(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年10 月16 日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/085107 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/09, 5/10, C12P 21/08, A01H 5/00, A01K 67/027, C07K 16/00, A61K 39/395, A61P 35/00, 37/00, 9/00, 31/12, 31/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04507

(22) 国際出願日: 2003 年4 月9 日 (09.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-106953 2002 年4 月9 日 (09.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代田区 大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山根 尚子 (YAMANE,Naoko) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 佐藤 光男 (SATOH,Mitsuo) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 森 勝弘 (MORI,Katsuhiro) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 山野 和也 (YAMANO,Kazuya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目６番６号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

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

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

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

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

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

WO 03/085107 A1

(54) Title: CELLS WITH MODIFIED GENOME

(54) 発明の名称: ゲノムが改変された細胞

(57) Abstract: Cells wherein the genome has been modified so that the activity of an enzyme relating to the sugar chain modification of binding the 1-position of fucose to the 6-position of a N-acetylglucosamine at the reducing end of a complex N-glycoside linked sugar chain via an α-bond is lowered, compared with the activity in the parent strain cells, or deleted; and a process for producing an antibody composition using these cells.

(57) 要約: N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞よりも低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞、および該細胞を用いて抗体組成物を製造する方法。

明 細 書

ゲノムが改変された細胞

技術分野

本発明は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞よりも低下または欠失するように、ゲノムが改変された細胞および該細胞を用いた抗体分子の製造方法に関する。

背景技術

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

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

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖蛋白質は、小胞体（以下、ＥＲと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ＥＲ内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-Dol とも表記する）と呼ばれるα－イソプレン単位を 20 個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸に N-アセチル-グルコサミン（以下、GlcNA とも表記する）が転移され GlcNAc-P-P-Dol となり、続いてもう 1 個 GlcNAc が転移され GlcNAc-GlcNAc-P-P-Dol となる。次いで、マンノース（以下、Man とも表記する）が 5 個転移され $(Man)_5$-$(GlcNAc)_2$-P-P-Dol に、さらに、Man が 4 個、グルコース（以下、Glc とも表記する）が 3 個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(Glc)_3$-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$-P-P-Dol ができる。この 14 個の糖からなる糖鎖の前駆体は

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

抗体の糖鎖に関しては、抗体のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加修飾によって、抗体の抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）が大きく変化することが報告されている（WO00/61739）。これらの報告は、ヒトIgG1サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしていることを示している。

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

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

糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の活性が変化した突然変異体を宿主細胞として用いることで、生産される糖鎖構造が変化した糖蛋白質の生産例も報告されており、その具体的な例としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I（GnTI）の活性が欠損しているＣＨＯ細胞変異株を用いてハイマンノース型糖鎖構造を有する抗体を生産した報告を挙げることができる[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 160, 3393, 1998]。また、ＣＭＰ－シアル酸トランスポーターやＵＤＰ－ガラクトーストランスポーターの欠損株を用いて、糖鎖非還元末端側にシアル酸が付加していない糖鎖構造を有する抗体の発現や、ガラクトースの付加のない抗体の発現例が報告されているが、医薬への応用に適したエフェクター作用が向上した抗体の発現には成功していない[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 160, 3393, 1998]。これら変異株は、変異剤処理によりランダムに変異が導入された結果の株として取得されており、医薬品製造に用いる株としては適切ではない。一方、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子を標的とし意図

的に標的遺伝子のみを破壊した細胞株を用いて糖蛋白質である抗体の生産を試みた報告はこれまでにない。

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

発明の開示

本発明は、以下の (1) ～ (43) に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞よりも低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞。

(2) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた、(1) 記載の細胞。

(3) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた(1)または(2)に記載の細胞。

(4) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、α1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(1)～(3)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(5) α1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(4)に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(6) α1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(4)に記載の細胞。

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(7) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(1)～(6)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(8) 少なくとも、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、(7)記載の細胞。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(9) 細胞が、下記の (a)～(j) からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(8)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

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

(c) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

(j) 植物細胞。

(10) 抗体分子をコードする遺伝子を含む(1)～(9)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(11) 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる抗体分子である、(10 に記載の細胞。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(12) 抗体分子のクラスが IgG である、(10) または(11)に記載の細胞。

(13) 親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する能力を有する、(1)～(12)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(14) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、(13)に記載の細胞。

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

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

(17) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、(13)～(16)のいずれか 1 項に記載の細胞。

(18) (10)～(17)のいずれか 1 項に記載の細胞を用いること特徴とする、抗体組成物を製造する方法。

(19) (10)～(18)のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(20) 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(18)または(19)に記載の方法。

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

(22) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、(21)に記載の方法。

(23) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物である、(20)～(22)のいずれか 1 項に記載の方法。

(24) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、(20)～(23)いずれか 1 項に記載の方法。

(25) (1)～(9)のいずれかに記載の細胞を用いて作製された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(26) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルおよびウサギからなる群から選ばれる動物である、(24)に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

(27) 抗体分子をコードする遺伝子を導入した(25)または(26)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(28) 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる抗体分子である、(27)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

(29) 抗体分子のクラスがIgGである、(27)または(28)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(30) (27)～(29)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体組成物を含む組織あるいは体液を取得し、該組織あるいは体液から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(31) (26)～(29)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫の抗体生産細胞を取得し、取得した抗体生産細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(32) 抗体組成物が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、(30)または(31)に記載の方法。

(33) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物より高いことを特徴とする、(32)に記載の方法。

(34) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にα結合していない糖鎖である、(33)に記載の方法。

(35) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物である、(32)～(34)のいずれか1項に記載の方法。

(36) 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、(32)～(35)いずれか1項に記載の方法。

(37) N-グリコシド結合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、該抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグリコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体組成物。

(38) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にα結合していない糖鎖である、(37)記載の抗体組成物。

(39) (18)～(24)のいずれか1項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(40) (27)～(36)のいずれか1項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(41) (37)～(40)のいずれか1項に記載の記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(42) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、(41)に記載の医薬。

(43) (41)または(42)に記載の医薬を製造するための、(37)～(40)のいずれか1項に記載の抗体組成物の使用。

本発明のN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞よりも低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞（以下、「本発明の細胞」と表記する）は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素（以下、「α1,6-フコース修飾酵素」と表記する）の活性が親株細胞よりも低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞であれば、ゲノムの改変の手段はいかなるものであってもよい。

親株細胞とは、α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下または欠失させるための方法をゲノムに対して施す前の細胞をいう。親株細胞としては、特に限定はないが、例えば、以下の細胞があげられる。

NS0細胞の親株細胞としては、バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング(Biotechnol. Bioeng.), 73, 261, (2001)等の文献に記載されているNS0細胞があげられる。ま

た、理化学研究所細胞開発銀行に登録されている NSO 細胞株（RCB0213）、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

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

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

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

α1,6-フコース修飾酵素としては、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する反応に関与する酵素としては、該反応に影響を与える酵素も包含される。

α1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、α1,6-フコシルトランスフェラーゼやα－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合する反応に影響を与える酵素としては、上述のα1,6-フコース修飾酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、α1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)あるいは(d)のDNAがコードする蛋白質、または下記(e)、(f)、(g)、(h)、(i)あるいは(j)の蛋白質などがあげられる。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAまたは、

(e) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとは、例えば配列番号1または2で表される塩基配列を有するＤＮＡなどのＤＮＡまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プ

ラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるＤＮＡをいい、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡを固定化したフィルターを用いて、0．7～1．0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0．1～2 倍濃度のＳＳＣ溶液（1 倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15 mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるＤＮＡをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとして具体的には、配列番号 1 または 2 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有するＤＮＡをあげることができる。

本発明において、配列番号 4 または 5 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA,79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA,82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 4 または 5 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするＤＮＡに部位特異的変異を導入することにより取得することができる蛋白質を意味する。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換、挿入もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、本発明において、配列番号4または5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、ＢＬＡＳＴ〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やＦＡＳＴＡ〔Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)〕等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号4または5に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上である蛋白質であることを意味する。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞より低下または欠失するようにゲノムが改変されたとは、該酵素の発現を低下または欠失させるように該酵素の遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、あるいは該酵素の機能を低下または欠失させるように該遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入するとは、ゲノム上の塩基配列に欠失、置換、挿入および／または付加といった塩基配列の改変を行うことをいう。

ゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞とは、ゲノム遺伝子の発現または機能を完全に抑制することをいう。ゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞の具体的な例としては、標的となる遺伝子のすべてまたは一部がゲノムから削除された細胞があげられる。このような細胞を取得する方法としては、目的とするゲノムの改変を行うことができれば、いずれの手法でも用いることができるが、遺伝子工学的な手法が望ましい。その具体的な手法としては、

（a） α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

（b） α１，６－フコース修飾酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する方法

(c) α1,6-フコース修飾酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) α1,6-フコース修飾酵素の転写または翻訳を抑制する手法などがあげられる。

また、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性な細胞株を選択する方法を用いることにより、本発明の細胞を選択することができる。

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞をいう。有効濃度とは、親株細胞が正常に生育できない濃度以上で

あり、好ましくは親株細胞が正常に生育できない濃度と同濃度、より好ましくは2～5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

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

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

本発明の細胞としては、抗体分子を発現できる細胞であればいかなる細胞でもよいが、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられ、これらの細胞の具体的な例としては、後述の 3. に記載のものがあげられる。動物細胞の具体例としては、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株ＹＢ2／3ＨＬ．Ｐ2．Ｇ11．16Ａｇ．20 細胞、マウスミエローマ細胞株ＮＳ0 細胞、マウスミエローマ細胞株ＳＰ2／0－Ａｇ14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞、抗体を生産するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などがあげられる。好ましくは、抗体組成物の製造に用いられる、上述のミエローマ細胞、ハイブリドーマ細胞、ヒト化抗体およびヒト抗体を製造するための宿主細胞、ヒト抗体を生産するヒト以外のトランスジェニック動物を製造するために用いる胚性幹細胞または受精卵細胞、ならびにヒト化抗体およびヒト抗体を生産するトランスジェニック植物を製造するために用いる植物細胞などがあげられる。

本発明の細胞は、親株細胞が生産する抗体組成物より、高い ADCC 活性を有する抗体組成物を生産することができる。

また、本発明の細胞は、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞よりも高い抗体組成物を生産することができる。

本発明は、本発明の細胞を用いることを特徴とする抗体組成物の製造方法に関する。

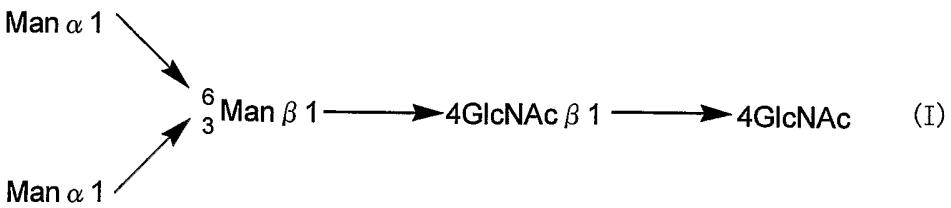
抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物をいう。

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

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

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

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



(I)

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

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

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

したがって、本発明において、本発明の細胞を用いて製造される抗体組成物は、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。そのような本発明により得られる抗体組成物として、好ましくは、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない親株細胞が生産する抗体組成物よりも高い抗体組成物があげられる。

また、本発明において、α1,6-フコース修飾酵素の活性が欠失または低下するようにゲノムが改変された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を用いて製造した抗体組成物も、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

そのような抗体組成物として、好ましくは、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫（以下、親個体と称す）が生産する抗体組成物よりも高い抗体組成物があげられる。

α1,6-フコース修飾酵素の活性が欠失または低下するようにゲノムが改変された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫は、胚性幹細胞、受精卵細胞、または植物細胞を用いて作製することができる。

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

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

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

親株細胞または親個体が生産する抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物としては、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞または親個体が生産する抗体組成物の該割合よりも高いものがあげられる。具体的には、該割合が 2 倍以上、好ましくは 3 倍以上、より好ましくは 5 倍以上、特に好ましくは 10 倍以上高い抗体組成物があげられ、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の全てが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位が結合していない糖鎖である抗体組成物が最も好ましい。

上述の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が１００％である抗体組成物、または抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グルコシド結合複合型糖鎖の全てが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位が結合していない糖鎖である抗体組成物として

は、後述５に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的には検出できない程度である場合をいう。

本発明により得られる抗体組成物において、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株または親個体が生産する抗体組成物よりも高い場合、本発明により得られる抗体組成物は、親株または親個体が生産する抗体分子からなる抗体組成物より高い ADCC 活性を有する。

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

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

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

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Anticancer Res., 13, 331-336, 1993）、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993）、抗ＧM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994）、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992）、抗 CD52 抗体 (Nature,

332, 323-327, 1988）、抗 MAGE 抗体（British J. Cancer, 83, 493-497, 2000）、抗HM1. 24 抗体（Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999）、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白（PTHrP）抗体（Cancer, 88, 2909-2911, 2000）、抗 FGF8 抗体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989）抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF8 受容体抗体（J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990）、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体（J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995）、抗インスリン様増殖因子受容体抗体（J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995）、抗 PMSA 抗体（J. Urology, 160, 2396-2401, 1998）、抗血管内皮細胞増殖因子抗体（Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997）、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体（Oncogene, 19, 2138-2146, 2000）、抗 CA125 抗体、抗 17-1A 抗体、抗インテグリン αvβ3 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD22 抗体、抗 HLA 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD19 抗体、抗 EGF 受容体抗体 （Immunology Today、21(8)、403-410 （2000））、抗 CD10 抗体（American Journal of Clinical Pathology, 113, 374-382, 2000)などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体（Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992）、抗インターロイキン 6 受容体抗体（Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994）、抗インターロイキン 5 抗体（Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992）、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体（Cytokine, 3, 562-567, 1991）、抗インターロイキン 4 受容体抗体（J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998）、抗腫瘍壊死因子抗体（Hybridoma, 13, 183-190, 1994）、抗腫瘍壊死因子受容体抗体（Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000）、抗 CCR4 抗体（Nature, 400, 776-780, 1999）、抗ケモカイン抗体（J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994）、抗ケモカイン受容体抗体（J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997）、抗 IgE 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD11a 抗体（Immunology Today、21(8)、403-410 (2000))、抗 CRTH2 抗体（J Immunol., 162, 1278-1286 (1999))、抗 CCR8 抗体（WO99/25734)、抗 CCR3 抗体（US6207155）などがあげられる。

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 GpIIb/IIIa 抗体（J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994）、抗血小板由来増殖因子抗体（Science, 253, 1129-1132, 1991）、抗血小板由来増殖因子受容体抗体（J. Biol. Chem., 272,

17400-17404, 1997）または抗血液凝固因子抗体（Circulation, 101, 1158-1164, 2000）などが挙げられる。

自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己 DNA 抗体（Immunol. Letters, 72, 61-68, 2000）などが挙げられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗ｇｐ120 抗体（Structure, 8, 385-395, 2000）、抗 CD4 抗体（J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998）、抗 CCR4 抗体、抗ベロ毒素抗体（J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999）、自己免疫疾患（乾癬、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症など）、抗 CD11a 抗体、抗 ICAM3 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD2 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗インテグリン α4β7 抗体、抗 CD40L 抗体、抗 IL-2 受容体抗体（Immunology Today、21(8)、403-410（2000））などが挙げられる。

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

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

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

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

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

ムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

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

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

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

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

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

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体生産トランスジェニック非ヒト動物あるいはヒト抗体生産トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

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

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

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

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

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

抗体の断片は、上記抗体の少なくとも Fc 領域の一部を含んだ断片をいう。Fc 領域とは、抗体の H 鎖の C 末端側の領域、CH2 領域および CH3 領域を意味し、天然型およびその変異型を包含する。少なくとも Fc 領域の一部とは、好ましくは CH2 領域を含む断片、より好ましくは CH2 領域内に存在する 1 番目のアスパラギン酸を含む領域をいう。IgG クラスの Fc 領域は、カバット (Kabat) らの EU Index [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] のナンバリングで 226 番目の Cys から C 末端、あるいは 230 番目の Pro から C 末端ま

でを意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

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

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

（1）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞は、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する酵素としては、具体的にはα1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。

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

（ａ）相同組換え法による本発明の抗体生産細胞の作製

本発明の細胞は、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

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

α1,6-フコース修飾酵素のｃＤＮＡを取得する。

取得したｃＤＮＡの塩基配列に基づき、α1,6-フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡを調製する。

該ゲノムＤＮＡの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子（例えば、α1,6-フコース修飾酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするα1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の細胞があげられる。

α1,6-フコース修飾酵素のｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡを取得する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ｃＤＮＡの調製方法

各種宿主細胞から全ＲＮＡまたはｍＲＮＡを調製する。

調製した全ＲＮＡまたはｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作製する。

α1,6-フコース修飾酵素の既知アミノ酸配列、例えばヒトのアミノ酸配列、に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したｃＤＮＡライブラリーを鋳型としてＰＣＲ法にて、α1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、α1,6-フコース修飾酵素をコードするｃＤＮＡを取得することができる。

各種宿主細胞のｍＲＮＡは、市販のもの(例えばClontech社製)を用いてもよいし、以下のごとく各種宿主細胞から調製してもよい。各種宿主細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)］、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム（ＡＧＰＣ）法［アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987)；実験医学、9, 1937 (1991)］などがあげられる。

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

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

調製した各種宿主細胞ｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作製する。ｃＤＮＡライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning（Life Technologies 社製）、ZAP-cDNA Synthesis Kit（STRATAGENE 社製）を用いる方法などがあげられる。

ｃＤＮＡライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express［STRATAGENE 社製、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)］、pBluescript II SK(+)［ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)］、Lambda ZAP II（STRATAGENE 社製）、λgt10、λgt11［ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach),1, 49 (1985)］、λTriplEx（Clontech 社製）、λExCell（Pharmacia 社製）、pT7T318U（Pharmacia 社製）、pcD2［モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)］および pUC18［ジーン(Gene), 33, 103 (1985)］等をあげることができる。

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

［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)］および Escherichia coli JM105［ジーン(Gene), 38, 275 (1985)］等が用いられる。

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

α1,6-フコース修飾酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5'端および 3'端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したｃＤＮＡライブラリーを鋳型としてＰＣＲ法［ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)］を用いてＤＮＡの増幅を行うことにより、α1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片がα1,6-フコース修飾酵素をコードするＤＮＡであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)］あるいはＡＢＩＰＲＩＳＭ377ＤＮＡシークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をＤＮＡプローブとして、各種宿主細胞に含まれるｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、α1,6-フコース修飾酵素のＤＮＡを取得することができる。

また、α1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、各種宿主細胞に含まれるｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＰＣＲ法を用いてスクリーニングを行うことにより、α1,6-フコース修飾酵素のＤＮＡを取得することもできる。

取得したα1,6-フコース修飾酵素をコードするＤＮＡの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)］あるいはＡＢＩＰＲＩＳM377ＤＮＡシークエンサー（PE Biosystems 社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したｃＤＮＡの塩基配列をもとに、ＢＬＡＳＴ等の相同性検索プログラムを用いて、ＧｅｎＢａｎｋ、ＥＭＢＬおよびＤＤＢＪなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中でα1,6-フコース修飾酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られるα1,6-フコース修飾酵素をコードしている遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または2に記載の塩基配列が挙げられる。

決定されたＤＮＡの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のＤＮＡ合成機 model 392 等のＤＮＡ合成機で化学合成することにより、α1,6-フコース修飾酵素のｃＤＮＡを取得することもできる。

α1,6-フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法が挙げられる。

ゲノムＤＮＡの調製方法

ゲノムＤＮＡを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムＤＮＡライブラリースクリーニングシステム（Genome Systems 社製）や Universal GenomeWalker™ Kits（CLONTECH 社製）などを用いることにより、α1,6-フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡを単離することもできる。

上記の方法で得られるα1,6-フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、 Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲ

ットベクターは、リプレースメント型、インサーション型いずれでも用いることができる。

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

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリＡ選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムＤＮＡに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）やＰＣＲ法［ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)］等があげられる。

また、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に係わる酵素活性の変化を指標として、相同組換え体を取得することもできる。具体的な方法としては、例えば、以下に記載の形質転換体を選択する方法が挙げられる。

形質転換体を選択する方法

α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下または欠失した細胞を選択する方法としては、文献［新生化学実験講座 3—糖質Ⅰ,糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)］、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ,グライコバイオロジー実験プロトコール,糖タンパク質･糖脂質･プロテオグリカン(秀潤社)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修（1996）］、モレキュラー･クローニング第 2 版、カレント･プロトコールズ･イン･モレキュラー･バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のｍＲＮＡ量を測定するノーザン解析やＲＴ－ＰＣＲ法等があげられる。

レクチン耐性細胞であることを確認する方法としては、GDP-フコース合成酵素、α1,6-フコース修飾酵素または GDP-フコース輸送蛋白質の発現を確認する方法、直接レクチンを加えた培地に細胞を培養する方法などがあげられる。具体的には

細胞内の α1,6-フコース修飾酵素の一つである α1,6-フコシルトランスフェラーゼの mRNA の発現量を測定し、mRNA の発現が低下していればレクチン耐性の細胞であるといえる。

また、α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下した結果生じる形質の変化を指標に細胞を選択する方法としては、例えば、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法や、細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法などが挙げられる。生産抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、後述の 5. に記載の方法が挙げられる。細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を挙げることができる。その具体的な例としては、ソマティク・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法が挙げられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、レンズマメレクチンＬＣＡ (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンＰＳＡ (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチンＶＦＡ (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンＡＡＬ (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等が好ましい。

具体的には、数 10μｇ／ｍｌ～10ｍｇ／ｍｌ、好ましくは 0.5～2.0ｍｇ／ｍｌの濃度の上述のレクチンを含む培地にで 1 日～2 週間、好ましくは 3 日～1 週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーを採取後、別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることで、本発明の宿主細胞を選択することができる。

（ｂ）ＲＤＯ方法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、ＲＤＯ法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

α1,6-フコース修飾酵素のｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡを調製する。

調製したｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したＤＮＡの配列に基づき、α1,6-フコース修飾酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのＲＤＯのコンストラクトを設計し合成する。

合成したＲＤＯを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわちα1,6-フコース修飾酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするα1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

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

α1,6-フコース修飾酵素のｃＤＮＡを調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の（ａ）に記載の「ｃＤＮＡの調製方法」などがあげられる。

α1,6-フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡを調製する方法としては、例えば、上記１の (1) の（ａ）に記載の「ゲノムＤＮＡの調製方法」などがあげられる。

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

ＲＤＯは、常法またはＤＮＡ合成機を用いることにより調製することができる。

ＲＤＯを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、上記１の (1) の（ａ）に記載の、α1,6-フコース修飾酵素活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」を用いることもできる。

ＲＤＯのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386, (1996)；ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285, (1998)；ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462, (1997)；ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960,

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

（ｃ）トランスポゾンを用いた方法による、本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.)，25，35，(2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、α1,6-フコース修飾酵素の活性、あるいは生産抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製することができる。

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

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

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

細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするα1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

本発明の細胞を宿主細胞として抗体分子をコードする遺伝子を導入するには、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

α1,6-フコース修飾酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、上記１の（1）の（ａ）に記載の、α1,6-フコース修飾酵素活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」が挙げられる。

（ｄ）アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、α１，６－フコース修飾酵素をコードしている遺伝子を標的とし、細胞工学，12，239，(1993)、バイオ／テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY)，17，1097，(1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.)，5，1083，(1995)、細胞工学，13，255，(1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)，96，1886（1999)等に記載されたアンチセンス法又はリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

標的遺伝子のｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡを調製する。

調製したｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したＤＮＡの配列に基づき、標的遺伝子の翻訳領域の部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

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

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

標的遺伝子がコードする蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の細胞を得ることもできる。

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

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写

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

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

標的遺伝子のｃＤＮＡ及びゲノムＤＮＡを取得する方法としては、例えば、上記１の（１）の（ａ）に記載の「ｃＤＮＡの調製方法」及び「ゲノムＤＮＡの調製方法」などがあげられる。

標的遺伝子がコードする蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、上記１の（１）の（ａ）に記載の「形質転換体を選択する方法」があげられる。

また、標的遺伝子がコードする蛋白質の活性が低下した結果生じる形質の変化を指標に細胞を選択する方法としては、例えば、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法や、細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法などが挙げられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、後述の５．に記載の方法が挙げられる。細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、上述の、Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を挙げることができる。その具体的な例としては、ソマティク・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス（Somatic Cell Mol. Genet.），12, 51, (1986)等に記載のレクチンを用いた方法が挙げられる。

また、発現ベクターを用いず、標的遺伝子の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはＤＮＡ合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、標的遺伝子のｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡの塩基配列のうち、連続した５～１５０塩基、好ましくは５～６０塩基、より好ましくは１０～４０塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

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

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

（ｅ）ＲＮＡｉ方法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を標的とし、ＲＮＡｉ（RNA interference）法を用い、例えば、以下のように作製することができる。ＲＮＡｉ法とは、2本鎖のRNAを細胞中に導入して、細胞中に存在する該RNAの配列に相同なmRNAを分解破壊し、遺伝子発現を抑える方法をいう。

標的遺伝子のｃＤＮＡを調製する。

調製したｃＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したＤＮＡの配列に基づき、標的遺伝子の翻訳領域の部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのＲＮＡｉ遺伝子のコンストラクトを設計する。

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

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

標的遺伝子がコードする蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

標的遺伝子がコードする蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）の（ａ）に記載の方法が挙げられる。また、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の５．に記載の方法が挙げられる。

標的遺伝子がコードする蛋白質のｃＤＮＡを調製する方法としては、例えば、前記１の（１）の（ａ）に記載された「ｃＤＮＡの調製方法」などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、標的遺伝子の塩基配列に基づいて設計したＲＮＡｉ遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を得ることもできる。

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

ＲＮＡｉ遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806, (1998)；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502, (1998)；ネイチャー(Nature), 395, 854, (1998)；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999)；セル(Cell), 95, 1017, (1998)；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451, (1999)；プロシーディングス・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959, (1998); ネイチャー・セル・バイオオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70, (2000)]等の記載に従って設計することができる。

本発明のRNAi法に用いられるRNAとしては、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質をコードするDNAに対応するRNAがあげられる。好ましくはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質が、α1,6-フコシルトランスフェラーゼであるDNAに対応するRNAがあげられる。

本発明のＲＮＡｉ法で使用される RNA としては、ＲＮＡおよびその相補ＲＮＡで構成され、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼのｍＲＮＡ量を減少させることが可能な２本鎖 RNA であればいかなるものでもよいが、RNA の長さとしては、好ましくは１～３０、より好ましくは５～２９、さらに好ましくは１０～２９、最も好ましくは１５～２９の連続した RNA があげられる。

（2）ドミナントネガティブ体を導入する手法による、本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、α１，６－フコース修飾酵素を標的とし、該蛋白質のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。

ドミナントネガティブ体の具体的な例として、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の例が挙げられる。

細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターは、小胞体及びゴルジ体の膜上においてダイマーを形成して機能していることが知られている[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 275, 17718, 2000]。また、細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターの変異体を細胞内で強制発現させることにより、野生型トランスポーターとヘテロダイマーを形成し、形成したヘテロダイマーは野生型ホモダイマーに対して阻害活性を示すことが報告されている[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 275, 17718, 2000]。従って、細胞内糖ヌクレオチドのトランスポーターの変異体を作製し細胞内に導入することで、ドミナントネガティブ体として機能させることが可能である。このような変異体の作製は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の細胞は、上述のように作製したα１，６－フコース修飾酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

α１，６－フコース修飾酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

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

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

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

α１，６－フコース修飾酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

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

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

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

標的蛋白質の活性を指標として突然変異体を選択する方法、あるいは、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）に記載の方法が挙げられる。また、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の４．に記載の方法が挙げられる。

(3) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の細胞は、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する酵素としては、具体的にはα1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。

具体的には、1) 突然変異誘発処理で親株細胞を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、α1,6-フコース修飾酵素活性の変化を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株細胞を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株細胞を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などが挙げられる。

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

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

α1,6-フコース修飾酵素活性の変化を指標として所望の細胞株を選択する方法、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法としては、例えば、上記１の（1）の（ａ）に記載の、α1,6-フコース修飾酵素活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」が挙げられる。

（4）GDP-フコース輸送蛋白質の転写または翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、α１，６－フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA／DNA技術［バイオサイエンスとインダストリー，50，322（1992）、化学，46，681（1991）、Biotechnology,9，358（1992）、Trends in Biotechnology,10，87（1992）、Trends in Biotechnology,10，152（1992）、細胞工学，16，1463（1997）］、トリプル・ヘリックス技術［Trends in Biotechnology,10，132（1992）］等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

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

本発明の、抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、α1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的として、1．に記載の手法を用いて作製した胚性幹細胞、受精卵細胞、または植物細胞より、公知の方法を用い作製することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する酵素としては、具体的にはα1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。

具体的な方法について、以下に記す。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1．に記載の手法を用いることにより、α1,6-フコース修飾酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体例としては、染色体上のα1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法［例えば、Nature，326，6110，295（1987）、Cell，51，3，503（1987）等］により不活化または任意の配列と置換した変異クローンなどがあげられる。作製した胚性幹細胞（例えば、該変異クローン）を用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞でα1,6-フコース修飾酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

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

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

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。具体的には、hprt 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、hprt 遺伝子を欠損した胚性幹細胞に導入後、胚性幹細胞をアミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、hprt 遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を G418 を含む培地で培養し、G418 耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。DT 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を培養し、生育してきた株を選別する (相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、DT 遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、DT の毒性により生育できない) ことにより、DT 遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組

換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）や PCR 法［ピーシーアール・プロトコールズ（PCR Protocols), Academic Press (1990)］等があげられる。

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

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

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1. に記載の手法を用いることにより、α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピューレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することもできる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルスまたは細胞に、1. に記載の手法を施すことでα1,6-フコース修飾酵素の活性が低下した本発明の植物細胞からなるカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じてオーキシンおよびサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、α1,6-フコース修飾酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

3. 抗体組成物の製造方法

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

抗体分子のｃＤＮＡを調製する。

調製した抗体分子の全長ｃＤＮＡをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を調製する。

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

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

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

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

抗体組成物の製造法に用いられる宿主細胞としては、上記 1. で作製した、本発明の細胞をあげることができる。

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

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

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

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、ＰＨＯ5 プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MFα1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

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

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

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

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

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

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

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

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

して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

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

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

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

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

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

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

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

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法［特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、WO94/00977］、エレクトロポレーション法［特開昭 60-251887］、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法［日本特許第 2606856、日本特許第 2517813］等をあげることができる。

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

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

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

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

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

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

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

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のｐＨは3．0～9．0に保持する。ｐＨの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

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

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

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地［ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエイション(The Journal of the American Medical Association),199, 519 (1967)］、Eagle のMEM培地［サイエンス(Science),122, 501 (1952)］、ダルベッコ改変MEM培地邊［ヴュウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)］、199培地［プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)］、Whitten 培地[発生工学実験マニュア

ルートランスジェニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（1987）]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

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

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

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

培養は、通常ｐＨ6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

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

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

培養は、通常ｐＨ5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとして

は、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

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

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

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

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理す

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

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質などを挙げることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物およびFc融合蛋白質の製造方法について記すが、他の抗体組成物を上述の方法および当該方法に準じて取得することもできる。

A. ヒト化抗体の組成物の製造

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

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

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hCγ1と表記する）およびヒト抗体のL鎖のκクラスのC領域（以下、hCκと表記する）等があげられる。

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

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

Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

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

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

(2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

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

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

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

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細

胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製) 、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in MolecularBiology), Supplement 1-34] 、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)] 、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)] 、λzap II (Stratagene 社製) 、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)] 、Lambda BlueMid (Clontech 社製) 、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製) 、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] および pUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)] 、C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)] 、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)] 、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)] 、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法［モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press NewYork, 1989］により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction［以下、PCR 法と表記する；モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34］により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

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

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

(3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins ofImmunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが

属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

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

(5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を移植するヒト抗体の VH および VL のフレームワーク（以下、FR と表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

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

（6）ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

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

低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている［バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)］。

ヒト型CDR移植抗体の作製において、該抗体と抗原との結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定することが、最も重要な点である。抗体と抗原との結合活性に関わるFRのアミノ酸を同定する方法としては、X線結晶解析［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（J. Mol. Biol.), 112, 535 (1977)］或いはコンピューターモデリング［プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)］等の抗体の立体構造の構築および解析方法があげられる。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらした。しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されていない。したがって、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

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

（7）ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

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

(8) ヒト化抗体の安定的生産

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

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

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

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるＢＨＫ細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、1. に記載の細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate（以下、G418 と表記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBS と表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法［以下、ELISA 法と表記する；アンティボディズ, Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ］等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる［アンティボディズ Chapter 8、モノクローナル･アンティボディズ］。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾

過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動［以下、SDS-PAGE と表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)］やウエスタンブロッティング法［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル, Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ］等で測定することができる。

B. Fc 融合蛋白質の製造

(1) Fc 融合蛋白質発現用ベクターの構築

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

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

ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。それら遺伝子と Fc 領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、PCR 法（レキュラー・クローニング第 2 版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34）を行うことがあげられる。

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

オフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

(2) ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAの取得

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

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

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

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

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

cDNAライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ

(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zapII (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

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

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

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

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

(3) Fc 融合蛋白質の安定的生産

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

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

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

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

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

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

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

以上、動物細胞を宿主とした抗体の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても製造することができる。

既に、抗体分子を発現する能力を有している細胞の場合には、上記 1. に記載の方法を用いて抗体生産細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、抗体組成物を製造することができる

4. 抗体組成物の活性評価

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

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法および蛍光抗体法［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)］等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)］。

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

5. 抗体組成物の糖鎖の分析

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

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

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

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

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

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2 次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal.Biochem.), 171,73 (1988)、生物化学実験法 23－糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2 次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間

または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン（以下、PA と略記する）による糖鎖の蛍光標識［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J.Biochem.），95, 197 (1984)］を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2 次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（TaKaRa 社製）、文献［アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.），171, 73 (1988)］とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

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

6. 本発明により得られる抗体組成物の利用

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

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

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

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い ADCC

活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

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

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

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Anticancer Res., 13, 331-336, 1993) 、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993) 、抗ＧM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994) 、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992) 、抗 CD52 抗体 (Nature, 332, 323-327, 1988) 、抗 MAGE 抗体 (British J. Cancer, 83, 493-497, 2000) 、抗HM1. 24 抗体 (Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999) 、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909-2911, 2000) 、抗 FGF8 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF8 受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990) 、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995) 、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995) 、抗 PMSA 抗体 (J. Urology, 160, 2396-2401, 1998) 、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997) 、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) 、抗 CA125 抗体、抗 17-1A 抗体、抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD22 抗体、抗 HLA 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD19 抗体、抗 EGF 受容体抗体 (Immunology Today、21(8)、403-410 (2000)) 、抗 CD10 抗体 (American Journal of Clinical Pathology, 113, 374-382, 2000)などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992) 、抗インターロイキン 6 受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994) 、抗インターロイキン 5 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992) 、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗

インターロイキン 4 抗体（Cytokine, 3, 562-567, 1991）、抗インターロイキン 4 受容体抗体（J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998）、抗腫瘍壊死因子抗体（Hybridoma, 13, 183-190, 1994）、抗腫瘍壊死因子受容体抗体（Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000）、抗 CCR4 抗体（Nature, 400, 776-780, 1999）、抗ケモカイン抗体（J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994）、抗ケモカイン受容体抗体（J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997）、抗 IgE 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD11a 抗体（Immunology Today、21(8)、403-410 (2000))、抗 CRTH2 抗体（J Immunol., 162, 1278-1286 (1999))、抗 CCR8 抗体（WO99/25734)、抗 CCR3 抗体（US6207155）などがあげられる。

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

自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己 DNA 抗体（Immunol. Letters, 72, 61-68, 2000）などが挙げられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗ｇｐ120 抗体（Structure, 8, 385-395, 2000）、抗 CD4 抗体（J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998）、抗 CCR4 抗体、抗ベロ毒素抗体（J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999）、自己免疫疾患（乾癬、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症など)、抗 CD11a 抗体、抗 ICAM3 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD2 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ 抗体、抗 CD40L 抗体、抗 IL-2 受容体抗体（Immunology Today、21(8)、403-410 (2000)）などが挙げられる。

上記抗体は、ＡＴＣＣ（The American Type Culture Collection）、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS 社、PharMingen 社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

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

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

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

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

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

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

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

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

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

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

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。

また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人１日当たり 10μg/kg～20mg/kg である。

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

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

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

図面の簡単な説明

第 1 図は、ラットミエローマ YB2/0 細胞 KM2760#58-35-16 株および 1-15 株が生産する抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□が KM2760#58-35-16 株生産抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1、△が抗 CCR4 キメラ抗体 1-15 株生産 KM2760-2 の活性をそれぞれ示す。

第 2 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって生産した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。第 2A 図に mfFUT8-6 株によって生産した抗体から調製した PA 化糖鎖、第 2B 図に pAGE249 導入株によって生産した抗体から調製した PA 化糖鎖の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 3 図は、RT-PCR 法を用いた各宿主細胞株における FUT8 およびβ-アクチン転写産物量の定量結果を示した写真である。KM2760-1 生産株である KM2760#58-35-16 株、KM2760-2 生産株である 1-15 株、および親株であるラットミエローマ YB2/0 細胞から調製した cDNA を鋳型とし、FU8 特異的プライマーセット（配列番号 13 および 14）あるいはβ-アクチン特異的プライマー（配列番号 11 および 12）を用いて PCR 反応を行い、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した結果を示す。

第 4 図は、プラスミド ploxPPuro の構築を示した図である。

第 5 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築を示した図である。

第 6 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築を示した図である。

第7図は、プラスミドpscFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第8図は、プラスミドpKOFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第9図は、プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築を示した図である。

第10図は、プラスミドpKOFUT8gE2-5の構築を示した図である。

第11図は、プラスミドpKOFUT8Puroの構築を示した図である。

第12図は、α1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子破壊CHO細胞株である1st.△FUT8 2-46-1株および1st.△FUT8 2-46株のゲノムサザン解析結果を示した写真である。

第13図は、α1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)遺伝子破壊CHO細胞株である1st.△FUT8 2-46株および2-46-H10株のゲノムサザン解析結果を示した図である。

第14図は、FUT8対立遺伝子破壊株より精製した抗CCR4キメラ抗体のADCC活性を示した写真である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲、■はそれぞれ、抗CCR4キメラ抗体生産CHO細胞5-03株由来の精製抗体、および1st.△FUT8 2-46-1株由来の精製抗体の活性をそれぞれ示す。

第15図は、プラスミドpKOFUT8Neoの構築を示した図である。

第16図は、CHO/DG44細胞のFUT8対立遺伝子を1コピー破壊したクローンのゲノムサザン解析結果を示した写真である。

第17図は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したクローンのゲノムサザン解析結果を示した写真である。

第18図は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子より薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した写真である。

第19図は、プラスミドpBs-2B8Lの構築を示した図である。

第20図は、プラスミドpBs-2B8HおよびプラスミドpBs-2B8Hmの構築を示した図である。

第21図は、プラスミドpKANTEX2B8Pの構築を示した図である。

第22図は、CHO/DG44細胞由来FUT8遺伝子ダブルノックアウト株より精製した抗CD20キメラ抗体のヒトBリンパ球培養細胞株Rajiに対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第23図は、プラスミドCHfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1. 抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞の作製

WO01/64754記載の抗CCR4キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpKANTEX2160を用いて抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

10μgの抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を4×10^6細胞のラットミエローマYB2/0細胞(ATCC CRL1662)へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、40mLのHybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAAラボラトリーズ社製)を5%含むHybridoma-SFM培地(インビトロジェン社製)]に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200μL/ウェルずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を1mg/mLになるように添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例2(2)項記載のELISA法により測定した。

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を1mg/mL、DHFRの阻害剤であるMTX (SIGMA社製)を50nM含むHybridoma-SFM-FBS(5)培地に$1\sim2\times10^5$細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート(Greiner社製)に1mlずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例2(2)項記載のELISA法により測定した。

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を上昇させ、最終的にMTXを200nMの濃度で含むHybridoma-SFM-FBS(5)培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行い、得られたクローン化株をKM2760#58-35-16と名付けた。尚、WO00/61739記載のα1,6-フコシルトランスフェラーゼ(以下、「FUT8」と表記する)の遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 の 4μg を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞[Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555 (1986)]へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 100μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析 FBS を 10%で含む IMDM 培地) に培地交換し、1～2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 2 (2) 記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に 1～2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nM に上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。

実施例 2. FUT8 遺伝子の発現が低下した抗体生産細胞が生産する抗体組成物と親株細胞が生産する抗体組成物との比較

α1,6-フコース修飾酵素の活性が親株細胞より低下した抗体生産細胞が生産する抗体組成物と、親株細胞が生産する抗体組成物との ADCC 活性の比較を行った。

(1) 抗体組成物の調製

α1,6-フコース修飾酵素の活性が親株より低下した抗体生産細胞が生産する抗体組成物としては、実施例 1 の(1)記載の FUT8 遺伝子の転写物量が低い KM2760#58-35-16 株の培養上清より精製した抗体組成物 KM2760-1 を用いた。

親株細胞であるラットミエローマ YB2/0 細胞（ATCC CRL1662)が生産する抗体組成物は、以下のようにして調製した。

10μg の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160（WO01/64754 記載）を 4×10^6細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞（ATCC CRL1662）へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology), 3, 133 (1990)］により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5)［FBS（PAA ラボラトリーズ社製）を 5%含む Hybridoma-SFM 培地（インビトロジェン社製)］に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に 200μL/ウェルずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 1mg/mL になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を本項（2）記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 1mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX（SIGMA 社製）を 50nM 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に 1～2×10^5細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート(Greiner 社製)に 1ml ずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を本項（2）記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株を 1-15 株と名付けた。尚、1-15 株に関しては限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行わなかった。

取得した形質転換株 1-15 が生産する抗 CCR4 キメラ抗体の精製は以下のように行った。

抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換株 1-15 を 200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製）を 5%の濃度で含む Hybridoma-SFM（インビトロジェン社製）培地に 2×10^5細胞/ml となる様に懸濁し、スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて 37℃の恒温室内で Fed-Batch 攪拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清

より、Prosep-A（ミリポア社製）カラムおよびゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-2 と名づけた。

(2) 抗体組成物の抗原結合活性

本実施例 (1) で得られた 2 種類の抗体組成物について抗原結合活性を以下に示す ELISA 法により測定した。

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 6) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100ml の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリックアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を撹拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした (A_{280}測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を撹拌しながら添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4℃、一晩透析し、最終濃度 0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05μg/mL、50μl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS (以下、TweeN-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを TweeN-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(γ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50μL/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を 50μL/ウェル加えて反応を停止した。その後 415nm の吸光度を測定した。

その結果、精製したKM2760-1およびKM2760-2のCCR4部分ペプチドに対する結合活性を上記記載のELISAにより測定した結果、同等の結合活性を示した。

(3) 抗体組成物のADCC活性

精製したKM2760-1およびKM2760-2のADCC活性を以下の方法で測定した。

抗CCR4キメラ抗体のヒトCCR4高発現細胞であるCCR4/EL-4細胞 (WO01/64754) に対するADCC活性は、以下のようにして測定した。

(a) 標的細胞溶液の調製

WO01/64754に記載のヒトCCR4を発現しているCCR4/EL-4細胞の1.5×10^6細胞を調製し、放射性物質である$Na_2{}^{51}CrO_4$を5.55MBq当量加えて37℃で1時間30分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を15mL加え、2×10^5細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

(b) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

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

(c) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の50μL (1×10^4細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したヒトエフェクター細胞溶液を100μL (5×10^5細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は50:1となる) 添加した。さらに、抗CCR4キメラ抗体を各最終濃度0.0001～10μg/mLとなるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の^{51}Cr量をγ-カウンターにて測定した。自然解離^{51}Cr量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の^{51}Cr量を測定することにより求めた。全解

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

$$ADCC\ 活性(\%) = \frac{(検体上清中の\ ^{51}Cr\ 量) - (自然遊離\ ^{51}Cr\ 量)}{(全遊離\ ^{51}Cr\ 量) - (自然遊離\ ^{51}Cr\ 量)} \times 100 \quad (I)$$

上記記載の方法により測定した結果、KM2760-1 と KM2760-2 では有意に活性が相違し、KM2760-2 の方が有意に低かった（第 1 図）。

(4) 抗体組成物の糖鎖解析

KM2760-1 および KM2760-2 の糖鎖分析を以下の方法に従って行った。

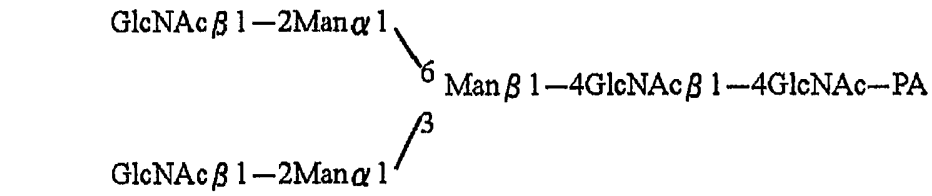
KM2760-1 および KM2760-2 についてそれぞれヒドラジン分解を行い、糖鎖を蛋白質から切断した[メソッド・オブ・エンザイモロジー（Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。減圧留去することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群（PA 化糖鎖群）を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム（Pharmacia 社製）を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム（Shimadzu 社製）を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った（第 2 図)。

緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）、緩衝液 B として 0.5%1-ブタノールを含むリン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）を用い、以下のグラジエントで分析した。

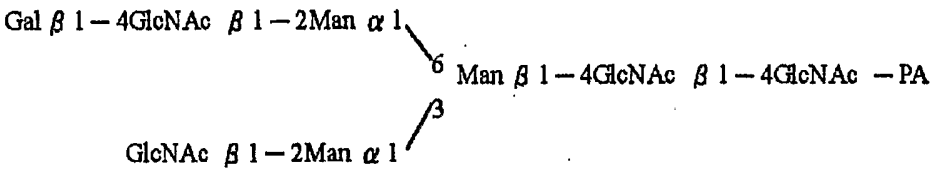
時間（分）	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B（%）	0	60	60	0	0

第 2 図で示した(1)～(8)のピークは、それぞれ以下の構造を示す。

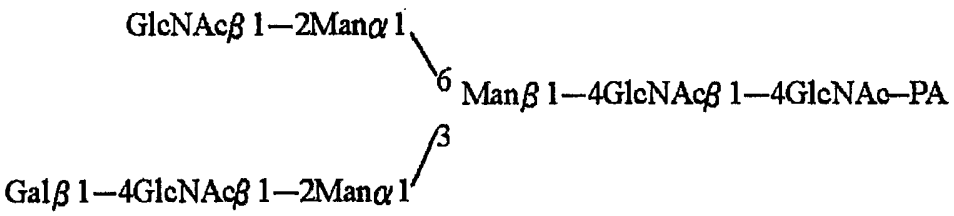
(1)


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

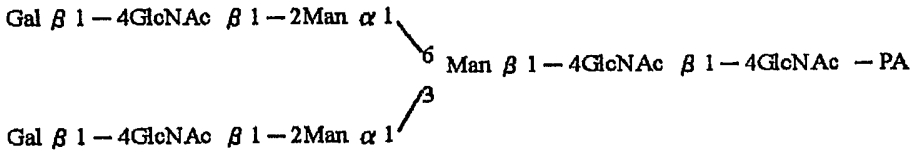
(2)


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

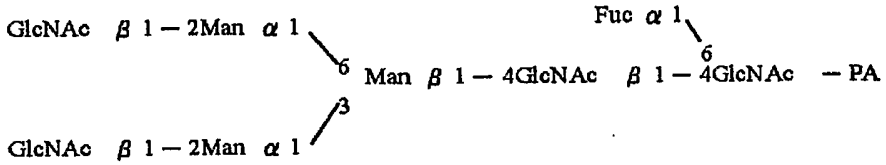
(3)


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

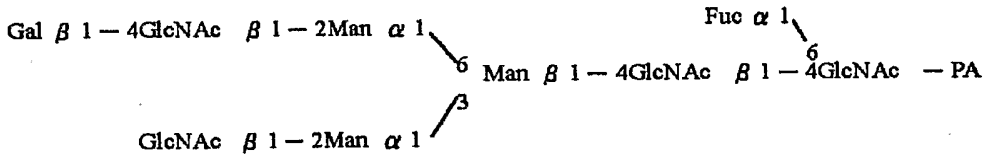
(4)



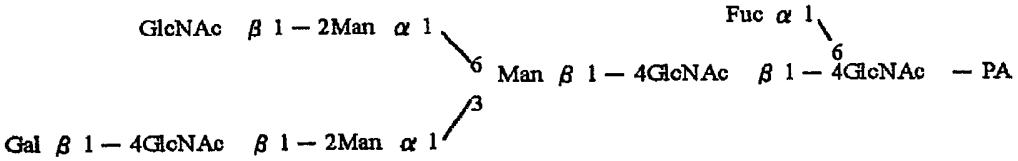
(5)



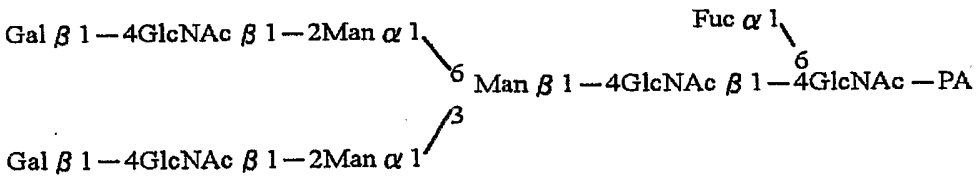
(6)



(7)



(8)



GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。

第 2 図において、α1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(1)～(8) のうち (1)～(4)のピークが占める面積、α1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(1)～(8)のうち (5)～(8) のピークが占める面積から算出した。

α1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に関して違いが観察され、KM2760-2 の方が有意に低かった。

(5) 抗体組成物を生産する細胞のFUT8遺伝子の発現量

親株細胞であるラットミエローマ YB2/0 細胞、KM2760-1 生産株であるKM2760#58-35-16 株、およびKM2760-2 生産株である 1-15 株の FUT8 およびβ-アクチン遺伝子の転写物の量を、WO00/61739 の実施例 8 に記載の定量法にしたがって測定した結果を第 3 図に示す。1-15 株の FUT8 遺伝子の発現量は、親株細胞であるラットミエローマ YB2/0 細胞と同等であったが、KM2760#58-35-16 株の発現量はこれら株と比較して明らかに低かった。

以上の結果より、α1,6-フコース修飾酵素の活性が親株細胞より低下した抗体生産細胞は、親株細胞が生産する抗体組成物より ADCC 活性の高い抗体組成物を生産することが可能であることが確認された。

実施例 3. FUT8 遺伝子が破壊された CHO 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

CHO 細胞 FUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むゲノム領域を欠失した CHO 細胞を作製し、該細胞が生産する抗体の ADCC 活性を評価した。

1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Puro の構築

(1) プラスミド ploxPPuro の構築

以下の手順でプラスミド ploxPPuro を構築した（第 4 図）。

プラスミド pKOSelectPuro (Lexicon 社製) 1.0μg を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、特開平 11-314512 に記載のプラスミド ploxP 1.0μg を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOSelectPuro 由来の AscI-AscI 断片 (約 1.5Kb) 4.5μl、プラスミド ploxP 由来の AscI-AscI 断片 (約 2.0Kb) 0.5μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を

行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuro と称す。

(2) プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築

参考例(2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-2 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-1 を構築した (第 5 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-2 2.0μg を、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS28 (New England Biolabs 社製) 1.0μg を、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 1.5Kb) 4.5μl、プラスミド LITMUS28 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 2.8Kb) 0.5μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-1 と称す。

(3) プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築

本項 (2) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-2を構築した (第6図)。

プラスミド pKOFUT8gE2-1 2.0μg を、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド ploxPPuro 1.0μg を、NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、制限酵素 HpaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0. 8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 由来の EcoRV-KpnI 断片 (約 1.5Kb) 4.0μl、プラスミド ploxPPuro 由来の HpaI-KpnI 断片 (約 3.5Kb) 1.0μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-2と称す。

(4) プラスミドpscFUT8gE2-3の構築

参考例(2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミドpscFUT8gE2-3を構築した (第7図)。

プラスミドpFUT8fgE2-4 2.0μgを NEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HpaII (New England Biolabs 社製) を加えて

37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、Blunting High（東洋紡社製）を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行って DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS39 (New England Biolabs 社製) 1.0μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HpaII-HindIII 断片（約 3.5Kb）4.0μl、プラスミド LITMUS39 由来の EcoRV-HindIII 断片（約 2.8Kb）1.0μl、Ligation High（東洋紡社製）5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pscFUT8gE2-3 と称す。

(5) プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築

参考例 (2)で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-3 を構築した（第 8 図）。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0μg を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.8Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) (Strategene 社製) 1.0μg を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、

該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 1.8Kb) 4.0 μl、プラスミド pBluescriptII KS(+)由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 3.0Kb) 1.0 μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3 と称す。

(6) プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築

本項 (4) および (5) で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 および pKOFUT8gE2-3 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-4 を構築した (第 9 図)。

プラスミド pscFUT8gE2-3 1.0μg を、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.6Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-3 1.0μg を、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5μl を添加し、65℃で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。

上記で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 由来の SalI- HindIII 断片（約 3.1Kb）4.0μl、プラスミド pKOFUT8gE2-3 由来の SalI- HindIII 断片（約 4.8Kb）1.0μl、Ligation High（東洋紡社製）5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-4 と称す。

(7) プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築

本項（3）および（6）で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 および pKOFUT8gE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-5 を構築した（第 10 図）。

プラスミド pKOFUT8gE2-2 1.0μg を NEBuffer 4（New England Biolabs 社製）30μl に溶解し、制限酵素 SmaI（New England Biolabs 社製）20 単位を加えて 25℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.0μl を添加し、65℃で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-4 1.0μg を NEBuffer 4（New England Biolabs 社製）30μl に溶解し、制限酵素 SmaI（New England Biolabs 社製）20 単位を加えて 25℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約 5.2Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 由来の SmaI-BamHI 断片（約 5.0Kb） 0.5μl、プラスミド pKOFUT8gE2-4 由来の SmaI-BamHI 断片（約 5.4Kb）4.5μl、Ligation High（東洋紡社製）5.0μl を混合し、16℃で 15 時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られ

たアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5 と称す。

(8) プラスミド pKOFUT8Puro の構築

本項 (7) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-5 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8Puro を構築した (第 11 図)。

プラスミド pKOSelectDT (Lexicon 社製) 1.0μg を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50μl に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ジフテリアトキシン発現ユニットを含む約 1.2Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-5 1.0μg を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50μl に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0μl を添加し、65℃で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。

上記で得たプラスミド pKOSelectDT 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 1.2Kb) 1.0μl、プラスミド pKOFUT8gE2-5 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 10.4Kb) 1.0μl、滅菌水 3.0μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Puro と称す。

2. FUT8 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域が 1 コピー破壊された CHO 細胞の作製

(1) ターゲティングベクターの導入

本実施例第 1 項で構築したチャイニーズハムスターFUT8 ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Puro を実施例 1 の(2)で作製した 5-03 株へ導入した。

プラスミド pKOFUT8Puro の 5-03 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で

行った。まず、プラスミド pKOFUT8Puro 150μg を NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 1.8ml に溶解し、600 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、5-03 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$) に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) を上記線状化プラスミド 4μl (4μg) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。同様にしてキュベット 30 本分に対し遺伝子導入した後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 30 枚へ播種した。5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、15μg/mlPuromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性株を取得した。

(2) ターゲティングベクター導入株の取得

本項 (1) で得たピューロマイシン耐性株より任意の 900 個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、ピューロマイシン耐性株が出現した 10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、15μg/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地（20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM）と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート（岩城硝子社製）へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、15μg/ml Puromycin（SIGMA 社製）および 10% ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）を用いて 1 週間培養することにより作製した。

(3) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (2) で得た 900 クローンに対し、以下の手順でゲノム PCR による相同組換えの診断を行った。

まず、本項 (2) で作製したレプリカプレートより公知の方法［アナリティカル・バイオケミストリー（Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)］に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液（pH8.0）（10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A）30μl に一晩溶解した。また、参考例で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 15 に示す）およびベクター内の loxP 配列に結合するプライマー（配列番号 16 に示す）を設計した。

DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々10μl 含む 25μl の反応液［ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 15 および配列番号 16)］を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした 38 サイクルの条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、CHO 細胞ゲノム領域とターゲティングベクター相同領域との境界部を含む約 1.7Kb の特異的増幅が認められるものを陽性クローンとした。本法により陽性を示す 1 クローンを見出した。

(4) ゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断

本項 (3) で陽性が確認された 1 クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、本項 (3) で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO_2、37℃の条件下で 10 分間静置した。静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。15μg/ml ピューロマイシン(SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A) 150μl に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12μg を NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製) 120μl に溶解し、25 単位の制限酵素 PstI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20μl に溶解し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、参考例で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 9 および配列番号 10) を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、参考例 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 9 および配列番号 10)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、[α-^{32}P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液［5×SSPE、50×Denhaldt's 液、0.5% (w/v) SDS、100μg/ml サケ精子 DNA］15ml を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 PstI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 4.4Kb の DNA 断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 6.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、本項 (3) における陽性クローンのゲノム DNA より上記約 4.4Kb および約 6.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1：1 であったことから、本クローンは、FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊したクローンであることが確認された。本クローンを以下、1st.△FUT8 2-46 株と称す。

3. FUT8 遺伝子が 1 コピー破壊された CHO 細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例第 2 項で作製した 1st.△FUT8 2-46 株へ、Cre リコンビナーゼ発現ベクターpBS185 (Life Technologies 社製) を導入した。

プラスミド pBS185 の 1st.△FUT8 2-46 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、1st.△FUT8 2-46 株を K-PBS 緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) をプラスミド pBS185 4μg と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) 10ml に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。接着

細胞培養用 10cm ディッシュ（Falcon 社製）7 枚へ播種後、5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した。培養後、上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製)を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行った。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項（1）で得た株より任意の 400 個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン（GILSON 社製）を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート（Falcon 社製）へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート（岩城硝子社製）へ各クローンを播種し、10%ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地（20%DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM）と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート（岩城硝子社製）へ播種してレプリカプレートを作製する一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

次に、レプリカプレートを 15μg/ml ピューロマイシン(SIGMA 社製）および 10% ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）を用いて 6 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれたピューロマイシン耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、ピューロマイシン存在下で死滅する。本選択法により 91 個の陽性クローンを見出した。

(3) ゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項（2）で見出された陽性クローンのうち任意の 6 クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項（2）で凍結保存したマスタープレートのうち、上記 6 クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO_2、37℃の条件下で 10 分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート（Greiner 社製)へ播種した。10% ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）を添加した

IMDM 培地（Life Technologies 社製）を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。該プレートより公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)］に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液（pH8.0）(10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A) 150μl に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12μg を NEBuffer for BamHI（New England Biolabs 社製）120μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液（pH8.0）(10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20μl に溶解し、0.4%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)］に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、参考例で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 9 および配列番号 10）を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、参考例（2）で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液［ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 9 および配列番号 10)］を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、[α-^{32}P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP（Amersham Pharmacia Biotech 社製）を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液（5×SSPE、50×Denhaldt's 液、0.5%（w/v）SDS、100μg/ml サケ精子 DNA）15ml を加えて 65℃で 3 時間の

プレハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 25.5Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 20.0Kb の DNA 断片が生じる。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去された場合には、同処理により約 18.5Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、上記 6 クローンのうち 5 クローンのゲノム DNA より上記約 25.5Kb および約 18.5Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1 : 1 であったことから、FUT8 ゲノム領域を 1 コピー破壊した株よりピューロマイシン耐性遺伝子が除去されたことが示された。本クローンを以下、1st.△FUT8 2-46-1 株と称す。尚、上述の 1st.△FUT8 2-46-1 株、1st.△FUT8 2-46 株、および、5-03 株のゲノムサザンの結果を第 12 図に示した。なお 1st.△FUT8 2-46-1 株は 2-46-1 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地中央第 6) に FERM BP-7755 として寄託されている。

4. FUT8 遺伝子破壊株が生産する抗体組成物の精製

本実施例第 3 項で得た FUT8 対立遺伝子が 1 コピー破壊された株 1st.△FUT8 2-46-1 株を、3×10^5 個/ml の密度で 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) へ懸濁後、接着細胞培養用 T182 フラスコ (Greiner 社製) 2 本に計 60ml 各々播種した。3 日間の培養後、上清を除去し、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 計 60ml へ交換した。

これらを 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティーが同程度 (各々30%以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、4℃の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4℃の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、0.22μm 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清各 100ml をカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 50ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を 500μl ずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 100μl と混合して中和した。BCA 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分 (計 1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH6.0) を用いて 4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22μm 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

5. FUT8 遺伝子破壊株が生産する抗体組成物の ADCC 活性

本実施例第 4 項で精製した抗 CCR4 抗体の ADCC 活性を評価するため、WO01/64754 に記載の CCR4 陽性細胞株 CCR4/EL-4 を用いた ADCC 活性を測定した。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養した CCR4/EL-4 株 1×10^6 個を RPMI1640-FBS(10) 500μl に懸濁し、$Na_2{}^{51}CrO_4$ 3.7MBq を添加して 37℃で 90 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、2.0×10^5 個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健常人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を

RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2.5×10^6個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96 穴U字底プレート (Falcon 社製) の各穴に標的細胞懸濁液を 50μl ずつ (1×10^4 個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を 100μl ずつ (2.5×10^5 個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 25:1 とした。次に RPMI1640-FBS(10)を用いて、本実施例第 4 項で得た各抗 CCR4 抗体より 0.01μg/ml、0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/ml の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに 50μl 添加することにより、終濃度 0.0025μg/ml、0.025μg/ml、0.25μg/ml、2.5μg/ml とした。5%CO_2、37℃の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分間の遠心分離を行った。各穴の上清 75μl を 12mm 径 RIA チューブ (IWAKI 社製) に分取し、MINAX-α オートガンマーカウンター5550 (PACKRD 社製) を用いて解離 ^{51}Cr 量の測定を行った。

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10) 150μl を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸 100μl および RPMI1640-FBS(10) 50μl を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。これらの値を用いて実施例 2 (3) 記載の式 (I) により、ADCC 活性を求めた。

第 13 図に各種抗 CCR4 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊された 1st.△FUT8 2-46-1 株より得た抗体組成物は、該遺伝子破壊前の CHO 細胞 5-03 株が生産する抗体組成物に比べ有意に高い ADCC 活性を示した。また、これら抗体組成物での抗原結合活性には変化は観察されなかった。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 対立遺伝子を破壊することにより、生産される抗体組成物の ADCC 活性を高めることができることが明らかになった。

実施例 4. FUT8 遺伝子が 1 コピー破壊された CHO 細胞からの高薬剤耐性株の取得

ターゲットベクターを用い相同組換えの方法で取得されたゲノム遺伝子の片方のアリルが破壊された細胞を、ターゲットベクター挿入株を選抜する際に用いたポジティブ選択のための薬剤濃度を 10 倍程度高くした培地で培養し、該薬剤に対する高耐性株を取得することで、両方のアリルが破壊された株が取得されることが一般的に知られている (マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボ

ラトリー・マニュアル、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製)。

そこで、実施例3の2(3)で得た1st. ΔFUT8 2-46株を用い、公知の方法［モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology), 12, 2391, (1992)］に従ってFUT8遺伝子が2コピー破壊された形質転換株を以下のようにして作製した。

(1) 高濃度ピューロマイシン耐性株の取得

10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地(Life Technologies 社製)へ 1st. ΔFUT8 2-46 株 1×10^8 個を懸濁し、接着細胞培養用10cmディッシュ (Falcon社製) 20枚へ播種した後、5%CO_2、37℃の条件下で24時間培養した。培養後、上清を除去し、150μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地(Life Technologies 社製)を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら12日間の培養を行った。

出現した薬剤耐性コロニー90 個を以下の手順で採取した。まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、150μg/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加したIMDM培地(Life Technologies社製)を用いて1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地［20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM］と混和した。このうち半量を接着細胞用平底96穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、15μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) および10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地(Life Technologies 社製)を用いて1週間培養した。

(2) ゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断

本項 (1) で得た全ての薬剤耐性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断を行った。

本項 (1) で作製したレプリカプレートに対しトリプシン処理を行った後、全クローンを接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。150μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地(Life Technologies 社製)を用いて全クローンを 1 週間培養した後、トリプシン処理を行い接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液(pH8.0) [10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200mg/ml RNase A] 150ml に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12μg を NEBuffer for BamHI(New England Biolabs 社製)120μl に溶解し、25 単位の制限酵素 BamHI(New England Biolabs 社製)を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液(pH8.0) [10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA] 20μl に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製)を用いて、参考例(2)で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 9 および配列番号 10)]を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5ml に対し、 [α^{32}P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhaldt's

液、0.5%(w/v) SDS、100μg/ml サケ精子 DNA] 15ml を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 25.5Kb の DNA 断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 20.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、相同組換え領域特異的な上記約 14.0Kb の断片のみを認めるクローンが見出された（第 14 図）。本クローンを 2-46-H10 株と称す。

実施例 5. ゲノム上に存在する全ての FUT8 遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

FUT8 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失した CHO/DG44 細胞株の造成をおこなった。

1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Neo の構築

実施例 3 第 1 項で得たターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Puro の保有するピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを以下の手順でネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットに置換することによって、プラスミド pKOFUT8Neo を構築した（第 15 図）。

プラスミド pKOSelectNeo (Lexicon 社製) 1.0μg を NEBuffer4(New England Biolabs 社) 50μl に溶解し、制限酵素 AscI(New England Biolabs 社) 16 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100 μg/ml BSA(New England Biolabs 社) を含む NEBuffer4(New England Biolabs 社製) 50μl に溶解し、20 単位の制限酵素 ApaLI(New England Biolabs 社製) を加えて 25℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8Puro 1.0μg を NEBuffer4(New England Biolabs 社製) 50μl に溶解し、制限酵素 AscI(New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.0μl を添加し、65℃で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。

上記で得たプラスミド pKOSelectNeo 由来の AscI- AscI 断片(約 1.6Kb) 1.0μl、プラスミド pKOFUT8Puro 由来の AscI- AscI 断片(約 10.1Kb) 1.0μl、滅菌水 3.0μl、Ligation High(東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Neo と称す。

2. ゲノム上の FUT8 遺伝子を 1 コピー破壊した CHO/DG44 細胞の作製

(1) ターゲティングベクター導入株の取得

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

プラスミド pKOFUT8Neo の CHO/DG44 細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、100μg/ml BSA(New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI(New England Biolabs 社製) 1.2ml にプラスミド pKOFUT8Neo 280μg を溶解し、400 単位の制限酵素 SalI(New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、CHO/DG44 細胞を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$] に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) を上記線状化プラスミド 4μl (4μg) と混和した後、細胞－DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette(電極間距離 2mm)(BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene

Pulser(BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5% CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、600 μg/ml G418 (ナカライテスク社製) 、1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) および 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) を 10ml/穴ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、G418 耐性クローンを取得した。

(2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (1) で取得した G418 耐性クローンに対し、以下の手順でゲノム PCR による相同組換えの診断を行った。

96 穴プレートに得た G418 耐性クローンに対しトリプシン処理を行った後、2 倍量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

レプリカプレートに対し、600μg/ml G418 (ナカライテスク社製) 、1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) および 10% ウシ胎児血清(Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) を用いて 1 週間培養した後、公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A] 30μl に一晩溶解した。

参考例で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 13 または配列番号 15) およびベクター内配列に結合するプライマー (配列番号 14 または配列番号 16) を用いて、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。即ち、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々10μl 含む 25μl の反応液[DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製) 、ExTaq buffer(宝酒造社製) 、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (フォワードプライマーは配列番号 13 または配列番号 15、リバースプライマーは配列番号 14 または配列番号 16)]を調製し、94℃で 3 分間の加熱の後、

94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとした条件でPCRを行った。

PCR後、反応液を0.8%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、CHO細胞ゲノム領域とターゲティングベクター相同領域との境界部を含む約1.7Kbの特異的増幅が認められるものを陽性クローン(50-10-104)と判定した。

(3) ゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断

本項(2)で陽性が確認されたクローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5% CO_2、37℃の条件下で10分間静置した。静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート(Greiner社製)へ播種した。600μg/ml G418(ナカライテスク社製)、1倍濃度のHT supplement(Invitrogen社製)および10%ウシ胎児血清(Invitrogen社製)を添加したIMDM培地(Invitrogen社製)を用いて1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート(Greiner社製)へ播種した。該プレートより公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々TE-RNase緩衝液(pH8.0)[10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A] 150μlに一晩溶解した。

100μg/ml BSA(New England Biolabs社製)を含むNEBuffer for BamHI(New England Biolabs社製) 120μlに上記で調製したゲノムDNA 12μgを溶解し、25単位の制限酵素BamHI(New England Biolabs社製)を加えて37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、TE緩衝液(pH8.0)[10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA] 20μlに溶解し、0.6%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)に従い、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、参考例で得たFUT8ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー(配列番号9および配列番号10)を用いて、以下の

PCR を行った。即ち、参考例 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20 μl の反応液[DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製) 、ExTaq buffer(宝酒造社製) 、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 9 および配列番号 10)]を調製し、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 後、反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、[α-^{32}P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhaldt's 液、0.5%(w/v) SDS、100μg/ml サケ精子 DNA] 15ml を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 25.5Kb の DNA 断片が生じた。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 20.0Kb の DNA 断片が生じた。

本法により、陽性クローン 50-10-104 のゲノム DNA より上記約 25.5Kb および約 20.0Kb の特異的断片が見出された (第 16 図) 。両断片の量比が 1 : 1 であったことから、本クローンは FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊したヘミノックアウトクローンであることが確認された。

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

(1) ターゲティングベクター導入株の取得

本実施例第 2 項で得た FUT8 ヘミノックアウトクローン 50-10-104 に対し、実施例 3 第 1 項で構築したチャイニーズハムスターFUT8 ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Puro を導入した。

プラスミド pKOFUT8Puro の 50-10-104 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、100μg/ml BSA(New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI(New England Biolabs 社製) 2.4ml にプラスミド pKOFUT8Puro 440μg を溶解し、800 単位の制限酵素 SalI(New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、50-10-104 を K-PBS 緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) を上記線状化プラスミド 4μl (4μg) と混和した後、細胞－DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette(電極間距離 2mm)(BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser(BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5% CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、15μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) 、1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) および 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 7 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、薬剤耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断

本項 (1) で得た薬剤耐性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断を行った。

ピューロマイシン耐性クローンが出現した 10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ各クローンを播種し、15μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) 、1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) および 10%

ウシ胎児血清（Invitrogen 社製）を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製）を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 24 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。15μg/ml ピューロマイシン（SIGMA 社製）、1 倍濃度の HT supplement（Invitrogen 社製）および 10% ウシ胎児血清（Invitrogen 社製）を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製）を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。該プレートより公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)］に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液(pH8.0) ［10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A］ 150μl に一晩溶解した。

100μg/ml BSA(New England Biolabs 社製) を含む NE Buffer for BamHI(New England Biolabs 社製) 120μl に上記で調製したゲノム DNA 12μg を溶解し、25 単位の制限酵素 BamHI(New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液(pH8.0) ［10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA］ 20μl に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 11 および配列番号 12）を用いて、以下の PCR を行った。即ち、参考例（2）で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液［DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製）、ExTaq buffer(宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 11 および配列番号 12）］を調製し、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 後、反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、［α-^{32}P］dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP（Amersham Pharmacia Biotech 社製）を用いて放射標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液［5×SSPE、50×Denhaldt's 液、0.5%(w/v) SDS、100μg/ml サケ精子 DNA］ 15ml を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC−0.1%(w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 25.5Kb の DNA 断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 20.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、薬剤耐性クローン WK704 のゲノム DNA より相同組換え領域特異的な約 20.0Kb の断片のみが見出された（第 17 図）。野生型対立遺伝子特異的断片が消失していたこと（矢印の部分）から、本クローンはゲノム上に存在する全ての FUT8 対立遺伝子を破壊したクローンであることが確認された。

4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例第 3 項で作製した FUT8 ダブルノックアウトクローンのうち WK704 に対し、Cre リコンビナーゼ発現ベクターpBS185 (Life Technologies 社製) を導入した。

プラスミド pBS185 の各 FUT8 ダブルノックアウトクローンへの遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、各 FUT8 ダブルノックアウトクローンを K-PBS 緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) をプラスミド pBS185 4μg と混和した後、細胞−DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette(電極間距離 2mm)(BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser(BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。導入後、各細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清

(Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) 10ml に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。各希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5% CO_2、37℃の条件下で 10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

WK704 に対し遺伝子導入して得たコロニーより任意のクローンを以下の手順で採取した。まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートを作製する一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

次に、レプリカプレートを 600μg/ml G418 (ナカライテスク社製) 、15μg/ml ピューロマイシン (SIGMA 社製) 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) を用いて 7 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれた両対立遺伝子上の薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418 およびピューロマイシン存在下で死滅する。本ネガティブ選択法により陽性クローンを見出した。

(3) ゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項 (2) で見出された陽性クローン (4-5-C3) に対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5% CO_2、37℃の条件下で 10 分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner

社製）へ播種した。10% ウシ胎児血清（Invitrogen 社製）および 1 倍濃度の HT supplement（Invitrogen 社製）を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。該プレートより公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)］に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液(pH8.0) ［10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A］ 150μl に一晩溶解した。

100μg/ml BSA(New England Biolabs 社製) を含む NE Buffer 2(New England Biolabs 社製) 120μl に上記で調製したゲノム DNA 12μg を溶解し、20 単位の制限酵素 NheI(New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液(pH8.0) ［10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA］ 20μl に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 11 および配列番号 12）を用いて、以下の PCR を行った。即ち、参考例 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液［DNA ポリメラーゼ ExTaq(宝酒造社製) 、ExTaq buffer(宝酒造社製) 、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 11 および配列番号 12）］を調製し、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 後、反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、［α-^{32}P］dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP（Amersham Pharmacia Biotech 社製）を用いて放射標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液［5×SSPE、50×Denhaldt's 液、0.5%(w/v) SDS、100μg/ml サケ精子 DNA］ 15ml を加えて 65℃で 3 時間のプ

レハイブリダイゼーションを行った。次に、^{32}P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

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

前述の制限酵素 NheI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 8.0Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 9.5Kb の DNA 断片が生じた。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からネオマイシン耐性遺伝子（約 1.6Kb）またはピューロマイシン耐性遺伝子（約 1.5Kb）が除去された場合には、同処理により約 8.0Kb の DNA 断片が生じた。

本法により、供試した陽性クローン 4-5-C3（実施例 5 の 4(3)陽性クローン)のゲノム DNA より、薬剤耐性遺伝子が除去された相同組換え領域特異的な約 8.0Kb 断片のみが見出された（第 18 図）。

実施例 6. FUT8 対立遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞における抗体分子の発現

1. 抗 CD20 キメラ抗体発現ベクターの作製

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

WO94/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の VL のアミノ酸配列をコードする cDNA(配列番号 17)を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、WO94/11026 記載の VL の塩基配列の 5'末端と 3'末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列（ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む）を付加した。設計した塩基配列を 5'末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする）、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 19、20、21、22、23、および 24 の 6 本の合成 DNA を作製(GENSET 社製へ委託)した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1μM となる様に、50μL の反応液[KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マ

グネシウム、0.5μM M13 primer M4（宝酒造社製）、0.5μM M13 primer RV（宝酒造社製）]に添加し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer 社製）を用いて、94℃にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase（東洋紡績社製）を添加し、94℃にて 30 秒間、55℃にて 30 秒間、74℃にて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行ない、更に 72℃にて 10 分間反応させた。該反応液 25μL をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 0.44kb の VL の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-)（Stratagene 社製）を制限酵素 Sma I（宝酒造社製）して得られた DNA0.1μg と、上記で得られた PCR 産物約 0.1μg を滅菌水に加えて 7.5μL とし、TAKARA ligation kit ver.2 の solution I（宝酒造社製）7.5μL、制限酵素 Sma I（宝酒造社製）0.3μL を加えて 22℃で 2 時間反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0（Applied Biosystems 社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 19 図に示したプラスミド pBS-2B8L を得た。

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

WO94/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の VH のアミノ酸配列をコードする cDNA（配列番号 18）を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、WO94/11026 記載の VH の塩基配列の 5'末端と 3'末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列（ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む）を付加した。設計した塩基配列を 5'末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする）、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 25、26、27、28、29、および 30 の 6 本の合成 DNA を作製(GENSET 社製へ委託)した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1μM となる様に、50μL の反応液[KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5μM M13 primer M4（宝酒造社製）、0.5μM M13 primer RV（宝

酒造社製）]に添加し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer 社製）を用いて、94℃にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase（東洋紡績社製）を添加し、94℃にて 30 秒間、55℃にて 30 秒間、74℃にて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行い、更に 72℃にて 10 分間反応させた。該反応液 25μL をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 0.49kb の VH の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-)（Stratagene 社製）を制限酵素 Sma I（宝酒造社製）して得られた DNA0.1μg と、上記で得られた PCR 産物約 0.1μg を滅菌水に加えて 7.5μL とし、TAKARA ligation kit ver.2 の solution I（宝酒造社製）7.5μL、 制限酵素 Sma I（宝酒造社製）0.3μL を加えて 22℃で一晩反応させた。

この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0（Applied Biosystems 社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。 こうして目的の塩基配列を有する第 20 図に示したプラスミド pBS-2B8H を得た。

次に、14 番目のアミノ酸残基を Ala から Pro へ置換するために、配列番号 31 で示した合成 DNA を設計し、LA PCR in vitro Mutagenesis Primer Set for pBluescriptII（宝酒造社製）を用いた PCR 法により、以下の様に塩基の置換を行った。上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50μL の反応液[LA PCR Buffer II(宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T3 BcaBEST Sequencing primer（宝酒造社製）、50nM 上記の変異導入用プライマー（配列番号 31、GENSET 社製）]を調製し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer 社製）を用いて、94℃にて 30 秒間、55℃にて 2 分間、72℃にて 1 分 30 秒間のサイクルを 25 サイクル行なった。該反応液 30μL をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 0.44kb の PCR 産物を回収し、30μL の水溶液とした。また、同様に、上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50μL の反応液[LA PCR Buffer II(宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T7 BcaBEST Sequencing primer（宝酒造社製）、50nM MUT B1 primer(宝酒造社製)]の PCR 反応を行った。該反応液 30μL をアガロースゲル電気

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

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

上記で得られた PCR 産物由来の KpnI-SacI 断片とプラスミド pBluescriptII SK(-)由来の KpnI-SacI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。

こうして目的の塩基配列を有する第 20 図に示したプラスミド pBS-2B8Hm を得た。

(3) 抗 CD20 ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035, 2000) と本項 (1) および (2) で得られたプラスミド pBS-2B8L および pBS-2B8Hm を用いて抗

CD20 ヒト型キメラ抗体(以下、抗 CD20 キメラ抗体と表記する)の発現ベクター pKANTEX2B8P を以下の様にして構築した。

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

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

次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8L 由来 BsiWI-EcoRI 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の BsiWI-EcoRI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、第 21 図に示したプラスミド pKANTEX2B8-L を得た。

次に、本項 (2) で得られたプラスミド pBS-2B8Hm の 2μg を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を用いて 37℃で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて 37℃で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.45kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

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

次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8Hm 由来の ApaI-NotI 断片とプラスミド pKANTEX2B8-L 由来の ApaI-NotI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製した。

得られたプラスミドを用い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を同社の DNA シークエンサー377 を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされている第 21 図に示したプラスミド pKANTEX2B8P が得られたことを確認した。

2. 抗CD20キメラ抗体の発現

実施例5第3項で作製したFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンWK704に対し、本実施例第1項で得た抗CD20抗体発現ベクターpKANTEX2B8Pを導入した。

プラスミドpKANTEX2B8PのWK704への遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミドpKANTEX2B8P 10μgをNEBuffer 4(New England Biolabs社製) 100μlに溶解し、40単位の制限酵素AatII(New England Biolabs社製)を加えて37℃で2時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを1μg/μl水溶液とした。一方、WK704をK-PBS緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して8×10^7個/mlとした。細胞懸濁液200μl (1.6×10^6個)を上記線状化プラスミド4μl (4μg)と混和した後、細胞－DNA混和液の全量をGene Pulser Cuvette(電極間距離2mm)(BIO-RAD社製)へ移し、細胞融合装置Gene Pulser(BIO-RAD社製)を用いてパルス電圧350V、電気容量250μFの条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を10%ウシ胎児血清(Invitrogen社製)および1倍濃度のHT supplement (Invitrogen社製)を添加したIMDM培地(Invitrogen社製)に懸濁し、接着細胞培養用T75フラスコ(Greiner社製)へ播種した。5% CO_2、37℃の条件下で24時間培養した後、培養上清を除去し、10%ウシ胎児透析血清(Invitrogen社製)を添加したIMDM培地(Invitrogen社製) 10mlを注入した。この培地交換作業を3～4日毎に繰り返しながら15日間の培養を行い、形質転換株WK704-2B8Pを取得した。なお、WK704-2B8P株はWK704-2B8Pの株名で、平成15年3月20日付けで独立法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地中央第6)にFERM BP-8337として寄託されている。

3. 抗ガングリオシドGD3キメラ抗体の発現

実施例5第3項で作製したFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンWK704に対し、抗ガングリオシドGD3キメラ抗体発現ベクタープラスミドpKANTEX641を導入し、抗GD3キメラ抗体の安定的発現株を作製した。pKANTEX641は、WO00/61739記載の抗GD3キメラ抗体発現ベクタープラスミドpChi641LHGM4およびヒト化抗体発

現用ベクターpKANTEX93［モレキュラー・イムノロジー（Mol. Immunol.），37, 1035 （2000）］より構成された誘導体であり、pChi641LHGM4 より得たタンデム型抗体発現ユニットを含む EcoRI-HindIII 断片を pKANTEX93 より得た複製起点を含む EcoRI-HindIII 断片へ連結したものである。

プラスミド pKANTEX641 の WK704 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKANTEX641 10μg を NEBuffer 4(New England Biolabs 社製) 100μl に溶解し、40 単位の制限酵素 AatII(New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、WK704 を K-PBS 緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して 8×10^7個/ml とした。細胞懸濁液 200μl（1.6×10^6個）を上記線状化プラスミド 4μl（4μg）と混和した後、細胞－DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette(電極間距離 2mm)(BIO-RAD 社製）へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser(BIO-RAD 社製）を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清（Invitrogen 社製）および 1 倍濃度の HT supplement（Invitrogen 社製）を添加した IMDM 培地（Invitrogen 社製）に懸濁し、接着細胞培養用 T75 フラスコ（Greiner 社製）へ播種した。5% CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清（Invitrogen 社製）を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) 10ml を注入した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、形質転換株 WK704-2871 を取得した。なお、WK704-2871 株は WK704-2871 の株名で、平成 15 年 3 月 20 日付けで独立法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地中央第 6）に FERM BP-8336 として寄託されている。

4. 抗 CCR4 キメラ抗体の発現

実施例 5 第 3 項で作製した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704 に対し、WO01/64754 記載の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 を導入し、抗 CCR4 キメラ抗体の安定的発現株を作製した。

プラスミド pKANTEX2B8P の WK704 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKANTEX2160 15μg を NEBuffer 4(New England Biolabs 社製) 100μl に溶解し、40 単位の制限酵素 AatII(New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、WK704 を K-PBS 緩衝液［137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$］に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) を上記線状化プラスミド 4μl (4μg) と混和した後、細胞－DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette(電極間距離 2mm)(BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser(BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) へ播種した。5% CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) 10ml を注入した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、形質転換株 WK704-2760 を取得した。なお、WK704-2760 株は WK704-2760 の株名で、平成 15 年 3 月 20 日付けで独立法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地中央第 6) に FERM BP-8335 として寄託されている。

5. 抗体分子の精製

本実施例第 2 項で得た抗 CD20 抗体発現株 WK704-2B8P を、10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地(Invitrogen 社製) へ 3×10^5 個/ml の密度で懸濁後、接着細胞培養用 T182 フラスコ (Greiner 社製) 10 本へ計 300ml 播種した。同様にして、本実施例第 3 項で得た抗 GD3 抗体発現株 WK704-2871 および本実施例第 4 項で得た抗 CCR4 抗体発現株 WK704-2760 を播種した。3 日間の培養後、各株の上清全量を除去し、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) へ交換した。これらを 37℃の 5% CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養後、各細胞懸濁液を回収した。回収した各細胞懸濁液に対し 3000rpm、4℃の条件で 10 分間の遠心

分離を行って上清を回収した後、0.22μm 孔径 500ml 容 PES Membrane（旭テクノグラス社製）を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Mab Select(Amersham Pharmacia Biotech 社製) 0.5ml を充填し、精製水 3.0ml および 0.2mol/l ホウ酸－0.15mol/l NaCl 緩衝液（pH7.5）3.0ml を順次通筒した。さらに、0.1mol/l クエン酸緩衝液（pH3.5）2.0ml および 0.2mol/l ホウ酸－0.15mol/l NaCl 緩衝液（pH7.5）1.5ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清 300ml をカラムに通筒した後、0.2mol/l ホウ酸－0.15mol/l NaCl 緩衝液（pH7.5）3.0ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液（pH3.5）1.25ml を用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。初めに溶出する 250μl の画分を廃棄し、次に得られる溶出画分 1ml を回収して 2mol/l Tris-HCl(pH8.5) 200μl と混合して中和した。取得した溶出液に対し、10mol/l クエン酸－0.15mol/l NaCl 緩衝液（pH6.0）を用いて 4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22μm 孔径 Millex GV（MILLIPORE 社製）を用いて滅菌濾過した。

実施例 7. FUT8 対立遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞が産生する抗体組成物の in vitro 細胞障害活性（ADCC 活性）

実施例 6 で精製した抗 CD20 抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下の記述に従い ADCC 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS(10) 培地(FCS を 10%含む RPMI1640 培地(GIBCO BRL 社製))で培養したヒト B リンパ球培養細胞株 Raji 細胞(JCRB9012)を遠心分離操作および懸濁により RPMI1640-FCS(5)培地（FCS を 5%含む RPMI1640 培地(GIBCO BRL 社製)）で洗浄した後、RPMI1640-FCS(5) 培地によって、2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（AXIS SHIELD 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20 分間）して単核球層を分離した。RPMI1640-FCS(5)

培地で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて 4×10^6 細胞/mL の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の 50μL (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したエフェクター細胞溶液を 50μL (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CD20 キメラ抗体を各最終濃度 0.3～3000ng/mL となるように加えて全量を 150μL とし、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性を、CytoTox96 NoN-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) を用いて測定した。標的細胞自然遊離 LDH 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。全標的細胞破壊にともなう全遊離 LDH 量は、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了 45 分前に 15μL の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。これらの値を用いて下式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

$$\text{ADCC 活性(\%)} = \frac{\text{(検体上清中の LDH 量)} - \text{(自然遊離 LDH 量)}}{\text{(全遊離 LDH 量)} - \text{(自然遊離 LDH 量)}} \times 100 \quad \text{(II)}$$

第 22 図に各抗 CD20 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704-2B8P より得た抗体は、いずれの抗体濃度においても市販 Rituxan™ より高い ADCC 活性を示し、最高細胞障害活性値も高かった。Rituxan™ は、FUT8 遺伝子が破壊されていない CHO 細胞を宿主細胞として製造された抗 CD20 キメラ抗体である。また、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704-2871 株、WK704-2760 株より得たそれぞれの抗体に関して ADCC 活性を測定したところ、抗 CD20 抗体の場合と同様に、FUT8 遺伝子が破壊されてない通常の CHO 細胞株が産生する抗体に比べて高い細胞障害活性を示した。以上の結果より、FUT8 対立遺伝子を破壊した宿主細胞を用いることにより、FUT8 遺伝子が破壊されていない宿

主細胞を用いた場合より、細胞障害活性の高い抗体の生産が可能となることが分かった。

実施例 8. FUT8 対立遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞が産生する抗体組成物の糖鎖解析

実施例 6 で取得した、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンが生産した抗 CD20 抗体、抗 GD3 抗体および抗 CCR4 抗体の糖鎖解析を実施例 2. (4) に記載の方法に従って行った。また、これら抗体の糖鎖の組成に関して単糖組成分析を、公知の方法［ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(Journal of Liquid Chromatography), 6, 1577, (1983)］に従って行った。その結果、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704 より得たいずれの抗体においても、フコースを含有する糖鎖構造は確認されなかった。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 対立遺伝子を破壊することにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する機能を完全に欠失させることが可能であることを明らかとなった。

参考例 CHO 細胞 FUT8 遺伝子の取得

(1) CHO 細胞 FUT8 cDNA 配列の取得

WO00/61739 の実施例 8 (1) の記載に基づき、培養 2 日目の CHO/DG44 細胞より調製した一本鎖 cDNA より、以下の手順でチャイニーズハムスターFUT8 cDNA を取得した（第 23 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列（GenBank, AB025198）より、5'側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー（配列番号 7 に示す）および 3'側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー（配列番号 8 に示す)を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、前述の CHO/DG44 細胞由来 cDNA 1μl を含む 25μl の反応液［ExTaq buffer（宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4%DMSO、0.5μmol/l 上記特異的プライマー（配列番号 7 および配列番号 8)］を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 2Kb を精製した。この DNA 断片 4μl を、TOPO TA cloning Kit（Invitrogen 社製）の

説明書に従ってプラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 8 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入 cDNA が、CHO 細胞 FUT8 の ORF 全長を含む配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを CHfFUT8-pCR2.1 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号 4 に示した。

(2) CHO 細胞 FUT8 ゲノム配列の取得

本項 (1) で取得した CHO 細胞 FUT8 ORF 全長 cDNA 断片をプローブとして用い、CHO-K1 細胞由来λ-ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE 社製) よりモレキュラー・クローニング第 2 版、 カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2 nd Ed. (1989) 等に記載の公知のゲノムスクリーニングの方法に従い CHO 細胞 FUT8 ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、 CHO 細胞 FUT8 cDNA の開始コドンを含む AfaI-Sau3AI 断片 (約 280bp) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうち XbaI-XbaI 断片 (約 2.5Kb) および SacI-SacI 断片 (約 6.5Kb) を選択して pBluescriptII KS(+) (Strategene 社製) へ各々挿入した。

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む上流イントロン約 2.5Kb の配列を、SacI-SacI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む下流イントロン約 6.5Kb の配列を各々コードすることを確認した。以下、XbaI-XbaI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-2、SacI-SacI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-4 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域の塩基配列 (約 9.0Kb) を配列番号 3 に示した。

産業上の利用可能性

本発明は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該細胞を用いて作製されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、該製造方法により製造された抗体組成物および抗体組成物を含有する医薬を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 7－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 8－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 9－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 10－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 11－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 12－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 13－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 14－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 15－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 16－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 19－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 20－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 21－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 22－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 23－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 24－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 25－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 26－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 27－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 28－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 29－人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 30－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 31－人工配列の説明：合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株細胞よりも低下または欠失するようにゲノムが改変された細胞。

2. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた、請求の範囲 1 記載の細胞。

3. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた請求の範囲 1 または 2 に記載の細胞。

4. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、α1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 1～3 のいずれか 1 項に記載の細胞。

5. α1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 4 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

6. α1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)および (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 4 に記載の細胞。

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(d) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

7. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 1～6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

8. 少なくとも、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲 7 記載の細胞。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

9. 細胞が、下記の (a)～(j) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

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

(c) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞；

(j) 植物細胞。

10. 抗体分子をコードする遺伝子を含む請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の細胞。

11. 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲 10 に記載の細胞。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

12. 抗体分子のクラスがIgGである、請求の範囲10または11に記載の細胞。

13. 親株細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する能力を有する、請求の範囲1～12のいずれか1項に記載の細胞。

14. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、請求の範囲13に記載の細胞。

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

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

17. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、請求の範囲13～16いずれか1項に記載の細胞。

18. 請求の範囲10～17のいずれか1項に記載の細胞を用いること特徴とする、抗体組成物を製造する方法。

19. 請求の範囲10～18のいずれか1項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

20. 抗体組成物が親株細胞が生産する抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲18または19に記載の方法。

21. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-ア

セチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物より高いことを特徴とする、請求の範囲 20 に記載の方法。

22. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、請求の範囲 21 に記載の方法。

23. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物である、請求の範囲 20～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

24. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、請求の範囲 20～23 いずれか 1 項に記載の方法。

25. 請求の範囲 1～9 のいずれかに記載の細胞を用いて作製された、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

26. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルおよびウサギからなる群から選ばれる動物である、請求の範囲 24 に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

27. 抗体分子をコードする遺伝子を導入した請求の範囲 25 または 26 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

28. 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲 27 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)の Fc 領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)の Fc 領域を有する融合蛋白質。

29. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 27 または 28 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

30. 請求の範囲 27～29 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体組成物を含む組織あるいは体液を取得し、該組織あるいは体液から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

31. 請求の範囲 26～29 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫の抗体生産細胞を取得し、取得した抗体生産細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

32. 抗体組成物が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物である、請求の範囲 30 または 31 に記載の方法。

33. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物より高いことを特徴とする、請求の範囲 32 に記載の方法。

34. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、請求の範囲 33 に記載の方法。

35. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物である、請求の範囲 32～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

36. 抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物が、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合している糖鎖を有しない抗体組成物である、請求の範囲 32～35 いずれか 1 項に記載の方法。

37. N-グリコシド結合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、該抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグリコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体組成物。

38. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、請求の範囲 37 記載の抗体組成物。

39. 請求の範囲 18～24 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

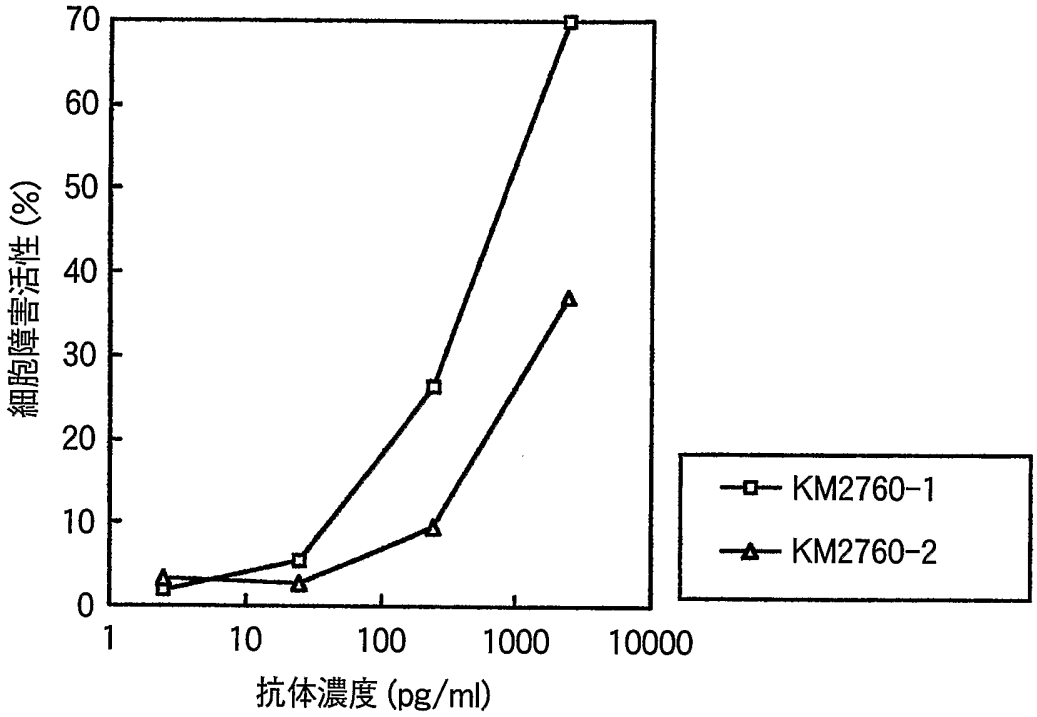
40. 請求の範囲 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

41. 請求の範囲 37～40 のいずれか 1 項に記載の記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

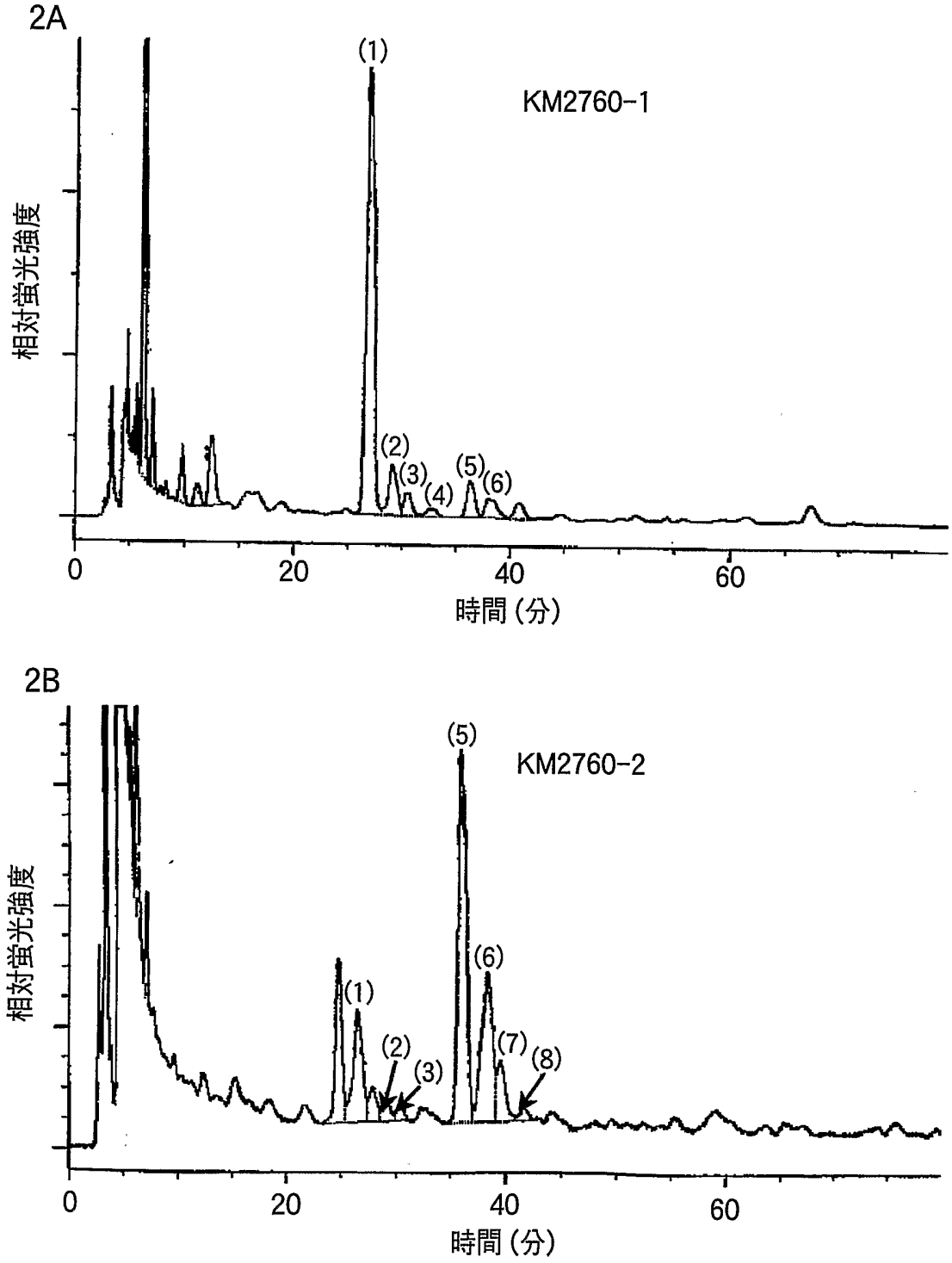
42. 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、請求の範囲 41 に記載の医薬。

43. 請求の範囲 41 または 42 に記載の医薬を製造するための、請求の範囲 37～40 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の使用。

第1図

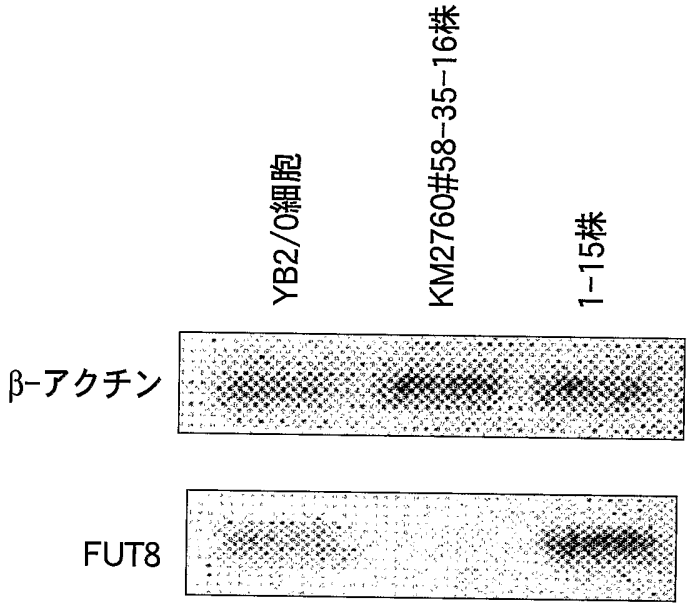

70
60
50
40
30
20
10
0
細胞障害活性 (%)
1
10
100
1000
10000
抗体濃度 (pg/ml)
KM2760-1
KM2760-2

第2図

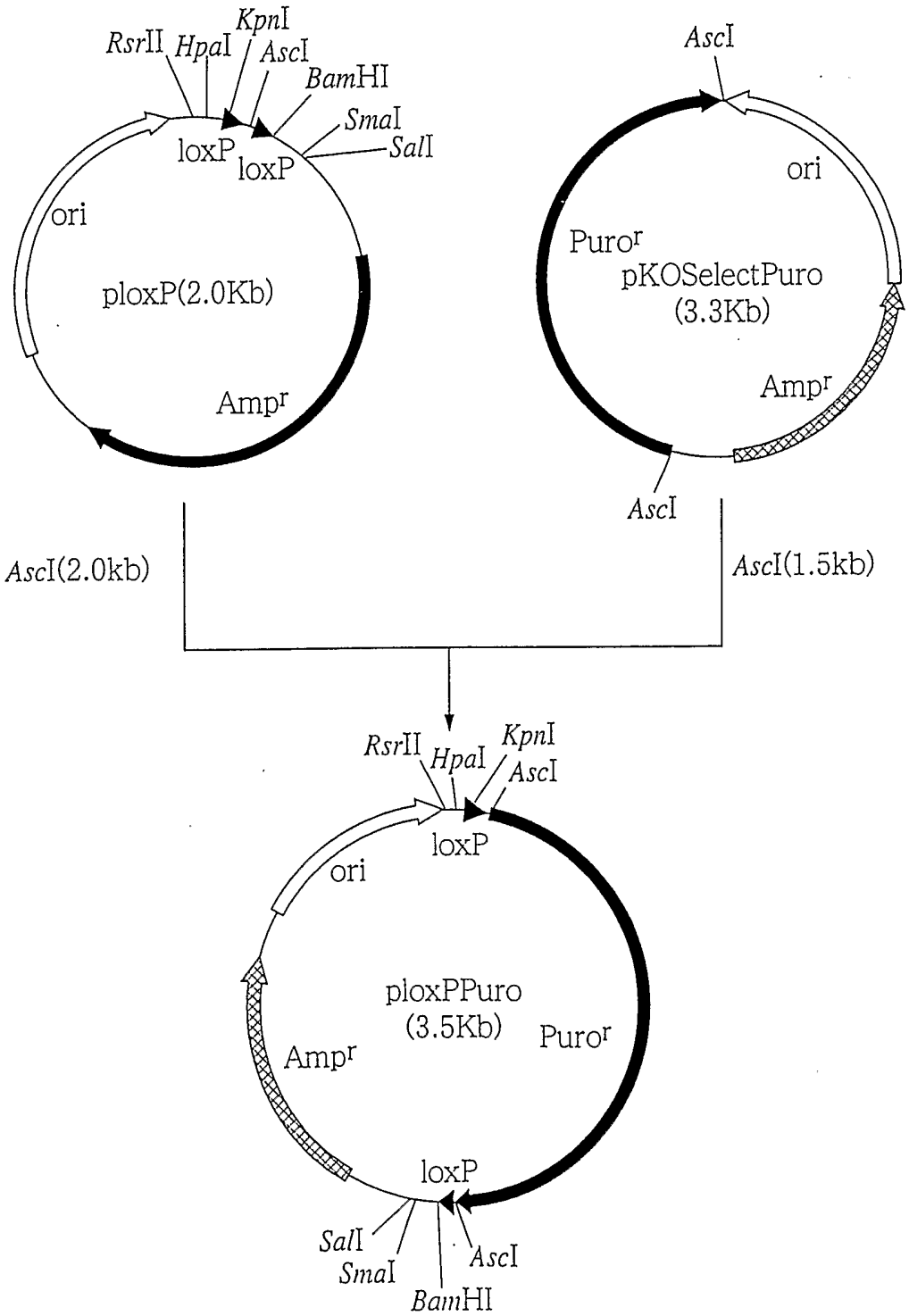


差替え用紙(規則26)

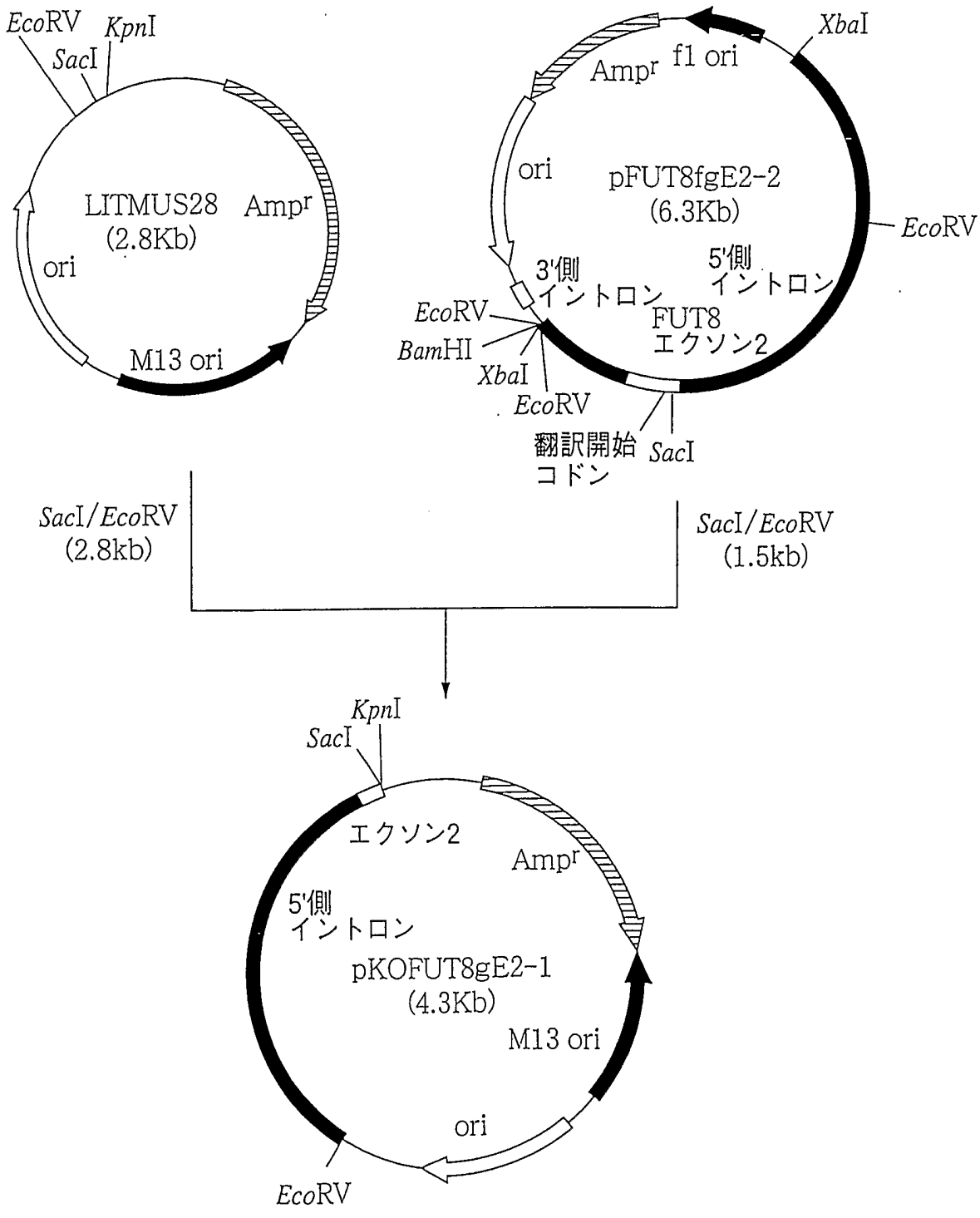
第3図



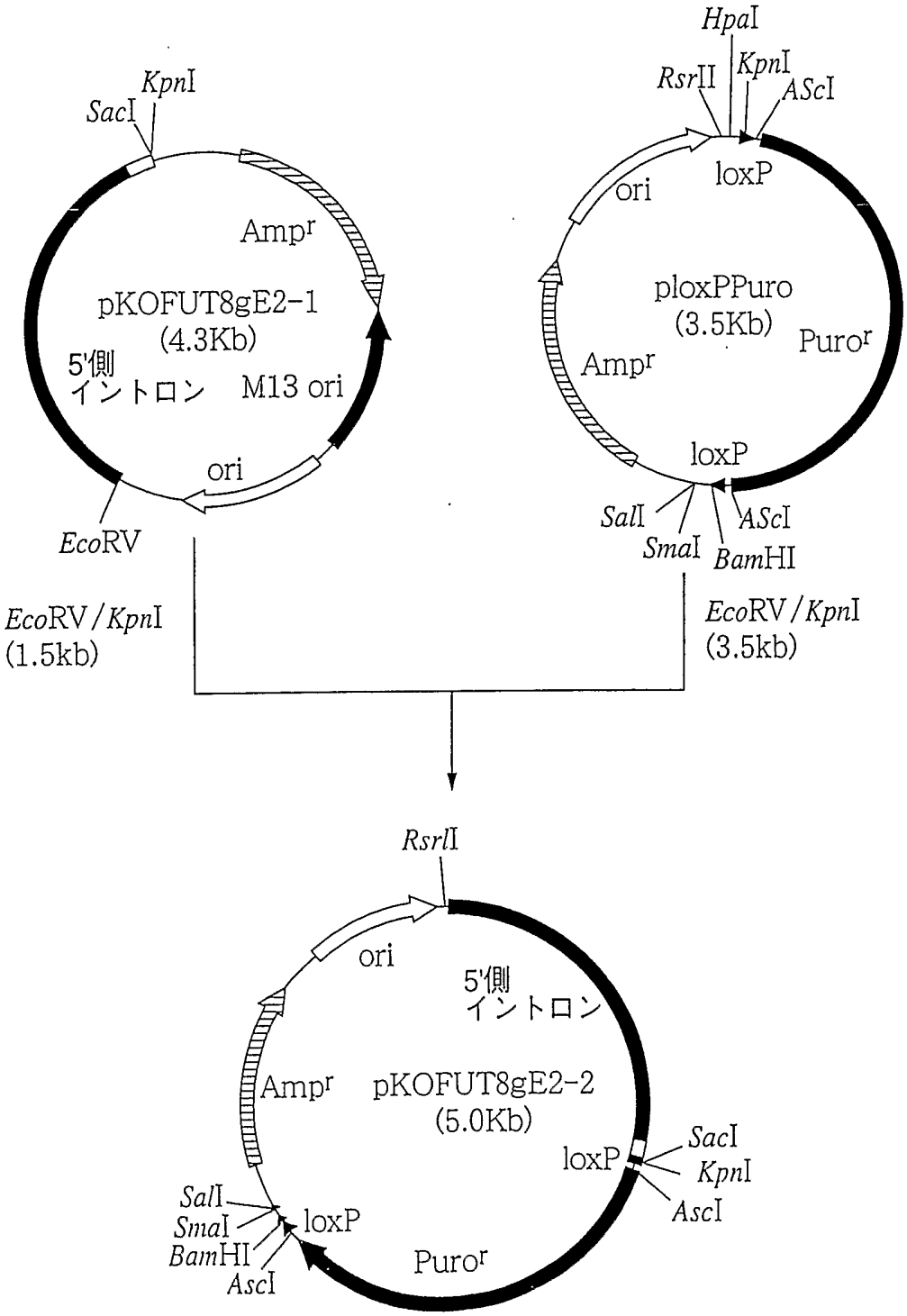
第４図


RsrII
HpaI
KpnI
AscI
BamHI
SmaI
SalI
loxP
loxP
ori
ploxP(2.0Kb)
Ampr
AscI
ori
Puror
pKOSelectPuro
(3.3Kb)
Ampr
AscI
AscI(2.0kb)
AscI(1.5kb)
RsrII
HpaI
KpnI
AscI
loxP
ori
ploxPPuro
(3.5Kb)
Puror
Ampr
loxP
SalI
SmaI
BamHI
AscI

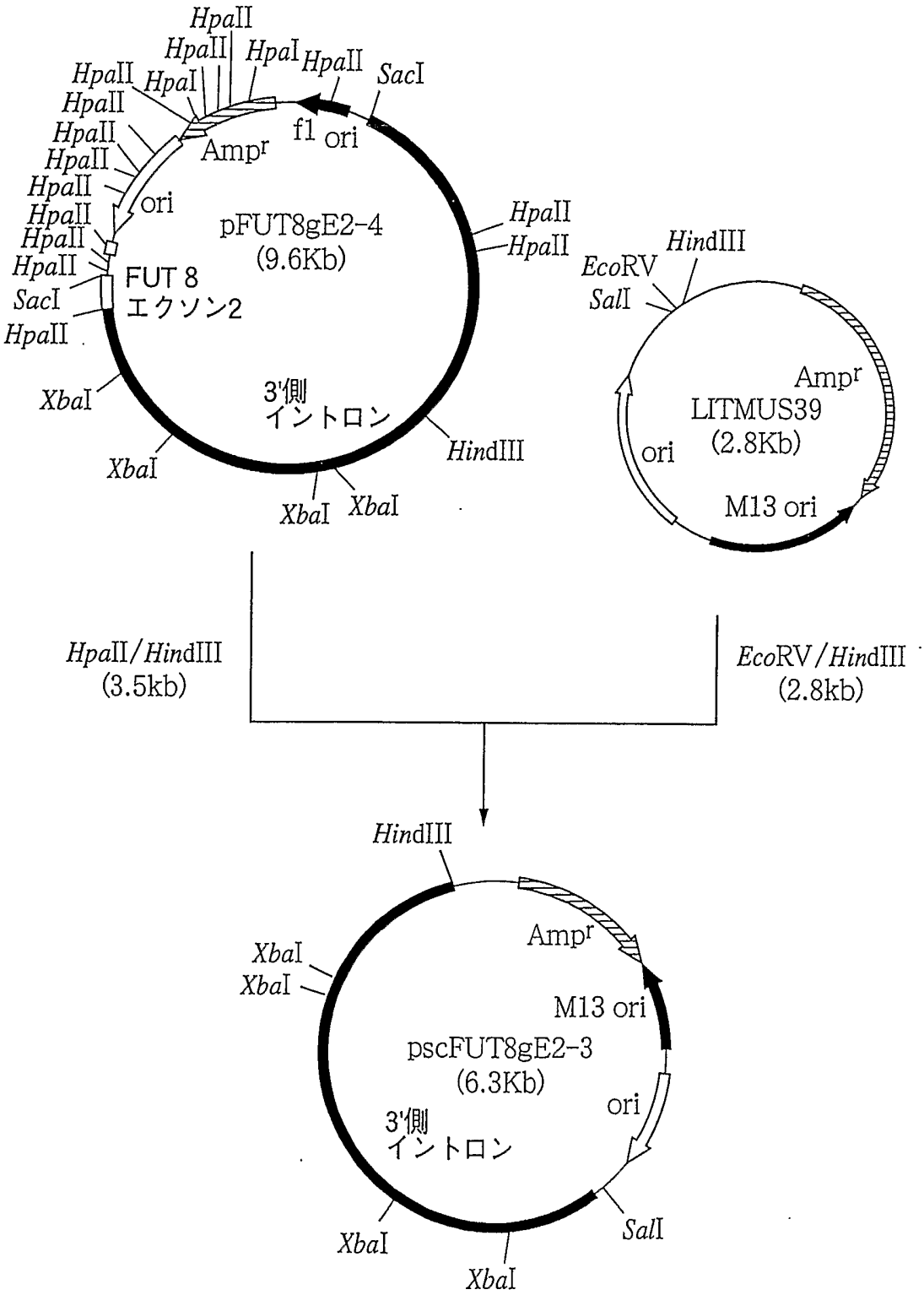
第５図


EcoRV
KpnI
SacI
LITMUS28
(2.8Kb)
Ampr
ori
M13 ori
XbaI
Ampr
f1 ori
ori
pFUT8fgE2-2
(6.3Kb)
EcoRV
3'側
イントロン
5'側
イントロン
FUT8
エクソン2
EcoRV
BamHI
XbaI
EcoRV
翻訳開始
コドン
SacI
SacI/EcoRV
(2.8kb)
SacI/EcoRV
(1.5kb)
KpnI
SacI
エクソン2
Ampr
5'側
イントロン
pKOFUT8gE2-1
(4.3Kb)
M13 ori
ori
EcoRV

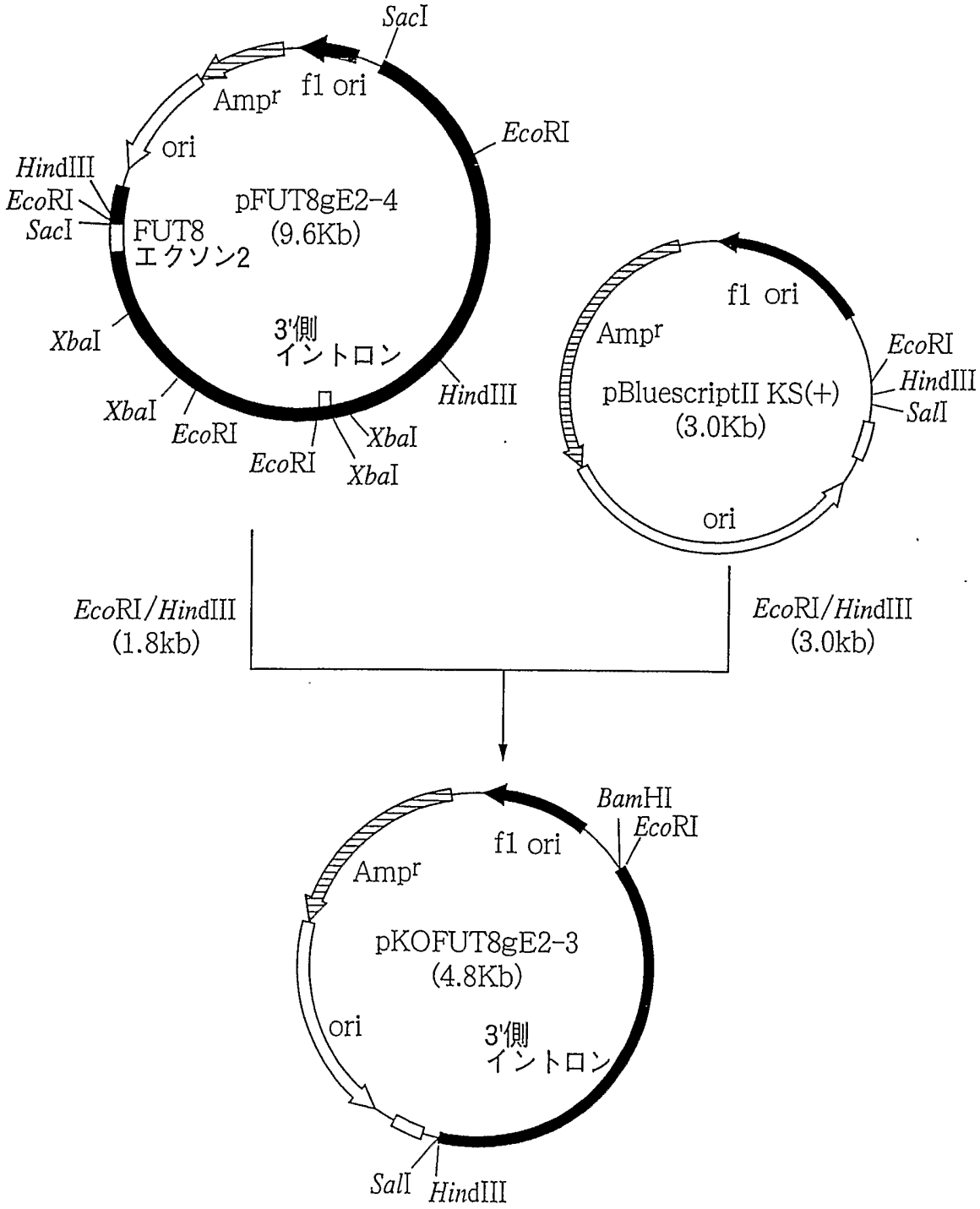
第６図


HpaI
RsrII
KpnI
AScI
loxP
ori
ploxPPuro
(3.5Kb)
Puror
Ampr
loxP
SalI
SmaI
BamHI
AScI
KpnI
SacI
Ampr
pKOFUT8gE2-1
(4.3Kb)
5'側
イントロン
M13 ori
ori
EcoRV
EcoRV/KpnI
(1.5kb)
EcoRV/KpnI
(3.5kb)
RsrII
ori
5'側
イントロン
Ampr
pKOFUT8gE2-2
(5.0Kb)
loxP
SacI
KpnI
AscI
SalI
SmaI
BamHI
AscI
loxP
Puror

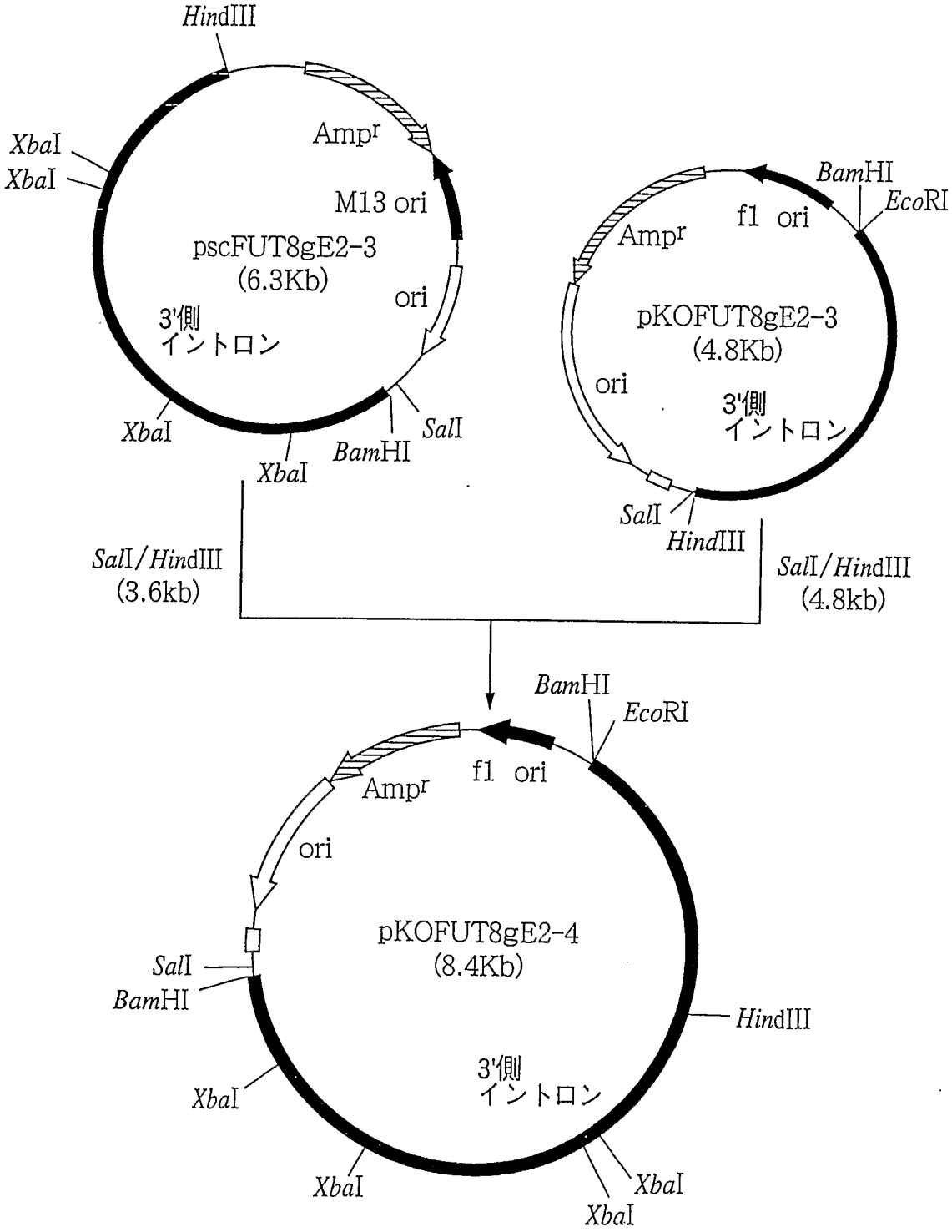
第７図


HpaII
HpaII
HpaI
HpaII
SacI
HpaII
HpaI
HpaII
HpaII
HpaII
HpaII
HpaII
HpaII
HpaII
SacI
HpaII
XbaI
XbaI
XbaI
XbaI
HindIII
HpaII
HpaII
f1 ori
Ampr
ori
pFUT8gE2-4
(9.6Kb)
FUT 8
エクソン2
3'側
イントロン
HindIII
EcoRV
SalI
Ampr
LITMUS39
(2.8Kb)
ori
M13 ori
HpaII/HindIII
(3.5kb)
EcoRV/HindIII
(2.8kb)
HindIII
XbaI
XbaI
Ampr
M13 ori
pscFUT8gE2-3
(6.3Kb)
ori
3'側
イントロン
XbaI
XbaI
SalI

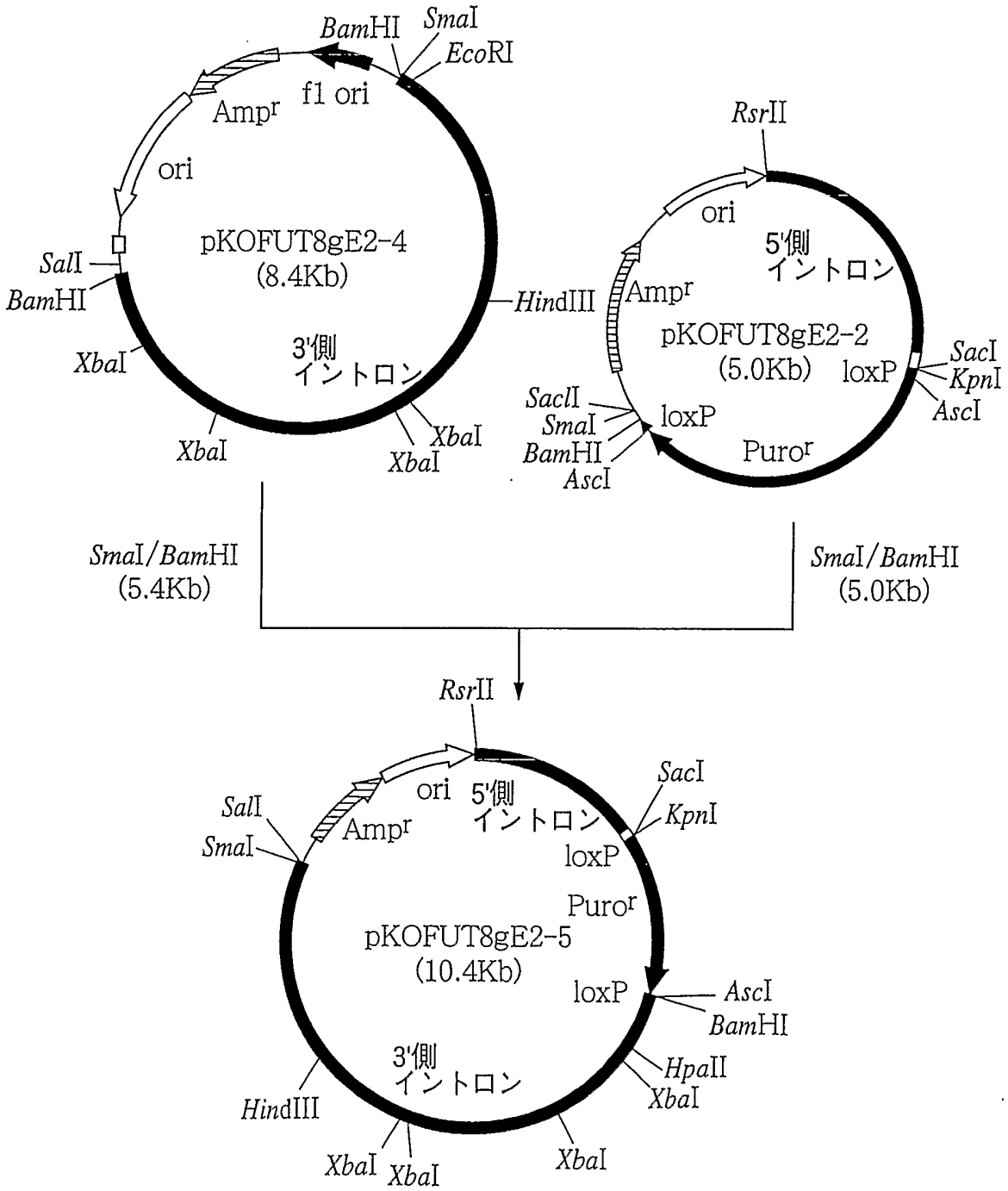
第８図


SacI
f1 ori
Ampr
EcoRI
ori
HindIII
EcoRI
SacI
pFUT8gE2-4
(9.6Kb)
FUT8
エクソン2
XbaI
3'側
イントロン
HindIII
XbaI
EcoRI
EcoRI
XbaI
f1 ori
Ampr
EcoRI
HindIII
SalI
pBluescriptII KS(+)
(3.0Kb)
ori
EcoRI/HindIII
(1.8kb)
EcoRI/HindIII
(3.0kb)
BamHI
EcoRI
f1 ori
Ampr
pKOFUT8gE2-3
(4.8Kb)
ori
3'側
イントロン
SalI
HindIII

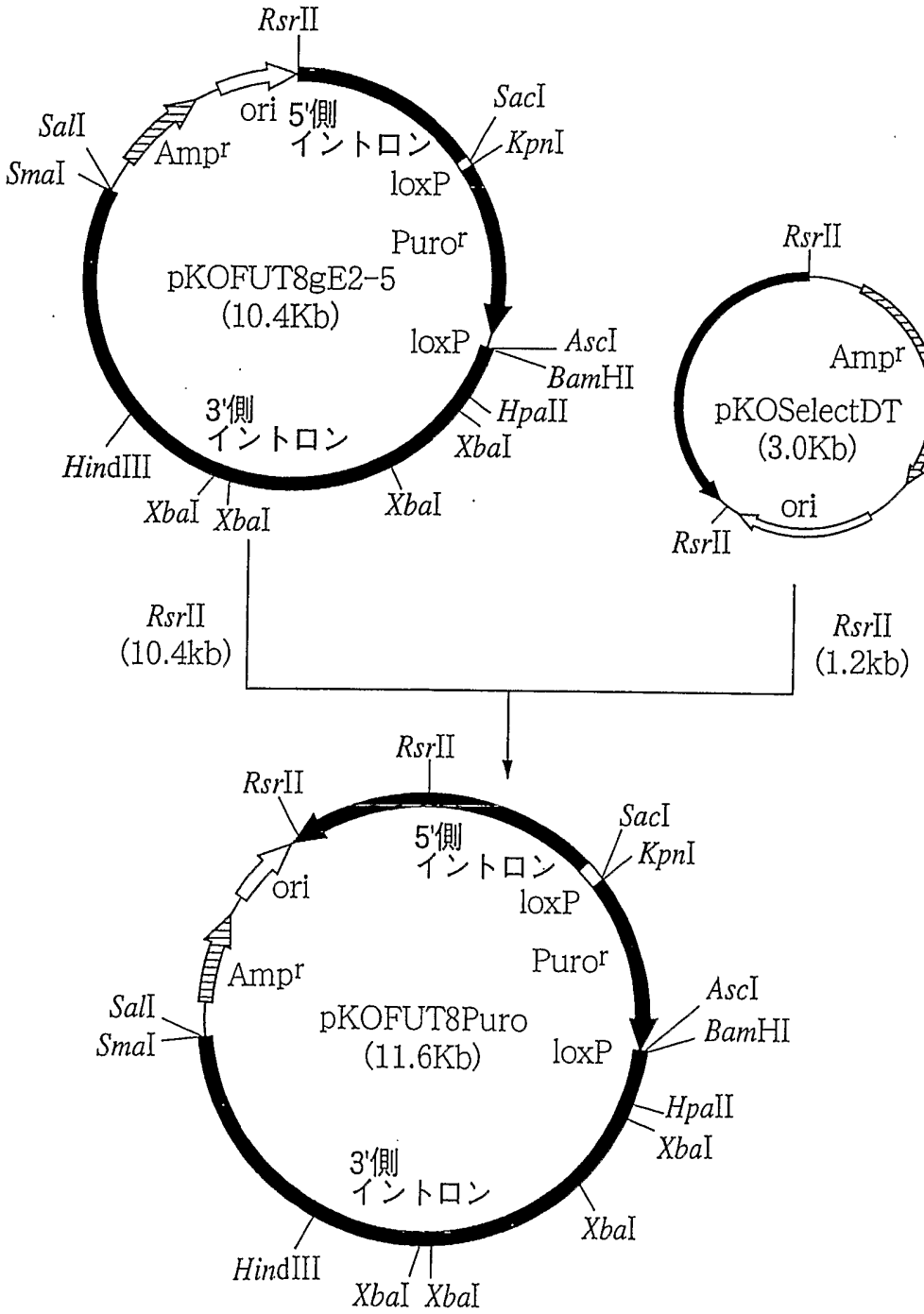
第９図


HindIII
XbaI
XbaI
Ampr
M13 ori
pscFUT8gE2-3
(6.3Kb)
ori
3'側
イントロン
XbaI
BamHI
SalI
XbaI
BamHI
EcoRI
f1 ori
Ampr
pKOFUT8gE2-3
(4.8Kb)
ori
3'側
イントロン
SalI
HindIII
SalI/HindIII
(3.6kb)
SalI/HindIII
(4.8kb)
BamHI
EcoRI
f1 ori
Ampr
ori
pKOFUT8gE2-4
(8.4Kb)
SalI
BamHI
HindIII
3'側
イントロン
XbaI
XbaI
XbaI

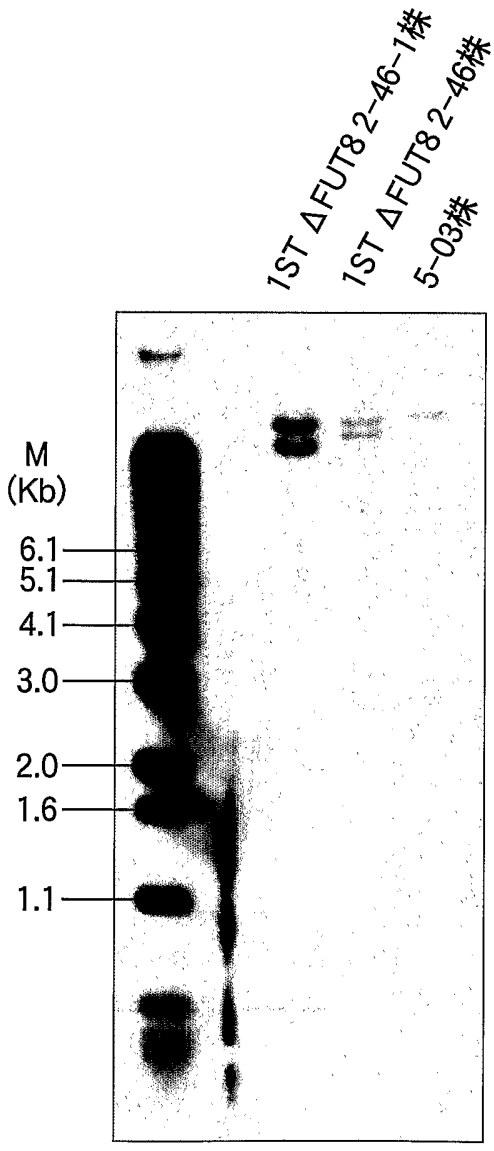
第１０図


BamHI
SmaI
EcoRI
f1 ori
Ampr
ori
pKOFUT8gE2-4
(8.4Kb)
SalI
BamHI
XbaI
3'側
イントロン
HindIII
XbaI
XbaI
RsrII
ori
5'側
イントロン
Ampr
pKOFUT8gE2-2
(5.0Kb)
loxP
SacI
KpnI
AscI
SacII
SmaI
BamHI
AscI
loxP
Puror
SmaI/BamHI
(5.4Kb)
SmaI/BamHI
(5.0Kb)
RsrII
ori
5'側
イントロン
SacI
KpnI
SalI
SmaI
Ampr
loxP
Puror
pKOFUT8gE2-5
(10.4Kb)
loxP
AscI
BamHI
3'側
イントロン
HpaII
XbaI
HindIII
XbaI
XbaI
XbaI

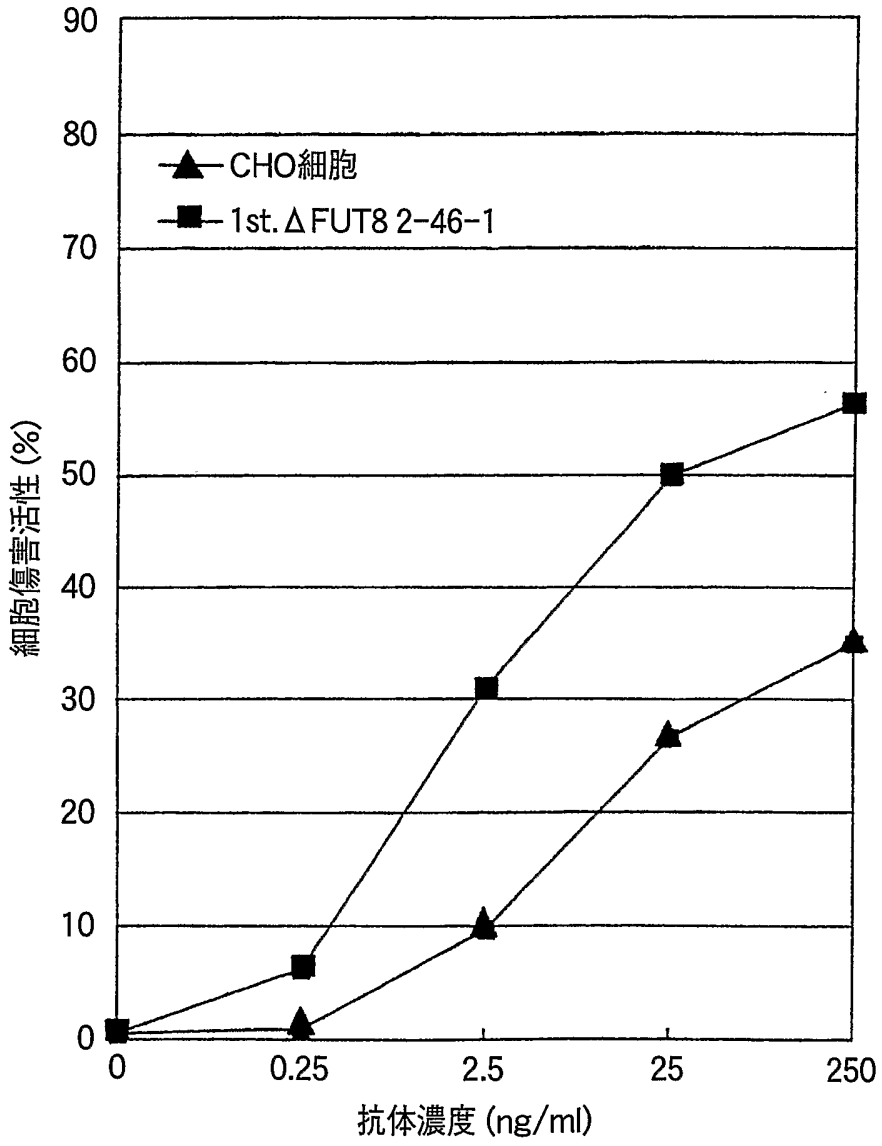
第１１図


RsrII
ori
5'側
イントロン
SacI
KpnI
SalI
SmaI
Ampr
loxP
Puror
pKOFUT8gE2-5
(10.4Kb)
loxP
AscI
BamHI
HpaII
XbaI
3'側
イントロン
HindIII
XbaI
XbaI
XbaI
RsrII
Ampr
pKOSelectDT
(3.0Kb)
ori
RsrII
RsrII
(10.4kb)
RsrII
(1.2kb)
RsrII
RsrII
5'側
イントロン
SacI
KpnI
ori
loxP
Puror
Ampr
SalI
SmaI
pKOFUT8Puro
(11.6Kb)
loxP
AscI
BamHI
HpaII
XbaI
3'側
イントロン
XbaI
HindIII
XbaI
XbaI

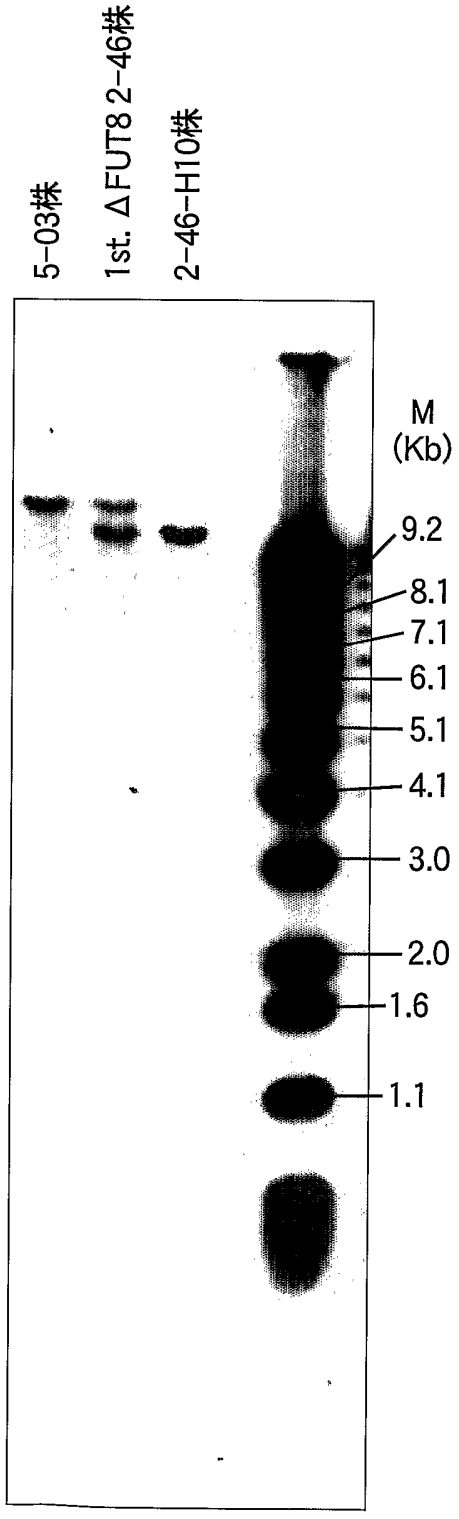
第１２図



第１３図

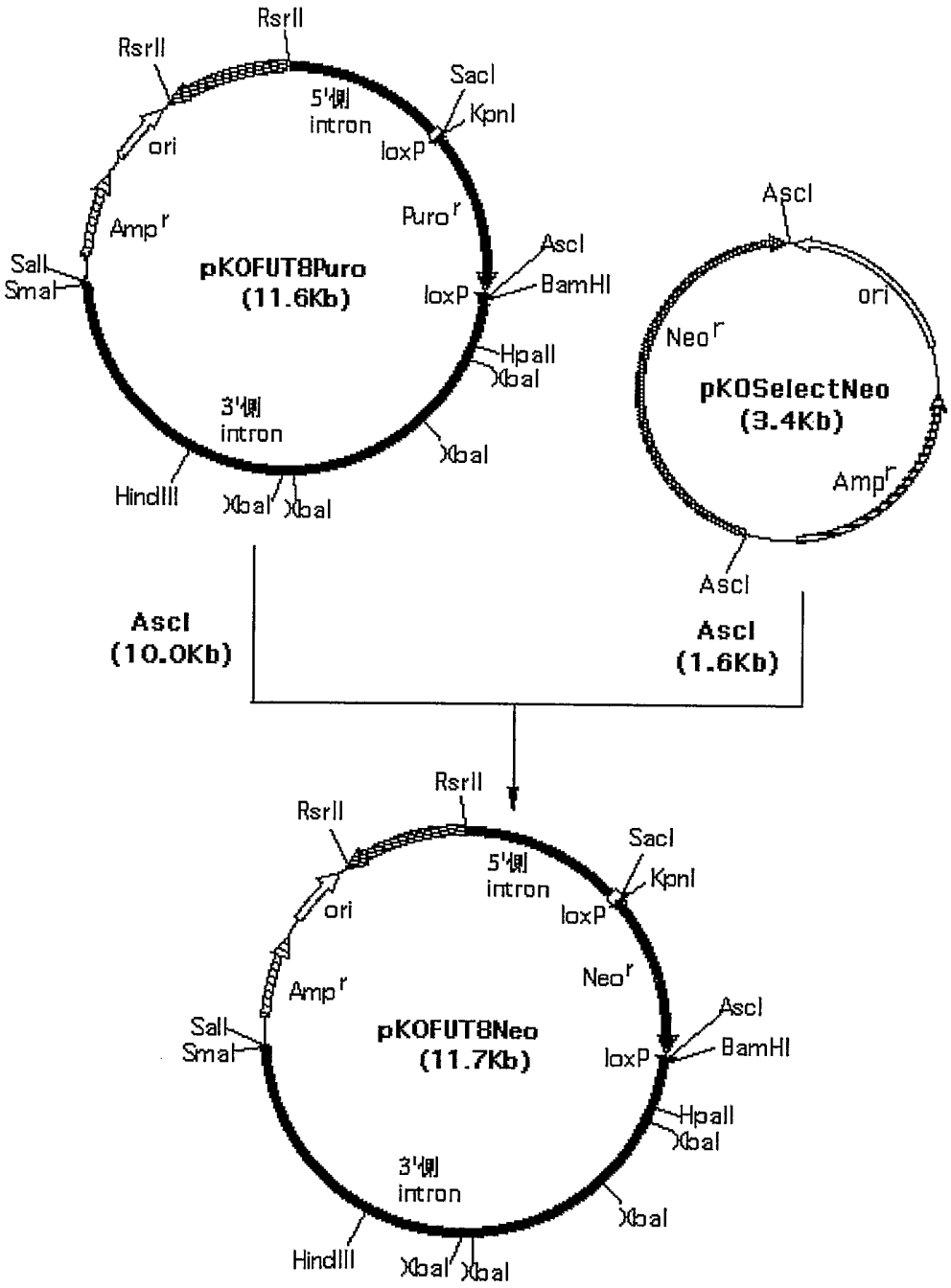

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CHO細胞
1st.ΔFUT8 2-46-1
細胞傷害活性 (%)
0
0.25
2.5
25
250
抗体濃度 (ng/ml)

第１４図

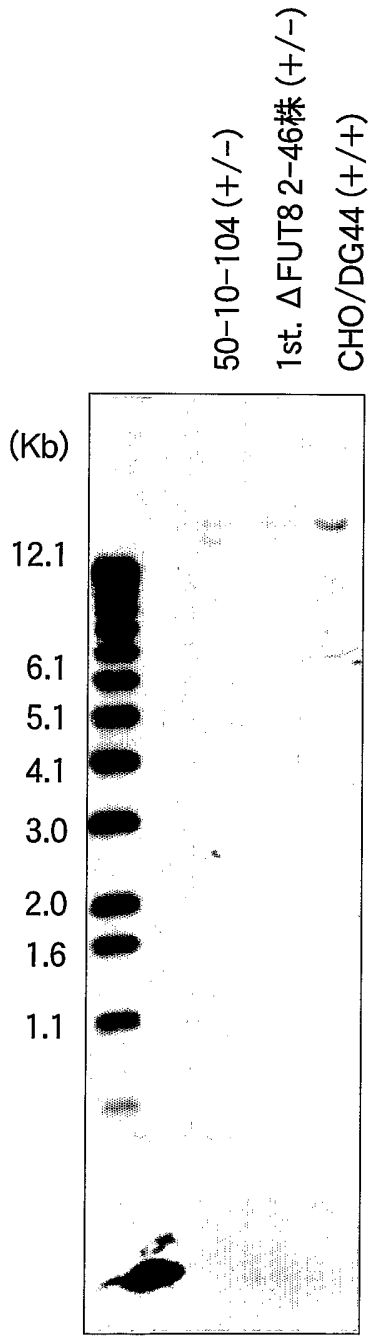


差替え用紙(規則26)

第１５図

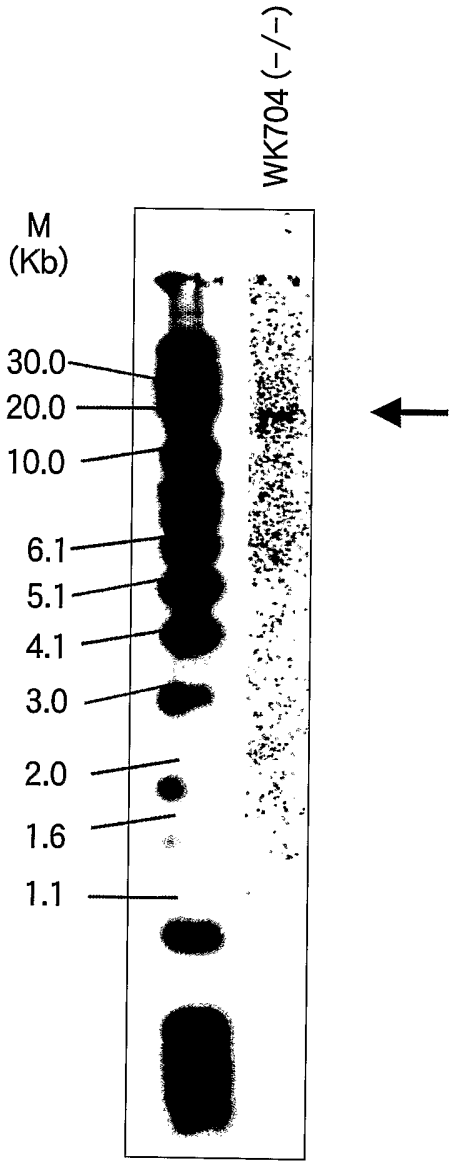

RsrII
RsrII
SacI
5'側
intron
KpnI
ori
loxP
Amp r
Puro r
AscI
SalI
SmaI
pKOFUT8Puro
(11.6Kb)
loxP
BamHI
HpaII
XbaI
3'側
intron
XbaI
HindIII
XbaI
XbaI
AscI
ori
Neo r
pKOSelectNeo
(3.4Kb)
Amp r
AscI
AscI
(10.0Kb)
AscI
(1.6Kb)
RsrII
RsrII
SacI
5'側
intron
KpnI
ori
loxP
Amp r
Neo r
AscI
SalI
SmaI
pKOFUT8Neo
(11.7Kb)
loxP
BamHI
HpaII
XbaI
3'側
intron
XbaI
HindIII
XbaI
XbaI

第16図

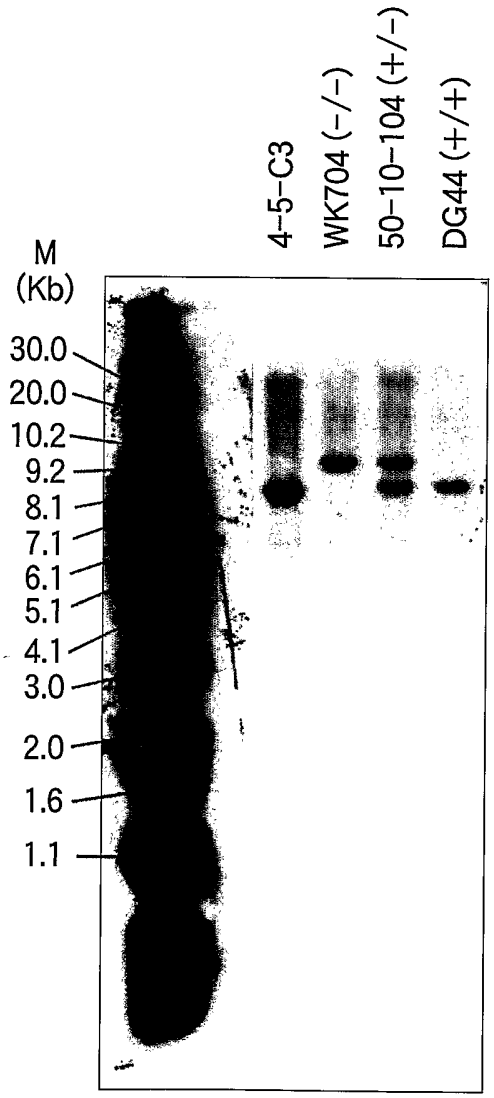


差替え用紙(規則26)

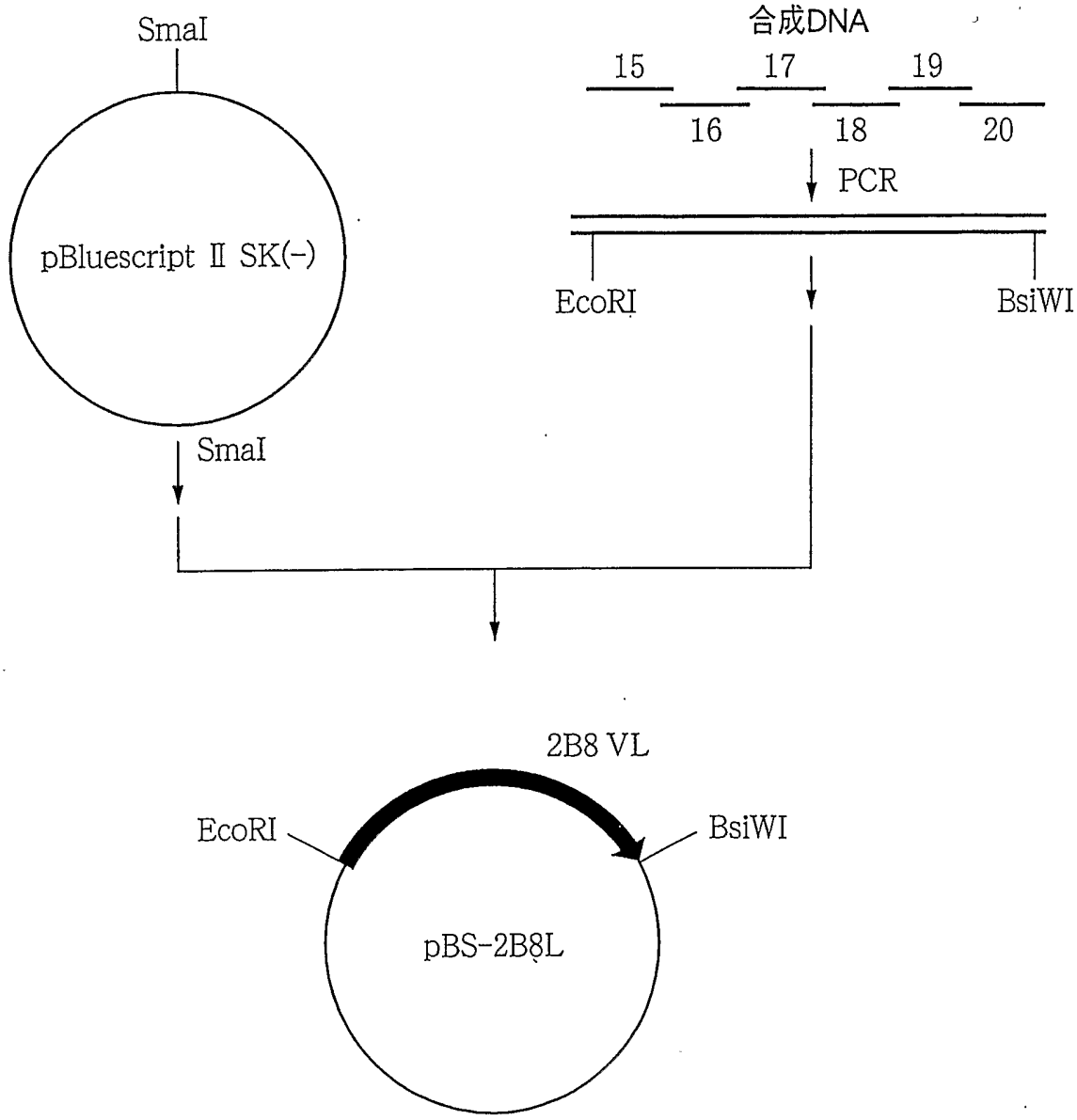
第１７図



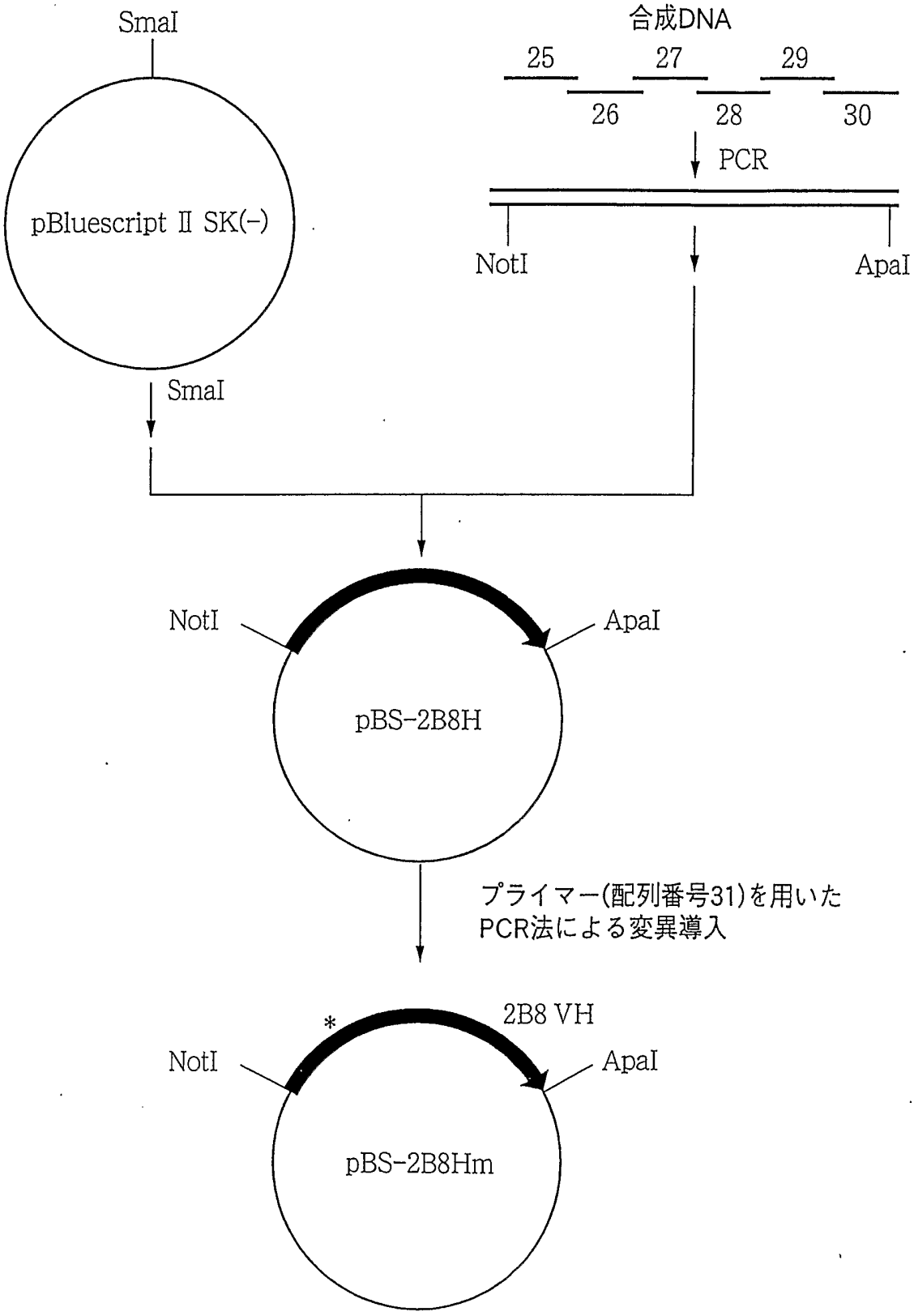
第１８図


4-5-C3
WK704 (-/-)
50-10-104 (+/-)
DG44 (+/+)
M
(Kb)
30.0
20.0
10.2
9.2
8.1
7.1
6.1
5.1
4.1
3.0
2.0
1.6
1.1

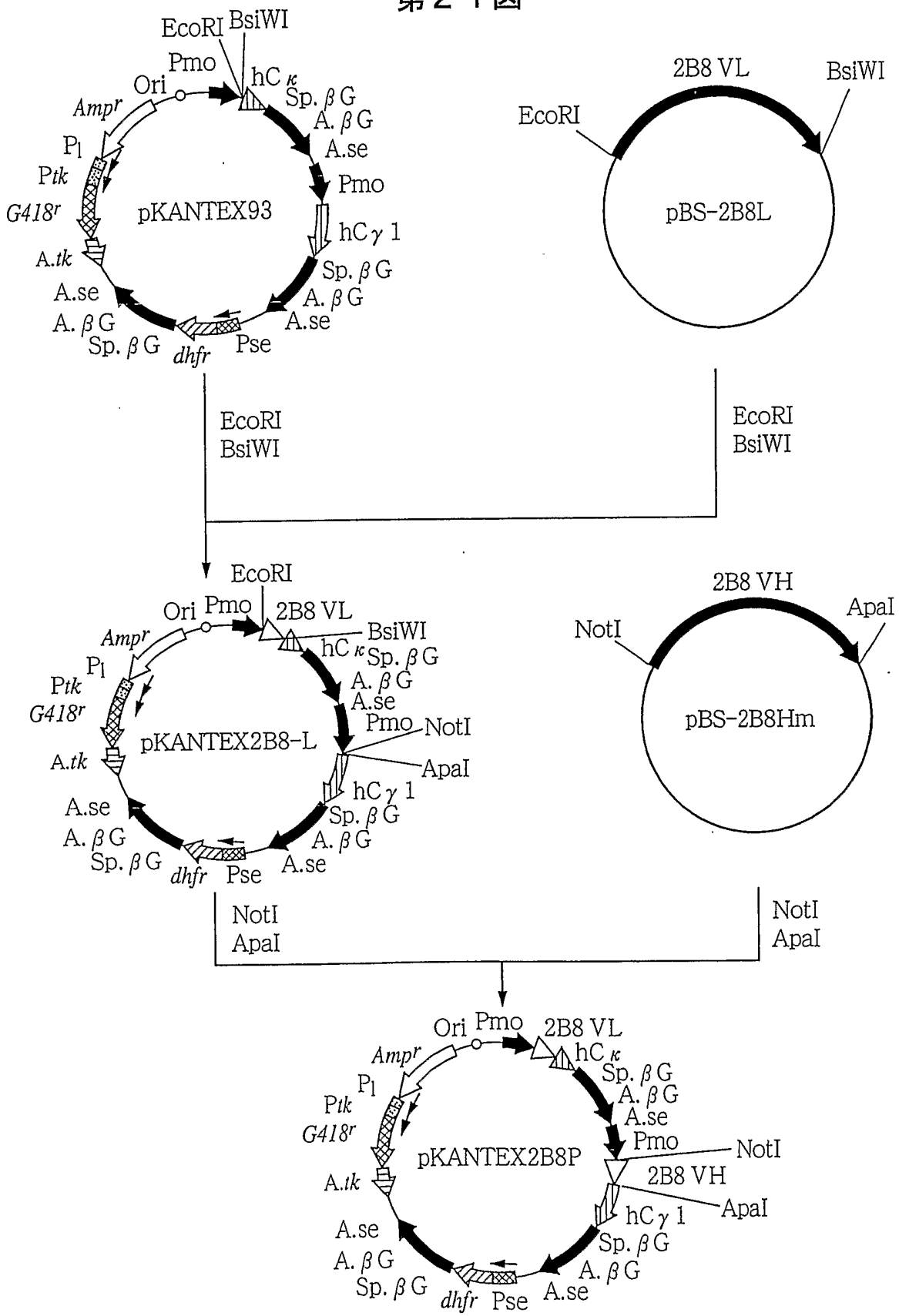
第１９図


SmaI
pBluescript II SK(-)
SmaI
合成DNA
15
17
19
16
18
20
PCR
EcoRI
BsiWI
2B8 VL
EcoRI
BsiWI
pBS-2B8L

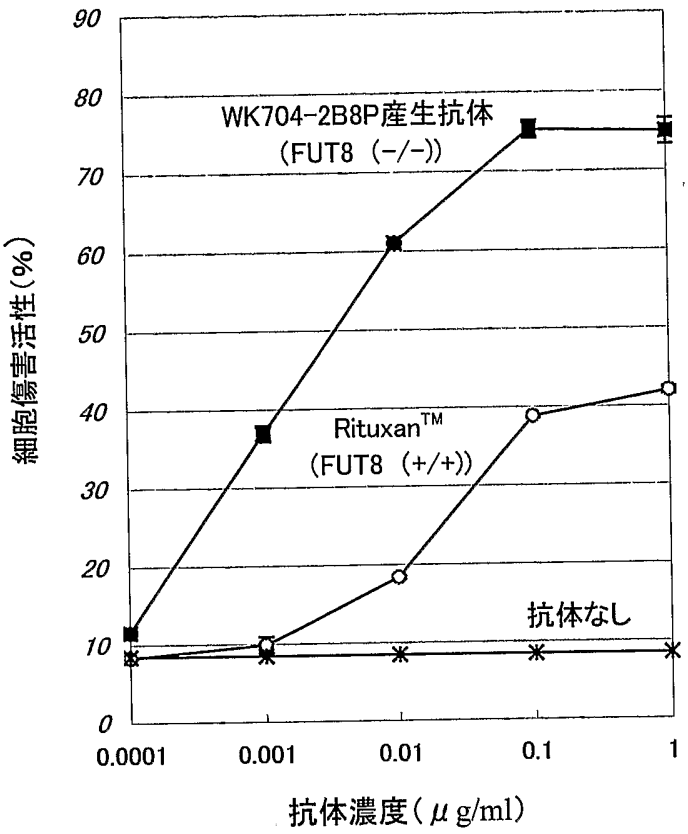
第２０図


SmaI
pBluescript II SK(-)
SmaI
合成DNA
25
27
29
26
28
30
PCR
NotI
ApaI
NotI
ApaI
pBS-2B8H
プライマー(配列番号31)を用いた
PCR法による変異導入
*
2B8 VH
NotI
ApaI
pBS-2B8Hm

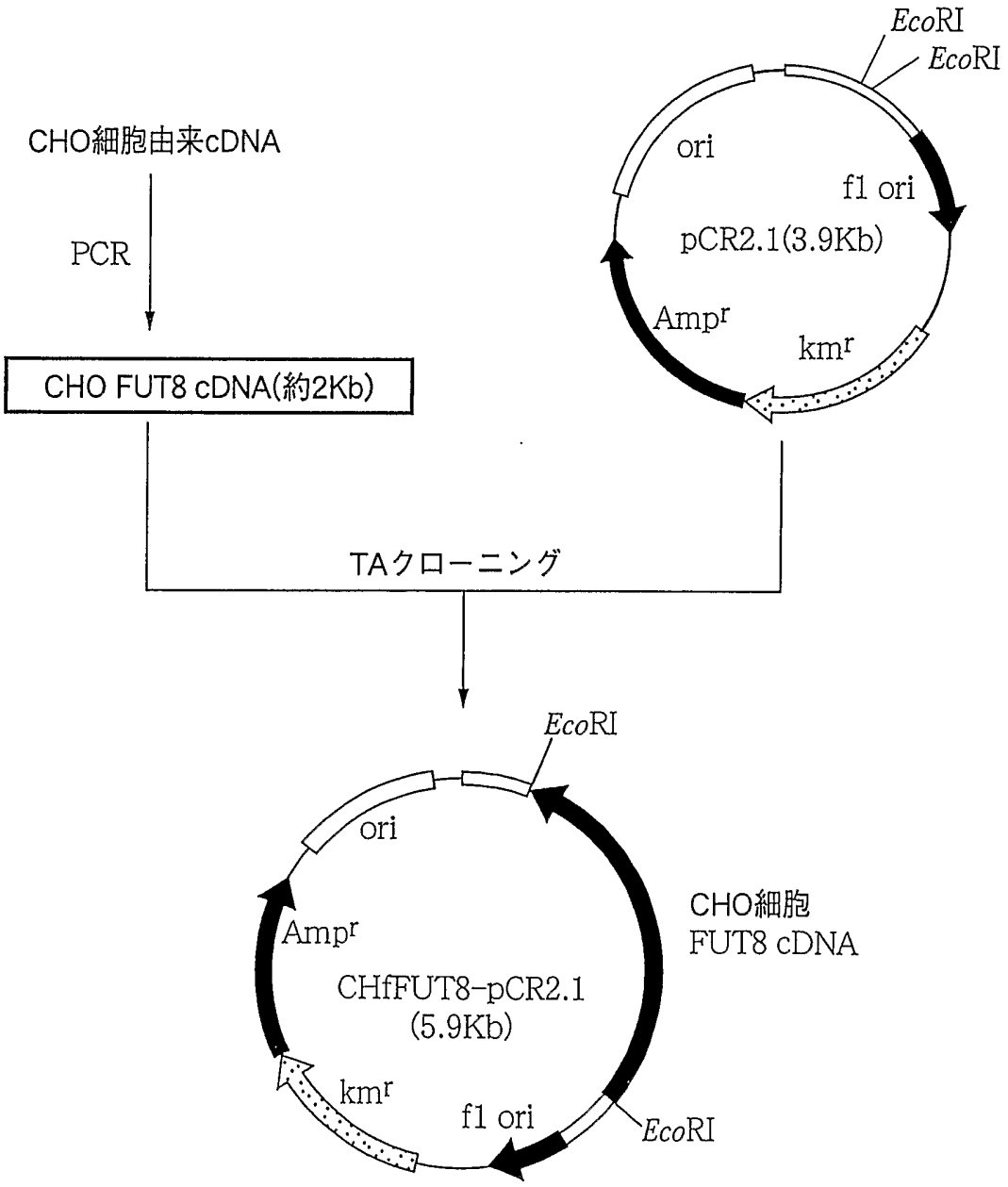
第２１図


EcoRI
BsiWI
Pmo
Ori
hC κ
Sp. β G
A. β G
A.se
Pmo
hC γ 1
Sp. β G
A. β G
A.se
Pse
dhfr
Sp. β G
A. β G
A.se
A.se
A.tk
G418r
Ptk
Pl
Ampr
pKANTEX93
2B8 VL
BsiWI
EcoRI
pBS-2B8L
EcoRI
BsiWI
EcoRI
BsiWI
EcoRI
Ori
Pmo
2B8 VL
BsiWI
hC κ
Sp. β G
A. β G
A.se
Pmo
NotI
ApaI
hC γ 1
Sp. β G
A. β G
A.se
Pse
dhfr
Sp. β G
A. β G
A.se
A.se
A.tk
G418r
Ptk
Pl
Ampr
pKANTEX2B8-L
2B8 VH
ApaI
NotI
pBS-2B8Hm
NotI
ApaI
NotI
ApaI
Ori
Pmo
2B8 VL
hC κ
Sp. β G
A. β G
A.se
Pmo
NotI
2B8 VH
ApaI
hC γ 1
Sp. β G
A. β G
A.se
Pse
dhfr
Sp. β G
A. β G
A.se
A.se
A.tk
G418r
Ptk
Pl
Ampr
pKANTEX2B8P

第２２図


90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
細胞傷害活性(%)
WK704-2B8P産生抗体
(FUT8 (-/-))
Rituxan™
(FUT8 (+/+))
抗体なし
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
抗体濃度(μg/ml)

第２３図


EcoRI
EcoRI
ori
f1 ori
pCR2.1(3.9Kb)
Ampr
kmr
CHO細胞由来cDNA
PCR
CHO FUT8 cDNA(約2Kb)
TAクローニング
EcoRI
ori
Ampr
CHfFUT8-pCR2.1
(5.9Kb)
kmr
f1 ori
EcoRI
CHO細胞
FUT8 cDNA

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Cells of which genome is modified

<130> P044080

<150> JP 2002-106953
<151> 2002-04-09

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2008
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 1
aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggctgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2
<211> 1728
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg 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 gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660

ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380
gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcatc ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca 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> Cricetulus griseus

<400> 3
tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgctg 60
ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120
atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctattt tgttatacat ttttgcgtaa 180
attattcttt tttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240
ttttgtctat gtatttgcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgctata taagttgtta 360
cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660

ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggt aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tcccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat ccccttttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt 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 tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcatc 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat 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 tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880

ttttttaaaag 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 gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcat cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcagc catttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgacccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttgtt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccagggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620
cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttccccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat tttaaggtga taatgtatga ttgcaaggtt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100

tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tggtctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagtttg atatctgtta 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 aaatcttgtt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaaggtgt ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggtatatat ttctatattc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgcccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300
ttctatattt tttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtgaa catattttca 6360
atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaatct tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac ccctttcaa aggtttcttt tctttttttt tttaagggac 6840
aacaagttta 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 tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccctg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320

aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tacttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgtattt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttatttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctcccct cctcccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca acccccttgtt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcatc tgcttccatc agctactgga 7980
tgagggctct aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggctttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100
acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tccctttctt 8160
tgctctcatc cgttcctccc ctgactagat cttcctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
tccccttctc cccttctctt tcttctaact ccctctcccc tccacccacg atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttggcta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatttag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460
ttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcatca tttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttatc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcaccat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060
caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagcaccc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4
<211> 575
<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 4

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> 5
<211> 575
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
225 230 235 240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
245 250 255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
260 265 270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
275 280 285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
290 295 300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
305 310 315 320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
325 330 335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
340 345 350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
385 390 395 400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
405 410 415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510
His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile

515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn

530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu

545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys

565 570 575

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys

1 5 10 15

Pro Cys

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 7
gtctgaagca ttatgtgttg aagc 24

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8
gtgagtacat tcattgtact gtg 23

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 9
ggtaggcctc actaactg 18

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 10
catagaaaca agtaacaaca gccag 25

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 11
gtgagtccat ggctgtcact g 21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 12
cctgacttgg ctattctcag 20

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 13
gagacttcag cccacttcaa ttattggc 28

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 14
gaggccactt gtgtagcgcc aagtg 25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 15
cttgtgtgac tcttaactct cagag 25

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 16
ccctcgagat aacttcgtat agc 23

<210> 17
<211> 384
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 17
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> 18
<211> 420
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 18
atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt 48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1 5 10 15
gtc ctg tcc cag gta caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30
cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

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

<210> 19
<211> 91
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 19
caggaaacag ctatgacgaa ttcgcctcct caaaatggat tttcaggtgc agattatcag 60
cttcctgcta atcagtgctt cagtcataat g 91

<210> 20
<211> 91
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20
gtgaccttct cccctggaga tgcagacagg attgctggag actgggagag aacaatttgt 60
cctctggaca ttatgactga agcactgatt a 91

<210> 21
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 21
ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatccact 60
ggttccagca gaagccagga tcctccccca 90

<210> 22
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 22
ccagacccac tgccactgaa gcgaacaggg actccagaag ccaggttgga tgtggcataa 60
atccagggtt tgggggagga tcctggctt 89

<210> 23

<211> 91
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 23
tcagtggcag tgggtctggg acttcttact ctctcaccat cagcagagtg gaggctgaag 60
atgctgccac ttattactgc cagcagtgga c 91

<210> 24
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 24
gttttcccag tcacgaccgt acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgggt 60
gggttactag tccactgctg gcagtaataa 90

<210> 25
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 25
caggaaacag ctatgacgcg gccgcgaccc ctcaccatgg gttggagcct catcttgctc 60
ttccttgtcg ctgttgctac gcgtgtcctg tcccaggta 99

<210> 26
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 26
atgtgtagcc agaagccttg caggacatct tcactgaggc cccagccttc accagctcag 60
ccccaggctg ctgcagttgt acctgggaca ggacacgc 98

<210> 27
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 27
caaggcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac tgggtaaaac agacacctgg 60
tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccgga 97

<210> 28
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 28
gtaggctgtg ctggaggatt tgtctgcagt caatgtggcc ttgcctttga acttctgatt 60

gtaggaagta tcaccatttc cgggataaat agctccaat 99

<210> 29
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 29
aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct 60
attactgtgc aagatcgact tactacggcg gtgactggt 99

<210> 30
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 30
gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgcaga gacggtgacc gtggtccctg 60
cgccccagac attgaagtac cagtcaccgc cgtagtaa 98

<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

gagctggtga agcctggggc ctcag 25

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

91 頁、 19 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成13年（2001）9月26日	FERM BP－7755

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

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

EP

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
P044080	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

91 頁、 19 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成13年（2001）9月26日	FERM BP－7755

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

オーストラリア特許法施行規則3．25の規定に基づき、
本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

91 頁、 19 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成13年（2001）9月26日	FERM BP－7755

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

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

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

113 頁、 22 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称
独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）
日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8335

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

ヨーロッパ特許条約施行規則28（3）の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

EP

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 （02.05.03）
権限のある職員	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号 P044080	国際出願番号 PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

113 頁、 22 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称
独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）
日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8335

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

オーストラリア特許法施行規則3．25の規定に基づき、
本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木 孝子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号 P044080	国際出願番号 PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

113 頁、 22 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称
独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）
日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年(2003) 3月20日	FERM BP－8335

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

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

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木珍子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

112 頁、 26 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8336

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

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

EP

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木 [illegible]	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

112 頁、 26 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8336

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

オーストラリア特許法施行規則3．25の規定に基づき、
本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

112 頁、 26 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8336

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

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

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄

☑ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員　鈴木珠子

様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄

☑ この用紙が国際事務局に受理された日

02 MAY 2003 (02.05.03)

権限のある職員　中村由佳里

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

111 頁、 25 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8337

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

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

EP

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT／RO／134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号	P044080	国際出願番号	PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

111 頁、 25 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8337

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

オーストラリア特許法施行規則3．25の規定に基づき、
本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木 祐子	権限のある職員 中村 由香里

様式PCT／RO／134（1992年7月）

出願人又は代理人の書類記号 P044080	国際出願番号 PCT/JP03/04507

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

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

111 頁、 25 行

B．寄託の表示　　他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1　中央第6（郵便番号305－8566）

寄託の日付	受託番号
平成15年（2003）3月20日	FERM BP－8337

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

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

D．この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E．追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

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

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑ この用紙は国際出願とともに受理した	☑ この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 鈴木玲子	権限のある職員 中村由香里

様式PCT/RO/134（1992年7月）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/09, C12N15/10, C12P21/08, A01H5/00, A01K67/027, C07K16/00, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00, A61P9/00, A61P31/12, A61P31/04
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/09, C12N5/10, C12P21/08, A01H5/00, A01K67/027, C07K16/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1176195 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 30 January, 2002 (30.01.02), & WO 00/61739 A1 & AU 200036728 A & JP 2000-611663 A	1-4,7-43 5-6
Y	HAYASHI, H. et al., Molecular cloning of mouse alpha-1,6-fucosyltransferase and expression of its mRNA in the developing cerebrum, DNA Seq., 2000, Vol.11, No.1-2, pages 91 to 96	5-6
A	DOMINO, S.E. et al., Deficiency of reproductive tract alpha(1,2)fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha(1,2)fucosyltransferase locus, Mol.Cell Biol., 2001, Vol.21, No.24, pages 8336 to 8345	1-43

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 May, 2003 (06.05.03)	20 May, 2003 (20.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04507

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SHINKAWA, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J.Biol.Chem., 2003 Jan., Vol.278, No.5, pages 3466 to 3473	1-43

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０４５０７

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．　Ｃｌ．[7] C12N15/09, C12N5/10, C12P21/08, A01H5/00, A01K67/027, C07K16/00, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00, A61P9/00, A61P31/12, A61P31/04

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．　Ｃｌ．[7] C12N15/09, C12N5/10, C12P21/08, A01H5/00, A01K67/027, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X/Y	EP 1176195 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,LTD.) 2002.01.30 & WO 00/61739 A1 & AU 200036728 A & JP 2000-611663 A	1-4,7-43/5-6
Y	HAYASHI,H. et al., Molecular cloning of mouse alpha-1,6-fucosyltransferase and expression of its mRNA in the developing cerebrum, DNA Seq, 2000, Vol.11, No.1-2, p.91-96	5-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
０６．０５．０３

国際調査報告の発送日
20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）
七條　里美
４Ｂ　２９３６

電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP03／04507

C（続き）. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	DOMINO, S.E. et al., Deficiency of reproductive tract alpha (1,2)fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha(1,2) fucosyltransferase locus, Mol Cell Biol, 2001, Vol.21, No.24, p.8336-8345	1-43
PX	SHINKAWA, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J Biol Chem, 2003 Jan, Vol.278, No.5, p.3466-3473	1-43