活性的蛋白质。

9. 根据权利要求 4 所述的细胞, 其中 GFPP 是以下(a)或(b)中的 DNA 编码的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA;

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 GFPP 活性的蛋白质的 DNA。

10. 根据权利要求 4 所述的细胞, 其中 GFPP 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列的蛋白质;

(b) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列, 其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加, 有 GFPP 活性的蛋白质;

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源

性的氨基酸序列，有 GFPP 活性的蛋白质。

11. 根据权利要求 3 所述的细胞，其中与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶是 α 1,6-岩藻糖转移酶。

12. 根据权利要求 11 所述的细胞，其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是选自以下(a)、(b)、(c)和(d)中的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA；

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA；

(d) 包括与由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA。

13 根据权利要求 11 所述的细胞，其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是选自以下(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(c) 包括由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或增加，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；

(d) 包括由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或增加，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；

(e) 包括与由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列具有至少 80%同源性的氨基酸序列，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；

(f) 包括与由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列具有至少 80%同源性的氨基酸序列，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质。

14. 根据权利要求 3 到 13 中任何一项所述的细胞，其中通过选自

以下(a)、(b)、(c)、(d)和(e)中的技术使酶活性降低或消除：

- (a) 以编码酶的基因为目标的基因断裂技术；
- (b) 导入编码酶的基因的显性失活突变体的技术；
- (c) 酶中导入突变的技术；
- (d) 抑制编码酶的基因转录或翻译的技术；
- (e) 选择对识别糖链的凝集素有抗性的细胞系的技术，所述凝集素识别岩藻糖的 1 位通过 α 键与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位结合。

15. 根据权利要求 1 到 14 中任何一项所述的细胞，其中所述细胞是至少对一种凝集素有抗性的细胞，其中凝集素识别岩藻糖的 1 位通过 α 键与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位结合。

16. 根据权利要求 1 到 15 中任何一项所述的细胞，其中所述细胞选自以下(a)到(j)：

- (a) 来自中国仓鼠卵巢组织的 CHO 细胞；
- (b) 大鼠骨髓瘤细胞细胞系，YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞；
- (c) 小鼠骨髓瘤细胞细胞系，NS0 细胞；
- (d) 小鼠骨髓瘤细胞细胞系，SP2/0-Ag14 细胞；
- (e) 来源于叙利亚仓鼠肾组织的 BHK 细胞；
- (f) 猴 COS 细胞；
- (g) 产生抗体的杂交瘤细胞；
- (h) 人白血病细胞系，Namalwa 细胞；
- (i) 胚胎干细胞；
- (j) 受精卵细胞。

17. 一种转基因非人动物或植物或它们的后代，其中导入与 CD20 特异结合，与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子，转基因非人动物或植物或它们的后代产生包括抗体分子的抗体组合物，其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不

与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多。

18. 根据权利要求 17 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中岩藻糖不与 N-乙酰葡萄糖胺连接的糖链是岩藻糖的 1 位不与 N-糖苷键合的糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位通过 α 键连接的糖链。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中基因组被修饰，这样与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或在岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的 6 位的糖链修饰有关的酶活性降低。

20. 根据权利要求 17 或 18 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶的基因被敲除。

21. 根据权利要求 19 或 20 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，是选自以下(a)、(b)或 (c)中的酶：

- (a) GMD (GDP-甘露糖 4,6-脱水酶)；
- (b) Fx (GDP-酮-6-脱氧甘露糖 3,5-差向异构酶, 4-还原酶)；
- (c) GFPP (GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶)。

22. 根据权利要求 21 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 GMD 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质：

- (a) 包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA；
- (b) 包括与由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 GMD 活性的蛋白质的 DNA。

23. 根据权利要求 21 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 Fx 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA;

(b) 包括与由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 FX 活性的蛋白质的 DNA。

24. 根据权利要求 21 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中 GFPP 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA;

(b) 包括与由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 GFPP 活性的蛋白质的 DNA。

25. 根据权利要求 19 或 20 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中岩藻糖的 1 位通过 α 键与 N-糖苷键合的糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位连接的糖链修饰相关的酶是 α 1,6-岩藻糖转移酶。

26. 根据权利要求 25 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是由选自以下(a)、(b)、(c) 和 (d)中的 DNA 编码的蛋白质:

(a) 包括由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA;

(b) 包括由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA;

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA;

(d) 包括与由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA。

27. 根据权利要求 17 到 26 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中转基因非人动物是从牛、绵羊、山羊、猪、马、小鼠、大鼠、鸡、猴和兔中选择的动物。

28. 根据权利要求 1 到 16 中任何一项所述的细胞, 其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子:

- (a) 人抗体；
- (b) 人源化抗体；
- (c) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的抗体片段；
- (d) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的融合蛋白。

29. 根据权利要求 1 到 16 和 28 中任何一项所述的细胞，其中抗体分子属于 IgG 类。

30. 根据权利要求 1 到 16, 28 和 29 中任何一项所述细胞，其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3，和/或抗体重链的互补决定区 1、2 和 3，所述轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 代表的氨基酸序列，所述抗体重链的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 代表的氨基酸序列。

31. 根据权利要求 1 到 16、28、29 和 30 中任何一项所述细胞，其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区，所述轻链可变区包括由 SEQ ID NO: 12 代表的氨基酸序列，所述重链可变区包括由 SEQ ID NO: 14 代表的氨基酸序列。

32. 根据权利要求 17 到 27 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子：

- (a) 人抗体；
- (b) 人源化抗体；
- (c) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的抗体片段；
- (d) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的融合蛋白。

33. 根据权利要求 17 到 27 和 32 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中抗体分子属于 IgG 类。

34. 根据权利要求 17 到 27、32 和 33 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互

补决定区 1、2 和 3 和/或重链的互补决定区 1、2 和 3，所述轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 代表的氨基酸序列，所述重链的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 代表的氨基酸序列。

35. 根据权利要求 17 到 27, 32, 33 和 34 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区，所述轻链可变区包括由 SEQ ID NO: 12 代表的氨基酸序列，所述重链可变区包括由 SEQ ID NO: 14 代表的氨基酸序列。

36. 一种抗体组合物，所述抗体组合物是根据权利要求 1 到 16 和 28 到 31 中任何一项所述的细胞产生的。

37. 一种抗体组合物，所述抗体组合物通过饲养根据权利要求 17 到 27 和 32 到 35 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代获得的。

38. 一种包含与 CD20 特异结合，具有与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子的抗体组合物，其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多

39. 根据权利要求 38 所述的抗体组合物，其中不与岩藻糖结合的糖链是岩藻糖的 1 位不与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位通过 α 键相连的糖链。

40. 根据权利要求 38 所述抗体组合物，其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子：

- (a) 人抗体；
- (b) 人源化抗体；
- (c) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的抗体片段；
- (d) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的融合蛋白。

41. 根据权利要求 38 到 40 中任何一项所述的抗体组合物, 其中抗体分子属于 IgG 类。

42. 根据权利要求 38 到 41 中任何一项所述的抗体组合物, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3, 和抗体重链的互补决定区 1、2 和 3, 所述抗体轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 分别包括由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 代表的氨基酸序列, 所述抗体重链的互补决定区 1、2 和 3 分别包括由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 代表的氨基酸序列。

43. 根据权利要求 38 到 42 中任何一项所述的抗体组合物, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区, 所述轻链可变区包括由 SEQ ID NO: 12 代表的氨基酸序列, 所述重链可变区包括由 SEQ ID NO: 14 代表的氨基酸序列。

44. 一种产生根据权利要求 36、38 到 43 中任何一项所述的抗体组合物的方法, 所述方法包括培养权利要求 1 到 16 和 28 到 31 中任何一项所述的细胞, 在培养基中形成和积累抗体组合物, 从培养基中回收抗体组合物。

45. 一种产生根据权利要求 36、38 到 43 中任何一项所述的抗体组合物的方法, 所述方法其中包括饲养权利要求 17 到 27 和 32 到 35 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 从饲养的动物或植物中分离出组织或体液, 和从分离的组织或体液中回收抗体组合物。

46. 一种根据权利要求 36 到 43 中任何一项所述的抗体组合物作为活性成分的药物。

47. 一种治疗与 CD20 相关疾病的制剂, 所述制剂包含根据权利要求 36 到 43 中任何一项所述的抗体组合物作为活性成分。

48. 根据权利要求 47 所述的试剂，其中与 CD20 相关的疾病是癌症或免疫疾病。

与 CD20 特异结合的抗体组合物

5 技术领域

本发明涉及一种用于治疗与 CD20 阳性细胞相关的疾病如 B 细胞淋巴瘤等的抗体组合物，生产抗体组合物的细胞，以及应用细胞生产抗体组合物的方法。

10 背景技术

因为在血液中抗体具有较高的结合活性，结合特异性以及高的稳定性，所以已经尝试抗体应用于诊断，预防和治疗不同的人类疾病 [*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications (单克隆抗体: 原理与应用)*](*单克隆抗体: 原理和应用*), Wiley-Liss, Inc., 第 2.1 章 (1995))。同时，用基因重组技术尝试生产人源化抗体例如人嵌合抗体或者来自于非人动物抗体的人互补决定区（以下称为“CDR”）-移植抗体。人嵌合抗体是一种抗体，其抗体可变区域（以下称为“V 区域”）是来自于非人动物的抗体，而其恒定区（以下称为“C 区”）是来自于人的抗体。人 CDR-移植的抗体是一种抗体，其中人抗体的 CDR 被来自于非人动物的抗体的 CDR 替换。

已经发现来自于哺乳动物的抗体存在五类，即是 IgM, IgD, IgG, IgA 和 IgE。由于它们具有如在血液中半衰期长，不同的效应功能等的功能特性，人的 IgG 类抗体主要用于诊断，预防和治疗不同的人类疾病 [*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications (单克隆抗体: 原理和应用)*], Wiley-Liss, Inc., 第 2.1 章(1995)]。人 IgG 类抗体进一步分为以下 4 个亚类：IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4。作为 IgG 类抗体的效应功能，对抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性（以下称为“ADCC 活性”），和补体依赖性细胞毒活性（以下称为“CDC 活性”）已经进行了大量的研究，而且已经报导在人 IgG 类抗体中，IgG1 亚类具有最高的 ADCC 活性和 CDC 活性 [*Chemical Immunology (化学免疫学)*, 65,

88 (1997)]。实际上, 已经报导, 尽管发现在猴中施用 IgG1 亚类的抗-CD20-嵌合抗体时, 耗损了 CD20 阳性 B 细胞, 但是当使用 IgG4 类抗体时检测不到该耗损。基于以上的观点, 在用于治疗的商业化抗体中, 绝大多数需要高效应功能表达其效应的抗肿瘤人源化抗体是人 IgG1 亚类抗体。

CD20, 也称作 Bp35, 是大约 35kDa 的多肽, 而且通过单克隆抗体确定为人 B 淋巴细胞特异性的抗原 B1 [*J.Immunol.* (免疫学杂志), 125,1678(1980)]。认为 CD20 是一个四次跨膜的分子, 功能为钙通道, 并且与 B 细胞的活化, 增殖和分化有关[*Immunology Today* (今日免疫学), 15, 450 (1994)]。CD20 的表达限制在前体 B 细胞到成熟的 B 细胞的阶段, 而且 CD20 在未分化的细胞和浆细胞中不表达。并且, 因为 CD20 具有在 90% 或更多的 B 细胞非-何杰金淋巴瘤中表达, 并且甚至当抗体结合时也并不内化进入细胞的特性, 所以长期以来尝试通过抗-CD20 抗体治疗 B 细胞淋巴瘤[*Blood* (血液), 69, 584 (1987)]。然而, 因为早期阶段使用鼠的单克隆抗体, 在人体中导入人抗鼠抗体(HAMA, 人抗鼠抗体), 其缺乏效应功能, 因此限制了其治疗效应。相应的, 应用基因重组技术尝试用人 IgG1 亚类来制备鼠抗体的嵌合抗体[*J.Immunol.* (免疫学杂志), 139, 3521 (1987), WO 88/04936]。此外, 通过用猴子进行的测试已经确定一种嵌合抗体 IDEC-C2B8, 使用鼠单克隆抗体 2B8 制备的人 IgG 亚类, 具有甚至在活体中耗尽 CD20-阳性细胞的活性[*Blood* (血液), 83, 435 (1994), WO 94/11026], 而且该抗体经过临床测试在美国于 1997 年 11 月投放市场命名为 RituxanTM (由 IDEC/Genentech 生产, 也称为 Rituximab, 以下称为“RituxanTM”)。

通过对低复发性的和滤泡性的淋巴瘤的 166 个病例给予 375 毫克 /m²/周的剂量 4 周, 美国对 RituxanTM 已经进行了三期研究, 有效率为 48% (完全康复 6%, 部分好转 42%) [*J. Clin. Oncol.*, 16, 2825 (1998)]。对于 RituxanTM 的作用机理, 认为除了它的 ADCC 活性和 CDC 活性之外, 它还具有通过交联 CD20 在细胞中诱导凋亡的活性。[*Current Opinion in immunology* (免疫学新观点), 11, 541(1999)]。关于 CDC 活性, 由于敏感性依赖于目标 B 淋巴瘤细胞而不同, 已经讨论了相对于其对照, 通过抑制补体抑制分子 CD55 和 CD59 的功能来增加 RituxanTM

治疗作用的可能性[*Current Opinion in immunology* (免疫学新观点), 11, 541(1999)]。然而也有报道在病人肿瘤细胞中这些抑制分子的表达和 CDC 活性的体外敏感性并不总是与临床结果相关[*Blood* (血液), 98, 1352 (2001)]。此外, 使用人 B 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞移植的模型鼠实验表明, 经由抗体受体的 ADCC 活性(在下文中, 抗体受体称作 FcγR) 5 对于抗肿瘤效应是重要的[*Nature Medicine* (天然药物), 6, 443 (2000)]。

已经实验了 Rituxan™ 和化学疗法 (CHOP, 环磷酰胺, 盐酸阿霉素, 长春新碱, 强的松) 的联合使用, 而且报导 II 期研究中, 在低复发性的和滤泡性的淋巴瘤的 40 个病例中效率为 95% (完全康复 55%, 10 部分缓解 45%), 但是具有 CHOP 引起的副作用[*J Clin. Oncol.*, 17, 268 (1999)]。此外, 放射性同位素标记的抗体例如 Zevalin (由 IDEC 生产) 和 Bexxar (由 Corixa 生产) 已经开发为用于治疗的其它的抗-CD20 抗体, 但是由于它们都是鼠抗体以及在其中使用了放射性同位素, 所以由于它们强毒性可能会引发副作用。

15 人 IgG1 亚类抗体 ADCC 活性和 CDC 活性的表达需要抗体的 Fc 区域与效应器细胞, 例如杀伤细胞, 天然杀伤细胞, 活化的巨噬细胞等表面存在的抗体受体及不同的补体成分结合。关于结合, 已经表明抗体铰链区的几个氨基酸残基和 C 区域的第二个结构域 (以下称为“Cγ2 结构域”) 是重要的[*Eur. J. Immunol.* (欧洲免疫学杂志), 23, 1098 20 (1993); *Immunology* (免疫学), 86, 319 (1995), *Chemical Immunology* (化学免疫学), 65, 88 (1997); *Chemical Immunology* (化学免疫学), 65, 88 (1997)]。关于 Rituxan™, 使用 Cγ2 结构域的某个氨基酸被取代的抗体研究的结果, 已经确定了对 CDC 活性非常重要是氨基酸 [25 *J Immunol.* (免疫学杂志), 164, 4178 (2000); *J Immunol.* (免疫学杂志), 166, 2571(2001)]。

此外, 表明结合于 Cγ2 结构域的糖链是重要的[*J. Immunology* (免疫学杂志), 65, 88(1997)]。关于糖链, Boyd 等人已经用各种糖水解酶处理过的中国仓鼠卵巢细胞(以下称为“CHO 细胞”)或者鼠骨髓瘤 NS0 细胞 (以下称为“NS0 细胞”) 产生的人 CDR-移植抗体 CAMPATH-1H 30 (人 IgG1 亚类), 检测糖链对 ADCC 活性和 CDC 活性的影响, 报导了去除非-还原性末端的唾液酸并不影响这两种活性, 但是进一步去除

半乳糖糖基，单独的 CDC 活性受到影响而且活性下降 50%，完全去除糖链导致两种活性消失[Molecular Immunol. (分子免疫学), 32, 1311 (1995)]。同时, Lifely 等人分析结合于人 CDR-移植抗体 CAMPATH-1H (人 IgG1 亚类) 的糖链, CAMPATH-1H 由 CHO 细胞, NS0 细胞或者大鼠骨髓瘤 YO 细胞产生, 测定其 ADCC 活性, 报导来自 YO 细胞的 CANDATH-1H 表现出最高的 ADCC 活性, 表明在对开位置的 N-乙酰葡萄糖胺 (以下称为“GlcNAc”) 对于活性是重要的[Glycobiology (糖生物学), 5, 813 (1995); WO 99/54342]。这些报导表明糖链的结构在 IgG1 亚类的人抗体的效应功能中起重要作用, 而且有可能通过改变糖链的结构来制备具有更高效应功能的抗体。然而, 实际上, 糖链的结构是多变且复杂的, 不能说已经确定了对于效应功能的实际重要结构。

作为通过把有关糖链修饰的酶的基因导入宿主细胞, 对产物的糖链结构进行修饰的例子, 已经报导了一种蛋白, 其中唾液酸大量加入到糖链的非-还原性末端, 这种蛋白可以通过把大鼠的 β -半乳糖苷- α 2,6-唾液酸转移酶导入 CHO 细胞产生[J.Biol.Chem. (生物化学杂志), 261, 13848 (1989)]。

同时, 岩藻糖 (以下称为“Fuc”) 结合于糖链 (Fuc α 1-2Gal β 1-) 的非还原性末端的 H 抗原的表达已经通过把人 β -半乳糖苷-2- α -岩藻糖基转移酶导入小鼠 L 细胞得到了证实[Science (科学), 252, 668 (1991)]。此外, N-糖苷键合的糖链的对分 N-乙酰葡萄糖胺的结合对于抗体的 ADCC 活性是重要的, 基于此知识, Umana 等人已经制备了表达 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III (GnTIII) 的 CHO 细胞, 而且与亲本细胞株进行了比较。在亲本 CHO 细胞中没有观察到 GnTIII 的表达 [J.Biol.Chem. (生物化学杂志), 259, 13370 (1984)], 并且已经确证使用制备的表达 GnTIII 的 CHO 细胞表达的抗体比亲本细胞中表达的抗体具有更高的 ADCC 活性 [Nature (自然), Biotechnol. (生物技术), 17, 176(1999); WO 99/54342]。在此情况下, Umana 等也制备了把 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 V (GnTV) 基因导入的 CHO 细胞, 而且报导 GnTIII 或者 GnTV 的过度表达对于 CHO 细胞有毒性。关于 RituxanTM, 已经有报道使用 GnTIII 导入的 CHO 细胞制备的抗体表现出比亲本细胞中表达的抗体更高的 ADCC 活性, 而且活性的差异大约为 10 到 20 倍

[*Biotechnol. Bioeng.* (生物技术与生物科学), 74, 288 (2001)].

发明内容

因为效应功能增加的抗 CD20 抗体表现出增强的治疗效果，所以
5 可以通过其降低的剂量使患者的负担减轻。此外，其它作用例如副作用的降低也可以预计，因为与化学治疗，放射性同位素等等结合使用就变得不必要了。本发明的一个目的是提供产生效应功能增强的抗-CD20 抗体的细胞，生产抗体组合物的方法，包括抗体组合物的药剂等。

10 本发明涉及以下 (1) 到 (48)。

(1) 一种产生抗体组合物的细胞，所述抗体组合物包含与 CD20 特异结合，并具有与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子，其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多。

15

(2) 根据(1)所述的细胞，其中岩藻糖不与 N-糖苷键合的复合糖链结合的糖链中岩藻糖的 1 位不与还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位通过 α 键结合。

20

(3) 根据 (1) 或 (2) 所述的细胞，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶活性降低或消失。

25

(4) 根据 (3) 所述的细胞，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的酶：

(a) GMD (GDP-甘露糖 4,6-脱水酶)；

(b) Fx (GDP-酮-6-脱氧甘露糖 3,5-差向异构酶, 4-还原酶)；

(c) GFPP (GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶)。

30

(5) 根据 (4) 所述的细胞，其中 GMD 是以下(a)或(b)中的 DNA

编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 GMD 活性的蛋白质的 DNA。

5

(6) 根据 (4) 所述的细胞，其中 GMD 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加，有 GMD 活性的蛋白质；

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 61 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列，有 GMD 活性的蛋白质。

(7) 根据 (4) 所述的细胞，其中 FX 是以下(a)或(b)中的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 FX 活性的蛋白质的 DNA。

(8) 根据 (4) 所述的细胞，其中 FX 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加，有 FX 活性的蛋白质；

(c) 包括与由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列，有 Fx 活性的蛋白质。

(9) 根据 (4) 所述的细胞，其中 GFPP 是以下(a)或(b)中的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条

件下杂交，编码有 GFP 活性的蛋白质的 DNA。

(10) 根据 (4) 所述的细胞，其中 GFP 是选自以下 (a)、(b) 和 (c) 中的蛋白质：

- 5 (a) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列的蛋白质；
(b) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或添加，有 GFP 活性的蛋白质；
(c) 包括与由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列，有 GFP 活性的蛋白质。

10

(11) 根据 (3) 所述的细胞，其中与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶是 α 1,6-岩藻糖转移酶。

15 (12) 根据 (11) 所述的细胞，其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是选自以下(a)、(b)、(c) 和 (d)中的的 DNA 编码的蛋白质：

- (a) 包括由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA；
(b) 包括由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA；
(c) 包括与由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA；
20 (d) 包括与由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA。

(13) 根据 (11) 所述的细胞，其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是选自以下(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中的蛋白质：

- 25 (a) 包括由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列的蛋白质；
(b) 包括由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列的蛋白质；
(c) 包括由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸被删除、取代、插入和/或增加，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；
30 (d) 包括由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列，其中至少一个氨

基酸被删除、取代、插入和/或增加，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；

(e) 包括与由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质；

5 (f) 包括与由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列具有至少 80% 同源性的氨基酸序列，具有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质。

(14) 根据 (3) 到 (13) 中任何一项所述的细胞，其中通过选自以下(a)、(b)、(c)、(d) 和(e)中的技术使酶活性降低或消除：

10 (a) 以编码酶的基因为目标的基因断裂技术；

(b) 导入编码酶的基因的显性失活突变体的技术；

(c) 酶中导入突变的技术；

(d) 抑制编码酶的基因转录或翻译的技术；

15 (e) 选择对识别糖链的凝集素有抗性的细胞系的技术，所述凝集素识别岩藻糖的 1 位通过 α 键与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位结合。

(15) . 根据 (1) 到 (14) 中任何一项所述的细胞，其中所述细胞是至少对一种凝集素有抗性的细胞，其中凝集素识别岩藻糖的 1 位
20 通过 α 键与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位结合。

(16) 根据 (1) 到 (15) 中任何一项所述的细胞，其中所述细胞选自以下(a)到(j)：

25 (a) 来自中国仓鼠卵巢组织的 CHO 细胞；

(b) 大鼠骨髓瘤细胞细胞系，YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞；

(c) 小鼠骨髓瘤细胞细胞系，NS0 细胞；

(d) 小鼠骨髓瘤细胞细胞系，SP2/0-Ag14 细胞；

(e) 来源于叙利亚仓鼠肾组织的 BHK 细胞；

30 (f) 猴 COS 细胞；

(g) 产生抗体的杂交瘤细胞；

- (h) 人白血病细胞系, Namalwa 细胞;
- (i) 胚胎干细胞;
- (j) 受精卵细胞。

5 (17) 一种转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中导入与 CD20 特异结合, 与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子, 转基因非人动物或植物或它们的后代产生包括抗体分子的抗体组合物, 其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中, 岩藻糖不与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多。
10

 (18) 根据 (17) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中岩藻糖不与 N-乙酰葡萄糖胺连接的糖链是岩藻糖的 1 位不与 N-糖苷键合的糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位通过 α 键连接的糖链。
15

 (19) 根据 (17) 或 (18) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中基因组被修饰, 这样与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性, 和/或在岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的 6 位的糖链修饰有关的酶活性降低。
20

 (20) 根据 (17) 或 (18) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶的基因被敲除。
25

 (21) 根据 (19) 或 (20) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 是选自以下(a)、(b)或 (c)中的酶:

- 30 (a) GMD (GDP-甘露糖 4,6-脱水酶);
- (b) Fx (GDP-酮-6-脱氧甘露糖 3,5-差向异构酶, 4-还原酶);

(c) GFPP (GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶)。

(22) 根据(21)所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 GMD 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质：

5 (a) 包括由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 包括与由 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 GMD 活性的蛋白质的 DNA。

(23) 根据(21)所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 Fx 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 包括与由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 FX 活性的蛋白质的 DNA。

(24) 根据(21)所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 GFPP 是由以下(a) 或 (b)的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 包括与由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 GFPP 活性的蛋白质的 DNA。

20

(25) 根据(19) 或 (20) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中岩藻糖的 1 位通过 α 键与 N-糖苷键合的糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位连接的糖链修饰相关的酶是 α 1,6-岩藻糖转移酶。

(26) 根据(25) 所述的转基因非人动物或植物或它们的后代，其中 α 1,6-岩藻糖转移酶是由选自以下(a)、(b)、(c) 和 (d)中的的 DNA 编码的蛋白质：

(a) 包括由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 包括由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA；

30 (c) 包括与由 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA；

(d) 包括与由 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交, 编码有 α 1,6-岩藻糖转移酶活性的蛋白质的 DNA。

5 (27) 根据 (17) 到 (26) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中转基因非人动物是从牛、绵羊、山羊、猪、马、小鼠、大鼠、鸡、猴和兔中选择的动物。

(28) 根据 (1) 到 (16) 中任何一项所述的细胞, 其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子:

- 10 (a) 人抗体;
(b) 人源化抗体;
(c) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的抗体片段;
(d) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的融合蛋白。

15 (29) 根据 (1) 到 (16) 和 (28) 中任何一项所述的细胞, 其中抗体分子属于 IgG 类。

(30) 根据 (1) 到 (16)、(28) 和 (29) 中任何一项所述细胞, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3, 和/或抗体
20 重链的互补决定区 1、2 和 3, 所述轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 代表的氨基酸序列, 所述抗体重链的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 代表的氨基酸序列。

25 (31) 根据 (1) 到 (16)、(28), (29) 和 (30) 中任何一项所述细胞, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区, 所述轻链可变区包括由 SEQ ID NO: 12 代表的氨基酸序列, 所述重链可变区包括由 SEQ ID NO: 14 代表的氨基酸序列。

30 (32) 根据 (17) 到 (27) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子:
(a) 人抗体;

- (b) 人源化抗体;
- (c) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的抗体片段;
- (d) 包括(a)或(b)的 Fc 区域的融合蛋白。

5 (33) 根据 (17) 到 (27) 和 (32) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中抗体分子属于 IgG 类。

10 (34) 根据 (17) 到 (27), (32) 和 (33) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 和/或重链的互补决定区 1、2 和 3, 所述轻链可变区的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 代表的氨基酸序列, 所述重链的互补决定区 1、2 和 3 包括分别由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 代表的氨基酸序列。

15 (35) 根据 (17) 到 (27)、(32)、(33) 和 (34) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代, 其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区, 所述轻链可变区包括由 SEQ ID NO: 12 代表的氨基酸序列, 所述重链可变区包括由 SEQ ID NO: 14 代表的氨基酸序列。

20 (36) 一种抗体组合物, 所述抗体组合物是根据 (1) 到 (16) 和 (28) 到 (31) 中任何一项所述的细胞产生的。

25 (37) 一种抗体组合物, 所述抗体组合物通过饲养根据 (17) 到 (27) 和 (32) 到 (35) 中任何一项所述的转基因非人动物或植物或它们的后代获得的。

30 (38) 一种包含与 CD20 特异结合, 具有与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子的抗体组合物, 其中组合物中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中, 岩藻糖不与糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合的比率是 20% 或更多

(39) 根据(38)所述的抗体组合物,其中不与岩藻糖结合的糖链是岩藻糖的1位不与N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰氨基葡萄糖的6位通过 α 键相连的糖链。

5

(40) 根据(38)所述抗体组合物,其中抗体分子是选自(a)、(b)、(c)和(d)中的分子:

(a) 人抗体;

(b) 人源化抗体;

10 (c) 包括(a)或(b)的Fc区域的抗体片段;

(d) 包括(a)或(b)的Fc区域的融合蛋白。

(41) 根据(38)到(40)中任何一项所述的抗体组合物,其中抗体分子属于IgG类。

15

(42) 根据(38)到(41)中任何一项所述的抗体组合物,其中抗体分子包括抗体轻链可变区的互补决定区1、2和3,和抗体重链的互补决定区1、2和3,所述抗体轻链可变区的互补决定区1、2和3分别包括由SEQ ID NO: 5、6和7代表的氨基酸序列,所述抗体重链的互补决定区1、2和3分别包括由SEQ ID NO: 8、9和10代表的氨基酸序列。

20

(43) 根据(38)到(42)中任何一项所述的抗体组合物,其中抗体分子包括抗体轻链可变区和/或重链可变区,所述轻链可变区包括由SEQ ID NO: 12代表的氨基酸序列,所述重链可变区包括由SEQ ID NO: 14

25

(44) 一种产生根据(36)、(38)到(43)中任何一项所述的抗体组合物的方法,所述方法包括培养(1)到(16)和(28)到(31)中任何一项所述的细胞,在培养基中形成和积累抗体组合物,从培养基中回收抗体组合物。

30

(45) 一种产生根据(36)、(38)到(43)中任何一项所述的抗体组合物的方法,所述方法其中包括饲养(17)到(27)和(32)到(35)中任何一项所

述的转基因非人动物或植物或它们的后代，从饲养的动物或植物中分离出组织或体液，和从分离的组织或体液中回收抗体组合物。

5 (46) 一种根据(36)到(43)中任何一项所述的抗体组合物作为活性成分的药物。

(47) 一种治疗与 CD20 相关疾病的制剂，所述制剂包含根据(36)到(43)中任何一项所述的抗体组合物作为活性成分。

10 (48) 根据(47)所述的试剂，其中与 CD20 相关的疾病是癌症或免疫疾病。

本发明的细胞可以是任何细胞，只要细胞产生与 CD20 特异结合，而且具有结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子的抗体组合物，其中组分中总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不与 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端结合的糖链的比率是 20% 或更多。

在本发明中，CD20 是一个大约 35kDa 的细胞表面膜蛋白，也称 B1 或者 Bp35，CD20 包括由 SEQ ID No: 4 代表的氨基酸序列的蛋白质，和包括由 SEQ ID NO: 4 代表的氨基酸序列中一个或几个氨基酸被取代，去除，插入和/或增加的氨基酸序列的蛋白质，而且具有与 CD20 实质上相似的特性。

例如，使用例如 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆，实验手册)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版) (1989) (以下称为“*Molecular Cloning* (分子克隆)，第二版”)；*Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学指南)，John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下称为“*Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学指南)”)；*Nucleic Acids Research* (核酸研究)，10, 6487 (1982)；*Proc. Natl. Acad. Sci.* (美国科学院院报) USA, 79, 6409 (1982)；*Gene* (基因)，34, 315 (1985)，*Nucleic Acids Research* (核酸研究)，13, 4431 (1985)，*Proc. Natl. Acad. Sci.* (美国科

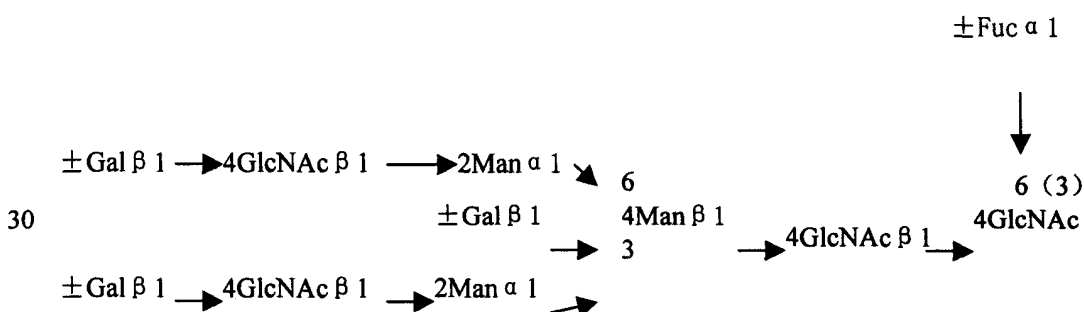
学院院报) *USA*, 82, 488 (1985) 等中描述的定点突变法, 通过往编码具有由 SEQ ID NO: 4 代表的氨基酸序列的蛋白质的 DNA 中导入定点突变, 获得包括由 SEQ ID NO: 4 代表的氨基酸序列, 其中一个或者几个氨基酸被取代, 去除, 插入和/或增加的蛋白质, 而且这种蛋白质具有与 CD20 实质上相似的活性。被删除的, 替换, 插入, 和/或增加氨基酸数目是一个或多个, 数目并不是特别限定的, 但是通过已知的技术如定点突变技术可以进行删除, 替换, 和/或增加的数目是 1 到几十, 优选的是 1 到 20, 更优选的是 1 到 10, 最优选的是 1 到 5。

同时, 本发明中为了保持使用的蛋白的 CD20 活性, 使用分析软件如 BLAST [*J Mol. Biol.* (分子生物学杂志), 215, 403 (1990)], FASTA [*Methods in Enzymology* (酶学方法), 183, 63 (1990)] 等计算时, 与由 SEQ ID NO: 4 代表的氨基酸序列的同源性为 80% 或者更多, 优选的是 85% 或者更多, 较优选的是 90% 或者更多, 更优选的是 95% 或者更多, 进一步更优选的是 97% 或者更多, 最优选的是 99% 或者更多。

在本发明中, 作为结合于抗体分子 Fc 区域的糖链, 被提及的是 N-糖苷键合的糖链。作为 N-糖苷键合的糖链, 被提到的是复合型的糖链, 其中核心结构的非还原性末端具有一个或多个平行的半乳糖-N-乙酰葡萄糖胺 (以下称为“Gal-GlcNAc”) 分枝而且 Gal-GlcNAc 的非还原性末端具有如唾液酸, 对分的 N-乙酰葡萄糖胺等结构。

在抗体中, 如下所述, Fc 区域具有两个 N-糖苷键合的糖链中每个都与之结合的位置。相应地, 每个抗体分子结合两个糖链。由于结合于抗体的 N-糖苷键合的糖链包括以下结构式 (I) 代表的任何糖链, 所以结合于抗体的 N-糖苷键连接的两个糖链有很多种糖链的组合。相应地, 物质的确认可以通过结合于 Fc 区域的糖链结构的观点来判断。

25



30

在本发明中,组合物包括 Fc 区域中具有 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子(以下称为“本发明的抗体组合物”),可以包括具有相同糖链结构的抗体或者具有不同糖链结构的抗体,只要从组合物中得到本发明的效果。

5 在本发明中,“在抗体组合物中,糖链中岩藻糖并不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的占总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链的比例”是指在糖链中岩藻糖并不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的占组分所含有的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链总数量的比率。

10 在本发明中,“岩藻糖并不结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺糖链”是指岩藻糖的 1 位并不通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的糖链。例子包括 N-糖苷键合的复合糖链,其中岩藻糖的 1 位并不通过 α 键结合于 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位。

15 本发明的抗体组合物中,糖链中岩藻糖并不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的占总的结合于 Fc 区域的 N-糖苷键合的复合糖链的比例优选是 20% 或更多,较优选的是 25%或更多,更优选的是 30%或更多,进一步优选的是 40% 或更多,最优选的是 50%或更多。含有这样比例糖链的抗体组合物具有高的 ADCC 活性。

20 当抗体浓度降低时,ADCC 活性相应的降低。然而,即使抗体浓度低时仍然可以获得高的 ADCC 活性,只要糖链中岩藻糖并不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的比例是 20%或更多。

在包括 FC 区域中含有 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子的组成中,岩藻糖并不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的比例,可以通过应用已知方法如胍解作用,酶消化等方法 [*Biochemical Experimentation Methods 23-Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain* (生物化学实验方法,研究糖蛋白的糖链结构的方法 23) (Japan Scientific Societies Press (日本科学学会出版)), Reiko Takahashi 编著 (1989)]从抗体分子中释放糖链来测定,对于释放的糖链进行荧光标记
25 或者放射性标记,然后通过层析方法分离标记的糖链。可选择的,释放的糖链也可以用 HPAED-PAD 方法分析来确定,[*J Liq Chromatogr.*, 6,
30

1577 (1983)]。

更进一步，本发明的细胞包括产生本发明组合物的细胞，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的活性，和/或与糖链修饰相关的酶活性降低或消失，此糖链中岩藻糖的1位与N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰葡糖胺的6位通过 α 键结合。

在本发明中，与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶可以是任何酶，只要这种酶是与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，只要它可以为糖链提供岩藻糖的来源。与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶包括对细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成有影响的酶。

对细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成有影响的酶，包括对细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的活性有影响的酶，和对作为酶底物的物质的结构有影响作用的酶。

细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖是通过从头合成途径或者补救合成途径来提供的。因此与这些合成途径有关的所有酶都包括在与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶之中。

与细胞内糖核苷酸，GDP-岩藻糖从头合成途径相关的酶，包括GDP-甘露糖4,6-脱水酶（以下称为“GMD”），GDP-酮-6-脱氧甘露糖3,5-差向异构酶4,6-还原酶（以下称为“Fx”）等。

与细胞内糖核苷酸，GDP-岩藻糖补救合成途径相关的酶，包括GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶（以下称为“GFPP”），岩藻糖激酶等。

在本发明中，GMD包括：

以下（a）或（b）的DNA编码的蛋白：

（a）包括SEQ ID NO：41代表的核苷酸序列的DNA；

（b）可以与包括SEQ ID NO：41代表的核苷酸序列的DNA在严谨条件下杂交，并且编码具有GMD活性的蛋白质的DNA；

（c）包括由SEQ ID NO：61代表的氨基酸序列的蛋白质；

（d）包括由SEQ ID NO：61代表的氨基酸序列，其中氨基酸序列中至少一个氨基酸缺失，替换，插入和/或者增加，并且具有GMD活性的蛋白质，和

（e）包含与由SEQ ID NO：61代表的氨基酸序列具有至少80%的

同源性的氨基酸序列，并且具有 GMD 活性的蛋白质。

同时，编码 GMD 的氨基酸序列的 DNA 包括 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 和与包括 SEQ ID NO: 41 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并且编码具有 GMD 活性的氨基酸序列的 DNA。

在本发明中，Fx 包括：

以下 (a) 或者 (b) 的 DNA 编码的蛋白：

(a) 包括 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并且编码具有 Fx 活性的蛋白质的 DNA，

(c) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列的蛋白质，

(d) 包括由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列，其中氨基酸序列中至少一个氨基酸缺失，替换，插入和/或者增加，并且具有 Fx 活性的蛋白质，和

(e) 包含与由 SEQ ID NO: 62 代表的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性的氨基酸序列，并且具有 Fx 活性的蛋白质。

同时，编码 Fx 的氨基酸序列的 DNA 包括包含由 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 和可以与包括 SEQ ID NO: 48 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交的，并且编码具有 Fx 活性的氨基酸序列的 DNA。

在本发明中，GFPP 包括：

以下 (a) 或者 (b) 的 DNA 编码的蛋白：

(a) 包括 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b) 与包括 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交的，并且编码具有 GFPP 活性的蛋白质的 DNA，

(c) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列的蛋白质，

(d) 包括由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列，其中氨基酸序列中至少一个氨基酸缺失，替换，插入和/或者增加，并且具有 GFPP 活性的蛋白质，和

(e) 包含与由 SEQ ID NO: 63 代表的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性的氨基酸序列，并且具有 GFPP 活性的蛋白质。

同时，编码 GFPP 的氨基酸序列的 DNA 包括由 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA，和与包括 SEQ ID NO: 51 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并且编码具有 Fx 活性的氨基酸序列的 DNA。

5 在本发明中，与糖链修饰有关的酶可以包括任何酶，此糖链中岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接，只要它是岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接反应有关的酶。

“岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接反应有关的酶”是指对岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接反应有影响的酶。

岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接反应有关的酶包括 α 1,6-岩藻糖基转移酶和 α -L-岩藻糖苷酶。

同时，例子包括对岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡糖胺的 6 位通过 α 键连接反应有关的酶的活性有影响的酶，和对酶底物的物质结构有影响的酶。

在本发明中， α 1,6-岩藻糖基转移酶包括：

20 以下(a)、(b)、(c) 或(d)的 DNA 编码的蛋白质：

(a)包括 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA；

(b)包括 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA；

(c)可以与包括 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交，并且编码具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的蛋白质的 DNA。

25 (d)可以与包括 SEQ ID NO: 2 代表的核苷酸序列的 DNA 在严谨条件下杂交的，并且编码具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的蛋白质的 DNA。

(e) 包括由 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列的蛋白质；

(f) 包括由 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列的蛋白质；

30 (g) 包括 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列，在氨基酸序列中至少一个氨基酸缺失，替换，插入和/或者加入，并且具有 α 1,6-岩藻糖基

转移酶活性的蛋白质；

(h) 包括一 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列，在氨基酸序列中至少一个氨基酸缺失，替换，插入和/或者加入，并且具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的蛋白质；

5 (i) 包括与 SEQ ID NO: 23 代表的氨基酸序列具有至少 80%同源性的氨基酸序列并且具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的蛋白质；

(j) 包括与 SEQ ID NO: 24 代表的氨基酸序列具有至少 80%同源性的氨基酸序列，并且具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的蛋白质；

同时，编码 α 1,6-岩藻糖基转移酶的氨基酸序列的 DNA 包括具有
10 SEQ ID NO: 1 或者 2 代表的核苷酸序列的 DNA，和可以和具有 SEQ ID NO: 1 或者 2 代表的核苷酸序列在严谨条件下杂交，并且编码具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性的氨基酸序列的 DNA。

在本发明中，“可以在严谨条件下杂交的 DNA”是指，用例如 SEQ ID NO: 1、2，48，51 或者 41 或者它们的部分片段代表的核苷酸序列
15 的 DNA 作为探针，通过如菌落杂交，噬菌斑杂交或者 Southern 印迹杂交的方法获得的 DNA。具体指的是可以在 65°C，0.7 到 1.0M 的氯化钠存在的条件下，使用对菌落或者噬菌斑来源的 DNA 片段进行了固定的滤膜进行杂交，然后在 65°C 下用 0.1 到 2×SSC 溶液（1×SSC 溶液的组成包括 150mM 的氯化钠和 15mM 的柠檬酸钠）漂洗滤膜确定的 DNA。
20 杂交可以按照如 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*（分子克隆，实验手册），第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press（冷泉港实验室出版）（1989）（以下称为“*Molecular Cloning*（分子克隆），第二版”），*Current Protocols in Molecular Biology*（现代分子生物学指南），John Wiley & Sons, 1987-1997（以下称为“*Current Protocols in Molecular*
25 *Biology*（现代分子生物学指南）”）；*DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach*，第二版，Oxford University（牛津大学）（1995）等中描述的方法进行。可杂交的 DNA 的例子包括与 SEQ ID NO: 1，2，48，51 或者 41 代表的核苷酸序列同源性至少为 60%或者更多，优选地 70%或者更多，较优选地 80%或者更多，进一步更优选地为 90%或者更多，
30 更优选地为 95%或者更多，最优选的 98%或者更多的 DNA。

在本发明中，包括分别由 SEQ ID NO: 23，24，61，62 和 63 代

表的氨基酸序列，其中缺失，替换，插入和/或者加入至少一个氨基酸，具有 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性，GMD 活性，Fx 活性和 GFPP 活性的蛋白质，是通过分别在编码具有 SEQ ID NO: 1、2，41，48 和 51 代表的氨基酸序列的 DNA 中导入定点突变，这种定点突变在例如
5 *Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版; *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学指南), *Nucleic Acids Research* (核酸研究), 10, 6487 (1982); *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 79, 6409 (1982), *Gene* (基因), 34, 315 (1985), *Nucleic Acids Research* (核酸研究), 13, 4431 (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报). USA, 82,
10 488 (1985) 等中有描述。缺失，替换，插入和/或者加入的氨基酸的数目是一个或者更多，数目并不特别限定，但是通过已知的技术如定点突变可以去除，替换，或者加入氨基酸的数目是，例如 1 到几十个，优选地 1 到 20，较优选地 1 到 10，并且最优选的是 1 到 5。

而且，在本发明中使用的每一种蛋白用例如 BLAST [*J. Mol. Biol.*(分子生物学杂志), 215, 403 (1990)], FASTA [*Methods in Enzymology* (酶学方法), 183, 63 (1990)]等分析软件等计算时，分别与 SEQ ID NO: 23, 24, 61, 62 和 63 代表的氨基酸序列具有至少 80% 或者更多，优选地 85% 或者更多，较优选的是 90%，更优选的是 95% 或者更多，进一步优选的是 97% 或者更多，最优选的是 99% 或者更多的同源性，这样它
15 分别可以保持 α 1,6-岩藻糖基转移酶活性，GMD 活性，Fx 活性和 GFPP 活性。

更进一步，作为获得本发明的细胞的方法，即细胞中与细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶的活性，和/或者与糖链修饰相关的酶的活性下降或者去除，该糖链中岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键连接的复合糖链 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位。可以应用任何技术，只
20 要可以减少目的酶的活性。用于减少或者去除酶活性的技术包括：

- (a) 以编码酶的基因为目标的基因断裂技术;
- (b) 导入编码酶的基因的显性失活突变体的技术;
- (c) 酶中导入突变的技术;
- 30 (d) 抑制编码酶的基因转录或翻译的技术; 和
- (e) 选择对识别糖链的凝集素有抗性的细胞系的技术，凝集素识别

的糖链中岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位通过 α 键结合。

由于凝集素识别糖链结构，其中的岩藻糖的 1 位与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位通过 α 键连接，所以可以使用能识别糖链结构的任何凝集素。例子包括 *Lens culinaris* 凝集素 LCA（源于 *Lens culinaris* 的扁豆凝集素），豌豆凝集素 PSA（来源于 *Pisum sativum* 的豌豆凝集素），蚕豆凝集素 VFA（来源于 *Vicia faba* 的凝集素），*Aleuria aurantia* 凝集素 AAL（源于 *Aleuria aurantia* 的凝集素）。

用于产生本发明抗体组合物的宿主细胞可以是任何宿主，只要其可以表达抗-CD20 的抗体分子，例如，转染了编码抗-CD20 抗体分子的基因的宿主细胞。例子包括酵母，动物细胞，昆虫细胞，植物细胞等等。细胞的具体例子包括在以下的条目 1 中描述的那些细胞。在动物细胞中优选的是来源于中国仓鼠卵巢组织的 CHO 细胞，大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞，小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 细胞，小鼠骨髓瘤 SP2/0-Ag14 细胞，来源于叙利亚仓鼠肾组织的 BHK 细胞，产生抗体的杂交瘤细胞，人白血病细胞系 Namalwa 细胞，胚胎干细胞，受精卵细胞等等。例子包括用本发明的抗-CD20 抗体的基因转染的大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞的转化克隆 KM3065（FERM BP-7834）。

对于转基因的非人动物或者植物以及其后代并没有限制，只要它是可以产生抗体组合物的转基因非人动物或者植物以及其后代，往其中导入编码抗体分子的基因，此抗体组合物包括抗体分子，抗体分子可以特异性结合 CD20 并且结合于 Fc 区域的复合糖链，其中在组和物中，连接到 Fc 区域的总的 N-糖苷键合的复合糖链中，岩藻糖不结合于糖链 N-乙酰葡萄糖胺还原性末端的比率是 20% 或者更多。产生抗体的转基因动物可以通过把编码特异结合于 CD20 的抗体的基因导入小鼠的 ES 细胞，移植 ES 细胞到其它小鼠的早期阶段胚胎中，然后进行发育来制备。转基因动物也可以通过把编码特异结合于 CD20 的抗体的基因导入受精卵中，并进行发育来制备。

转基因的非人动物包括牛，羊，山羊，猪，马，鼠，大鼠，鸡，

猴，兔等等类似物。

在本发明中，抗体分子包括任何的分子，只要其包含抗体的 Fc 区域。例子包括抗体，抗体片段，包括 Fc 区域的融合蛋白等。

5 抗体是外源抗原的刺激的结果，是活体免疫应答产生的蛋白，具有特异结合抗原的活性。作为抗体，从用抗原免疫的动物的脾脏细胞中制备的杂交瘤细胞分泌的抗体；由重组 DNA 技术制备的抗体，如，用提及的把插入抗体基因的抗体表达载体导入宿主细胞中得到的抗体等。例子包括由杂交瘤产生的抗体，人源化的抗体，人抗体等等。

10 作为杂交瘤细胞，提及的是通过用抗原免疫除人之外的哺乳动物得到的 B 细胞和来源于鼠等的骨髓瘤细胞之间细胞融合获得，可以产生有所需的抗原特异性的单克隆抗体的细胞。

对于人源化的抗体，提及的是人嵌合抗体，人互补决定区域（以下称为“CDR”）-移植的抗体等等。

15 人嵌合抗体是包括非人抗体的重链可变区（以下称为“HV”或者“VH”，可变链和重链分别为“V 区域”和“H 链”）和非人抗体轻链的可变区（以下称为“LV”或者“VL”），人抗体重链恒定区（在此后也称作为“CH”）和人抗体轻链恒定区（在此后也称作为“CL”）的抗体。对于非人动物，任何动物例如小鼠，大鼠，仓鼠，兔等都可以使用，只要可以从其中制备杂交瘤。

20 通过从产生单克隆抗体的杂交瘤中制备编码 VH 和 VL 的 cDNA，把它们插入用于宿主细胞的表达载体中，宿主细胞具有编码人抗体 CH 和人抗体 CL 的基因，构建表达人嵌合抗体的载体，然后把载体导入用于表达载体的宿主细胞，产生人嵌合抗体。

25 对于人嵌合抗体的 CH，可以应用任何 CH，只要其属于人的免疫球蛋白（以下称为“hIg”）。那些属于 hIgG 的类别是优选的，也可以使用任何属于 hIgG 类的亚类，如 hIgG1，hIgG2，hIgG3 和 hIgG4。同样地，对于人嵌合抗体的 CL，可以使用任何 CL，只要其属于 hIg 类，并且也可以使用那些属于 κ 或者 λ 类的 CL。

30 人 CDR-移植抗体是其中非人动物抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的氨基酸序列移植到人抗体的 VH 和 VL 的合适位置的抗体。

人 CDR-移植抗体可通过构建编码 V 区域的 cDNA 制备，其中来

源于非人动物的抗体 VH 和 VL 的 CDR 移植到人抗体的 VH 和 VL 的 CDR 区域，将它们插入到用于宿主细胞的表达载体中，该宿主细胞含有编码人抗体 CH 和人抗体 CL 的基因，由此构建了用于人-CDR 移植抗体的表达的载体，然后将表达载体导入到宿主细胞来表达人 CDR-
5 移植抗体。

对于人 CDR-移植抗体的 CH，可以使用任何 CH，只要它属于 hIg 类，但 hIgG 是优选的，任何属于 hIgG 类的亚类，如 hIgG1，hIgG2，hIgG3 和 hIgG4 也可以使用。同样地，对于人 CDR-移植抗体的 CL，可以应用任何 CL，只要其属于 hIg 类，并且也可以使用那些属于 κ 或者 λ 类的 CL。
10

人抗体起初是人体中自然存在的抗体，但是也包括从人抗体噬菌体库，产生人抗体的转基因动物和产生人抗体的转基因植物中得到的抗体。产生人抗体的转基因动物和产生人抗体的转基因植物是以基因工程，细胞过程和发育工程技术的最新进展为基础制备的。

15 通过分离人外周血淋巴细胞，用 EB 病毒等感染使其永生化，把它克隆获得能够产生抗体的淋巴细胞，培养该淋巴细胞，从培养基中分离和纯化抗体而获得人体中存在的抗体。

人抗体噬菌体库是一种文库，其中通过把从人 B 细胞中制备的编码抗体的基因插入噬菌体基因，抗体片段如 Fab（抗原结合片段），单链抗体等表达于噬菌体的表面。表达具有所需要的抗原结合活性的抗体片段的噬菌体，可以使用它结合于固定化抗原的底物的活性，作为
20 标记从文库中回收。抗体片段可以进一步通过重组 DNA 技术转化为包括两个全长 H 链和全长 L 链的人抗体分子。

抗体片段是包括抗体 Fc 区域的片段。对于抗体片段，可以提及的是 H 链单体，H 链二体等等。
25

包括 Fc 区域的融合蛋白，包括一种组合物，其中的抗体包括抗体或者抗体片段的 Fc 区域，该抗体与如酶，细胞因子等蛋白质融合。

本发明的抗体分子可以是任何抗体分子，只要其特异性地结合于 CD20。抗体分子优选的是特异结合于 CD20，并且包括分别由 SEQ ID NO: 5、6 和 7 所代表的氨基酸序列的抗体轻链可变区的互补决定区域
30 1、2 和 3，和/或分别由 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所代表的氨基酸序列

的抗体重链的抗体分子，较优选的是特异结合于 CD20，并且包括由 SEQ ID NO: 12 所代表的轻链可变区，和/或由 SEQ ID NO: 14 所代表的重链可变区的抗体分子。

本发明的药剂包括一种药物，其中包括一种活性成分，本发明的
5 抗体组合物，例如包括抗-CD20 的抗体分子的组合物。

与 CD20 有关的疾病包括例如 B 细胞淋巴瘤的癌症，炎症性疾病，自身免疫病等等。

在本发明中，ADCC 活性是一种细胞毒活性，其中与活体中的肿瘤细胞等细胞表面的抗原结合的抗体，通过存在于抗体 Fc 区域中的和
10 效应器细胞表面的 Fc 受体来活化效应器细胞，藉此妨碍肿瘤细胞等
[*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* (单克隆抗体: 原理与应用), Wiley-Liss, Inc., 2.1 章节(1955)]。作为效应器细胞，可能提及的是杀伤细胞，天然杀伤细胞，活化的巨噬细胞等等。

以下是本发明的详细描述。

15 1. 制备产生本发明抗体组合物的细胞

按照以下技术制备用于产生本发明的抗体组合物的宿主细胞，按照以下的条目 3 所描述的方法用编码抗-CD20 抗体的基因转染宿主细胞，从而制备本发明的细胞。

(1) 以编码酶的基因为目标的基因断裂技术

20 用于生产本发明细胞的宿主细胞可以通过以编码与细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因为目标，或者以编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因为目标的基因断裂技术制备，作为与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，可以提及的是 GMD，
25 Fx, GFPP, 岩藻糖激酶等等。作为与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶，可以提及的是 α 1,6-岩藻糖基转移酶， α -L-岩藻糖苷酶等等。

在此使用的基因包括 DNA 和 RNA。

作为基因断裂的方法，可以包括任何方法，只要其可以使靶酶的
30 基因断裂。作为例子，可以提及的是反义方法，核酶方法，同源重组方法，RNA-DNA 寡聚核苷酸方法（以下称为“RDO 方法”），RNA 干

涉方法（以下称为“RNAi 方法”），用逆转录病毒的方法，用转座子的方法等。方法具体地描述如下。

(a)通过使用反义方法或者核酶方法制备用于制备本发明细胞的宿主细胞

5 制备本发明细胞的宿主细胞可以使用 *Cell Technology (细胞技术)*, 12, 239 (1993); *BIO/TECHNOLOGY(生物/技术)*, 17, 1097 (1999), *Hum. Mol Genet.*, 5, 1083 (1995), *Cell Technology (细胞技术)*, 13, 255 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.(美国科学院院报) USA*, 96 1886 (1999)等中描述的反义方法或者核酶方法制备，例如，以下的方式中，以编码与细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因为目标，或者以编码与
10 岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因为目标。

制备编码与细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶或者编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 或基因组 DNA。
15

确定制备的 cDNA 或者基因组 DNA 的核苷酸序列。

以确定的 DNA 序列为基础，设计适当长度的反义基因或者核酶构建物，其包括编码与细胞内的糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因，和/或者编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 的一部分。设计的构建物可以进一步包括部分非翻译区域或者内含子。
20

为了在细胞中表达反义基因或者核酶，通过在合适的表达载体的启动子的下游插入制备 DNA 的片段或者全长来制备重组载体。

通过在适于载体表达的宿主细胞中导入重组质粒来得到转化体。

25 本发明的细胞可以通过选择转化体来得到，使用与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或在岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性作为标记。用于制备本发明细胞的宿主细胞也可以通过细胞膜上糖蛋白的糖链结构，或者产生的抗体分子的糖链结构为
30 基础来选择转化体而得到。

用于制备本发明细胞的宿主细胞，可以使用任何细胞如酵母，动

物细胞，昆虫细胞或者植物细胞，只要其具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的目标酶的基因，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因。包括宿主细胞的例子在以下的条目 3 中有说明。

作为表达载体，可以使用能够在宿主细胞中可以自主复制，或者可以整合到染色体中，并且在该启动子的位置设计的反义基因或者核酶就可以转入。表达载体包括的例子在以下的条目 3 中描述。

关于把基因导入不同的宿主细胞的方法，可以使用把适于不同宿主细胞的重组载体导入的方法，此方法在以下的条目 3 中描述。

以下的方法可以作为选择转化体的方法的例子，使用与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性作为标记。

15 选择转化体的方法：

细胞内与糖核苷酸，GDP-岩藻糖合成相关的酶的活性，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶的活性下降，选择这种细胞的方法包括在 *New Biochemical Experimentation Series* (新生物化学实验丛书) 3-Saccharides I, Glycoprotein (Tokyo Kagaku Dojin), 日本生物化学学会编辑 (1988); *Cell Engineering* (细胞工程), Supplement (增刊), *Experimental Protocol Series* (实验方法丛书), *Glycobiology Experimental Protocol*(糖生物学实验手册), *Glycoprotein, Glycolipid and Proteoglycan* (Shujun-sha), Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Kiyoshi Furukawa 和 Kazuyuki Sugawara 编辑 (1996), *Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版; *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学指南) 等中描述的生物化学方法或者基因工程技术。生物化学方法包括使用酶特异性的底物，测定酶活性的方法等。基因工程技术包括 Northern 分析，RT-PCR 等等，其中测定编码酶的基因的 mRNA 的量。

基于细胞膜上的糖蛋白的糖链结构来选择转化体的方法包括以下

条目 1(5)中所描述的方法。基于一种产生的抗体分子的糖链结构来选择转化体的方法包括以下条目 4 和 5 中所说明的方法。

对于制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶的 cDNA 的方法，以下面的方法为例子。

DNA 的制备方法:

从组织中和不同种类的宿主细胞中制备总 RNA 或者 mRNA。

从制备的总 RNA 或者 mRNA 中制备 cDNA 文库。

10 基于细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶的氨基酸序列，和使用制备的 cDNA 文库作为模板，应用 PCR 得到编码细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因片段为基础制备简并引物。

20 编码细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 可以通过使用获得的基因片段为探针筛查 cDNA 文库得到。

25 关于人或者非人类的组织或者细胞的 mRNA，可以应用商业上可以购买到的产品（如，由 Clontech 制造），或者用以下方式从人或者非人动物的组织和细胞中制备。从人或者非人动物的组织或者细胞中制备总 RNA 的方法的例子包括硫代氰酸铯胍三氟乙酸方法[*Methods in Enzymology* (酶学方法), 154, 3(1987)], 酸性硫氰酸胍苯酚氯仿(AGPC)方法[*Analytical Biochemistry* (分析生物化学), 162, 156 (1987); *Experimental Medicine* (实验药物), 9, 1937 (1991)]等。

30 同样地，从总 RNA 中制备 mRNA 作为 poly (A)⁺RNA 的方法包括寡聚 (dT) -固定的纤维素柱方法 (*Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版) 等等。

此外，使用试剂盒如 Fast Track mRNA 分离试剂盒(Invitrogen 生

产), Quick Prep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 生产) 等等制备 mRNA。

从人或者非人动物的组织和细胞中制备的 mRNA 制备 cDNA 文库, 制备 cDNA 文库的方法包括在 *Molecular Cloning (分子克隆)*, 第二版中, *Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学实验方法)*; *A Laboratory Manual(实验手册)*, 第二版(1989)等等中描述的方法, 或者使用商业上可以买到的试剂盒如 SuperScript Plasmid System 用于 cDNA 合成和质粒的克隆 (由 Life Technologies 制造), ZAP-cDNA 合成试剂盒 (由 STRATAGENE 制造) 等等。

作为制备 cDNA 文库的克隆载体, 可以使用任何载体如噬菌体载体, 质粒载体等等, 只要载体可以在大肠杆菌 K12 中自主复制。载体例子包括 ZAP Express[由 STRATAGENE 制造, *Strategies*, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+)[*Nucleic Acids Research (核酸研究)* 17, 9494 (1989)], Lambda ZAP II (由 STRATAGENE 制造), λ gt10 和 λ gt11[*DNA Cloning, A Practical Approach*, 1, 49 (1985)], λ TriplEx (由 Clontech 制造), λ ExCell (Pharmacia 生产), PT7T318U (Pharmacia 生产), pcD2 [*Mol. Cell Biol.*, 3, 280 (1983)], pUC18[*Gene*, 33, 103 (1985)] 等等。

可以使用任何微生物作为宿主微生物, 优选使用大肠杆菌, 例子包括大肠杆菌 XL1-Blue MRF'[由 STRATAGENE 制造, *Strategies*, 5, 81 (1992)], 大肠杆菌 C600[*Genetics (遗传学)*, 39, 440 (1954)], 大肠杆菌 Y1088 [*Science (科学)*, 222, 778 (1983)], 大肠杆菌 Y1090 [*Science (科学)*, 222, 778 (1983)], 大肠杆菌 NM522 [*J. Mol. Biol.*, 166, 1 (1983)], 大肠杆菌 K802 [*J Mol. Biol.* 16, 118 (1966)], 大肠杆菌 JM105 [*Gene (基因)*, 38, 275 (1985)] 等等。

cDNA 文库可以用于以下分析, 而且降低非全长 cDNA 的比率通过尽可能有效地得到全长的 cDNA, 可以在以下的分析中使用 Sugano 等人研发的[*Gene(基因)*, 138, 171(1994), *Gene(基因)*, 200, 149 (1997), *Protein, Nucleic Acid and Enzyme (蛋白质, 核酸和酶)*, 41, 603 (1996), *Experimental Medicine(实验药物)*, 11, 2491(1993), *cDNA Cloning(cDNA 克隆)* (Yodo-sha) (1996), *Methods for Preparing Gene Libraries (基因文库制备方法)* (Yodo-sha) (1994)]寡聚 cap 方法制备 cDNA 文库。

推定编码氨基酸序列的核苷酸序列的 5'-端和 3'-端核苷酸序列的特异的简并引物的制备, 是根据与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的氨基酸序列, 而且以制备的 cDNA 文库为模板用 PCR 进行 DNA 扩增[PCR protocols (PCR 实验方法) Academic Press(美国学术出版社) (1990)], 得到编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因片段。

通过常用的核酸测序的方法如 Sanger 等人的双脱氧法[Proc. Natl. Acad. Sci.(美国科学院院报) USA, 74, 5463 (1977)], 核苷酸序列分析仪如 ABI PRISM 377 DNA 测序仪 (Applied Biosystems 制造) 等可以确定, 得到的基因片段是编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA。

编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的 DNA, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 可以通过人或者非人动物的组织和细胞中含有的 mRNA 合成的 cDNA 或者 cDNA 库, 使用基因片段作为 DNA 探针, 进行菌落或者噬菌斑杂交的方法得到 (*Molecular Cloning (分子克隆)*, 第二版)。

同样地, 编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的 DNA, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 可以通过使用用于获得的编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因片段为引物, 以人或者非人动物的组织和细胞中含有的 mRNA 合成的 cDNA 或者 cDNA 库为模板, 进行 PCR 筛查得到。

编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的 DNA, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性

末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 的核酸序列通过常用的测序的方法如 Sanger 等人的双脱氧法[*Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报) USA, 74, 5463 (1977)*], 核苷酸序列分析仪如 ABI PRISM 377 DNA 测序仪 (Applied Biosystems 制造) 等等, 从其末端进行核酸
5 测序分析来确定。

编码与在细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因也可以通过基于确定的 cDNA 核苷酸序列, 使用同源性搜索程序如 BLAST 搜索例如
10 GenBank, EMBL, DDBJ 等核苷酸序列数据库的数据来确定。

通过该方法得到的编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因的核苷酸序列包括由 SEQ ID NO: 48, 51 或者 41 代表的核苷酸序列。编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因的
15 核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 1 或者 2 所代表的核苷酸序列。

编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 也可以通过基于确定的 DNA 核苷酸序列, 用 DNA 合成仪例如由 Perkin Elmer 制造的 DNA 合成仪型号 392 等, 使用亚磷酰胺方法化学合成得到。
20

作为制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA 的方法的例子, 该方法在以下示例性描述。

25 基因组 DNA 的制备方法:

作为制备基因组 DNA 的方法, 可以提及在 *Molecular Cloning (分子克隆)*, 第二版, *Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学指南)* 等中描述的已知方法。此外, 编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于
30 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA 也可以使用试剂盒例如基因组 DNA 文库筛查系

统试剂盒（由 Genome Systems 制造），Universal GenomeWalker™ 试剂盒（由 CLONTECH 制造）等来进行分离。

通过以上方法获得的编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因的核苷酸序列的基因组 DNA 的核苷酸序列包括由 SEQ ID NO: 57 或者 60 代表的核苷酸序列。编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 3 所代表的核苷酸序列。

此外，也可以不使用表达载体，而直接导入反义寡聚核苷酸或者核酶到宿主细胞中获得本发明的宿主细胞，反义寡聚核苷酸或者核酶的设计基于编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因序列。

反义寡聚核苷酸或者核酶可以使用常用的方法或者 DNA 合成仪来进行制备。具体的，以编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 和基因组 DNA 的核苷酸序列中的连续的 5 到 150 个碱基，优选的 5 到 60 个碱基，而且更优选的 10 到 40 个碱基的相应序列的寡聚核苷酸的序列信息为基础，通过合成相对应的寡聚核苷酸序列互补的寡聚核苷酸（反义寡聚核苷酸）或者包括该寡聚核苷酸序列的核酶，制备反义寡聚核苷酸或者核酶。

寡聚核苷酸包括寡聚 RNA 以及寡聚核苷酸的衍生物（以下称为“寡聚核苷酸衍生物”）。

作为寡聚核苷酸衍生物，可以提及的是，其中寡聚核苷酸中磷酸二酯键转变为磷酸硫酯键的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中磷酸二酯键转变为 N3'-P5' 磷酸酰胺键的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中核糖和磷酸二酯键转变成肽-核酸键的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中尿嘧啶由 C-5 丙炔基尿嘧啶取代的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中尿嘧啶由 C-5 噻唑基尿嘧啶取代的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中的胞嘧啶由 C-5 丙炔基胞嘧啶取代的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中的胞嘧啶由吩噻嗪-修饰的胞嘧啶取

代的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中的核糖由 2'-O-丙基核糖取代的寡聚核苷酸衍生物，其中寡聚核苷酸中的核糖由 2'-甲氧乙氧核糖取代的寡聚核苷酸衍生物[Cell Technology (细胞技术), 16, 1463 (1997)] 等等。

5 (b)通过同源重组制备用于制备本发明细胞的宿主细胞

制备本发明细胞的宿主细胞可以通过使用编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因作为靶基因，通过同源重组技术在染色体上
10 对靶基因进行修饰来产生。

染色体上的靶基因的修饰可以使用在 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*(小鼠胚胎的操作：实验手册)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版) (1994)(以下称为“*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*(小鼠胚胎的操作：实验手册)”)，*Gene Targeting, A Practical Approach* (靶向基因：实践方法)(靶向基因：实践方法)，IRL Press at Oxford University Press (牛津大学出版社) (1993)；*BioManual Series 8* (生物手册：8)，*Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells* (靶向基因：使用 ES 细胞制备突变小鼠)，Yodo-sha (1995) (以下称为“*Preparation of Mutant Mice using ES Cells* (使用 ES 细胞制备突变小鼠)”) 等中描述的方法，例如，如下。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA。

25 以基因组 DNA 的核苷酸序列为基础，制备用于待修饰的靶基因同源重组的靶载体（如，编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的结构基因，或者启动子基因）。

30 用于制备本发明细胞的宿主细胞，可以通过把制备好的靶载体导入宿主细胞中，并且选择在靶基因和靶载体之间发生同源重组的细胞

来产生。

作为宿主细胞可以使用任何细胞如酵母，动物细胞，昆虫细胞，或者植物细胞，只要其具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因。
5 例子包括在以下的条目 3 中描述的宿主细胞。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA 的方法包括
10 条目 1 (1) (a) 中描述的制备基因组 DNA 的方法。

编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶包括由 SEQ ID NO: 57 或者 60 代表的核苷酸序列。编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA 的核苷酸序列包括由 SEQ ID NO: 3 所代
15 表的核苷酸序列。

用于靶基因同源重组的靶载体可以按照与 *Gene Targeting, A Practical Approach* (靶向基因: 实践方法), IRL Press at Oxford University Press (牛津大学出版社) (1993); *Biomanual Series 8* (生物手册: 8), *Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells* (靶向基因: 使用 ES 细胞制备突变小鼠), Yodo-sha (1995), 等中描述相
20 一致的方法制备。靶载体既可以是作为置换型或者插入型使用。

为了将靶载体导入到不同的宿主细胞中，可以使用在以下的条目 3 中描述的把适于不同宿主细胞的重组载体导入的方法。

有效的筛选同源重组子的方法包括 *Gene Targeting A Practical Approach* (靶向基因: 实践方法), IRL Press at Oxford University Press (牛津大学出版社) (1993); *Biomanual Series 8*, (生物手册: 8), *Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES Cells* (靶向基因: 使用 ES 细胞制备突变小鼠), Yodo-sha (1995) 等中描述的方法，例如阳性选择，启动子选择，负选择或者多聚 A 选择。在选择
25 的细胞系中选择目的同源重组子的方法包括基因组 DNA 的 Southern 杂交方法 (*Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版), PCR [*PCR protocols* (PCR 实验方法)]
30

Academic Press (美国学术出版社) (1990)]等。

(c) 通过 RDO 方法制备用于制备本发明细胞的宿主细胞

用于制备本发明细胞的宿主细胞可以通过 RDO (RNA-DNA 寡聚核苷酸) 的方法, 通过以编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因为目标制备, 例如, 如下。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 或者基因组。

确定制备的 cDNA 或者基因组 DNA 的核苷酸序列。

以确定的 DNA 序列为基础, 设计包括编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 DNA 的适当长度的 RDO 构建物。设计的 RDO 构建物可能进一步包括非翻译区的一部分或者一个内含子的一部分。

本发明的宿主细胞可以通过在宿主细胞中导入合成的 RDO, 然后通过选择在靶酶中发生突变的转化体得到, 即, 与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶。

对于宿主细胞, 可以使用任何细胞例如酵母, 动物细胞, 昆虫细胞或者植物细胞, 只要它具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的靶酶和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的靶酶的基因。例子包括在以下的条目 3 中描述的宿主细胞。

把 RDO 导入不同宿主细胞的方法包括在以下的条目 3 中描述的不同宿主细胞中导入适当的重组载体的方法。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 的方法包括在条目

1 (1) (a) 等中描述的 DNA 制备方法。

制备编码与在细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因组 DNA 的方法包括在条目 1 (1) (a) 等中描述的基因组 DNA 的制备方法。

此 DNA 的核苷酸序列可以通过用合适的限制性内切酶消化，克隆该 DNA 片段到如 pBluescript SK(-) (由 Stratagene 制备) 等质粒中，对于该克隆进行一般作为分析核苷酸序列方法的反应，例如 Sanger 等的双脱氧法 [*Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报)*, USA, 74, 5463 (1977)] 等。然后用自动的核苷酸序列分析仪，如 A. L.F. DNA 测序仪 (Pharmacia 制造) 等分析此克隆。

RDO 也可以使用通常方法或者使用 DNA 合成仪制备。

通过把 RDO 导入宿主细胞中，导入编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因中，选择发生突变的细胞的方法包括在 *Molecular Cloning (分子克隆)* 第二版中，*Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学指南)* 等等中描述的直接检测染色体基因中突变的方法。

同样地，作为方法，可以使用在条目 1(1)(a) 中描述的，通过测定导入的与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性来选择转化体的方法；将在条目 1 (5) 中描述的以细胞膜上的糖蛋白的糖链结构为基础，选择转化体的方法；将在条目 4 或者 5 中进行描述的以产生的抗体分子的糖链结构为基础，选择转化体的方法等。

RDO 构建物可以按照 *Science (科学)*, 273 1386(1996), *Nature Medicine (天然药物)*, 4, 285 (1998), *Hepatology (肝脏病学)*, 25, 1462 (1997), *Gene Therapy (基因治疗)*, 5, 1960 (1999),; *J Mol. Med. (分子药物杂志)*, 75, 829 (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报)* USA, 96, 8774 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报)* USA, 96, 8768

(1999), *Nuc. Acids Res*(核酸研究), 27, 1323(1999), *Invest. Dermatol.*, 111, 1172 (1998), *Nature Biotech.* (自然生物技术), 16, 1343 (1998); *Nature Biotech.* (自然生物技术), 18, 43 (2000); *Nature Biotech.* (自然生物技术), 18, 555 (2000)等中描述的方法设计。

5 (d) 通过 RNAi 的方法制备用于制备本发明细胞的宿主细胞

用于制备本发明细胞的宿主细胞可以通过 RNAi (RNA 干涉) 的方法, 以编码与在细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因为目标制备, 例如, 如下。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA。

确定制备的 cDNA 的核苷酸序列。

15 以确定的 DNA 序列为基础, 设计包括编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的部分 DNA 的适当长度的 RNAi 构建物。设计的构建物可能进一步包括非翻译区的一部分。

20 为了在细胞中表达 RNAi 基因, 通过插入制备的 DNA 片段或全长到合适的表达质粒的启动子的下游来制备重组载体。

通过把重组载体导入适于表达载体的宿主细胞中得到转化体。

用于制备本发明细胞的宿主细胞可以通过选择转化体获得, 转化体的选择是基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或 25 或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性, 或者基于以细胞膜上糖蛋白或者产生的抗体分子的糖链的结构。

作为宿主细胞, 可以使用任何细胞例如酵母, 动物细胞, 昆虫细胞或者植物细胞, 只要它具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的靶酶和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的靶酶的基因。

例子包括在以下的条目 3 中描述的宿主细胞。

作为表达载体，可以使用在宿主细胞中可以自主复制，或者可以整合到染色体中，并且包括设计的 RNAi 可以导入的启动子的载体。此位置可以转入的载体，例子包括在以下的条目 3 中描述的表达载体。

5 作为把基因导入不同的宿主细胞的方法，可以使用将在以下的条目 3 中描述的把适于不同宿主细胞的重组载体导入的方法。

基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性来选择转化体的方法包括在条
10 目 1 (1) (a) 中描述的方法。

基于以细胞膜上糖蛋白的糖链的结构选择转化体的方法包括将在条目 1 (5) 中描述的方法。基于产生的抗体分子的糖链结构选择转化体的方法包括将在条目 4 或者 5 中描述的方法。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶或编码与
15 岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的 cDNA 的方法包括在条目 1(1) (a) 等中描述的 DNA 制备方法。

此外，制备本发明细胞的宿主细胞也可以不使用表达载体，而直接导入基于编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/
20 或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的核苷酸序列设计的 RNAi 基因获得。

RNAi 基因可以使用通常方法或者 DNA 合成仪来制备。

RNAi 基因构建物可以按照在 *Nature*(自然), 391, 806(1998); *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 95, 15502 (1998), *Nature* (自然), 395, 854(1998) ; *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 96, 5049 (1999), *Cell*, 95, 1017 (1998); *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 96, 1451 (1999); *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 95, 13959 (1998), *Nature Cell Biol* (自然细胞生物学). 2, 70(2000) 等描述的方法设计。
30

(e) 通过使用转座子的方法制备用于制备本发明细胞的宿主细胞

制备本发明细胞的宿主细胞可以通过使用在 *Nature Genet.* (自然遗传学), 25, 35(2000) 等中描述的转座子系统导入突变, 然后基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性选择突变体, 或者基于产生的抗体分子的糖链结构或者细胞膜上的糖蛋白的糖链结构选择突变体来制备。

转座子系统是通过在染色体中随机插入外源基因诱发突变的系统, 其中插入在转座子之间的外源基因一般用作诱发突变的载体, 并且同时向细胞中导入用于在染色体中随机插入基因的转位酶表达载体。

可以使用任何转位酶, 只要其适合于使用的转座子的序列。

作为外源基因, 可以使用任何基因, 只要它可以在宿主细胞的 DNA 中诱发突变。

作为宿主细胞, 可以使用任何细胞例如酵母, 动物细胞, 昆虫细胞或者植物细胞, 只要它具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的靶酶和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的靶酶的基因。例子包括在以下的条目 3 中描述的宿主细胞。

基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性选择突变的方法包括条目 1(1) (a) 中描述的方法。

基于在细胞膜上糖蛋白的糖链的结构选择突变的方法包括在下面的条目 1(5) 中描述的方法, 基于产生的抗体分子的糖链结构选择转化体的方法包括将在条目 4 或者 5 中描述的方法。

(2) 导入编码酶的基因的显性负突变体的方法

制备本发明细胞的宿主细胞可以通过靶向编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因, 并且使用导入酶的显性负突变体的技术来制备。与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶包括 GMD, Fx, GFPP,

岩藻糖激酶等等。与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶包括 α 1,6-岩藻糖基转移酶, α -L-岩藻糖苷酶等。

5 酶催化具有底物特异性的特异反应, 编码酶的基因的显性负突变体可以通过断裂酶的活性中心来制备, 该酶催化具有底物特异性的催化活性。制备显性负突变体的方法如下参照在靶酶中的 GMD 有具体的描述。

作为大肠杆菌来源的 GMD 的三维结构分析的结果, 发现 4 个氨基酸 (133 位的苏氨酸, 135 位的谷氨酸, 157 位的酪氨酸和 161 位的赖氨酸) 对于酶活性有重要作用 (*Structure (结构)*, 8, 2, 2000)。即, 10 当基于三维结构的信息, 用其它不同的氨基酸替换的 4 个氨基酸制备突变体, 所有突变体的酶的活性显著下降。另一方面, 几乎不能观察到突变体 GMD 结合于 GMD 辅酶 NADP 或者其底物 GDP-甘露糖的活性的变化。相应的, 通过替换控制 GMD 酶活性的 4 个氨基酸可以制备 15 显性负突变体。例如, 来源于 CHO 细胞的 GMD (SEQ ID NO: 41), 通过比较同源性, 使用基于大肠杆菌来源的 GMD 的结果的氨基酸序列信息预测三维结构, 显性负突变体可以通过用其它的氨基酸替换 155 位的苏氨酸, 157 位的谷氨酸, 179 位的酪氨酸, 和 183 位的赖氨酸来制备。这样导入氨基酸取代的基因的导入可以使用 *Molecular Cloning* 20 (*分子克隆*) 第二版, *Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学指南)* 等中描述的定点突变的方法制备。

用于制备本发明细胞的宿主细胞可以按照 *Molecular Cloning (分子克隆)* 第二版, *Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学指南)* 等中描述的方法制备, 使用制备的靶酶的显性负突变体基因, 25 例如, 如下。

制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的显性负突变体的基因 (以下称为“显性负突变体基因”)。

30 如果必要, 基于制备的显性负突变体基因的全长 DNA, 制备含有编码蛋白质的部分的相应长度的 DNA 片段。

通过插入 DNA 片段或者 DNA 全长至合适的表达载体的启动子的下游来产生重组载体。

通过在适于表达载体的宿主细胞中导入重组载体得到转化体。

用于制备本发明细胞的宿主细胞，可以通过基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶活性，或者基于产生的抗体分子或者细胞膜上糖蛋白的糖链的结构选择转化体来制备。

作为宿主细胞，可以使用任何细胞例如酵母，动物细胞，昆虫细胞或者植物细胞，只要其具有编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的靶酶，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的靶酶的基因。例子包括将在以下的条目 3 中描述的宿主细胞。

作为表达载体，可以使用在宿主细胞中可以自主复制，或者可以整合到染色体中，而且包括编码目的显性负突变体的 DNA 可以有效地进行转录的启动子的载体。例子包括在以下的条目 3 中描述的表达载体。

对于把基因导入不同宿主细胞，可以使用把适于不同宿主细胞的重组载体导入的方法，其在以下的条目 3 中有说明。

基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性选择转化体的方法包括在条目 1 (1) (a) 中描述的方法。

基于细胞膜上糖蛋白的糖链结构选择转化体的方法包括在条目 1 (5) 中描述的方法，基于产生的抗体分子的糖链结构选择转化体的方法包括在以下条目 4 或者 5 中描述的方法。

(3)在酶中导入突变的方法

用于制备本发明细胞的宿主细胞，可以通过把突变导入编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因中，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因中，然后选择在酶中发生了突

变的细胞系而制备。

与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶包括 GMD, Fx, GFPP, 岩藻糖激酶等等。与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶包
5 括 α 1,6-岩藻糖基转移酶, α -L-岩藻糖苷酶等等。

方法包括 1) 基于与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性, 从对亲代细胞系用诱变剂进行突变诱导处理得到的突变体以及自发产生的突变体中
10 选择所需细胞系的方法。2) 基于产生的抗体分子的糖链的结构, 从对亲代细胞系用诱变剂进行突变诱导处理得到的突变体以及自发产生的突变体中选择所需细胞系的方法。3) 基于细胞膜上糖蛋白的糖链结构, 从对亲代细胞系用诱变剂进行突变诱导处理得到的突变体以及自发产生的突变体中选择所需细胞系的方法。

15 作为诱发突变的处理, 可以使用任何的处理手段, 只要其可以在亲代细胞系细胞的 DNA 中诱发点突变或者缺失或者移码突变。

例子包括用乙基亚硝基脲, 亚硝基胍, 苯并芘或者一种吡啶色素以及用辐射处理。并且, 可以使用不同的烷化剂以及致癌剂作为诱变剂。允许诱变剂作用于细胞的方法包括在 *Tissue culture (组织培养)*
20 *Techniques*, 第三版 (Asakura Shoten), 日本组织培养协会编著 (1996), *Nature Genet. (自然遗传学)*, 24, 314 (2000) 等等中描述的方法。

自发产生的突变包括在一般的细胞培养条件下, 不用使用特定的突变诱发处理, 通过连续传代而自发形成的突变。

测定在细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶, 和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的活性的方法包括在条目 1 (1) (a)
25 中描述的方法。辨别制备的抗体分子的糖链结构的方法包括在以下的条目 4 或者 5 中描述方法。辨别细胞膜上糖蛋白的糖链结构的方法包括在条目 1 (5) 中描述的方法。

30 (4) 抑制编码酶的基因的转录和/或翻译的方法

本发明的宿主细胞可以使用例如反义 RNA/DNA 技术[Bioscience

and Industry (生物科学和工业), 50, 322 (1992); *Chemistry* (化学), 46, 681 (1991), *Biotechnology* (生物技术), 9, 358 (1992), *Trends in Biotechnology*(生物技术进展), 10, 87 (1992), *Trends in Biotechnology*(生物技术进展), 10, 152 (1992); *Cell Engineering* (细胞工程), 16, 1463 (1997)], 三股螺旋技术[*Trends in Biotechnology*(生物技术进展), 10, 132 (1992)] 等等, 使用编码细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因, 和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因作为靶基因, 抑制靶基因的转录和/或翻译而制备。

10 与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶包括 GMD, Fx, GFPP, 岩藻糖激酶等等。岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰相关的酶包括 α 1,6-岩藻糖基转移酶, α -L-岩藻糖苷酶等等。

15 (5)选择对可以识别岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链结构的凝集素有抗性的细胞系的方法。

制备本发明细胞的宿主细胞,可以通过使用选择对可以识别岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链结构的凝集素有抗性的细胞系的方法制备。

20 选择对可以识别岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链结构的凝集素有抗性的细胞系的方法包括在 *Somatic Cell Mol. Genet*(体细胞分子遗传学), 12, 51 (1986)等中描述的方法使用凝集素的方法。

25 作为凝集素,可以使用任何凝集素,只要它是可以识别岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链的凝集素。例子包括 *Lens culinaris* 凝集素 LCA(来源于 *Lens culinaris* 的扁豆凝集素), 豌豆凝集素 PSA(来源于 *Pisum sativum* 的豌豆凝集素), 一种蚕豆凝集素 VFA(来源于 *Vicia faba* 的凝集素), *Aleuria aurantia* 凝集素 AAL(来源于 *Aleuria aurantia* 的凝集素)等等。

30 具体的,本发明的对可以识别岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链结构的凝集

素有抗性的细胞系，可以通过培养细胞 1 天到 2 周，优选的从 1 天到 1 周，使用含有凝集素的培养基，其终浓度为 1 微克/毫升到 1 毫克/毫升，存活的细胞传代培养或者挑出一个单克隆并且转移至培养皿中，随后在含有凝集素的培养基中连续培养而选择。

5 2.制备本发明的转基因非人动物或者植物或者它们的后代

转基因非人动物或者植物或者它们的后代,可以从本发明的胚胎干细胞，受精卵细胞，或者植物愈伤组织细胞来制备，其中以抗体分子糖链修饰相关的酶的活性控制了的方式修饰了它们的基因组基因，这些细胞通过以上的条目 1，使用编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶的基因，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶的基因作为靶基因制备，例如，如下。

在转基因的非人动物中，通过如条目 1 描述的方法，本发明的胚胎干细胞中细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶活性得到控制，使其制备成目的非人动物如牛，羊，山羊，猪，马，小鼠，大鼠，鸡，猴，兔等的胚胎干细胞。

具体的，通过已知的同源重组技术[如，*Nature (自然)*, 326, 6110, 295 (1987), *Cell (细胞)*, 51, 3, 503 (1987), 等等]，制备编码与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶，和/或编码与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的基因失效或者用任何序列取代的突变克隆。使用制备好的胚胎干细胞（如，突变的克隆），包括胚胎干细胞克隆和正常细胞的嵌合个体可以通过在一种动物受精卵的胚囊中注射嵌合体的方法或者通过一种嵌合体集簇（aggregation chimera）的方法制备。嵌合个体与正常个体杂交，以便能够得到全部体细胞中与在细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位的糖链修饰有关的酶的活性下降或者缺失的转基因非人动物。

同样的，通过使用与条目 1 类似的方法，制备本发明受精卵细胞，

其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的1位通过 α 键结合于N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰葡萄糖胺6位的糖链修饰有关的酶的活性下降或者缺失，使受精卵成为目的非人动物如牛，羊，山羊，猪，马，小鼠，大鼠，鸡，猴，兔，或者等等的受精卵细胞。

使用 *Manipulating Mouse Embryo* (小鼠胚胎操作)，第二版等等描述的胚胎移植的方法，移植制备的受精卵细胞至假孕雌性动物的输卵管或者子宫中，随后动物分娩来制备转基因的非人动物，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的1位通过 α 键结合于N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰葡萄糖胺6位的糖链修饰有关的酶的活性下降。

在转基因植物中，使用与条目1类似的方法，制备本发明的愈伤组织，其中与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的1位通过 α 键结合于N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰葡萄糖胺6位的糖链修饰有关的酶的活性的下降或者缺失，成为目的植物的愈伤组织或者植物细胞。

转基因植物，其中细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶活性，和/或与岩藻糖的1位通过 α 键结合于N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的N-乙酰葡萄糖胺6位的糖链修饰有关的酶的活性的下降，可以按照已知的方法[*Tissue culture* (组织培养) 20 (1994); *Tissue culture* (组织培养) 21 (1995); *Trends in Biotechnology*(生物技术进展), 15, 45 (1997)], 使用包括植物生长素和细胞分裂素的培养基培养制备的植物愈伤组织，使其重分化来制备。

3.生产抗体组合物的方法

通过用 *Molecular Cloning*(分子克隆)，第二版, *Current Protocols in Molecular Biology, Antibodies, A Laboratory Manual* (现代分子生物学实验方法, 抗体), Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), 1988 (以下也称为“抗体”), *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice* (单克隆抗体: 原理与实践), 第三版, Acad. Press (美国学术出版社), 1993 (以下也称为“单克隆抗体”) 和 *Antibody Engineering* (抗体工程), *A Practical Approach*, IRL Press Oxford University (牛津大学出版) (以下

也称为“*Antibody Engineering (抗体工程)*”)中描述的方法在宿主细胞中表达得到抗体组合物,例如,如下。

制备本发明的编码抗 CD20 的抗体分子的全长 cDNA,制备包括编码抗体分子的区域的合适长度的 DNA 片段。

- 5 通过插入 DNA 片段或 cDNA 全长至合适的表达载体的启动子下游来制备重组载体。

产生抗体分子的转化体可以通过在适于表达载体的宿主细胞中导入重组载体制备。

- 10 作为宿主细胞,可以使用任何的酵母,动物细胞,昆虫细胞,植物细胞等等,只要它可以表达目的基因。

- 15 作为宿主细胞,可以使用其中与修饰结合于抗体分子的 Fc 区域的 N-糖苷键合的糖链相关的酶,例如,与细胞内糖核苷酸、GDP-岩藻糖合成相关的酶,和/或与岩藻糖的 1 位通过 α 键结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰葡萄糖胺 6 位的糖链修饰有关的酶活性的下降或者缺失的细胞,或者通过在条目 1 中描述的不同的人工技术得到的细胞。

作为表达载体,可以使用在宿主细胞中可以自主复制,或者可以整合到染色体中,并且包括编码目的抗体分子的 DNA 可以导入的启动子的载体。

- 20 使用根据条目 1 (1) (a) 中描述的 DNA 制备方法,例如目的抗体分子特异的探针引物,从人或者非人类组织或者细胞中制备 cDNA。

当使用酵母细胞作为宿主细胞,表达载体包括 YEP13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419)等等。

- 25 可以使用任何启动子,只要它可以在酵母中起作用。例子包括糖酵解途径基因的启动子,例如己糖激酶的基因启动子, PH05 启动子, PGK 启动子, GAP 启动子, ADH 启动子, gal 1 启动子, gal 10 启动子, 热休克蛋白启动子, MF α 1 启动子, CUP 1 启动子等等。

- 30 宿主细胞包括属于酵母属,裂殖酵母属,克鲁维酵母属,卵形丝孢酵母属, *Schwanniomyces* 属等的微生物,如酿酒酵母,裂殖酵母,乳酸克鲁维酵母, *Trichosporon pullulans* 和 *Schwanniomyces alluvius*。

作为导入重组载体的方法,可以使用任何方法,只要可以在酵母

中导入 DNA。例子包括电穿孔[*Methods in Enzymology* (酶学方法), 194, 182 (1990)], 原生质体方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报) USA*, 83, 1929 (1978)], 乙酸锂方法[*J Bacteriol*, 153, 163 (1983)], 在 *Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报) USA*, 75, 1929 (1978) 等中描述的方法。

5 当动物细胞用作宿主, 表达载体包括 pcDNA1, pcDM8 (在 Funakoshi 可以购到), pAGE107 [日本公开的审查的专利申请 22979/91 号; *Cytotechnology* (电穿孔), 3, 133 (1990)], pAS3-3 (日本公开的审查的专利申请号 227075/90), pCDM8 [*Nature* (自然), 329, 840 (1987)], pcDNA1/Amp (Invitrogen 生产), pREP4 (Invitrogen 生产), pAGE 103 [*J. Biochemistry* (生物化学杂志), 101, 1307 (1987)],
10 pAGE210 等等。

可以使用任何启动子, 只要其可以在动物细胞中起作用。例子包括巨细胞病毒(CMV)的 IE 基因的启动子 (超早期), SV40 的早期启动子, 反转录病毒启动子, 金属硫蛋白启动子, 热休克启动子, SR α 启动子等等。同时也可以与启动子一齐使用人 CMV 的 IE 基因的增强子。
15

宿主细胞包括人细胞如 Namalwa 细胞, 猴细胞如 COS 细胞, 中国仓鼠细胞如 CHO 细胞或者 HBT5637 (日本公开的审查的专利申请 299/88 号), 大鼠骨髓瘤细胞, 小鼠骨髓瘤细胞, 来源于叙利亚仓鼠肾的细胞, 胚胎干细胞, 受精卵细胞等等。

20 作为导入重组载体的方法, 可以使用任何方法, 只要该方法可以在动物细胞中导入 DNA。例子包括电击转化[*Cytotechnology* (电穿孔), 3, 133 (1990)], 磷酸钙方法(日本公开的审查的专利申请 227075/90 号), 脂质体感染方法 [*Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报) USA*, 84, 7413 (1987)], 注射方法 [*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual* (小鼠胚胎的操作: 实验手册)], 使用基因枪的方法 (基因枪) (日本专利 2606856 号, 日本专利 2517813 号), DEAE-dextran 方法
25 [*Biomanual Series 4-Gene Transfer and Expression Analysis* (生物手册 4-基因转移和表达分析) (Yodo-sha), 由 Takashi Yokota 和 Kenichi Arai 编辑(1994)], 病毒载体方法 [*Manipulating Mouse Embryo* (小鼠胚胎操作),
30 第二版] 等等。

当用昆虫细胞作为宿主时, 可以用 *Current Protocols in Molecular*

Biology (现代分子生物学指南), *Baculovirus expression Vectors, A Laboratory Manual*(实验手册), W.H. Freeman and Company, New York (1992), *Bio/Technology*(生物/技术), 6, 47 (1988) 等中描述的方法表达蛋白。

- 5 即, 通过将重组基因导入载体和杆状病毒, 再导入昆虫细胞, 在昆虫细胞培养基的上清中得到重组病毒, 然后用重组病毒感染昆虫细胞来表达此蛋白。

在此方法中使用的基因导入载体包括 pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (均 Invitrogen 生产) 等等。

- 10 杆状病毒包括感染昆虫 *Barathra* 家族的苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒。

- 此昆虫细胞包括 *Spodoptera frugiperda* 卵巢 Sf9 和 Sf21 [*Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学指南), *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*(实验手册), W. H. Freeman and Company, New York (1992)], *Trichoplusia ni* ovarian High 5 (Invitrogen 生产)等等。

- 同时导入重组基因导入载体和杆状病毒用于制备重组病毒的方法包括磷酸钙方法[日本公开的审查的专利申请 227075/90 号], 脂质体感染方法 [*Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院报) USA, 84 7413 (1987)] 等等。

20 当植物细胞用作宿主细胞时, 表达载体包括 Ti 质粒, 番茄花叶病毒等等。

- 作为启动子, 可以使用任何启动子, 只要其可以作用于植物细胞。例子包括花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 启动子, 水稻肌动蛋白 1 启动子等等。

宿主细胞包括烟草, 马铃薯, 番茄, 胡萝卜, 大豆, 油菜, 苜蓿, 水稻, 小麦, 大麦等的植物细胞。

- 作为导入重组载体的方法, 可以使用任何方法, 只要其可以把 DNA 导入植物细胞中。例子包括使用 *Aprobacterium* 的方法 (日本公开的审查的专利申请 140885/84 号, 日本公开的审查的专利申请 70080/85 号, WO 94/00977), 电穿孔 (日本公开的审查的专利申请 251887/85 号),

使用基因枪的方法(基因枪)(日本专利 2606856 号,日本专利 2517813 号)等。

作为表达基因,分泌产物,表达 Fc 区域与其它蛋白的融合蛋白的方法,除了直接表达外,可以根据 *Molecular Cloning (分子克隆)* 第二版等描述的方法进行。

当用细菌,酵母,动物细胞,昆虫细胞或者植物细胞进行基因表达时,导入与合成糖链有关基因,通过导入的基因获得加入糖或者糖链的抗体。

通过在培养基中培养得到的转化体,在培养基中形成和积累抗体分子,然后从培养基中回收抗体组合物来得到抗体组合物。根据用于培养宿主细胞的一般方法,使用培养基,进行培养转化体。

对于使用一种原核细胞如大肠杆菌或者真核细胞如酵母来作为宿主,培养得到的转化体的培养基既可以是天然培养基,也可以是合成的培养基,只要其包括如碳源,氮源,无机盐等等物质,这些物质可以被生物同化作用利用,而且也可以有效地进行转化体的培养。

作为碳源,可以使用那些能被生物体同化的物质。例子包括糖类,如葡萄糖,岩藻糖,蔗糖,以及含有它们的糖蜜,淀粉,和淀粉水解产物,有机酸如醋酸和丙酸;醇类如乙醇和丙醇;以及类似物。

氮源包括氨,无机酸的铵盐或者有机酸如氯化铵,硫酸铵,醋酸铵和磷酸铵;其它的含氮化合物;蛋白胨;肉膏;酵母提取物;玉米浸出液;酪蛋白水解物;粗大豆粉;粗大豆粉水解物;各种发酵的细胞及其水解物等。

无机矿物质包括磷酸二氢钾,磷酸氢二钾。磷酸镁,硫酸镁,氯化钠,硫酸铁,硫酸锰,硫酸铜,碳酸钙等。

培养一般是在有氧气的条件下进行如振荡培养或者在水中通气搅拌培养。培养温度优选为 15 到 40°C,而且培养时间一般为 16 小时到 7 天。在培养中,pH 保持在 3.0 到 9.0。用无机酸或者有机酸,碱性溶液,尿素,碳酸钙,氨等调节 pH 值。

同时,如果有必要可以在培养过程中在培养基中加入抗生素,如氨基青霉素或者四环素等。

当培养使用诱导型启动子作为启动子,得到的重组载体转化的微

生物时，如果有必要，可以在培养基中加入诱导物。例如，当培养使用 lac 启动子得到的重组质粒转化的微生物时，可以在培养基中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷，并且当培养使用 trp 启动子得到的重组质粒转化的微生物时，可以将 indoleacrylic acid 加入到培养基中。

5 当培养用动物细胞作为宿主细胞得到的转化体时，培养基的例子包括一般常用的 RPMI1640 培养基 [*The Journal of the American Medical Association*(美国医学协会杂志), 199, 519 (1967)], Eagle's MEM 培养基 [*Science* (科学), 122, 501 (1952)], Dulbecco's 修饰的 MEM 培养基 [*Virology* (病毒学), 8, 396 (1959)], 199 培养基[*Proceeding of the*
10 *Society for the Biological Medicine* (生物医学协会进展), 73, 1 (1950)] 和 Whitten's 培养基 [*Developmental Engineering Experimentation Manual-Preparation of Transgenic Mice* (工程实验进展手册-制备转基因小鼠) (Kodan-sha), M. Katshuki 编著 (1987)], 其中培养基加入了胎牛血清。

15 培养一般在 pH6 到 8, 30 到 40°C, 有 5% 的 CO₂ 下培养 1 到 7 天。

如果有必要，可以在培养过程中在培养基中加入抗生素，如卡那霉素或者青霉素。

培养昆虫细胞作为宿主细胞得到的转化体的培养基，一般使用
20 TNM-FH 培养基 (Pharmingen 制造), Sf900 II SFM 培养基 (Life Technologies 制造), ExCell 400 和 ExCell 405 (两者均由 JRH Biosciences 制造), Grace's 昆虫培养基 [*Nature* (自然), 195, 788 (1962)] 等。

培养一般在 pH6 到 7, 25 到 30°C 下培养 1 到 5 天。

25 如果有必要，在培养过程中可以在培养基中加入抗生素，如庆大霉素。

用植物细胞作为宿主细胞的转化体可作为细胞培养，或者通过使其分化成为植物细胞或者植物器官。用于培养转化体的培养基包括一般常用的 Murashige 和 Skoog (MS) 培养基和 White 培养基，其中的培
30 培养基加入植物激素如植物生长素或者细胞分裂素。

培养一般在 pH5 到 9, 20 到 40°C 下培养 3 到 60 天。

如果有必要，培养过程中可以在培养基中加入抗生素，如卡那霉素，潮霉素等。

这样，通过培养转化体可以生产抗体组合物，转化体来源于微生物，动物细胞或者植物细胞，这些细胞包含有重组载体，其中插入了编码抗体分子的 DNA 片段，按照一般的培养方法，在其中形成和积累抗体组合物，然后从培养基中回收抗体组合物。

除了直接表达，对于表达基因，分泌产物，表达融合蛋白等的方法可以按照在 *Molecular Cloning* (分子克隆) 第二版等说明的方法进行。

用于生产抗体组合物的方法包括在宿主细胞的细胞内表达的方法，宿主细胞的细胞外分泌的方法，以及在宿主细胞的膜的外侧产生的方法。可以通过改变使用的宿主细胞或者生产的抗体组合物的结构来选择方法。

当本发明的抗体组合物在宿主细胞中产生或者在宿主细胞膜的外层产生，按照 Paulson 等人 [*J.Biol.Chem.* (生物化学杂志), 264, 17619 (1989)]的方法，Lowe 等人 [*Proc. Natl. Acad. Sci.(美国科学院院报) USA*, 86, 8227 (1989), *Genes Develop.* (基因进展), 4, 1288 (1990)]的方法，在日本公开的审查的专利申请 336963/93 号和在日本公开的审查的专利申请 823021/94 号等描述的方法可以直接将产物分泌到细胞外。

即，通过使用重组 DNA 技术，在表达载体中插入编码抗体分子的 DNA 和适于表达抗体分子的编码信号肽的 DNA，将表达载体导入到宿主细胞中，随后表达抗体分子，目的抗体分子直接从宿主细胞分泌到胞外。

同样地，可以按照日本公开的审查的专利申请 No. 227075/90 号所述的方法，使用的基因扩增系统（用二氢叶酸还原酶的基因）增加其产量。

此外，抗体组合物也可以通过使用转基因动物个体（转基因非人动物）或者转基因植物个体（转基因植物）产生，它们是通过将导入了基因的动物细胞或者植物细胞重分化来构建的。

当转化体是动物个体或者植物个体，可以按照一般的方法，通过饲养或者培养其来形成和积累抗体组合物，然后从动物个体或者植物

个体中回收抗体组合物来产生抗体组合物。

使用动物个体生产抗体组合物的方法，包括根据已知方法
[*American Journal of Clinical Nutrition*(美国临床营养学杂志), 63, 639S
(1996); *American Journal of Clinical Nutrition*(美国临床营养学杂志),
5 63, 627S (1996) ; *Bio/Technology*(生物/技术), 9, 830 (1991)], 通过导入
基因构建的动物中来生产目的抗体组合物的方法。

在一个动物个体的例子中，可以通过饲养其中导入编码抗体分子的
DNA 的转基因的非人动物，使其在动物中形成和积累抗体组合物，
然后从动物中回收抗体组合物来产生抗体组合物。在动物身体上生产
10 和积累抗体组合物的部位包括乳汁（日本公开的审查的专利申请号
309192/88）和动物的卵。在这种情况下使用的启动子，可以使用任何
启动子，只要其在动物中有作用。优选的例子包括哺乳动物乳腺细胞
特异的启动子，如 α 酪蛋白启动子， β 酪蛋白启动子， β 乳球蛋白启动
子和乳清酸蛋白启动子。

15 使用植物个体生产抗体组合物的方法包括根据已知方法 [*Tissue
culture* (组织培养), 20 (1994), *Tissue culture* (组织培养), 21 (1995),
Trends in Biotechnology(生物技术进展), 15, 45 (1997)], 通过培养导入编
码抗体分子的 DNA 的转基因植物，产生抗体组合物，在植物中形成和
积累抗体组合物，然后从植物中回收这些抗体组合物的方法。

20 关于纯化导入编码抗体分子的基因的转化体产生的抗体组合物，
例如，当抗体分子在细胞内以不溶的形式表达，在培养后，通过离心
回收细胞，悬浮于缓冲水溶液中，然后用超声波仪，French press, Manton
Gaulin 匀浆器，dynamill 等破碎细胞，得到无细胞的提取物。使用一般
的酶分离纯化技术，如溶剂抽提；硫酸铵盐析等；脱盐；用有机溶剂
25 沉淀；使用如二乙基氨基乙基(DEAE)-琼脂糖或者 DIAION HPA-75
(Mitsubishi Chemical 生产)树脂的阴离子交换层析；使用 S-琼脂糖 FF
(Pharmacia 生产)树脂的阳离子交换层析；用如丁基-琼脂糖或者苯基
-琼脂糖树脂的疏水层析；使用分子筛的凝胶过滤；亲和层析；色谱聚
焦；电泳如，等电聚焦等方法（这些方法可以单独使用或者组合使用），
30 从通过离心无细胞提取物而得到的上清液中，可以得到纯化的抗体组
合物产物。

同样地，当抗体组合物在细胞内表达，形成包涵体时，回收细胞，以同样的方式破细胞并且离心，抗体组合物的包涵体以沉淀部分的形式回收。回收的抗体组合物包涵体通过使用蛋白变性剂溶解。抗体组合物溶通过稀释或者透析解的溶液，变为正常的三维结构，通过同样的分离纯化方法得到抗体组合物的纯化产物。

当细胞外分泌抗体组合物时，抗体组合物或其衍生物可以从培养基上清中回收。即，培养基用例如离心的技术处理，获得可溶成分，抗体组合物的纯化制剂可以用同样的分离提纯方法从可溶成分中获得。

如此得到的抗体组合物包括抗体，抗体的片段，和包括抗体 Fc 区域的融合蛋白。

作为获得抗体组合物的例子，产生人源化抗体组合物的方法在以下详细描述，但是别的抗体组合物也可以用相似的方法获得。

(1) 构建表达人源化抗体的载体

表达人源化抗体的载体是动物细胞的表达载体，其中插入了编码人抗体的重链（H 链）和轻链（L 链）的 C 区的基因，表达人源化抗体的载体可以通过把编码人抗体 H 链和 L 链的 C 区的基因克隆进入动物细胞的表达载体而构建。

人抗体的 C 区可以是任何人抗体的 H 链和 L 链的 C 区。例子包括属于人抗体 H 链中的 IgG1 亚类的 C 区（以下称为“hC γ 1”），属于人抗体 L 链中的 κ 类的 C 区（以下称为“hC κ ”）等。

作为编码人抗体 H 链和 L 链的 C 区的基因，可以使用包含外显子和内含子的基因组 DNA，也可以使用 cDNA。

作为动物细胞的表达载体，可以使用任何载体，只要编码人抗体的 C 区的基因可以插入并且可以在此表达。例子包括 pAGE107 [Cytotechnology (电穿孔), 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem. (生物化学杂志), 101, 1307(1987)], pHSG274 [Gene (基因), 27, 223 (1984)], pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci.(美国科学院院报) USA, 78, 1527 (1981), pSGI β d2-4 [Cytotechnology (电穿孔), 4, 173(1990)]等等。

动物细胞表达载体中的启动子和增强子的例子包括 SV40 早期启动子和增强子[J. Biochem. (生物化学杂志), 101, 1307(1987)], 莫洛尼鼠白

血病病毒 LTR 启动子[*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (生物化学与生物物理研究通讯), 149, 960(1987)], 免疫球蛋白 H 链启动子[*Cel (细胞)* 1, 41, 479(1985)]和增强子[*Cel (细胞)* 33, 717(1983)]等。

表达人源化抗体的载体可以是任何类型, 其中编码抗体 H 链和 L 链的基因存在于不同载体上或者存在于同一载体上(以下称为“串联式”)。考虑构建表达人源化抗体的载体的容易性, 导入动物细胞和动物细胞中抗体 H 链的容易性和 L 链表达量的平衡, 优选表达人源化抗体的串联式载体[*J. Immunol Methods* (免疫学方法杂志), 167, 271 (1994)]。表达人源化抗体的串联式载体包括 pKANTEK93[*Mol. Immunol* (分子免疫学), 37, 1035 (2000)], pEE18 [*Hybridoma (杂交瘤)*, 17, 559 (1998)]等等。

构建的表达人源化抗体的载体可以用于在动物细胞中表达人嵌合抗体和人 CDR-移植抗体。

(2) 制备编码来源于非人动物的抗体的 V 区的 cDNA

编码来源于非人动物的抗体, 例如鼠抗体的 H 链和 L 链的 V 区的 cDNA 可以用以下方法获得。

从产生目的鼠抗体的杂交瘤细胞中提取 mRNA, 由 mRNA 合成 cDNA。合成的 cDNA 克隆进入载体, 例如噬菌体或质粒, 获得 cDNA 文库。每个含有编码 H 链 V 区的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒, 和每个含有编码 L 链 V 区的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒通过用现有的鼠抗体的 C 区部分或 V 区部分作为探针从文库中分离出来。确定重组噬菌体或重组质粒中目的鼠抗体的 H 链和 L 链的 V 区的核苷酸全序列, 从核苷酸序列推导出 H 链和 L 链的 V 区的氨基酸全序列。

作为非人动物, 可以使用任何动物例如小鼠, 大鼠, 仓鼠, 兔等, 只要可以从其中产生出杂交瘤细胞。

从杂交瘤细胞中制备总 DNA 的方法包括硫代氰酸胍-三氟乙酸铯法[*Methods in Enzymology* (酶学方法), 154, 3(1987)]等。从总 DNA 中制备 mRNA 的方法包括 oligo(dT)-固定的纤维素柱方法 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(分子克隆: 实验手册), Cold Spring Harbor Lab. Press (冷泉港实验室出版) New york, 1989) 等。另外, 从杂交瘤细胞中制备 mRNA 的试剂盒包括 Fast Track mRNA 分离试剂盒

(Invitrogen 生产), 快速制备 mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 生产) 等。

合成 cDNA 和制备 cDNA 文库的方法包括常规方法 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验手册), Cold Spring Harbor Lab. Press (冷泉港实验室出版) New York 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验方法), 增刊 1-34); 使用商业上可获得的试剂盒的方法, 例如用于 cDNA 合成和质粒克隆的 SuperScript™ 质粒系统 (GIBCO BRL 生产), 和 ZAP-cDNA 合成试剂盒 (Stratagene 生产) 等。

在制备 cDNA 文库中, 载体, 其中杂交瘤细胞中提取的 mRNA 作为模板合成的 cDNA 插入到载体中, 可以是任何载体, 只要 cDNA 可以插入。例子包括 ZAP Express [*Strategies*, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [*Nucleic Acids Research* (核酸研究), 17, 9494(1989)], λzapII (Stratagene 生产), λgt10 和 λgt11 [*DNA Cloning, A Practical Approach*, I, 49(1985)], Lambda BlueMid (CLONTECH 生产), λExCell 和 PT7T3 18U (Pharmacia 生产), pcD2 [*Mol Cell Biol.*, 3, 280 (1983)], pUC18 [*Gene* (基因), 33, 103 (1985)] 等。

作为噬菌体或质粒载体构建的 cDNA 文库导入的大肠杆菌, 可以使用任何的大肠杆菌, 只要 cDNA 文库可以导入, 表达和维持。例子包括 XL1-Blue MRF' [*Strategies*, 5, 58 (1992)], C600 [*Genetics* (遗传学), 39, 440(1954)], Y1088 和 Y1090 [*Science* (科学), 222, 778 (1983)], NM522 [*J Mol. Biol.* (分子生物学杂志), 166, 1 (1983)], K802 [*J Mol. Biol.* (分子生物学杂志), 16 118 (1966)], JM105 [*Gene* (基因), 38, 275 (1985)] 等。

作为从 cDNA 文库中选择编码来源于非人动物的抗体的 H 链和 L 链 V 区的 cDNA 克隆的方法, 可以使用利用同位素或荧光标记探针的克隆杂交或噬菌斑杂交 (*Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版, Cold Spring Harbor Lab. Press (冷泉港实验室出版) New York, 1989)。可以通过制备引物和进行聚合酶链式反应 (以下称为“PCR”, *Molecular Cloning* (分子克隆), 第二版, Cold Spring Harbor Lab. Press (冷泉港实验室出版) New York, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验方法), 增刊 1-34), 使用由 mRNA 合成的 cDNA

或 cDNA 文库作为模板，制备编码 H 链和 L 链的 cDNA。

cDNA 的核苷酸序列可以通过用合适的限制性内切酶消化所选的 cDNA，然后把片段克隆进入质粒例如 pBluescript SK (-) (Stratagene 生产)，进行常用的核苷酸序列分析方法，例如 Sanger 等人的双脱氧法
5 [Proc. Natl. Acad. Sci.(美国科学院院报) USA, 74, 5463 (1977) 的反应，然后使用自动核苷酸序列分析仪例如 A.L.F.DNA 测序仪 (Pharmacia 生产) 分析克隆。

获得的 cDNA 是否编码含有分泌信号序列的抗体 H 链和 L 链 V 区的全长氨基酸序列，可以从确定的核苷酸序列推导出 H 链和 L 链的 V
10 区的全长氨基酸序列，并且与已知抗体的 H 链和 L 链的 V 区的全长氨基酸序列 [Sequences of proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (具有免疫学重要性的蛋白质的序列, 美国, 健康与人类服务进展) (1991)] 比较加以确定。

而且，当抗体可变区的氨基酸序列或编码可变区的 DNA 的核苷酸
15 序列是已知时，可以根据以下方法制备 cDNA。

当氨基酸序列已知时，氨基酸序列基于密码子选择的频率转化为 DNA 序列 [Sequences of proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (1991) (具有免疫学重要性的蛋白质的序列, 美国, 健康与人类服务进展)]，基于设计的 DNA 序列合成几种
20 长度约 100 个碱基的 DNA，使用此 DNA 进行 PCR，制备 cDNA。当核苷酸序列已知时，基于设计的 DNA 序列合成几种长度约 100 个碱基的 DNA，使用 DNA 进行 PCR，制备 cDNA。

(3) 来源于非人动物的抗体的 V 区的氨基酸序列分析

关于包括分泌信号序列的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的全长氨基酸
25 序列，分泌信号序列和 N-端氨基酸序列的长度可以推导出来，通过把它们与已知抗体的 H 链和 L 链的 V 区的全长氨基酸序列 [Sequences of proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (具有免疫学重要性的蛋白质的序列, 美国, 健康与人类服务进展) (1991)] 加以比较，可以发现它们所属的亚群。另外，可以通过把它们
30 与已知抗体的 H 链和 L 链的 V 区的氨基酸序列 [Sequences of proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (具有免疫

学重要性的蛋白质的序列，美国，健康与人类服务进展）(1991)]加以比较，也可发现 H 链和 L 链的 V 区的每个 CDR 的氨基酸序列。

(4) 表达人嵌合抗体的载体的构建

表达人嵌合抗体的载体的构建，如条目 3 (1) 中描述的，通过在
5 人源化抗体表达的载体中，把编码来源于非人动物的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的 cDNA 克隆进入编码人抗体的 H 链和 L 链的 C 区的基因的上游。例如，表达人嵌合抗体的载体可以通过把编码来源于人类动物的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的每个 cDNA，与合成的 DNA 加以连接构建，此处合成的 DNA 包括来源于非人动物的抗体的 H 链和 L 链的 V
10 区的 3'-末端核苷酸序列，人抗体的 H 链和 L 链的 C 区的 5'-末端核苷酸序列，并且在两个末端都有合适的限制性内切酶识别位点，和把它们克隆到载体中含有的编码人抗体的 H 链和 L 链的 C 区的基因的上游，此载体是如条目 3 (1) 所描述构建的适合表达的人源化抗体的表达载体。

15 (5) 编码人 CDR-移植抗体 V 区的 cDNA 的构建

编码人 CDR-移植抗体 H 链和 L 链的 V 区的 cDNA 可以如以下获得。首先，选择用于移植来源于非人动物的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的 CDR 的人抗体的 H 链和 L 链的 V 区的框架（以下称为“FR”）的氨基酸。作为人抗体 H 链和 L 链 V 区 FR 的氨基酸序列，任何氨基酸都
20 可以使用，只要它们来源于人抗体。例子包括数据库，例如蛋白质数据库中登记的人抗体 H 链和 L 链 V 区 FR 的氨基酸序列，通常人抗体 H 链和 L 链 V 区 FR 的每个亚群的氨基酸序列[*Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services (具有免疫学重要性的蛋白质的序列，美国，健康与人类服务进展) (1991)]等。为
25 了制备有效活性的人 CDR-移植抗体，优选的选择与来源于非人动物的目的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的氨基酸序列同源性尽可能高的氨基酸序列（至少 60% 或更多）。

然后，来源于非人动物的目的抗体的 H 链和 L 链的 V 区的 CDR 氨基酸序列，移植到选择的人抗体的 H 链和 L 链的 V 区的 FR 氨基酸
30 序列，设计人 CDR-移植抗体 H 链和 L 链 V 区的氨基酸序列。考虑抗体基因核苷酸序列中发现的密码子选择的频率，把设计的氨基酸序列

转变为 DNA 序列[*Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services (具有免疫学重要性的蛋白质的序列, 美国, 健康与人类服务进展) (1991)], 设计编码人 CDR-移植抗体 H 链和 L 链 V 区氨基酸序列的 DNA 序列。以设计的 DNA 序列为基础, 合成几种长度约 100 个碱基的合成 DNA, 使用它们进行 PCR。在此情况下, 考虑到 PCR 的反应效率和可以合成的 DNA 的长度, 每种 H 链和 L 链优选设计 4 到 6 种合成 DNA。

而且, 通过把合适的限制性内切酶的识别位点导入存在于合成 DNA 的两个末端的 5'-端, 合成 DNA 可以容易的克隆进入在条目 3(1) 中构建的, 用于人源化抗体表达的载体中。PCR 后, 扩增的产物克隆进入质粒例如 pBluescript SK (-) (Stratagene 生产) 或相似的质粒, 通过条目 3(2) 中的方法确定核苷酸序列, 获得含有编码需要的人 CDR-移植抗体的 H 链和 L 链的 V 区的氨基酸序列的 DNA 序列的质粒。

(6) 构建用于人 CDR-移植抗体表达的载体

通过把编码条目 3(5) 中构建的人 CDR-移植抗体 H 链和 L 链的 V 区的 cDNA 克隆进入编码条目 3(1) 中描述的用于人源化抗体表达的载体中的人抗体的 H 链和 L 链的 C 区基因的上游, 构建用于人 CDR-移植抗体表达的载体。例如, 通过在条目 3(5) 中进行 PCR 构建 H 链和 L 链的 V 区时, 把合适的限制性内切酶识别序列导入所用的合成的 DNA 片段两个末端的 5'-末端中, 这样人 CDR-移植抗体 H 链和 L 链的 V 区 cDNA 可以克隆进入如条目 3(1) 中描述的用于人源化抗体表达的载体中编码人抗体的 H 链和 L 链的 C 区的基因的上游, 以这样的方式它们可以以合适的方式表达。

(7) 稳定产生人源化抗体

通过把条目 3(4) 或 (6) 中描述的表达人源化抗体的载体导入合适的动物细胞, 能获得稳定产生人嵌合抗体和人 CDR-移植抗体 (在下文中两者都称为“人源化抗体”) 的转化体。

把表达人源化抗体的载体导入细胞的方法包括电穿孔[日本公开的审查的专利申请 25789 1/90 号, *Cytotechnology* (电穿孔), 3, 133 (1990)] 等。

作为表达人源化抗体的载体导入的动物细胞, 可以使用任何细胞,

只要是产生人源化抗体的动物细胞。

例子包括小鼠骨髓瘤细胞，例如 NS0 细胞和 SP2/0 细胞，中国仓鼠卵巢细胞，例如 CHO/dhfr⁻细胞和 CHO/DG44 细胞；大鼠骨髓瘤细胞，例如 YB2/0 细胞和 IR983F 细胞；来源于叙利亚仓鼠肾的 BHK 细胞；人骨髓瘤细胞例如 Namalwa 细胞等。优选中国仓鼠卵巢细胞 CHO/DG44 细胞和大鼠骨髓瘤细胞 YB2/0 细胞。

导入表达人源化抗体的载体后，根据日本公开的审查的专利申请号 257891/90 中公开的方法，使用用于动物细胞培养的含有例如 G418 硫酸盐（以下称为“G418”，由 SIGMA 制备）的培养基，选择能够稳定产生人源化抗体的转化体。作为动物细胞培养的培养基，可以提及的是 RPMI 1640 培养基（Nissui Pharmaceutical 生产），GIT 培养基（Nihon Pharmaceutical 生产），EX-CELL 302 培养基（JRH 生产），IMDM 培养基（GIBCO BRL 生产），Hybridoma-SFM 培养基（GIBCO BRL 生产），往这些培养基中加入多种添加剂例如胎牛血清（以下称为“FCS”）获得的培养基等。通过在培养基中培养获得的转化体，在培养基中产生和积累人源化抗体。培养基中产生和抗原结合活性可以用例如酶联免疫吸附试验[以下称为“ELISA”，*Antibodies: A Laboratory Manual*(实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory, 第 14 章(1998), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (美国学术出版社) Limited (1996)]等方法测定。而且，根据日本公开的审查的专利申请 257891/90 号中公开的方法，使用 DHFR 基因扩增系统，可以使通过转化体产生人源化抗体的产量增加。。

使用蛋白 A 柱[*Antibodies: A Laboratory Manual*(抗体: 实验手册) Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), 第 8 章 (1988), *Monoclonal Antibodies Principles and Practice* (单克隆抗体: 原理于实践), Academic Press (美国学术出版社) Limited (1996)], 从转化体的培养基上清中纯化人源化抗体。另外，也可以使用一般用于纯化蛋白质的纯化方法。例如，通过凝胶过滤，离子交换层析，超滤相结合进行提纯。能够分别测定纯化的人源化抗体的 H 链，L 链和整体抗体分子的分子量，例如，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳[以下称为“SDS-PAGE”，*Nature* (自然), 227, 680 (1970)], 免疫印迹法[*Antibodies A Laboratory*

Manual(抗体: 实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), 第12章(1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and practice (单克隆抗体: 原理于实践)*, Academic Press (美国学术出版社) Limited (1996)]等。

5 所以, 使用动物细胞作为宿主制备抗体组合物的方法已有描述, 但是, 如以上所描述, 抗体组合物也可以通过用如动物细胞的相同方法, 用酵母, 昆虫细胞, 植物细胞, 动物个体或植物个体制备。

当宿主细胞有表达抗体分子的能力时, 本发明的抗体组合物可以通过用条目1中描述的方法制备表达抗体分子的细胞, 培养细胞, 然后从所得培养基中纯化目的抗体组合物制备。

4. 抗体组合物的活性测定

15 作为测定纯化的抗体组合物的蛋白质的量, 纯化抗体组合物与抗原结合的活性和效应子功能的方法, 可以使用 *Monoclonal Antibodies, Antibody Engineering (单克隆抗体: 原理于实践)* 等中描述的已知方法等。

例如, 当抗体组合物是人源化抗体时, 与抗原结合的活性和与抗原-阳性培养细胞系结合的活性可以用例如 ELISA 和免疫荧光方法[, 36, 373 (1993)]测定。对抗原-阳性细胞系的细胞毒活性可以通过测定 CDC 活性, ADCC 活性[*Cancer Immunol Immunother. (癌症免疫治疗)*, 36, 373 20 (1993)]等进行测定。

而且, 抗体组合物在人中的安全性和治疗效果可以使用合适的与人近似的动物种类模型, 例如食蟹猴评价。

5. 抗体组合物中糖链的分析

25 在各种细胞中表达的抗体分子的糖链结构可以根据糖蛋白的糖链结构的一般分析进行分析。例如, 结合于 IgG 分子的糖链包括中性糖链例如半乳糖, 甘露糖或岩藻糖, 氨基糖例如 N-乙酰氨基葡萄糖, 酸性糖例如唾液酸, 可以通过例如使用糖组合物分析糖链结构, 二维糖链图谱等方法分析。

(1) 中性糖和氨基糖成分的分析

30 抗体组合物的糖链可以通过把糖链用酸例如三氟乙酸酸解, 释放出中性糖和氨基糖, 测定组合物比率来分析。

例子包括使用由 Dionex 生产的糖组合物分析仪 (BioLC) 的方法。BioLC 是一种用 HPAEC-PAD (高效阴离子交换色谱法脉冲电流测定) [*J Liq. Chromatogr. (液相色谱杂志)*, 6, 1577 (1983)] 分析糖组合物的仪器。

- 5 组合物的比率也可以用使用 2-氨基吡啶的荧光标记法分析。具体的, 把酸解过的样品用 2-氨基吡啶化的荧光标记, 然后 HPLC 分析组合物, 组合物的比率可以根据已知方法 [*Agric. Biol Chem. (农业生物化学)*, 55(1), 283-284 (1991)] 计算,

(2) 糖链结构的分析

- 10 抗体分子的糖链结构可以用二维糖链图谱法分析 [*Anal Biochem. (农业生物化学)*, 171, 73 (1988), *Biochemical Experimentation Methods 23 - Methods for Studying Glycoprotein Sugar Chains (生物化学实验方法 23-研究糖蛋白糖链的方法)* (Japan Scientific Societies Press (日本科学学会出版)) 由 Reiko Takahashi 编辑(1989)]。二维糖链图谱法是通过, 15 例如, 分别用反相色谱法得到的糖链的滞留时间或洗脱位置作为 X 轴, 正相色谱法得到的糖链的滞留时间或洗脱位置作为 y 轴, 把它们与已知糖链的结果相比较, 从而推导糖链结构的方法。

- 具体的, 把抗体胥解, 糖链从抗体释放出来, 释放的糖链用 2-氨基吡啶 (以下称为“PA”) 荧光标记 [*J. Biochem.*, 95, 197(1984)], 然后糖 20 链通过凝胶过滤, 和反相色谱, 从过量 PA-处理试剂中分离出来。然后, 分离的糖链的每个峰经正相色谱法分离。通过把得到的结果标绘在二维糖链图谱上, 把它们与糖链标准点 (由 Takara Slluzo 绘制) 或文献 [*Anal Biochem.*, 171, 73 (1988)] 比较推导出糖链结构。

- 通过二维糖链图谱方法推导出的结构可以进一步用质谱法, 例如 25 每个糖链的 MALDI-TOF-MS 确证。

6. 识别抗体分子糖链结构的免疫测定法

- 抗体组合物包括不同的抗体分子, 其中结合于抗体 Fc 区的糖链在结构上是不同的。在本发明的抗体组合物中, 在总的与抗体组合物 Fc 区结合的 N-糖苷键合的复合糖链中, 岩藻糖不与糖链中的 N-乙酰氨基 30 葡萄糖还原性末端结合的糖链的比率是 20% 或更多, 抗体组合物有有效的 ADCC 活性。抗体组合物可以用条目 5 中描述的分析抗体分子的

糖链结构的方法鉴定。抗体组合物也可以用利用凝集素的免疫测定法鉴定。

根据已知的免疫测定方法,例如 *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* (单克隆抗体: 原理与应用), Wiley-Liss, Inc.(1995),
 5 *Immunoassay*,第三版., Igakushoin (1987), *Enzyme Antibody Method* (酶抗体方法), 修订版, Gakusai Kikaku (1985) 中描述的 Western 染色法, IRA (放射免疫测定), VIA (病毒免疫测定), EIA (酶免疫测定), FIA (荧光免疫测定) 和 MIA (金属免疫分析) 等方法, 抗体分子的糖链结构可以用使用凝集素的免疫测定法鉴定。

10 标记识别抗体组合物中包含的抗体分子的糖链结构的凝集素, 标记的凝集素与抗体组合物反应作为样本。然后, 测定标记的凝集素与抗体分子的复合物的量。

鉴定抗体分子的糖链结构的凝集素包括 WGA(来源于百里香属(*T. vulgaris*) 的麦胚凝集素)、ConA (来源于矮生刀豆 (*C. ensiformis*)
 15 的 concanavalin A)、RIC (来源于 *R. communis* 的毒素)、L-PHA (来源于白花夏枯草 (*P. vulgaris*) 的白细胞凝集素)、LCA (来源于小扁豆 (*L. culinaris*) 的扁豆凝集素)、PSA (来源于豌豆(*P. sativum*)的豌豆凝集素)、AAL (橙黄网胞盘菌(*Aleuria aurantia*)凝集素)、ACL (苜蓿属 *caudatus* 凝集素)、BPL (红花羊蹄甲(*Bauhinia purpurea*)凝集素)、
 20 DSL (曼陀罗属曼陀草凝集素)、DBA (扁豆属 *biflorus* 凝集素)、EBL (接骨木果 *balk* 凝集素)、ECL (刺桐属 *crisagalli* 凝集素)、EEL (卫矛属 *europaeus* 凝集素)、GNL (雪花莲属雪花莲胺凝集素)、GSL (*Griffonia simplicifolia* 凝集素)、HPA (盖罩大蜗牛(*Helix pomatia*) 凝集素)、HHL (星花属 *hybrid* 凝集素)、Jacalin、LTL (百脉根属
 25 *tetragonolobus* 凝集素)、LEL (番茄属 *esculentum* 凝集素)、MAL (*Maackia amurensis* 凝集素)、MPL (桑橙 (*Maclura pomifera*) 凝集素)、NPL (喇叭水仙. (*Narcissus pseudonarcissus*). 凝集素)、PNA (花生凝集素)、E-PHA (云豆(*Phaseolus vulgaris*) erythroagglutinin)、PTL (*Psophocarpus tetragonolobus* 凝集素)、RCA (蓖麻 (*Ricinus communis*)
 30 凝集素凝集素)、STL (马铃薯(*Solanum tuberosum*)凝集素)、SJA (槐属山茶(*Sophora japonica*)凝集素)、SBA (大豆凝集素)、UEA (荆豆

(*Ulex europaeus*)凝集素)、VVL (蚕豆(*Vicia villosa*)凝集素) 和 WFA (*Wisteria floiybunda* 凝集素)。

优选的使用特异性识别岩藻糖与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端的 N-乙酰氨基葡萄糖结合的糖链结构的凝集素。例子包括 *Lens*
5 *culinaris* 凝集素 LCA (来源于 *Lens culinaris* 的扁豆凝集素), 豌豆凝集素 PSA (来源于 *Pisum sativum* 的豌豆凝集素), 蚕豆凝集素 VFA (来源于 *Vicia faba* 的凝集素)和橙黄网胞盘菌凝集素 AAL (来源于 *Aleuria aurantia* 的凝集素)。

7. 本发明的抗体分子的应用

10 因为本发明的抗体组合物与 CD20 特异性结合, 有有效的抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性, 所以可用于预防和治疗不同的与 CD20-表达细胞相关的疾病, 例如癌症。

关于癌症, 即恶性肿瘤, 癌细胞生长例如, 特别是 B 细胞淋巴瘤中 B 细胞异常生长。一般的抗肿瘤试剂抑止癌细胞的生长。相反的,
15 抗体有有效的抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性, 通过它的细胞杀伤作用, 杀死癌细胞而治愈癌症, 所以, 抗体作为表达 antigen 的治疗试剂比一般的抗肿瘤试剂有效。特别的, 在癌症治疗试剂中, 单独的抗体药剂的抗肿瘤效果目前还是不足的, 所以, 进行与化疗结合的治疗[*Science* (科学), 280, 1197 (1998)]。假如单独通过本发明的抗体组
20 合物发现更有效的抗肿瘤效果, 对化疗的依赖性将会降低, 副作用会减少。

本发明的抗体组合物可以作为单独的治疗试剂给药。通常, 优选的是抗体组合物与至少一种药学可接受的载体混合, 把它作为药学配方, 用制备药学的技术领域中已知的合适方法制备。

25 优选的是选择治疗中最有效的给药途径。例子包括口服、非肠道给药, 例如口腔的、气管的、直肠的、皮下的、肌肉的、静脉内的施用。在抗体制备中, 静脉内施用是优选的。

剂形包括喷雾、胶囊、片剂、颗粒、糖浆、乳剂、栓剂、注射剂、软膏剂、粘膏剂等。

30 合适于口服的药学制剂的例子包括乳剂、糖浆、胶囊、片剂、粉末、颗粒等等。

液体制剂，例如乳剂和糖浆，可以用如添加剂、水；糖例如蔗糖、山梨醇和果糖；二元醇例如聚乙二醇和丙二醇；油例如芝麻油、橄榄油和豆油；防腐剂例如 p-对羟基苯甲酸酯；香料例如草莓香料和薄荷等制备。

5 胶、片剂、粉末、颗粒等可以用添加剂，赋形剂例如乳糖、葡萄糖、蔗糖和甘露醇；分解剂例如淀粉和精氨酸钠；润滑剂例如硬脂酸镁和滑石；粘合剂例如聚乙烯醇、羟丙纤维素和明胶，表面活性剂例如脂肪酸酯，可塑剂例如丙三醇制备。

适合非肠道给药的药制剂包括注射剂、栓剂、喷雾剂等等。

10 注射剂可以使用载体例如盐溶液、葡萄糖溶液或它们的混合物等等。粉末注射剂可以用常规方法制备的冷冻干燥的抗体组合物，往其中加入氯化钠制备。

栓剂可以使用载体，例如可可脂、氢化脂或羧酸制备。

15 喷雾也可以使用这样的抗体组合物或使用不刺激患者口腔或气管粘膜，并且通过把它分散成细颗粒而促进抗体组合物吸收的载体制备。

载体包括乳糖、甘油等。根据抗体组合物和载体的性质，可以制备药制剂例如喷雾剂和干粉。另外，作为口服制剂的添加剂例子的成分也可以添加到非肠道的制剂中。

20 虽然临床剂量或施用频率根据目的治疗效果、施用方法、治疗周期、年龄、体重等等不同，但是一般是 10 微克/千克到 20 微克/千克/天/人。

而且，作为检验抗体组合物对不同肿瘤细胞的抗肿瘤作用的方法，体外检验包括 CDC 活性检测方法、ADCC 活性检测方法等；体内检验包括在实验动物例如小鼠中使用肿瘤系统的抗肿瘤实验等。

25 CDC 活性和 ADCC 活性测定和抗肿瘤实验可以根据 *cancer Immunology Immunotherapy*, 36, 373(1993); *Cancer Research*, 54, 1511(1944)等中描述的方法进行。

本发明将根据实验例详细描述如下；然而，实验仅仅是本发明的简单说明，本发明的范围不受此限制。

30

附图简要说明

图 1 表示质粒 pBS-2B8L 的构建步骤。

图 2 表示质粒 pBS-2B8Hm 的构建步骤。

图 3 表示质粒 pKANTEX2B8P 的构建步骤。

图 4 表示使用免疫荧光方法，改变抗体浓度，纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 和 Rituxan™ 与人 CD20 表达细胞，Raji 细胞结合的活性测定结果。纵座标和横座标分别表示每个浓度的相对荧光强度和抗体浓度。“■”和“○”分别表示 Rituxan™ 和 KM3065 的活性。

图 5 表示使用免疫荧光方法，纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 和 Rituxan™ 与人 CD20-阴性细胞，CCRF-CEM 细胞结合的活性的测定结果。

图 6 表示纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 和 Rituxan™ 对人 CD20 表达细胞的 ADCC 活性。在图 6A, 6B 和 6C 中，使用 Raji 细胞，Ramos 细胞和 WIL2-S 作为靶细胞。纵座标和横座标表示细胞毒活性和抗体浓度。“■”和“○”分别表示 Rituxan™ 和 KM3065 的活性。

图 7 表示通过从纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 和 Rituxan™ 制备 PA-修饰的糖链，然后反相 HPLC 分析，获得的洗脱模式。纵座标和横座标分别表示相对荧光强度和洗脱时间。

图 8 表示质粒 CHfFUT8-pCR2.1 的构建。

图 9 表示质粒 ploxPPuro 的构建

图 10 表示质粒 pKOFUT8gE2-1 的构建。

图 11 表示质粒 pKOFUT8gE2-2 的构建。

图 12 表示质粒 pscFUT8gE2-3 的构建。

图 13 表示质粒 pKOFUT8gE2-3 的构建。

图 14 表示质粒 pKOFUT8gE2-4 的构建。

图 15 表示质粒 pKOFUT8gE2-5 的构建。

图 16 表示质粒 pKOFUT8Puro 的构建。

图 17 表示使用免疫荧光方法，改变抗体浓度，由凝集素抗性 CHO/DG44 细胞产生的抗-CD20 嵌合抗体 R92-3-1 的结合活性测定结果。纵座标和横座标分别表示每个浓度的相对荧光强度和抗体浓度。

“■”和“○”分别表示 Rituxan™ 和 R92-3-1 的活性。

图 18 表示使用 Raji 细胞作为靶细胞，由凝集素抗性 CHO/DG44

细胞产生的抗-CD20 嵌合抗体 R92-3-1 的 ADCC 活性测定结果。纵座标和横座标分别表示对靶细胞的细胞毒活性和抗体浓度。“■”和“○”分别表示 RituxanTM 和 R92-3-1 的活性。

图 19 表示由凝集素抗性 CHO/DG44 细胞产生的抗-CD20 嵌合抗体 R92-3-1 制备的 PA 修饰的糖链，经过反相 HPLC 分析，获得的洗脱模式。纵座标和横座标分别表示相对荧光强度和洗脱时间。用例子 3 中的相同方式进行反相 HPLC 条件分析，鉴定糖链结构和计算不与 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖结合的糖链的比率。

图 20 表示通过把克隆 34-2 的 5'-端导入来源于 CHO 细胞的 GMD cDNA 克隆 22-8 的 5'-端而制备的质粒 CHO-GMD 的构建步骤。

图 21 表示对从三个抗-CD20 嵌合抗体制备的 PA 修饰的糖链进行反相 HPLC 分析得到的洗脱模式。纵座标和横座标分别表示相对荧光强度和洗脱时间。用例子 3 中的相同方式进行反相 HPLC 条件分析，鉴定糖链结构和计算不与 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖结合的糖链的比率。

图 22 表示使用免疫荧光方法，改变抗体浓度时，CD20 表达细胞对五种抗-CD20 嵌合抗体的结合活性的测定结果，五种抗-CD20 嵌合抗体有不同的与无 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖的糖链结合的比率。纵座标和横座标分别表示与 CD20 的结合活性和抗体浓度。“□”，“■”，“△”，“▲”和“○”分别表示抗-CD20 嵌合抗体（96%），抗-CD20 嵌合抗体（44%），抗-CD20 嵌合抗体（35%），抗-CD20 嵌合抗体（26%）和抗-CD20 嵌合抗体（6%）的活性。

图 23 表示有不同抗体分子比率的抗-CD20 嵌合抗体的 ADCC 活性的测定结果，其中所述抗体分子的无 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖的糖链结合于 WIL2-S 细胞。表明使用供体 A 的效应细胞，用 ⁵¹Cr 方法的测定结果。纵座标和横座标分别表示细胞毒活性和抗体浓度。“□”，“■”，“△”，“▲”和“○”分别表示抗-CD20 嵌合抗体（96%），抗-CD20 嵌合抗体（44%），抗-CD20 嵌合抗体（35%），抗-CD20 嵌合抗体（26%）和抗-CD20 嵌合抗体（6%）的活性。

图 24 表示有不同抗体分子比率的抗-CD20 嵌合抗体的 ADCC 活性的测定结果，其中所述的抗体分子的无 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖的糖链结合于 Raji 细胞，。表明使用供体 B 的效应细胞，用 LDH 方法的测定结果。纵座

标和横坐标分别表示细胞毒活性和抗体浓度。“□”，“■”，“△”，“▲”和“○”分别表示抗-CD20 嵌合抗体（96%），抗-CD20 嵌合抗体（44%），抗-CD20 嵌合抗体（35%），抗-CD20 嵌合抗体（26%）和抗-CD20 嵌合抗体（6%）的活性。

5 图 25 表示用固定了含有 bisecting GlcNAc 的糖链有亲和力的凝集素的柱子，分离抗-CD20 嵌合抗体 KM3065，得到的洗脱模式。纵坐标和横坐标分别表示 280nm 时的吸光度和洗脱时间。①到④表示成分①到④的洗脱位置。

图 26 表示分离前，使用固定了对含有 bisecting GlcNAc 的糖链，
10 和从抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 中制备的 PA 修饰的糖链有亲和力的凝集素的柱子，分离均通过反相 HPLC 分析获得的成分①到④得到的洗脱模式。左上方的图，右上方的图，左中的图，右中的图，左下的图分别表示分离前的 KM3065，成分①，成分②，成分③，成分④的洗脱模式。纵坐标和横坐标分别表示相对荧光强度和洗脱时间。图中，用
15 黑色打出的峰表示来源于抗体的 PA 修饰的糖链，“•”表示含有 bisecting GlcNAc 的 PA 修饰的糖链。

图 27 表示分离前，用固定了含有 bisecting GlcNAc 的糖链有亲和力的凝集素，和抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 的柱子分离的成分①到④，
20 对 Raji 细胞的 ADCC 活性。表明使用来源于健康供体的效应细胞，用 LDH 方法测定的结果。纵坐标和横坐标分别表示细胞毒活性和抗体浓度。“●”，“○”，“△”，“◇”，“◆”，“□”和“×”表示分离前的 KM3065，成分①，成分②，成分③，成分④，RituxanTM 和不加抗体情况下的活性。

25 本发明的实施方式

实施例 1

制备抗-CD20 人嵌合抗体

1、制备表达人嵌合抗体的抗-CD20 载体

(1) 构建编码抗-CD20 鼠单克隆抗体的 L 链 V 区的 cDNA

30 编码 WO 94/11026 中描述的抗-CD20 鼠单克隆抗体 2B8 的 L 链 V 区（以下称为“VL”）的氨基酸序列的 cDNA（由 SEQ ID NO: 11 代表），

如以下使用 PCR 构建。

首先，PCR 时用于扩增的引物核苷酸序列和用于克隆进入人源化抗体表达载体的限制性内切酶识别序列结合，加到 WO 94/11026 中描述的 VL 的核苷酸序列的 5'-端和 3'-端。设计的核苷酸序列从 5'-端分为总共 6 个核苷酸序列，每个有大约 100 个碱基（设计相邻的核苷酸序列，这样它们的末端有大约 20 个碱基的重叠），6 个合成的 DNA 片段，现在用 SEQ ID NO:15, 16, 17, 18, 19 和 20 来代表，用有义链和反义链交替制备这 6 个 DNA 片段（委托给 GENSET）。

每种寡核苷酸加入到 50 微升反应混合物中[KOD DNA 聚合酶-连接的 PCR 缓冲液#1（TOYOBO 生产），0.2 毫摩尔 dNTP，1 毫摩尔氯化镁，0.5 微摩尔 M13 引物 M4（Takara Shuzo 生产）和 0.5 微摩尔 M13 引物 RV（Takara Shuzo 生产）]，最终浓度为 0.1 微摩尔，使用 DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 9600（Perkin Elmer 生产），94℃加热 3 分钟进行反应，往反应混合物中加入 2.5 单位 KOD DNA 聚合酶（TOYOBO 生产），然后进行 25 个循环，每循环为 94℃加热 30 秒，55℃加热 30 秒，74℃1 分钟。然后 72℃加热 10 分钟。25 微升反应混合物琼脂糖凝胶电泳后，使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒（QIAGEN 生产）回收大约 0.44 kb 的 VL 的 PCR 产物。

接着，用限制性内切酶 *SmaI*（Takara Shuzo 生产）消化质粒 pBluescript II SK（-）（Stratagene 生产），获得大约 0.1 微克的 DNA 产物，以上获得的大约 0.1 微克的 PCR 产物加到无菌水中，调节总体积到 7.5 微升，然后加入 7.5 微升 TAKARA 连接试剂盒 ver. 2（Takara Shuzo 生产）的溶液 I，和 0.3 微升限制性内切酶 *SmaI*（Takara Shuzo 生产），22℃反应 2 小时。使用这种方式获得的重组质粒 DNA 溶液转化 *E.coli DH5α*（TOYOBO 生产）。从转化体克隆中制备出每种质粒 DNA，，使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 v2.0（Applied Biosystems 生产），根据所附的指导进行反应，然后用同一公司生产的 DNA 测序仪 ABI PRISM 377 分析核苷酸序列。用这种方式，获得图 1 中所示的有目的核苷酸序列的质粒 PBS-2B8L。

（2）构建编码抗-CD20 鼠单克隆抗体的 H 链 V 区的 cDNA
编码 WO 94/11026 中描述的抗-CD20 鼠单克隆抗体 2B8 的 H 链 V

区(以下称为“VH”)的氨基酸序列的 cDNA(由 SEQ ID NO: 13 代表), 如以下使用 PCR 构建。

首先, PCR 时用于扩增的引物核苷酸序列和用于克隆进入人源化抗体表达载体的限制性内切酶识别序列结合, 加到 WO 94/11026 中描述的 VH 的核苷酸序列的 5'-端和 3'-端。设计的核苷酸序列从 5'-端分为总共 6 个核苷酸序列, 每个有大约 100 个碱基(设计相邻的核苷酸序列, 这样它们的末端有大约 20 个碱基的重叠), 6 个合成的 DNA 片段, 现在用 SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 29 和 30 来代表, 用有义链和反义链交替制备这 6 个 DNA 片段(委托给 GENSET)。

10 每种寡核苷酸加入到 50 微升反应混合物中[KOD DNA 聚合酶-PCR 缓冲液#1 (TOYOBO 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP, 1 微摩尔氯化镁, 0.5 毫摩尔 M13 引物 M4 (Takara Shuzo 生产) 和 0.5 微摩尔 M13 引物 RV(Takara Shuzo 生产)], 最终浓度为 0.1 微摩尔, 使用 DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 9600 (Perkin Elmer 生产), 94°C 加热 3 分钟进行
15 反应, 往反应混合物中加入 2.5 单位 KOD DNA 聚合酶 (TOYOBO 生产), 然后进行 25 个循环, 每循环为 94°C 加热 30 秒, 55°C 加热 30 秒, 74°C 1 分钟。然后 72°C 加热 10 分钟。25 微升反应混合物琼脂糖凝胶电泳后, 使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(QIAGEN 生产)回收大约 0.49 kb 的 VH 的 PCR 产物。

20 接着, 用限制性内切酶 *SmaI* (Takara Shuzo 生产) 消化质粒 pBluescript II SK (-) (Stratagene 生产), 获得大约 0.1 微克的 DNA 片段, 以上获得的大约 0.1 微克的 PCR 产物加到无菌水中, 调节总体积到 7.5 微升, 然后加入 7.5 微升 TAKARA 连接试剂盒 ver. 2 (Takara Shuzo 生产) 的溶液 I, 和 0.3 微升限制性内切酶 *SmaI* (Takara Shuzo
25 生产), 然后 22°C 反应过夜。

使用用这种方式获得的重组质粒 DNA 溶液转化 *E.coli DH5a* (TOYOBO 生产)。从转化体克隆中制备出每种质粒 DNA, 使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 v2.0 (Applied Biosystems 生产), 根据所附的产品说明进行反应, 然后用同一公司生产的 DNA 测序仪 ABI PRISM 377 分析核苷酸序列。用这种方式, 获得
30 图 2 中所示的有目的核苷酸序列的质粒 PBS-2B8H。

然后，为了把位置 14 的氨基酸由 Ala 取代为 Pro，设计如 SEQ ID NO: 31 所示的合成的 DNA。使用如下的对于 pBluescript 11 (Takara Shuzo 生产) 的 LA PCR 体外诱变引物组，通过 PCR 进行碱基取代。制备 50 微升含有 1 纳克质粒 PBS-2B8H 的反应混合物[LA PCR 缓冲液 II (Takara Shuzo 生产)，2.5 单位 TaKaRa LA Taq，0.4 毫摩尔 dNTP，2.5 毫摩尔氯化镁，50 纳摩尔 T3 BcaBEST 测序引物 (Takara Shuzo 生产) 和 50 纳摩尔诱变引物 (SEQ ID NO: 31, GENSET 生产)]后，使用 DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 9600 (Perkin Elmer 生产) 进行 25 个循环的 PCR，每个循环为 94°C 加热 30 秒，55°C 2 分钟，74°C 1.5 分钟。30 微升反应混合物琼脂糖凝胶电泳后，使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN 生产) 回收大约 0.44 kb 的 PCR 产物，制成 30 微升的水混合物。用同样方式，用 50 微升含有 1 纳克质粒 PBS-2B8H 的反应混合物[LA PCR 缓冲液 II (Takara Shuzo 生产)，2.5 单位 TaKaRa LA Taq，0.4 毫摩尔 dNTP，2.5 毫摩尔氯化镁，50 纳摩尔 T3 BcaBEST 测序引物 (Takara Shuzo 生产) 和 50 纳摩尔 MUT B1 引物 (由 Takara Shuzo 制备) 进行 PCR。30 微升反应混合物琼脂糖凝胶电泳后，使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN 生产) 回收大约 0.63 kb 的 PCR 产物，制成 30 微升的水溶液。然后，这样获得的 0.44 kb PCR 产物和 0.63 kb PCR 产物各 0.5 微升加入到 47.5 微升反应混合物中[LA PCR 缓冲液 II (Takara Shuzo 生产)，0.4 毫摩尔 dNTP，和 2.5 毫摩尔氯化镁]，使用 DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 9600 (Perkin Elmer 生产)，通过把反应混合物 90°C 加热 10 分钟，冷却到 37°C 60 分钟，然后保持在 37°C 15 分钟退火此 DNA。加入 2.5 单位 TaKaRa LA Taq (Takara Shuzo 生产) 72°C 反应 3 分钟后，往其中加入每种 T3 BcaBEST 测序引物 (Takara Shuzo 生产) 和 T7 BcaBEST 测序引物 (Takara Shuzo 生产) 10 皮摩尔，使反应混合物的体积到 50 微升，进行 10 个循环，每个循环为 94°C 加热 30 秒，55°C 2 分钟，75°C 1.5 分钟。25 微升反应混合物使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (由 QIAGEN 制备) 纯化后，它的一半体积使用 10 个单位的限制性内切酶 *KpnI* (Takara Shuzo 生产) 和 10 个单位的限制性内切酶 *SacI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 1 小时。反应混合物使用琼脂糖凝胶电泳分离，回收大约 0.59 kb 的 *KpnI-SacI* 片

段。

然后，1 微克 pBluescript II SK (-) (Stratagene 生产) 用 10 个单位的限制性内切酶 *KpnI* (Takara Shuzo 生产) 和 10 个单位的限制性内切酶 *SacI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 1 小时，然后反应混合物琼脂糖凝胶电泳，回收大约 2.9 kb 的 *KpnI-SacI* 片段。

这样获得的来源于 PCR 产物的 *KpnI-SacI* 片段和来源于质粒 pBluescript II SK (-) 的 *KpnI-SacI* 片段，使用 DNA 连接试剂盒 Ver. 2 (Takara Shuzo 生产) 的溶液 1，根据所附产品说明进行连接。使用用这种方式获得的重组质粒 DNA 溶液转化 *E.coli* DH5 α (TOYOBO 生产)。从转化体克隆中制备每种质粒 DNA，使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 v2.0 (Applied Biosystems 生产)，根据产品说明进行反应，然后用同一公司生产的 DNA 测序仪 ABI PRISM 377 分析核苷酸序列。

用这种方式，获得图 2 中所示的含有目的核苷酸序列的质粒 PBS-2B8Hm。

(3) 构建表达人嵌合抗体的抗-CD20 载体

通过使用表达人源化抗体的载体 pKANTEX93 (*Mol Immunol.*, 37, 1035, 2000) 和实施例 1 的条目 1 (1) 和 (2) 中获得的质粒 pBS-2B8L 和 pBS-2B8Hm，如下构建抗-CD20 人嵌合抗体 (以下称为“抗-CD20 嵌合抗体”) 表达载体 pKANTEX2B8P。

2 微克在实施例 1 的条目 1 (1) 中获得的质粒 pBS-2B8L 使用 10 个单位的限制性内切酶 *BsiWI* (New England Biolabs 生产) 55°C 反应 1 小时后，使用 10 个单位的限制性内切酶 *EcoRI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 1 小时。反应混合物使用琼脂糖凝胶电泳分离，回收大约 0.41 kb 的 *BsiWI-EcoRI* 片段。

然后，2 微克表达人源化抗体的载体 pKANTEX93，使用 10 个单位的限制性内切酶 *BsiWI* (New England Biolabs 生产) 55°C 反应 1 小时后，使用 10 个单位的限制性内切酶 *EcoRI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 1 小时。反应混合物使用琼脂糖凝胶电泳分离，回收大约 12.75 kb 的 *BsiWI-EcoRI* 片段。

然后，获得的来源于质粒 pBS-2B8L 的 *BsiWI-EcoRI* 片段和来源于

质粒 pKANTEX93 的 *BsiWI-EcoRI* 片段使用 DNA 连接试剂盒 Ver. 2 (Takara Shuzo 生产) 的溶液 1, 根据产品说明反应进行连接。使用用这种方式获得的重组质粒 DNA 溶液转化 *E.coli* DH5 α (TOYOBO 生产), 获得如图 3 所示的质粒 pKANTEX2B8-L。

5 然后, 2 微克在实施例 1 的条目 1 (2) 中获得的质粒 pBS-2B8Hm 使用 10 个单位的限制性内切酶 *ApaI* (Takara Shuzo 生产) 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 然后使用 10 个单位的限制性内切酶 *NotI* (Takara Shuzo 生产) 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。反应混合物使用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约 0.45kb 的 *ApaI-NotI* 片段。

10 然后, 3 微克质粒 pKANTEX2B8-L 使用 10 个单位的限制性内切酶 *ApaI* (Takara Shuzo 生产) 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 然后使用 10 个单位的限制性内切酶 *NotI* (Takara Shuzo 生产) 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。反应混合物使用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约 13.16kb 的 *ApaI-NotI* 片段。

然后, 获得的来源于质粒 pBS-2B8Hm 的 *ApaI-NotI* 片段和来源于
15 pKANTEX2B8-L 的 *ApaI-NotI* 片段使用 DNA 连接试剂盒 Ver. 2 (Takara Shuzo 生产) 的溶液 1, 根据产品说明进行连接。使用用这种方式获得的重组质粒 DNA 溶液转化 *E.coli* DH5 α (TOYOBO 生产), 从转化克隆中制备每种质粒 DNA。

获得质粒的核苷酸序列用 BigDye Terminator Cycle Sequencing
20 Ready Reaction 试剂盒 v 2.0 (Applied Biosystems 生产) 和同一公司的 DNA 测序仪 377 分析, 确认获得在图 3 中所示的克隆有目的 DNA 的质粒 pKANTEX2B8P。

2. 使用动物细胞稳定表达抗-CD20 嵌合抗体

(1) 使用大鼠骨髓瘤 YB2/0 细胞制备生产细胞

25 使用抗-CD20 嵌合抗体表达载体, 实施例 1 的条目 1 (3) 中获得的 pKANTEX2B8P, 在动物细胞中如下的表达抗-CD20 嵌合抗体。

10 微克质粒 pKANTEX2B8P 通过电穿孔[Cytotechnology(电穿孔),
3, 133 (1990)]导入 4×10^6 大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0 细胞(ATCC CRL
1662)后, 细胞悬浮在 40 毫升 H-SFM 培养基(GIBCO-BRL 生产,
30 添加了 5%胎牛血清(FCS)中, 200 微升/孔分配在 96 孔微量滴定板
(Sumitomo Bakelite 生产)中。5%CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时后,

加入 G418 至终浓度为 1 毫克/毫升，然后培养 1 到 2 周。从转化体克隆表现出 G418 抗性，转化体变得汇合的孔中回收培养基上清，用实施例 1 中的条目 2 (2) 描述的 ELISA 测定培养基上清中产生的人 IgG 抗体的量。

- 5 关于在培养基上清中发现人 IgG 抗体表达的孔中的转化体，为了增加抗体表达水平，使用 *dhfr* 基因扩增系统，转化体悬浮于含有 1 毫克/毫升 G418 和 50 纳摩尔作为 *dhfr* 基因产物二氢叶酸还原酶（以下称为“DHFR”）的抑制剂的氨甲蝶呤（以下称为“MTX”，由 SIGMA 制备）的 H-SFM 培养基中，密度为 1 到 2×10^5 细胞/毫升，悬浮液在 24 孔板
10 （由 Greiner）中每孔分配 1 毫升。5%CO₂ 培养箱中 37°C 培养 1 到 2 周，诱导表现 50 纳摩尔 MTX 抗性的转化体。当转化体在孔中汇合时，用实施例 1 中的条目 2 (2) 描述的 ELISA 测定培养基上清中产生的人 IgG 抗体的量。关于在培养基上清中发现人 IgG 抗体表达的孔中的转化体，MTX 浓度增加到 100 纳摩尔，然后增加到 200 纳摩尔，用同样方法最后获得能在含 1 毫克/毫升 G418 和 200 纳摩尔 MTX 的 H-SFM 中
15 生长，同时也可以高效表达抗-CD20 嵌合抗体的转化体。得到的转化体通过有限稀释进行克隆，由此可以获得表达抗-CD20 嵌合抗体的克隆 KM3065。同样，使用 WO 00/61739 的实施例 8 中描述的 α 1,6-岩藻糖基转移酶的基因的转录产物的确定方法，选择产生相对低水平转录
20 产物的细胞系，使用此细胞系作为合适的细胞系。

获得的产生抗-CD20 嵌合抗体的转化体克隆 KM3065 已经在 2001 年 12 月 21 日保藏，作为国际专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所（AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan）的 FERN 7834。

25 (2) 培养基上清中 IgG 抗体浓度的测定 (ELISA)

- 羊抗人 IgG (H&L) 抗体 (American Qualex 生产) 用磷酸缓冲剂生理盐水稀释 (以下称为“PBS”) 到浓度为 1 微克/毫升，50 微升/孔分配到 96 孔 ELISA 板 (Greiner 生产) 中，4°C 吸附过夜。用 PBS 漂洗后，以 100 微升/孔加入含 1% 牛血清白蛋白 (以下称为“BSA”，
30 AMPC 生产) 的 PBS (以下称为“1%BSA-PBS”) 的，室温反应 1 小时，封闭剩余的活性基团。弃去 1%BSA-PBS 后，转化体的培养基上

清和纯化的人嵌合抗体的不同稀释溶液以 50 微升/孔加入孔中，室温反应 2 小时。反应后，每孔用含 0.05% Tween 20 的 PBS（以下称为“Tween-PBS”）漂洗，然后，往其中以 50 微升/孔加入过氧化酶标记的用 1% BSA-PBS 稀释 3000 倍的羊抗人 IgG（H&L）抗体溶液（American Qualex 生产），作为二抗溶液，室温反应 1 小时。反应后，用 Tween-PBS 漂洗，ABTS 底物溶液（把 0.55 克 2,2'-azino-顺(3-乙基苯并二氢噻唑-6-磺酸)胺溶于 1 升 0.1 摩尔柠檬酸缓冲液(pH4.2)中，使用前加入 1 微升/毫升过氧化氢)以 50 微升/孔分配，用于显色，在 415nm 测定吸光度(以下称为“OD415”)。

10 3. 从培养基上清中纯化抗-CD20 嵌合抗体

在实施例 1 的条目 2(1)中获得的能表达抗-CD20 嵌合抗体的转化体细胞克隆 KM3065 悬浮于含有 200 纳摩尔 MTX 和 5% of Daigo's GF21(Wako Pure Chemical industries 生产)的 H-SFM(GIBCO-BRL 生产)中，密度为 1×10^5 细胞/毫升，在 182cm² 的瓶（Greiner 生产）中分装 50 毫升。细胞在 5%CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 7 天，当细胞汇合时回收培养基上清。使用 Prosep-A（Millipore 生产）柱，根据所附产品说明，从培养基上清中纯化抗-CD20 嵌合抗体 KM3065。根据已知方法[*Nature*（自然），227, 680 (1970)]，大约 3 微克获得的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 经电泳检测其分子量和纯化程度。结果，纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 在非还原条件下大约为 150 千道尔顿（以下称为“Kd”），在还原条件下观察到两条大约为 50Kd 和大约 25Kd 的带。蛋白质的大小与报道的相符，即 IgG 抗体在非还原条件下分子量大约为 150Kd，在还原条件下由于切断分子间二硫键（以下称为“S-S 键”），形成分子量为 50Kd 的 H 链和分子量为 25Kd 的 L 链 [*Antibodies: A Laboratory Manual*(实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory, 第 14 章（1988），*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*（单克隆抗体：原理与应用），Academic Press（美国学术出版社） Limited (1996)]，也几乎与 RituxanTM 的电泳形式相同，相应的，这证实抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 表达成正确结构的抗体分子。

30 实施例 2

测定抗-CD20 嵌合抗体活性：

1. 抗-CD20 嵌合抗体对表达 CD20 的细胞的结合活性（免疫荧光方法）

实施例 1 的条目 3 中获得的纯化的 CD20 嵌合抗体的结合活性，使用流式细胞分析仪用免疫荧光方法测定。人淋巴瘤细胞系，Raji 细胞（JCRB 9012），作为 CD20-阳性细胞在 96 孔 U 型板（Falcon 生产）中每孔分配 2×10^5 细胞。把抗-CD20 嵌合抗体用 FACS 缓冲液（1% BSA-PBS，0.02% EDTA，0.05% NaN_3 ）稀释，制成抗体溶液（浓度为 0.039 到 40 微克/毫升），以 50 微升/孔加入 96 孔 U 型板，冰上反应 30 分钟。用 200 微升/孔 FACS 缓冲液漂洗两次后，把用 FACS 缓冲液稀释 100 倍制备的 PE-标记的抗人 IgG 抗体（由 Coulter 制备）溶液以 50 微升/孔加入 96 孔 U 型板中，冰上避光反应 30 分钟，然后以 200 微升/孔漂洗三次，细胞最后悬浮于 500 微升混合液中，使用流式细胞分析仪测定荧光强度。结果在图 4 中表示。在 KM3065 和 RituxanTM 中都观察到抗体浓度依赖的荧光强度增强，这证实它们都表现出相同的结合活性。而且，通过调节抗体浓度到 40 微克/毫升，用同样的方式，观察到它们结合于 CD20-阴性细胞，人 CCRF-CEM 细胞（ATCC CCL 119）的活性。结果在图 5 中表示。因为 KM3065 和 RituxanTM 都没有被结合，所以意味着 KM3065 特异性的结合 CD20。

2. 抗-CD20 嵌合抗体体外细胞毒活性（ADCC 活性）

为了测定实施例 1 的条目 3 中获得的纯化的 CD20 嵌合抗体的体外细胞毒活性，根据以下方法测定 ADCC 活性。

（1）制备靶细胞溶液

培养于 RPMI1640-FCS(10)培养基(RPMI1640 培养基（由 GIBCO BRL 制备），含有 10% FCS）中的人 B 淋巴细胞培养细胞系 WIL2-S 细胞（ATCC CRL8885），Ramos 细胞（ATCC CRL1596）或 Raji 细胞（JCRB9012），用 RPMI1640-FCS(5)培养基(RPMI1640 培养基(GIBCO BRL 生产)，含有 5% FCS) 通过离心和悬浮进行漂洗，然后通过加入 RPMI1640-FCS（5）培养基调节到 2×10^5 细胞/毫升，作为靶细胞溶液。

（2）制备效应细胞溶液

从健康人中收集 50 毫升静脉血，加入 0.5 毫升肝素钠（Shimizu Pharmaceutical 生产），轻轻混合。根据产品说明（ $800 \times g$ ，20 分钟），

使用 Lymphoprep (AXIS SHIELD 生产), 混合物离心分离出单核细胞层。用 RPMI1640-FCS (5) 培养基离心漂洗三次后, 得到的沉淀用相同培养基重悬, 得到密度为 4×10^6 细胞/毫升, 作为效应细胞溶液。

(3) 测定 ADCC 活性

- 5 往 96 孔 U 型底板的每一孔中分配 50 微升以上 (1) 中制备的靶细胞溶液 (1×10^4 细胞/孔)。然后, 加入 50 微升以上 (2) 中制备的效应细胞溶液 (2×10^5 细胞/孔), 效应细胞与靶细胞比率为 20: 1)。随后, 往其中加入每种抗-CD20 嵌合抗体, 最终浓度从 0.3 到 3000 纳克/毫升, 总体积达到 150 微升, 然后 37°C 反应 4 小时。反应后, 离心板,
- 10 根据产品说明, 使用 CytoTox96 非放射性细胞毒活性测定 (Promega 生产), 测定上清中的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, 获得吸光度数据。除了分别单独使用培养基取代效应细胞与抗体溶液, 单独使用培养基取代靶细胞溶液和抗体溶液之外, 用以上相同方式, 获得自发释放靶细胞的吸光度数据和自发释放效应细胞的吸光度数据。使用培养基取代
- 15 抗体溶液和效应细胞溶液, 在反应结束前 45 分钟, 往培养基中加入 15 微升 9% Triton X-100 溶液, 用以上相同方式, 通过测定 LDH 活性, 获得全部释放的靶细胞的吸光度数据。通过以下方程测定 ADCC 活性。

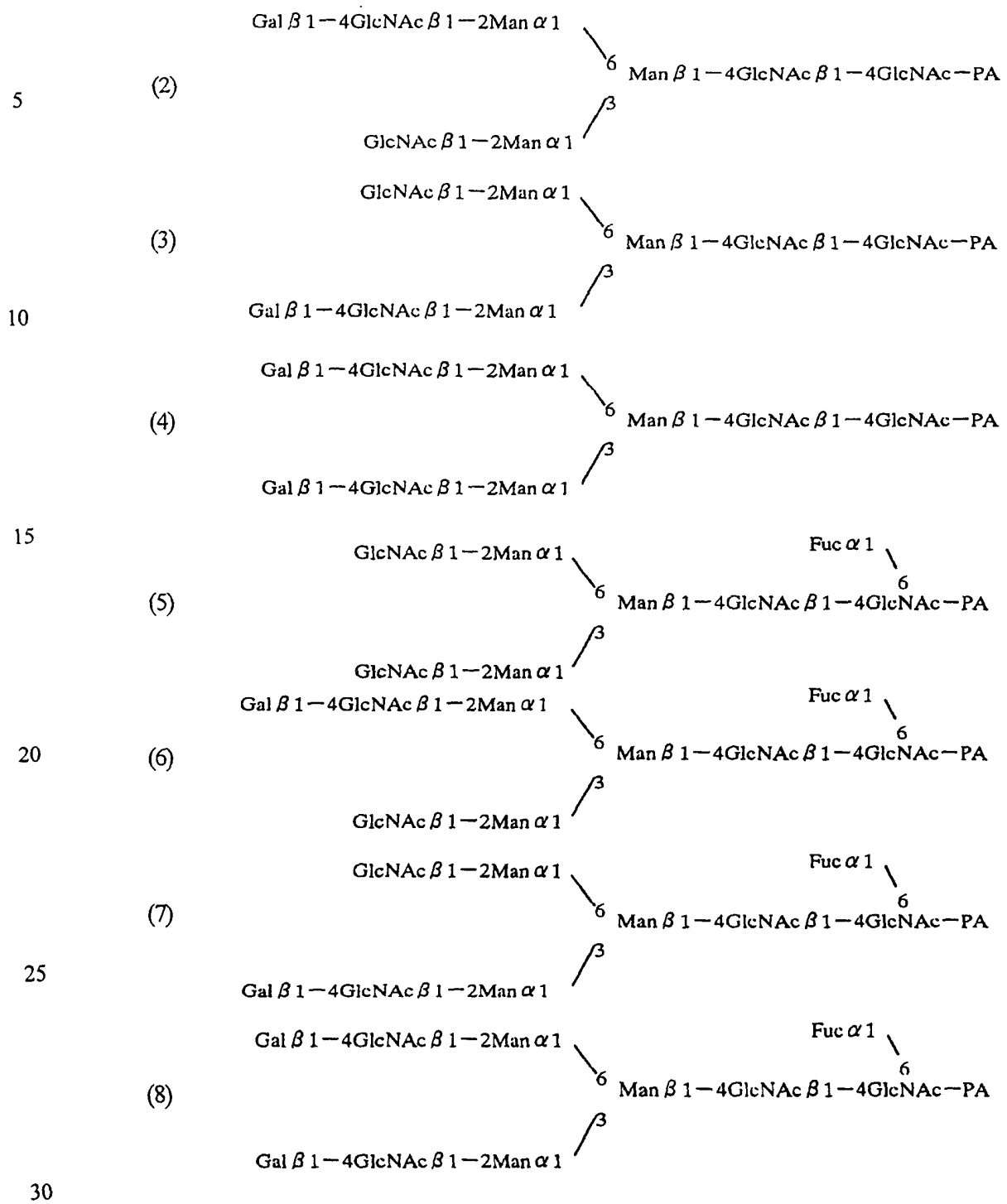
$$20 \quad \text{细胞毒性}(\%) = \frac{(\text{样品吸光度}) - (\text{自发释放的效应细胞的吸光度}) - (\text{自发释放的靶细胞的吸光度})}{(\text{全部释放的靶细胞}) - \text{自发释放的靶细胞的吸光度}} \times 100$$

- 图 6 表示 3 种细胞系作为靶细胞的结果。图 6A, 6B 和 6C 分别表示使用 Raji 细胞 (JCRB90 12), Ramos 细胞 (ATCC CRL 1596) 和
- 25 WIL2-S 细胞 (ATCC CRL8885) 的结果。如图 6 所示, 和 RituxanTM 相比, KM3065 表现出更高的 ADCC 活性 (在所有抗体浓度) 和更高的最大细胞毒活性。

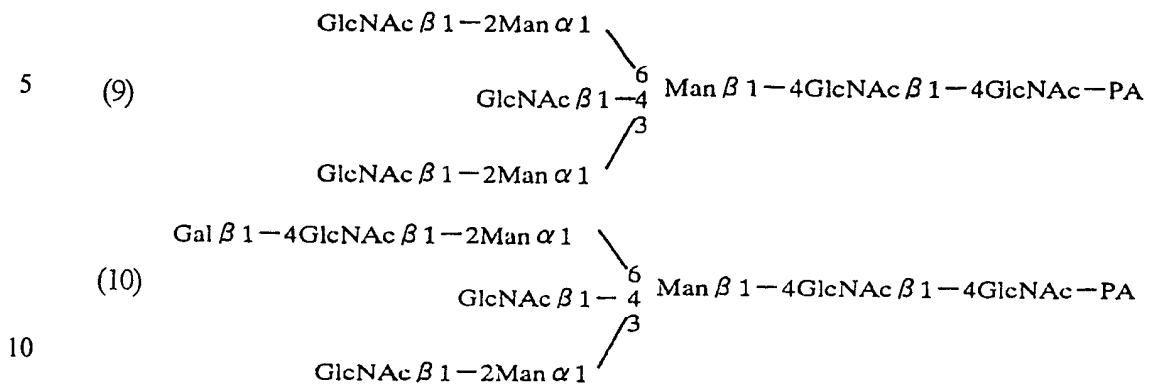
实施例 3

抗-CD20 嵌合抗体的糖链分析

- 30 分析实施例 1 的条目 3 中纯化的抗-CD20 嵌合抗体的糖链。把 KM3065 和 RituxanTM 经胍解作用 [*Method of Enzymology*, 83, 263 (1982)]



35



15 GlcNAc, Gal, Man, Fuc 和 PA 分别代表 N-乙酰葡萄糖胺, 半乳糖, 甘露糖, 岩藻糖和吡啶基氨基。在图 7 中, 岩藻糖的 1 位并不通过 α 键 (以下称为“无 $\alpha 1,6$ -岩藻糖的糖链基团”或“ $\alpha 1,6$ -岩藻糖-不结合的糖链基团”) 结合于 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端中 6 位的 N-乙酰葡萄糖胺, 其比率可以通过峰①到⑩所占的面积中峰①到④, ⑨和⑩

20 所占的面积计算。而且, 岩藻糖的 1 位通过 α 键 (以下称为“ $\alpha 1,6$ -岩藻糖-连接的糖链基团”) 与 N-糖苷键合的复合糖链还原性末端中 6 位的 N-乙酰氨基葡萄糖结合, 其比率可以通过峰①到⑩所占的面积中峰⑤和⑧所占的面积计算。

25 结果, 在 Rituxan™ 中, $\alpha 1,6$ -岩藻糖-不结合的糖链的比率是 6%, 反之, $\alpha 1,6$ -岩藻糖-结合的糖链比率是 94%。在 KM3065 中, $\alpha 1,6$ -岩藻糖-不结合的糖链的比率是 96%, 反之, $\alpha 1,6$ -岩藻糖-结合的糖链比率是 4%。结果表明, KM3065 的 $\alpha 1,6$ -岩藻糖-不结合的糖链比率比 Rituxan™ 高。

30 实施例 4

制备来源于 CHO 细胞的 $\alpha 1,6$ -岩藻糖基转移酶 (FUT8)

(1) 从 CHO 细胞中制备 $\alpha 1,6$ -岩藻糖基转移酶 (FUT8) cDNA 序列

在 WO00/61739 的实施例 8 (1) 中, CHO/DG44 细胞培养前两天

时，从 CHO/DG44 细胞中制备单链 cDNA，通过以下程序获得中国仓鼠 FUT8 cDNA（图 8）。

首先，从小鼠 FUT8 cDNA 序列（GenBank, AB025198）中设计对 5'-端非翻译区特异的正向引物（在 SEQ ID NO: 21 中表示）和 3'-
5 端非翻译区特异性的反向引物（在 SEQ ID NO: 22 中表示）。

然后，制备含有 1 微升来源于 CHO/DG44 细胞的 cDNA 的 25 微升反应混合物[ExTaq 缓冲液（Takara Shuzo 生产），0.2 毫摩尔/升 dNTP，4% DMSO 和 0.5 微摩尔/升特异引物（SEQ ID NO: 21 和 22)],
10 使用 DNA 聚合酶 ExTaq（Takara Shuzo 生产）进行 PCR。PCR 是 94°C 加热 1 分钟，随后进行 30 个循环，每个循环是 94°C 加热 30 秒，55°C 加热 30 秒，72°C 加热 2 分钟，30 个循环后，72°C 加热 10 分钟。

PCR 后，反应混合物经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，纯化出大约 2Kb 的特异扩增片段。根据附加在 TOPO TA 克隆试剂盒（Invitrogen 生产）的产品说明，往质粒 pCR2.1 中导入 4 微升 DNA 片段，*E.coli* DH5 α 用
15 此反应混合物转化。根据已知方法，在获得的卡那霉素抗性克隆中，从 cDNA 插入的 8 个克隆中分离出质粒 DNA。

用 DNA 测序仪 377(Applied Biosystems 生产)和 BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction 试剂盒（Applied Biosystems 生产），根据产品说明的方法，确定每个插入质粒的 cDNA 的核苷酸序列。
20 用此方法证实，所有插入的 cDNA 编码含有 CHO 细胞 FUT8 的全长 ORF 的序列。通过 PCR，从它们中间选择序列中绝对不含有碱基阅读错误的质粒 DNA。于此，此质粒称为“CHfFUT8-pCR2.1”。确定的 CHO FUT8 的 cDNA 核苷酸序列用 SEQ ID NO: 1 代表。在 SEQ ID NO: 1 中翻译区（开放阅读框架：ORF）是 100-1827 位的核苷酸，除了终止
25 密码子外，100 到 1824 位的核苷酸相对应的氨基酸序列用 SEQ ID NO: 23 代表。

(2) 从 CHO 细胞中制备 α 1,6-岩藻糖基转移酶（FUT8）基因组序列

使用条目（1）中获得的 CHO 细胞 FUT8 的 ORF 全长 cDNA 片段
30 作为探针，根据例如 *Molecular Cloning*（分子克隆），第二版, *Current Protocols in Molecular Biology*（现代分子生物学指南），*A Laboratory*

Manual(实验手册), 第二版 (1989)中描述的已知基因组筛选方法, 从来源于 CHO-K1 细胞的 λ -噬菌体基因组文库 (Stratagene 生产) 中获得 CHO 细胞 FUT8 基因组克隆。然后, 用不同限制性内切酶消化获得的基因组克隆后, 使用含 CHO 细胞 FUT8 cDNA 的起始密码子的

5 *AfaI-Sau3AI* 片段 (大约 280bp) 作为探针进行 Southern 杂交, 然后从表现阳性反应的限制性内切酶片段中选择 *XbaI-XbaI* 片段(大约 2.5 Kb) 和 *SacI-SacI* 片段 (大约 6.5 Kb), 分别插入 pBluescript 11 KS (+) (Stratagene 生产)。

使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产) 和 BigDye

10 Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction 试剂盒 由 (Parkin Elmer 生产), 根据产品说明的方法确定每个获得的基因组片段的核苷酸序列, 证实 *XbaI-XbaI* 片段编码含有 CHO 细胞 FUT8 的外显子 2, 大约 2.5 Kb 的上游内含子序列, *SacI-SacI* 片段编码含有 CHO 细胞 FUT8 的外显子 2 的大约 6.5 Kb 的下游内含子序列。于此, 含有 *XbaI-XbaI*

15 片段的质粒和含有 *SacI-SacI* 片段的质粒分别称为 pFUT8fgE2-2 和 pFUT8fgE2-4。确定的含有 CHO 细胞 FUT8 的外显子 2 的基因组区域的核苷酸序列 (大约 9.0 Kb) 在 SEQ ID NO: 3 中表示。

实施例 5

制备 α 1,6-岩藻糖基转移酶的基因被断裂的 CHO 细胞:

20 制备包含来源于 CHO 细胞的 α 1,6-岩藻糖基转移酶 (FUT8) 基因的外显子 2 的基因组区域被删除的 CHO 细胞, 测定细胞产生的抗体的 ADCC 活性。

1. 构建以中国仓鼠 α 1,6-岩藻糖基转移酶 (FUT8) 基因外显子 2 为目标的载体质粒 pKOFUT8Puro

25 (1) 构建质粒 ploxPPuro

通过以下程序 (图 9) 构建质粒 ploxPPuro

在 35 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产) 中溶解 1.0 微克质粒 pKOSelectPuro (由 Lexicon 制备), 加入 20 个单位的限制性内切酶 *AscI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2

30 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出有嘌呤霉素抗性基因表达单位的大约 1.5 Kb 的 DNA 片段。

1.0 微克日本公开的审查的专利申请 314512/99 号中描述的质粒 ploxP 独立溶于 35 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产), 加入 20 个单位的限制性内切酶 *AscI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 2.0 Kb 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pKOSelectPuro 的 *AscI-AscI* 片段 (4.5 微升, 大约 1.5 Kb), 0.5 微升来源于质粒 ploxP 的 *AscI-AscI* 片段 (大约 2.0 Kb) 与 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。用反应混合物转化 *E.coli* DH5 α , 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 此质粒称 ploxPPuro。

(2) 构建质粒 pKOFUT8gE2-1

使用实施例 4 (2) 中获得的含有包括中国仓鼠 FUT8 的外显子 2 的基因组区域的质粒 pFUT8fgE2-2, 用以下步骤构建质粒 pKOFUT8gE2-1 (图 10)。

35 微升含有 100 微克/毫升 BSA (New England Biolabs 生产) 的 NE 缓冲液 1 (New England Biolabs 生产) 中溶解 2.0 微克质粒 pFUT8fgE2-2, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *SacI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 35 微升含有 100 微克/毫升 BSA (由 New England Biolabs 制备) 的 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *EcoRV* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 1.5 Kb 的 DNA 片段。

1.0 微克质粒 LITMUS28 (New England Biolabs 生产) 单独溶于 35 微升含有 100 微克/毫升 BSA (New England Biolabs 生产) 的 NE 缓冲液 1 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *SacI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 35 微升含有 100 微克/毫升 BSA (由 New England Biolabs 制备) 的 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *EcoRV* (New

England Biolabs 生产) , 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 2.8 Kb 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pFUT8fgE2-2 的 *EcoRV-SacI* 片段 (4.5 微升, 5 大约 1.5 Kb), 0.5 微升来源于质粒 LITMUS28 的 *EcoRV-SacI* 片段 (大约 2.8Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。反应混合物转化 *E.coli* DH5 α , 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 质粒称 pKOFUT8gE2-1。

10 (3) 构建质粒 pKOFUT8gE2-2

使用条目 (2) (图 1.1) 中获得的质粒 pKOFUT8gE2-1, 用以下步骤构建质粒 pKOFUT8gE2-2。

30 微升含有 100 微克/毫升 BSA (New England Biolabs 生产) 的 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中溶解 2.0 微克质粒 15 pFUT8fgE2-1, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *EcoRV* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 30 微升含有 100 微克/毫升 BSA (由 New England Biolabs 制备) 的 NE 缓冲液 1 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *KpnI* (New England Biolabs 生产), 然后 20 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 1.5 Kb 的 DNA 片段。

1.0 微克质粒 ploxPPuro (New England Biolabs 生产) 独立溶于 30 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *HpaI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化 25 反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 30 微升含有 100 微克/毫升 BSA (由 New England Biolabs 制备) 的 NE 缓冲液 1 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *KpnI* (New England Biolabs 生产) , 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 3.5 Kb 30 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pKOFUT8gE2-1 的 *EcoRV-KpnI* 片段(4.0 微升, 大约 1.5 Kb), 1.0 微升来源于质粒 ploxPPuro 的 *HpaI-kpnI* 片段(大约 3.5Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。此反应混合物转化 *Ecoli DH5α*, 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 质粒称 pKOFUT8gE2-2。

(4) 构建质粒 pscFUT8gE2-3

使用实施例 4 (2) 中获得的含有包括中国仓鼠 FUT8 的外显子 2 的基因组区域的质粒 pFUT8fgE2-4, 用以下步骤构建质粒 pscFUT8gE2-3 (图 12)。

35 微升 NE 缓冲液 1 (New England Biolabs 生产) 中溶解 2.0 微克质粒 pFUT8fgE2-4, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *HpaII* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 根据产品说明, 使用 Blunting High (Toyobo 生产), 把此 DNA 末端变成平末端。此 DNA 片段通过酚/氯仿抽提和乙醇沉淀回收, 溶于 35 微升 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *HindIII* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 3.5 Kb 的 DNA 片段。

1.0 微克质粒 LITMUS39 (New England Biolabs 生产) 独立溶于 35 微升 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中, 混合物与 20 个单位的限制性内切酶 *EcoRV* (New England Biolabs 生产) 和 20 个单位的限制性内切酶 *HindIII* (New England Biolabs 生产) 混合, 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 2.8Kb 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pFUT8fgE2-4 的 *HpaII-HindIII* 片段 (4.0 微升, 大约 3.5 Kb), 1.0 微升来源于质粒 LITMUS39 的 *EcoRV-HindIII* 片段 (大约 2.8Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。此反应混合物转化 *Ecoli DH5α*, 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 质粒称 pscFUT8gE2-3。

(5) 构建质粒 pKOFUT8gE2-3

使用实施例 4 (2) 中获得的, 包括中国仓鼠 FUT8 的外显子 2 的基因组区域的质粒 pFUT8fgE2-4, 用以下步骤构建质粒 pKOFUT8gE2-3 (图 13)。

5 质粒 pFUT8fgE2-4 溶于 35 微升用于 *EcoRI* 的 NE 缓冲液 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *EcoRI* (New England Biolabs 生产) 和 20 个单位的限制性内切酶 *HindIII* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 1.8 Kb 的 DNA
10 片段。

1.0 微克质粒 pBluescript II KS (+) (New England Biolabs 生产) 独立溶于 35 微升用于 *EcoRI* 的 NE 缓冲液 (New England Biolabs 生产) 中, 然后加入 20 个单位的限制性内切酶 *EcoRI* (New England Biolabs 生产) 和 20 个单位的限制性内切酶 *HindIII* (New England Biolabs 生产),
15 接下来 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 3.0Kb 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pFUT8fgE2-4 的 *HindIII-EcoRI* 片段 (4.0 微升, 大约 1.8 Kb), 1.0 微升来源于质粒 pBluescript II KS (+) 的 *HindIII-EcoRI* 片段 (大约 3.0Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合,
20 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。此反应混合物转化 *E. coli* DH5 α , 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 质粒称 pKOFUT8gE2-3。

(6) 构建质粒 pKOFUT8gE2-4

使用条目 (4) 和 (5) 中获得的质粒 pscFUT8gE2-3 和
25 pKOFUT8gE2-3, 用以下步骤构建质粒 pKOFUT8gE2-4 (图 13)。

1.0 微克质粒 pscFUT8gE2-3 溶于 35 微升用于 *SalI*, 含有 100 微克/毫升 BSA (New England Biolabs 生产) 的 NE 缓冲液 (New England Biolabs 生产), 加入 20 个单位的限制性内切酶 *SalI* (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混
30 合物中回收 DNA 片段, 溶于 30 微升含有 100 微克/毫升 BSA (由 New England Biolabs 制备) 的 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中,

加入 20 个单位限制性内切酶 *Hind*III (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳, 纯化出大约 3.6 Kb 的 DNA 片段。

1.0 微克质粒 pKOFUT8gE2-3 独立溶于 35 微升用于 *Sa*II, 含有 100
5 微克/毫升 BSA(New England Biolabs 生产)的 NE 缓冲液(New England Biolabs 生产)中, 加入 20 个单位的限制性内切酶 *Sa*II (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 35 微升 NE 缓冲液 2(New England Biolabs 生产)中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *Hind*III (New England Biolabs
10 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 加入 35 微升 1 摩尔/升的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 和 3.5 微升 *Ecoli* C15 衍生的碱性磷酸酶 (Takara Shuzo 生产), 然后 65°C 反应 30 分钟, 使 DNA 末端脱磷酸化。脱磷酸化处理后, DNA 片段通过酚/氯仿抽提和乙醇沉淀回收, 溶于 10 微升无菌水中。

15 得到的来源于质粒 pscFUT8gE2-3 的 *Sa*II-*Hind*III 片段 (4.0 微升, 大约 3.1Kb), 1.0 微升来源于质粒 pKOFUT8gE2-3 的 *Sa*II-*Hind*III 片段 (大约 4.8Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。此反应混合物转化 *Ecoli* DH5 α , 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此,
20 质粒称 pKOFUT8gE2-4。

(7) 构建质粒 pKOFUT8gE2-5

使用条目 (3) 和 (6) 中获得的质粒 pKOFUT8gE2-2 和 pKOFUT8gE2-4, 用以下步骤构建质粒 pKOFUT8gE2-5 (图 15)。

1.0 微克质粒 pKOFUT8gE2-2 溶于 30 微升 NE 缓冲液 4 (New
25 England Biolabs 生产), 加入 20 个单位的限制性内切酶 *Sma*I (New England Biolabs 生产), 然后 25°C 消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段, 溶于 30 微升 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中, 加入 20 个单位限制性内切酶 *Bam*HI (New England Biolabs 生产), 然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后, 加入 30
30 微升 1 摩尔/升的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 和 3.0 微升 *Ecoli* C15 来源的碱性磷酸酶 (Takara Shuzo 生产), 然后 65°C 反应 30 分钟使 DNA 末

端脱磷酸化。脱磷酸化处理后，DNA 片段通过酚/氯仿抽提和乙醇沉淀回收，溶于 10 微升无菌水。

1.0 微克质粒 pKOFUT8gE2-4 (New England Biolabs 生产) 独立溶于 30 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产) 中，加入 20 个单位的限制性内切酶 *SmaI* (New England Biolabs 生产)，然后 25°C 消化反应 2 小时。用乙醇沉淀从反应混合物中回收 DNA 片段，溶于 30 微升 NE 缓冲液 2 (New England Biolabs 生产) 中，加入 20 个单位限制性内切酶 *BamHI* (New England Biolabs 生产)，然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后，混合物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳，纯化出大约 5.2 Kb 的 DNA 片段。

得到的来源于质粒 pKOFUT8gE2-2 的 *SmaI-BamHI* 片段(0.5 微升，大约 5.0 Kb)，4.5 微升来源于质粒 pKOFUT8gE2-4 的 *SmaI-BamHI* 片段 (大约 5.2Kb) 和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合，然后 16°C 连接反应 15 小时。此反应混合物转化 *Ecoli* DH5 α ，根据已知方法，在获得的氨苄青霉素抗性克隆中，分离出质粒 DNA。于此，质粒称 pKOFUT8gE2-5。

(8) 构建质粒 pKOFUT8Puro

使用条目 (7) 中获得的质粒 pKOFUT8gE2-5，用以下步骤构建质粒 pKOFUT8Puro (图 16)。

1.0 微克质粒 pKOSelectDT (Lexicon 生产) 溶于 50 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产)，加入 16 个单位的限制性内切酶 *RsrII* (New England Biolabs 生产)，然后 37°C 进行消化反应 2 小时。消化反应后，混合物 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳，纯化出大约 1.2 Kb，包含白喉毒素表达单位的 DNA 片段。

1.0 微克质粒 pKOFUT8gE2-5 独立溶于 50 微升 NE 缓冲液 4 (New England Biolabs 生产) 中，加入 16 个单位的限制性内切酶 *RsrII* (New England Biolabs 生产)，然后 37°C 进行消化反应 2 小时，消化反应后，加入 30 微升 1 摩尔/升的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 和 3.0 微升来源于 *Ecoli* C15 的碱性磷酸酶 (Takara Shuzo 生产)，然后 65°C 反应 1 小时进行 DNA 末端脱磷酸化。脱磷酸化处理后，DNA 片段通过酚/氯仿抽提和乙醇沉淀回收，溶于 10 微升无菌水。

1.0 微克得到的来源于质粒 pKOSelectDT 的 *RsrII-RsrII* 片段 (大约 1.2 Kb), 1.0 微升来源于质粒 pKOFUT8gE2-5 的 *RsrII-RsrII* 片段 (大约 10.4Kb), 3.0 微升无菌水和 5.0 微升 Ligation High (TOYOBO 生产) 混合, 然后 16°C 进行连接反应 30 分钟。此反应混合物转化 *Ecoli DH5α*, 根据已知方法, 在获得的氨苄青霉素抗性克隆中, 分离出质粒 DNA。于此, 质粒称 pKOFUT8Puro。质粒作为靶载体, 用于构建 CHO 细胞来源的 FUT8 基因敲除的细胞。

实施例 6

制备凝集素抗性 CHO/DG44 细胞及使用细胞产生抗体

1. 制备凝集素抗性 CHO/DG44

使用 IMDM-FBS (10) 培养基[IMDM 培养基含有 10%胎牛血清 (FBS) 和 1×浓度的 HT 添加物 (GIBCO BRL 生产)], CHO/DG44 细胞在 75cm³ 瓶 (Greiner 生产) 中贴壁培养, 生长直到汇合前阶段。细胞用 5 毫升 Dulbecco's PBS (Invitrogen 生产) 漂洗后, 加入 1.5 毫升用 Dulbecco's PBS 稀释的 0.05% 胰蛋白酶 (Invitrogen 生产), 37°C 处理 5 分钟, 使细胞从瓶底解离下来。解离细胞通过一般用于细胞培养的离心操作收集, 悬浮在 IMDM-FBS (10) 培养基中, 密度为 1×10⁵ 细胞/毫升。然后, 假如需要的话, 往细胞悬浮液中加入 0.1 微克/毫升烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (以下称为“MNNG”, Sigma 生产)。CO₂ 培养箱 (由 TABAI 制备) 中 37°C 培养 3 天后, 弃去培养基上清, 细胞再次用同样的操作漂洗, 解离和收集, 悬浮于 IMDM-FBS (10) 培养基中, 然后接种于组织培养 96 孔板 (IWAKI Glass 制备), 密度为 1,000 细胞/孔。往每孔中, 作为培养基中的最终浓度, 加入 1 毫克/毫升 *Lens culinaris* 凝集素 (以下称为“LCA”, Vector 生产), 1 毫克/毫升 *Aleuria aurantia* 凝集素 (*Aleuria aurantia* 凝集素, 以下称为“AAL”, Vector 生产) 或 1 毫克/毫升云豆凝集素 (*Phaseolus vulgaris* 白细胞凝集素, 以下称为“L-PHA”, Vector 生产)。CO₂ 培养箱中 37°C 培养 2 周后, 出现的克隆是获得的凝集素抗性 CHO/DG44。关于获得的凝集素抗性 CHO/DG44, LCA-抗性细胞系, AAL-抗性细胞系和 L-PHA-抗性细胞系分别被命名为 CHO-LCA., CHO-AAL 和 CHO-PHA。当检测这些细胞系对多种凝集素的抗性时, 发现 CHO-LCA 对 AAL 也有抗性,

CHO-AAL 对 LCA 也有抗性。另外, CHO-LCA 和 CHO-AAL 也对识别与 LCA 和 AAL 识别的糖链结构相同的糖链结构的凝集素表现抗性, 即, 此凝集素识别 1-岩藻糖与 N-糖苷键合的糖链还原性末端 N-乙酰氨基葡萄糖的 6 位通过 α 键相连的糖链结构。具体的, 发现甚至在添加了最终浓度达到 1 毫克/毫升的豌豆凝集素 (*Pisum sativum* 凝集素, 以下称为“PSA”, Vector 生产) 的培养基中, CHO-LCA 和 CHO-AAL 仍可以表现抗性和存活。另外, 即使当烷化试剂 MNNG 不加入时, 也可以通过增加处理的细胞的数目, 得到凝集素抗性细胞。在下文中, 这些细胞系被用于分析。

10 2. 制备产生抗-CD20 人嵌合抗体的细胞系

以上条目 1 获得的 1.6×10^6 个凝集素-抗性细胞系 CHO/DGG44 细胞中, 通过电穿孔导入 4 微克用于表达人嵌合抗体 pKANTEK2B8P 的抗-CD20 载体[Cytotechnology (电穿孔), 3, 133(1990)]。细胞悬浮于 10 毫升 IMDM-dFBS(10)-HT(1) [含有 10% dFBS (Invitrogen 生产) 和 1 \times 浓度的 HT 添加剂 (Invitrogen 生产) 的 IMDM 培养基 (Invitrogen 生产)], 培养基以 100 微升/孔分配于 96 孔培养板 (由 Iwaki Glass 制备)。细胞在 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。然后培养基换成 IMDM-dFBS(10) (含 10% 透析的 FBS 的 IMDM 培养基), 然后培养 1 到 2 周。因为观察到表现 HT-不依赖生长的转化体克隆, 所以观察有转化体生长的孔中的转化体经 DHFR 基因扩增, 抗体产生的量增加。具体的, 细胞以密度 1 到 2×10^5 细胞/毫升悬浮于含有 50 纳摩尔 MTX 的 IMDM-dFBS(10) 培养基中, 悬浮液以 0.5 毫升/孔分配于 24 孔板 (由 Iwaki Glass 制备) 中。细胞在 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 1 到 2 周, 进行诱导转化子表现 50 纳摩尔 MTX 抗性。关于观察到细胞生长的孔中的转化体, 培养基的 MTX 浓度增加到 200 纳摩尔, 然后用如上描述的不同方式最终获得能在含有 200 纳摩尔 MTX 的 IMDM-dFBS(10) 培养基中生长, 并能大量产生抗-CD20 人嵌合抗体的转化体。

3. 培养抗体表达细胞系和纯化抗体

以上条目 2 中获得的能大量产生抗-CD20 人嵌合抗体的 LCA 凝集素-抗性 CHO/DG44 转化细胞命名为 R92-3-1。R92-3-1 作为 FERM BP-7976 在国际专利生物保藏中心, 独立行政法人产业技术综合研究所

(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 2002年3月26日保藏。

R92-3-1 培养于含有 200 纳摩尔 MTX 的 IMDM-dFBS(10)中, 直到细胞开始汇合, 用 Dulbecco's PBS (Invitrogen 生产) 漂洗, 然后培养基换成 EX-CELL301 (由 JKH 制备)。细胞在 5%CO₂ 培养箱中 37°C 培养 7 天, 收集培养基上清。用 Prosep-A 柱 (Millipore 生产) 从培养基上清中纯化抗-CD20 嵌合抗体, 命名为 R92-3-1 抗体。

实施例 7

纯化凝集素-抗性 CHO/DG44 细胞产生的抗-CD20 嵌合抗体并测定其活性。

1. 测定来源于凝集素-抗性 CHO/DG44 细胞产生的抗体的结合活性 (免疫荧光法)

以上实施例 6 的条目 3 获得的 R92-3-1 抗体与表达 CD20 的 Raji 细胞系的结合活性根据以上实施例 2 的条目 1 描述的免疫荧光方法检测, 并且与来源于普通 CHO 细胞的商业上可购得的抗体 RituxanTM 比较。如图 17 所示, 荧光强度增加依赖于 R92-3-1 抗体和 RituxanTM 浓度, 证实它们有相似的结合活性。

2. 测定来源于凝集素-抗性 CHO/DG44 细胞的抗体的体外细胞毒活性 (ADCC 活性)

为了测定实施例 6 的条目 3 中获得的 R92-3-1 抗体的体外 ADCC 活性, 根据以上实施例 2 的条目 2 描述的方法测定 ADCC 活性。效应细胞与靶细胞, Raji 细胞的比率是 25: 1, 最终抗体浓度是 0.001 到 10 微克/毫升, 反应总体积是 200 微升, 结果在图 18 中表示。

结果表明来源于凝集素-抗性 CHO/DG44 细胞的 R92-3-1 抗体的 ADCC 活性比 RituxanTM 高。

3. 来源于凝集素-抗性 CHO/DG44 细胞的抗体的糖链分析

以上实施例 6 的条目 3 获得的 R92-3-1 抗体的糖链分析, 根据以上实施例 3 中描述的方法进行。结果在图 19 中显示。图 19 中峰①到⑧的糖链结构分别与图 7 的峰①到⑧相同。

图 19 中, 无 α 1,6-岩藻糖的糖链基团的比率从峰①到⑩中峰①到④, ⑨和⑩所占的面积计算。同时, α 1,6-岩藻糖结合的糖链基团的比

率从峰①到⑩中峰⑤到⑧所占的面积计算。

结果，在 R92-3-1 抗体中， α 1,6-岩藻糖不结合的糖链基团的比率是 33%，反之， α 1,6-岩藻糖结合的糖链基团的比率是 67%。当与实施
例 3 中进行的 Rituxan™ 糖链分析相比较时，由 LCA 凝集素-抗性
5 CHO/DG44 细胞产生的抗体，其 α 1,6-岩藻糖非结合的糖链的比率更高。

实施例 8

制备 CHO 细胞来源的 GMD 基因

1. 测定 CHO 细胞来源的 GMD 基因的 cDNA 序列

(1) 制备 CHO 细胞来源的 GMD 基因的 cDNA (制备除 5'-和 3'-
10 末端序列之外的 cDNA 部分)

使用在 GenBank 登记的人来源的 GMD (GenBank 登记号 AF042377) 的 cDNA 序列作为查询，在公共数据库中搜索啮齿动物来源的 cDNA，得到三种小鼠的 EST 序列(GenBank 登记号是 BE986856, BF158988 和 BE284785)。通过把这些 EST 序列加以连接，确定推
15 出的小鼠 GMD 的 cDNA 序列。

在小鼠来源的 GMD 的 cDNA 序列的基础上，制备具有由 SEQ ID NO: 32 代表的序列的 28 聚体的引物，具有由 SEQ ID NO: 33 代表的序列的 27 聚体的引物，具有由 SEQ ID NO: 34 代表的序列的 25 聚体的引物，具有由 SEQ ID NO: 35 代表的序列的 24 聚体的引物，具
20 有由 SEQ ID NO: 36 代表的序列的 25 聚体的引物。

然后，5%CO₂ 培养箱中，37℃，CHO/DG44 细胞传代培养，然后培养。培养后，使用 RNeasy Protect Mini 试剂盒 (QIAGEN 生产)，根据产品说明，从每个细胞系的 1×10⁷ 细胞中制备总 RNA。使用 RT-PCR (GIBCO BRL 生产)，根据产品说明，从 20 微升反应混合物中的 5 微
25 克每种 RNA 合成单链 cDNA。

然后，为了扩增 CHO 细胞来源的 cDNA，通过以下方法进行 PCR。具体的，制备 20 微升的反应混合物，其中含有 0.5 微升 CHO-来源的单链 cDNA 作为模板，[1×Ex Taq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产)，0.2 毫摩尔 dNTP，0.5 单位 Ex Taq 聚合酶 (Takara Shuzo 生产) 和 0.5μM 的
30 两种合成的 DNA 引物]。在此情况下，SEQ ID NO: 32 与 SEQ ID NO: 33 组合，SEQ ID NO: 34 与 SEQ ID NO: 33 组合，SEQ ID NO: 32

与 SEQ ID NO: 35 组合, SEQ ID NO: 32 与 SEQ IDNO: 36 组合作为 DNA 的合成引物。使用 DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer 生产) 进行反应, 94°C 加热 5 分钟, 然后进行 30 个循环, 每个循环为 94°C 加热 1 分钟, 68°C 加热 2 分钟。

5 PCR 反应混合物经过琼脂糖电泳分离, 发现当使用 SEQ ID NO: 32 和 33 的合成 DNA 引物时, 大约 1.2 kbp 的 DNA 片段在 PCR 产物中扩增, 当使用 SEQ ID NO: 33 和 34 的合成 DNA 引物时, 大约 1.1 kbp 的 DNA 片段在 PCR 产物中扩增, 当使用 SEQ ID NO: 32 和 35 的合成 DNA 引物时, 大约 350bp 的 DNA 片段在 PCR 产物中扩增, 当使用
10 SEQ ID NO: 32 和 36 的合成 DNA 引物时, 大约 1kbp 的 DNA 片段在 PCR 产物中扩增。使用 Gene Clean II 试剂盒 (BIO101 生产), 根据产品说明, 回收 DNA 片段。使用 DNA Ligation 试剂盒 (Takara Shuzo 生产), 回收的 DNA 片段连接到 pT7Blue(R) 载体 (Novagen 生产)。使用得到的重组质粒 DNA 样品转化 *E.coli* DH (TOYOBO 生产), 得
15 到质粒 22-8 (由 SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33 的合成 DNA 引物扩增的大约 1.2 kbp 的 DNA 片段), 质粒 23-3 (由 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 33 的合成 DNA 引物扩增的大约 1.1kbp 的 DNA 片段), 质粒 31 -5 (由 SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 35 的合成 DNA 引物扩
20 增的大约 350bp 的 DNA 片段) 和质粒 34-2 (由 SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 36 的合成 DNA 引物扩增的大约 1kbp 的 DNA 片段)。使用 DNA 测序仪 ABI PRISM 377 (Perkin Elmer 生产), 使用常规方法, 确定在这些质粒中含有的 CHO 细胞来源的 GMD 的 cDNA 序列 (因为 5'-末端的起始密码子甲硫氨酸的下游的 28 个碱基的序列和 3'-末端的
25 终止子上游的 27 个碱基的序列是开始于合成的寡聚 DNA 序列, 它们是小鼠 GMD cDNA 序列)。

另外, 为了制备其中质粒 22-8 和质粒 34-2 中所含的 CHO 细胞来源的 GMD 的 cDNA 片段合并的质粒, 进行以下步骤。1 微克质粒 22-8 与限制性内切酶 *EcoRI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 16 小时后, 消化产物经过琼脂糖电泳, 然后使用 Gene Clean II 试剂盒 (BIO101 生
30 产), 根据产品说明, 回收大约 4 kbp 的 DNA 片段。2 微克质粒 34-2 与限制性内切酶 *EcoRI* (Takara Shuzo 生产) 37°C 反应 16 小时后, 消

化产物经过琼脂糖电泳，然后使用 Gene Clean II 试剂盒（BIO101 生产），根据产品说明，回收大约 150bp 的 DNA 片段。回收的 DNA 片段分别使用小牛肠碱性磷酸酯酶（Takara Shuzo 生产）进行末端去磷酸化，然后使用 DNA Ligation 试剂盒（Takara Shuzo 生产）进行连接，使用
5 得到的重组质粒 DNA 转化 *E.coli* DH5 α （TOYOBO 生产），得到质粒 CHO-GMD（图 20）。

（2）测定 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 的 5'-末端序列

有从 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 的 5'-末端非编码区域的核苷酸序列制备的由 SEQ ID NO: 37 代表的核苷酸序列的 24 聚体的引物，从
10 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 制备的由 SEQ ID NO: 38 代表的核苷酸序列的 32 聚体的引物。为了扩增 cDNA，通过以下方法进行 PCR。然后，制备 20 微升含有 0.5 微升 CHO 细胞来源的单链 cDNA 作为模板的反应混合物[1 \times Ex Taq 缓冲液(Takara Shuzo 生产)，0.2 毫摩尔 dNTP，0.5 单位 Ex Taq 聚合酶（Takara Shuzo 生产）和 0.5 微摩尔 SEQ
15 ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 38 的合成 DNA 引物]，使用 DNA Thermal Cycler 480（Perkin Elmer 生产）进行反应，94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟，然后 20 个循环，每个循环为 94 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟，55 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟。然后 18 个循环，每个循环为 94 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟，68 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟。PCR 反应产物经过琼脂糖电泳分离，然后使用 Gene Clean II 试剂盒
20（BIO101 生产），根据产品说明，回收大约 300bp 的 DNA 片段。使用 DNA Ligation 试剂盒（Takara Shuzo 生产），回收的 DNA 片段连接到 pT7Blue(R) 载体（Novagen 生产）。使用得到的重组质粒 DNA 样品转化 *E.coli* DH5 α （TOYOBO 生产），得到质粒 5'GMD。使用 DNA 测序仪 377（Applied Biosystems 生产），测定质粒中含有的 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 的起始甲硫氨酸上游的 28 个碱基的核苷酸序列。
25

（3）测定 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 的 3'-末端序列

为了获得 CHO 细胞来源的 GMD 3'-末端 cDNA 序列，通过以下方法进行 RACE 方法。使用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒（CLONTECH 生产），根据产品说明，从 CHO 细胞来源的 RNA 制备
30 用于 3' RACE 的单链 cDNA。在此情况下，使用 PowerScriptTM 反转录酶（CLONTECH 生产）作为反转录酶。制备后得到的单链 cDNA 用试

剂盒所带的 Tricin-EDTA 缓冲液稀释 10 倍，用作 PCR 的模板。

然后，制备 20 微升含有 1 微升作为模板的 3'RACE 的 cDNA 反应混合物[Ex Taq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产)，0.2 毫摩尔 dNTP，0.5 单位 Ex Taq 聚合酶 (Takara Shuzo 生产)，0.5 微摩尔在 SEQ ID NO: 39 中所示的 24 聚体合成 DNA 引物[在条目 (1) 测定的 CHO 细胞来源的 GMD 的 cDNA 序列基础之上制备]，和 1×浓度的通用引物混合物 (附加于 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒，CLONTECH 生产)，使用 DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer 生产) 进行 PCR，PCR 是 94°C 加热 5 分钟，然后进行 30 个循环，每个循环为 94°C 加热 1 分钟，68°C 加热 2 分钟。

反应完成后，1 微升 PCR 反应混合物用 Tricin-EDTA 缓冲液 (CLONTECH 生产) 稀释 20 倍。然后 20 微升反应混合物[Ex Taq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产)，0.2 毫摩尔 dNTP，0.5 单位 EX Taq 聚合酶 (Takara Shuzo 生产)，0.5 微摩尔在 SEQ ID NO: 40 中所示的 25 聚体的合成 DNA 引物[在条目 (1) 测定的 CHO 细胞来源的 GMD 的 cDNA 序列基础之上制备]和 0.5 微摩尔含有 1 微升稀释 20 倍的作为模板的水溶液嵌套通用引物 (附加于 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒，CLONTECH 生产)，使用 DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer 生产) 进行反应，94°C 加热 5 分钟，然后进行 30 个循环，每个循环为 94°C 加热 1 分钟，68°C 加热 2 分钟。

反应完成后，PCR 反应产物经过琼脂糖电泳分离，然后使用 Gene Clean II 试剂盒 (BIO101 生产)，根据产品说明，回收大约 700bp 的 DNA 片段。使用 DNA Ligation 试剂盒 (Takara Shuzo 生产)，回收的 DNA 片段连接到 pT7Blue(R)载体 (Novagen 生产)，使用得到的重组质粒 DNA 转化 *E.coli* DHα (TOYOBO 生产)，得到质粒 3'GMD。使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产)，测定质粒中含有的 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 的终止密码子上游的 27 个碱基和 3'-末端中的非编码区域 415 个碱基的核苷酸序列。

条目 (1)，(2) 和 (3) 中测定的 CHO-来源的 GMD 基因的全长 cDNA 序列和相应的氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 41 和 61 中显示。

2. 测定含有 CHO/DG44 细胞来源的 GMD 基因的基因组序列

有由 SEQ ID NO: 56 代表的核苷酸序列的 25 聚体的引物在实施例 8 的条目 1 中测定的鼠 GMD cDNA 序列的基础上制备。然后, 通过以下方法获得 CHO 细胞来源的基因组 DNA。CHO/DG44 细胞悬浮于 IMDM-dFBS (10) -HT (1) 培养基中[IMDM-dFBS (10) 培养基包括 1×浓度的 HT 添加物 (Invitrogen 生产)], 密度为 3×10^5 细胞/毫升, 5 悬浮液以 2 毫升/孔分配于用于贴壁细胞的 6 孔平底组织培养板。细胞在 5%CO₂ 培养箱中 37°C 培养, 直到细胞在培养板中汇合, 通过已知方法[*Nucleic Acids Research (核酸研究)*, 3, 2303 (1976)]从培养板的细胞中制备基因组 DNA, 在 150 微升 TE-RNase 缓冲液 (pH 8.0) (10 毫摩尔/升 Tris-HCl, 1 毫摩尔/升 EDTA, 200 微克/毫升 RNase A) 中溶解过夜。

然后, 制备 100 纳克获得的 CHO/DG44 细胞来源的基因组 DNA 和 20 微升反应混合物[1×ExTaq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP, 0.5 单位 EX Taq 聚合酶 (Takara Shuzo 生产), 0.5 微摩尔 SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 56 的合成 DNA 引物], 使用 DNA Thermal 15 Cycler 480 (Perkin Elmer 生产) 进行 PCR, PCR 是 94°C 加热 5 分钟, 然后进行 30 个循环, 每个循环为 94°C 加热 1 分钟, 68°C 加热 2 分钟。反应完成后, PCR 反应产物经过琼脂糖电泳分离, 然后使用 Gene Clean II 试剂盒 (BIO101 生产), 根据产品说明, 回收大约 100bp 的 DNA 20 片段。使用 DNA Ligation 试剂盒 (Takara Shuzo 生产), 回收的 DNA 片段连接到 pT7Blue(R) 载体 (Novagen 生产), 使用得到的重组质粒 DNA 转化 *E.coli* DH5α (TOYOBO 生产), 得到质粒 ex3。使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产), 测定质粒中含有的 CHO 细胞来源的基因组 DNA 的核苷酸序列。测定的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 57 25 中表示。

然后, 在实施例 8 的条目 1 中测定的鼠 CHO 细胞来源的 GMD cDNA 序列的基础上, 制备由 SEQ ID NO: 58 代表的核苷酸序列的 25 聚体的引物和有由 SEQ ID NO: 59 代表的核苷酸序列的 25 聚体的引物。然后, 制备 100 纳克 CHO/DG44-来源的基因组 DNA 和 20 微升反 30 应混合物[1×ExTaq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP, 0.5 单位 EX Taq 聚合酶 (Takara Shuzo 生产), 0.5 微摩尔 SEQ ID NO:

58 和 SEQ ID NO: 59 的合成 DNA 引物], 使用 DNA Thermal Cyclers 480 (Perkin Elmer 生产) 进行 PCR, PCR 是 94°C 加热 5 分钟, 然后进行 30 个循环, 每个循环为 94°C 加热 1 分钟, 68°C 加热 2 分钟。

反应完成后, PCR 反应产物经过琼脂糖电泳分离, 然后使用 Gene Clean II 试剂盒 (BIO101 生产), 根据产品说明, 回收大约 200bp 的 DNA 片段。使用 DNA Ligation 试剂盒 (Takara Shuzo 生产), 回收的 DNA 片段连接到 pT7Blue(R) 载体 (Novagen 生产), 使用得到的重组质粒 DNA 转化 *E.coli* DH α (TOYOBO 生产), 得到质粒 ex4。使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产), 测定获得的质粒中含有的 CHO 细胞来源的基因组 DNA 的核苷酸序列。测定的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 60 中表示。

实施例 9

制备编码各种关于糖链合成的酶的 CHO 细胞来源的基因:

1. 测定 CHO 细胞来源的 FX cDNA 序列

15 (1) 从 CHO/DG44 细胞中提取总 RNA

CHO/DG44 细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清 (Life Technologies 生产) 和 1 \times 浓度 HT 添加物 (Life Technologies 生产) 的 IMDM 培养基中, 15 毫升悬浮液接种于用于贴壁细胞培养的 T75 组织培养瓶 (Greiner 生产) 中, 密度为 2 \times 10⁵ 细胞/毫升。在 5% CO₂ 培养箱中 37°C 培养后的第二天, 收集 1 \times 10⁷ 细胞, 使用 RNAeasy (由 QIAGEN 制备), 根据产品说明, 从中提取总 RNA。

(2) 制备 CHO/DG44 细胞来源的单链 cDNA

25 条目 (1) 中制备的总 RNA 溶解于 45 微升无菌水中, 加入 1 微升 RQ1 无 RNase 的 DNase (Promega 生产), 5 微升所附的 10 \times DNase 缓冲液和 0.5 微升 RNasin 核糖核酸酶抑制剂 (Promega 生产), 然后 37°C 反应 30 分钟, 降解样品中污染的基因组 DNA。反应后, 使用 RNAeasy (由 QIAGEN 制备) 再次纯化总 RNA, 溶解于 50 微升无菌水中。

30 使用寡聚 o(dT) 作为引物的 20 微升反应混合物中, 通过第一条链 cDNA 合成的 SUPERSCRIPT 预扩增系统 (Life Technologies 生产), 根据产品说明进行反转录反应, 从 3 微克得到的总 RNA 样品中合成单链 cDNA。稀释 50 倍的反应混合物的水溶液用于 GFPP 和 FX 克隆。

使用前储存于-80°C。

(3) 制备中国仓鼠-来源的 FX 的部分 cDNA 片段

通过以下步骤制备来源于中国仓鼠-来源的 FX 的部分 cDNA 片段。首先，设计人 FX cDNA (Genebank 登记号 U58766) 和鼠 FX cDNA (Genebank 登记号 M30127) 共同的核苷酸序列的特异引物(在 SEQ ID NO: 42 和 43 中所示)。

然后，制备 25 微升含有 1 微升在条目 (2) 中制备的 CHO/DG44-来源的单链 cDNA 的反应混合物[ExTaq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产)，0.2 纳摩尔 dNTP 和 0.5 微摩尔/升基因特异性引物 (SEQ ID NO: 42 和 43)]，使用 DNA 聚合酶 ExTaq (Takara Shuzo 生产) 进行聚合酶链反应 (PCR)。PCR 是 94°C 加热 5 分钟，随后进行 30 个循环，每个循环是 94°C 加热 1 分钟，58°C 加热 2 分钟，72°C 加热 3 分钟。最后 72°C 加热 10 分钟。

PCR 后，反应混合物经过 2% 琼脂糖电泳分离，然后使用 QiaexII Gel Extraction 试剂盒 (QIAGEN 产生)，纯化 301bp 的特异性扩增片段，用 20 微升无菌水洗涤(在下文中此方法用于从琼脂糖凝胶中纯化 DNA 片段)。通过 TOPO TA Cloning 试剂盒 (Invitrogen 生产) 根据所附的产品说明，在质粒 PCR2.1 中插入 4 微升扩增片段。使用反应混合物，用 Cohen 等人的方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. (美国科学院院报) USA*, **69**, 2110(1972)] (在下文中，此方法用于转化 *E. coli*) 转化 *E. coli* DH5a。根据已知方法[*Nucleic Acids Research (核酸研究)*, **7**, 1513 (1979)] 从获得的几种卡那霉素-抗性克隆中分离质粒 DNA (在下文中，此方法用于分离质粒)，得到 2 个 FX cDNA 部分片段分别插入的克隆。它们称 pCRFX 克隆 8 和 pCRFX 克隆 12。

使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产) 和 BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction 试剂盒 (Applied Biosystems 生产)，根据产品说明的方法，测定插入到每个 FX 克隆 8 和 FX 克隆 12 的 cDNA 核苷酸序列。确定每个插入的序列被测定的 cDNA 编码中国仓鼠-来源的 FX 的开放阅读框架 (ORF) 的部分序列。

(4) 合成用于 RACE 的单链 cDNA

使用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (CLONTECH 生产)，根据产

品说明, 从条目(1)提取的 CHO/DG44 总 RNA 中制备 5'RACE 和 3'RACE 单链 cDNA 样品。反转录中使用 PowerScript™ 反转录酶 (CLONTECH 生产)。每个制备的单链 cDNA 用试剂盒所附的 Tricin-EDTA 缓冲液稀释 10 倍, 用作 PCR 模板。

- 5 以条目(3)中测定的中国仓鼠来源的 FX 的部分序列为基础, 设计中国仓鼠 FX-特异的 5' RACE 引物 FXGSP1-1 (SEQ ID NO: 44)和 FXGSP 1-2 (SEQ ID NO: 45), 中国仓鼠 FX-特异的 3' RACE 引物 FXGSP2-1 (SEQ ID NO: 46) 和 FXGSP2-2 (SEQ ID NO: 47)。

- 10 然后, 制备 50 微升含有条目(4)中制备的 1 微升用于 RACE 的 CHO/DG44 来源的单链的 cDNA 的反应混合物[Advantage2 PCR 缓冲液 (CLONTECH 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP, 0.2 微摩尔/升用于 RACE 的中国仓鼠 FX-特异性的引物和 1×浓度的共同引物(CLONTECH 生产)], 使用 Advantage2 PCR 试剂盒 (CLONTECH 生产) 进行聚合酶链反应 (PCR)。PCR 反应进行 20 个重复循环, 每个循环是 94℃加热 5 秒, 15 68℃加热 10 秒, 72℃加热 2 分钟。

反应完成后, 1 微升反应混合物用 Tricin-EDTA 缓冲液稀释 50 倍, 1 微升稀释的溶液作为模板, 再次制备反应混合物, 在相同体积下进行 PCR。在第一次和第二次 PCR 中联合使用的引物和 PCR 扩增的 DNA 片段的长度在表 2 中表示。

20

表 2

中国仓鼠-来源的 FX cDNA RACE PCR 中联合使用的引物和 PCR 产物大小

5'RACE	FX-特异性引物	共同引物	PCR 扩增产物大小
第一次	FXGSP1-1	UPM(通用引物混合物)	
第二次	FXGSP1-2	NUP(嵌套通用引物)	300bp
3'RACE	FX-特异性引物	共同引物	PCR 扩增产物大小

第一次	FXGSP2-1	UPM(通用引物混合物)	
第二次	FXGSP2-2	NUP(嵌套通用引物)	1,100bp

PCR 后，反应混合物经过 1% 琼脂糖电泳分离，然后使用 QiaexII Gel Extraction 试剂盒（QIAGEN 产生）纯化目的特异性扩增片段，用 20 微升无菌水洗涤。根据附加于 TOPO TA 克隆试剂盒（Invitrogen 生产）的产品说明，在质粒 PCR2.1 中插入 4 微升扩增片段，用反应混合物转化 *E.coli* DH5 α 。

从出现的几个卡那霉素-抗性克隆中分离质粒 DNA，得到 6 个含有中国仓鼠 FX 5' 区域的 cDNA 克隆。它们称 FX5' 克隆 25, FX5' 克隆 26, FX5' 克隆 27, FX5' 克隆 28, FX5' 克隆 31 和 FX5' 克隆 32。

以同样方式获得 5 个含有中国仓鼠 FX3' 区域的 cDNA 克隆。这些 FX3' 称 FX3' 克隆 1, FX3'3, FX3, 克隆 6, FX3, 克隆 8 和 FX3, 克隆 9。

使用 DNA 测序仪 377（Applied Biosystems 生产），根据产品说明中描述的方法，通过 5' 和 3' RACE 测定获得的每个克隆 cDNA 组成的核苷酸序列。通过把用此方法测定的 cDNA 核苷酸序列加以比较，排除 PCR 中核苷酸阅读错误，确定中国仓鼠-来源的 FX cDNA 的全长核苷酸序列。测定的序列用 SEQ ID NO: 48 的 SEQ ID NO48 ORF 代表，相应于 95 到 1060 位的核苷酸，除去终止密码子外，相应于 95 到 1057 位的核苷酸的氨基酸序列用 SEQ ID NO: 62 表示。

2. 测定 CHO 细胞 GFPP cDNA 序列

(1) 制备中国仓鼠-来源的 GFPP 的部分 cDNA 片段

通过以下步骤制备中国仓鼠 GFPP 的部分 cDNA 片段。

首先，比较公共数据库中登记的人来源 GFPP cDNA 的核苷酸序列（Genebank 登记号 AF017445），与此核苷酸序列有高度同源性的小鼠 EST 序列（Genebank 登记号 AI467195, AA422658, BE304325 和 AI466474）和大鼠 EST 序列（Genebank 登记号 BF546372, AI058400 和 AW144783），以这三种中高度保守区域为基础设计对大鼠 GFPP 的

特异引物 GFPP FW9 和 GFPP RV9 (SEQ ID NO: 49 和 50)。

然后, 制备 25 微升含有 1 微升在条目 1 (2) 中制备的 CHO/DG44-来源的单链 cDNA 的反应混合物[ExTaq 缓冲液 (Takara Shuzo 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP 和 0.5 微摩尔/升 GFPP 特异性引物 GFPP FW9 和
5 GFPP RV9(SEQ ID NO: 49 和 50)], 使用 DNA 聚合酶 ExTaq (Takara Shuzo 生产) 进行聚合酶链反应 (PCR)。PCR 是 94°C 加热 5 分钟, 随后进行 30 个循环, 每个循环是 94°C 加热 1 分钟, 58°C 加热 2 分钟, 72°C 加热 3 分钟。最后 72°C 加热 10 分钟。

PCR 后, 反应混合物经过 2% 琼脂糖电泳分离, 然后使用 QiaexII
10 Gel Extraction 试剂盒 (QIAGEN 产生) 纯化 1.4 Kbp 的特异性扩增片段, 用 20 微升无菌水洗涤。根据 TOPO TA Cloning 试剂盒 (Invitrogen 生产) 所附的产品说明, 在质粒 pCR2.1 中插入 4 微升扩增片段。使用反应混合物, 转化 *E.coli* DH5 α 。

从出现的几种卡那霉素-抗性克隆中分离质粒 DNA, 得到 3 个用
15 GFPP 部分 cDNA 片段转染的克隆。它们称为 GFPP 克隆 8, GFPP 克隆 11, 和 GFPP 克隆 12。

使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产) 和 BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction 试剂盒 (Applied Biosystems 生产), 根据产品说明描述的方法, 测定插入到 GFPP 克隆
20 8, GFPP 克隆 11, 和 GFPP 克隆 12 的 cDNA 核苷酸序列。证实序列确定的插入 cDNA 编码中国仓鼠来源的 GFPP 的部分开放阅读框架 (ORF) 序列。

(2) 用 RACE 法测定中国仓鼠-来源的 GFPP 全长 cDNA 序列

以条目 2 (1) 中确定的中国仓鼠 FX 部分序列为基础, 设计中国
25 仓鼠 FX-特异的 5'RACE 的引物 GFPP GSP1-1 (SEQ ID NO: 52) 和 GFPP GSP1-2 (SEQ ID NO: 53), 和中国仓鼠 GFPP-特异的 3'RACE 的引物 GFPP GSP2-1 (SEQ ID NO: 54) 和 GFPP GSP2-2 (SEQ ID NO: 55)。

然后, 制备 50 微升含有条目 (4) 中制备的 1 微升用于 RACE 的 CHO/DG44 来源的单链 cDNA 的反应混合物[Advantage2 PCR 缓冲液
30 (CLONTECH 生产), 0.2 毫摩尔 dNTP, 0.2 微摩尔/升用于 RACE 的中国仓鼠 GFPP-特异性引物和 1 \times 浓度的共同引物(CLONTECH 生产)],

进行 PCR 反应。

PCR 反应进行 20 个重复循环，每个循环是 94℃加热 5 秒，68℃加热 10 秒，72℃加热 2 分钟。

反应完成后，1 微升反应混合物用 Tricin-EDTA 缓冲液稀释 50 倍。

- 5 用 1 微升稀释的溶液作为模板，再次制备反应混合物，在相同体积下进行 PCR。在第一次和第二次 PCR 中联合使用的引物和 PCR 扩增的 DNA 片段的大小在表 3 中表示。

表 3

中国仓鼠-衍生的 GFPP cDNA RACE PCR 中联合使用的引物和
10 PCR 产物的大小

5'RACE	GFPP- 特 异 性引物	共同引物	PCR 扩 增 产物的大小
第一次	GFPPGSP1-1	UPM(通用 引物混合物)	
第二次	GFPPGSP1-2	NUP(嵌套 通用引物)	1,100bp
3'RACE	GFPP- 特 异 性引物	共同引物	PCR 扩 增 产物的大小
第一次	GFPPGSP2-1	UPM(通用 引物混合物)	
第二次	GFPPGSP2-2	NUP(嵌套 通用引物)	1,400bp

- 15 PCR 后，反应混合物经过 1%琼脂糖电泳分离，然后使用 QiaexII Gel Extraction 试剂盒（QIAGEN 产生）纯化目的特异性扩增片段，用 20 微升无菌水洗涤。根据附加于 TOPO TA Cloning 试剂盒（Invitrogen 生产）的产品说明，在质粒 PCR2.1 中插入 4 微升扩增片段，用反应混合物转化 *E.coli* DH5α。

从出现的几个卡那霉素-抗性克隆中分离质粒 DNA，得到 4 个含有中国仓鼠 GFPP5'区域的 cDNA 克隆。它们称 GFPP5'克隆 1，GFPP5'

克隆 2, GFPP5'克隆 3, GFPP5'克隆 4。

以同样方式获得 3 个含有中国仓鼠 GFPP3'区域的 cDNA 的克隆。它们称为 GFPP3'克隆 10, GFPP3'克隆 16, GFPP3'克隆 20。

使用 DNA 测序仪 377 (Applied Biosystems 生产), 根据产品说明
5 中描述的方法, 测定通过 5'和 3'RACE 获得的每个克隆的 cDNA 的核苷酸序列。测定核苷酸序列后, 把核苷酸序列加以比较, 排除 PCR 中碱基的阅读错误, 确定中国仓鼠-来源的 GFPP cDNA 的全长核苷酸序列。确定的序列用 SEQ ID NO: 51 的 SEQ ID NO51 ORF 代表, 相应于 27 到 1799 位的核苷酸, 除去终止密码子外, 相应于 27 到 1796 位
10 的核苷酸的氨基酸序列用 SEQ ID NO: 63 表示。

实施例 10

测定具有不同比率的无 α 1,6-岩藻糖的糖链与之结合的抗体分子的抗-CD20 嵌合抗体活性

1. 制备具有不同比率的无 α 1,6-岩藻糖的糖链与之结合的抗体分子的抗-CD20 嵌合抗体
15

实施例 1 的条目 3 中纯化的 KM3065 与 CHO 产生的 RituxanTM 以 KM3065: RituxanTM=24: 66, 34: 56 或 44: 46 的比率混合。这些样品根据实施例 3 的方法进行糖链分析。无 α 1,6-岩藻糖的糖链与之结合的抗体分子比率分别是 26%, 35%, 44%。在下文中, 这些样品叫做
20 抗-CD20 嵌合抗体 (26%), 抗-CD20 嵌合抗体 (35%), 抗-CD20 嵌合抗体 (44%)。每个样品的糖链分析结果如图 21 中所示。

2. 测定表达 CD20 的细胞系结合活性 (免疫荧光法)

总共 5 种抗体, 包括实施例 10 的条目 1 中制备的 3 种具有不同的无 α 1,6-岩藻糖的糖链与抗体分子结合的糖链比率的抗-CD20 嵌合抗体, 和在实施例 3 中进行了糖链分析的 KM3065 和 RituxanTM (分别称“抗-CD20 嵌合抗体 (96%) 和抗-CD20 嵌合抗体 (6%)”), 通过实施例
25 2 的条目 1 描述的免疫荧光法检测这五种抗体的结合活性。如图 22 所示, 所有这些抗体在抗体浓度为 0.016 到 2 微克/毫升的情况下, 对 CD20-阳性 Raji 细胞 (JCRB 9012) 几乎表现相同的结合活性。发现无
30 α 1,6-岩藻糖的糖链与抗体分子结合的抗体分子, 其糖链的比率不影响抗体的抗原结合活性。

3. 测定 CD20 表达细胞系的细胞毒活性 (^{51}Cr 释放方法)

使用从健康供体 A 收集的效应细胞, 如下测定对 CD20-阳性人 B 淋巴细胞系 WIL2-S (ATCC CRL 8885) 的 ADCC 活性

(1) 制备靶细胞悬液

5 制备 2×10^6 WIL2-S 细胞后, 加入 3.7MBq 当量的放射性物质 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 37°C 反应 1 小时标记细胞。反应后, 细胞重复悬浮于 PRMI 1640-FCS(10)培养基中, 然后离心, 这样把细胞漂洗三次。细胞再悬浮于培养基中, 4°C 置于冰上 30 分钟, 自发的分解放射性物质。离心后, 通过加入 10 毫升培养基, 细胞调节到 2×10^5 细胞/毫升, 作为靶向细胞
10 悬液。

(2) 制备人效应细胞悬液

从健康人收集 50 毫升外周血后, 加入 0.5 毫升肝素钠 (Shimizu Pharmaceutical 生产), 然后轻轻混合。使用 Lymphoprep (AXIS SHIELD 生产), 根据所附的产品说明, 离心混合物 ($800 \times g$, 20 分钟), 分离出
15 单核白细胞层。用培养基离心漂洗 ($1,400 \text{ rpm}$, 5 分钟) 三次后, 细胞使用培养基重悬, 密度达到 2×10^6 细胞/毫升, 作为人效应细胞悬液。

(3) ADCC 活性测定

(1)中制备的靶细胞悬液(50 微升)分配于 96 孔 U 型底板 (Falcon 生产) 中 (1×10^4 细胞/孔)。然后分配 (2) 中制备的 100 微升人效应
20 细胞悬液 (2×10^5 细胞/孔, 人效应细胞与靶向细胞的比率是 20: 1)。随后, 加入不同的有不同的无 $\alpha 1,6$ -岩藻糖的糖链结合比率的抗-CD20 嵌合抗体, 得到终浓度浓度分别为 0.001 到 1 微克/毫升, 然后 37°C 反应 4 小时。反应后, 板离心, 悬液中 ^{51}Cr 的量用 γ -计数器测量。单独使用培养基取代人效应细胞悬液和抗体溶液, 用相同程序测量上清中
25 ^{51}Cr 的量, 计算自发释放的 ^{51}Cr 量。使用 1 摩尔/升盐酸溶液取代抗体溶液和人效应细胞悬液, 用相同程序测量材料上清中 ^{51}Cr 的量, 计算总释放 ^{51}Cr 的量。细胞毒活性 (%) 的计算基于以下方程。

$$30 \quad \text{细胞毒性}(\%) = \frac{\text{样品上清中 } ^{51}\text{Cr} - \text{自发释放的 } ^{51}\text{Cr}}{\text{总的释放 } ^{51}\text{Cr} - \text{自发释放的 } ^{51}\text{Cr}} \times 100$$

图 23 表示使用健康供体 A 的效应细胞，以不同浓度（从 0.001 到 1 微克/毫升）的有不同无 α 1,6-岩藻糖的糖链基团的抗体分子比率的抗-CD20 嵌合抗体，得到的 ADCC 活性测量结果。如图 23 所示，当无 α 1,6-岩藻糖的糖链与之结合的抗体分子比率增加时，抗-CD20 嵌合抗体的 ADCC 活性表现出随着每种抗体浓度增加而增加的趋势。当抗体浓度低时，ADCC 活性降低。抗体浓度为 0.01 微克/毫升时，有着 26%，35%，44% 和 96% 的无 α 1,6-岩藻糖的糖链的抗体表现出几乎同样高的 ADCC 活性，但是有着 6% 的无 α 1,6-岩藻糖的糖链的抗体表现出低的 ADCC 活性。

4. 测定 CD20 表达细胞系的 ADCC 活性（LDH 法）

对 Raji 细胞的 ADCC 活性通过实施例 2 的条目 2 中描述的 LDH（乳酸脱氢酶）活性测量方法，使用从健康供体 B 中收集的效应细胞测定。效应细胞与靶向细胞的比率是 20: 1，最终抗体浓度是 0.0001 到 1 微克/毫升。反应是总体积为 200 微升，37°C 进行 4 小时，然后根据实施例 2 的条目 2 进行测量。图 24 表示使用健康供体 B 的效应细胞，以不同浓度（从 0.001 到 1 微克/毫升）的有不同比率的无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子的抗-CD20 嵌合抗体，得到的 ADCC 活性测量结果。如图 24 所示，当无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子比率增加时，抗-CD20 嵌合抗体的 ADCC 活性表现出随着每种抗体浓度增加而增加的趋势。当抗体浓度低时，ADCC 活性降低。抗体浓度为 0.01 微克/毫升时，有着 26%，35%，44% 和 96% 的无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体表现出高的 ADCC 活性，但是有着 6% 的无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体表现出低的 ADCC 活性。

图 23 和图 24 的结果表明随着无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子比率增加，ADCC 活性增加。无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子比率大约 20% 或更多时，ADCC 活性足够的高。当改变人效应细胞供体和靶细胞时，可以获得相同的结果。

实施例 11

测定有不同比率 bisecting GlcNAc 的糖链结合的抗体分子的抗

-CD20 嵌合抗体活性

(1) 通过凝集素层析法分离抗-CD20 嵌合抗体

使用对有 bisecting GlcNAc 的糖链有亲和力的凝集素固定柱子, 分离实施例 1 的条目 3 中纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065。

- 5 含有纯化的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 的溶液用于凝集素柱子 (LA-PHA-E₄, 4.6×150 毫米, Hohnen Corp 生产)。使用 Shimadzu 生产的 LC-6A 作为 HPLC 系统, 以 0.5 毫升/分钟的流速和室温作为柱温进行凝集素层析。柱子用 50 毫摩尔 Tris-硫酸缓冲液 (pH 8.0) 平衡, 然后注入含有纯化的 KM3065 的溶液, 用 50 毫摩尔 Tris-硫酸缓冲液
- 10 (pH 8.0) 的 0M 到 58 毫摩尔四硼酸钾 (K₂B₄O₇, 由 Nakalai Tesque 制备) 线性梯度洗脱 (35 分钟)。其后, 四硼酸钾浓度保持在 100 毫摩尔 5 分钟, 然后 50 毫摩尔 Tris-硫酸缓冲液 (pH 8.0) 进一步通过柱子 20 分钟, 这样把抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 分成 4 个成分 (成分①到④), 4 个成分为 9 到 14 分钟期间, 14 到 17 分钟期间, 17 到 22
- 15 分钟期间和 22 到 34 分钟期间洗脱的。(图 25)

(2) 糖链分析

- 这样分离的 4 个成分 (成分①到④) 和分离前的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 使用实施例 3 中描述的方法进行糖链分析。在 15 分钟到 45 分钟期间 PA 修饰的糖链被洗脱。基于每个 PA 修饰的糖链的峰面积的
- 20 总和, 计算有 bisecting GlcNAc 的糖链的比率时, 分离前抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 的糖链比率是 20%, 然而在成分①中糖链比率是 0%, 在成分②中糖链比率是 8%, 在成分③中糖链比率是 33%, 在成分④中糖链比率是 45% (图 26)。无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子的比率在抗 D20 嵌合抗体 KM3065 分离前是 96%, 在成分①中是 93%,
- 25 在成分②中是 94%, 在成分③中是 92%, 在成分④中是 90%。基于这些结果为基础, 证实使用对有 bisecting GlcNAc 的糖链有亲和力的凝集素固定柱子计算时, 无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子的比率几乎是恒定的。制备了有不同抗体分子比率的抗-CD20 嵌合抗体, 其中抗体分子是 bisecting GlcNAc 的糖链结合的。

- 30 (3) 测量体外细胞毒活性 (ADCC 活性)

用实施例 2 的条目 2 描述的方法, 测定用凝集素层析法分离的 4

个成分（成分①到④）和分离前的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 的体外细胞毒活性（ADCC 活性）（图 27）。结果，用凝集素层析法分离的 4 个成分表现出与分离前的抗-CD20 嵌合抗体 KM3065 几乎相同强度的 ADCC 活性。因此根据以上结果，无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子几乎有 90% 到 96% 的相同比率，认为无 α 1,6-岩藻糖糖的链基团结合的抗体分子对 ADCC 活性的影响几乎是相同的。当高比率的无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合的抗体分子的抗体中 bisecting GlcNAc 进一步增加时，ADCC 活性并不增加，同时也有着高 ADCC 活性。即，发现高无 α 1,6-岩藻糖的糖链结合比率的抗体，其 ADCC 活性比高 α 1,6-岩藻糖的糖链结合比率的抗体高，这与 bisecting GlcNAc 的存在与否无关。

工业实用性

本发明提供包含特异性的与 CD20 结合的，有与 Fc 区域结合的 N-糖苷键合的复合糖链的抗体分子的抗体组合物，产生这种抗体组合物的细胞或转基因非人动物或植物，这种抗体组合物的制备方法，和包含抗体组合物的药物。

<110>协和发酵工业株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD.)

<120>与CD20特异结合的抗体组合物

<130> CPJPL41616

<150> 日本 2001-392753

<151> 2001-12-25

<150> 日本 2002-106948

<151> 2001-04-09

<150> 日本 2002-319975

<151> 2001-11-01

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<400> 1

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattcct 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattcct 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
tttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaagc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggt 1020
gtaccagaag accttgaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat ccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacatttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440

cggggcgtga tcttgatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
 tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
 gcaaaacttc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
 attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
 atcattgggtg tggetggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgcaa cagaaaacta 1740
 ggaaaaacag gcctgtacc cttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
 cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
 gaagggctgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213>小鼠

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgetca ttctttttgc ctgggggacc 60
 ttgttathtt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
 agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
 aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
 ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300

aagaacaag ctagaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gtttttctca caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcggga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatectcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggagc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cgttacacag aaaattcact tcggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380

gactttctag tgtgtacttt ttcattccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcata ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
ggccaaaatg cccacaatca gattgctggt taccctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728
<210> 3
<211> 9196
<212> DNA
<213> 中国地鼠

<400> 3
tctagaccag gctggctctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtctg 60
ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca ttttttgaa tattgtgata 120
atttacatta taattgtaag taaaaatctt cagcctatct tgttatacat ttttgcgtaa 180
attattcttt tttgaaagt ttgttgcct taatagtcta gggaaacata aagttataat 240
ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgtata taagttgta 360
cagcaaagtg ttattaatc atagtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
ctttctatat atgtggaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgag agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttctttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttctcccag gggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggtgttgt 720
tactgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gttcttgta cattctttg tagagaattt attttcttg ggttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
ttcatatat gtctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620

tttaaatac atagccacc taagggttta actgttgta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaatat attgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct ttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt 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 tcctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc attgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta cttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctcttgat caccaggaag atcttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta atttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
atcttctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttctt ggcgttgat 2580
tatgtcatt cttttgcct gggggacctt attgtttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700

gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt 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 aaatTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt ggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgccttac tgtcacttta aaaaactgca ggcttagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gttgtatggt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcgggtg gaggttgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780

agtcaggac aagaagtgg cgatacttg ttggattaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagt gtggtcttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttecta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tccatcctg agaagatctc ttttccctt tataatttag 4260
gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgc tcaatccca ataacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620
cgatttecta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgect 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860

ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taaggacaa 4920
agagtttatt cagattacat ttaaggtga taatgtatga ttgcaaggtt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttctgtgct cagctcactt ttctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtcctcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagttg atatctgta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttggt ccattctggg 5880
ttctttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaaggtgt ggtagtattg gaaggctctc 5940

aggtatatat ttctatattc tgtatTTTTT tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccatt ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
tttttaata ttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaa ttaattttgtg 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
tggtgaaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaa 6660
atatttagat gcttgtttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac ccttttcaa aggtttcttt tcttttttt ttaagggac 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 tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatggt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt ttttagtta 7320
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgatatt tcatcccttc aatacatata ttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat ctcaatgtc tgcataatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggtc 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg accccttgc tcactacttc tcctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tcgttccatc agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct ctgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160
tgctctcacc cgttcctccc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tectctcccc 8220
tccccttctc ccttctcttt tcttctaact cctctctccc tccaccacag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta taccaggttt attttgcta gtatttgat gtgtttggtt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatitag acacagattt aatatitga agtttttttt 8460
ttttttttt ttaaagattt atttatittt tatgtcttct gcttcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcacca ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt ttagccatt tataatgta gctgtacca ggtttacatt ttcttttacc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcacc tcttattttt gtctgttggg ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagtat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttgcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtgat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaacccacgc tctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
cagtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgctgtatc tctagcacc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttccag cattgtgtga cagagacagg 9180

aggatcccaa gagctc

9196

<210> 4

<211> 297

<212> PRT

<213> 人类

<400> 4

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
 20 25 30

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

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
 50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
 65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
 85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
 100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
 115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
 130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
 180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
 210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
 275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7
Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8
Ser Tyr Asn Met His
1

<210> 9
<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

<210> 11

<211> 384

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 11

atg gat ttt cag gtg cag att atc agc ttc ctg cta atc agt gct tca 48
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc tcc cag tct cca gca atc 96
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc agg gcc agc 144
 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

tca agt gta agt tac atc cac tgg ttc cag cag aag cca gga tcc tcc 192

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

gtt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg act tct tac tct ctc acc atc 288
 Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg 336
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

act agt aac cca ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa atc aaa 384
 Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 12

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gca aga tcg act tac tac ggc ggt gac tgg tac ttc aat 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tct gca 420
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140
 <210> 14
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 14
 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
130 135

<210> 15

<211> 91

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 15

caggaaacag ctatgacgaa ttcgcctcct caaatggat ttcaggtgc agattatcag 60

cttcctgcta atcagtgctt cagtcataat g

91

<210> 16

<211> 91

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 16

gtgaccttct cccctggaga tgcagacagg attgctggag actgggagag aacaatttgt 60

cctctggaca ttatgactga agcactgatt a

91

<210> 17

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 17

ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgtagt tacatccact 60

ggttccagca gaagccagga tcctccccc

90

<210> 18

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 18

ccagaccac tgccactgaa gcgaacaggg actccagaag ccaggttga tgtggcataa 60

atccagggtt tgggggagga tcctggctt

89

<210> 19

<211> 91

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 19

tcagtggcag tgggtctggg acttcttact ctctcacat cagcagagtg gaggctgaag 60

atgctgccac ttattactgc cagcagtgga c

91

<210> 20

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 20

gttttcccag tcacgaccgt acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgggt 60

gggttactag tccactgctg gcagtaataa

90

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 21

gtctgaagca ttatgtgttg aagc

24

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成DNA

<400> 22

gtgagtacat tcattgtact gtg

23

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> 中国地鼠

<400> 23

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

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

20

25

30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35

40

45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50

55

60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65

70

75

80

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

Ile Glu Asn Tyr Lys 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> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 24

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

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

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

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> 25

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 25

caggaaacag ctatgacgcg gccgcgaccc ctcacatgg gttggagcct catcttgctc 60

ttccttgctg ctgttgctac gcggtcctg tcccaggta 99

<210> 26

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 26

atgtgtagcc agaagccttg caggacatct tcaactgaggc cccagccttc accagctcag 60

ccccaggctg ctgcagttgt acctgggaca ggacacgc 98

<210> 27

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 27

caagcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac tgggtaaacc agacacctgg 60

tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccgga 97

<210> 28

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 28

gtaggctgtg ctggaggatt tgtctgcagt caatgtggcc ttgcctttga acttctgatt 60

gtaggaagta tcaccatttc cgggataaat agctccaat

99

<210> 29

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 29

aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct 60

attactgtgc aagatcgact tactacggcg gtgactggt

99

<210> 30

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 30

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgcaga gacggtgacc gtggtccctg 60

cgccccagac attgaagtac cagtcaccgc cgtagtaa

98

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 31

gagctggtga agcctggggc ctcag

25

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 32

atggctcaag ctcccgctaa gtgcccgga

28

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 33

tcaagcgttt gggttggtcc tcatgag

27

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 34

tccgggatg gcgagatggg caagc

25

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 35

cttgacatgg ctctgggctc caag

24

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 36

ccacttcagt cggtcggtag tattt

25

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 37

cgctcaccg cctgaggcga catg

24

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 38

ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc

32

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成DNA

<400> 39

ggggccatgc caaggactat gtcg

24

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成DNA

<400> 40

atgtggctga tgttacaaaa tgatg

25

<210> 41

<211> 1504

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 41

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 aaaaaaattc 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 ctgaaatta tgcactaga caacttaaat			1399
ttttgagtct tgagattggt tttctctttt cttattaat gatctttcta tgaccagca			1459
aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa			1504

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 42

gccatccaga aggtggt

17

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 43

gtcttgcag ggaagat

17

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 44

ggcaggagac caccttgca gtgccac

28

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 45

gggtgggctg taccttctgg aacagggc

28

<210> 46

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 46

ggcgctggct taccgggaga ggaatggg

28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 47

ggaatgggtg tttgtctcctc caaagatgc

28

<210> 48

<211> 1316

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<400> 48

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactggtg gaaccctgcg cagggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gatcctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgtggc ttaccggag aggaatgggt gttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag cctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc tttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctacagcttc gaggtgggca ctgcaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa ctccaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcatc cataagggtc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgagg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcttggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggtgc agtetcatca tttgcttgc aagaactgag 1140

gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200

atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca cttgtttgt 1260

ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 49

gatcctgctg ggacaaaaat tgg 23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg 22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<400> 51

acggggggct cccggaagcg gggacatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60
tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120
ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180
agctgaagag aaaggaattg ccccttggag ttaactacca tgttttact gatcctcctg 240
gaacaaaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300
atggagacaa gtggaattcc ttacagtcc tgtaattca ctctgggtgc tacagtcaac 360
gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc ttaccactt ggtgagccca 420
ttatcagat gttggactta aactagcca tglacatgga ttcccctca cgcatagaagc 480
ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540
ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg cctagccca tccatctagt ctggctgtag 600
gcaccacaca tggagtattt gatttgact ctgccggttc ttgcaacat ggtgacctag 660
agtacaggca atgccacgt ttctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720
atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780
gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct atttacatg gatcataaat 840
cagcaaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900
cctatggatga cttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960
cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttgacat gaggcagaaa atattccacc 1020
tcctcaaggg aacaccctg aatgtgttg tccttaataa ctccagttt taccacattg 1080

gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca ctccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140
 gcttgcaatc catagctttc agtgctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
 cctgtgtcat tcacagcacc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260
 aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcgaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
 tcatagaaaa agctgttctg ccccatggt cttcgtgtg ctctttaagt gtggagataa 1380
 atggacactt agaatattca actatggtgt ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
 ttaaaacat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttgtt 1500
 tagatatttg gaacctaaa gctatggaag aactatttc aggaagtaag acgcagctga 1560
 gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttcttctct gactgagtcg gttgcagcat 1620
 cccttgggat gttaaatgcc attcgaacc attgccatt cagcctgagc aactcaagc 1680
 tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
 agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aatcttaaa 1800
 tacaatggat tttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860
 gttcttcttt cttctcccc tctctccttt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
 aatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 52

caggggtggt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 53

cactgagcca ggggccacac agcatcc

27

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 54

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 55

tgccaccggtt tcctccataa gccccagc

27

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 56

atgaagttgc actatggtga cctca

25

<210> 57

<211> 59

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<400> 57

ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成DNA

<400> 58

gacttagcag agtacactgc agatg

25

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成DNA

<400> 59

accttgata gaaaggggtg gtctc

25

<210> 60

<211> 125

<212> DNA

<213> 中国地鼠

<400> 60

ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
 ctgtgaagtt ctaccagcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120
 agaaa 125

<210> 61

<211> 372

<212> PRT

<213> 中国地鼠

<400> 61

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> 62

<211> 321

<212> PRT

<213> 中国地鼠

<400> 62

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> 63

<211> 590

<212> PRT

<213> 中国地鼠

<400> 63

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser
 1 5 10 15

Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val
 20 25 30

Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln
 35 40 45

Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr
 50 55 60

His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp
 85 90 95

Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg
 100 105 110

Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu
 115 120 125

Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met
 130 135 140

Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp
 145 150 155 160

Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu
 165 170 175

Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly
 180 185 190

Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His
 195 200 205

Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser
 210 215 220

Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe
 225 230 235 240

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
 245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
 260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
 275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
 290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
 305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
 325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
 340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
 370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val
420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
450 455 460

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
580 585 590

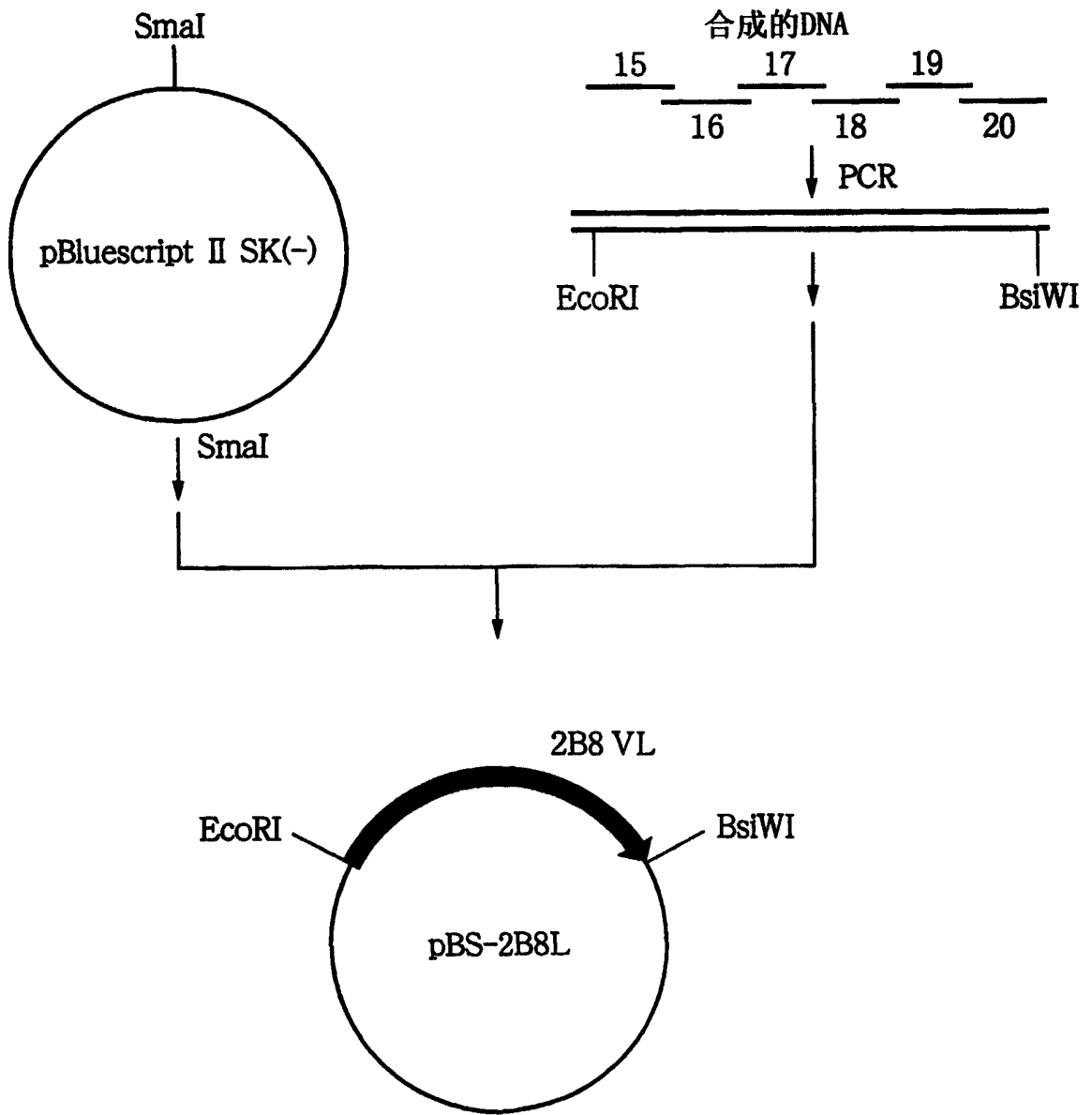


图1

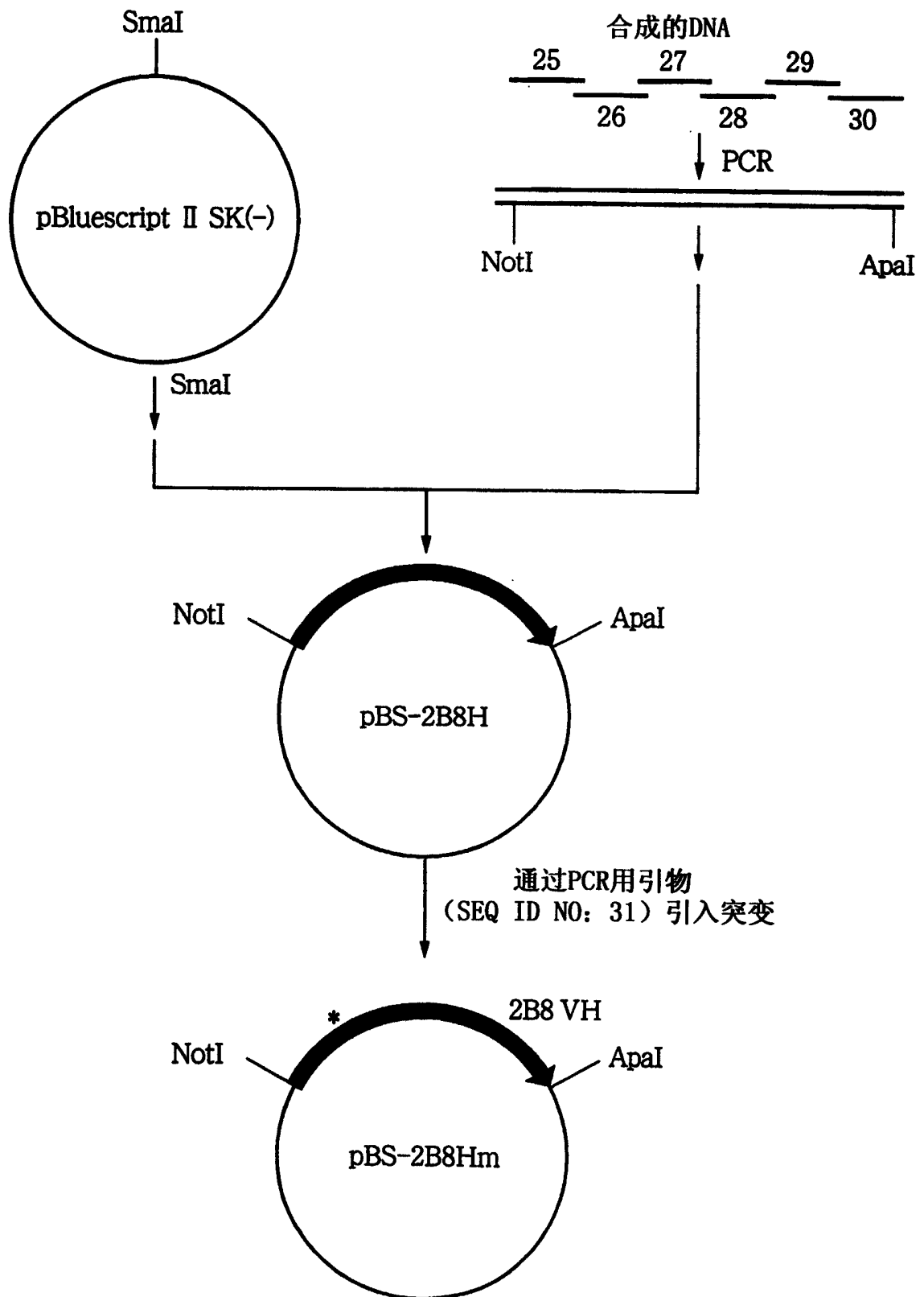


图2

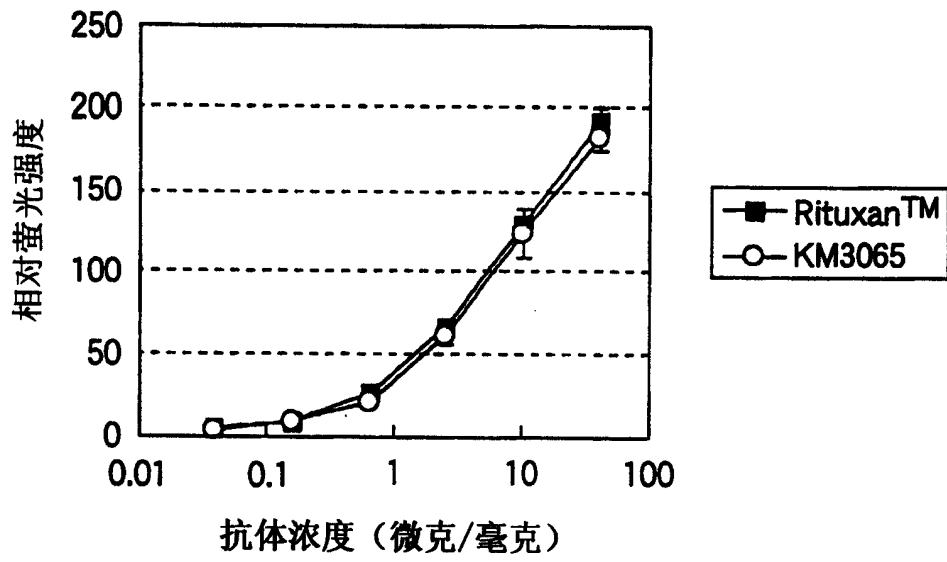


图4

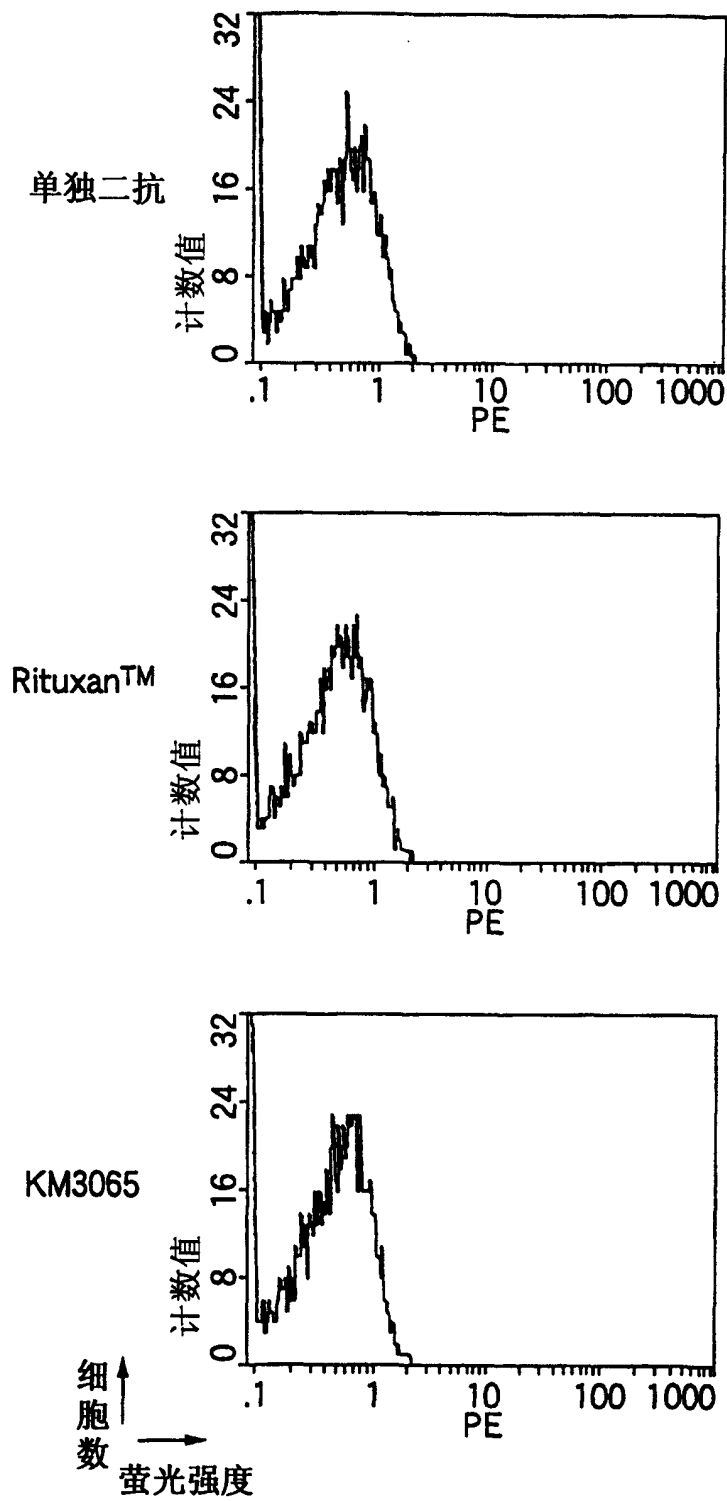


图5

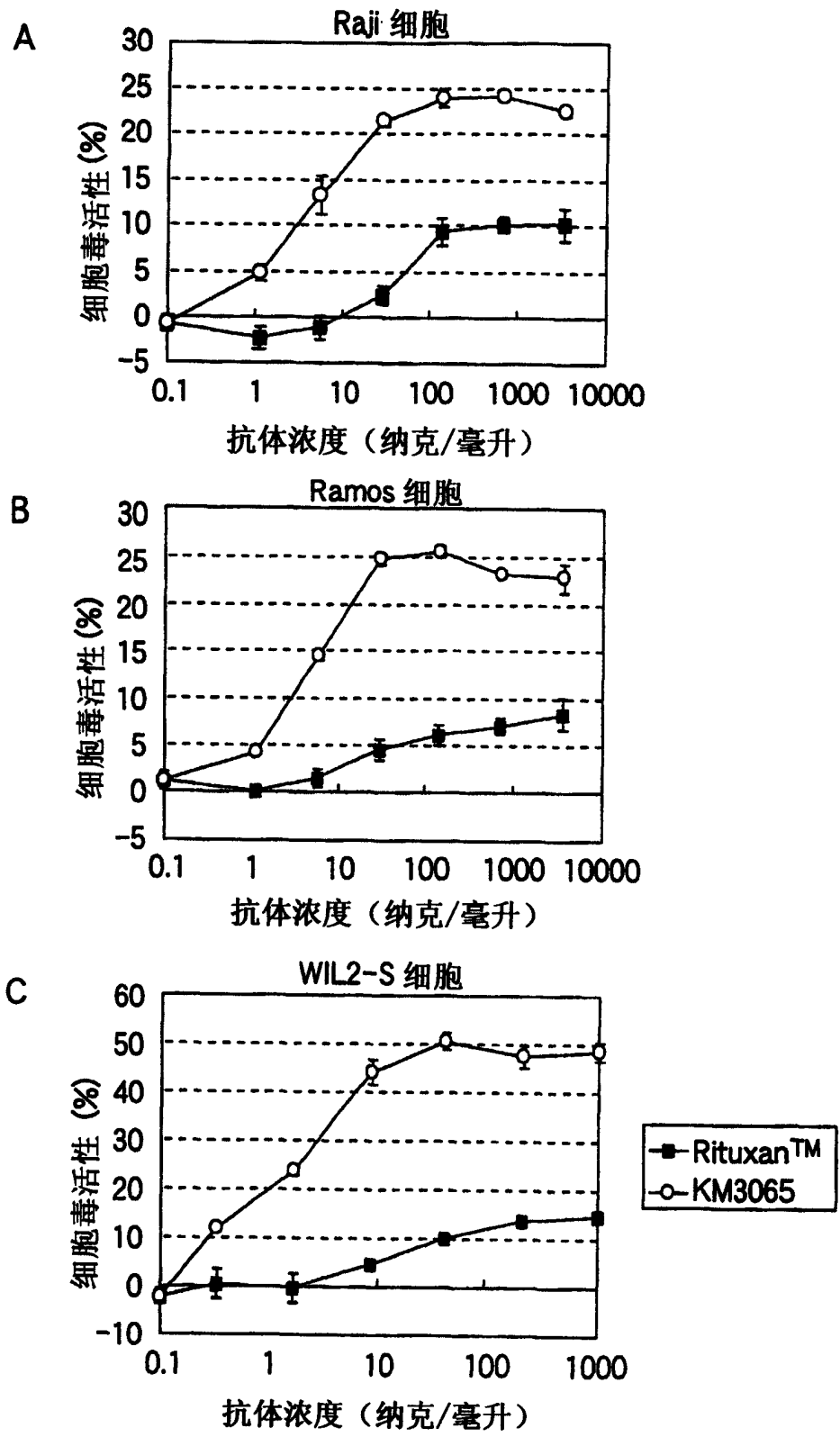


图6

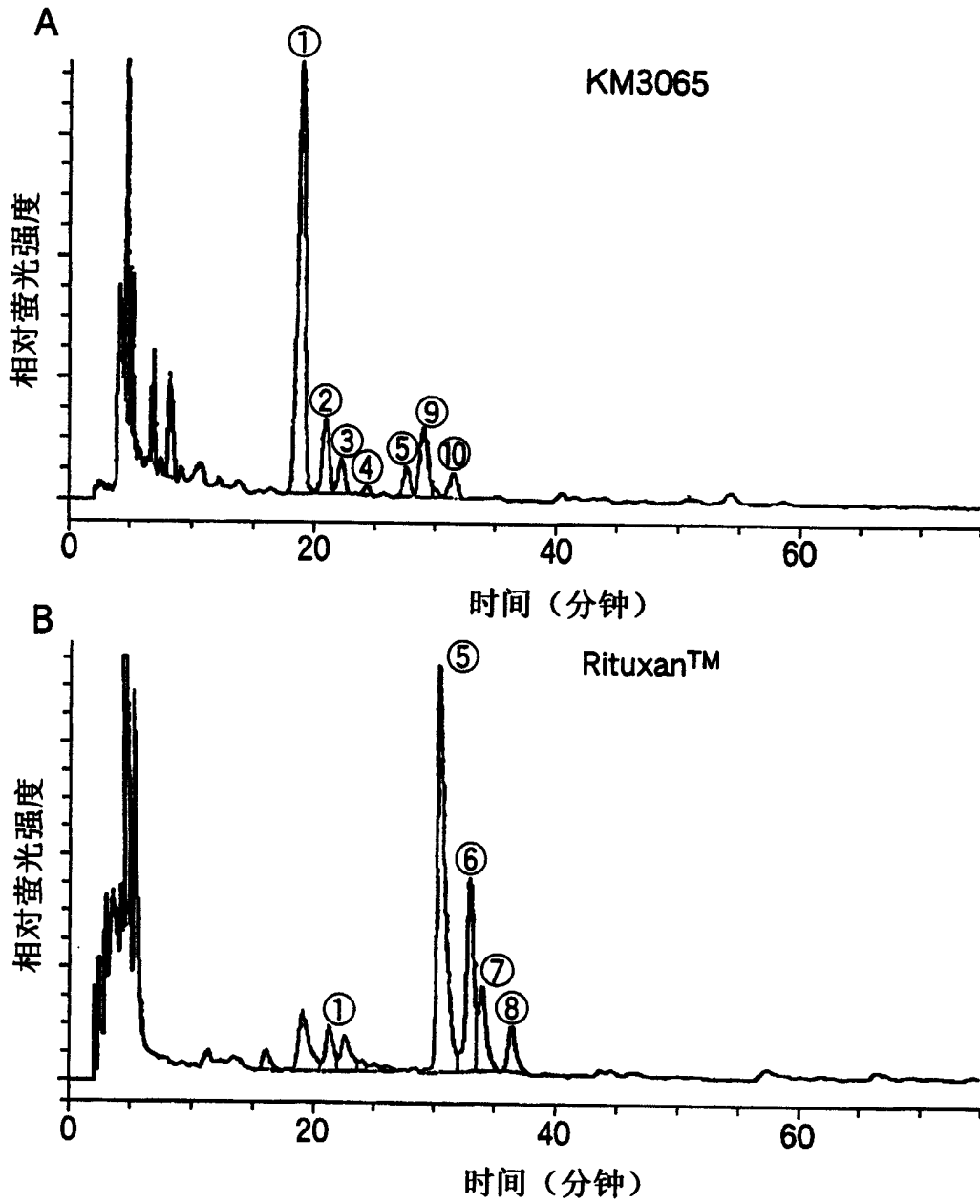


图7

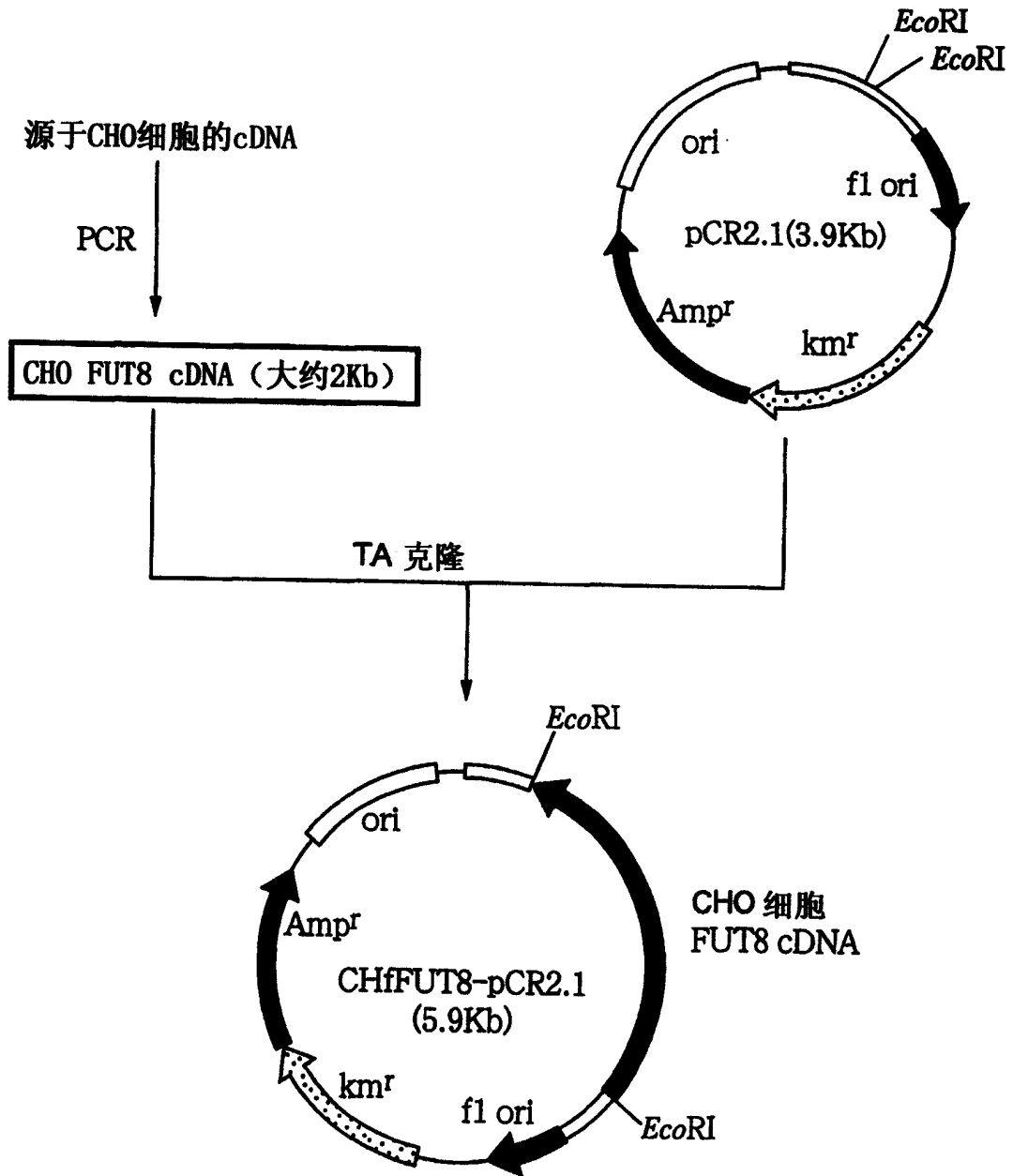


图8

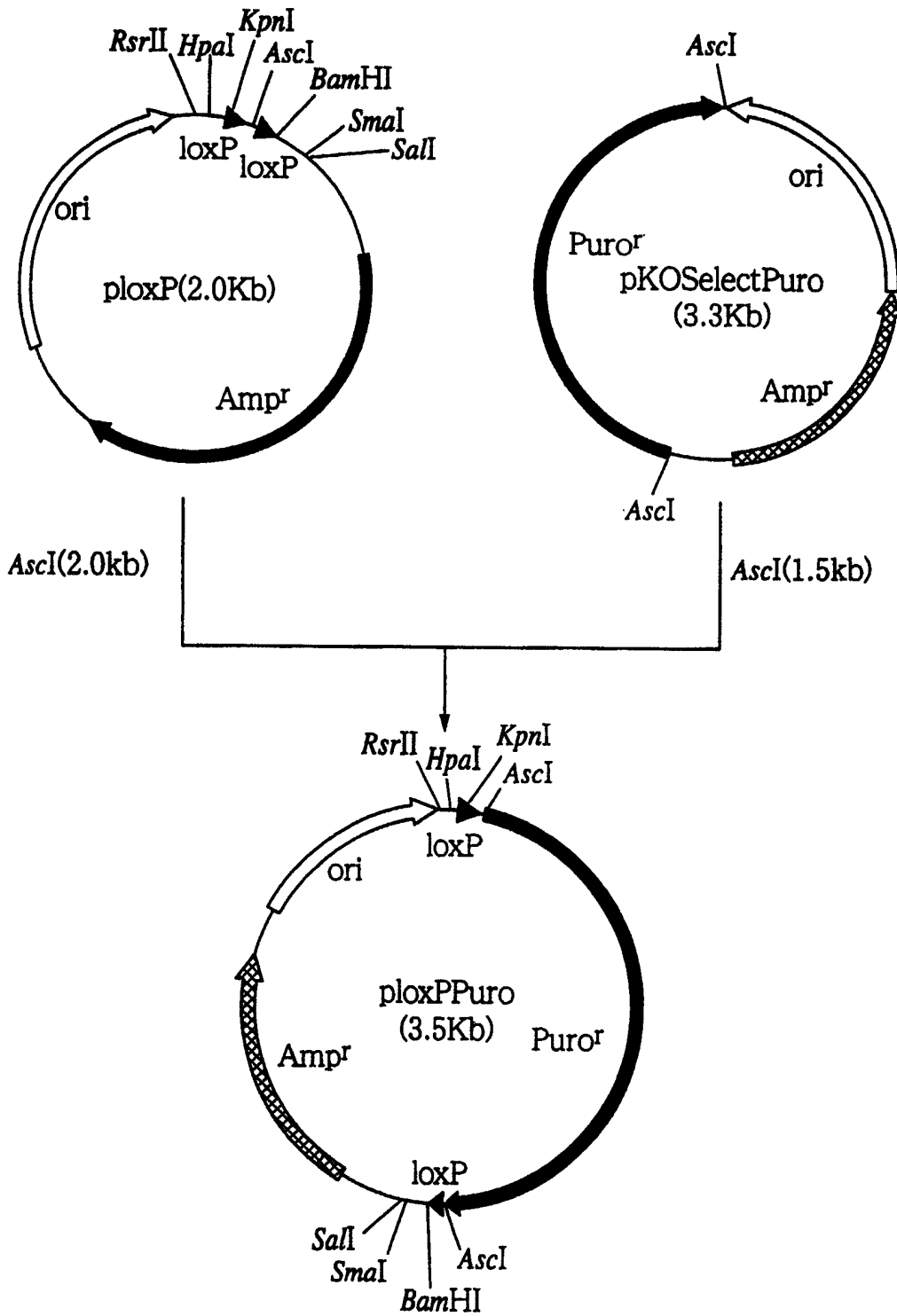


图9

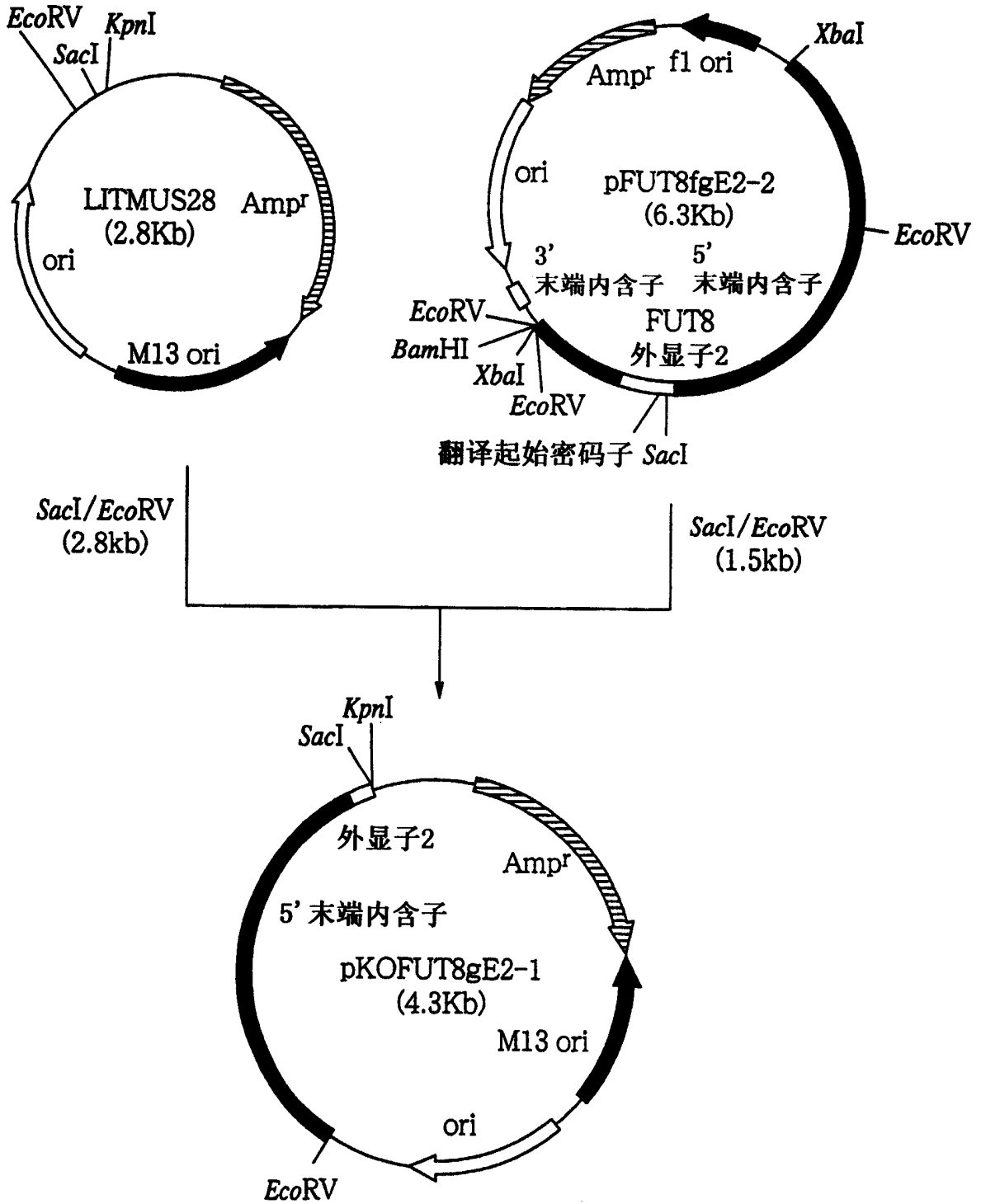


图10

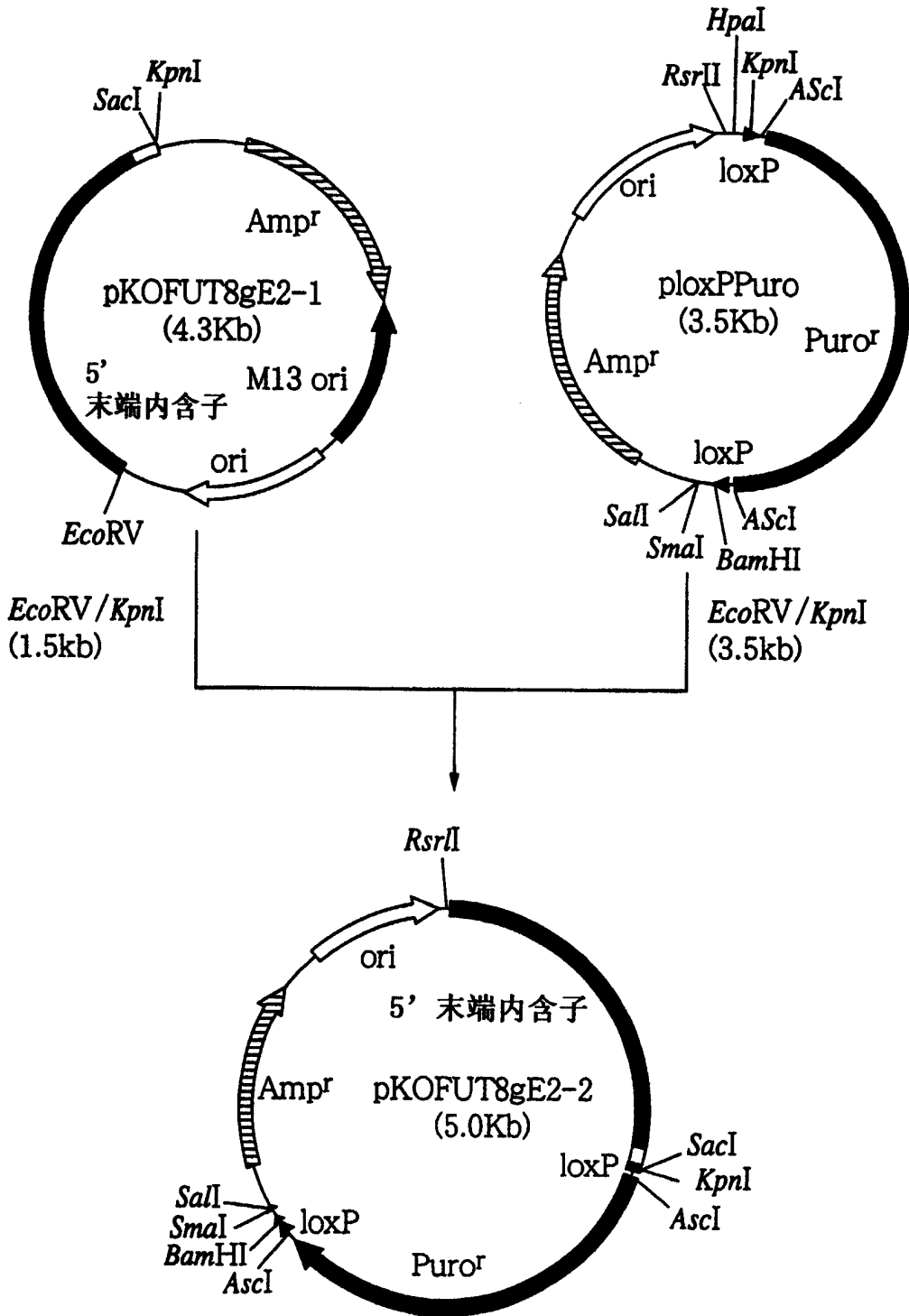


图11

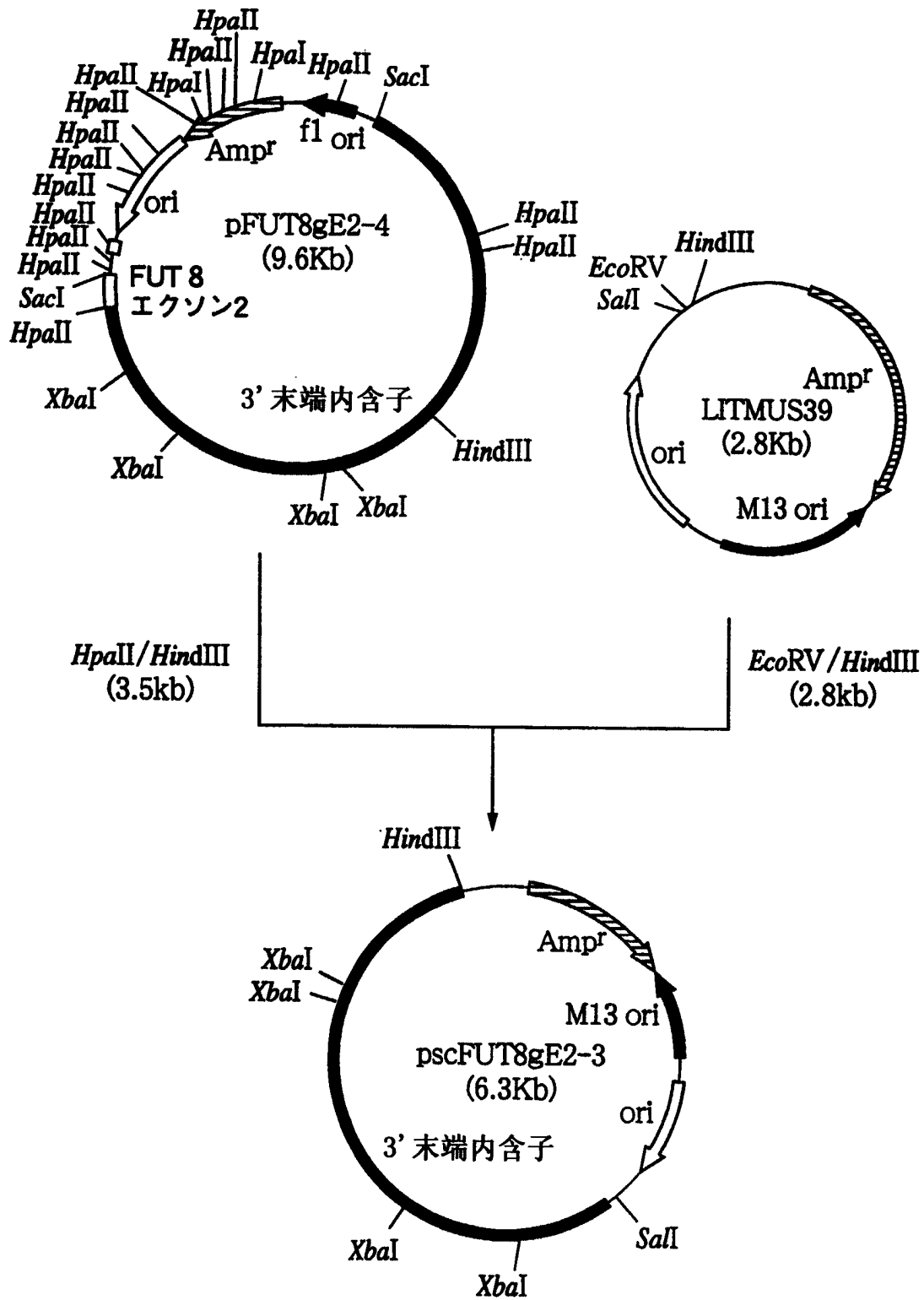


图12

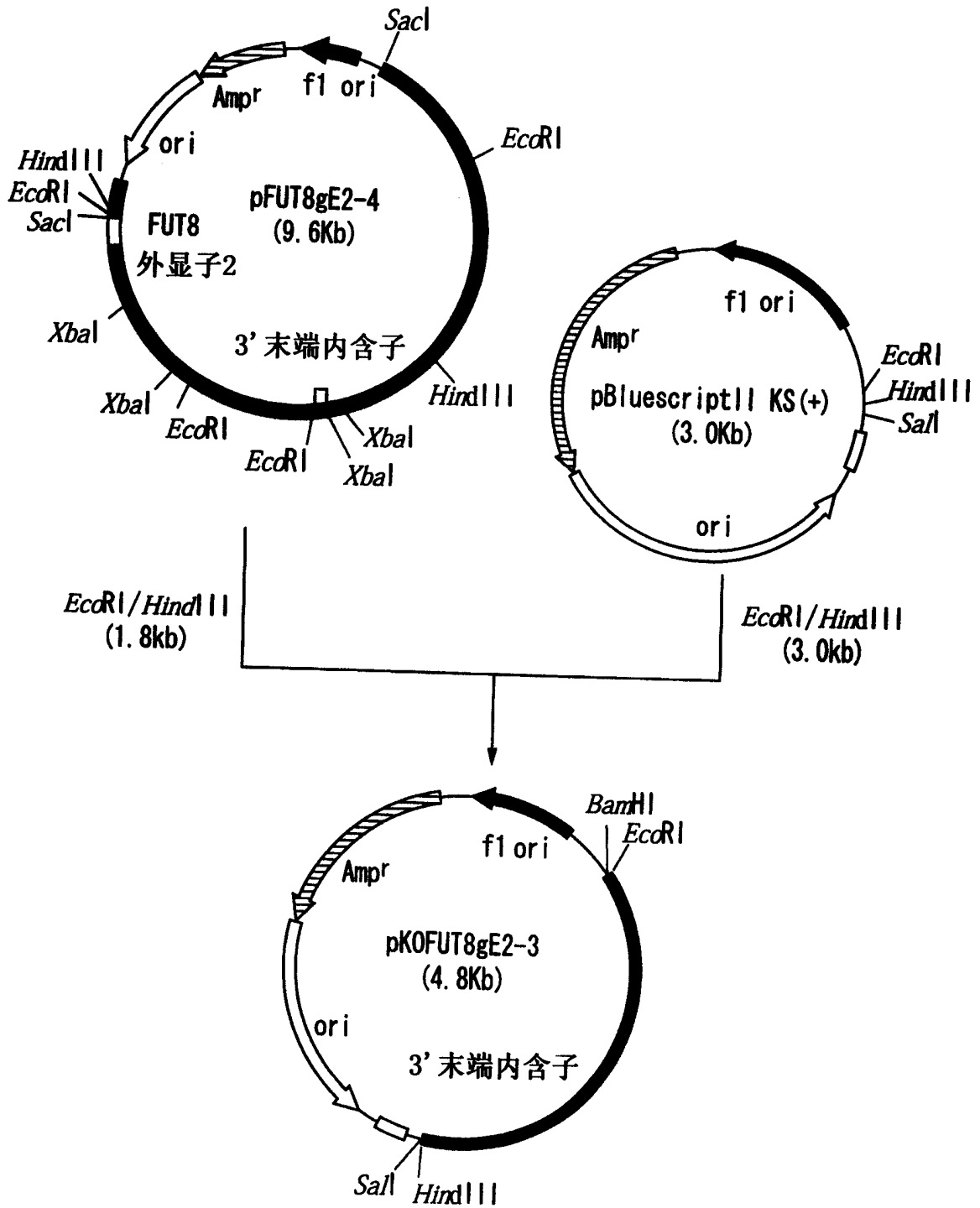


图13

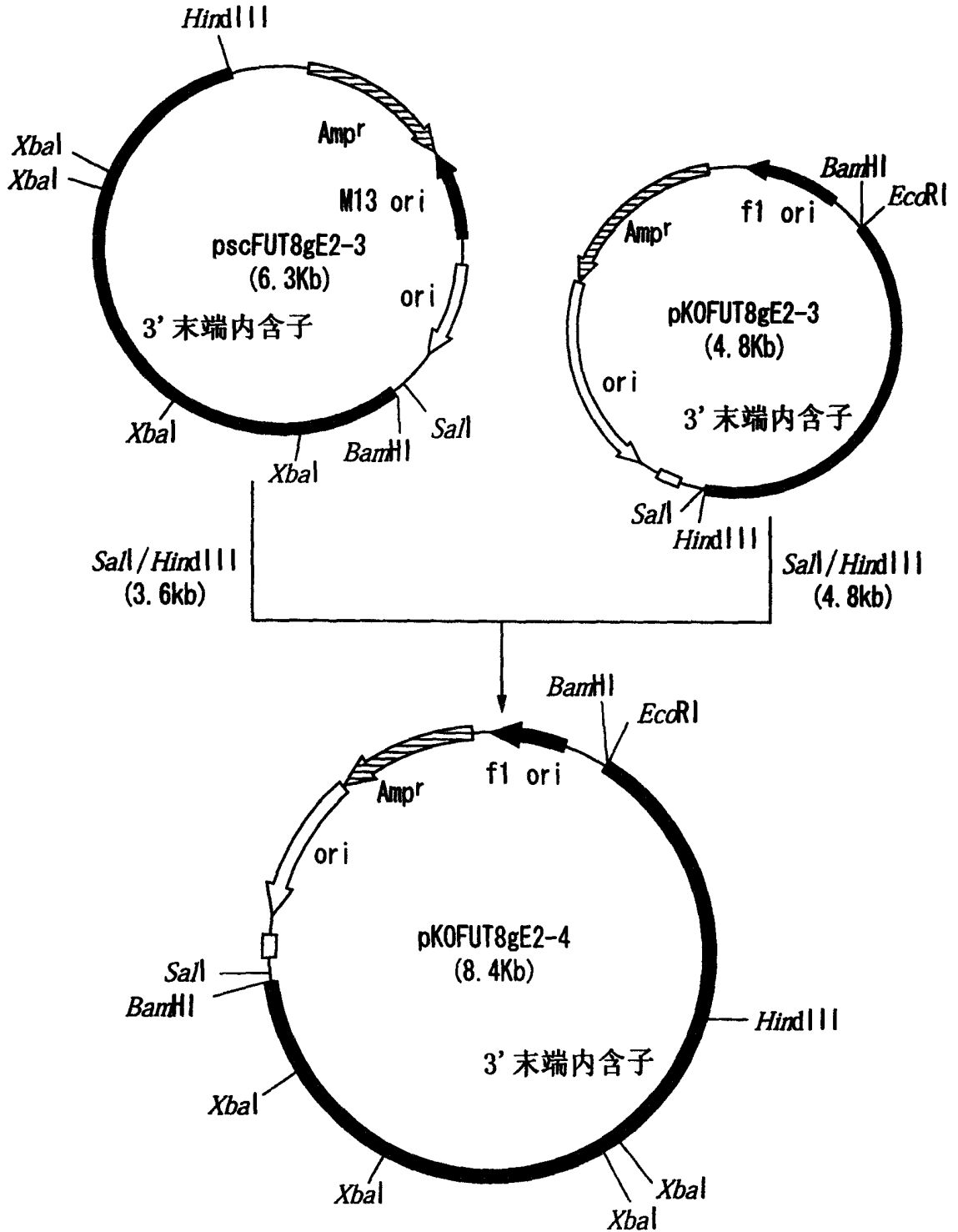


图14

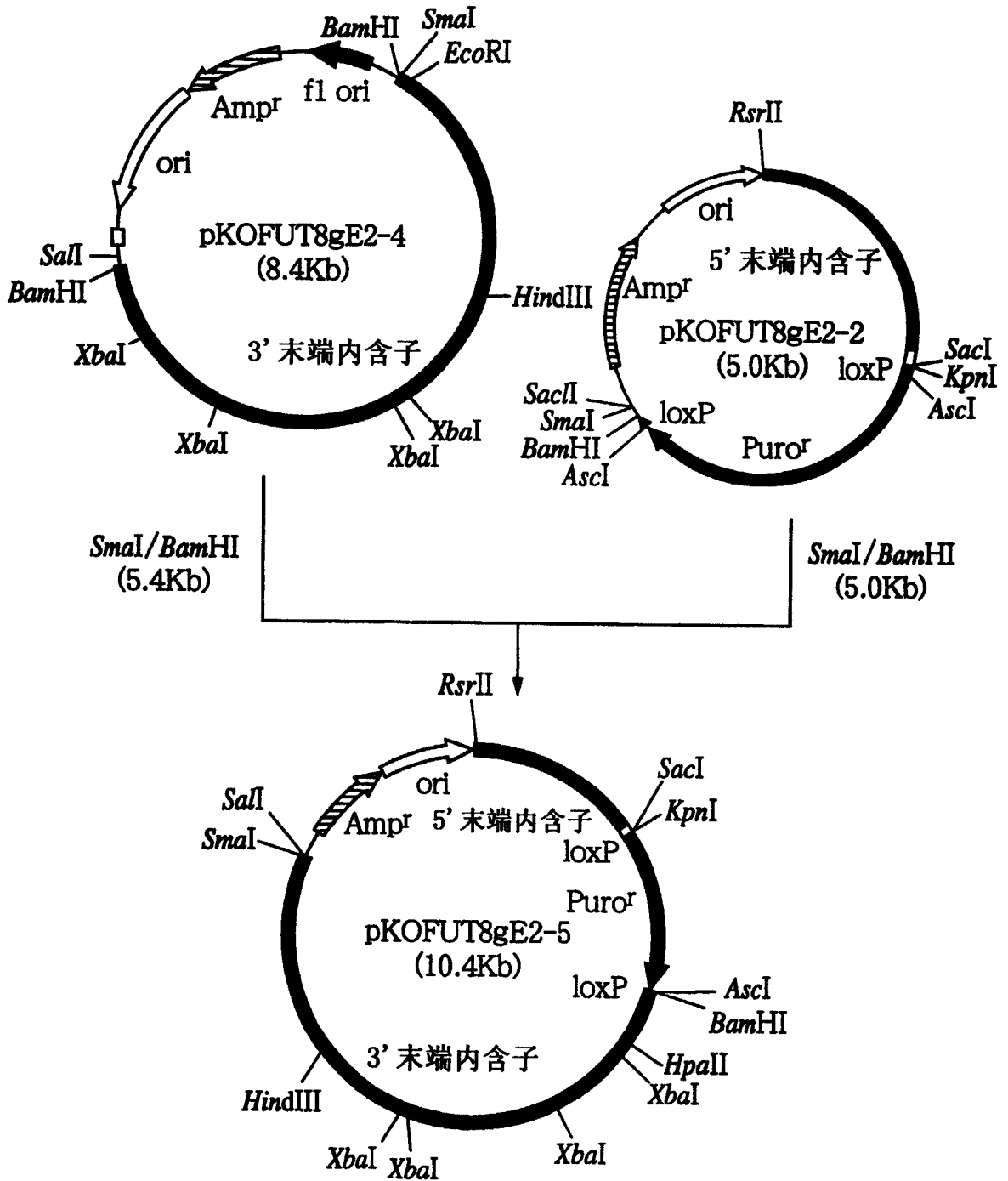


图15

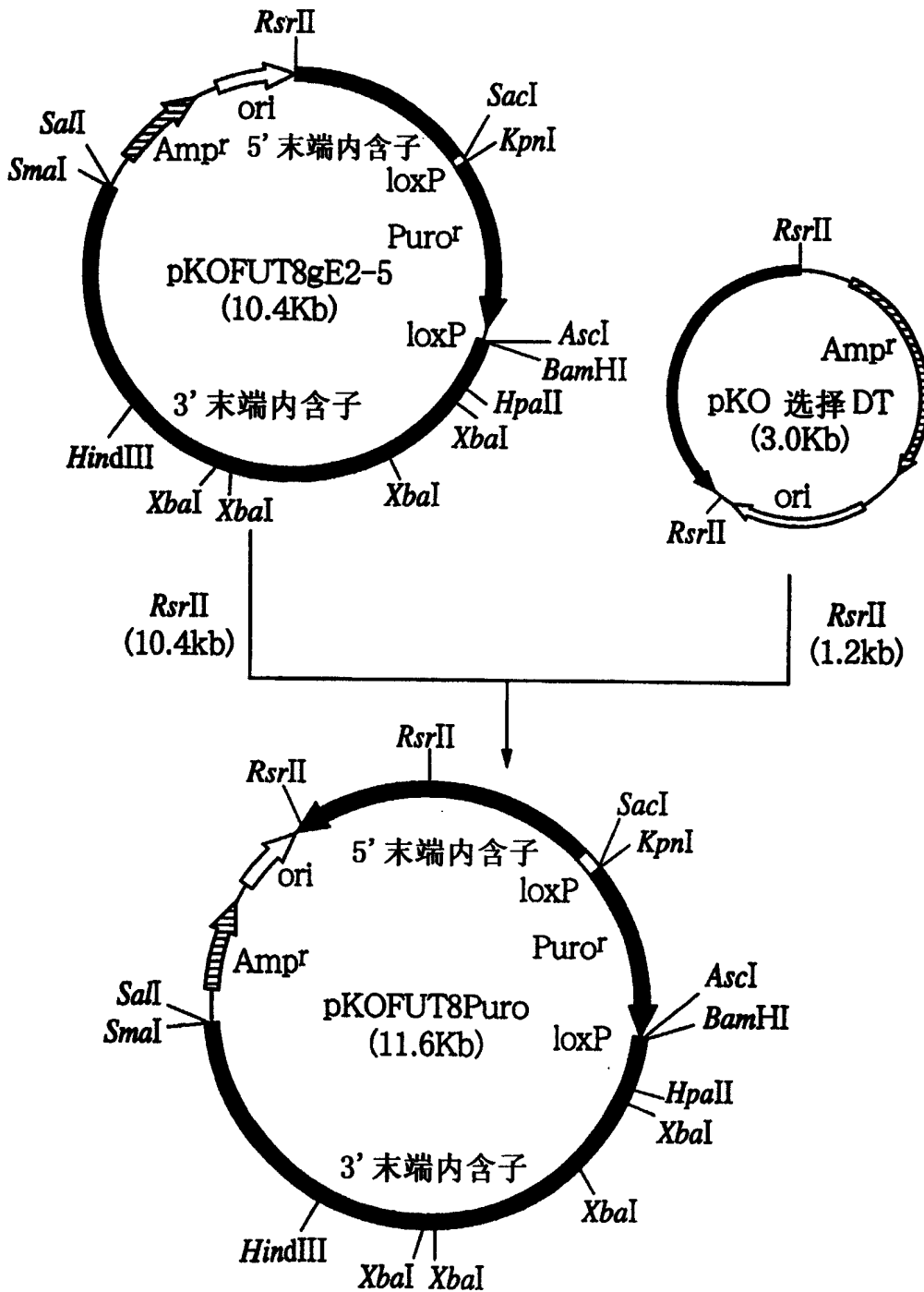


图16

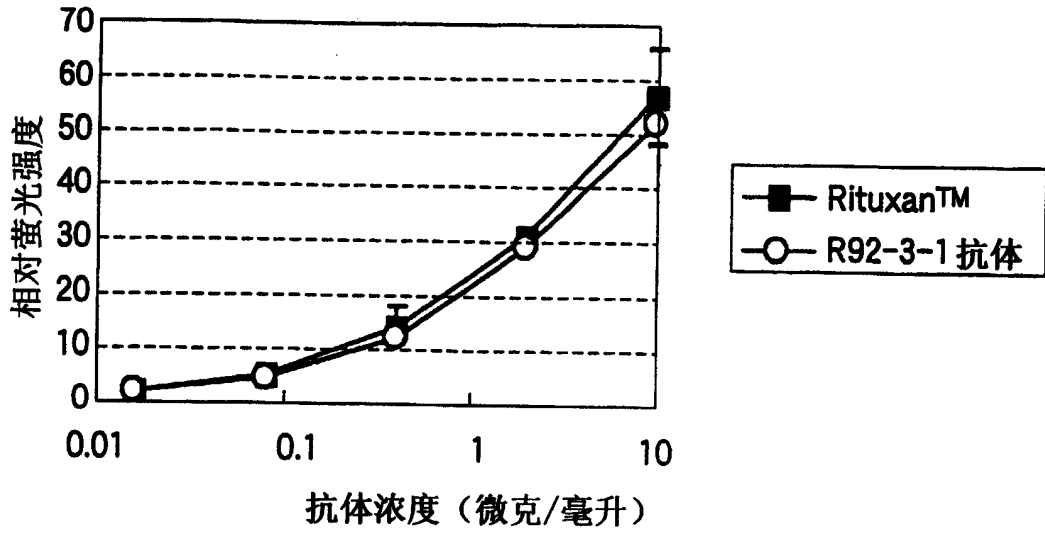


图17

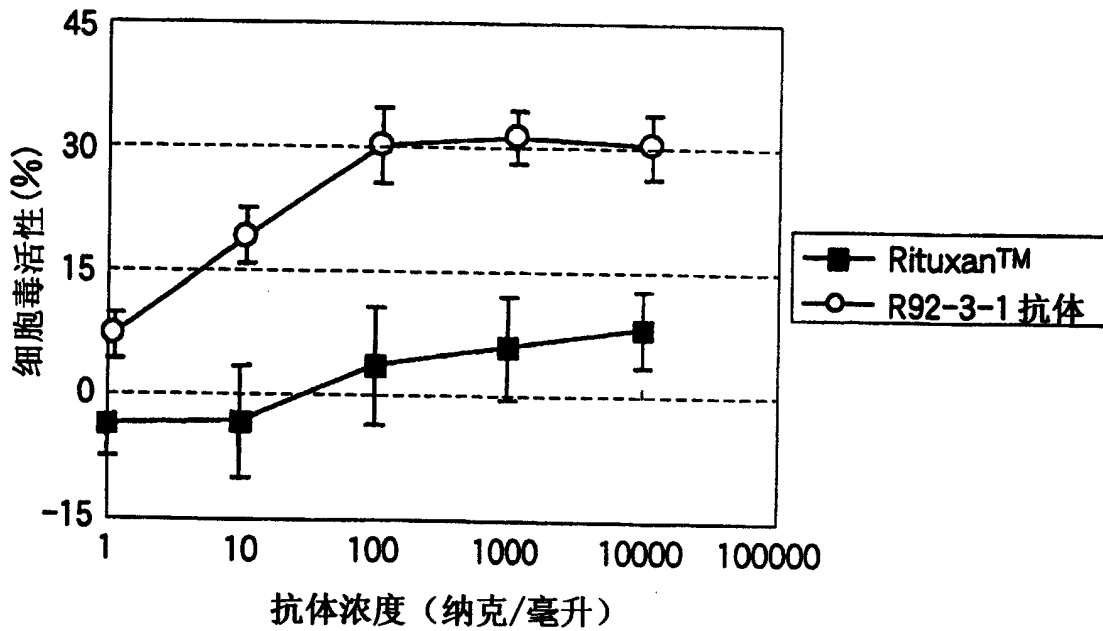


图18

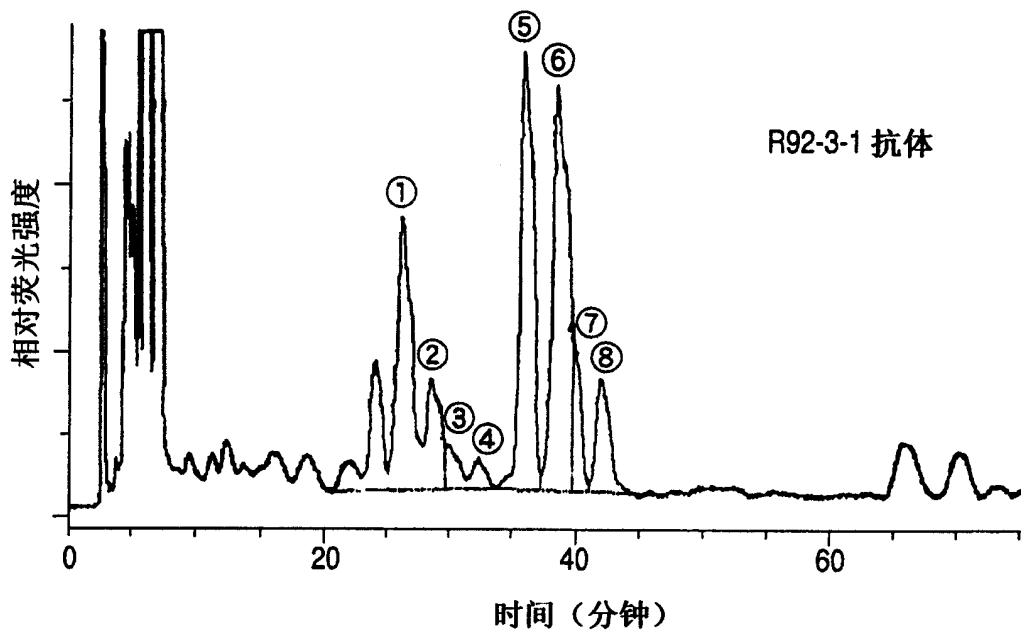


图19

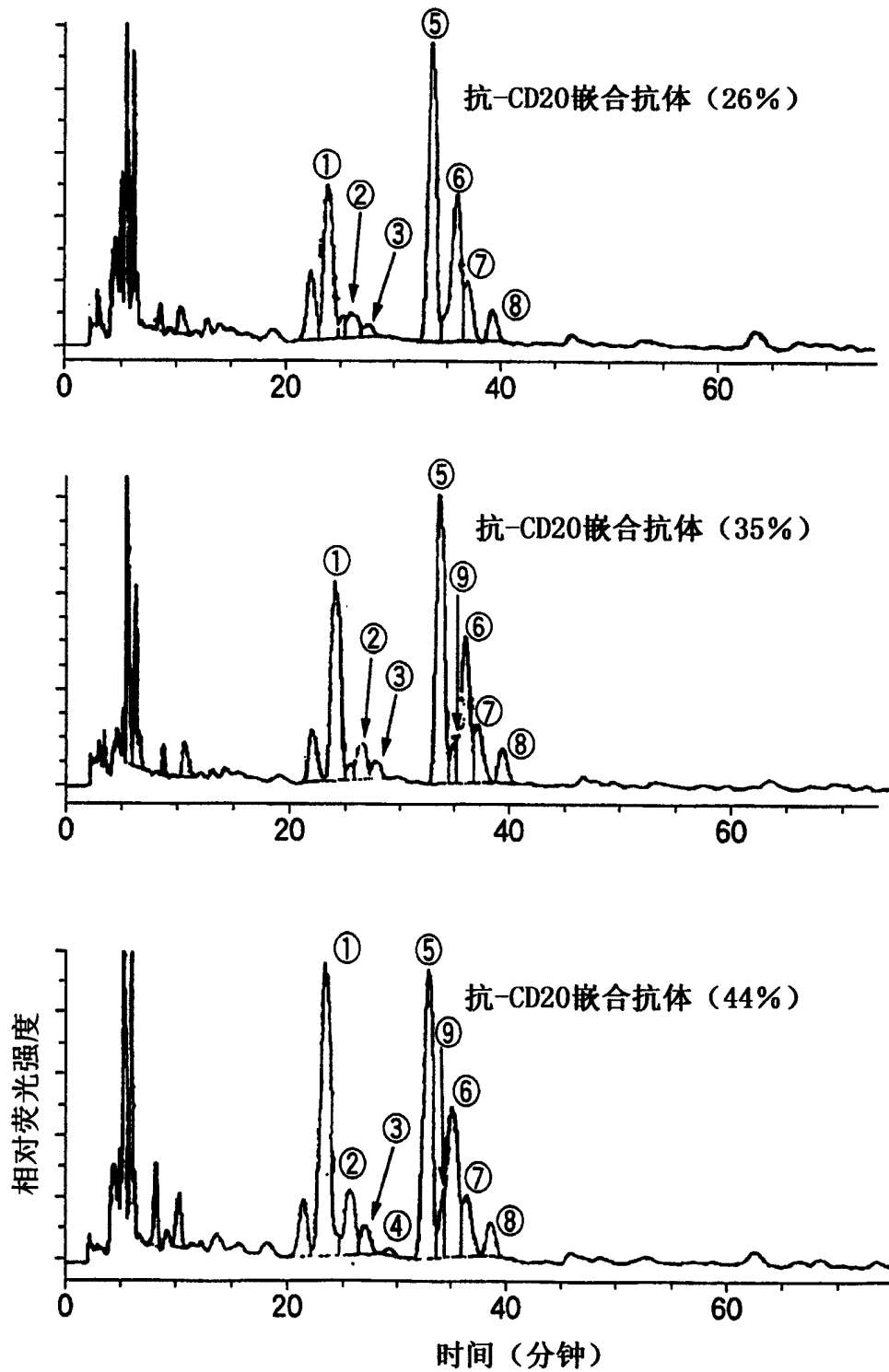


图21

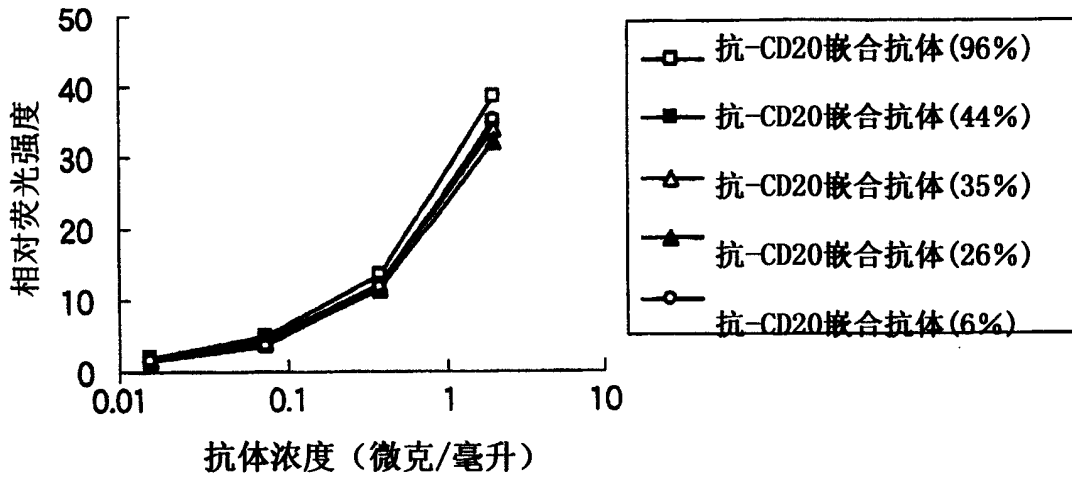


图22

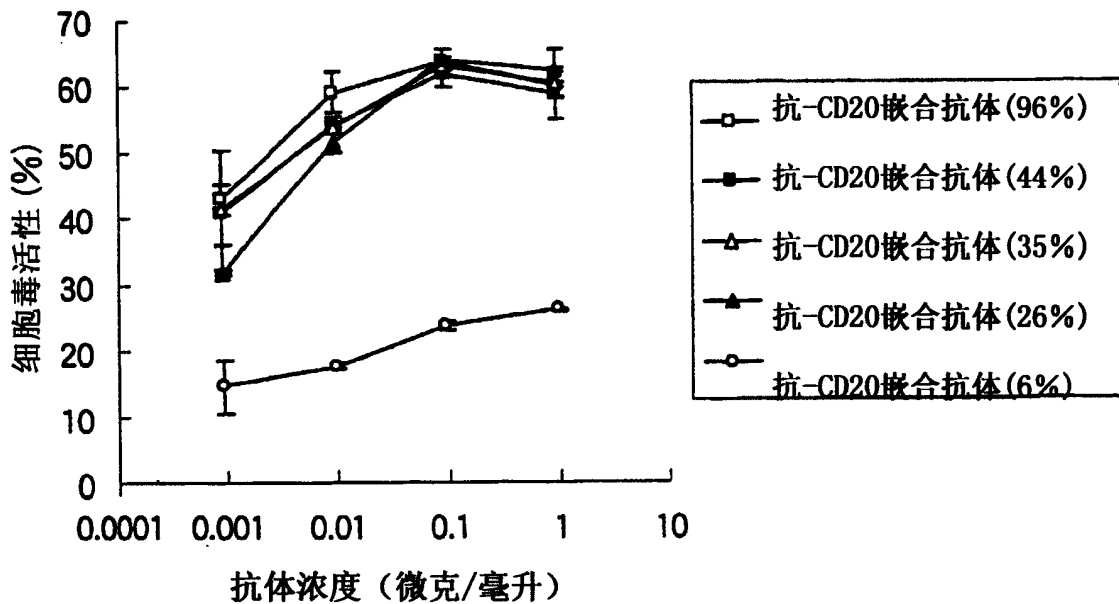


图23

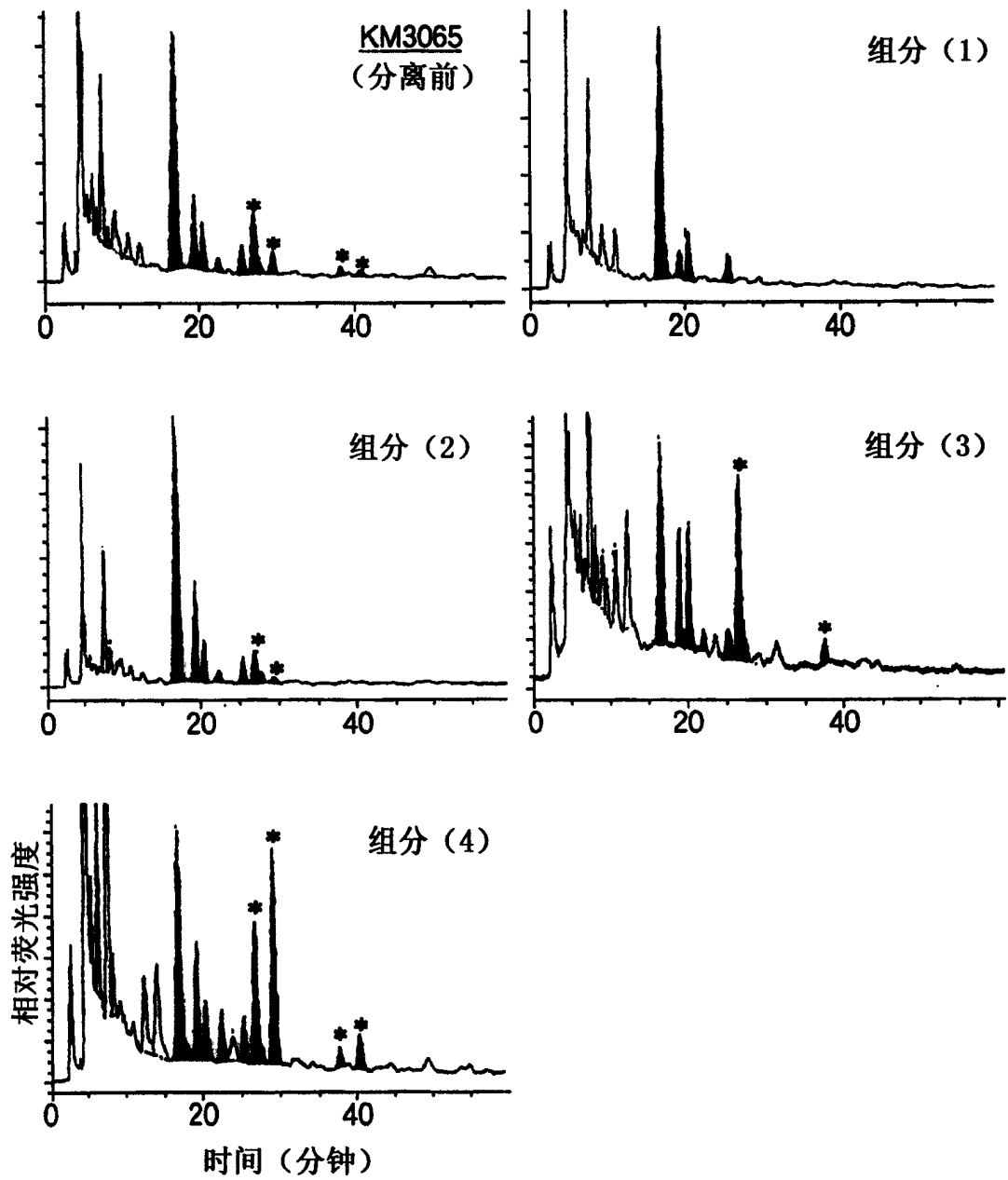


图26

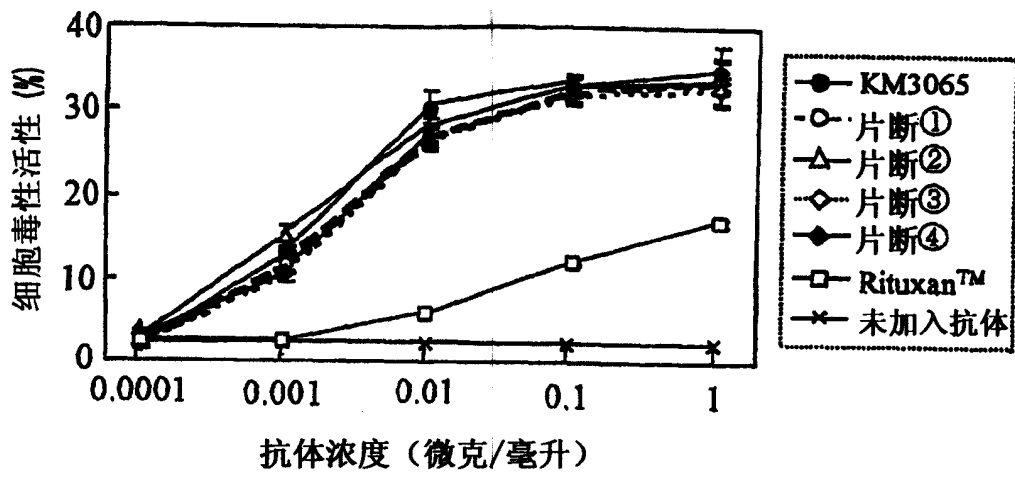


图27