



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 419**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/113** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03720896 .4**

96 Fecha de presentación : **09.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1500698**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54

Título: **Células con depresión o deleción de la actividad de la proteína que participa en el transporte de GDP-fucosa.**

30

Prioridad: **09.04.2002 JP 2002-106952**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.07.2011**

73

Titular/es: **KYOWA HAKKO KIRIN Co., Ltd.**  
**1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku**  
**Tokyo 100-8185, JP**

72

Inventor/es: **Kanda, Yutaka;**  
**Satoh, Mitsuo y**  
**Mori, Katsuhiko**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 419 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Células con Depresión o Delección de la Actividad de la Proteína que Participa en el Transporte de GDP-Fucosa

5

**Campo Técnico**

La presente invención se refiere a una célula en la cual la actividad de una proteína relacionada con el transporte de GDP-fucosa al aparato de Golgi está más reducida o suprimida que en su célula parental; a un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo utilizando la célula; a un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo a partir del animal o planta; y a un medicamento que comprende la composición de anticuerpo.

**Técnica Anterior**

En la región Fc de un anticuerpo de tipo IgG, se encuentran presentes dos sitios de unión de cadenas de azúcar unidas a N-glicósido. En la IgG del suero, al sitio de unión de la cadena de azúcar, generalmente, se une una cadena de azúcar de tipo complejo que tiene numerosas ramificaciones y en la cual la adición de ácido siálico o N-acetilglucosamina bisecante es baja. Se sabe que existe una variedad con respecto a la adición de galactosa al extremo no reductor de la cadena de azúcar de tipo complejo y la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor [Biochemistry, 36, 130 (1997)].

Se ha planteado que dicha estructura de una cadena de azúcar está determinada por una glicosiltransferasa que sintetiza una cadena de azúcar y una enzima glicolítica que hidroliza la cadena de azúcar.

La síntesis de una cadena de azúcar unida a N-glicósido se describe más abajo.

Las glicoproteínas están modificadas con una cadena de azúcar en el lumen del retículo endoplásmico (referido en adelante como "RE"). Durante la etapa de biosíntesis de la cadena de azúcar unida a N-glicósido, se transfiere una cadena de azúcar relativamente grande a la cadena del polipéptido que se está alargando en el lumen del RE. En la transformación, primero se añade la cadena de azúcar seguido de los grupos fosfato de un portador lipídico de cadena larga que comprende aproximadamente 20 unidades de  $\alpha$ -isopreno, lo que se denomina fosfato de dolicol (en adelante referido a veces como "P-Dol"). Esto es, la N-acetilglucosamina es transferida al fosfato de dolicol para formar de ese modo GlcNAc-P-P-Dol y después se transfiere un GlcNAc más para formar GlcNAc-GlcNAc-P-P-Dol. A continuación, se transfieren cinco manosas (referidas en adelante también como "Man") para formar de ese modo (Man)<sub>5</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>-P-P-Dol y después se transfieren cuatro Man y tres glucosas (también referidas en adelante como "Glc"). De este modo, se forma un precursor de la cadena de azúcar, (Glc)<sub>3</sub>-(Man)<sub>9</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>-P-P-Dol, denominado oligosacárido núcleo. El precursor de la cadena de azúcar que comprende 14 azúcares se transfiere en masa a un polipéptido que tiene una secuencia asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina en el lumen del RE. En la reacción, el pirofosfato de dolicol (P-P-Dol) unido al oligosacárido núcleo se libera pero de nuevo se convierte en fosfato de dolicol por medio de hidrólisis con pirofosfatasa y se recicla. El recorte de la cadena de azúcar se inicia inmediatamente después de que la cadena de azúcar se una al polipéptido. Esto es, se eliminan 3 Glc y 1 o 2 Man del RE, y se sabe que la  $\alpha$ -1,2-glucosidasa I, la  $\alpha$ -1,3-glucosidasa II y la  $\alpha$ -1,2-manosidasa están relacionadas con la eliminación.

Las glicoproteínas que se habían sometido a recorte en el RE se transfieren al aparato de Golgi y se modifican de diferentes maneras. En la porción *cis* del aparato de Golgi, se encuentran presentes la N-acetilglucosamina fosfotransferasa que está relacionada con la adición de manosa fosfato, la N-acetilglucosamina 1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa y la  $\alpha$ -manosidasa I y reducen los residuos de Man a 5. En la porción media del aparato de Golgi, se encuentran presentes la N-acetilglucosamina transferasa I (GnTI) que está relacionada con la adición de la primera GlcNAc fuera de la cadena de azúcar unida a N-glicósido de tipo complejo, la  $\alpha$ -manosidasa II que se relaciona con la eliminación de 2 Man, la N-acetilglucosamina transferasa II (GnTII) que se relaciona con la adición de la segunda GlcNAc del exterior y la  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa que se relaciona con la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina del extremo reductor. En la porción *trans* del aparato de Golgi, se encuentran presentes la galactosa transferasa que se relaciona con la adición de galactosa y la sialiltransferasa que se relaciona con la adición de ácido siálico tal como ácido N-acetilneuramínico. Se sabe que la cadena de azúcar unida a N-glicósido está formada por las actividades de estas diferentes enzimas.

Con respecto a la cadena de azúcar de un anticuerpo, Boyd *et al.* han examinado los efectos de una cadena de azúcar sobre la actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos (referida en adelante como "actividad CCDA") y la actividad citotóxica dependiente del complemento (en adelante referida como actividad "CDC") tratando un anticuerpo injertado con CDR humana CAMPATH-1H (subclase de IgG1 humana) producido por células de ovario de hámster Chino (células CHO) o un mieloma de ratón producido por células NS0 con diferentes enzimas hidrolizantes de azúcares, y han informado de que la eliminación del ácido siálico del extremo no reductor no influía en ninguna de las actividades, pero solamente la actividad CDC resultaba afectada por la eliminación adicional de residuos de galactosa y aproximadamente el 50% de la actividad disminuía, y que la eliminación

completa de la cadena de azúcar ocasionaba la desaparición de ambas actividades [Molecular Immunol., 32, 1311 (1995)]. Del mismo modo, Lifely *et al.* han analizado la cadena de azúcar unida a un anticuerpo injertado con CDR humana CAMPATH-1H (subclase de IgG1 humana) que había sido producido por células CHO, células NS0 o células YO de mieloma de rata, han medido su actividad CCDA, y han informado de que el CAMPATH-1H producido por células YO mostraba la actividad CCDA más alta, sugiriendo que la *N*-acetilglucosamina (referida en adelante a veces como "GlcNAc") en la posición bisecante es importante para la actividad [Glycobiology, 5, 813 (1995); documento WO 99/54342].

Además, con respecto a una cadena de azúcar de un anticuerpo, se ha informado de que la modificación por adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar unida a *N*-glicósido de un anticuerpo cambia enormemente la actividad CCDA del anticuerpo (documento WO00/61739). Estos informes indican que la estructura de la cadena de azúcar juega un papel importante en las funciones efectoras de los anticuerpos humanos de la subclase IgG1.

En general, la mayor parte de los anticuerpos humanizados cuya aplicación a medicamentos se está teniendo en cuenta se preparan utilizando técnicas de recombinación genética y se producen utilizando células CHO derivadas de tejido de ovario de hámster Chino como célula anfitriona. Sin embargo, como se ha descrito antes, puesto que la estructura de la cadena de azúcar juega un papel muy importante en la función efectora de los anticuerpos y las diferencias de la estructura de la cadena de azúcar de las glicoproteínas dependen de las células anfitrionas que producen las glicoproteínas, se desea el desarrollo de una célula anfitriona que se pueda utilizar para la producción de un anticuerpo que tenga una función efectora superior.

Con el fin de ajustar la actividad de una enzima referente a la modificación de una cadena de azúcar en una célula anfitriona y modificar la estructura de la cadena de azúcar de la glicoproteína producida, se ha intentado un método en el que se aplica un inhibidor de una enzima relacionada con la modificación de la cadena de azúcar.

Los ejemplos del inhibidor de la enzima relacionada con la modificación de la cadena de azúcar incluyen la tunicamicina que inhibe selectivamente la formación de GlcNAc-P-P-Dol que es la primera etapa de la formación de un oligosacárido núcleo que es precursor de una cadena de azúcar unida a *N*-glicósido, la castanospermina y la *N*-metil-1-desoxinijirimicina que son inhibidores de la glicosidasa I, el bromocondulitol que es un inhibidor de la glicosidasa II, la 1-desoxinijirimicina y el 1,4-dioxi-1,4-imino-D-manitol que son inhibidores de la manosidasa I, la swainsonina que es un inhibidor de la manosidasa II y similares. Los ejemplos del inhibidor específico de la glicosiltransferasa incluyen derivados desoxi de sustratos contra la *N*-acetilglucosamina transferasa V (GnTV) y similares [Glycobiology Series 2 - Destiny of Sugar Chain in Cell (Kodan-sha Scientific), editada por Katsutaka Nagai, Senichiro Hakomori y Akira Kobata (1993)]. Asimismo, se sabe que la 1-desoxinijirimicina inhibe la síntesis de una cadena de azúcar de tipo complejo e incrementa la proporción de cadenas de azúcar de tipo elevado contenido de manosa con respecto a las híbridas. En realidad, se ha informado de que la estructura de la cadena de azúcar de IgG producida por un hibridoma había cambiado y que las propiedades tales como la actividad de unión al antígeno o la actividad CCDA habían cambiado cuando se habían añadido inhibidores tales como la castanospermina, la *N*-metil-1-desoxinijirimicina, la swainsonina y la tunicamicina al medio [Molecular Immunol., 26, 1113 (1989)]. No obstante, puesto que estos inhibidores tienen una especificidad débil y tampoco pueden inhibir suficientemente la enzima diana, resulta difícil controlar de manera segura la estructura de la cadena de azúcar del anticuerpo producido.

Asimismo, se ha realizado un intento de modificar la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína producida introduciendo un gen de enzima relacionado con la modificación de las cadenas de azúcar en la célula anfitriona, y específicamente, se ha informado de que 1) es posible producir una proteína en la cual se ha añadido ácido siálico en gran número al extremo no reductor de una cadena de azúcar introduciendo  $\beta$ -galactosido- $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa de rata en células CHO [J. Biol. Chem., 261, 13848 (1989)], 2) es posible expresar un antígeno H en el cual se ha añadido fucosa (también referida en adelante como "Fuc") al extremo no reductor de una cadena de azúcar (Fuca1-2Gal $\beta$ 1-) introduciendo  $\beta$ -galactosido-2- $\alpha$ -fucosiltransferasa humana en células L de ratón [Science, 252, 1668 (1991)], y 3) es posible producir un anticuerpo que tenga una elevada tasa de adición de la *N*-acetilglucosamina bisecante de las cadenas de azúcar de unión a *N*-glicósido produciendo un anticuerpo mediante la utilización de una célula CHO en la que se ha introducido  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosamina transferasa III (GnTIII) [Glycobiology., 5, 813 (1995); documento WO 99/54342]. Cuando el anticuerpo se expresaba utilizando una célula CHO en la que se había introducido GnTIII, ésta mostraba una actividad CCDA 16 veces mayor que el anticuerpo expresado en la célula parental. Sin embargo, puesto que se ha informado de que la expresión en exceso de GnTIII o  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosamina transferasa V (GnTV) muestra toxicidad para las células CHO, ésta no es adecuada para la producción de medicamentos con anticuerpos.

También se ha informado de un ejemplo de producción de una glicoproteína en la cual la estructura de una cadena de azúcar producida cambió utilizando, como célula anfitriona, un mutante en el cual se había cambiado la actividad de un gen de una enzima relacionado con la modificación de cadenas de azúcar, y como ejemplo, se ha informado de que se había producido un anticuerpo que tenía una estructura de una cadena de azúcar del tipo de elevado

5 contenido de manosa utilizando un clon mutante de células CHO en el que se había suprimido la actividad de la 4-N-acetilglucosamina transferasa I (GnT1) [J. Immunol., 160, 3393 (1998)]. Además, se ha informado de la expresión de un anticuerpo que tiene una estructura de cadena de azúcar en la que el ácido siálico no está unido al lado reductor de la cadena de azúcar y de un ejemplo de expresión de un anticuerpo que tiene una estructura de cadena de azúcar a la que no se ha unido galactosa, utilizando una línea celular carente de transportador de ácido siálico o de transportador de UDP-galactosa, respectivamente, pero no se ha encontrado ningún anticuerpo que tenga funciones efectoras mejoradas adecuadas para la aplicación a medicamentos [J. Immunol., 160, 3393 (1998)]. Puesto que los clones mutantes han sido obtenidos como clones resultantes de la introducción de una mutación al azar mediante tratamiento con mutágenos, estos no son adecuados como clones utilizados en la producción de preparaciones farmacéuticas.

10 De este modo, con el fin de modificar la estructura de una cadena de azúcar de una glicoproteína producida, se han realizado intentos de controlar la actividad de una enzima relacionada con la modificación de las cadenas de azúcar en células anfitrionas. No obstante, de hecho, puesto que el mecanismo de modificación de la cadena de azúcar es variado y complicado y no se puede decir que los papeles fisiológicos de las cadenas de azúcar hayan sido suficientemente revelados, la situación actual es que se repiten las pruebas y los errores. Concretamente, se ha revelado de forma gradual que las funciones efectoras de los anticuerpos están muy influenciadas por las estructuras de las cadenas de azúcar, pero todavía no se ha obtenido una célula anfitriona capaz de producir moléculas de anticuerpo modificadas con una estructura de azúcar muy adecuadas.

## 20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los siguientes asuntos:

25 1. Una célula en la cual la actividad de un transportador de GDP-fucosa está suprimida o más disminuida que en su célula parental, donde la célula se selecciona entre los siguientes apartados (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana;
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana,

40 donde el transportador de GDP-fucosa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en los siguientes apartados (a) a (c) o una proteína codificada por un ADN seleccionado entre los apartados (d) y (e):

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa;
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa;
- (d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1;
- (e) un ADN que hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad transportadora de GDP-fucosa,

50 donde la actividad de dicho transportador de GDP-fucosa está disminuida o suprimida por medio de una técnica de ingeniería genética, donde la técnica de ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en los apartados (1) a (3):

- (1) una técnica de desorganización de genes que comprende elegir como diana un gen que codifica dicho transportador de GDP-fucosa;
- (2) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de dicho transportador de GDP-fucosa, donde el mutante negativo dominante de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa;
- (3) una técnica para suprimir la transcripción y/o traducción de dicho transportador de GDP-fucosa.

60 2. La célula de acuerdo con el apartado (1), donde el mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal en el que se suprimen 30 aminoácidos en el extremo N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa.

3. La célula de acuerdo con el apartado 1, donde la técnica para suprimir la transcripción y/o traducción de dicho transportador de GDP-fucosa es un método de ARNi (ARN de interferencia).
- 5 4. La célula de acuerdo con apartado 3, donde el método de ARNi utiliza un ARN de doble hebra que comprende un ARN y su ARN complementario, cuyo ARN de doble hebra es introducido o expresado en la célula, siendo capaz dicho ARN comprendido en el ARN de doble hebra de disminuir la cantidad de ARNm de dicho transportador de GDP-fucosa, donde dicho ARN de doble hebra es un ARN correspondiente a un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de 10 a 30 nucleótidos continuos de la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1.
- 10 5. La célula de acuerdo con el apartado 3 o 4, donde en el método del ARNi se utiliza un ARN de doble hebra que comprende un ARN seleccionado del grupo que consiste en (a) y (b) y su ARN complementario, cuyo ARN de doble hebra es introducido o expresado en la célula para disminuir de ese modo la cantidad de ARNm de dicho transportador de GDP-fucosa:
- 15 (a) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33;  
(b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos o añadidos a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33.
- 20 6. La célula de acuerdo con el apartado 4 o 5, donde el ARN de doble hebra es introducido en la célula utilizando un vector en el que se introducen un ADN correspondiente al ARN de acuerdo con el apartado 4 o 5 y su ADN complementario.
- 25 7. La célula de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 6, que es resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina del extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de una cadena de azúcar unida de N-glicósido complejo.
- 30 8. La célula de acuerdo con el apartado 7, que es resistente a al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):
- 35 (a) una lectina de *Lens culinaris*;  
(b) una lectina de *Pisum sativum*;  
(c) una lectina de *Vicia faba*;  
(d) una lectina de *Aleuria aurantia*.
9. Una célula en la que un gen que codifica una molécula de anticuerpo es introducido en la célula de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 8.
- 40 10. La célula de acuerdo con el apartado 9, donde la molécula de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):
- 45 (a) un anticuerpo humano;  
(b) un anticuerpo humanizado;  
(c) un fragmento de anticuerpo que comprende la región Fc de (a) o (b);  
(d) una proteína de fusión que comprende la región Fc de (a) o (b).
11. La célula de acuerdo con el apartado 9 o 10, donde la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
- 50 12. Un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo, que comprende el uso de una célula de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 9 a 11, donde la composición de anticuerpo tiene una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos más alta y tiene una razón más alta de una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre las cadenas de azúcar conectadas a un N-glicósido complejo totales unida a la composición de anticuerpo que una composición de anticuerpo producida por la célula parental.
- 55 13. El procedimiento de acuerdo con el apartado 12, que comprende cultivar la célula de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 9 a 11 en un medio para formar y acumular una composición de anticuerpo en el cultivo; y recuperar la composición de anticuerpo del cultivo.
- 60 14. El procedimiento de acuerdo con el apartado 12 o 13, donde la razón de una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  es de 20% o más de las cadenas de azúcar conectadas a un N-glicósido complejo totales unidas a la región Fc de la composición de anticuerpo.

- 5 15. El procedimiento de acuerdo con el apartado 12 o 13, donde la cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida es una cadena de azúcar en la cual la posición 1 de la fucosa no está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo a través de un enlace  $\alpha$ .
16. Una composición de anticuerpo producida por medio del procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 12 a 15.
- 10 17. Un medicamento que comprende como ingrediente activo la composición de anticuerpo de acuerdo con el apartado 16.
- 15 18. Un anticuerpo producido mediante el procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 12 a 15 para la diagnosis, prevención o tratamiento de enfermedades acompañadas de tumores, enfermedades acompañadas de alergias, enfermedades acompañadas de inflamación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades acompañadas de infección viral o enfermedades acompañadas de infección bacteriana.
- 20 19. Una proteína que inhibe la función de un transportador de GDP-fucosa, donde el transportador de GDP-fucosa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):
- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos 1 a 20 son suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa; y
- 25 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene actividad de transportador de GDP-fucosa,
- donde la proteína que inhibe la función de dicho transportador de GDP-fucosa es una proteína negativa dominante de dicho transportador de GDP-fucosa, y donde la proteína negativa dominante de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante de dicho transportador de GDP-fucosa con el extremo N-terminal suprimido.
- 30 20. La proteína de acuerdo con el apartado 19, donde el mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa en el que 30 aminoácidos son suprimidos del extremo N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa.
- 35 21. Un ADN que codifica la proteína de acuerdo con el apartado 19 o 20.
22. Un ARN de doble hebra que comprende un ARN seleccionado del grupo que consiste en (a) y (b) y su ARN complementario:
- 40 (a) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33;
- (b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos en la que se suprimen o se añaden uno o unos pocos nucleótidos a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 para un transportador de GDP-fucosa como se define en el apartado 1.
- 45 23. Un ADN correspondiente al ARN de acuerdo con el apartado 22 y su ADN complementario.
24. El ADN de acuerdo con el apartado 23, donde el ADN correspondiente al ARN está representado por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 16.
- 50 25. Un ADN recombinante que comprende el ADN de acuerdo con el apartado 23 o 24 y su ADN complementario.
- 55 26. El ADN recombinante de acuerdo con el apartado 25, que está constituido para expresar el ARN de doble hebra de acuerdo con el apartado 22.
27. Un transformante, que es una célula en la que se ha introducido el ADN recombinante de acuerdo con el apartado 25 o 26.
- 60 28. Un procedimiento para la producción de una célula resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina del extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  en una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo, que comprende introducir

y/o expresar en una célula el ARN de doble hebra de acuerdo con el apartado 22.

29. El procedimiento de acuerdo con el apartado 28, donde dicha introducción del ARN de doble hebra es la introducción de un vector en el cual se ha insertado un ADN complementario del ARN de acuerdo con el apartado 25 o 26.

30. El procedimiento de acuerdo con el apartado 28 o 29, donde la célula resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de una cadena de azúcar conectada a N-glicosido complejo es una célula resistente a al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):

1. (a) una lectina de *Lens culinaris*;
2. (b) una lectina de *Pisum sativum*;
3. (c) una lectina de *Vicia faba*;
4. (d) una lectina de *Aleuria aurantia*.

31. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 28 a 30, donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una levadura, una célula animal, y una célula de insecto.

32. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 28 a 31, donde la célula se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) a (i):

- (a) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (b) una célula de una línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (c) una célula de una línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (d) una célula de una línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster Sirio;
- (f) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (g) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (h) una célula pluripotencial embrionaria no humana;
- (i) una célula huevo fertilizada no humana.

La célula de la presente invención en la que la actividad de una proteína relacionada con el transporte de GDP-fucosa al aparato de Golgi está más suprimida o disminuida que en su célula parental (referida en adelante como "célula anfitriona de la presente invención") es una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de una línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de una línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de una línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

La célula parental representa una célula antes de llevar a cabo el método para disminuir o suprimir la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

La célula parental de la célula NS0 incluye células NS0 descritas en publicaciones tales como BIO/TECHNOLOGY, 10, 169 (1992) y Biotechnol. Bioeng., 73, 261 (2001), la línea celular NS0 (RCB 0213) registrada en el RIKEN Cell Bank, The Institute of Physical and Chemical Research, las sub-líneas celulares obtenidas aclimatando estas líneas celulares a los medios en los que pueden crecer, y similares.

La célula parental de la célula SP2/0-Ag14 incluye las células SP2/0-Ag14 descritas en publicaciones tales como J. Immunol., 126, 317 (1981), Nature, 276, 269 (1978) y Human Antibodies and Hybridomas, 3, 129 (1992), la célula SP2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581) registrada en la ATCC, las sub-líneas celulares obtenidas aclimatando estas líneas celulares a medios en los que pueden crecer (ATCC CRL-1581.1), y similares.

La célula parental de la célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster Chino incluye las células CHO descritas en publicaciones tales como Journal of Experimental Medicine (Jikken Igaku), 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. USA, 60, 1275 (1968), Cell, 6, 121 (1975) y Molecular Cell Genetics, Apéndice I, II (p. 883-900), la línea celular CHO-K1 (ATCC CCL-61), la línea celular DUXB11 (ATCC CRL-9096) y la línea celular Pro-5 (ATCC CL-1781) registrada en la

ATCC, la línea celular disponible en el mercado CHO-S (Núm. Cat 11619 de Life Technologies), las sub-líneas celulares obtenidas aclimatando estas líneas celulares a medios en los que pueden crecer, y similares.

5 La célula parental de una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 incluye las líneas celulares establecidas a partir de la célula Y3/Ag1.2.3 (ATCC CRL-1631) tal como la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 descrita en publicaciones tales como J. Cell. Biol., 93, 576 (1982) y Methods Enzymol., 73B, 1 (1981), la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL-1662) registrada en ATCC, las sub-líneas obtenidas aclimatando estas líneas celulares a medios en los que pueden crecer, y similares.

10 El método para disminuir o suprimir la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa puede ser cualquier técnica con tal que sea un método para disminuir o suprimir la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa. Sin embargo, se prefieren las técnicas de ingeniería genética. Los ejemplos incluyen:

- 15 (a) una técnica de desorganización génica que comprende elegir como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa,  
 (b) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de la proteína de transporte de GDP-fucosa,  
 (c) una técnica para introducir mutaciones en la proteína de transporte de GDP-fucosa,  
 (d) una técnica para suprimir la transcripción y/o traducción de la proteína de transporte de GDP-fucosa, y  
 20 similares.

Además, se puede obtener la célula de la presente invención en la cual la proteína de transporte de GDP-fucosa está más disminuida o suprimida que en su célula parental utilizando un método para seleccionar un clon resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  de la cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo.  
 25

La célula resistente a lectina es una célula en la que su crecimiento no está inhibido en cultivo celular cuando se aplica una lectina al medio de cultivo a una concentración eficaz.

30 En la presente invención, la concentración eficaz a la cual el crecimiento no resulta inhibido se puede seleccionar dependiendo de la línea celular, y es generalmente de 10  $\mu\text{g/ml}$  a 10,0  $\text{mg/ml}$ , preferiblemente de 0,5 a 2,0  $\text{mg/ml}$ . La concentración eficaz cuando la mutación es introducida en la célula parental es una concentración a la cual la célula parental normalmente no puede crecer o una concentración superior, y es una concentración que preferiblemente es similar a, más preferiblemente de 2 a 5 veces, aún más preferiblemente al menos 10 veces, y  
 35 muy preferiblemente al menos 20 veces, mayor que la concentración a la cual la célula parental normalmente no puede crecer.

En cuanto a la lectina que reconoce la estructura de una cadena de azúcar en la cual la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de la cadena de  
 40 azúcar conectada a un N-glicósido, se puede utilizar cualquier lectina, con tal que ésta pueda reconocer la estructura de la cadena de azúcar. Los ejemplos incluyen una lectina LCA de *Lens culinaris* (lentil-aglutinina derivada de *Lens culinaris*), una lectina PSA de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), una lectina VFA de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*), una lectina AAL de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*) y  
 45 similares.

La proteína de transporte de GDP-fucosa incluye un transportador de GDP-fucosa y similares. Asimismo, en la proteína de transporte de GDP-fucosa está incluida una proteína que tiene influencia sobre la actividad o expresión de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

50 En la presente invención, el transportador de GDP-fucosa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en los siguientes(a) a (c) o una proteína codificada por un ADN seleccionado entre los (d) y (e):

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;  
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen, insertan  
 55 y/o añaden de 1 a 20 aminoácidos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene actividad de transportador de GDP-fucosa;  
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa;  
 (d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1;  
 60 (e) un ADN que hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa.

También se describe en la presente memoria una proteína transportadora de GDP-fucosa codificada por un ADN de los siguientes (a) a (e):

- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3;  
 (b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 29;  
 (c) un DNA que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 30;  
 (d) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad transportadora de GDP-fucosa;  
 (e) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 29 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad transportadora de GDP-fucosa;  
 (f) un ADN que hibrida con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 30 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad transportadora de GDP-fucosa.

También se describe en la presente memoria una proteína seleccionada del grupo de los siguientes (g) a (o):

- (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos of SEQ ID NO:4;  
 (h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31;  
 (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32;  
 (j) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprime, sustituye, inserta y/o añade al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa,  
 (k) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprime, sustituye, inserta y/o añade al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa,  
 (l) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprime, sustituye, inserta y/o añade al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa,  
 (m) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa;  
 (n) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa;  
 (o) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa.

En la presente invención, el ADN que es hibridable en condiciones restrictivas es un ADN obtenido, p. ej., mediante un método tal como la hibridación de colonias, la hibridación en placa o la hibridación por transferencia Southern utilizando el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos parciales como sonda, y cuyos ejemplos incluyen un ADN que puede ser identificado llevando a cabo la hibridación a 65°C en presencia de cloruro de sodio de 0,7 a 1,0 M utilizando un filtro en el que se pueden inmovilizar fragmentos de ADN derivados de colonias o placas, y lavando con posterioridad el filtro a 65°C utilizando de 0,1 a 2 x solución de SSC (composición de la solución de 1 x solución de SSC que comprende cloruro de sodio 150 mM y citrato de sodio 15 mM). La hibridación se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos, p. ej., en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (referido más adelante en la presente memoria como "Molecular Cloning Segunda Edición"), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (referido más adelante en la presente memoria como "Current Protocols in Molecular Biology"); DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Segunda Edición, Oxford University (1995); y similares. Los ADN hibridables incluyen un ADN que tiene una homología de al menos 60% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 90% o más, bastante más preferiblemente 95% o más, y muy preferiblemente 98% o más, con la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 .

En la presente invención, se puede obtener la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprime, sustituye, inserta y/o añade al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene actividad transportadora de GDP-fucosa, p. ej., introduciendo una mutación dirigida al sitio en un ADN que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 utilizando el método para introducir la mutagénesis dirigida al sitio descrito, p. ej., en Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols in Molecular Biology; 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); y similares. El número de aminoácidos que se va a suprimir, sustituir, insertar y/o añadir es uno o más, y el número no está particularmente limitado, pero es un número que se puede suprimir, sustituir o añadir mediante una técnica conocida tal como la mutagénesis dirigida al sitio, p. ej., es de 1 a varias decenas, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10, y muy preferiblemente 1 a 5.

En cuanto a la proteína que tiene una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, 4, 31 o 32 y que tiene actividad transportadora de GDP-fucosa, se mencionan las proteínas que tienen una homología de al menos 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, aún más preferiblemente 95% o más, bastante más preferiblemente 97% o más, y muy preferiblemente 99% o más, con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, 4, 31 o 32 cuando se calcula utilizando un programa de análisis tal

como BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)], y que también tienen actividad transportadora de GDP-fucosa.

5 La célula anfitriona de la presente invención es una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino, una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0, una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14, una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster sirio, una célula de hibridoma productora de anticuerpo, una célula de la línea celular de leucemia humana Namalwa, una célula pluripotencial embrionaria no humana, o una célula huevo fertilizada no humana y similares.

10 La composición de anticuerpo se puede preparar introduciendo un gen que codifica una molécula de anticuerpo en la célula anfitriona de la presente invención o utilizando la célula anfitriona cuando la célula anfitriona es capaz de producir una molécula de anticuerpo.

15 También se describe en la presente memoria un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo, que comprende utilizar un animal no humano o una planta o sus progenies en las cuales el genoma está modificado con el fin de disminuir la actividad de una proteína relacionada con el transporte de un nucleótido-azúcar intracelular, la GDP-fucosa, al aparato de Golgi.

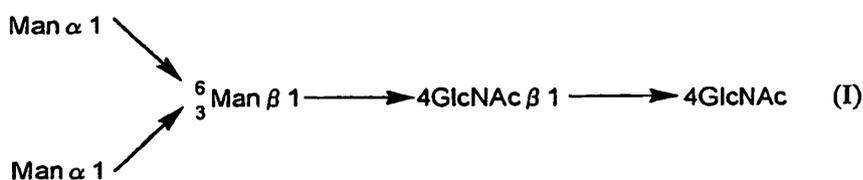
20 En la presente invención, la composición de anticuerpo es una composición que comprende una molécula de anticuerpo que tiene una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo en la región Fc.

25 El anticuerpo es un tetrámero en el que dos moléculas de cada una de las cadenas polipeptídicas, una cadena pesada y una cadena ligera (referidas más adelante en la presente memoria como "cadena H" y "cadena L", respectivamente), están asociadas respectivamente. Cada uno de los aproximadamente un cuarto del lado N-terminal de la cadena H y aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena L (más de 100 aminoácidos cada uno) se denomina región variable (referida más adelante en la presente memoria como "región V") que es rica en diversidad y está directamente relacionada con la unión con el antígeno. La mayor parte del radical distinto de la región V se denomina región constante (referida en adelante en la presente memoria como "región C"). Basándose en la homología con la región C, las moléculas de anticuerpo se clasifican en clases IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

30 Asimismo, la clase IgG se clasifica además en subclases IgG1 a IgG4 basándose en la homología con la región C.

35 La cadena H se divide en cuatro dominios de inmunoglobulina, VH, CH1, CH2 y CH3, desde su lado N-terminal, y se encuentra presente una región peptídica muy flexible denominada región bisagra entre CH1 y CH2 para dividir CH1 y CH2. La unidad estructural que comprende CH2 y CH3 aguas abajo de la región bisagra se denomina región Fc a la que está unida una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo. La región Fc es una región con la que están unidos un receptor de Fc, un complemento y similares (Immunology Illustrated, Original, 5ª edición, publicada el 10 de Febrero de 2000, por Nankodo; Handbook of Antibody Technology (Kotai Kogaku Nyumon), 1ª edición el 25 de Enero de 1994, por Chijin Shokan).

40 Las cadenas de azúcar de glicoproteínas tales como un anticuerpo se dividen a grosso modo en dos tipos, a saber, una cadena de azúcar que se une a asparagina (cadena de azúcar conectada a N-glicosido) y una cadena de azúcar que se une a otro aminoácido tal como serina, treonina (cadena de azúcar conectada a O-glicosido), basándose en la forma de unión al radical de la proteína. Las cadenas de azúcar conectadas a N-glicosido tienen una estructura núcleo común básica mostrada por la siguiente fórmula estructural (I) [Biochemical Experimentación Method 23 -Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Gakujutsu Shuppan Center), editado por Reiko Takahashi (1989)]:



55 En la fórmula (I), el extremo de la cadena de azúcar que se une a asparagina se denomina extremo reductor, y el lado opuesto se denomina extremo no reductor.

La cadena de azúcar conectada a un N-glicósido puede ser cualquier cadena de azúcar conectada a un N-glicósido, con tal que comprenda la estructura núcleo de fórmula (I). Los ejemplos incluyen un tipo de elevado contenido de manosa en el que la manosa sola que se une al extremo no reductor del núcleo comprende al menos una ramificación paralela de galactosa-N-acetilglucosamina (referido más adelante en la presente memoria como "Gal-GlcNAc") y el lado del extremo no reductor de Gal-GlcNAc comprende una estructura de ácido siálico, que

bisecciona la *N*-acetilglucosamina o similar; un tipo híbrido en el que el lado del extremo no reductor de la estructura núcleo comprende ramificaciones tanto del tipo de elevado contenido de manosa como del tipo complejo; y similares.

5 Puesto que la región Fc de la molécula de anticuerpo comprende posiciones a las cuales se han unido por separado cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido, dos cadenas de azúcar están unidas por una molécula de anticuerpo. Puesto que la cadena de azúcar conectada a un *N*-glicósido que se une a una molécula de anticuerpo incluye cualquier cadena de azúcar que tiene la estructura núcleo representada por la fórmula (I), existen numerosas combinaciones de cadenas de azúcar para las dos cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido que se unen al anticuerpo.

10 Por consiguiente, la composición de anticuerpo de la presente invención que es preparada por una célula anfitriona de la presente invención en la que la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa está disminuida o suprimida puede comprender un anticuerpo que tiene la misma estructura de cadena de azúcar o un anticuerpo que tiene estructuras de cadenas de azúcar diferentes, con tal que se obtenga el efecto de la presente invención a partir de la composición. En la composición de anticuerpo de la presente invención, entre las cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido complejo totales unidas a la región Fc de la composición de anticuerpo, la proporción de una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es superior a la de una composición de anticuerpo producida por una célula parental que no es sometida a tratamiento para disminuir o suprimir la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

15 En la presente invención, la proporción de una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre las cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido complejo totales unidas a la región Fc contenida en la composición de anticuerpo es una proporción del número de la cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar con respecto al número total de cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicosido complejo unidas a la región Fc contenida en la composición.

20 La cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de la cadena de azúcar conectada a un *N*-glicósido complejo es una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de la cadena de azúcar conectada a un *N*-glicósido complejo. Específicamente, ésta es una cadena de azúcar conectada a un *N*-glicósido complejo en la cual la posición 1 de la fucosa no está unida a la posición 6 de la *N*-acetilglucosamina por medio de un enlace  $\alpha$ .

25 La composición de anticuerpo que tiene toxicidad CCDA incluye aquellas en las que, entre las cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido complejo unidas a la región Fc de la composición de anticuerpo, la proporción de cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es superior a la proporción en una composición de anticuerpo producida por la célula parental o el individuo parental. Los ejemplos incluyen una composición de anticuerpo en la cual la actividad es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, y aún más preferiblemente 10 veces o superior. Una composición de anticuerpo en la cual todas las cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicósido complejo unidas a la región Fc de la composición de anticuerpo son cadenas de azúcar en las cuales la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es sumamente preferida.

30 De acuerdo con la composición de anticuerpo de la presente invención, cuando, entre las cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicosido complejo totales unidas a la región Fc, la proporción de cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar es superior a la de una composición de anticuerpo producida por la célula parental o el individuo parental, la composición de anticuerpo de la presente invención tiene una actividad CCDA superior a la de la composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo producida por la célula parental o el individuo parental.

35 La actividad CCDA es una actividad citotóxica en la cual el anticuerpo unido al antígeno de la superficie celular de una célula tumoral del organismo activa una célula efectora por medio de un receptor de Fc existente sobre la región Fc del anticuerpo y la superficie de la célula efectora y de ese modo bloquean la célula tumoral y similares [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Capítulo 2.1 (1955)]. La célula efectora incluye una célula asesina, una célula asesina natural, un macrófago activado y similares.

40 La proporción de cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar contenida en la composición que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar conectadas a *N*-glicosido complejo en la región Fc se puede determinar liberando la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo utilizando un método conocido tal como la hidrazinólisis o la digestión enzimática [Biochemical Experimentación Methods 23-Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi (1989)], llevando a cabo el marcaje por fluorescencia o el marcaje con radioisótopos de la cadena de azúcar liberada y separando después la cadena de azúcar marcada mediante

cromatografía. Asimismo, la cadena de azúcar liberada también se puede determinar analizándola con el método HPAED-PAD [*J. Liq. Chromatogr.*, 6, 1557 (1983)].

5 La molécula de anticuerpo puede ser cualquier molécula de anticuerpo, con tal que comprenda la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos incluyen un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende una región Fc, y similares.

10 El anticuerpo incluye un anticuerpo secretado por una célula de hibridoma, un anticuerpo preparado por medio de una técnica de recombinación genética, esto es un anticuerpo obtenido introduciendo un vector de expresión de anticuerpos con el gen del anticuerpo insertado en una célula anfitriona, y similares. Los ejemplos incluyen un anticuerpo producido por un hibridoma, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y similares.

15 Un hibridoma es una célula que se obtiene mediante fusión celular entre una célula B obtenida mediante inmunización de un mamífero no humano con un antígeno y una célula de mieloma derivada de ratón o similar y que puede producir un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad antigénica de interés.

El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con una CDR humana y similares.

20 Un anticuerpo quimérico humano es un anticuerpo que comprende la región V de la cadena H (también referida más adelante en la presente memoria como "HV" o "VH") y la región V de la cadena L (también referida más adelante en la presente memoria como "LV" o "VL"), ambas de un anticuerpo animal no humano, una región C de la cadena H de un anticuerpo humano (también referida más adelante en la presente memoria como "CH") y una región C de la cadena L de un anticuerpo humano (también referida más adelante en la presente memoria como "CL"). El animal  
25 no humano puede ser cualquier animal tal como ratón, rata, hámster o conejo, con tal que se pueda preparar de él un hibridoma.

30 El anticuerpo quimérico humano puede ser producido obteniendo los ADNc que codifican VH y VL a partir de un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal, insertándolos en un vector de expresión para la célula anfitriona que tiene genes que codifican la CH de un anticuerpo humano y la CL de un anticuerpo humano para construir de ese modo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano, e introduciendo después el vector en una célula anfitriona para expresar el anticuerpo.

35 En cuanto a la CH del anticuerpo quimérico humano, se puede utilizar cualquier CH, con tal que pertenezca a una inmunoglobulina humana (referida más adelante en la presente memoria como "hlg"), y se prefieren aquellas pertenecientes a la clase hlgG, y se puede utilizar una cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4. En cuanto a la CL de un anticuerpo quimérico humano, se puede utilizar cualquier CL, con tal que pertenezca a la clase hlg, y se pueden utilizar aquellas pertenecientes a la clase k o a la clase λ.  
40

45 El anticuerpo injertado con CDR humana se puede producir construyendo ADNc que codifican regiones V en las cuales se han injertado las CDR de VH y VL de un anticuerpo animal no humano en las CDR de VH y VL de un anticuerpo humano, insertándolas en un vector de expresión para la célula anfitriona que tiene los genes que codifican la CH de un anticuerpo humano y la CL de un anticuerpo humano para construir de ese modo un vector de expresión de anticuerpo con una CDR humana injertada, e introduciendo después el vector de expresión en una célula anfitriona para expresar el anticuerpo injertado con CDR humana.

50 En cuanto a la CH del anticuerpo injertado con CDR humana, se puede utilizar cualquier CH, con tal que pertenezca a las hlg, y se prefieren las de la clase hlgG y se puede utilizar una cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4. En cuanto a la CL del anticuerpo injertado con CDR humana, se puede utilizar cualquier CL, con tal que pertenezca a la clase hlg, y se pueden utilizar aquellas pertenecientes a la clase k o a la clase λ.

55 Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo que existe de forma natural en el organismo humano, pero también incluye anticuerpos obtenidos de una genoteca de fagos con anticuerpos humanos, un animal transgénico no transgénico productor de anticuerpo humano y una planta transgénica productora de anticuerpo humano, que se preparan basándose en los avances recientes de la ingeniería genética, el diseño celular y las técnicas de ingeniería evolutiva.

60 Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo que existe de forma natural en el organismo humano, pero también incluye anticuerpos obtenidos de una genoteca de fagos con anticuerpos humanos, un animal transgénico productor de anticuerpo humano y una planta transgénica productora de anticuerpo humano, que se preparan basándose en los avances recientes de la ingeniería genética, el diseño celular y las técnicas de ingeniería evolutiva.

El anticuerpo existente en el organismo humano se puede preparar aislando un linfocito de sangre periférica humana, inmortalizándolo mediante su infección con virus EB o similar y después clonándolo para obtener de ese modo linfocitos capaces de producir el anticuerpo, cultivando los linfocitos obtenidos de ese modo, y recogiendo el anticuerpo del cultivo.

La genoteca de fagos con anticuerpos humanos es una genoteca en la que fragmentos de anticuerpos tales como Fab y anticuerpos de cadena sencilla se expresan sobre la superficie de los fagos insertando un gen que codifica un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen del fago. Se puede recuperar de la genoteca un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que tiene la actividad de unión al antígeno deseado, utilizando su actividad para unirse a un sustrato con el antígeno inmovilizado como marcador. El fragmento de anticuerpo se puede convertir adicionalmente en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

En la presente invención, como anticuerpo, se prefieren anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con tumores, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con la alergia o la inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad autoinmunitaria o un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección vírica o bacteriana, y se prefiere un anticuerpo humano que pertenece a la clase IgG.

Un fragmento de anticuerpo es un fragmento que comprende al menos una porción de la región Fc de un anticuerpo. La región Fc es una región del extremo C de la cadena H de un anticuerpo, región CH2 y región CH3, e incluye un tipo natural y un tipo mutante. "Una porción de la región Fc" es preferiblemente un fragmento que contiene la región CH2, más preferiblemente una región que contiene Asp en la posición 1 de la región CH2. La región Fc de la clase IgG es desde la Cys de la posición 226 al extremo C-terminal o desde la Pro de la posición 230 al extremo C-terminal de acuerdo con la numeración del Índice EU de Kabat et al. [Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. El fragmento de anticuerpo incluye un monómero de cadena H, un dímero de cadenas H y similares.

Una proteína de fusión que comprende una porción de una región Fc es una proteína que se obtiene fusionando un anticuerpo que comprende la región Fc de un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con una proteína tal como una enzima o una citoquina (referida más adelante en la presente memoria como "Proteína de fusión con Fc").

La presente invención se explica con detalle más abajo.

## 1. Preparación de la célula anfitriona de la presente invención

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar mediante las siguientes técnicas.

### (1) Técnica de desorganización génica que comprende elegir como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar de acuerdo con una técnica de desorganización génica que comprende elegir como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa. La proteína de transporte de GDP-fucosa incluye un transportador de GDP-fucosa y similares.

El gen utilizado en la presente memoria incluye ADN y ARN.

El método de desorganización génica puede ser cualquier método, con tal que pueda desorganizar el gen de la enzima diana que se ha incluido. Los ejemplos incluyen un método de recombinación homóloga, un método con oligonucleótidos ARN-ADN (RDO), un método en el que se utiliza un retrovirus, un método en el que se utiliza un transposón, un método antisentido, un método con ribozima, un método con ARN de interferencia (ARNi) y similares.

#### (a) Preparación de células de la presente invención mediante el método antisentido o el método con ribozima

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa de acuerdo con el método de la ribozima descrito en Cell Technology, 12, 239 (1993); BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999); Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995); Cell Technology, 13, 255 (1994); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1886 (1999); o similar, por ejemplo, como sigue.

Se prepara un ADNc un ADN genómico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa.

Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc o el ADN genómico preparado.

El ADN genómico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye un ADN genómico que codifica un transportador de GDP-fucosa que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 34 o 35.

5 Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña un gen antisentido o un constructo de ribozima de una longitud apropiada que comprende una porción de ADN que codifica la proteína transportadora de GDP-fucosa, una porción de su región no traducida o una parte de su intrón.

10 Con el fin de expresar el gen antisentido o ribozima en una célula, se prepara un vector recombinante insertando un fragmento o toda la longitud del ADN preparado aguas abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Se obtiene un transformante introduciendo el vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión.

15 La célula anfitriona se puede obtener seleccionando un transformante basado en la actividad de la proteína transportadora de GDP-fucosa. La célula anfitriona de la presente invención también se puede obtener seleccionando un transformante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular o la estructura de la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo producida.

20 En cuanto a la célula anfitriona utilizada para preparar la célula anfitriona de la presente invención, se emplea una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- 25 (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- 30 (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

35 En cuanto al vector de expresión, se utiliza un vector que es autónomamente replicable en la célula anfitriona o puede ser integrado en el cromosoma y comprende un promotor en una posición tal que el gen antisentido o ribozima diseñado puede ser transferido. Los ejemplos incluyen los vectores de expresión descritos en el siguiente apartado 2.

En cuanto al método para introducir un gen en diferentes células anfitrionas, se pueden utilizar los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas descritos en el siguiente apartado 2.

40 En cuanto al método para obtener un ADNc o un ADN genómico de la proteína transportadora de GDP-fucosa, se ilustra el siguiente método.

#### **Método de preparación de ADNc:**

45 Se prepara un ARN total o ARNm procedente de diversas células anfitrionas.

Se prepara una genoteca de ADNc a partir del ARN total o el ARNm.

50 Se producen cebadores degenerativos basándose en una secuencia de aminoácidos conocida, tal como una secuencia humana, de la proteína de transporte de GDP-fucosa, y se obtiene un fragmento génico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa mediante PCR utilizando como molde la genoteca de ADNc preparada.

55 Se puede obtener un ADNc de la proteína de transporte de GDP-fucosa escrutando la genoteca de ADNc empleando el fragmento génico obtenido como sonda.

60 El ARNm de diversas células anfitrionas puede ser un producto disponible en el mercado (p. ej., fabricado por Clontech) o se puede preparar a partir de diversas células anfitrionas como sigue. El método para preparar el ARNm total a partir de diversas células anfitrionas incluye el método del tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)], el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo ácido (AGPC) [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987); Experimental Medicine (Jikken Igaku), 9, 1937 (1991)] y similares.

Además, un método para preparar ARNm en forma de ARN poli(A)<sup>+</sup> a partir del ARN total incluye el método de la columna de celulosa con oligo(dT) inmovilizado (*Molecular Cloning*, Segunda Edición)

Además, el ARNm se puede preparar utilizando un Kit, tal como el Kit de Aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) o el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

5 Se prepara una genoteca de ADNc a partir del ARNm preparado de diversas células anfitrionas. El método para preparar genotecas de ADNc incluye los métodos descritos en *Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*; y similares, o métodos que utilizan kits disponibles en el mercado tales como el Sistema del Plásmido SuperScript para la Síntesis de ADNc y la Clonación de Plásmidos (fabricado por Life Technologies) y el Kit de Síntesis de ADNc ZAP (fabricado por STRATAGENE).

10 En cuanto al vector de clonación para preparar la genoteca de ADNc, se puede utilizar cualquier vector tal como un fago vector o un plásmido vector, con tal que sea autónomamente replicable en *Escherichia coli* K12. Los ejemplos incluyen ZAP Express [fabricado por STRATAGENE, *Strategies*, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], Lambda ZAP II (fabricado por STRATAGENE),  $\lambda$ gt10 y  $\lambda$ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)],  $\lambda$ TriplEx (fabricado por Clontech),  $\lambda$ ExCell (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] y similares.

20 Se puede utilizar cualquier microorganismo como microorganismo anfitrión para preparar la genoteca de ADNc, y preferiblemente se utiliza *Escherichia coli*. Los ejemplos incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [fabricada por STRATAGENE, *Strategies*, 5, 81 (1992)], *Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], *Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)], *Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], *Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], *Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], *Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] y similares

25 Se puede utilizar la genoteca de ADNc como tal en el posterior análisis, y con el fin de obtener un ADNc completo tan eficaz como sea posible por medio de la disminución de la proporción de ADNc completo, se puede utilizar en el siguiente análisis una genoteca de ADNc preparada de acuerdo con el método de la caperuza de oligos desarrollado por Sugano et al. [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); Protein, Nucleic Acid, Protein (Tanpakushitu, Kakusan, Koso), 41, 603 (1996); Experimental Medicine (Jikken Igaku), 11, 2491 (1993); cDNA Cloning (Yodo-sha) (1996); Methods for Preparing Gene Libraries (Yodo-sha) (1994)].

30 Basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína de transporte de GDP-fucosa, se preparan cebadores degenerativos específicos para las secuencias de nucleótidos 5'-terminal y 3'-terminal de una secuencia de nucleótidos que se presume que codifica la secuencia de aminoácidos, y se amplifica el ADN mediante PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] utilizando la genoteca de ADNc preparada como molde para obtener un fragmento génico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa.

35 Se puede confirmar que el fragmento génico obtenido es un ADN que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa mediante un método utilizado generalmente para analizar un nucleótido tal como el método didesoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] o un analizador de secuencias de nucleótidos tal como el Secuenciador de ADN ABIPRISM 377 (fabricado por PE Biosystems).

40 Se puede obtener un ADN que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa llevando a cabo la hibridación de colonias o la hibridación de placas (*Molecular Cloning*, Segunda Edición) para el ADNc o la genoteca de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en diferentes células anfitrionas, utilizando el fragmento génico como sonda de ADN.

45 Asimismo, se puede obtener también un ADN que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa llevando a cabo el escrutinio mediante PCR utilizando el ADNc o la genoteca de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en diferentes células anfitrionas como molde y utilizando los cebadores empleados para obtener el fragmento génico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa.

50 La secuencia de nucleótidos del ADN obtenido que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa se analiza desde su extremo y se determina mediante un método utilizado generalmente para analizar un nucleótido tal como el método didesoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] o un analizador de secuencias de nucleótidos tal como el Secuenciador de ADN ABIPRISM 377 (fabricado por PE Biosystems).

55 También se puede determinar un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa a partir de los genes de las bases de datos buscando en las bases de datos de secuencia de nucleótidos tales como GenBank, EMBL y DDBJ utilizando un programa de recuperación de homología tal como BLAST basado en la secuencia de nucleótidos del ADNc determinado.

60 La secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa obtenida mediante el método anterior incluye la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1, 3, 29 o 30.

El ADNc de la proteína de transporte de GDP-fucosa también puede ser obtenido sintetizándolo químicamente con un sintetizador de ADN tal como un Sintetizador de ADN modelo 392 fabricado por Perkin Elmer utilizando el método de la fosforamidita, basándose en la secuencia de nucleótidos del ADN determinado.

5 Como ejemplo del método para preparar un ADN genómico de la proteína de transporte de GDP-fucosa, se ilustra el método descrito más abajo.

**Método de preparación del ADN genómico:**

10 El método para preparar ADN genómico incluye los métodos conocidos descritos en *Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*, y similares. Por añadidura, también se puede aislar un ADN genómico de la proteína de transporte de GDP-fucosa utilizando un kit tal como el Sistema de Escrutinio de Genotecas de ADN Genómico (fabricado por Genome Systems) o Kits Universal GenomeWalker® (fabricados por CLONTECH).

15 Se puede ilustrar el siguiente método como un método para seleccionar un transformante basado en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

20 **Método para seleccionar transformantes:**

El método para seleccionar una célula en la que la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa está disminuida o suprimida incluye métodos bioquímicos o técnicas de ingeniería genética descritos en New Biochemical Experimentation Series 3-Saccharides I, Glycoprotein (Tokyo Kagaku Dojin), editado por Japanese Biochemical Society (1988); Cell Engineering, Suplemento, Experimental Protocol Series, Glycobiology Experimental Protocol, Glycoprotein, Glycolipid and Proteoglycan (Shujun-sha), editado por Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Kiyoshi Furukawa and Kazuyuki Sugawara (1996); *Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*; y similares. El método bioquímico incluye métodos en los que se evalúa la actividad de transporte al aparato de Golgi utilizando GDP-fucosa como sustrato. Las técnicas de ingeniería genética incluyen el análisis Northern, la RT-PCR y similares que miden la cantidad de ARNm de un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa.

Además, el método para seleccionar una célula basado en un cambio morfológico ocasionado por una disminución y supresión de la actividad de transporte de GDP-fucosa incluye un método para seleccionar un transformante basado en la estructura del azúcar de una molécula de anticuerpo producida, un método para seleccionar un transformante basado en la estructura del azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular, y similares. El método para seleccionar un transformante utilizando una estructura de azúcar de una molécula productora de anticuerpo incluye el método descrito en el apartado 4 de más abajo. El método para seleccionar un transformante utilizando la estructura de azúcar de una glicoproteína sobre una membrana celular incluye un clon resistente a una lectina que reconoce una estructura de una cadena de azúcar donde la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de la cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo. Los ejemplos incluyen un método en el que se utiliza una lectina descrito en Somatic Cell Mol. Genet, 12, 51 (1986).

45 En cuanto a la lectina, se puede utilizar cualquier lectina, con tal que sea una lectina que reconozca una estructura de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor por medio de un enlace  $\alpha$  de la cadena de azúcar conectada a un N-glicósido. Los ejemplos incluyen una lectina LCA de *Lens culinaris* (lentil aglutinina derivada de *Lens culinaris*), una lectina PSA de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), una lectina VFA de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*), una lectina AAL de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*) y similares.

50 Específicamente, la célula anfitriona de la presente invención se puede seleccionar cultivando células durante 1 día a 2 semanas, preferiblemente de 1 día a 1 semana, en un medio que comprende la lectina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml a 10 mg/ml, preferiblemente de 0,5 a 2,0 mg/ml, subcultivar las células o elegir una colonia y transferirla a un recipiente de cultivo, y con posterioridad continuar el cultivo en el medio que contiene la lectina.

Por añadidura, la célula anfitriona de la presente invención también se puede obtener sin utilizar un vector de expresión, introduciendo directamente un oligonucleótido antisentido o ribozima que se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos de la proteína de transporte de GDP-fucosa en una célula anfitriona.

60 El oligonucleótido antisentido o ribozima se pueden preparar mediante el método habitual o utilizando un sintetizador de ADN. Específicamente, se puede preparar basándose en la información de la secuencia de un oligonucleótido que tiene una secuencia correspondiente de 5 a 150 bases continuas, preferiblemente 5 a 60 bases, y más preferiblemente 10 a 40 bases, entre las secuencias de nucleótidos de un ADNc y un ADN genómico de una

proteína de transporte de GDP-fucosa sintetizando un oligonucleótido que corresponde a una secuencia complementaria al oligonucleótido (oligonucleótido antisentido) o una ribozima que comprende la secuencia de oligonucleótidos .

- 5 El oligonucleótido incluye oligo-ARN y derivados del oligonucleótido (referidos más adelante en la presente memoria como "derivados de oligonucleótidos").

Los derivados de oligonucleótidos incluyen derivados de oligonucleótidos en los que un enlace fosfodiéster del oligonucleótido se convierte en un enlace fosforotioato, un derivado de oligonucleótido en el que un enlace fosfodiéster del oligonucleótido se convierte en un enlace N3'-P5' fosfoamidato, un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa y un enlace fosfodiéster del oligonucleótido se convierten en un enlace péptido-ácido nucleico, un derivado de oligonucleótido en el que el uracilo del oligonucleótido está sustituido con C-5 propiniluracilo, un derivado de oligonucleótido en el que uracilo del oligonucleótido está sustituido con C-5 tiazolouracilo, un derivado de oligonucleótido en el que la citosina del oligonucleótido está sustituida con C-5 propinilcitosina, un derivado de oligonucleótido en el que la citosina del oligonucleótido está sustituida con citosina modificada con fenoxazina, un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa del oligonucleótido está sustituida con 2'-O-propilribosa y un derivado de oligonucleótido en el que la ribosa del oligonucleótido está sustituida con 2'-metoxietoxirribosa [Cell Technology (Saibo Kogaku), 16, 1463 (1997)].

#### 20 **(b) Preparación de células anfitrionas de la presente invención mediante recombinación homóloga**

La célula anfitriona de la presente invención se puede producir eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa y modificando el gen diana del cromosoma por medio de una técnica de recombinación homóloga.

25 El gen diana del cromosoma se puede modificar utilizando un método descrito en *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (referido más adelante en la presente memoria como "Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual"); *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993); *Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice using ES*, Yodo-sha (1995) (referido más adelante en la presente memoria como "*Preparation of Mutant Mice using ES Cells*"); o similar, por ejemplo, como sigue.

Se prepara un ADN genómico de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

35 Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADN genómico, se prepara un vector diana para la recombinación homóloga del gen diana que se va a modificar (p. ej., un gen estructural de la proteína de transporte de GDP-fucosa o un gen promotor).

40 La célula anfitriona se puede producir introduciendo el vector diana preparado en una célula anfitriona y seleccionando una célula en la que la recombinación homóloga se produce entre el gen diana y el vector diana.

En cuanto a la célula anfitriona, se puede utilizar cualquier célula tal como levadura, una célula animal, una célula de insecto o una célula vegetal, con tal que tenga un gen que codifique la proteína de transporte de GDP-fucosa. Los ejemplos de las células anfitrionas se describen en el siguiente apartado 2.

45 El método para preparar un ADN genómico que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye los métodos descritos en "Preparation method of genomic DNA" en el apartado 1(1)(a) y similares.

50 El vector diana para la recombinación homóloga del gen diana se puede preparar de acuerdo con un método descrito en *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993); *Preparation of Mutant Mice using ES Cells*; o similar. El vector diana se puede utilizar como un tipo de remplazo o un tipo de inserción.

55 Para introducir el vector diana en diferentes células anfitrionas, se pueden utilizar los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas descritos en el siguiente apartado 2.

60 El método para seleccionar eficazmente un recombinante homólogo incluye un método tal como la selección positiva, la selección del promotor, la selección negativa o la selección con poliA descrita en *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993); *Preparation of Mutant Mice using ES Cells*, o similar. El método para seleccionar el recombinante homólogo de interés a partir clones seleccionados incluye el método de hibridación de Southern del ADN genómico (*Molecular Cloning*, Segunda Edición), PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)], y similares.

#### **(c) Preparación de células anfitrionas de la presente invención mediante el método RDO**

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa de acuerdo con el método RDO (oligonucleótido ARN-ADN), por ejemplo, como sigue.

Se prepara un ADNc o un ADN genómico de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc o el ADN genómico preparado.

Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña y se sintetiza un constructo RDO de una longitud apropiada que comprende una porción que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa, una porción de su región de no traducción o una parte de un intrón.

La célula anfitriona de la presente invención se puede obtener introduciendo el RDO sintetizado en una célula anfitriona y seleccionando después un transformante en el que se había producido una mutación en la proteína de transporte de GDP-fucosa diana.

En cuanto a la célula anfitriona, se utiliza una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

El método para introducir RDO en diferentes células anfitrionas incluye los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas, descrito en el siguiente apartado 2.

El método para preparar el ADNc de la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye los métodos descritos en "Método de preparación de ADNc" en el apartado 1(1)(a) y similares.

El método para preparar el ADN genómico de la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye los métodos del "Método de preparación de ADN genómico" descrito en el apartado 1(1)(a) y similares.

La secuencia de nucleótidos del ADN se puede determinar digiriéndolo con las enzimas de restricción apropiadas, clonando los fragmentos en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), sometiendo los clones a la reacción utilizada generalmente como método para analizar una secuencia de nucleótidos tal como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] o similar, y analizando después los clones utilizando un analizador de la secuencia de nucleótidos automático tal como el Secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) o similar.

El RDO se puede preparar mediante un método habitual o utilizando un sintetizador de ADN.

El método para seleccionar una célula en la cual se produjo una mutación, introduciendo un RDO en la célula anfitriona, en el gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye los métodos para detectar directamente mutaciones en genes cromosómicos descritos en *Molecular Cloning*, Segunda Edición, *Current Protocols in Molecular Biology* y similares.

Además, también se pueden utilizar el método descrito en el apartado 1(1)(a) para seleccionar un transformante por medio de la evaluación de la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa introducida, el método para seleccionar un transformante basado en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular, y el método para seleccionar un transformante basado en la estructura de azúcar de una molécula de anticuerpo producida descritos en el siguiente apartado 4.

El constructo del RDO se puede diseñar de acuerdo con los métodos descritos en Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids. Res., 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech., 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000); y similares.

#### **(d) Preparación de células anfitrionas de la presente invención mediante el método del ARNi**

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa de acuerdo con el método del ARNi (ARN de interferencia), por ejemplo, como sigue.

5 Se prepara un ADNc de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc preparado.

10 Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña un constructo génico de ARNi de una longitud apropiada que comprende el radical codificante de ADN que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa o una porción de su región no traducida.

Con el fin de expresar el gen de ARNi en una célula, se prepara un vector recombinante insertando un fragmento o todo el ADN preparado aguas abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

15 Se obtiene un transformante introduciendo el vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión.

20 La célula anfitriona se puede obtener seleccionando un transformante basado en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa, o la estructura de la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo producida o de una glicoproteína sobre la membrana celular.

En cuanto a la célula anfitriona, se utiliza una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- 25 (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- 30 (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

35 En cuanto al vector de expresión, se utiliza un vector que sea autónomamente replicable en la célula anfitriona o se pueda integrar en el cromosoma y comprende un promotor en una posición tal que el gen del ARNi diseñado pueda ser transferido. Los ejemplos incluyen los vectores de expresión transcritos por la polimerasa III descritos en el siguiente 2.

40 En cuanto al método para introducir un gen en diferentes células anfitrionas, se pueden utilizar los métodos para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas descritos en el siguiente apartado 2.

45 El método para seleccionar un transformante basado en la actividad de la molécula de anticuerpo producida o el método para seleccionar un transformante basado en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular como marcador incluye los métodos descritos en el apartado 1(1)(a). El método para seleccionar un transformante basado en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluye los métodos descritos en el siguiente apartado 4.

50 El método para preparar ADNc de la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye los métodos descritos "Método de preparación de ADNc" del apartado 1(1)(a) y similares.

Además, la célula anfitriona de la presente invención también se puede obtener sin utilizar un vector de expresión, introduciendo directamente un gen de ARNi diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

55 El gen de ARNi se puede preparar mediante el método habitual o utilizando un sintetizador de ADN.

60 El constructo del gen de ARNi se puede diseñar de acuerdo con los métodos descritos en Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 5049 (1999); Cell, 95,1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000); y similares.

El ARN utilizado en el método del ARNi para la preparación de una célula anfitriona de la presente invención incluye el ARN correspondiente al ADN que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa o similar. Los ejemplos preferidos incluyen el ARN correspondiente al ADN que codifica el transportador de GDP-fucosa descrito antes.

El ARN utilizado en el método del ARNi para la preparación de una célula anfitriona de la presente invención puede ser cualquier ARN de doble hebra que consiste en ARN y su ARN complementario y capaz de disminuir la cantidad de ARNm de la proteína de transporte de GDP-fucosa tal como el transportador de GDP-fucosa. Con respecto a la longitud del ARN, el ARN es un ARN continuo preferiblemente de 1 a 30, más preferiblemente de 5 a 29, aún más preferiblemente de 10 a 29, y muy preferiblemente de 15 a 29.

Los ejemplos incluyen un ARN correspondiente al ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por 10 a 30 nucleótidos continuos de la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1.

Los ejemplos preferibles incluyen:

- (a) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33; y
- (b) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos o añadidos a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que el ARN del SEQ ID NO: 33.

El ARN anterior que tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que el ARN del SEQ ID NO: 33 puede ser cualquier ARN que tenga actividad de ARNi hacia la proteína de transporte de GDP-fucosa como el ARN del SEQ ID NO: 33, y el elemento cuantitativo tal como la longitud del ARN puede ser diferente.

La secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos o añadidos representa una secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos y/o añadidos en ambos extremos del SEQ ID NO: 33. Con respecto a la longitud de la secuencia de nucleótidos, la secuencia de nucleótidos es un ARN continuo preferiblemente de 1 a 30, más preferiblemente de 5 a 29, aún más preferiblemente de 10 a 29, y muy preferiblemente de 15 a 29.

Además, un ADN correspondiente al ARN y su ADN complementario están dentro del alcance de la presente invención, y el ADN correspondiente al ARN incluye un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 16. Por otra parte, se introducen un ADN recombinante que comprende un vector en el ADN y su ADN complementario y el transformante obtenido introduciendo el ADN recombinante en una célula también están dentro del alcance de la presente invención, y se pueden utilizar para expresar el ARN de doble hebra.

#### **(e) Preparación de células anfitrionas de la presente invención mediante el método en el que se utiliza un transposón**

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar seleccionando un mutante basándose en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa o la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o de una glicoproteína sobre la membrana celular utilizando un sistema de transposón descrito en Nature Genet., 25, 35 (2000) o similar.

El sistema del transposón es un sistema en el que se induce una mutación insertando al azar un gen exógeno en un cromosoma, donde el gen exógeno interpuesto entre los transposones se utiliza generalmente como vector para inducir una mutación, y se introduce al mismo tiempo en la célula un vector de expresión de transposasa para insertar al azar el gen en el cromosoma.

Se puede utilizar cualquier transposasa, con tal que sea adecuada para la secuencia del transposón que se va a utilizar.

En cuanto al gen exógeno, se puede utilizar cualquier gen, con tal que pueda inducir una mutación en el ADN de una célula anfitriona.

En cuanto a la célula anfitriona, se utiliza una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

Para introducir el gen en diferentes células anfitrionas, se puede utilizar el método para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas descritos en el siguiente apartado 2.

5 El método para seleccionar un mutante basándose en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa o el método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular incluye los métodos que se han descrito antes en el apartado 1(1)(a). El método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluye los métodos descritos en el siguiente apartado 4.

## 10 (2) Método para introducir un mutante negativo dominante de la proteína de transporte de GDP-fucosa

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa de acuerdo con una técnica para la producción de un mutante negativo dominante de la proteína. La proteína de transporte de GDP-fucosa incluye el transportador de GDP-fucosa y similares.

15 Se sabe que un transportador de un azúcar nucleotídico intracelular funciona en forma de dímero sobre la membrana del retículo endoplásmico o el aparato de Golgi [J. Biol. Chem., 275, 17718 (2000)]. Asimismo, se ha informado de que, cuando un mutante de un transportador de un azúcar nucleotídico intracelular es expresado obligatoriamente de manera intracelular, se forma un heterodímero con un transportador de tipo salvaje, y el heterodímero formado tiene una actividad inhibitoria del homodímero de tipo salvaje [J. Biol. Chem., 275, 17718 (2000)]. Por consiguiente, se prepara un mutante de un transportador de un azúcar nucleotídico intracelular y se introduce en una célula de manera que pueda funcionar como mutante negativo dominante. El mutante se puede preparar utilizando el método para introducir la mutagénesis dirigida al sitio descrita en *Molecular Cloning*, Segunda Edición, *Current Protocols in Molecular Biology* y similares.

25 El mutante negativo dominante de la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye un mutante por delección N-terminal de una proteína relacionada con el transporte de un azúcar nucleotídico intracelular, GDP-fucosa, al aparato de Golgi, y es preferiblemente un mutante por delección N-terminal en el que se suprimen 30 aminoácidos del extremo N-terminal en una proteína relacionada con el transporte de un azúcar nucleotídico intracelular, GDP-fucosa, al aparato de Golgi. Los ejemplos específicos incluyen un mutante por delección N-terminal del transportador de GDP-fucosa descrito en el Ejemplo 1.

35 La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar utilizando el gen mutante negativo dominante preparado de la enzima diana de acuerdo con el método descrito en *Molecular Cloning*, Segunda Edición, *Current Protocols in Molecular Biology*, *Manipulating the Mouse Embryo*, Segunda Edición o similar, por ejemplo, como sigue.

Se prepara un gen mutante negativo dominante de la proteína de transporte de GDP-fucosa.

40 Basándose en el ADN completo preparado del gen mutante negativo dominante, se prepara un fragmento de ADN de una longitud apropiada que contiene una porción que codifica la proteína, si fuera necesario.

Se prepara un vector recombinante insertando el fragmento de ADN o el ADN completo aguas abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

45 Se obtiene un transformante introduciendo el vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión.

50 La célula anfitriona se puede preparar seleccionando un transformante basado en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa, o la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o de una glicoproteína sobre la membrana celular como marcador.

En cuanto a la célula anfitriona, se utiliza una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- 55 (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;  
(ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;  
(iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;  
(iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;  
(v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;  
60 (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;  
(vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;  
(viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y  
(ix) una célula huevo fertilizada no humana.

En cuanto al vector de expresión, se utiliza un vector que sea autónomamente replicable en la célula anfitriona o pueda ser integrado en el cromosoma y comprenda un promotor en una posición en la que se pueda efectuar la transcripción del ADN que codifica el mutante negativo dominante de interés. Los ejemplos incluyen los vectores de expresión descritos en el siguiente apartado 2.

5 Para introducir el gen en diferentes células anfitrionas, se puede utilizar el método para introducir vectores recombinantes adecuados para diferentes células anfitrionas descritos en el siguiente apartado 2.

10 El método para seleccionar un mutante basándose en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa o el método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular incluye los métodos que se han descrito en el apartado 1(1)(a) anterior. El método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluye los métodos descritos en el siguiente apartado 4.

### 15 **(3) Método para introducir una mutación en la proteína de transporte de GDP-fucosa**

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar introduciendo una mutación en un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa, y seleccionando después un clon de interés en el que la mutación se produce en la proteína.

20 El gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa incluye un transportador de GDP-fucosa y similares.

25 Los ejemplos incluyen 1) un método en el que se selecciona un clon deseado a partir de los mutantes obtenidos mediante un tratamiento de inducción de la mutación de una línea celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa, 2) un método en el que se selecciona un clon deseado a partir de mutantes obtenidos mediante un tratamiento de inducción de la mutación de una línea celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida, 3) un método en el que se selecciona un clon deseado a partir de los mutantes obtenidos mediante un tratamiento de inducción de la mutación de una línea celular parental con un mutágeno o mutantes generados espontáneamente, basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular, y similares.

35 En cuanto al tratamiento de inducción de la mutación, se puede utilizar cualquier tratamiento, con tal que pueda inducir una mutación puntual o una deleción o una mutación por desplazamiento del marco de las células de la línea celular parental. Los ejemplos incluyen el tratamiento con etil-nitrosourea, nitrosoguanidina, benzopireno o un pigmento de acridina y un tratamiento con radiación. Asimismo, se pueden utilizar como mutágenos diferentes agentes alquilantes y carcinógenos. El método para permitir que un mutágeno actúe sobre las células incluye los métodos descritos en Tissue Culture Techniques, 3ª edición (Asakura Shoten), editado por Japanese Tissue Culture Association (1996), Nature Genet., 24, 314 (2000) y similares.

40 El mutante generado espontáneamente incluye mutantes que se forman espontáneamente continuando el subcultivo en las condiciones generales del cultivo de tejidos sin aplicar un tratamiento de inducción de mutación especial.

45 El método para seleccionar un mutante basándose en la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa o el método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular incluyen los métodos que se han descrito antes en el apartado 1(1)(a). El método para seleccionar un mutante basándose en la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluye los métodos descritos en el siguiente apartado 4.

### 50 **(4) Método para inhibir la transcripción y/o traducción de la proteína de transporte de GDP-fucosa**

La célula anfitriona de la presente invención se puede preparar eligiendo como diana un gen que codifica la proteína de transporte de GDP-fucosa e inhibiendo la transcripción y/o traducción del gen diana de acuerdo con un método tal como la técnica del ARN/ADN antisentido [Bioscience and Industry, 50, 322 (1992); Chemistry, 46, 681 (1991); Biotechnology, 9, 358 (1992); Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992); Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992); Cell Engineering, 16, 1463 (1997)] o la técnica de la triple hélice [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)].

## **2. Método para la producción de la composición de anticuerpo**

60 La composición de anticuerpo se puede obtener expresándolo en una célula anfitriona utilizando los métodos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols in Molecular Biology, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (referido a veces más adelante en la presente como memoria "Antibodies"); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Tercera Edición, Acad. Press, 1993 (referido a veces más adelante en la presente memoria como "Monoclonal Antibodies"); y Antibody Engineering, A Practical Approach,

IRL Press en Oxford University Press (referido a veces en la presente memoria más adelante como "*Antibody Engineering*"), por ejemplo, como sigue.

Se prepara un ADNc de una molécula de anticuerpo.

Basándose en el ADNc total preparado de una molécula de anticuerpo, se prepara un fragmento de ADN de una longitud apropiada que comprende un radical que codifica la proteína, si fuera necesario.

Se prepara un vector recombinante insertando el fragmento de ADN o el ADN total aguas abajo del promotor de un vector de expresión apropiado.

Se puede obtener un transformante que produce la molécula de anticuerpo introduciendo el vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión.

En cuanto a la célula anfitriona, se utiliza una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

La célula anfitriona utilizada para la producción del anticuerpo de la presente invención incluye a célula anfitriona de la presente invención en la que la actividad de la proteína de transporte de GDP-fucosa se encuentra más suprimida o más disminuida que en su célula parental preparada en el 1 anterior.

En cuanto al vector de expresión, se utiliza un vector que es autónomamente replicable en la célula anfitriona o puede ser integrado en el cromosoma y comprende un promotor en una posición tal que se puede transferir el ADN que codifica la molécula de anticuerpo de interés.

El ADNc se puede preparar a partir de un tejido o célula humanos o no humanos utilizando, p. ej., un cebador sonda específico para la molécula de anticuerpo de interés de acuerdo con los métodos descritos en "Métodos de preparación de ADNc" en el apartado 1(1)(a).

Como se describe en la presente memoria cuando se utiliza una levadura como célula anfitriona, el vector de expresión incluye YEP13 (ATCC-37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419) y similares.

Se puede utilizar cualquier promotor, con tal que funcione en levaduras. Los ejemplos incluyen un promotor de un gen de la ruta glicolítica tal como un gen de hexosa quinasa, el promotor de PHO5, el promotor de PGK, el promotor de GAP, el promotor de ADH, el promotor de gal 1, el promotor de gal 10, el promotor de la proteína de choque térmico, el promotor de MF  $\alpha$ 1, el promotor de CUP 1 y similares.

Adicionalmente se describe en la presente memoria una célula anfitriona que incluye microorganismos pertenecientes al género *Saccharomyces*, el género *Schizosaccharomyces*, el género *Kluyveromyces*, el género *Trichosporon*, el género *Schwanniomyces* y similares, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans* y *Schwanniomyces alluvius*.

En cuanto al método para introducir el vector recombinante, se puede utilizar cualquier método, con tal que pueda introducir ADN en una levadura. Los ejemplos incluyen la electroporación [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)], el método del esferoplasto [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)], el método del acetato de litio [J. Bacteriol, 153, 163 (1983)], un método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) y similares.

Cuando se utiliza una célula animal, el vector de expresión incluye pcDNA1, pcDM8 (asequible de Funakoshi), pAGE107 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 22979/91; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 227075/90), pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)], pAGE210 y similares.

Se puede utilizar cualquier promotor, con tal que funcione en una célula animal. Los ejemplos incluyen un promotor del gen IE (temprano inmediato) de citomegalovirus (CMV), un promotor temprano de SV40, un promotor de

retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque término, un promotor de SR $\alpha$  y similares. Asimismo, se puede utilizar un intensificador del gen IE del CMV humano junto con el promotor.

La célula anfitriona de la presente invención es una célula seleccionada entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de ratón NSO;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana; y
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana.

En cuanto al método para introducir el vector recombinante, se puede utilizar cualquier método, con tal que pueda introducir ADN en una célula animal. Los ejemplos incluyen electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], el método del fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], el método de inyección [*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*], un método en el que se utiliza una pistola de partículas (pistola génica) (Patente Japonesa Núm. 2606856, Patente Japonesa Núm.2517813), el método del DEAE-dextrano [Biomannual Series 4-Gene Transfer and Expression Analysis (Yodo-sha), editado por Takashi Yokota y Kenichi Arai (1994)], el método del vector de virus (*Manipulating Mouse Embryo, Segunda Edición*) y similares.

Como se describe adicionalmente en la presente memoria, cuando se utiliza una célula de insecto como anfitrión, se puede expresar la proteína mediante el método descrito en Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992), Bio/Technology, 6,47 (1988) o similar.

Esto es, la proteína se puede expresar introduciendo simultáneamente un vector de introducción de un gen recombinante y un baculovirus en una célula de insecto para obtener un virus recombinante en un sobrenadante de cultivo de células de insecto e infectando después la célula de insecto con el virus recombinante.

El vector de introducción del gen utilizado en el método incluye pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (fabricados todos por Invitrogen) y similares.

El baculovirus incluye el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* que es infectado por un insecto de la familia *Barathra*.

La célula de insecto incluye oocitos Sf9 y Sf21 de *Spodoptera frugiperda* [Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992)], un oocito High 5 de *Trichoplusia ni* (fabricado por Invitrogen) y similares.

El método para la introducción simultánea del vector de introducción del gen recombinante y el baculovirus para preparar el virus recombinante incluye el método del fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84,7413 (1987)] y similares.

Como se describe adicionalmente en la presente memoria, cuando se utiliza una célula vegetal como célula anfitriona, el vector de expresión incluye el plásmido Ti, el vector del virus del mosaico del tabaco y similares.

En cuanto al promotor, se puede utilizar cualquier promotor, con tal que pueda funcionar en una célula vegetal. Los ejemplos incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor 1 de la actina de arroz y similares.

La célula anfitriona incluye células vegetales de tabaco, patata, tomate, zanahoria, soja, colza, alfalfa, arroz, trigo, cebada y similares.

En cuanto al método para introducir el vector recombinante, se puede utilizar cualquier método, con tal que pueda introducir ADN en una célula vegetal. Los ejemplos incluyen el método que utiliza *Agrobacterium* (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 140885/84, Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 70080/85, documento WO 94/00977), la electroporación (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 251887/85), el método que utiliza una pistola de partículas (pistola génica) (Patente Japonesa Núm. 2606856, Patente Japonesa Núm. 2517813) y similares.

En cuanto al método para expresar un gen de anticuerpo, se pueden llevar a cabo la producción de secreción, la expresión de una proteína de fusión y similares de acuerdo con el método descrito en *Molecular Cloning*, Segunda Edición o similar, además de la expresión directa.

5 Cuando el gen es expresado por una levadura, una célula animal, una célula de insecto o una célula vegetal en la cual se introduce un gen relacionado con la síntesis de una cadena de azúcar, se puede obtener una molécula de anticuerpo a la cual se añade un azúcar o una cadena de azúcar por medio del gen introducido.

10 Se puede obtener una composición de anticuerpo cultivando el transformante obtenido en un medio para la producción de y acumular la molécula de anticuerpo en el cultivo y después recuperándolo del cultivo resultante. El método para cultivar el transformante en un medio se puede llevar a cabo de acuerdo con el método general que se utiliza para el cultivo de células anfitrionas.

15 En cuanto al medio para cultivar un transformante obtenido utilizando un eucariota, tal como una levadura, como anfitrión, el medio puede ser un medio natural o un medio sintético, con tal que comprenda materiales tales como una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una sal inorgánica que puede ser asimilada por el organismo y el cultivo del transformante se pueda llevar a cabo eficazmente.

20 En cuanto a la fuente de carbono, se pueden utilizar aquellas que pueden ser asimiladas por el organismo. Los ejemplos incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que las contienen, almidón e hidrolizado de almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; alcoholes tales como etanol y propanol; y similares.

25 La fuente de nitrógeno incluye amoníaco; sales de amonio de ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio; otros compuestos que contienen nitrógeno; peptona; extracto de carne; extracto de levadura; aguas de infusión de maíz; hidrolizado de caseína; harina de soja; hidrolizado de harina de soja; diferentes células fermentadas y sus hidrolizados; y similares.

30 El material inorgánico incluye dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio, y similares.

35 El cultivo se lleva a cabo generalmente en condiciones aerobias tales como el cultivo con sacudimiento o el cultivo con agitación por aireación sumergido. La temperatura de cultivo es preferiblemente de 15 a 40°C, y el tiempo de cultivo es generalmente de 16 horas a 7 días. Durante el cultivo, el pH se mantiene de 3,0 a 9,0. El pH se ajusta utilizando un ácido inorgánico u orgánico, una solución de álcali, urea, carbonato de calcio, amoníaco o similar.

Si fuera necesario, se puede añadir un antibiótico tal como ampicilina o tetraciclina al medio durante el cultivo.

40 Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante obtenido utilizando un promotor inducible como promotor, se puede añadir un inductor al medio, si fuera necesario. Por ejemplo, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante obtenido utilizando el promotor *lac*, se puede añadir isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido al medio, y cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante obtenido utilizando el promotor de *trp*, se puede añadir al medio ácido indolacrílico.

45 Cuando se cultiva el transformante obtenido utilizando una célula animal como anfitrión, el medio incluye el medio RPMI 1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122,501 (1952)], medio MEM modificado por Dulbecco [Virology, 8, 396 (1959)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] y medio de Whitten [Developmental Engineering Experimentation Manual-Preparation of Transgenic Mice (Kodan-sha), editado por M. Katsuki (1987)], los medios a los que se añaden suero de ternera fetal, etc., generalmente utilizados y similares.

50 El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de 6 a 8 y de 30 a 40°C durante 1 a 7 días en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. Asimismo, el cultivo se puede llevar a cabo durante un día a varios meses de acuerdo con un método de cultivo tal como el cultivo semi-continuo o en fibra hueca.

55 Si fuera necesario, se puede añadir un antibiótico tal como kanamicina o penicilina al medio durante el cultivo. El medio para cultivar un transformante obtenido utilizando una célula de insecto como anfitrión incluye el medio TNM-FH (fabricado por Pharmingen), el medio Sf-900 II SFM (fabricado por Life Technologies), ExCell 400 y ExCell 405 (fabricados ambos por JRH Biosciences), el Medio para Insecto de Grace [Nature, 195, 788 (1962)] generalmente utilizados y similares.

El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH del medio de 6 a 7 y de 25 a 30°C durante 1 a 5 días.

Además, se pueden añadir al medio antibióticos tales como gentamicina durante el cultivo, si fuera necesario.

5 El transformante obtenido utilizando una célula vegetal como anfitrión se puede cultivar en forma de célula o después de diferenciarlo en una célula u órgano vegetal. El medio para cultivar el transformante incluye el medio de Murashige y Skoog (MS) y el medio de White, los medios a los cuales se añade una hormona vegetal tal como auxina o citoquinina generalmente utilizados, y similares.

El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de 5 a 9 y de 20 a 40°C durante 3 a 60 días.

10 Además, si fuera necesario, se puede añadir al medio un antibiótico tal como kanamicina o higromicina durante el cultivo.

15 Como se ha comentado antes, se puede producir una composición de anticuerpo cultivando un transformante derivado de levadura, de una célula animal o de una célula vegetal, que comprende un vector recombinante en el que se inserta un ADN que codifica una molécula de anticuerpo, de acuerdo con un método de cultivo general, para la producción de y acumular de ese modo la composición de anticuerpo, y recuperando después la composición de anticuerpo del cultivo.

20 El método para la producción de una composición de anticuerpo incluye un método de expresión intracelular en una célula anfitriona, un método de secreción extracelular a partir de una célula anfitriona, y un método de producción sobre una envoltura externa de la membrana de la célula anfitriona. El método se puede seleccionar cambiando la célula anfitriona utilizada o la estructura de la composición de anticuerpo producida

25 Cuando la composición de anticuerpo se produce en una célula anfitriona o sobre una envoltura externa de una membrana de la célula anfitriona, esta puede ser secretada positivamente de manera extracelular de acuerdo con el método de Paulson et al. [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)], los métodos descritos en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 336963/93 y la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 823021/94 y similares.

30 Esto es, la molécula de anticuerpo de interés puede ser secretada positivamente extracelularmente a partir de una célula anfitriona insertando un ADN que codifica la molécula de anticuerpo y un ADN que codifica un péptido señal adecuado para la expresión de la molécula de anticuerpo en un vector de expresión de acuerdo con una técnica de recombinación génica, introduciendo el vector de expresión en la célula anfitriona.

35 Asimismo, su cantidad de producción puede ser incrementada de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 227075/90 de acuerdo con un sistema de amplificación génica utilizando un gen de dihidrofolato reductasa.

40 Por añadidura, la composición de anticuerpo también puede ser producida utilizando un individuo animal con un gen introducido (animal no humano transgénico) o individuo vegetal (planta transgénica) que se construye por medio de la re-diferenciación de una célula animal o vegetal en el que se ha introducido el gen.

45 Cuando el transformante es un individuo animal o un individuo vegetal, se puede producir una composición de anticuerpo de acuerdo con un método general criándola o cultivándola para la producción de y acumular de ese modo la composición de anticuerpo y recuperando después la composición de anticuerpo a partir del individuo animal o vegetal.

50 El método para la producción de una composición de anticuerpo utilizando un individuo animal incluye un método en el que la composición de anticuerpo de interés es producida en un animal construido introduciendo un gen de acuerdo con un método conocido [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996); American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)].

55 En el caso de un individuo animal, se puede producir una composición de anticuerpo criando un animal no humano transgénico en el que se introduce un ADN que codifica una molécula de anticuerpo para la producción de y acumular de ese modo la composición de anticuerpo en el animal, y recuperando después la composición de anticuerpo a partir del animal. Los lugares del animal en los que se produce y se acumula la composición incluyen la leche (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 309192/88) y los huevos del animal. En cuanto al promotor utilizado en este caso, se puede utilizar cualquier promotor, con tal que funcione en el animal. Los ejemplos preferidos incluyen los promotores específicos de las células de las glándulas mamarias tales como el  
60 promotor de la  $\alpha$  caseína, el promotor de la caseína  $\beta$ , el promotor de la  $\beta$ -lactoglobulina, el promotor de la proteína ácida del suero y similares.

El procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo utilizando un individuo vegetal incluye el método en el que se produce una composición de anticuerpo cultivando una planta transgénica en la cual se introduce un ADN que codifica una molécula de anticuerpo por medio de un método conocido [Tissue Culture (Soshiki Baiyo), 20 (1994); Tissue Culture (Soshiki Baiyo), 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] para la producción de y acumular la composición de anticuerpo en la planta, y recuperando después la composición de anticuerpo a partir de la planta.

Con respecto a la purificación de una composición de anticuerpo producida por un transformante en el que se introduce un gen que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, cuando la composición de anticuerpo es expresada intracelularmente en un estado disuelto, se recuperan las células después del cultivo mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuoso y después se desorganizan utilizando un oscilador ultrasónico, una prensa French, un homogeneizador Manton Gaulin, un Dynamill o similar para obtener un extracto libre de células, que se centrifuga para obtener un sobrenadante, y se puede obtener un producto purificado de la composición de anticuerpo sometiendo el sobrenadante a una técnica de aislamiento con enzima general y se pueden utilizar técnicas de purificación tales como la extracción con disolvente; la precipitación por adición de sal y la eliminación de las sales con sulfato de amonio; *etc.*; la precipitación con un disolvente orgánico; la cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina tal como DIAION HPA-75 (fabricado por Mitsubishi Chemical); la cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina tal como S-Sepharose FF (fabricado por Pharmacia); la cromatografía hidrófoba utilizando una resina tal como butil-Sepharose o fenil-Sepharose; la filtración en gel utilizando un tamiz molecular; la cromatografía de afinidad; el cromatoenfoco; la electroforesis tal como el enfoque isoelectrico; y similares solas o combinadas.

Cuando la composición de anticuerpo se expresa intracelularmente formando un cuerpo insoluble, las células se recuperan, se desorganizan y se centrifugan de la misma manera, y el cuerpo insoluble de la composición de anticuerpo se recupera en forma de una fracción de precipitación. El cuerpo insoluble de la composición de anticuerpo recuperado se solubiliza con un agente desnaturante de proteínas. La composición de anticuerpo se elabora en una estructura tridimensional normal diluyendo o sometiendo a diálisis la solución solubilizada, y después se obtiene un producto purificado de la composición de anticuerpo mediante el mismo método de purificación y aislamiento.

Cuando la composición de anticuerpo es secretada extracelularmente, la composición de anticuerpo o sus derivados se pueden recuperar del sobrenadante de cultivo. Esto es, el cultivo se trata por medio de una técnica tal como la centrifugación para obtener una fracción soluble, y se puede obtener una preparación purificada de la composición de anticuerpo a partir de la fracción soluble mediante el mismo método de purificación y aislamiento.

La composición de anticuerpo obtenida de este modo incluye un anticuerpo, el fragmento del anticuerpo, una proteína de fusión que comprende la región Fc del anticuerpo, y similares.

En cuanto a los ejemplos de la composición de anticuerpo, los procedimientos para la producción de una composición de anticuerpo humanizada y una proteína de fusión de Fc se describen con detalle más abajo, pero también se pueden obtener otras composiciones de anticuerpo de una manera similar a estos métodos.

#### **A. Preparación composición de anticuerpo humanizada**

##### **(1) Construcción del vector de expresión para la expresión del anticuerpo humanizado**

El vector para la expresión del anticuerpo humanizado es un vector de expresión para células animales en las cuales se han insertado genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano, que se pueden construir clonando cada uno de los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para una célula animal.

Las regiones C de un anticuerpo humano pueden ser la CH y la CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen la región C perteneciente a la subclase IgG1 de la cadena H de un anticuerpo humano (referida más adelante en la presente memoria como "hC<sub>H</sub>1"), la región C perteneciente a la clase κ de la cadena L de un anticuerpo humano (referida más adelante en la presente memoria como "hC<sub>L</sub>κ"), y similares.

En cuanto a los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano, se puede utilizar un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón, y también se puede utilizar un ADNc.

En cuanto al vector de expresión para una célula animal, se puede utilizar cualquier vector, con tal que se pueda insertar y expresar en él un gen que codifique una región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] y similares. El promotor y el intensificador del vector de expresión para una célula animal incluyen el promotor temprano y el

intensificador de SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], el promotor LTR del virus de la leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], el promotor [Cell, 41, 479 (1985)] y el intensificador [Cell, 33, 717 (1983)] de la cadena H de la inmunoglobulina, y similares.

5 El vector para la expresión de un anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que existen genes que codifican la cadena H y la cadena L de un anticuerpo sobre vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (referido más adelante en la presente memoria como "tipo tándem"). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector para la expresión de anticuerpos humanizados, la facilidad de introducción en células animales, y al equilibrio entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L de un anticuerpo en células animales, es más preferido el tipo tándem del vector de expresión para anticuerpos humanizados [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)].

Se puede utilizar el vector construido para la expresión de anticuerpos humanizados para la expresión de un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo injertado con CDR humana en células animales.

## 15 (2) Método de preparación de ADNc que codifica una región V de un anticuerpo animal no humano

Los ADN que codifican VH y VL de un anticuerpo animal no humano tal como un anticuerpo de ratón se pueden obtener de la siguiente manera.

20 Se sintetiza un ADNc a partir de ARNm extraído de una célula de hibridoma que produce el anticuerpo de ratón de interés. El ADNc sintetizado se clona en un vector tal como un fago o plásmido para obtener una genoteca de ADNc. Cada uno de los fagos recombinantes o plásmidos recombinantes que comprende un ADNc que codifica VH y de los fagos recombinantes o plásmidos recombinantes que comprenden un ADNc que codifica VL se aísla de la genoteca utilizando una parte de la región C o una parte de la región V de un anticuerpo de ratón existente como sonda. Se determinan las secuencias de nucleótidos de VH y VL completas del anticuerpo de ratón de interés sobre el fago recombinante o el plásmido recombinante, y se deducen las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL a partir de las secuencias de nucleótidos.

30 En cuanto al animal no humano, se puede utilizar cualquier animal tal como un ratón, una rata, un hámster o un conejo, con tal que se pueda producir a partir de ellos una célula de hibridoma.

35 El método para preparar un ARN total a partir de una célula de hibridoma incluye el método del tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)] y similares, y el método para preparar ARNm a partir del ARNm total RNA incluye un método en columna de celulosa con oligo(dT)-inmovilizado (*Molecular Cloning*, Segunda Edición) y similares. Además, un kit para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma incluye el kit de Aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

40 El método para sintetizar un ADNc y preparar una genoteca de ADNc incluye los métodos habituales (*Molecular Cloning*, Segunda Edición, *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34), los métodos en los que se utiliza un kit disponible en el mercado tal como SuperScript<sup>®</sup>, Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (fabricado por GIBCO BRL) o ZAP-cDNA Synthesis Kit (fabricado por Stratagene), y similares.

45 En la preparación de la genoteca de ADNc, el vector en el que un ADNc sintetizado utilizando ARNm extraído de una célula de hibridoma como molde es insertado, puede ser cualquier vector, con tal se pueda insertar el ADNc. Los ejemplos incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λzapII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] y similares.

55 En cuanto a la *Escherichia coli* en la que se introduce la genoteca de ADNc construida a partir de un vector de fago o plasmídico, se puede utilizar cualquier *Escherichia coli*, con tal que se pueda introducir, expresar y mantener la genoteca de ADNc. Los ejemplos incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088 y Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] y similares.

60 En cuanto al método para seleccionar un clon de ADNc que codifica la VH y la VL de un anticuerpo de un animal no humano a partir de la genoteca de ADNc, se puede utilizar la hibridación de colonias o la hibridación de placas utilizando una sonda marcada con isótopos o con fluorescencia (*Molecular Cloning*, Segunda Edición). El ADNc que codifica la CH y la VL también se puede preparar elaborando cebadores y llevando a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (referida más adelante en la presente memoria como "PCR"; *Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34) utilizando un ADNc sintetizado a partir del ARNm o de una genoteca de ADNc como molde.

Las secuencias de nucleótidos de los ADNc se pueden determinar digiriendo los ADNc seleccionados con enzimas de restricción apropiadas, clonando los fragmentos en un plásmido tal como Bluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo la reacción de un método de análisis de la secuencia de nucleótidos tal como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)], y analizando después los clones utilizando un analizador tal como el Secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia). Que los ADNc obtenidos codifiquen o no las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que comprende una secuencia señal secretora se puede confirmar deduciendo las secuencias de aminoácidos completas de la VH y la VL a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y comparándolas con las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (1991), referida más adelante en la presente memoria como "*Sequence of Proteins of Immunological Interest*"].

### (3) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V de un anticuerpo animal no humano

Con respecto a las secuencias de aminoácidos completas de la VH y la VL del anticuerpo que comprende la secuencia señal secretora, se puede deducir la longitud de la secuencia señal secretora y las secuencias de aminoácidos N-terminales y también se pueden encontrar los subgrupos a los cuales perteneces, comparándolas con las secuencias de aminoácidos completas de las VH y VL de anticuerpos conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*). Además, también se pueden encontrar las secuencias de aminoácidos de cada CDR de VH y VL comparándolas con las secuencias de aminoácidos de las VH y VL de anticuerpos conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

### (4) Construcción del vector de expresión del anticuerpo quimérico humano

Se puede construir un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano clonando los ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo animal no humano aguas arriba de los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado descrito en el apartado 2 (1). Por ejemplo, se puede construir un vector de expresión de un anticuerpo quimérico humano conectando cada uno de los ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo animal no humano con un ADN sintético que comprende las secuencias de nucleótidos de los extremos 3' de la VH y la VL de un anticuerpo animal no humano y que también tiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en ambos extremos, y clonándolas aguas arriba de los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano contenido en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado descrito en el apartado 2 (1).

### (5) Construcción del ADNc que codifica la región V del anticuerpo injertado con CDR humana

Los ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo injertado con CDR humana se pueden obtener como sigue. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de los marcos (referidos más adelante en la presente memoria como "FR") de la VH y la VL de un anticuerpo humano para injertar la CDR de una VH y una VL de un anticuerpo animal no humano. En cuanto a las secuencias de aminoácidos de los FR de la VH y la V de un anticuerpo humano, se puede utilizar cualquiera de las secuencias de aminoácidos con tal que deriven de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen las secuencias de aminoácidos de los FR de VH y VL de anticuerpos humanos registradas en las bases de datos tales como Protein Data Bank, las secuencias de aminoácidos comunes a cada subgrupo de las Fr de la VH y la VL de anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*) y similares. Con el fin de producir un anticuerpo injertado con CDR humana que tenga suficientes actividades, se prefiere seleccionar una secuencia de aminoácidos que tenga una homología tal alta como sea posible (al menos 60% o más) con las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL de un anticuerpo animal no humano de interés.

A continuación, se injertan las secuencias de aminoácidos de las CDR de la VH y la VL del anticuerpo animal no humano de interés en las secuencias de aminoácidos de los FR de la VH y la VL seleccionadas de un anticuerpo humano para diseñar las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL del anticuerpo injertado con la CDR humana. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en las secuencias de ADN considerando la frecuencia del uso codónico encontrado en las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*), y se diseñan las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL del anticuerpo injertado con CDR humana. Basándose en las secuencias de ADN diseñadas, se sintetizan diferentes ADN sintéticos que tienen una longitud de aproximadamente 100 bases, y se lleva a cabo la PCR utilizándolos. En este caso, se prefiere diseñar, en cada cadena H y cada cadena L, 6 ADN sintéticos a la vista de la eficacia de la reacción de PCR y las longitudes de los ADN que se pueden sintetizar.

Asimismo, se pueden clonar fácilmente en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado descrito en el apartado 2 (1) introduciendo las secuencias de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en los extremos 5' del ADN sintético en ambos extremos. Después de la PCR, se clona el producto amplificado en un

plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) y se determinan las secuencias de nucleótidos mediante el método del apartado 2 (2) para obtener de ese modo un plásmido que tiene secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL del anticuerpo injertado con la CDR humana deseada.

#### 5 **(6) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo injertado con CDR humana**

Se sabe que cuando se produce un anticuerpo injertado con CDR humana injertando simplemente sólo las CDR en la VH y la VL de un anticuerpo animal no humano en los FR de la VH y la VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión al antígeno es inferior a la del anticuerpo animal no humano original [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)].  
 10 Como razón, se considera que los diversos residuos de aminoácido de los FR distintos de las CDR se relacionan directamente o indirectamente con la actividad de unión al antígeno de la VH y la VL del anticuerpo animal no humano original, y que éstos son cambiados a diferentes residuos de aminoácido de los FR de la VH y la VL de un anticuerpo humano. Con el fin de resolver el problema, en los anticuerpos injertados con CDR humanas, entre las  
 15 secuencias de aminoácidos de los FR de la VH y la VL de un anticuerpo humano, se identifica un residuo de aminoácido que está directamente relacionado con la unión a un antígeno, o un residuo de aminoácido que está indirectamente relacionado con la unión a un antígeno interaccionando con un residuo de aminoácido de la CDR o manteniendo la estructura tridimensional de un anticuerpo y se modifica a un residuo de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo animal no humano original para incrementar de ese modo la actividad de unión al antígeno que ha sido descrita [BIOTECHNOLOGY, 9, 266 (1991)].

En la preparación de un anticuerpo injertado con CDR humana, es sumamente importante identificar eficazmente los residuos de aminoácido relacionados con la actividad de unión al antígeno en el FR. Para identificar los residuos de aminoácido del FR relacionados con la actividad de unión a antígeno del anticuerpo, se construye la estructura tridimensional de un anticuerpo, y se analiza mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)],  
 25 modelado por ordenador [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] o similar. Aunque la información de la estructura tridimensional de los anticuerpos ha resultado útil en la producción de un anticuerpo injertado con CDR humana, todavía no se ha establecido un método para la producción de un anticuerpo injertado con CDR humana que se pueda aplicar a todos los anticuerpos. Por lo tanto, en la actualidad deben ser necesarios diferentes intentos, por ejemplo se producen diferentes anticuerpos modificados de cada anticuerpo y se examina la relación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión al anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos de los FR de la VH y la VL de un anticuerpo humano se puede modificar utilizando un ADN sintético para la modificación de acuerdo con la PCR como se ha descrito en el apartado 2 (5). Con respecto al producto amplificado obtenido por medio de la PCR, se determina la secuencia de nucleótidos de acuerdo con el  
 35 método descrito en el apartado 2 (2) de manera que se confirma si se ha llevado a cabo la modificación objetivo.

#### **(7) Construcción del vector de expresión del anticuerpo injertado con CDR humana**

Se puede construir un vector de expresión del anticuerpo injertado con CDR humana clonando los ADNc que codifican la VH y la VL del anticuerpo injertado con CDR humana construido en los apartados 2 (5) y (6) aguas arriba del gen que codifica la CH y la CL de un anticuerpo humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado descrito en el apartado 2 (1). Por ejemplo, se puede construir el vector de expresión del anticuerpo injertado con CDR humana introduciendo las secuencias de una enzima de restricción apropiada en los extremos 5' de ambos  
 45 extremos de un fragmento de un ADN sintético, entre los fragmentos de ADN sintético que se utilizan cuando se lleva a cabo la PCR en los apartados 2 (5) y (6) para construir la VH y la VL del anticuerpo injertado con CDR humana, de manera que se clonan aguas arriba de los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado descrito en el apartado 2 (1) de tal manera que puedan ser expresados de una forma adecuada.

#### 50 **(8) Producción adecuada de anticuerpo humanizado**

Se puede obtener un transformante capaz de producir establemente un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo injertado con CDR humana (referidos ambos más adelante en la presente memoria como "anticuerpo humanizado") introduciendo el vector de expresión del anticuerpo humanizado descrito en los apartados 2 (4) y (7)  
 55 en una célula animal apropiada.

El método para introducir un vector de expresión de anticuerpo humanizado en una célula animal incluye la electroporación [Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] y similares.

60 En cuanto a la célula animal en la cual se introduce un vector de expresión humanizado, se puede utilizar cualquier célula con tal que ésta sea una célula animal que pueda producir el anticuerpo humanizado.

Los ejemplos incluyen células de mieloma de ratón tales como células NS0 y células SP2/0, células de ovario de hámster Chino tales como células CHO/dhfr y células CHO/DG44, mieloma de rata tales como células YB2/0 y células IR983F, células BHK derivadas de riñón de hámster sirio, células de mieloma humano tales como células Namalwa, y similares, y células de ovario de hámster Chino CHO/DG44, células de mieloma de rata YB2/0 y se prefieren las células anfitrionas de la presente invención descritas en el apartado 1.

Tras la introducción del vector de expresión del anticuerpo humanizado, se puede seleccionar un transformante capaz de producir establemente el anticuerpo humanizado utilizando un medio para el cultivo de células animales que comprende un agente tal como sulfato G418 (referido más adelante en la presente memoria como "G418"; fabricado por SIGMA) y similares de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90. El medio para cultivar células animales incluye medio RPMI 1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), medio EX-CELL 302 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por GIBCO BRL), medio Hybridoma-SFM (fabricado por GIBCO BRL), medio obtenido añadiendo diversos aditivos tales como suero bovino fetal (referido más adelante en la presente memoria como "FBS") a estos medios, y similares. El anticuerpo humanizado se puede producir y acumular en el sobrenadante de cultivo cultivando el transformante obtenido en un medio. La cantidad de producción y de actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado en el sobrenadante de cultivo se puede medir mediante un método tal como un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (referido más adelante en la presente memoria como "ELISA"; *Antibodies, Monoclonal Antibodies*) o similar. Asimismo, se puede incrementar la cantidad del anticuerpo humanizado producido por el transformante utilizando un sistema de amplificación del gen DHFR de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90.

El anticuerpo humanizado se puede purificar a partir de un sobrenadante de cultivo del transformante utilizando una columna de proteína A (*Antibodies, Monoclonal Antibodies*). Además, también se pueden utilizar métodos de purificación utilizados generalmente para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la purificación se puede llevar a cabo combinando la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico y la ultrafiltración. El peso molecular de la cadena H, la cadena L o la molécula de anticuerpo en su totalidad del anticuerpo humanizado purificado se puede medir, p. ej., mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [referida más adelante en la presente memoria como "SDS-PAGE"; *Nature*, 227, 680 (1970)], transferencia Western (*Antibodies, Monoclonal Antibodies*) o similar.

## B. Preparación de la proteína de fusión con Fc

### (1) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión con Fc

Un vector de expresión de una proteína de fusión con Fc es un vector de expresión para células animales en el que se insertan los genes que codifican la región Fc de un anticuerpo humano y una proteína que se va a fusionar, que puede ser construido clonando cada uno de los genes que codifican la región Fc de un anticuerpo humano y la proteína que se va a fusionar en un vector de expresión para células animales.

La región Fc de un anticuerpo humano incluye aquellas que contienen una porción de una región bisagra y/o CH1 además de las regiones que contienen las regiones CH2 y CH3. Asimismo, puede ser cualquier región Fc con tal que se pueda suprimir, sustituir, añadir o insertar al menos un aminoácido de CH2 o CH3, y tenga esencialmente actividad de unión al receptor Fcγ.

En cuanto a los genes que codifican la región Fc de un anticuerpo humano y la proteína que se va a fusionar, se puede utilizar un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón, y también se puede utilizar un ADNc. El método para conectar los genes y la región Fc incluye la PCR en la que se utiliza cada una de las secuencias génicas como molde (*Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34).

En cuanto al vector de expresión para células animales, se puede utilizar cualquier vector, con tal que se pueda insertar y expresar en él un gen que codifique la región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen pAGE107 [Cytotechnology, 3 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] y similares. El promotor y el intensificador del vector de expresión para células animales incluyen el promotor y el intensificador tempranos de SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], el promotor LTR del virus de la leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], el promotor [Cell, 41, 479 (1985)] y el intensificador [Cell, 33 717 (1983)] de la cadena H de la inmunoglobulina, y similares.

### (2) Preparación del ADN que codifica la región Fc del anticuerpo humano y la proteína que se va a fusionar

Se puede obtener un ADN que codifica la región Fc de un anticuerpo humano y la proteína que se va a fusionar de la siguiente manera.

Se sintetiza un ADN a partir del ARNm extraído de una célula o tejido que expresa la proteína de interés que se va a fusionar con Fc. El ADNc sintetizado se clona en un vector tal como un fago o un plásmido para obtener una genoteca de ADNc. Se aísla el fago recombinante o el plásmido recombinante que comprende el ADN que codifica la proteína de interés de la genoteca utilizando la porción de la secuencia del gen de la proteína de interés como sonda. Se determina la secuencia de nucleótidos completa del anticuerpo de interés en el fago recombinante o el plásmido recombinante, y se deduce una secuencia de aminoácidos completa a partir de la secuencia de nucleótidos.

En cuanto al animal no humano, se puede utilizar cualquier animal tal como un ratón, una rata, un hámster o un conejo con tal que se pueda separar de él una célula o tejido.

El método para preparar un ARN total a partir de una célula o tejido incluye el método del tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)] y similares, y el método para preparar ARNm a partir de ARN total incluye el método de la columna de celulosa con oligo(dT) inmovilizado (*Molecular Cloning*, Segunda Edición) y similares. Además, un kit para preparar ARNm a partir de una célula o tejido incluye el Kit para el Aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el Kit de Purificación de ARNm (fabricado por Pharmacia) y similares.

El método para sintetizar un ADNc y preparar una genoteca de ADNc incluye los métodos habituales (*Molecular Cloning*, Segunda Edición; *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34); los métodos que utilizan un kit disponible en el mercado tales como SuperScript<sup>®</sup>, Sistema de Plásmidos para la Síntesis de ADNc y Clonación de Plásmidos (fabricado por GIBCO BRL) o el Kit de Síntesis de ADNc ZAP (fabricado por Stratagene); y similares.

En la preparación de la genoteca de ADNc, el vector en el que se inserta un ADNc sintetizado utilizando ARNm extraído de una célula o tejido como molde puede ser cualquier vector con tal que se pueda insertar el ADNc. Los ejemplos incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λzapII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] y similares.

En cuanto a la *Escherichia coli* en la cual se introduce la genoteca de ADNc construida a partir de un vector de fago o plásmido, se puede utilizar cualquier *Escherichia coli*, con tal que se pueda introducir, expresar y mantener la genoteca de ADNc. Los ejemplos incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088 y Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] y similares.

En cuanto al método para seleccionar un clon de ADNc que codifica la proteína de interés a partir de la genoteca de ADNc, se puede utilizar la hibridación de colonias o la hibridación de placas empleando una sonda marcada con isótopos o fluorescencia (*Molecular Cloning*, Segunda Edición). El ADNc que codifica la proteína de interés también se puede preparar elaborando cebadores y utilizando un ADNc sintetizado a partir del ARNm o una genoteca de ADNc como molde de acuerdo con la PCR.

El método para fusionar la proteína de interés con la región Fc de un anticuerpo humano incluye PCR. Por ejemplo, se diseñan oligo ADN sintetizados (cebadores) en el extremo 5' y el extremo 3' de la secuencia génica que codifica la proteína de interés, y se lleva a cabo la PCR para preparar un producto de PCR. De la misma manera, se diseñan los cebadores para la secuencia génica que codifica la región Fc de un anticuerpo humano que se va a fusionar para preparar un producto de PCR. En este momento, se diseñan los cebadores de tal manera que el mismo sitio para la enzima de restricción o la misma secuencia génica están presentes entre el extremo 3' del producto de PCR de la proteína que se va a fusionar y el extremo 5' del producto de PCR de la región Fc. Cuando es necesario modificar los aminoácidos en torno al sitio de conexión, se introduce una mutación utilizando el cebador en el que se había introducido la mutación. La PCR se lleva a cabo adicionalmente utilizando las dos clases de fragmentos de PCR obtenidos para conectar los genes. Asimismo, se pueden conectar llevando a cabo la ligación después del tratamiento con la misma enzima de restricción.

La secuencia de nucleótidos del ADN se puede determinar digiriendo la secuencia génica conectada mediante el método anterior con las enzimas de restricción apropiadas, clonando los fragmentos en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo el análisis utilizando un método de análisis de secuencias de nucleótidos empleado generalmente tal como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] o un analizador de secuencias de nucleótidos automático tal como el Secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia).

Se puede confirmar si el ADN obtenido codifica o no las secuencias de aminoácidos completas de la proteína de fusión que contiene la secuencia señal deduciendo la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de fusión

con Fc a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y comparándola con la secuencia de aminoácidos de interés.

### (3) Producción estable de la proteína de fusión con Fc

Se puede obtener un transformante capaz de producir establemente una proteína de fusión con Fc introduciendo el vector de expresión de la proteína de fusión con Fc descrito en el apartado (1) en una célula animal apropiada.

El método para introducir el vector de expresión de la proteína de fusión con Fc en una célula animal incluye la electroporación [Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] y similares.

En cuanto a la célula animal en la cual se introduce el vector de expresión de la proteína de fusión con Fc, se puede utilizar cualquier célula, con tal que ésta sea una célula animal que pueda producir la proteína de fusión con Fc.

Los ejemplos incluyen células de mieloma de ratón tales como células NS0 y células SP2/0, células de ovario de hámster Chino tales como células CHO/dhfr y células CHO/DG44, células de mieloma de rata tales como células YB2/0 y células IR983F, células BHK derivadas de riñón de hámster sirio, células de mieloma humano tales como células Namalwa, y similares, y se prefieren las células de ovario de hámster Chino CHO/DG44, células de mieloma de rata YB2/0 y las células anfitrionas utilizadas en el método de la presente invención descrito en el apartado 1.

Tras la introducción del vector de expresión de la proteína de fusión con Fc, se puede seleccionar un transformante capaz de producir establemente el vector de expresión de la proteína de fusión con Fc utilizando un medio para el cultivo de células animales que comprende un agente tal como G418 y similares de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90. Los medios para el cultivo de animales incluyen medio RPMI 1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), medio EX-CELL 302 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por GIBCO BRL), medio de Hibridoma-SFM (fabricado por GIBCO BRL), medios obtenidos añadiendo diversos aditivos tales como suero bovino fetal a estos medios, y similares. Se puede producir y acumular la proteína de fusión con Fc en el sobrenadante de cultivo cultivando el transformante obtenido en un medio. La cantidad de producción y la actividad de unión al antígeno de la proteína de fusión con Fc del sobrenadante de cultivo se pueden medir mediante un método tal como ELISA. Asimismo, se puede incrementar la cantidad de proteína de fusión con Fc producida por el transformante utilizando un sistema de amplificación del gen *dhfr* de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada Núm. 257891/90.

Se puede purificar la proteína de fusión con FC a partir de un sobrenadante de cultivo cultivando el transformante por medio del uso de una columna de proteína A o una columna de proteína G (*Antibodies*, Capítulo 8; *Monoclonal Antibodies*). Además, también se pueden utilizar métodos de purificación empleados generalmente para la purificación de proteínas. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la purificación combinando la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico y la ultrafiltración. El peso molecular en conjunto de la molécula de proteína de fusión con Fc purificada se puede medir mediante SDS-PAGE [Nature, 227, 680 (1970)], transferencia Western (*Antibodies*, Capítulo 12, *Monoclonal Antibodies*) o similar.

De este modo, se han descrito los métodos para la producción de una composición de anticuerpo utilizando una célula animal como célula anfitriona, pero, como se ha descrito antes, ésta también puede ser producida por levaduras, células de insecto, células vegetales, individuos animales o individuos vegetales mediante los mismos métodos que las células animales.

Cuando la célula anfitriona de la presente invención es capaz de preparar la molécula de anticuerpo, la composición de anticuerpo de la presente invención se puede preparar cultivando la célula anfitriona de la presente invención capaz de expresar la molécula de anticuerpo de acuerdo con el método descrito en el apartado 1 anterior, cultivando la célula, y recuperando la composición de anticuerpo de interés.

### 3. Evaluación de la actividad de la composición de anticuerpo

En cuanto al método para medir la cantidad de la composición de anticuerpo purificada, la actividad de unión a un anticuerpo y la función efectora de la composición de anticuerpo purificada, se puede utilizar el método conocido descrito en *Monoclonal Antibodies*, *Antibody Engineering* y similares.

Por ejemplo, cuando la composición de anticuerpo es un anticuerpo humanizado, se pueden medir la actividad de unión con un antígeno y la actividad de unión con un clon cultivado positivo para el antígeno mediante métodos tales como ELISA y un método de inmunofluorescencia [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]. La actividad citotóxica frente a un clon cultivado positivo para un antígeno se puede evaluar midiendo la actividad CDC, la actividad CCDA [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] y similares.

Asimismo, se pueden evaluar la seguridad y el efecto terapéutico de la composición de anticuerpo en seres humanos utilizando un modelo apropiado de especie animal relativamente próxima al ser humano, tal como *Macaca fascicularis*.

#### 4. Análisis de las cadenas de azúcar de la composición de anticuerpo

Se puede analizar la estructura de la cadena de azúcar que se une a la molécula de anticuerpo expresada en diferentes células de acuerdo con el análisis general de la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína. Por ejemplo, la cadena de azúcar que se une a una molécula de IgG comprende un azúcar neutro tal como galactosa, manosa, fucosa, un aminoazúcar tal como *N*-acetilglucosamina y un azúcar ácido tal como ácido siálico, y se pueden analizar mediante un método tal como el análisis de la estructura de la cadena de azúcar utilizando el análisis de la composición de azúcar, el mapeo de la cadena de azúcar bidimensional o similar.

##### (1) Análisis de composiciones azúcares neutros y aminoazúcares

La composición de la cadena de azúcar que se une a una molécula de anticuerpo se puede analizar llevando a cabo la hidrólisis ácida de las cadenas de azúcar con ácido trifluoroacético o similar para liberar un azúcar neutro o un aminoazúcar y midiendo la proporción de la composición.

Los ejemplos incluyen un método en el que se utiliza un analizador de la composición de azúcar (BioLC) fabricado por Dionex. El BioLC es un aparato que analiza la composición de azúcar por medio de HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos) [J. Liq. Chromatogr., 6 1577 (1983)].

La proporción de la composición también se puede analizar mediante un método de marcaje con fluorescencia utilizando 2-aminopiridina. Específicamente, la proporción de la composición se puede calcular de acuerdo con un método conocido [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283-284 (1991)] mediante marcaje de una muestra hidrolizada con ácido con fluorescencia con 2-aminopiridilación y analizando después la composición mediante HPLC.

##### (2) Análisis de la estructura de la cadena de azúcar

La estructura de la cadena de azúcar que se une a una molécula de anticuerpo se puede analizar mediante el método de mapeo de la cadena de azúcar bidimensional [Anal. Biochem., 171, 73 (1988), Biochemical Experimentation Methods 23 -Methods for Studying Glycoprotein Sugar Chains (Japan Scientific Societies Press) editado por Reiko Takahashi (1989)]. El método de mapeo de la cadena de azúcar bidimensional es un método para deducir la estructura de la cadena de azúcar, p. ej., trazando el tiempo de retención o la posición de elución de una cadena de azúcar mediante cromatografía de fase inversa en el eje de la X y el tiempo de retención o la posición de elución de la cadena de azúcar mediante cromatografía de fase normal en el eje de la Y, respectivamente, y comparándolos con los de cadenas de azúcares conocidos.

Específicamente, las cadenas de azúcar se liberan de un anticuerpo sometiendo el anticuerpo a hidrazinólisis, y la cadena de azúcar liberada se somete a marcaje con fluorescencia con 2-aminopiridina (referida más adelante en la presente memoria como "PA") [J. Biochem., 95, 197 (1984)], y después se separan las cadenas de azúcar de un exceso de reactivo de tratamiento de PA mediante filtración en gel, y se someten a cromatografía de fase inversa. Después de eso, se somete cada pico de las cadenas de azúcar separadas a cromatografía en fase normal. La estructura de la cadena de azúcar se puede deducir trazando los resultados sobre un mapa de la cadena de azúcar bidimensional y comparándolos con las aplicaciones de una cadena de azúcar patrón (fabricado por Takara Shuzo) o de una publicación [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)].

La estructura deducida mediante el método de mapeo de la cadena de azúcar bidimensional se puede confirmar llevando a cabo adicionalmente la espectrometría de masas tal como MALDI-TOF-MS de cada cadena de azúcar.

#### 5. Aplicación de la composición de anticuerpo obtenida en la presente invención

La composición de anticuerpo obtenida en la en la presente invención tiene una elevada actividad CCDA. Un anticuerpo que tiene una elevada actividad CCDA es útil para prevenir y tratar diferentes enfermedades incluyendo cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias tales como enfermedades autoinmunitarias y alergias, enfermedades cardiovasculares e infecciones virales o bacterianas.

En el caso de los cánceres, esto es tumores malignos, las células cancerosas crecen. Los agentes anti-tumorales generales inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Por el contrario, un anticuerpo que tiene una elevada actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos puede tratar cánceres lesionando las células cancerosas por medio de su efecto destructor de células, y por lo tanto, es más eficaz como agente terapéutico que

los agentes antitumorales generales. En la actualidad, en los agentes terapéuticos para los cánceres, el efecto anti-tumoral de un medicamento de anticuerpo solo es insuficiente, de modo que se ha llevado a cabo la terapia combinada con quimioterapia [Science, 280, 1197 (1998)]. Si la composición de anticuerpo de la presente invención sola encuentra un efecto anti-tumoral más elevado, disminuirá la dependencia de la quimioterapia y se reducirán los efectos secundarios.

En las enfermedades inmunitarias tales como las enfermedades inflamatorias, las enfermedades autoinmunitarias y las alergias, la liberación por los inmunocitos de una molécula mediadora induce reacciones *in vivo* de las enfermedades, de manera que la reacción alérgica puede ser inhibida eliminando los inmunocitos utilizando un anticuerpo que tiene una elevada actividad CCDA.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen arterioesclerosis y similares. La arterioesclerosis se trata en la actualidad utilizando un catéter con balón, pero las enfermedades cardiovasculares se pueden evitar y tratar inhibiendo el crecimiento de las células arteriales en la reestenosis después del tratamiento utilizando un anticuerpo que tiene una elevada actividad CCDA.

Se pueden evitar y tratar diferentes enfermedades incluyendo infecciones virales y bacterianas mediante la inhibición de la proliferación de las células infectadas con un virus o una bacteria utilizando un anticuerpo que tenga una elevada actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos.

Más abajo se describen un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular y un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección viral o bacteriana.

Los anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con un tumor incluyen el anticuerpo anti-GD2 [Anticancer Res., 13, 331-336 (1993)], el anticuerpo anti-GD3 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266 (1993)], el anticuerpo anti-GM2 [Cancer Res., 54, 1511-1516 (1994)], el anticuerpo anti-HER2 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289 (1992)], el anticuerpo anti-CD52 [Nature, 332, 323-327 (1988)], el anticuerpo anti-MAGE [British J. Cancer, 83, 493-497 (2000)], el anticuerpo anti-HM1.24 [Molecular Immunol., 36, 387-395 (1999)], el anticuerpo contra la proteína relacionada con la hormona anti-paratiroidea (PTHrP) [Cancer, 88, 2909-2911 (2000)], el anticuerpo anti-FGF8 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915 (1989)], el anticuerpo anti-factor de crecimiento de fibroblastos básico y el anticuerpo anti-receptor de FGF8 [J. Biol. Chem., 265, 16455-16463 (1990)], el anticuerpo anti-factor de crecimiento de tipo insulínico [J. Neurosci. Res., 40, 647-659 (1995)], el anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico [J. Neurosci. Res., 40, 647-659 (1995)], el anticuerpo anti-PMSA [J. Urology, 160, 2396-2401 (1998)], el anticuerpo anti-factor de crecimiento de células endoteliales vasculares [Cancer Res., 57, 4593-4599 (1997)], el anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares [Oncogene, 19, 2138-2146 (2000)] y similares.

Los anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con una alergia o inflamación incluyen el anticuerpo anti-interleuquina 6 [Immunol. Rev., 127, 5-24 (1992)], el anticuerpo anti-receptor de interleuquina 6 [Molecular Immunol., 31, 371-381 (1994)], el anticuerpo anti-interleuquina 5 [Immunol. Rev., 127, 5-24 (1992)], el anticuerpo anti-receptor de interleuquina 5 y el anticuerpo anti-interleuquina 4 [Cytokine, 3, 562-567 (1991)], el anticuerpo anti-interleuquina 4 [J. Immunol. Meth., 217, 41-50 (1991)], el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [Hybridoma, 13, 183-190 (1994)], y el anticuerpo anti-receptor del factor de necrosis tumoral [Molecular Pharmacol., 58, 237-245 (2000)], el anticuerpo anti-CCR4 [Nature, 400, 776-780 (1999)], el anticuerpo anti-quimioquina [J. Immunol. Meth., 174, 249-257 (1994)], el anticuerpo anti-receptor de quimioquina [J. Exp. Med., 186, 1373-1381 (1997)] y similares.

Los anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular incluyen el anticuerpo anti-GpIIB/IIIA [J. Immunol., 152, 2968-2976 (1994)], el anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas [Science, 253, 1129-1132 (1991)], el anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas [J. Biol. Chem., 272, 17400-17404 (1997)] y el anticuerpo anti-factor de coagulación de la sangre [Circulation, 101, 1158-1164 (2000)] y similares.

Los anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con enfermedades autoinmunitarias incluyen un anticuerpo anti-auto-ADN [Immunol. Letters, 72, 61-68 (2000)] y similares.

Los anticuerpos que reconocen un antígeno relacionado con una infección viral o bacteriana incluyen el anticuerpo anti-gp120 [Structure, 8, 385-395 (2000)], el anticuerpo anti-CD4 [J. Rheumatology, 25, 2065-2076 (1998)], el anticuerpo anti-CCR4 y el anticuerpo anti-toxina Vero [J. Clin. Microbiol., 37, 396-399 (1999)] y similares.

Estos anticuerpos se pueden obtener de organizaciones públicas tales como ATCC (Colección de Cultivos Tipo Americana), RIKEN Gene Bank en el Instituto de Investigación Física y Química, y National Institute of Bioscience

and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, o de compañías de venta de reactivos privadas tales como Dainippon Pharmaceutical, R & D SYSTEMS, PharMingen, Cosmo Bio y Funakoshi.

El medicamento que comprende la composición de anticuerpo obtenida en la presente invención se puede administrar en forma de un agente terapéutico solo, pero generalmente, se prefiere proporcionarlo en forma de una formulación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia industrial, mezclándolo con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Es deseable seleccionar la ruta de administración que es más eficaz en el tratamiento. Los ejemplos incluyen la administración oral y parenteral, por ejemplo bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular e intravenosa. En el caso de una preparación de anticuerpo se prefiere la administración intravenosa.

La forma de dosificación incluye pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyectables, pomadas, cintas y similares.

Las preparaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares.

Las preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabes se pueden producir utilizando, como aditivos, agua; azúcares tales como sacarosa, sorbitol y fructosa; glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja; antisépticos tales como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico; aromas tales como aroma de fresa y menta; y similares.

Las cápsulas, los comprimidos, los polvos, los gránulos y similares se pueden producir utilizando, como aditivos, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes disgregantes tales como almidón y alginato de sodio; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como poli(alcohol vinílico), hidroxipropilcelulosa y gelatina; tensioactivos tales como ésteres de ácidos grasos; plastificantes tales como glicerina; y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para la administración parenteral incluye inyectables, supositorios, pulverizaciones y similares.

Los inyectables se pueden preparar utilizando un portador tal como una solución salina, una solución de glucosa o una mezcla de ambos. Asimismo, se pueden preparar inyectables en polvo liofilizando la composición de anticuerpo de la manera habitual y añadiendo a esto cloruro de sodio.

Los supositorios se pueden preparar utilizando un portador tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

Las pulverizaciones se pueden preparar utilizando la composición de anticuerpo tal cual o utilizando la composición de anticuerpo junto con un portador que no estimule la membrana bucal o la mucosa de las vías respiratorias del paciente y pueda facilitar la absorción de la composición de anticuerpo dispersándola en forma de partículas finas.

El portador incluye lactosa, glicerol y similares. Dependiendo de las propiedades de la composición de anticuerpo y el portador, es posible producir preparaciones farmacéuticas tales como aerosoles y polvos secos. Además, los componentes ilustrados como aditivos para las preparaciones orales también se pueden añadir a las preparaciones parenterales.

Aunque la dosis clínica o la frecuencia de administración varía dependiendo del efecto terapéutico objetivo, el método de administración, el período de tratamiento, la edad, el peso corporal y similares, ésta es normalmente de 10 µg/kg a 20 mg/kg por día y por adulto.

Asimismo, en cuanto al método para examinar el efecto antitumoral de la composición de anticuerpo frente a diferentes células tumorales, los ensayos *in vitro* incluyen métodos para medir la actividad CDC, métodos para medir la actividad CCDA y similares, y los ensayos *in vivo* incluyen experimentos antitumorales en los que se utiliza un sistema tumoral en un animal experimental tal como un ratón, y similares.

Las medidas de la actividad CDC y CCDA y los experimentos anti-tumorales se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos en Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993); Cancer Research, 54, 1511 (1994) y similares.

La presente invención se describirá más abajo con detalle basándose en los Ejemplos; sin embargo, los Ejemplos son solamente simples ilustraciones, y el alcance de la presente invención no está limitado a estos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra el resultado de la medición de la actividad de unión al péptido parcial CCR4 cambiando las concentraciones de anticuerpo de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 producidos por el clon CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el clon CHO/pcDNA-CCR4. La ordenada y la abscisa muestran la actividad de unión para el péptido parcial CCR4 como la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm y la concentración de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4, respectivamente. "▲" y "■" muestran las actividades de unión al antígeno del anticuerpo CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4, respectivamente.

La Fig. 2 muestra el resultado de la medición de la actividad CCDA cambiando las concentraciones de anticuerpo de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 producidos por el clon CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el con CHO/pcDNA-CCR4. La ordenada y la abscisa muestran la actividad citotóxica y la concentración de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 en la solución de reacción, respectivamente. "▲" y "■" muestran las actividades del anticuerpo CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4, respectivamente.

La Fig. 3 muestra los patrones de elución de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de anticuerpos quiméricos anti-CCR4 producidos por el clon CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el clon CHO/pcDNA-CCR4 obtenidos mediante análisis HPLC de fase inversa. La ordenada y la abscisa muestran la intensidad de fluorescencia y el tiempo de elución, respectivamente.

La Fig. 4 muestra las secuencias de nucleótidos de la región no traducida y la región de traducción adyacente de un transportador de GDP-fucosa de hámster Chino. Las regiones de cebador diseñadas para obtener un ADNc completo se muestran por medio de subrayado. Las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos se muestran en la porción inferior de la secuencia de nucleótidos en la región de traducción.

La Fig. 5 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_pre\_sense.

La Fig. 6 muestra las etapas de construcción del plásmido pBS\_BgIII.

La Fig. 7 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_pre\_antisense.

La Fig. 8 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_sense\_H.

La Fig. 9 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_antisense\_H.

La Fig. 10 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_GFT\_H.

La Fig. 11 muestra las etapas de construcción del plásmido U6\_GFT\_H\_pure.

La Fig. 12 es una fotografía que muestra la cantidad de expresión de la β-actina y el transportador de GDP-fucosa por medio de la expresión de ARNsi.

## Ejemplo 1

### Preparación de la célula que expresa el mutante negativo dominante de GDP-fucosa y evaluación del anticuerpo producido:

#### (1) Aislamiento del gen que codifica el transportador de GDP-fucosa humano

Utilizando la secuencia del ARNm del transportador de GDP-fucosa humano referido en *Nature Genetics* [Nature Genetics, 8, 73 (2001)], se diseñaron un grupo de cebadores [cebador GDPFT-Fw (SEQ ID NO: 5) y cebador GDPFT-Rv (SEQ ID NO: 6)] para amplificar un marco de lectura abierto completo (referido más adelante en la presente memoria como "ORF") de la secuencia del ARNm del transportador de GDP-fucosa humano para sintetizar un ADN.

Se preparó una solución de PCR añadiendo 2,5 μl de Marathon-Ready-ADNc derivado de cerebro fetal humano (fabricado por Clontech), 5 μl de solución mixta de desoxirribonucleótidos 20 mM (fabricada por TOYOBO), 5 μl de 10× tampón para PCR (fabricado por Clontech), 4 μl de cebador GDPFT-Fw (equivalente a 20 pmoles), 4 μl de cebador GDPFT-Rv (equivalente a 20 pmoles), 1 μl de ADN Polimerasa Advantage (fabricada por Clontech) y 28,5 μl de agua destilada estéril (fabricada por Invitrogen) en un tubo de microcentrifugación de 500 μl de capacidad (fabricado por Eppendorf). Después de mezclar cuidadosamente la solución de reacción, se aplicaron como revestimiento 30 μl de aceite mineral (fabricado por Sigma), y después, utilizando Thermal Cycler 480 (fabricado por Perkin Elmer), se llevó a cabo la PCR calentando a 94°C durante 2 minutos, 30 ciclos de una reacción a 94°C durante 30 segundos y a 64°C durante 3 minutos en un ciclo, y finalmente calentando a 72°C durante 3 minutos. De la solución de reacción, se tomaron 5 μl y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para confirmar la amplificación de un ADN que tenía una longitud total de aproximadamente 1,1 kpb específico para los cebadores.

A continuación, se mezclaron 4 μl de la solución de PCR, 1 μl del vector de clonación TopoTA (fabricado por Invitrogen) y 1 μl de Solución Salina (fabricada por Invitrogen) en un tubo de micro-centrifugación de 500 μl de capacidad (fabricado por Eppendorf) y se dejó reposar a la temperatura ambiente durante 15 minutos. A partir de la solución de reacción, se tomó 1 μl, se mezcló con 50 μl de Células Competentes de *Escherichia coli* XL-1 Blue (fabricadas por Stratagene), se dejaron reposar sobre hielo durante 15 minutos, y después se calentaron en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos para transformar *Escherichia coli* mediante choque térmico. Después de la transformación se suspendió la *Escherichia coli* en medio LB (fabricado por DIFCO) y después se inoculó sobre una placa de agar LB con un suplemento de 50 μg/ml de ampicilina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries). La placa se incubó a 37°C durante la noche para obtener una única colonia del transformante sobre el agar LB. La

única colonia obtenida se despegó con un mondadientes esterilizado y se cultivó durante la noche en 50 ml de medio LB con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries) a 37°C y 150 rpm (sacudimiento recíproco). El caldo de cultivo obtenido se dispensó en tubos de centrifugación (fabricados por Becton Dickinson), se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y después se descartó el sobrenadante para obtener células de *Escherichia coli*. Se purificó ADN plasmídico de las células obtenidas de ese modo utilizando el Kit de Purificación de ADN de Plásmidos Qiaprep Midi (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante adjuntas al kit. Después de confirmar la pureza del ADN plasmídico extraído mediante electroforesis en gel de agarosa, se calculó su concentración midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro (fabricado por Shimadzu). La secuencia del ADN recombinante de 1,1 kpb se descodificó utilizando un secuenciador de ADN 377A (fabricado por Shimadzu), se confirmó que la secuencia es un ORF completo de un transportador de GDP-fucosa. La secuencia de nucleótidos del ADNc del transportador de GDP-fucosa humano secuenciado es el SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos del transportador de GDP-fucosa humano basada en la secuencia de nucleótidos es el SEQ ID NO: 4. El ADN plasmídico obtenido se denominó pCR/hGDPfr.

## (2) Construcción del mutante por delección N-terminal del transportador de GDP-fucosa humano y su vector de expresión

Se diseñaron un grupo de cebadores [cebador GDPfTΔ30-Fw (SEQ ID NO: 7) y cebador GDPfTΔ30-Rv (SEQ ID NO: 8)] para la amplificación de una secuencia de ADNc en la que se habían suprimido 30 residuos de aminoácido en el extremo N-terminal para sintetizar un ADN. Asimismo, se diseñó el cebador GDPfTΔ30-Fw de tal manera que se ligaron un sitio para una enzima de restricción HindIII para la introducción en un plásmido de expresión para una célula animal pcDNA3.1Hyg(+) (fabricada por Invitrogen), una secuencia de Kozak mejoradora de la eficacia de la traducción (CCGCC) y un codón de iniciación de la traducción ATG aguas arriba del extremo 5'-terminal de una secuencia de ADN que codificaba un residuo de aminoácido en la posición 31 del transportador de GDP-fucosa humano.

Asimismo, se diseñó el cebador GDPfTΔ30-Rv de tal manera que se ligó un sitio para la enzima de restricción XbaI para la introducción en un plásmido de expresión pcDNA3.1Hyg(+) para una célula animal (fabricado por Invitrogen) en el extremo 5' terminal externo de una secuencia de ADN que codificaba el codón de terminación de la traducción del transportador de GDP-fucosa humano.

Se preparó una solución de PCR añadiendo 10 ng del pCR/hGDPfT preparado en el apartado (1), 5 µl de solución de desoxirribonucleótidos mixtos 20 mM (fabricada por TOYOBO), 5 µl de 10×tampón para PCR (fabricado por Clontech), 4 µl de cebador GDPfTΔ30-Fw (equivalente a 20 pmoles), 4 µl de cebador GDPfTΔ30-Rv (equivalente a 20 pmoles), 1 µl de ADN Polimerasa KOD (fabricada por Clontech) y 28,5 µl de agua destilada estéril (fabricada por Invitrogen) en un tubo de micro-centrifugación de 500 µl de capacidad (fabricado por Eppendorf). La solución de reacción se mezcló cuidadosamente, se aplicaron como revestimiento 30 µl de aceite mineral (fabricado por Sigma), y después, utilizando un Ciclador Térmico 480 (fabricado por Perkin Elmer), se llevó a cabo la PCR calentando a 94°C durante 2 minutos, 30 ciclos de reacción a 94°C durante 30 segundos y a 64°C durante 3 minutos en un ciclo, y finalmente calentando a 72°C durante 3 minutos. A partir de la solución de reacción, se tomaron 5 µl y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para confirmar la amplificación de un ADN que tenía una longitud total de aproximadamente 1 kpb específico para los cebadores.

A continuación, se recuperó la solución de PCR en un tubo de micro-centrifugación, y se purificó el ADN utilizando un Kit de Purificación por PCR Qiaquick (fabricado por QIAGEN), a esto se añadió tampón M (fabricado por Takara Shuzo) en 1/10 del volumen de la solución de ADN, a esto se añadieron 10 unidades para cada una de las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 8 horas. En este tratamiento con enzimas de restricción, también se trataron de la misma manera 10 µg del plásmido pcDNA3.1Hyg(+) (fabricado por Invitrogen).

El ADN se purificó a partir de la muestra tratada con la enzima de restricción utilizando el Kit de Purificación por PCR Qiaquick (fabricado por QIAGEN) y se mezcló con 5 µl de la solución de ADNc para la muestra con el extremo N-terminal suprimido y a esto se le añadió 1 µl de la solución de pcDNA3.1Hyg(+), a esto se le añadieron 6 µl de Ligation High (fabricado por TOYOBO), y se llevó a cabo la ligación a 16°C durante 30 minutos. Se tomaron 2 µl de la solución de reacción, se mezclaron con 50 µl de Células Competentes de *Escherichia coli* XL-1 Blue (fabricadas por Stratagene), se dejaron reposar sobre hielo durante 15 minutos y después se calentaron en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos para transformar *Escherichia coli* mediante choque térmico. Después de la transformación se suspendió *Escherichia coli* en medio LB (fabricado por DIFCO) y luego se inoculó sobre medio para placa de agar LB con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries). La placa se incubó a 37°C durante la noche para obtener una única colonia del transformante sobre el medio de agar. La única colonia obtenida se separó con un mondadientes esterilizado y se cultivó durante la noche en 50 ml de medio LB con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) a 37°C y 150 rpm (sacudimiento recíproco). El caldo de cultivo obtenido se dispensó en tubos de centrifugación (fabricados

por Becton Dickinson), se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y después se descartó el sobrenadante para obtener las células de *Escherichia coli*. Se purificó un ADN plasmídico a partir de las células obtenidas utilizando el Kit de Purificación de ADN de Plásmidos Qiaprep Midi (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante adjuntas al mismo. Después de confirmar la pureza del ADN plasmídico purificado mediante electroforesis en gel de agarosa, se calculó su concentración midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro (fabricado por Shimadzu). La secuencia de ADN recombinante de 1 kbp se descodificó utilizando un secuenciador de ADN 377A (fabricado por Shimadzu), se confirmó que el ADN plasmídico era el mutante por delección N-terminal del transportador de GDP-fucosa humano. El ADN plasmídico obtenido de este modo se denominó pcDNA/hGDPfTΔ30.

### (3) Introducción del plásmido en células CHO/DG44 y preparación de transformantes

Se introdujeron simultáneamente 10 µg del pcDNA/hGDPfTΔ30 y 10 µg del plásmido de expresión del anticuerpo quimérico CCR4 pKANTEX2160 (descrito en el documento WO 01/64754) en  $1,6 \times 10^6$  células de células CHO/DG44 [G. Urlaub y L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] mediante electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]. Asimismo, como control, se introdujeron simultáneamente de la misma manera 10 µg de pcDNA3.1Hyg(+) y 10 µg de pKANTEX2160 en células CHO/DG44.

Cada una de las suspensiones celulares se suspendió en 10 ml de medio IMDM-dFBS(10)-Hyg(500) [IMDM que contenía suero bovino fetal sometido a diálisis al 10% y 500 µg/ml de higromicina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries)] y se inoculó en un matraz T75 (fabricado por Greiner). Después de cultivar a 37°C durante 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se obtuvieron transformantes resistentes a higromicina. A continuación, se cambió el medio a un medio preparado añadiendo MTX 50 nM al medio IMDM-dFBS(10)-Hyg(500), y se llevó a cabo el cultivo durante 2 semanas para obtener clones resistentes a MTX 50 nM. Además, el medio se cambió a un medio preparado añadiendo MTX 200 nM al medio IMDM-dFBS(10)-Hyg(500) y el cultivo se llevó a cabo durante 2 semanas para obtener clones resistentes a MTX 200 nM. La expresión de anticuerpo quimérico anti-CCR4 en estos clones resistentes a MTX 200 nM se confirmó por medio del ELISA descrito en el apartado (6) de este Ejemplo utilizando una placa con el péptido CCR4 inmovilizado.

El transformante transfectado con el mutante por delección N-terminal del transportador de GDP-fucosa humano se denomina clon CHO/GDPfTΔ30-CCR4, y el transformante transfectado con pcDNA3.1Hyg(+) se denomina clon CHO/pcDNA-CCR4. Asimismo, el clon CHO/GDPfTΔ30-CCR4, con el nombre celular de Nega-13/GDPfTΔ30, ha sido depositado el 14 de Marzo de 2002, como FERM BP-7965 en el Depósito de Organismos de Patentes Internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Avanzadas (Tsukuba Central 6, 1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón).

### (4) Purificación de un anticuerpo quimérico anti-CCR4

Los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 producidos por el clon CHO/GDPfTΔ30-CCR4 y el clon CHO/pcDNA-CCR4 se purificaron como sigue.

Cada uno de los clones CHO/GDPfTΔ30-CCR4 y CHO/pcDNA-CCR4 se inoculó en un matraz T182 (fabricado por Greiner) y se cultivó a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que creció hasta la confluencia. Cuando la densidad celular alcanzó la fase confluyente, se descartó el sobrenadante de cultivo, las células se lavaron con 25 ml de tampón PBS (fabricado por Invitrogen) y después se añadieron a esto 35 ml de medio EXCELL301 (fabricado por JRH). Tras cultivar a 37°C durante 1 semana en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante de cultivo para llevar a cabo la purificación con una columna Prosep-A (fabricado por Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinaron las concentraciones de proteína de los anticuerpos purificados utilizando un Kit para el Análisis de Proteínas BCA (fabricado por PIERCE). Con respecto a los anticuerpos purificados, el anticuerpo producido por el clon CHO/GDPfTΔ30-CCR4 y el anticuerpo producido por el clon CHO/pcDNA-CCR4 se denominaron anticuerpo CHO/GDPfTΔ30-CCR4 y anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4, respectivamente.

### (5) Análisis del anticuerpo quimérico anti-CCR4 purificado

De acuerdo con un método conocido [Nature, 227, 680 (1970)], se sometieron 4 µg de cada uno de los dos anticuerpos quiméricos anti-CCR4 purificados obtenidos en el apartado (4) de este Ejemplo a SDS-PAGE para analizar su peso molecular y su pureza. En cada uno de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 purificados, se encontró una única banda de aproximadamente 150 Kd de peso molecular en condiciones no reductoras y se encontraron dos bandas de aproximadamente 50 Kd y aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras. Estos pesos moleculares casi coincidían con los pesos moleculares deducidos de las secuencias de nucleótidos del ADNc de la cadena H y la cadena L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 Kd, cadena L: aproximadamente 23 Kd, molécula completa: aproximadamente 144 Kd), y también coincidían con los informes que establecían que el anticuerpo de tipo IgG muestra un peso molecular de aproximadamente 150 Kd en condiciones no reductoras y se

rebaja en la cadena H que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 Kd y la cadena L que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras debido al corte del enlace S-S intramolecular (Antibodies, Capítulo 14; *Monoclonal Antibodies*), y se confirmó que los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 se expresaban y purificaban en forma de moléculas de anticuerpo que tenían las estructuras correctas.

#### (6) Evaluación de la actividad de unión al péptido parcial CCR4

Se midió la actividad de unión de los dos anticuerpos quiméricos anti-CCR4 obtenidos en el apartado (4) de este Ejemplo a un péptido parcial CCR4 mediante el siguiente método de acuerdo con el ELISA utilizando una placa con el péptido CCR4 inmovilizado.

#### Actividad de unión del anticuerpo al péptido parcial CCR4 (ELISA)

Se seleccionó el Compuesto 1 (SEQ ID NO: 15) como el péptido de la región extracelular CCR4 humana capaz de reaccionar con el anticuerpo quimérico anti-CCR4. Con el fin de utilizarlo en la medición de la actividad mediante ELISA, se preparó un producto conjugado con BSA (albúmina de suero bovino) (fabricada por Nacalai Tesque) por medio del siguiente método y se utilizó como antígeno. Esto es, se añadieron gota a gota 100 ml de una solución de DMSO que comprendía 25 mg/ml de SMCC [éster N-hidroxisuccinimídico de ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico] (fabricado por Sigma) a 900 ml de una solución de PBS que contenía 10 mg de BSA agitando con un vórtex, seguido de agitación suave durante 30 minutos. Se aplicó una porción de 1 ml de la solución de reacción a una columna de filtración en gel tal como una columna NAP-10 equilibrada con 25 ml de PBS, y después se hizo eluir con 1,5 ml de PBS y el producto eluido resultante se utilizó como solución de BSA-SMCC (la concentración de BSA se calculó basándose en la medición a  $A_{280}$ ). A continuación, se añadieron 250 ml de PBS a 0,5 mg de Compuesto 1 y luego se disolvieron completamente añadiendo 250 ml de DMF, y la solución de BSA-SMCC se añadió a esto bajo vórtice, seguido de agitación suave durante 3 horas. La solución de reacción se sometió a diálisis frente a PBS a 4°C durante la noche, se añadió a esto azida de sodio para dar una concentración final de 0,05%, y la mezcla se filtró a través de un filtro de 0,22 mm para ser utilizada en forma de solución de BSA-compuesto 1.

El producto conjugado preparado se dispensó a 0,05 µg/ml y 50 µl/pocillo en una placa de EIA de 96 pocillos (fabricada por Greiner) y se incubó para la adherencia a 4°C durante la noche. Después de lavar cada pocillo con PBS, se añadió a esto BSA-PBS al 1% a 100 µl/pocillo y se dejó que reaccionara a la temperatura ambiente para bloquear los grupos activos restantes. Después de lavar cada pocillo con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (referido más adelante en la presente memoria como "Tween-PBS"), se añadió un sobrenadante de cultivo de un transformante a 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, se lavó cada pocillo con Tween-PBS, y después se añadió una solución de anticuerpo anti-IgG (γ) humana de cabra marcada con peroxidasa (fabricada por American Qualex) diluida 6000 veces con BSA-PBS al 1% como anticuerpo secundario a 50 µl/pocillo y se dejó que reaccionara a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y posterior lavado con Tween-PBS, se añadió la solución sustrato de ABTS a 50 µl/pocillo para el desarrollo de color, y 20 minutos después de eso, se detuvo la reacción añadiendo una solución de SDS al 5% a 50 µl/pocillo. Después de eso, se midió la absorbancia a 415 nm.

Como resultado, como se muestran en la Fig. 1, el anticuerpo CHO/GDPftΔ30-CCR4 y el anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4 mostraron casi la misma actividad de unión al antígeno para el péptido CCR4.

#### (7) Evaluación de la actividad CCDA para el clon con una elevada expresión de CCR4 humano

Se midió la actividad CCDA de los dos anticuerpos quiméricos anti-CCR4 obtenidos en el apartado (4) de este Ejemplo para las células CCR4/EL-4 de elevada expresión de CCR4 humano (documento WO 01/64754) de acuerdo con el siguiente método.

##### (a) Preparación de la suspensión de células diana

Una vez preparadas  $1,5 \times 10^6$  células de una línea celular CCR4/EL-4 que expresa CCR4 humano descrita en el documento WO 01/64754, se añadieron a esto 5,55 equivalentes MBq de una sustancia radiactiva  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , seguido de reacción a 37°C durante 1,5 horas para marcar de ese modo las células con un radioisótopo. Después de la reacción, las células se lavaron tres veces mediante suspensión en un medio y posterior centrifugación, se resuspendieron en el medio y después se incubaron a 4°C durante 30 minutos sobre hielo para la disociación espontánea de la sustancia radiactiva. Después de la centrifugación, las células se ajustaron para dar una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml añadiendo 15 ml del medio y se utilizaron como suspensión de células diana.

##### (b) Preparación de la suspensión de células efectoras humanas

Se recogieron 60 ml de sangre periférica procedente de un donante sano, se añadieron a esto 0,6 ml de heparina sódica (fabricada por Shimizu Pharmaceutical), seguido de mezclado suave. La mezcla se centrifugó (800 g, 20 minutos) para aislar una capa de células mononucleares utilizando Lymphoprep (fabricado por AXIS SHIELD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron centrifugando (1.400 rpm, 5 minutos) tres veces con un medio y después se resuspendieron en el medio para dar una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml y se utilizaron como suspensión de células efectoras humanas.

### (c) Medida de la actividad CCDA

La suspensión de células diana preparada en el apartado (a) anterior se dispensaron a 50  $\mu$ l ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) en cada uno de los pocillos de una placa con el fondo en forma de U de 96 pocillos (fabricada por Falcon). A continuación, se añadieron a esto 100  $\mu$ l de la suspensión de células efectoras humanas preparada en el apartado (b) anterior ( $5 \times 10^5$  células/pocillo, la proporción de células efectoras humanas con respecto a las células diana fue de 50 : 1). Además, se añadieron a esto cada uno de los anticuerpos quiméricos anti-CCR4 para dar una concentración final de 0,0001 a 10  $\mu$ g/ml, seguido de reacción a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, la placa se centrifugó y se midió la cantidad de  $\text{Cr}^{51}$  en el sobrenadante utilizando un contador  $\gamma$ . Se calculó la cantidad de  $\text{Cr}^{51}$  disociado espontáneamente llevando a cabo el mismo procedimiento utilizando el medio solo en lugar de la suspensión de células efectoras humanas y la solución de anticuerpo, y midiendo la cantidad de  $\text{Cr}^{51}$  en el sobrenadante. Se calculó la cantidad de  $\text{Cr}^{51}$  disociado total llevando a cabo el mismo procedimiento utilizando una solución de ácido clorhídrico de 1 mol/L en lugar de la solución de anticuerpo y la suspensión de células efectoras humanas, y midiendo la cantidad de  $\text{Cr}^{51}$  en el sobrenadante. Se calculó la actividad CCDA (%) basándose en la siguiente ecuación (1).

$$\text{Actividad CCDA (\%)} = \frac{\text{Cr}^{51} \text{ en el sobrenadante de la muestra} - \text{Cr}^{51} \text{ liberado espontáneamente}}{\text{Cr}^{51} \text{ liberado total} - \text{Cr}^{51} \text{ liberado espontáneamente}} \times 100 \quad (1)$$

Como resultado, como se muestra en la Fig. 2, se encontró que la actividad CCDA del anticuerpo CHO/GDPft $\Delta$ 30-CCR4 es significativamente mayor que la del anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4.

### (8) Análisis de la estructura de la cadena de azúcar del anticuerpo quimérico anti-CCR4

Se analizaron las cadenas de azúcar de los dos anticuerpos quiméricos humanos anti-CCR4 purificados en el apartado (4) de este Ejemplo. Se cambió la solución de cada uno de los anticuerpos purificados por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM utilizando Ultra Free 0,5-10K (fabricado por Millipore). El cambio se llevó a cabo de tal manera que la proporción de cambio fuera de 80 veces o más. Se midió la concentración de los anticuerpos después del cambio de solución con UV-1600 (fabricado por Shimadzu). Se calculó el coeficiente de absorción molar a partir de la secuencia de aminoácidos de cada anticuerpo basándose en la siguiente ecuación (2) [Advances in Protein Chemistry, 12, 303 (1962)], y se determinó la concentración definiendo la absorbancia a 280 nm como 1,38 mg/ml.

Ecuación (2)

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

$$E_{1\text{mol/ml}} = E_{1\text{mol/l}} / \text{PM}$$

$E_{1\text{mol/l}}$ :  
coeficiente de absorción a 280 nm ( $\text{mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ )

$E_{1\text{mol/ml}}$ :  
coeficiente de absorción molar a 280 nm ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

A:

coeficiente de absorción molar de triptófano a 280 nm = 5550 ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

B:

coeficiente de absorción molar de tirosina a 280 nm = 1340 ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

C:

coeficiente de absorción molar de cistina a 280 nm = 200 ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

n1:

número de triptófanos por 1 molécula de anticuerpo

n2:

número de tirosinas por 1 molécula de anticuerpo

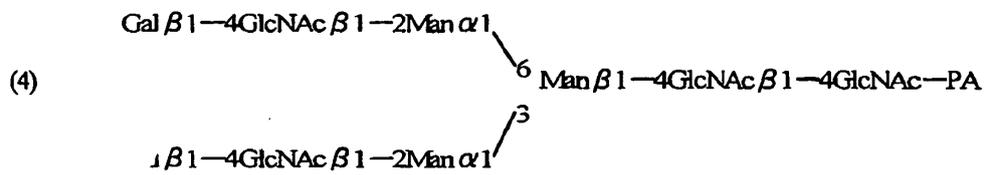
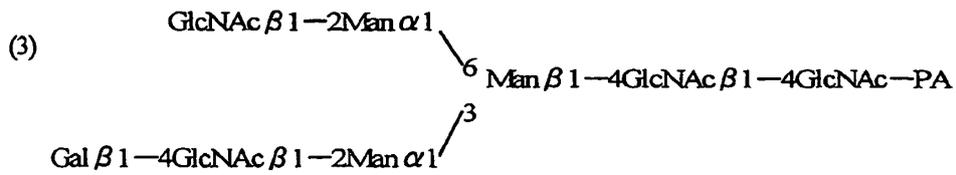
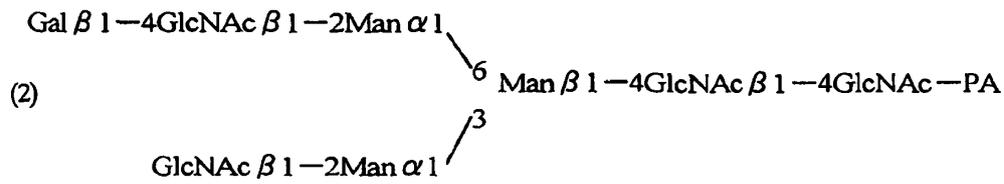
n3:

número de cistinas por 1 molécula de anticuerpo

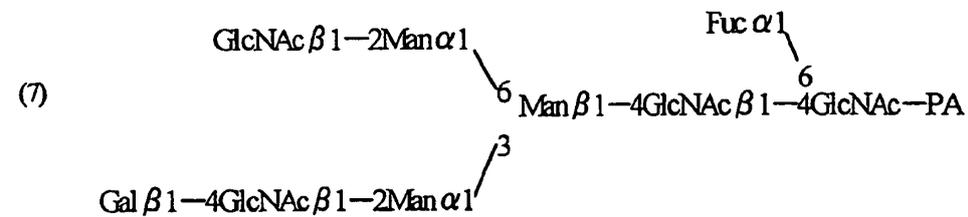
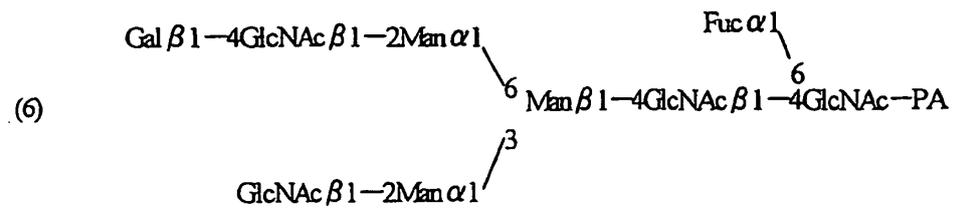
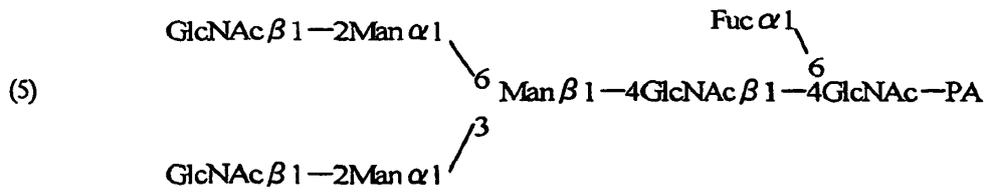
PM:

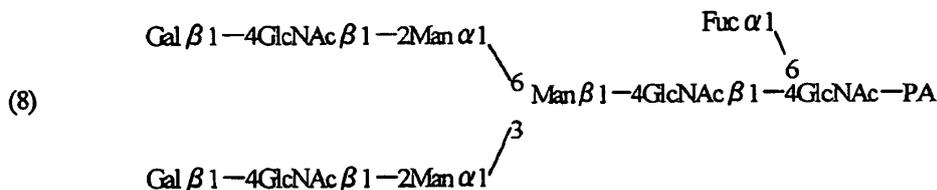
peso molecular del anticuerpo (g/mol)





5





GlcNAc, Gal, Man, Fuc y PA indican N-acetilglucosamina, galactosa, manosa, fucosa y un grupo piridilamino, respectivamente. En la Fig. 3, la proporción del grupo de la cadena de azúcar libre de  $\alpha$ 1,6-fucosa se calculó a partir del área ocupada por los picos ① a ④ entre ① a ⑧, y la proporción del grupo de la cadena de azúcar unido a  $\alpha$ 1,6-fucosa a partir del área ocupada por los picos ⑤ a ⑧ entre ① a ⑧. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Anticuerpo	Proporción de cadena de azúcar libre de $\alpha$ 1,6-fucosa (%)
anticuerpo CHO/GDPf $\Delta$ 30-CCR4	35
anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4	10

10 Cuando se calculó a partir del área del pico, el contenido de cadena de azúcar libre de  $\alpha$ 1,6-fucosa de CHO/GDPf $\Delta$ 30-CCR4 fue de 35%, y la proporción de cadena de azúcar compleja unida a  $\alpha$ 1,6-fucosa fue de 65%. El contenido de cadena de azúcar libre de  $\alpha$ 1,6-fucosa del anticuerpo CHO/pcDNA-CCR4 fue de 10%, y la proporción de cadena de azúcar compleja unida a  $\alpha$ 1,6-fucosa fue de 90%.

15 Basándose en los resultados anteriores, se encontró que el mutante por delección N-terminal introducido del transportador de GDP-fucosa actúa como un mutante negativo dominante del transportador de GDP-fucosa y puede disminuir la proporción de la cadena de azúcar compleja unida a  $\alpha$ 1,6-fucosa del anticuerpo producido.

## Ejemplo 2

### 20 Aislamiento del gen que codifica el transportador de GDP-fucosa procedente de células de hámster Chino:

#### (1) Extracción de ARN total derivado de células CHO/DG44

25 Se suspendieron células CHO/DG44 [G. Urlaub y L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] en medio IMDM (fabricado por Life Technologies) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (fabricado por Life Technologies) y  $1 \times$  concentración de suplemento HT (fabricado por Life Technologies) y 15 ml de esto se inocularon a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en un matraz T75 para el cultivo de células adherentes (fabricado por Greiner). El cultivo se llevó a cabo a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 50%,  $1 \times 10^7$  células fueron recuperadas el segundo día de cultivo, y se extrajo el ARN total utilizando RNAeasy (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### (2) Preparación de ADNc de hebra sencilla completo derivado de células CHO/DG44

35 Se disolvió el ARN total preparado en el apartado (1) anterior en 45  $\mu$ l de agua estéril, se mezcló con 1  $\mu$ l RQ1 RNasa-Free DNasa (fabricado por Promega), 5  $\mu$ l de 10  $\times$  tampón para DNasa anclado a esto y 0,5  $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega) y se dejó que reaccionara a 37°C durante 30 minutos para degradar el ADN genómico como contaminante de la muestra. Después de la reacción, se volvió a purificar el ARN mediante RNAeasy (fabricado por QIAGEN) y se disolvió en 50  $\mu$ l de agua estéril.

40 Se sintetizó un ADNc de cadena sencilla a partir de 3  $\mu$ l del ARN total obtenido mediante una reacción de transcripción inversa en una solución de 20  $\mu$ l que contenía oligo(dT) como cebadores, utilizando SUPERSRIPT® First-Strand Synthesis System para RT-PCR (fabricado por Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la clonación por PCR, se utilizó una solución acuosa diluida 50 veces de la solución de reacción. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso.

45

**(3) Preparación ADNc del transportador de GDP-fucosa quimérico humano/células de ovario de hámster Chino (CHO)**

Se amplificó un transportador de GDP-fucosa quimérico que tenía una secuencia de transportador de GDP-fucosa en el radical cebador y una secuencia de CHO en el radical amplificado por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ADNc de hebra sencilla derivado de células CHO/DG44 preparado en el apartado (2) anterior, utilizando un grupo de cebadores del cebador GDPfT-Fw y el cebador GDPfT-Rv (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente) diseñados basándose en la secuencia del transportador de GDP-fucosa humano descrita en el Ejemplo 1(1). Utilizando ExTaq (fabricado por Takara Shuzo), se prepararon 25 µl de una solución de reacción [tampón ExTaq, dNTP 0,2 mM, 0,5 µM del grupo de cebadores específicos del gen anterior] que contenía 1 µl del ADNc de hebra sencilla derivado de CHO/DG44, y se llevó a cabo la PCR calentando a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de reacción a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto en un ciclo, y finalmente calentando a 72°C durante 5 minutos. Una vez completada la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se purificaron aproximadamente 1.100 pb del fragmento de amplificación específico empleando el Kit GENECLEAN SPIN (fabricado por BIO 101) (más adelante, se utilizó este método para la purificación del fragmento de ADN a partir del gel de agarosa) y se hizo eluir con 20 µl de agua estéril. En 20 µl de solución de reacción utilizando Ligation High (fabricado por TOYOBO), se ligaron 9 µl del fragmento amplificado con 50 ng de T7blue T-Vector, y se transformó la cepa DH5α de *Escherichia coli* utilizando 2 µl de la solución de reacción mediante el método de Cohen *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2100 (1972)] (más adelante, se utilizó este método para la transformación de *Escherichia coli*). Se aisló un ADN plasmídico a partir de las numerosas colonias resistentes a ampicilina obtenidas de acuerdo con un método conocido [Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979)] (más adelante se utilizó este método como método de aislamiento de plásmidos). Se confirmó la presencia o ausencia de inserto mediante comparación de tamaños utilizando electroforesis en gel de agarosa, y se determinó la secuencia de nucleótidos utilizando DNA Sequencer 377 (fabricado por Perkin Elmer) y el Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la lectura se suprimieron los errores de las bases acompañado por PCR comparando las secuencias de nucleótidos secuenciadas de 4 clones, se confirmó que el ADN insertado determinado mediante este método codifica el transportador de GDP-fucosa quimérico humano/CHO.

**(4) Síntesis de ADNc de hebra sencilla para RACE**

Se prepararon ADNc de hebra sencilla para RACE 5' y 3' a partir del ARN total de CHO/DG44 extraído en el apartado (1) utilizando el Kit de Amplificación de ADNc RACE SMART<sup>®</sup> (fabricado por CLONTECH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este caso, se utilizó la Transcriptasa Inversa PowerScript<sup>®</sup> (fabricado por CLONTECH) como transcriptasa inversa. Cada uno de los ADNc de hebra sencilla preparados se diluyó 10 veces con tampón Tricina-EDTA adjunto al kit y se utilizó como molde de la PCR.

**(5) Determinación de las secuencias de nucleótidos de la región no traducida del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino mediante el método RACE**

Basándose en la secuencia de nucleótidos del transportador de GDP-fucosa quimérico humano/CHO determinada en el apartado (3), se diseñaron cebadores RACE 5' CHO-GFT-GSP5'-1 (SEQ ID NO: 9) y CHO-GFT-GSP5'-2 (SEQ ID NO: 10) específicos para el transportador de GDP-fucosa de hámster Chino y cebadores RACE 3' CHO-GFT-GSP3'-1 (SEQ ID NO: 11) y CHO-GFT-GSP3'-2 (SEQ ID NO: 12) específicos para transportador de GDP-fucosa específico de hámster Chino.

A continuación, utilizando el Kit de PCR Advantage2 (fabricado por CLONTECH), se prepararon 50 µl de una solución de reacción [tampón para Advantage2 PCR (fabricado por CLONTECH), dNTP 0,2 mM, 0,2 µmoles/l de cebadores específicos para transportador de GDP-fucosa de hámster Chino para RACE, 1 × concentración de cebador común (fabricado por CLONTECH)] que contenía 1 µl del ADNc de hebra sencilla derivado de CHO/DG44 para RACE preparado en el apartado (4) de este Ejemplo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se llevó a cabo mediante 20 ciclos de reacción a 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo. Una vez completada la reacción, se llevó a cabo de nuevo la PCR en las mismas condiciones utilizando 1 µl de la solución de reacción como molde y preparando la solución de reacción de nuevo. Los moldes y la combinación de cebadores utilizados en la 1ª y 2ª PCR y los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados se muestran en la Tabla 2. Una vez completada la segunda PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y los fragmentos de amplificación específicos de interés se purificaron y se hicieron eluir con 20 µl de agua estéril.

Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los productos de la PCR obtenidos por medio de RACE 5' y 3' anterior por medio de un método de secuenciación directa utilizando DNA Sequencer 377 (fabricado por Perkin Elmer) y Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (fabricado por Perkin Elmer). El método se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos de las regiones 5' y 3' no traducidas adyacentes al ORF del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino se muestran en la Fig. 4.

Tabla 2

Combinación de cebadores utilizados en RACE de ADNc de transportador de GDP-fucosa de hámster Chino y tamaño de productos de la PCR			
RACE 5'	Cebador específico	Cebador Común	Tamaño de productos amplificados por PCR (longitud pronosticada)
1ª PCR	GFT_GSP5'-1	UPM (Mezcla de Cebadores Universal)	
2ª PCR	GFT_GSP5'-2	NUP (Cebador Universal Anidado)	aproximadamente 550 pb (280 pb o más)
3' RACE	Cebador específico	Cebador Común	Tamaño de productos amplificados por PCR (longitud pronosticada)
1ª PCR	GFT_GSP3'-1	UPM (Mezcla de Cebadores Universal)	
2ª PCR	GFT_GSP3'-2	NUP (Cebador Universal Anidado)	aproximadamente 1.400 pb (270 pb o más)

### (6) Clonación de ADNc completo de transportador de GDP-fucosa de hámster Chino

5  
Primero, basándose en la secuencia de nucleótidos de las regiones no traducidas del transportador de GDP-fucosa determinada en el apartado (5) de este Ejemplo, se diseñaron un grupo de cebadores para su uso en la amplificación específica del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino, CHO#GFT#FW (SEQ ID NO: 13) y CHO#GFT#RV (SEQ ID NO: 144). A continuación, utilizando ADN polimerasa KOD (fabricada por TOYOBO),  
10 se prepararon 20 µl de una solución de reacción [tampón KOD, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,6 mM, 0,5 µM de los cebadores específicos del gen anterior (CHO#GFT#FW y CHO#GFT#RV)] que contenía 1 µl del ADNc de hebra sencilla derivado de CHO/DG44 preparado en el apartado (2) de este Ejemplo, y se llevó a cabo la PCR calentando a 94°C durante 5 minutos y después 30 ciclos de reacción a 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 2 minutos en un ciclo. Después de llevar a cabo la PCR 4 veces en experimentos independientes, se  
15 sometió cada una de las soluciones de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se purificó un fragmento específico amplificado de aproximadamente 1.250 pb utilizando el Kit GENE CLEAN SPIN (fabricado por BIO 101) y se hizo eluir con 20 µl de agua estéril. En una solución de 20 µl que contenía Ligation High (fabricado por TOYOBO), se ligaron 4 µl del fragmento amplificado anterior con 5 ng del vector pCR-blunt (fabricado por Invitrogen), y se transformó DH5α utilizando 2 µl de la solución de reacción. Las muestras de ADN plasmídico se aislaron de las  
20 diferentes colonias resistentes a kanamicina obtenidas, y aproximadamente 100 ng de las mismas se digirieron con *EcoRI* y después se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia del inserto. Se determinó una secuencia de nucleótidos del fragmento de amplificación por PCR clonado utilizando un DNA Sequencer 377 (fabricado por Perkin Elmer) y un Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer). La secuencia del ADNc del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino  
25 determinado mediante este método es el SEQ ID NO: 1. Una secuencia de aminoácidos (365 aminoácidos) del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino deducida del ORF (nucleótidos de las posiciones 117 a 1214) presente en la secuencia de ADNc completa determinada es el SEQ ID NO: 2.

### Ejemplo 3

30 **Preparación de células con el plásmido de expresión de ARNsi introducido y preparación de la composición de anticuerpo utilizando el transportador de GDP-fucosa dirigido a células**

35 **1. Construcción del plásmido de expresión de ARNsi U6\_GFT\_H\_pure que dirige el transportador de GDP-fucosa**

#### (1) Selección de la secuencia de nucleótidos del gen derivado de CHO como diana del ARNi

40 Los 19 nucleótidos del SEQ ID NO: 16 se utilizaron como secuencia diana del ARNi. La secuencia corresponde a las posiciones 803 a 821 de la secuencia de nucleótidos del ADNc del transportador de GDP-fucosa derivado de

hámster Chino (SEQ ID NO: 1) obtenida en el Ejemplo 2. El ARN de interferencia corto (referido más adelante en la presente memoria como "ARNsi") que dirige la secuencia se denomina siRNA\_GFT\_H. En la presente memoria, se describe un método para construir un plásmido U6\_GFT8\_H\_pure que expresaba siRNA\_GFT\_H en células animales. Asimismo, se diseñó la estructura básica del plásmido de expresión de acuerdo con el método de Miyagishi [Nat. Biotechnology, 20, 5 (2002)].

## (2) Construcción del plásmido U6\_pre\_sense

Se construyó el plásmido U6\_pre\_sense de acuerdo con el siguiente método (Fig. 5). Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores (SEQ ID NO: 17 y 18) diseñados a partir de la secuencia del gen de U6 snRNP humano registrada en GenBank (Núms. GenBank X07425 y M14486) para amplificar la región promotora del gen U6 snRNP humano. En la PCR, se prepararon 50 µL de una solución de reacción que contenía 200 ng de ADN Genómico Humano (fabricado por Clontech) [1×Tampón EX Taq (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 2,5 unidades de Polimerasa EX Taq (fabricada por Takara Shuzo), y 0,5 µM de cada uno de los cebadores anteriores (SEQ ID NO: 65 y 66 como se ha descrito antes)], seguido de calentamiento a 94°C durante 5 minutos y 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo utilizando GeneAmp PCR system 9700 (fabricado por Perkin Elmer).

La solución de PCR se extrajo con fenol/cloroformo, y el fragmento amplificado por PCR se recuperó mediante precipitación con etanol. El fragmento amplificado se digirió con *Xba*I (fabricado por Takara Shuzo), se extrajo con fenol/cloroformo, y se sometió a precipitación con etanol para recuperar un fragmento de ADN. El fragmento de ADN se digirió después con *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo), y la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb se purificó por medio del Kit de Extracción en Gel (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se conectó con el vector pBluescript SK(-) (STRATAGENE) que se había digerido de antemano con *Xba*I (fabricado por Takara Shuzo) y *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo) utilizando un Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Utilizando el ADN recombinante plasmídico resultante, se transformó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) de acuerdo con el método de Cohen et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69, 2110 (1972)] (más adelante, se utilizó este método en la transformación de *Escherichia coli*). Se aisló un ADN recombinante plasmídico a partir de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando un Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). Se determinó la secuencia de nucleótidos del promotor U6 contenido en el plásmido utilizando el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. Se seleccionó el plásmido en el que no se había producido mutación en los nucleótidos durante la PCR y se denominó U6\_pre\_sense.

## (3) Construcción del plásmido pBS\_BgIII

Se construyó el plásmido pBS\_BgIII de acuerdo con el siguiente método (Fig. 6). En agua destilada, se disolvieron 10 pmoles de oligo ADN sintéticos (cada uno fosforilado en los extremos 5') de los SEQ ID NO: 19 y 20, seguido de calentamiento a 90°C durante 10 minutos, y se dejó que la mezcla reposara a la temperatura ambiente para la hibridación. El oligómero sintético hibridado (0,2 pmoles) aislado de la solución de reacción solución se conectó con el vector pBluescript SK(-) (fabricado por STRATAGENE) que había sido digerido de antemano con *Sac*I (fabricado por Takara Shuzo) utilizando el Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. El ADN recombinante plasmídico se aisló de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). El plásmido digerido con *Bgl*II (fabricado por Takara Shuzo) se seleccionó a partir de los respectivos clones y se denominó pBS\_BgIII.

## (4) Construcción del plásmido U6\_pre\_antisense

Se construyó el plásmido U6\_pre\_antisense de acuerdo con el siguiente método (Fig. 7). Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores (SEQ ID NO: 21 y 22) diseñados a partir de la secuencia del gen de U6 snRNP humano registrada en GenBank (Núms. de Acceso GenBank X07425 y M14486) para amplificar la región promotora del gen U6 snRNP humano. En la PCR, se prepararon 50 µL de una solución de reacción que contenía 200 ng de ADN Genómico Humano (fabricado por Clontech) [1×tampón EX Taq (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 2,5 unidades de polimerasa EX Taq (fabricada por Takara Shuzo), y 0,5 µM de cada uno de los cebadores anteriores (SEQ ID NO: 21 y 22 como se ha descrito antes)], seguido de calentamiento a 94°C durante 5 minutos y después 30 ciclos de calentamiento de 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos en un ciclo utilizando GeneAmp PCR system 9700 (fabricado por Perkin Elmer).

La solución de PCR se extrajo con fenol/cloroformo, y el fragmento amplificado por PCR se recuperó mediante precipitación con etanol. El fragmento amplificado se digirió con *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo), se extrajo con fenol/cloroformo, y se sometió a precipitación con etanol para recuperar un fragmento de ADN. Después se digirió el fragmento de ADN con *Eco*RI (fabricado por Takara Shuzo), y la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb se purificó utilizando el Kit de Extracción en Gel

(fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se conectó con el plásmido pBS\_BglII (fabricado por Takara Shuzo) que había sido digerido de antemano con *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo) y *Eco*RI (fabricado por Takara Shuzo) by using DNA Ligación Kit (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. El ADN recombinante plasmídico se aisló de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando un Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). Se determinó la secuencia de nucleótidos del promotor U6 contenido en el plásmido utilizando un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. El plásmido en el que no se producía mutación en los nucleótidos durante la PCR se seleccionó entre los clones determinados y se denominó U6\_pre\_antisense.

#### (5) Construcción de un plásmido U6\_sense\_H

Se construyó el plásmido U6\_sense\_B de acuerdo con el siguiente método (Fig. 8). En agua destilada, se disolvieron 10 pmoles de cada uno de los oligo ADN sintéticos (cada uno fosforilado en el extremo 5') de los SEQ ID NO: 23 y 24, seguido de calentamiento a 90°C durante 10 minutos, y la mezcla se dejó reposar a la temperatura ambiente para la hibridación. El oligómero sintético hibridado (0,2 pmoles) aislado de la solución de reacción se conectó con un plásmido U6\_pre\_sense que había sido digerido de antemano con *Pma*CI (fabricado por Takara Shuzo) y *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo) utilizando un Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. Se aisló el ADN recombinante plasmídico de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). La secuencia de nucleótidos derivada del oligómero sintético contenido en el plásmido se determinó utilizando el Secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. Se seleccionó el plásmido en el que las secuencias de nucleótidos de los SEQ ID NO: 23 y 24 se habían introducido correctamente a partir de los clones determinados y se denominó U6\_sense\_H.

#### (6) Construcción del plásmido U6\_antisense\_H

El plásmido U6\_antisense\_B se construyó de acuerdo con el siguiente método (Fig. 9). En agua destilada, se disolvieron 10 pmoles de cada uno de los oligo ADN sintéticos (cada uno fosforilado en los extremos 5') de los SEQ ID NO: 25 y 26, seguido de calentamiento a 90°C durante 10 minutos, y se dejó que la mezcla se enfriara a la temperatura ambiente para la hibridación. El oligómero sintético hibridado (0,2 pmoles) aislado a partir de la solución de reacción se conectó con el plásmido U6\_pre\_antisense que se había digerido de antemano con *Pma*CI (fabricado por Takara Shuzo) y *Eco*RI (fabricado por Takara Shuzo) utilizando un Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. El ADN recombinante plasmídico se aisló a partir de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). Se determinó la secuencia de nucleótidos derivada del oligómero sintético contenido en el plásmido utilizando un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. Se seleccionó el plásmido en el que se habían introducido correctamente las secuencias de nucleótidos de los SEQ ID NO: 25 y 26 a partir de los clones determinados y se denominó U6\_antisense\_H.

#### (7) Construcción del plásmido U6\_GFT\_H

Se construyó el plásmido U6\_GFT\_H de acuerdo con el siguiente método (Fig. 10). Se digirió el plásmido U6\_antisense\_H con *Sa*II (fabricado por Takara Shuzo) y se extrajo con fenol/cloroformo. El fragmento de ADN se recuperó mediante precipitación con etanol y después se digirió con *Bg*II (fabricado por Takara Shuzo). La solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se purificó el fragmento de ADN de aproximadamente 370 pb utilizando el Kit de Extracción en Gel (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se conectó con el plásmido U6\_sense\_H que había sido digerido de antemano con *Sa*II (fabricado por Takara Shuzo) y *Bam*HI (fabricado por Takara Shuzo) utilizando el Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. El ADN recombinante plasmídico se aisló a partir de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). Se determinó la secuencia de nucleótidos contenida en el plásmido utilizando el Secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. Se seleccionó el plásmido que tenía la secuencia de nucleótidos de interés a partir de los clones determinados y se denominó U6\_GFT\_H.

#### (8) Construcción del plásmido U6\_FUT8\_H\_pure

Se construyó el plásmido U6\_FUT8\_H\_pure de acuerdo con el siguiente método (Fig. 11). Se digirió el plásmido U6\_FUT8\_H con *Pvu*II (fabricado por Takara Shuzo) y se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de ADN de aproximadamente 1150 pb se purificó utilizando el Kit de Extracción en Gel (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se insertó en el plásmido pPUR (fabricado por Clontech)

que había sido digerido de antemano con *PvuII* (fabricado por Takara Shuzo) utilizando el Kit de Ligación de ADN (fabricado por Takara Shuzo). Se transformó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) con el ADN recombinante plasmídico resultante. El ADN recombinante plasmídico recombinante se aisló a partir de las múltiples colonias resistentes a ampicilina resultantes utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen). Se determinó la secuencia de nucleótidos contenida en el plásmido utilizando el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Perkin Elmer) de acuerdo con el método convencional. Se seleccionó el plásmido que tenía la secuencia de nucleótidos de interés a partir de los clones determinados y se denominó U6\_FUT8\_H\_pure.

#### (9) Preparación del plásmido U6\_GFT\_H\_pure linealizado

Se digirió el plásmido U6\_GFT\_H\_pure con una enzima de restricción *FspI* (fabricada por NEW ENGLAND BIOLABS) para la linealización. Después de la digestión, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que los plásmidos se habían linealizado correctamente.

### 2. Preparación de un clon resistente a lectina en el que se ha introducido el plásmido de expresión ARNsi con el transportador de GDP-fucosa

#### (1) Preparación de células productoras de anticuerpo quimérico anti-CCR4 utilizando células CHO/DG44 como anfitrión

Después de introducir 4 µg del vector de expresión de anticuerpo quimérico anti-CCR4 pKANTEX2160 en  $1,6 \times 10^6$  células de células CHO/DG44 mediante electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], las células se suspendieron en 10 ml de medio IMDM-dFBS(10)-HT(1) [medio IMDM (fabricado por Invitrogen) que comprende dFBS al 10% (fabricado por Invitrogen) y 1 × concentración de suplemento HT (fabricado por Invitrogen)] y se dispuso a 100 µl/pocillo en una placa para el cultivo de tejidos de 96 pocillos (fabricada por Asahi Techno Glass). Después de cultivar a 37°C durante 24 horas en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, se cambió el medio por IMDM-dFBS(10) (medio IMDM que comprende 10% de FBS sometido a diálisis), seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó de los pocillos en los cuales se observó crecimiento debido a la formación de colonias transformantes, y se midió la concentración de anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante por medio del ELISA descrito en el apartado (6) del Ejemplo 1 utilizando una placa con el péptido CCR4 inmovilizado.

Con el fin de incrementar la cantidad de producción de anticuerpo utilizando un sistema de amplificación del gen DHFR, se suspendió cada uno de los transformantes de los pocillos en los que se había observado producción de anticuerpo quimérico anti-CCR4 en los sobrenadantes de cultivo en el medio IMDM-dFBS(10) que comprendía MTX 50 nM para dar una densidad de 1 a  $2 \times 10^5$  células/ml, y se dispuso la suspensión a 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Asahi Techno Glass). Después de cultivar a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, se indujeron los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM. Para los transformantes de los pocillos en los que se observó crecimiento, se incrementó la concentración de MTX a 200 nM mediante el mismo método, y finalmente se obtuvo un transformante capaz de crecer en el medio IMDM-dFBS (10) que comprendía MTX 200 nM y de producir el anticuerpo quimérico anti-CCR4 en una gran cantidad. El transformante obtenido se suspendió en el medio IMDM-dFBS (10) que comprendía MTX 500 nM para dar una densidad de 0,5 células/pocillo, y se inoculó en los pocillos de una placa de 96 pocillos (fabricada por Asahi Techno Glass) para llevar a cabo la separación de células individuales mediante dilución limitante. Después de cultivar a 37°C durante 2 semanas, se observó cada placa con un microscopio, y se sometió un pocillo en el que se había confirmado el crecimiento de una única colonia a cultivo a escala creciente para obtener de ese modo un clon que expresaba un anticuerpo quimérico anti-CCR4, el clon 32-05-09.

#### (2) Introducción del vector de expresión de ARNsi U6\_GFT\_H\_pure en células productoras de anticuerpo quimérico anti-CCR4

Se introdujo el vector de expresión de ARNsi construido en el Ejemplo 1 en el con 32-05-09 preparado en el apartado (1) de este Ejemplo.

La introducción del vector de expresión de ARNsi en el clon 32-05-09 se llevó a cabo mediante electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] de acuerdo con el siguiente método. Primero, se suspendió el clon 32-05-09 en PBS de Dulbecco (tampón K-PBS) (137 mmoles/l de KCl, 2,7 mmoles/l de NaCl, 8,1 mmoles/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mmoles/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,0 mmoles/l de MgCl<sub>2</sub>) a  $8 \times 10^6$  células/ml, y se mezclaron 200 µl de la suspensión celular ( $1,8 \times 10^6$  células) con 10 µg del plásmido linealizado preparado en el apartado 1 de este Ejemplo. La mezcla de células/ADN resultante se introdujo en Gene Pulser Cuvette (2 mm de distancia entre los electrodos) (fabricado por BIO-RAD) y se sometió a la introducción del gen a 0,35 KV de voltaje de pulso y 250 µF de capacidad eléctrica en un aparato de fusión celular, Gene Pulser (fabricado por BIO-RAD).

La suspensión celular se añadió a 30 ml de un medio alcalino [Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (fabricado por Life Technologies) con un suplemento de suero bovino sometido a diálisis al 10% (fabricado por Life

Technologies) y 50 µg/ml de gentamicina (fabricado por Nacalai Tesque)] y después se inoculó a 10 ml sobre una placa de 10 cm para la adherencia celular (fabricada por Asahi Techno Glass) y se cultivó en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 24 horas. Después de la eliminación del medio de cultivo, se añadieron a esto 10 ml de un medio de cultivo alcalino con un suplemento de 12 µg/ml de puromicina (fabricado por SIGMA). Después de cultivar adicionalmente durante 6 días, se aspiró el medio de cultivo, y después se añadió a esto un medio alcalino con un suplemento de 0,5 mg/ml de LCA (aglutinina de *Lens culinaris*) (fabricado por Vector) y 12 µg/ml de puromicina (fabricada por SIGMA) a 100 µl/pocillo. Después de cultivar adicionalmente durante 10 días, se aisló el clon de supervivencia. Asimismo, se confirmó la expresión del anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante de cultivo de estos clones de supervivencia por medio del ELISA descrito en el apartado (6) del Ejemplo 1 utilizando una placa con péptido CCR4 inmovilizado.

El clon resultante se eliminó de la placa e cultivo mediante tratamiento con tripsina, se inoculó sobre una placa de 24 pocillos para el cultivo de tejidos (fabricada por Asahi Techno Glass) y se cultivó con un medio alcalino con un suplemento de 12 mg/ml de puromicina (fabricado por SIGMA) durante 5 días. Después de cultivar, cada clon de cada pocillo de la placa se cultivó a escala creciente sobre un medio alcalino con un suplemento de 12 µg/ml de puromicina (fabricada por SIGMA) en un matraz para el cultivo de tejidos (fabricado por Asahi Techno Glass). Un clon de los clones obtenidos de este modo en los que se había introducido el vector de expresión de ARNs<sub>i</sub> U6\_GFT\_H\_pure se denominó clon 32-05-09-H12. El clon 32-05-09-H12 ha sido depositado con el nombre de clon 32-05-09-H12 el 27 de Marzo de 2003 como FERM BP-8345 en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Avanzadas (Tsukuba Central 6, 1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón).

### 3. Medida del ARNm del transportador de GDP-fucosa en el clon con siRNA\_GFT\_H introducido que dirige el transportador de GDP-fucosa

El clon 32-05-09-H12 obtenido en el apartado 2 de este Ejemplo se suspendió en un medio alcalino con un suplemento de 12 µg/ml de puromicina a una densidad celular de  $3 \times 10^5$  células/ml, se inoculó en un matraz T75 para la adherencia de las células (fabricado por Greiner), y se cultivó durante 3 días. Cada suspensión celular se recuperó mediante tratamiento con tripsina y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante. Las células se suspendieron en PBS de Dulbecco (fabricado por GIBCO), se centrifugaron de nuevo a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos, y después se congelaron a -80°C. El clon parental 32-05-09 en el que no se había introducido el plásmido de expresión de ARNs<sub>i</sub> también se trató de la misma manera para preparar las células congeladas.

Las células congeladas se descongelaron a la temperatura ambiente y se extrajo el ARN total utilizando RNeasy (fabricado por Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante adjuntas. Se disolvió el ARN total en 45 µl de agua esterilizada, se añadieron a esto 1 µl de RQ1 RNasa-Free DNasa (fabricada por Promega), 5 µl de 10× tampón de DNasa anclado y 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa RNasin (fabricado por Promega), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 30 minutos para descomponer el ADN genómico contaminado en la muestra. Después de la reacción, se purificó el ARN total de nuevo utilizando RNeasy (fabricado por Qiagen) y se disolvió en 40 µl de agua esterilizada.

Para 3 µg de cada uno de los ARN totales obtenidos, se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa utilizando oligo(dT) como cebador en un sistema de 20 µl con SUPERScript® Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis (fabricado por Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante adjuntas para sintetizar un ADNc de hebra sencilla.

A continuación, se llevó a cabo la PCR utilizando una solución de ADNc diluida 100 veces como molde con grupos de cebadores h\_GFT\_fw4 (SEQ ID NO: 27) y h\_GFT\_rv2 (SEQ ID NO: 28) que se diseñaron con el fin de amplificar la región de nucleótidos en las posiciones 799 a 1108 del ADNc del transportador de GDP-fucosa de hámster Chino del SEQ ID NO: 1. Específicamente, se prepararon 20 µl de una solución de reacción [1×tampón Ex Taq (fabricado por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 2,5 unidades de versión de inicio en caliente de polimerasa Ex Taq (fabricada por Takara Shuzo) y 0,5 µM de los cebadores anteriores (SEQ ID NO: 27 y 28)], y se llevó a cabo la PCR calentando a 94°C durante 3 minutos y 32 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos en un ciclo. Después de someter 7 µl de la solución de PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1,75%, se sumergió el gel en 1× concentración SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (fabricado por Molecular Probes) para la tinción durante 30 minutos. La cantidad de ADN amplificado por medio de PCR se midió por medio de un aparato de medida de la fluorescencia de imagen (FluorImager, fabricado por Molecular Dynamics) y se comparó con la cantidad de expresión del ARNm en el transportador de GDP-fucosa. Además, se midió la cantidad de expresión del ARNm en la β-actina y se comparó utilizando el ADNc linealizado en la misma cantidad que el ADNc linealizado utilizado como molde en la medida de la cantidad del ARNm en el transportador de GDP-fucosa de acuerdo con el método para determinar la cantidad de transcripción por medio de PCR competitiva como se describe en el documento WO00/61739.

La Fig. 12 muestra los resultados de la comparación de los ARNm del transportador de GDP-fucosa y la acción  $\beta$  expresada en el clon 32-05-09 y el clon 32-05-09-H12 por medio del método anterior. Los resultados demuestran que en la PCR llevada a cabo tres veces independientemente, no había diferencia en la cantidad de ARNm en la acción  $\beta$  entre los dos clones comparados, mientras la cantidad de expresión del ARNm en el transportador de GDP-fucosa disminuía significativamente.

#### 4. Preparación de la composición de anticuerpo producida mediante el clon con el plásmido de expresión de ARNsi introducido que dirige el transportador de GDP-fucosa

Se preparó un anticuerpo quimérico anti-CCR4 producido mediante el clon 32-05-09-H12 y el clon 32-05-09 obtenidos de acuerdo con el siguiente método.

Se suspendió el clon 32-05-09-H12 en un medio alcalino con un suplemento de 12  $\mu\text{g/ml}$  de puomicina a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml, y se inocularon 30 ml de la mezcla en un matraz T182 para cultivar las células adherentes (fabricadas por Greiner) y se cultivaron para llegar a una confluencia del 100%. El clon 32-05-09 se cultivó de la misma manera que antes, excepto por el uso de un medio alcalino que no tenía suplemento de puomicina. Se eliminó la cantidad total del medio en cada clon, se añadió la misma cantidad de PBS (fabricado por Invitrogen) y se volvió a eliminar para el lavado, y el medio de reemplazó por 30 ml de EXCELL301 (fabricado por JRH Biosciences). Después de cultivar durante 7 días más, se recuperó cada una de las suspensiones celulares. La suspensión se centrifugó a 3.000 rpm y 4°C durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante, seguido de filtración a través de una Membrana PES con un tamaño de poro de 0,22 mm (fabricada por Asahi Techno Glass).

En una columna de 0,8 mm de diámetro, se empaquetaron 0,5 ml de Mab Select (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech), y se hicieron pasar sucesivamente 3,0 ml de agua purificada y 3,0 ml de tampón borato de 0,2 moles/L-NaCl de 0,15 moles/L (pH 7,5) por la columna. La columna se lavó adicionalmente de manera sucesiva con 2,0 ml de tampón citrato de 0,1 moles/l (pH 3,5) y 1,5 ml de tampón borato de 0,2 moles/l-NaCl de 0,15 moles/l (pH 7,5) para equilibrar el portador. Después, se aplicaron a la columna 30 ml del sobrenadante de cultivo después de aplicar la filtración anterior a la columna, y la columna se lavó con 3,0 ml de tampón borato de 0,2 moles/l-NaCl de 0,15 moles/l (pH 7,5). Después de lavar, el anticuerpo adsorbido sobre la columna se hizo eluir con 1,25 ml de tampón citrato de 0,1 moles/l (pH 3,5). Se descartó una fracción de 250  $\mu\text{l}$  eluida en primer lugar, y se recuperó 1 ml de la siguiente fracción y se neutralizó con 0,2 ml de Tris-HCl de 2 moles/l (pH 8,5). El producto eluido recuperado se sometió a diálisis en tampón citrato de 10 moles/l-NaCl de 0,15 moles/l (pH 6,0) a 4°C durante la noche. Después de la diálisis, se recuperó la solución de anticuerpo y se sometió a filtración en condiciones estériles utilizando Millex GV con un tamaño de poro de 0,22 mm (fabricado por MILLIPORE).

#### 5. Análisis de la composición de monosacáridos en la composición de anticuerpo producido por el clon en el que se ha introducido el plásmido de expresión de ARNsi que dirige el transportador de GDP-fucosa

Para el anticuerpo humanizado anti-CCR4 purificado en el apartado 4 de este Ejemplo, se llevó a cabo el análisis de la composición de monosacáridos de acuerdo con un método conocido [Journal of Liquid Chromatography, 6, 1577 (1983)]. La Tabla 3 muestra la proporción de cadenas de azúcar complejas libres de fucosa del total de cadenas de azúcar complejas, calculada a partir de la proporción de la composición de monosacáridos contenida en cada uno de los anticuerpos. Los resultados demuestran que la proporción de cadenas de azúcar libres de fucosa en los anticuerpos producidos por los clones parentales 32-05-09 utilizados en la introducción de ARNsi fue del 8%, mientras la proporción en la cepa 32-05-09-H12 con ARNsi introducido aumentó significativamente hasta el 56%.

A partir de los resultados anteriores, se demostró que la introducción del ARNsi que dirigía el transportador de GDP-fucosa podía controlar la modificación de cadenas de azúcar complejas en el anticuerpo producido por una célula anfitriona.

#### 6. Actividad biológica de la composición de anticuerpo producido por el clon en el que se había introducido el plásmido de expresión de ARNsi que dirige el transportador de GDP-fucosa

Se midió la actividad biológica del anticuerpo quimérico anti-CCR4 purificado en el apartado 4 de este Ejemplo 4 de acuerdo con el método de medida de la actividad CCDA descrito en el apartado (7) del Ejemplo 1 y la actividad de unión al antígeno descrita en el apartado (6) del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Se observó que no existía diferencia en la actividad del unión al antígeno entre el anticuerpo producido por el clon parental 32-05-09 y el anticuerpo producido por el clon en el que se había introducido ARNsi 32-05-09-H12, a la vez que se confirmó que la actividad CCDA del anticuerpo producido por el clon en el que se había introducido ARNsi 32-05-09-H12 se había incrementado notablemente.

Tabla 3

Proporción de cadenas de azúcar libres de fucosa del anticuerpo producido por cada clon	
Cepa	Proporción de cadenas de azúcar libres de fucosa
32-05-09	8%
32-05-09-H12	56%

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 La presente invención puede proporcionar una célula en la cual la actividad de una proteína relacionada con el transporte de un azúcar nucleotídico intracelular, la GDP-fucosa, al aparato de Golgi está más disminuida o suprimida que en su célula parental; un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo que utiliza la célula; un animal no humano o una planta transgénicos o sus progenies, en la que el genoma está modificado con el fin de que tenga una actividad disminuida o suprimida de una proteína relacionada con el
- 10 transporte de un azúcar nucleotídico intracelular, la GDP-fucosa, al aparato de Golgi; un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo a partir del animal o la planta; y un medicamento que comprende la composición de anticuerpo.

**Texto Libre de la Lista de Secuencias**

- SEQ ID NO: 5 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 6 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
5 SEQ ID NO: 7 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 8 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 9 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 10 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 11 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
10 SEQ ID NO: 12 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 13 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 14 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 17 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
15 SEQ ID NO: 18 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 19 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 20 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 21 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 22 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 23 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
20 SEQ ID NO: 24 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 25 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 26 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 27 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
SEQ ID NO: 28 - Explicación de la secuencia sintética: ADN sintético  
25 SEQ ID NO: 33 - Explicación de la secuencia sintética: ARN sintético

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
- <120> Células en las que la actividad de la proteína implicada en el transporte de GDP-fucosa se ha reducido o se ha perdido
- 10 <130> P044079
- <150> JP 2002-106952
- <151> 2002-04-09
- 15 <160> 35
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 1245
- <212> ADN
- <213> Cricetulus griseus
- <400> 1
- |  |                        |      |
|--|------------------------|------|
| gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtacc   | ccagacccta acatcttga   | 60   |
| gccctgtaga ccaggagtg cttctggcgg tggggtgacc   | tagctcttct accaccatga  | 120  |
| acagggccccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc | gctgactgga ggctccactg  | 180  |
| cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccggt  | tctgctgagg gcgctgcaga  | 240  |
| tcgctgctggc cgtctctctc tactgggtca cctccatctc | catggtattc ctcaacaagt  | 300  |
| acctgctgga cagcccctcc ctgcagctgg ataccctat   | cttctgctact ttctaccaat | 360  |
| gcctggtagc ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct  | ggccacctgc tgcccggca   | 420  |
| ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc  | ccgcagcgtg ctgccactgt  | 480  |
| cggtagtctt cattggcatg ataagttca ataacctctg   | cctcaagtac gtaggggtgg  | 540  |
| ctttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttaa   | tgtgcttctg tctacctgc   | 600  |
| tgctcaaaca gaccattcc ttctatgcc tgctcacatg    | tggcatcacc attggtggtt  | 660  |
| tctggctggg tatagaccaa gagggagctg agggcaccct  | gtccctcata ggcaccatct  | 720  |
| tcgggggtgct ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgcat  | ctataccaag aaggtgctcc  | 780  |
| cagcagtgga caacagcctc tggcgcctaa cttctataa   | caatgtcaat gcctgtgtgc  | 840  |
| tcttcttgcc cctgatggtt ctgctgggtg agctccgtgc  | cctccttgac tttgctcacc  | 900  |
| tgtacagtgc ccacttctgg ctcctatgga cgctgggtgg  | cctcttcggc tttgccattg  | 960  |
| gctatgtgac aggactgcag atcaaatca ccagtcccct   | gaccacaat gtatcaggca   | 1020 |
| cagccaaggc ctgtgcgag acagtgctgg ccgtgctcta   | ctatgaagag actaagagct  | 1080 |
| tcctgtggtg gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc  | ctcagcctat acctgggtca  | 1140 |
| ggggctggga gatgcagaag acccaagagg accccagctc  | caaagagggt gagaagagtg  | 1200 |
| ctattggggt gtgagcttct tcagggacct gggactgaac  | ccaag                  | 1245 |
- 25 <210> 2
- <211> 365
- <212> PRT
- <213> Cricetulus griseus
- <400> 2

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu Arg Met Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Gly Ser Thr Ala Ser Glu Glu Ala Asp Glu Asp Ser Arg Asn  
 20 25 30  
 Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu  
 35 40 45  
 Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu  
 50 55 60  
 Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu Ala  
 85 90 95  
 Thr Cys Cys Pro Gly Thr Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp Leu  
 100 105 110  
 Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met  
 115 120 125  
 Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr  
 130 135 140  
 Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly  
 165 170 175  
 Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala Glu  
 180 185 190  
 Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu  
 195 200 205  
 Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala Val  
 210 215 220  
 Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu Arg Ala Leu  
 245 250 255  
 Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met Thr  
 260 265 270  
 Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln  
 275 280 285  
 Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys  
 290 295 300  
 Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys  
 305 310 315 320  
 Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser Ser  
 325 330 335  
 Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu Asp  
 340 345 350  
 Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val  
 355 360 365

<210> 3  
 <211> 1095  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

5

```

atgaataggg cccctctgaa gcggtccagg atcctgcaca tggcgctgac cggggcctca    60
gacccctctg cagaggcaga ggccaacggg gagaagccct ttctgctgcg ggcatgagc    120
atcgcgctgg tggctctccct ctactgggtc acctccatct ccatggtgtt ccttaataag    180
tacctgctgg acagcccctc cctgcggctg gacaccccca tcttcgtcac cttctaccag    240
tgcttggtga ccacgctgct gtgcaaaggc ctcagcgctc tggccgctg ctgccctggt    300
gccgtggact tccccagctt gcgcctggac ctcaggggtg cccgcagcgt cctgccctg    360
tcggtggtct tcatcggcat gatcaccttc aataacctct gcctcaagta cgtcgggtgtg    420
gccttctaca atgtgggccc ctcactcacc accgtcttca acgtgctgct ctcctacctg    480
ctgtcaagc agaccacctc cttctatgcc ctgctcacct gcggtatcat catcgggggc    540
ttctggcttg gtgtggacca ggagggggca gaaggcacc tgctgtggct gggcaccgtc    600
ttcggcgtgc tggctagcct ctgtgtctcg ctcaacgcca tctacaccac gaaggtgctc    660
ccggcgggtg acggcagcat ctgggcctg actttctaca acaacgtcaa cgcctgcatc    720
ctcttctgct cctgtctcct gctgctcggg gagcttcagg ccctgcgtga ctttgcccag    780
ctgggcagtg cccacttctg ggggatgatg acgctgggcg gcctgtttgg ctttgccatc    840
ggctacgtga caggactgca gatcaagttc accagtccgc tgaccacaa tgtgtcgggc    900
acggccaagg cctgtgcca gacagtgctg gccgtgctct actacgagga gaccaagagc    960
ttcctctggt ggacgagcaa catgatggtg ctggcggtc cctccgccta cacctgggtc   1020
agggcctggg agatgaagaa gactccggag gagcccagcc ccaaagacag cgagaagagc   1080
gccatggggg tgtga                                     1095
    
```

5

```

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

```

<400> 4
Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu His Met Ala Leu
 1          5          10          15
Thr Gly Ala Ser Asp Pro Ser Ala Glu Ala Glu Ala Asn Gly Glu Lys
          20          25          30
Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu Tyr
          35          40          45
Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu Asp
          50          55          60
Ser Pro Ser Leu Arg Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr Gln
    
```

10



	<400> 6 gctctagatc acacccccat ggcgctcttc tcgc	34
5	<210> 7 <211> 53 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
10	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
15	<400> 7 gcaagcttc gccatggaga agcccttct gctgcgggca ttgcagatcg cgc	53
20	<210> 8 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
30	<400> 8 gctctagatc acacccccat ggcgctcttc tcgc	34
35	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
45	<400> 9 gagatggagg tgaccagta gaga	24
50	<210> 10 <211> 24 <212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	<400> 10 gagagagacg accagcgca tctg	24
	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	<400> 11 gccattggct atgtgacagg actg	24

5 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 12  
 gcagatcaaa ttcaccagt cccc 24

15 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 13  
 gaacttcacc caagccatgt gac 23

25 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

35 <400> 14  
 cttgggttca gtcccaggtc 20

40 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

45 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Cricetulus griseus

50 <220>

<400> 16  
 ggcgctaacc ttctataac 19

55 <210> 17  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

	<400> 17 gctctagaga attcaaggtc gggcaggaag agggcctatt tc	42
5	<210> 18 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
15	<400> 18 cgggatcctt cacgtgttc gtcctttcca caagatat aaagcc	46
20	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
30	<400> 19 cagatctgcg gccgagct	20
35	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
45	<400> 20 cgcgccgca gatctgagct	20
50	<210> 21 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
60	<400> 21 cgggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc tatttc	37
65	<210> 22 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
70	<220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
75	<400> 22 cgaattctt cacgtgttc gtcctttcca caagatat aaagcc	46

5	<210> 23 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
10	<400> 23 cgcgctaac cttctataac ttttg	26
15	<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
20	<400> 24 gatccaaaaa gttatagaag gttaggcgcg	30
25	<210> 25 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
30	<400> 25 cgttatagaa ggtaggcgc ttttt	26
35	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
40	<400> 26 aatataaaaa gcgctaacc ttctataacg	30
45	<210> 27 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220>  <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético	
50	<400> 27 tctggcgct gactttctac aacaa	25
55	<210> 28 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60		

<220>

5

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 28

accatcatgt tgctcgtcca ccaga

25

10

<210> 29

<211> 2609

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 29

gagccgaggg tgggtctgca ggtgcacccg agggcaccgc cgaggggtgag caccaggtcc 60  
 ctgcatcagc caggacacca gagcccagtc ggggtggacgg acgggcgcct ctgaagcggg 120  
 ccaggatcct gcgcatggcg ctgactggag tctctgctgt ctccgaggag tcagagagcg 180  
 ggaacaagcc atttctgctc cgggctctgc agatcgcgct ggtggctctt ctctactggg 240  
 tcacctccat ttccatggta ttcctcaaca agtacctgct ggacagcccc tccctgcagc 300  
 tggatacccc cattttgtc acctctacc aatgcctggg gacctactg ctgtgcaagg 360  
 gcctcagcac tctggccacc tgctgccccg gcatggtaga ctccccacc ctaaacctgg 420  
 acctcaaggt ggcccgaagt gtgctgcccg tgcagtggt ctttatcggc atgataacct 480  
 tcaataacct ctgcctcaag tacgtagggg tgcccctcta caactggga cgctcgtca 540  
 ccaccgtgtt caacgttctt ctctctacc tgctgctcaa acagaccact tccttctatg 600  
 ccctgctcac ctgcccgtc atcattgggt gtttctggct gggtatagac caagaaggag 660  
 ctgagggaac ctgtccctg acgggcacca tcttcggggt gctggccagc ctctgcgtct 720  
 ccctcaatgc catctatacc aagaagggtc tccctgcagt agaccacagt atctggcgcc 780  
 taaccttcta taacaatgtc aatgcctgcg tgctcttctt gcccctgatg atagtctgg 840  
 gcgagctccg tgcccctctg gccttcaact atctgagcag tgcccacttc tggctcatga 900  
 tgacgctggg tggcctgttt ggctttgcca tcggctatgt gacaggactg cagatcaaat 960  
 tcaccagtcc cctgacccat aacgtgtcag gcacggccaa ggccctgtgca cagacagtgc 1020  
 tggccgtgct ctactacgaa gagattaaga gcttctgtg gtggacaagc aacctgatgg 1080  
 tgctgggtgg ctctccgcc tacacctggg tcaggggctg ggagatgcag aagaccagg 1140  
 aggaccccag ctcaaagat ggtgagaaga gtgtatcag ggtgtgagct ccttcaggga 1200  
 gccagggctg agctcgggtg gggcctgccc agcacggaag gcttccata gacctaactg 1260  
 ggtatggccc tgagcaataa tgtttacatc ctctcagaa gaccatctaa gaagagccag 1320  
 gttctttctt gataatgca gaaagctgcc aaatctctg cctgccccat ctctagtct 1380  
 tgggaaagcc ctaccaggag tggcaccctt cctgcctcct cctggggcct gtctacctcc 1440  
 atatggtctc tggggttggg gccagctgca ctctttgggc actggactga tgaagtgatg 1500  
 tcttactttc tacacaaggg agatgggtt gaccctact atagctagt gaagggagct 1560  
 gtgtaacccc acatctctgg ggccctgggc aggtagcata atagctaggt gctattaaca 1620  
 tcaataacac ttcagactac ctttggaggc agttgggagc tgagccgaga gagagagatg 1680  
 gccattctgc cctcttctgt gtggatgggt atgacagacc aactgtccat ggggtgactg 1740  
 acacctccac acttcatatt ttcaacttta gaaaaggggg agccacacgt ttacagatt 1800  
 aagtggagtg atgaatgect ctacagcccc taacccact tccctgcct ggcttctctt 1860  
 ggcccagaag ggccaccatc ctgttctcca acacctgacc cagctatctg gctatactct 1920  
 ctttctgtac tcccttccc tccccccc cattagctc ctcccaca cctccatctt 1980  
 caggcaggaa gtgggttcca ctgacctct gtcccctct gcttggacc ctgagcctct 2040  
 catgaaggta ggcttatgtt ctctgaggct gggccggag gagcgactg attctcggag 2100  
 ttatccatc aggtcctgt cacaaaatag cctaggccgt gtgtctaaga acagtggagg 2160  
 ttggcttata actgttctgg gggcagcgaa gccacatca aggtactcat agaccagta 2220  
 tttctgagga aaccctgtc cacatcctca cttggtaaag gcacagataa tctccctcag 2280  
 gcctcttcta taggagcact agccctggga gggctccgcc ccatgacctg atcaccceaa 2340  
 agccttcaac agaaggatc caacatgaat ttggggacag aagcactcag accacgatgc 2400  
 ccagcaccac acctctat cctcagggtg gctgtcactg tcctagtccc ttctgtttgg 2460  
 cttttgtac cctcatttcc ttggcgtcat gtttgatgtc ttgtctctt tcgtgagaag 2520  
 atggggaaac catgtcagcc tctgctccg acttccatg gtttctaag aagttgggtg 2580  
 ggctgatgc cctgagttgt atgtgattt 2609

- <210> 30
- <211> 1053
- <212> ADN
- <213> Rattus norvegiucus
- <400> 30

```

atggcgctga ctggagcctc tgctgtctct gaggaggcag acagcgagaa caagccattt    60
ctgctacggg ctctgcagat cgcgctgggt gtttctctct actgggtcac ctccatctcc    120
atggtattcc tcaacaagta cctgctggac agcccctccc tgcagctgga taccctcctc    180
ttcgtcacct tctaccaatg cctgggtgacc tcaactgctgt gcaagggcct cagcactctg    240
gccacctgct gccctggcat ggtagacttc cccaccctaa acctggacct caaggtggcc    300
cgaagtgtgc tgccgctgtc cgtgggtctt atcggcatga taaccttcaa taacctctgc    360
ctcaagtacg tgggggtggc cttctacaac gtgggacgct cgctcactac cgtgttcaat    420
gtgcttctct cctacctgct gcttaaacag accacttctt tttatgccct gctcacctgt    480
gccatcatca ttggtggtt ctggctggga atagatcaag agggagctga gggcaccctg    540
tccttgacgg gcaccatctt cgggggtgctg gccagcctct gtgtctcact caatgccatc    600
tacaccaaga aggtgctccc tgccgtagac cacagtatct ggccgctaac cttctataac    660
aacgtcaacg cctgtgtgct cttcttggcc ctgatggtag tgctgggcga gctccatgct    720
ctcctggcct tcgctcatct gaacagcgcc cacttctggg tcatgatgac gctgggtgga    780
ctcttcggct ttgccattgg ctaigtgaca ggactgcaga tcaaattcac cagtcccctg    840
accataatg tgtcgggcac agccaaggcc tgtgcacaga cagtgtctggc tgtgctctac    900
tatgaagaga ttaagagctt cctgtggtgg acaagcaact tgatggtgct ggggtgctcc    960
tctgcctaca cctgggtcag gggctgggag atgcagaaga cccaggagga ccccagctcc   1020
aaagagggtg agaagagtgc tatcgggggtg tga                               1053

```

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

5

```

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

```

```

          115              120              125
Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser
   130              135              140
Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys
   145              150              155              160
Gly Val Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala
          165              170              175
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser
          180              185              190
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala
          195              200              205
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala
          210              215              220
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Ile Val Leu Gly Glu Leu Arg Ala
          225              230              235              240
Leu Leu Ala Phe Thr His Leu Ser Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met
          245              250              255
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu
          260              265              270
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala
          275              280              285
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile
          290              295              300
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser
          305              310              315              320
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu
          325              330              335
Asp Pro Ser Ser Lys Asp Gly Glu Lys Ser Ala Ile Arg Val
          340              345              350

```

<210> 32  
 <211> 350  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

5

```

<400> 32
Met Ala Leu Thr Gly Ala Ser Ala Val Ser Glu Glu Ala Asp Ser Glu
   1              5              10              15
Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser
          20              25              30
Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu
          35              40              45
Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe
          50              55              60
Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu
          65              70              75              80

```

Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp  
 85 90 95  
 Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly  
 100 105 110  
 Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe  
 115 120 125  
 Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser  
 130 135 140  
 Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys  
 145 150 155 160  
 Ala Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala  
 165 170 175  
 Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser  
 180 185 190  
 Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala  
 195 200 205  
 Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala  
 210 215 220  
 Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Val Leu Gly Glu Leu His Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Ala Phe Ala His Leu Asn Ser Ala His Phe Trp Val Met Met  
 245 250 255  
 Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu  
 260 265 270  
 Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala  
 275 280 285  
 Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile  
 290 295 300  
 Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu  
 325 330 335  
 Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val  
 340 345 350

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

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN Sintético

10

<400> 33  
 gcgccuaacc uucuaaac

19

15

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

<400> 34

agcgttgcaa gttcagccga ggggtggtgct gcaggtgcac ccgagggcac cgccgaggg	60
gagcaccagg tccctgcatc agccaggaca ccagagccca gtcgggtgga cggacggtac	120
gttctggaag gaaaagggcc ccgggaaggg gatacagcat tgagaagctc agaggctttg	180
gtctgggcat ccagaatgga ctttatctgg aggaggtgac atggcttctc gcctctggaa	240
gtgctgcttg gatctccggg acttcatgtc ctgactaggt ctggaagcgg tgaaaatagg	300
ggtaggaaaa aaggagagga ctgcaacaag gtcttcccga gtggcctgag ctcgagggac	360
gagggagggt caacgggtggg gagccgggcg caagggctgg gcggagggag ggggggggtc	420
tccctaagca gaaaggtggg attccatttt ctgggtagat ggtgaagatg cacctgaccg	480
agtctggtcg atctgaagat atcaggggaa aagatagtgc ggggtggagg gagaatgaca	540
gaaccttcca gaaaatggga gaggctatag cacttgcaaa cccttccctg atctccgggg	600
actcccggaa gaagagggca ggtctgtggg cataggtgca gacttgccgg ggagctcttg	660
acggcccgcg gaagtggcaa cggcctgcga gctggccctt taaggcggct cgtaggcgtg	720
tcaggaatg cgcgcaaggg ccgccctgct cggtaatgg cccgggacct gcgtcgctga	780
gccggaactt gaattcggct cgtggcaacc gcagggcctt gctccggtca gggccctgtc	840
cgtgtccctc gagacgcctt cctgagcctc ggtgatctcc ctgcagcacg ccctcctttc	900
ggctctgcgg gtgcttccgg gggttcccgc agcccatgct tcccacgcgg tccgctcca	960
gttatttctt cctccgctcc gtcccttctt cgtctctcgc ctccctttct ccctgcgact	1020
cacgtgtccc ctgtcctcaa actggccatg gctgtcaaag cccacatcct tagttaggcc	1080
ccttctccct tccctgggtc ttgtttcgtg acaccacctc cctccccgc cccgggagcg	1140
agcaagatga ggagcgggtc acctcggcaa atccggaagc agaacttcat ccaagaagga	1200
ggggaccgat aggtcatccc atgtgacagt tgaaggctgc agccacagac cctagctgct	1260
tgaagccctg tagtccaggg actgcttctg gccgtaaggt gacccagctc ttctgccacc	1320
atgaacaggg cgccctctgaa gcgggtccagg atcctgcgca tggcgctgac tggagtctct	1380
gctgtctccg aggagtcaga gagcgggaac aagccatttc tgctccgggc tctgcagatc	1440
gcgctgggtg tctctctcta ctgggtcacc tccatttcca tgggtattct caacaagtac	1500
ctgctggaca gccccctct gcagctggat accccattt ttgtcacctt ctaccaatgc	1560
ctggtgacct cactgctgtg caagggcctc agcactctgg ccacctgctg ccccgcatg	1620
gtagacttcc ccaccctaaa cctggacctc aaggtggccc gaagtgtgct gccgctgtca	1680
gtggtcttta tcggcatgat aaccttcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtgccc	1740
ttctacaacg tgggacgctc gctcaccacc gtgttcaacg ttcttctctc ctacctgctg	1800
ctcaaacaga ccacttctt ctatgccctg ctccacctgc gcgtcatcat tgggtgagtg	1860
gactgggggc gtggggagca ggaatcgtaa agatcaatac cacattactc attatctgtc	1920
ccaggtcttt tgcaccacca gtcataggga gagacctgta gagaacaaat aacttcttta	1980
ctgtgactca gtaagttagg gatccagcca aggtgaacat aataatgta ggcagacact	2040
acagcaaagc cagccagaca ctcagatcta gctaagcatt tgagccatgt taatgtaacg	2100
gatccccatt acaaggtata atatagctgc gttttatgga gagaaacca aggcacagag	2160
aagctaagta gctgggatca cacaggtaat cactgacgta gcagaaattt gcacataagc	2220
agttacctc ataggttaca ctcttgacca acacaccact gttctcaaga ggtcaaggg	2280
gaactcaggt catcacaatt ggcacaagta cctctaccca ctgagccatt tcagtggtcc	2340
agtcaatatg tgtgtgcttt aagaggcttt aactaccttc tcagatgtga ccataagtaa	2400

ttaattaccg ataggagcgt tgtgctgac attacactg tagcatcctc tttattgtac 2460  
 ccataagctc tctgagtggc ggcatctctg tgaactgca gctcggagag gctgcgctcc 2520  
 ttgccacagc cccacaacta agaagcagat agtctgggac gcagtcccca gttggtcata 2580  
 ctcccctggc tgtgtttcaa gccagtctgc tttgctcctg acccttggga gttagcgsaa 2640  
 tgaaaaccaa cactatcact acagtctaaa tgtgctttta aatgaaagcc caggaacttt 2700  
 gaagcatccg gcccttaac ggcagccact atgtcctgat tccgccaaca tcttttcagt 2760  
 gcccggcagt cacatggagc aaggcctct tggcttggac agcatgtgtt agggaacatg 2820  
 tttgccactt gaaatgaatt tagtggctgc tgggttacag agaccagggc atctttcccc 2880  
 tcagatcct gaatgaacga aaagcaacct tcattgttac ctgctctgga ttttagttcg 2940  
 tcttgtttgg cctatttaga tgtccctggt gtctctgagg ccaggctgg gtgctctaga 3000  
 tgtagggacc aggccaacct gtactgtctt cctagaaac attgccctgg ttgggagct 3060  
 cctggatcca ggttaagggt gtctgggagg agagaggta gatagtggca ggatgctcc 3120  
 cactgcccc acatacatac ctaagagat ctggtactcc tccctccagc ctacaagcta 3180  
 ccgtggggtc cacttcagt ccaccagccc tgccaacgtt agaggggatg ggcctcctag 3240  
 taggagaact tacatgcagg aaggtaacgt ctctggagaa cctgagcccg ggtcccaaa 3300  
 gggacaagta gctgatagt aggcagctga gcccctggc ggcctgcca agtggcacgg 3360  
 gaaagtggag ctctctgctg cccccactac tggccccatc tcttggctct cccctccctt 3420  
 cctctgttg agaaggcca tctctgaaa ggcctcctag acatgcgga ctttgcaaaag 3480  
 cctgtcgggc tcacagccc tctagggtct aggacctga gaatgaagaa tggagtcact 3540  
 tctagactct agtggtaacc accaggaggt acagggtgct ctgactgtgc agggaaccc 3600  
 accgtgggct ctgctgagcc aagtgcctgt gaggctggag agtctgtgct ccttgttctg 3660  
 agatagcacc ttgctatgtt gccctcaagt cccaggcaac tgggctgca ggagcaccac 3720  
 ctgctctc tccagcttct tgaagactg taccttctc ctgacagtct ctatctgctc 3780  
 tcactccatc cattgagcag ctattagctt gtggccaagt atttccagg ccctgtactg 3840  
 agtttaggg tacaagttg agaaaggaag ggtggggtc ttgctcctgg tccgtgaatg 3900  
 atgttgatgg cagaaacgat agttacacta gatgctaagg gctgtgggta tctagagga 3960  
 gcaggagca tgtgggataa cctgagcagg cctagctgaa aagtcattgc tggcatgaga 4020  
 ctgctccagt agtacaggct ggaacacac atttgaatgt ttcctgaaga cagttgggag 4080  
 ccacaggaat tatccactgt agaaagatta tttagttgta agacagagta gtagattggt 4140  
 taacatagta gcaaaaacgt gccccagtt tttacagatg aagggaattg gaactcagag 4200  
 aggttaagta acttctcca agcagctcag ctacaaaaat cacagaacag gcaggggct 4260  
 gatggctctg atgcctgtgc tggctccact attccatgtt gctaattcct gcagcagcag 4320  
 taaacctctg ccttgtggaa atgaggagtc taaataaaga gaccatagca ttgccacaag 4380  
 caggtttcta ccaactgggg gtggcaagga atgctgtgtt agcagcagga agctgggaag 4440  
 aggctgagta ctggggggat gaggaagga tccccaggag aggctgactt tggccttga 4500  
 gaatggtgga gtccctggaa agatgcagat acacagagct ctgtggatat acagagaagt 4560  
 gggagctaa gtaggtggct tggggccatc atgtgacaga ggaagtcggg ctgatgcag 4620  
 gaagcccgt gctgtggcct agggagccat gtaggttctt tgagcaggg gcgggggggg 4680  
 gggggggtga cccaggagtg actgtaaaca acatcaggcc atgagcagct ctgacctaat 4740  
 gttctacca agggagccag aaccaaggct tagagccctg tccctttta ggtccaagg 4800  
 tcactttact ggccctctc ctttacagct gttggcccc acaggccatc aggcacctat 4860  
 gctattttat tttatagcct tcattacaat gactacaatt gtaattagag agttgacagg 4920  
 gtcacatctg tccttatata tccccctct gctaagttct gcctgggaga atgtggaggg 4980  
 tattggtgaa atttgggaa gttataaccc ccccaccct gccccacc cctgctttgc 5040  
 tccctttatc tgcagggcat ttctgtgcc actttagccc atatagctcc caaataaatg 5100  
 acacagaac ctggtatctt cattaacaaa ctgctggcac tctgtgggc aggttctgag 5160  
 ctgttctaac cctctaagct gctaagccc agatagatgc cccaatgctt gccatccgag 5220

tctttctctg gcttgctctg ctccatgtgt gacctcatgg tgaatcctcc tgatttcccc 5280  
 acatggcctc tccacacttt tcttctctcc ctctctctac cagggaccct ctcaactggga 5340  
 cccgatgtcc catctgtact gtcctctccc acccagtcac aggcctgattg agtctttatt 5400  
 aaccaatcag agatgatgga aaaacagttt ttacatagca ctgaggatgg agatgcttga 5460  
 cccttgagat gcttgccccg aacctgtact gtatccagat gcttgggccc ccaaatcagc 5520  
 aggtgaatac acagtacaca ggactgacct ccaacagagg gggaacacag gttctcactc 5580  
 tgggctccac gccctcggcc ctttcttagt gcagggggtta gactttgtat gtgttgatga 5640  
 tgaggtaagg gccatggaac agtcagaacg gtgggtgcag aatcctgtcc ctctccctcc 5700  
 tgtcctcacc cctccttacc gtgtcactct tctgtctgtt gcagggtggt tctggctggg 5760  
 tatagaccac gaaggagctg agggaacctt gtccctgacg ggcaccatct tcggggtgct 5820  
 ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgccat ctataccaag aagggtgctcc ctgcagtaga 5880  
 ccacagtatc tggcgcctaa ccttctataa caatgtcaat gcctgcgtgc tcttcttgcc 5940  
 cctgatgata gtgtggggcg agtccctgc cctcctggcc ttactcacc tgagcagtg 6000  
 ccacttctgg ctcatgatga cgtgggtgg cctgtttggc ttgccatcg gctatgtgac 6060  
 aggactgcag atcaaatca ccagtcacct gaccataac gtgtcaggca cggccaaggc 6120  
 ctgtgcacag acagtgtctg ccgtgtctca ctacgaagag attaagagct tctgtgtgtg 6180  
 gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctccgcctac acctgggtca ggggctggga 6240  
 gatgcagaag acccaggagg accccagctc caaagatggt gagaagagtg ctatcagggt 6300  
 gtgagctcct tcagggagcc agggctgagc tcgggtgggg cctgccaccg acggaaggct 6360  
 tcccatagag cctactgggt atggccctga gcaataatgt ttacatcctt ctcaagaagc 6420  
 catctaagaa gagccagggt ctttctgat aatgtcagaa agctgccaaa tctcctgcct 6480  
 gccccatctt ctagtcttgg gaaagcccta ccaggagtgg cacccttctt gcctcctcct 6540  
 ggggctgtc tacctccata tggctcttgg ggttggggcc agctgcactc ttggggcact 6600  
 ggactgatga agtgatgtct tactttctac acaagggaga tgggttgtga ccctactata 6660  
 gctagttgaa gggagctgtg taaccccaca tctctggggc cctggggcagg tagcataata 6720  
 gctaggtgct ataacatca ataacactc agactacctt tggaggcagt tgggagctga 6780  
 gccagagag agagatggcc atctgtccct cttctgtgtg gatgggtatg acagaccaac 6840  
 tctccatggg gtgactgaca cctccacact tcatatttc aactttagaa aagggggagc 6900  
 cacaggtttt acagattaag tggagtgatg aatgcctca cagcccctaa cccactttc 6960  
 cctgcctggc tctcttggc ccagaagggc caccatctg tctccaaca cctgaccag 7020  
 ctatctggct atactctctt tctgtactcc cttcccttc cccccccat tagcctcctc 7080  
 cccaacacct ccatctcag gcaggaagtg gggctcactc agcctctgtt cccatctgct 7140  
 tggacccttg agcctctcat gaaggtaggc ttatgttctc tgaggctggg gccggaggag 7200  
 cgcactgatt ctcgagatta tcccatcagg ctcctgtcac aaaatagcct agccctgtgtg 7260  
 tctaagaaca gtggaggttg gcttataact gttctggggg cagcgaagcc cacatcaagg 7320  
 tactcataga cccagatatt ctgaggaaac ccctgtccac atcctcactt ggtaaaggca 7380  
 cagataatct cctcaggcc tcttgtatag gagcactagc cctgggaggg ctccgcccc 7440  
 tgacctgatc accccaaagc cttcaacaga aggattccaa catgaatttg gggacagaag 7500  
 cactcagacc acgatgccca gcaccacacc ctcctatcct cagggtagct gtcactgtcc 7560  
 tagtcccttc tgtttggcct tttgtaccct ctttctctg gcgtcatgtt tgatgtcttt 7620  
 gtctctttcg tgagaagatg gggaaacct gtcagcctct gcttccgact tccatgggt 7680  
 tctaataag tgggtggggc ctgatgccct gagttgtatg tgatttaata aaaaaaaaaat 7740  
 ttttttaaaa ac 7752

- <210> 35
- <211> 4039
- <212> ADN
- <213> *Cricetulus griseus*
- <400> 35

gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtacc ccagacccta acatcttgg 60  
 gccctgtaga ccaggagtg cttctggccg tggggtgacc tagctcttct accaccatga 120  
 acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg 180  
 cctctgagga ggcatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctcgg gcctgcaga 240  
 tgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catggtttc ctaacaagt 300  
 acctgctgga cagccccctc ctgcagctgg ataccctat cttcgtcact ttctaccaat 360  
 gcctgtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca 420  
 ccgttgactt cccacccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgacgctg ctgccactgt 480  
 cggtagctt cattggcatg ataagttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540  
 ccttctacaa cgtggggcgc tcgctacca ccgtgtcaa tgtctctcgc tctacctgc 600  
 tgctcaaaac gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtgagt 660  
 ggggccggg ggctgtggga gcaggatggg catogaactg aagccctaaa ggtcaacact 720  
 gtaggtacct ttacttactg tcccaggctc ctgcatcag cagttacagg aagagccctg 780  
 tagaaaacaa ataacttctt tatggtcatt caacaagtta gggacccagc cagggtgaaa 840  
 ataagttag cagcaactac agcaaagatg gctctcgcca ctgcatgat taaaatgtgc 900  
 caggactca gatcyaaaga ttggatccac attaactcaa ctaatcccta ttacaaggta 960  
 aaatatatcc gaattttaca gagggaaaac caaggcacag agaggctaag tagcttgacc 1020  
 aggatcacac agctaataat cactgacata gctgggattt aaacataagc agttacctc 1080  
 atagatcaca ctatgaccac catgccactg ttcttctca agagttccag gatcctgtct 1140  
 gtccagttct ctttaagag gacaacacat ctgacattgc taccttgagg taacattga 1200  
 aatagtggt agacatatgt ttttaagttt attcttctt tttatgytg tgtgttggg 1260  
 gggccaccac agtgtatggg tggagataag gggacaactt aagaattggt ctttctccc 1320  
 accacatggg tgctgagtc tgaactcagg tcatcaggat tggcacaat cctttacc 1380  
 actgagccat ttcactggtc caatatatgt gtgctttaa gaggcttaa ctatttccc 1440  
 agatgaa gtectgctga tcattatccc cttttaccg gaagccctc gggaggtgcc 1500  
 atccctgtgg tcgtctgcat acaaatggg aaactgcaac tcagagaaac aaggctactt 1560  
 gccaggcccc cacaagtaag ataggctggg atgcatccc agactggcca cactcctgg 1620  
 cctgtgcttc aagccagttt actttgtcc tgccattgg aagttagcat gttgagtc 1680  
 aacacaataa ctacaggcca aaagtgttt taaattaaag tcagatgaac ttttaacat 1740  
 ccagagctcc tcaactgcag gagttacaac ctgattctgc aaccatctt gcagtcccc 1800  
 gtagcatat gtagctagag gctctggct aggacagcat gtgttaggaa acatctggcc 1860  
 ctgagatcat tgaattgagt gactgctggg tgacaaagc caaggcatcc gttccctgag 1920  
 agtctgggc aagcagcaat gtgacctca tttgtacct ctcaggttct ttatctgtcc 1980  
 tgtttgacct acttagtctc ctctgggtgc tcagaggccc aggctgggta ctctggatgt 2040  
 caggatcagg ccaatgcgca catctgccct agaaatgtcc ccctggttga gcagctcctg 2100  
 aatccatcgg taaagggtct ggaccaggga ggagtcagat aaaaagctga cagcactggg 2160  
 ggactccatg gggaaactcc acctgcccc acacatccat cctaagagaa ctggtattcc 2220  
 ttgttctctc tttgtctac aaggcaccct gggatccca ttcagtctcc cagccttgcc 2280  
 agggtagag ggcatgagcc tccttgggg gaatttagat gcaagaagt acagtcacta 2340  
 gagaacctga gctcagatcc ccaaagtaac cagtacctga tagtgagga gctgagaacc 2400  
 gcagcagcct gcctgagtg ctgaactctg cggctccgg aactggccc aactgttggg 2460  
 tctctcttc cttctctcgt tgagggagg cccatctctg ataagtctg tggggactct 2520  
 agagtaggga ggaggaggag caatctaagc aggccttact gagaagtct tgctggcat 2580

tggetgcctg	aggagtacag	actgggaaca	cccattttaa	tgagtaaggt	ttttcctgaa	2640
ggccatgggg	agccacggag	gaaaatcatt	ttagttacaa	gacaaagagt	agattgggta	2700
acatggggagc	arggacatgg	ccccaatfff	cattgatgaa	ggaaattgga	actcrgagag	2760
gtaaagtaac	ttctcccaa	tagctcagct	tcataatcac	agaacagtca	gagtctagat	2820
ctctctgatg	cctgtgatgg	tcctgccatt	ccatgttgct	gatccctgtg	gcatcagtaa	2880
gcctctacct	tgtgggaatg	caggatctaa	atgaagagag	raagtgtctg	ccccatgctg	2940
tggcttgga	agctatgcag	gctctttgag	cagagagtga	cccacaagtg	aatagagtcc	3000
tatgagactc	aaagcaacat	ccacccttaa	gcagctctaa	ccaaatgctc	acactgaggg	3060
agccaaagcc	aagttagagt	cctgtgcttg	cccaaggtea	ctttgcctgg	ccctcctcct	3120
atagcaccog	tgttatctta	tagccctcat	tacagtgatt	acaattataa	ttagagaggt	3180
aacagggccca	cactgtcctt	acacattccc	ctgctagatt	gtagctggga	gagggggaga	3240
ttaggtggc	tggggagtg	ggagggaaga	tgagatfff	cattctgggc	tctactccct	3300
cagccatfff	ttggtgtggg	agttagactt	tggatatgtt	gatgatgagg	taaggggccac	3360
agaacagtct	gaactgtggt	atcagaatcc	tgtccctctc	cctctctcct	catccctctt	3420
caccttgca	ctcctctgtc	tgctacaggt	ggtttctggc	tgggtataga	ccaagagggga	3480
gctgagggca	ccctgtccct	cataggcacc	atcttcgggg	tgctggccag	cctctgcgtc	3540
tcctcaatg	ccatctatac	caagaagtg	ctcccagcag	tggacaacag	catctggcgc	3600
ctaaccttct	ataacaatgt	caatgcctgt	gtgctcttct	tgccctgat	ggttctgctg	3660
ggtgagctcc	gtgccctcct	tgactttgct	catctgtaca	gtgccactt	ctggctcatg	3720
atgacgctgg	gtggcctctt	cggctttgcc	attggctatg	tgacaggact	gcagatcaaa	3780
ttcaccagtc	ccctgaccca	caatgtatca	ggcacagcca	aggcctgtgc	gcagacagtg	3840
ctggccgtgc	tctactatga	agagactaag	agcttcctgt	ggtggacaag	caacctgatg	3900
gtgctgggtg	gctcctcagc	ctatacctgg	gtcaggggct	gggagatgca	gaagacccaa	3960
gaggacccca	gctccaaaga	gggtgagaag	agtgctattg	gggtgtgagc	ttcttcaggg	4020
acctgggact	gaacccaag					4039

## REIVINDICACIONES

1. Una célula en la cual la actividad de un transportador de GDP-fucosa está suprimida o más disminuida que en su célula parental, donde la célula se selecciona entre los siguientes (i) a (ix):

- (i) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (ii) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (iii) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- (iv) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (v) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (vi) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (vii) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (viii) una célula pluripotencial embrionaria no humana;
- (ix) una célula huevo fertilizada no humana,

donde el transportador de GDP-fucosa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) o una proteína codificada por un ADN seleccionado entre (d) y (e):

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;
- (b) una proteína que comprende un secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa;
- (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa;
- (d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1;
- (e) un ADN que hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa,

donde la actividad de dicho transportador de GDP-fucosa está disminuida o suprimida por medio de una técnica de ingeniería genética, donde la técnica de ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en (1) a (3):

- (1) una técnica de desorganización génica que comprende dirigir un gen que codifica dicho transportador de GDP-fucosa;
- (2) una técnica para introducir un mutante negativo dominante de dicho transportador de GDP-fucosa, donde el mutante negativo dominante de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa;
- (3) una técnica para suprimir la transcripción y/o traducción de dicho transportador de GDP-fucosa.

2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, donde el mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal en el que se suprimen 30 aminoácidos en el extremo N de dicho transportador de GDP-fucosa.

3. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, donde la técnica para suprimir la transcripción y/o traducción de dicho transportador de GDP-fucosa es un método de ARNi (ARN de interferencia).

4. La célula de acuerdo con la reivindicación 3, donde el método de ARNi es la utilización de un ARN de doble hebra que comprende un ARN y su ARN complementario, cuyo ARN de doble hebra es introducido o expresado en la célula, siendo capaz dicho ARN comprendido en el ARN de doble hebra de disminuir la cantidad de ARNm de dicho transportador de GDP-fucosa, donde dicho ARN de doble hebra es un ARN correspondiente a un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de 10 a 30 nucleótidos continuos en la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1.

5. La célula de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde el método de ARNi es la utilización de un ARN de doble hebra que comprende un ARN seleccionado del grupo que consiste en (a) y (b) y su ARN complementario, cuyo ARN de doble hebra es introducido o expresado en la célula para disminuir de ese modo la cantidad de ARNm de dicho transportador de GDP-fucosa:

- (a) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33;
- (b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos o añadidos a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33.

6. La célula de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde el ARN de doble hebra es introducido en la célula utilizando un vector en el que se introducen un ADN correspondiente al ARN de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 y su ADN complementario.
- 5 7. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  en una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo.
- 10 8. La célula de acuerdo con la reivindicación 7, que es resistente a al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):
- 15 (a) una lectina de *Lens culinaris*;  
(b) una lectina de *Pisum sativum*;  
(c) una lectina de *Vicia faba*;  
(d) una lectina de *Aleuria aurantia*.
9. Una célula en la que un gen que codifica una molécula de anticuerpo es introducido en la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 10. La célula de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):
- 25 (a) un anticuerpo humano;  
(b) un anticuerpo humanizado;  
(c) un fragmento de anticuerpo que comprende la región Fc de (a) o (b);  
(d) una proteína de fusión que comprende la región Fc de (a) o (b).
- 30 11. La célula de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde la molécula de anticuerpo pertenece a una clase de IgG.
12. Un procedimiento para la producción de una composición de anticuerpo, que comprende utilizar la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde la composición de anticuerpo tiene una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos superior y tiene una proporción superior de cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre las cadenas de azúcar conectadas a N-glicósido complejo totales unidas a la región Fc en la composición de anticuerpo que una composición de anticuerpo producida por la célula parental.
- 35 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende cultivar la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en un medio para formar y acumular una composición de anticuerpo en el cultivo; y recuperar la composición de anticuerpo del cultivo.
- 40 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde la proporción de una cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  es del 20% o más de las cadenas de azúcar conectadas a N-glicósido complejo totales unidas a la región Fc de la composición de anticuerpo.
- 45 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde la cadena de azúcar en la cual la fucosa no está unida es una cadena de azúcar en la cual la posición 1 de la fucosa no está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo a través de un enlace  $\alpha$ .
- 50 16. Una composición de anticuerpo producida mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.
- 55 17. Un medicamento que comprende como ingrediente activo la composición de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16.
- 60 18. Un anticuerpo producido mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para la diagnosis, prevención o tratamiento de enfermedades acompañadas de tumores, enfermedades acompañadas de alergia, enfermedades acompañadas de inflamación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades acompañadas de infecciones virales o enfermedades acompañadas de infecciones bacterianas.

19. Una proteína que inhibe la función de un transportador de GDP-fucosa, donde el transportador de GDP-fucosa es una proteína seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

- 5 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;  
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1 a 20 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa; y  
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y tiene una actividad transportadora de GDP-fucosa,

10 donde la proteína que inhibe la función de dicho transportador de GDP-fucosa es una proteína negativa dominante de dicho transportador de GDP-fucosa, y donde la proteína negativa dominante de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa.

15 20. La proteína de acuerdo con la reivindicación 19, donde el mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa es un mutante por delección N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa en el que se suprimen 30 aminoácidos del extremo N-terminal de dicho transportador de GDP-fucosa.

20 21. Un ADN que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 19 o 20.

22. Un ARN de doble hebra que comprende un ARN seleccionado del grupo que consiste en

(a) y (b) y su ARN complementario:

- 25 (a) un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33;  
 (b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos en la que uno o unos pocos nucleótidos son suprimidos o añadidos a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y tiene esencialmente la misma actividad de ARNi que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 para un transportador de GDP-fucosa como se define en la reivindicación 1.

30 23. Un ADN correspondiente al ARN de acuerdo con la reivindicación 22 y su ADN complementario.

35 24. El ADN de acuerdo con la reivindicación 23, donde el ADN correspondiente al ARN está representado por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 16.

25. Un ADN recombinante que comprende el ADN de acuerdo con la reivindicación 23 o 24 y su ADN complementario.

40 26. El ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 25, que se constituye para expresar el ARN de doble hebra de acuerdo con la reivindicación 22.

27. Un transformante, que es una célula que tiene introducido el ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 25 o 26.

45 28. Un procedimiento para la producción de una célula resistente a una lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  en una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo, que comprende introducir y/o expresar en una célula el ARN de doble hebra de acuerdo con la reivindicación 22.

50 29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, donde dicha introducción del ARN de doble hebra es la introducción de un vector en el que se inserta un ADN complementario al ARN de acuerdo con la reivindicación 25 o 26.

55 30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, donde la célula resistente a lectina que reconoce una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace  $\alpha$  en una cadena de azúcar conectada a un N-glicósido complejo es una célula resistente a al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):

- 60 (a) una lectina de *Lens culinaris*;  
 (b) una lectina de *Pisum sativum*;  
 (c) una lectina de *Vicia faba*;  
 (d) una lectina de *Aleuria aurantia*.

31. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una levadura, una célula animal, y una célula de insecto.

5 32. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, donde la célula se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) a (i):

- (a) una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster Chino;
- (b) una célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (c) una célula de la línea celular de mieloma de ratón NS0;
- 10 (d) una célula de la línea celular de mieloma de ratón SP2/0-Ag14;
- (e) una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster Sirio;
- (f) una célula de hibridoma que produce un anticuerpo;
- (g) una célula de la línea celular leucémica humana Namalwa;
- (h) una célula pluripotencial embrionaria no humana;
- 15 (i) una célula huevo fertilizada no humana.

20

FIG. 1

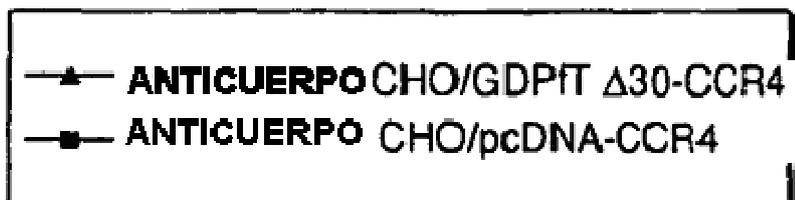
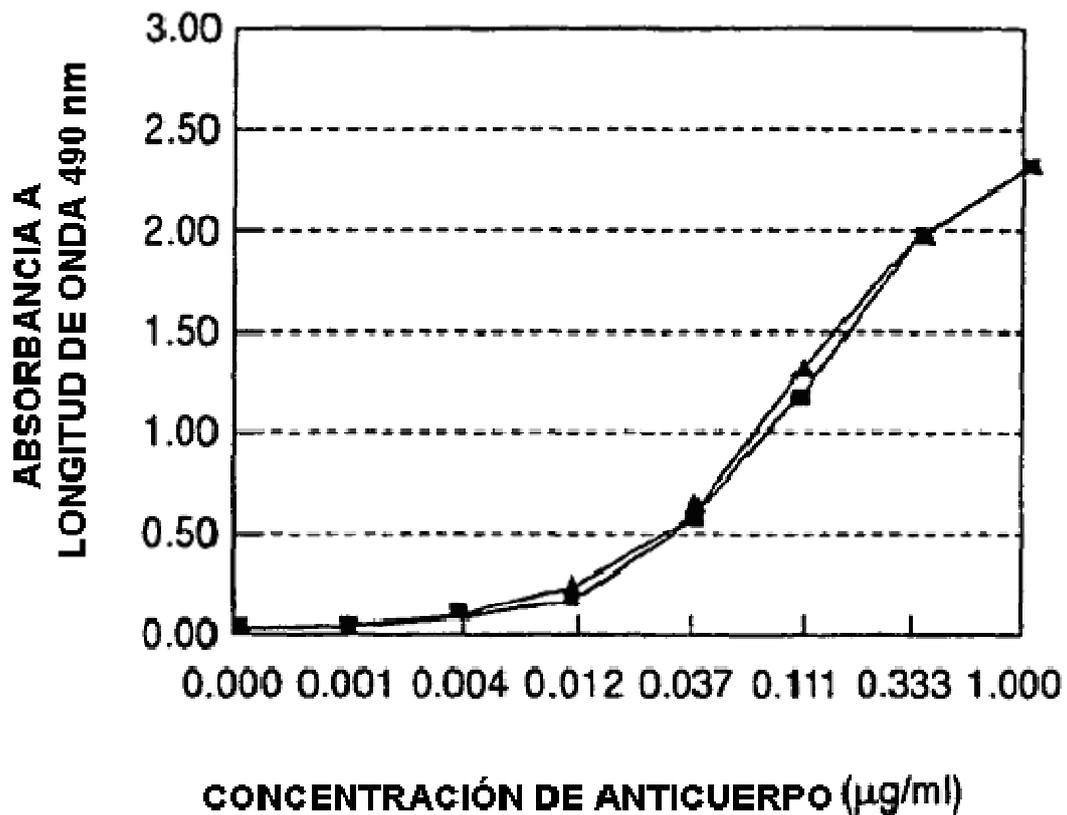


FIG. 2

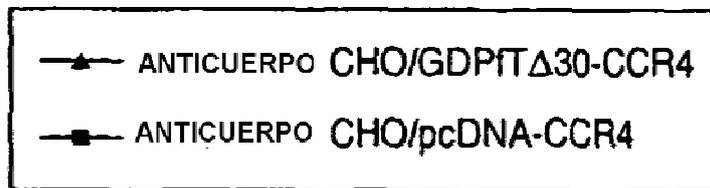
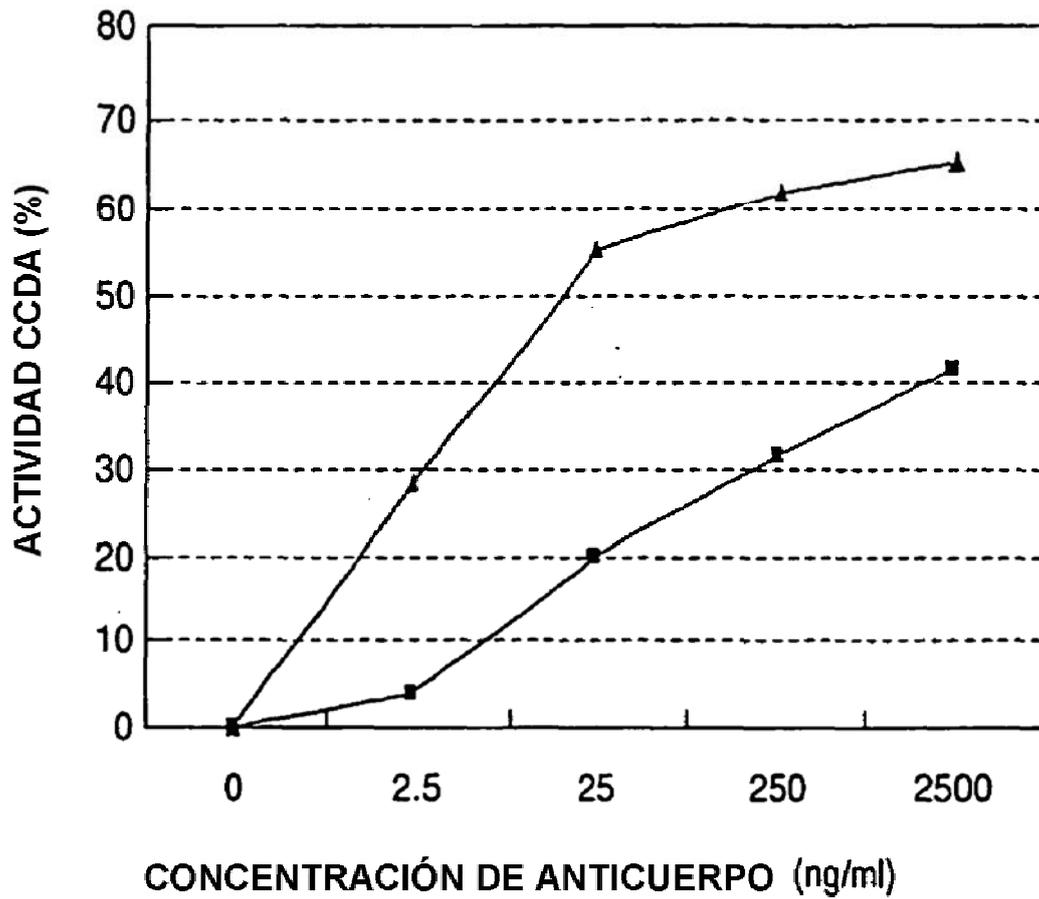


FIG. 3

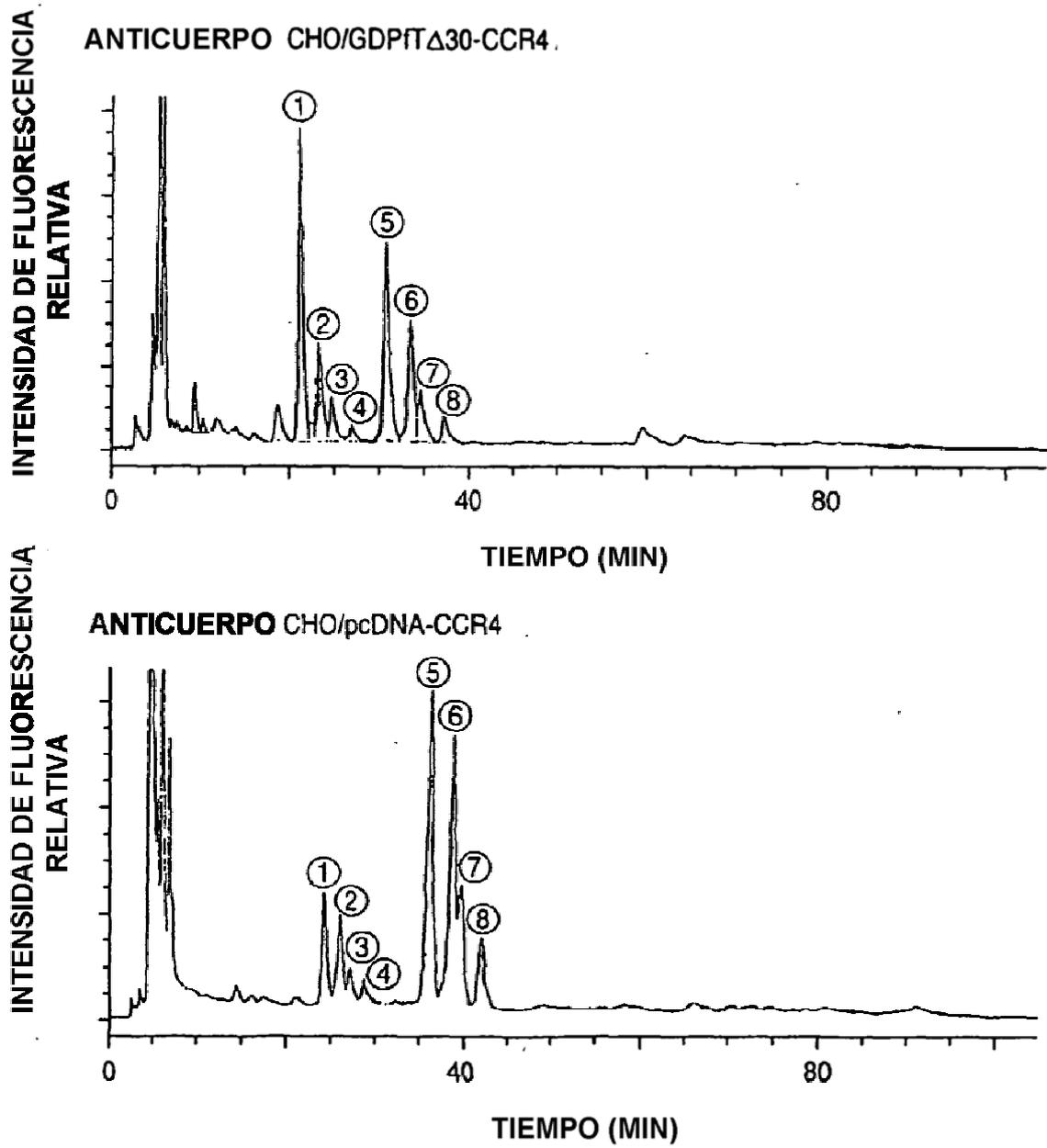
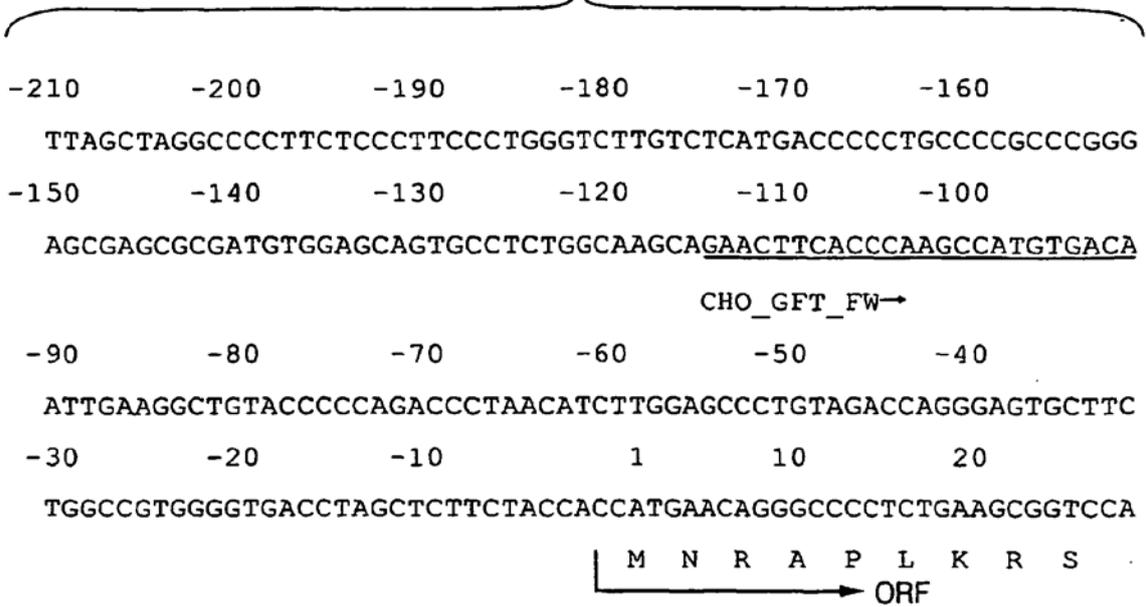
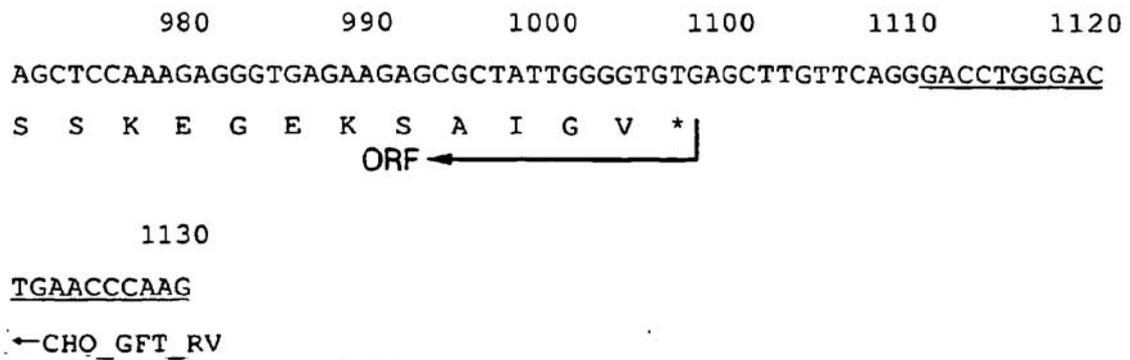


FIG. 4



SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN NO TRADUCIDA 5'



SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN NO TRADUCIDA 3'

FIG. 5

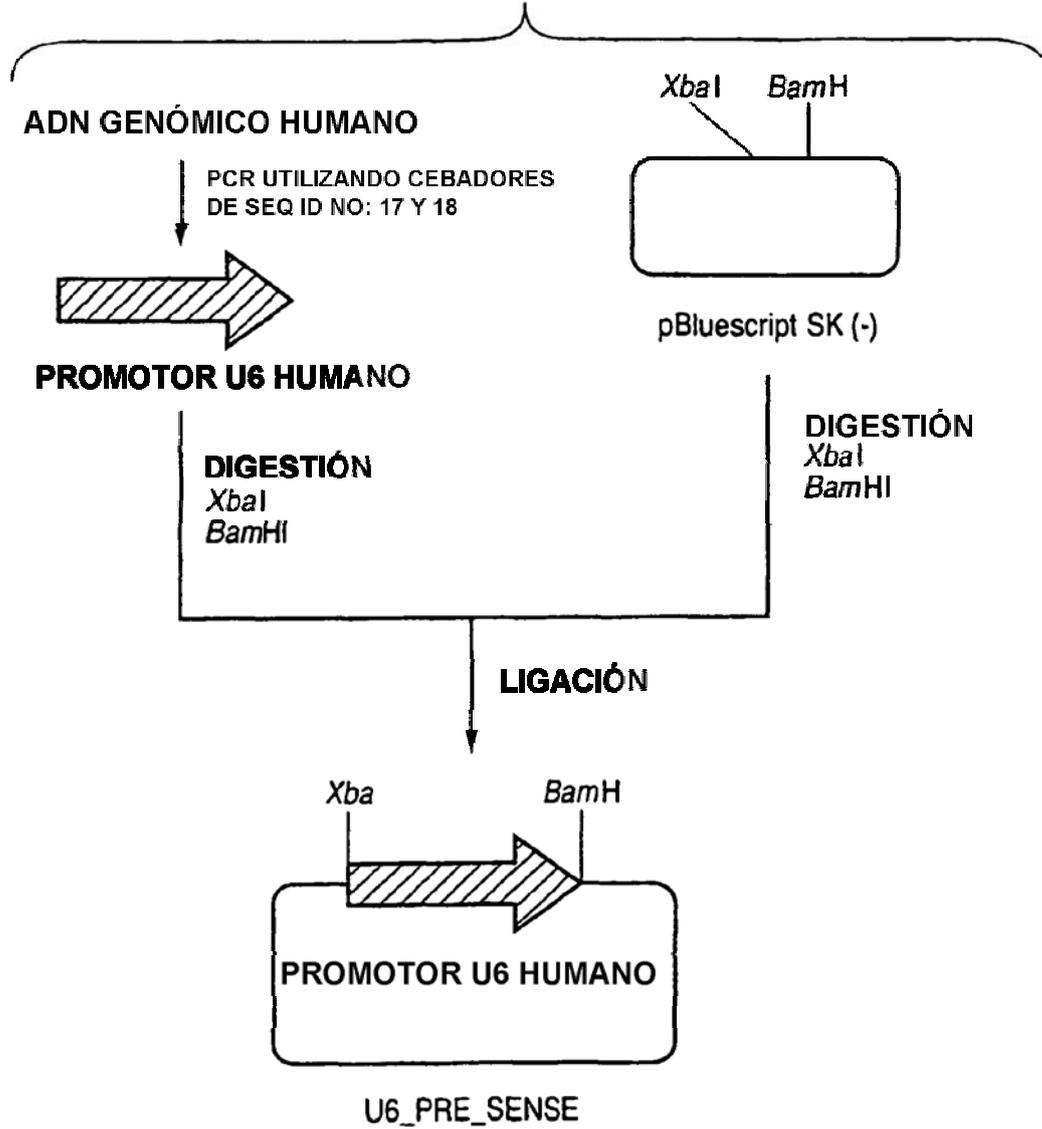


FIG. 6

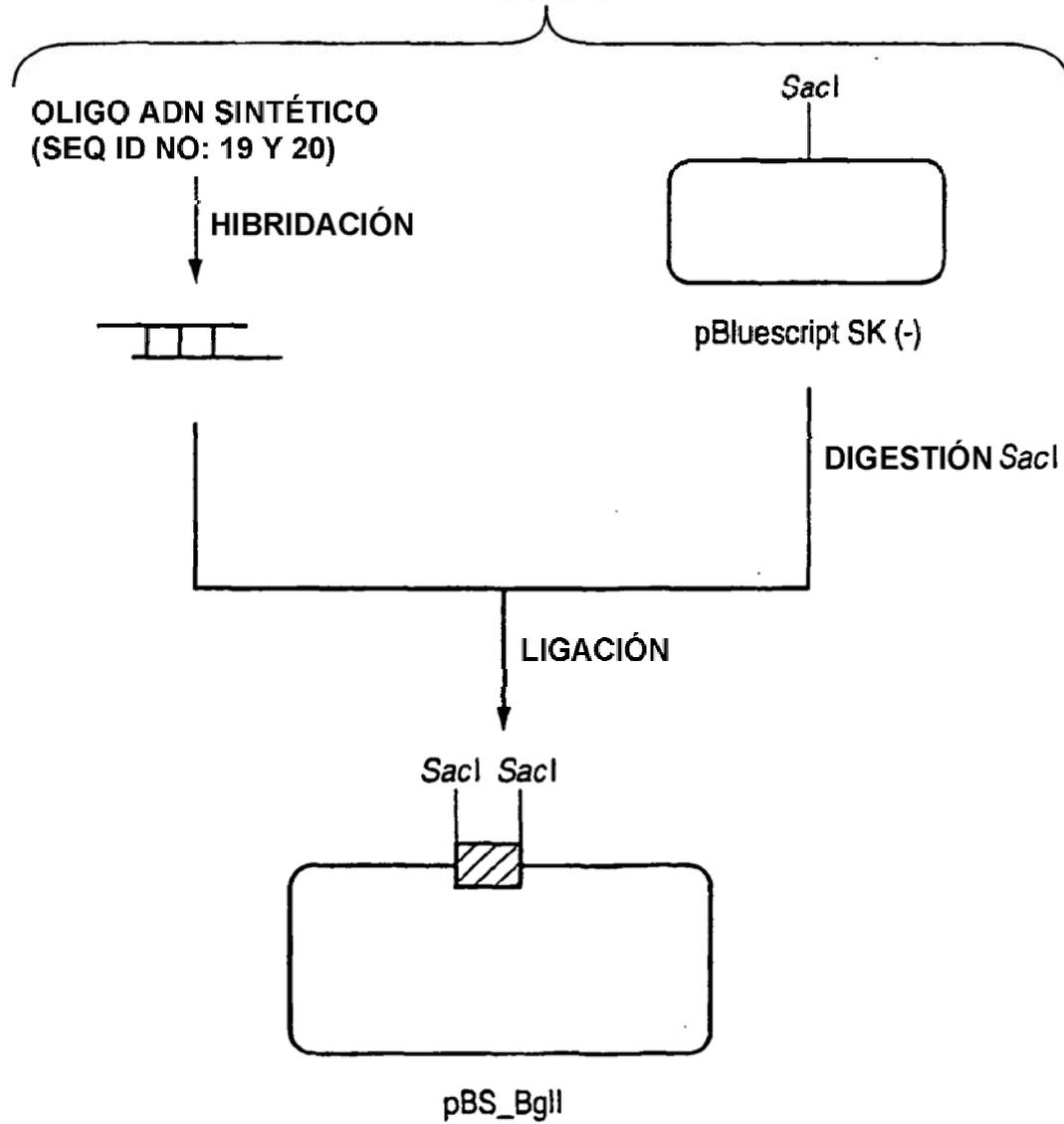


FIG. 7

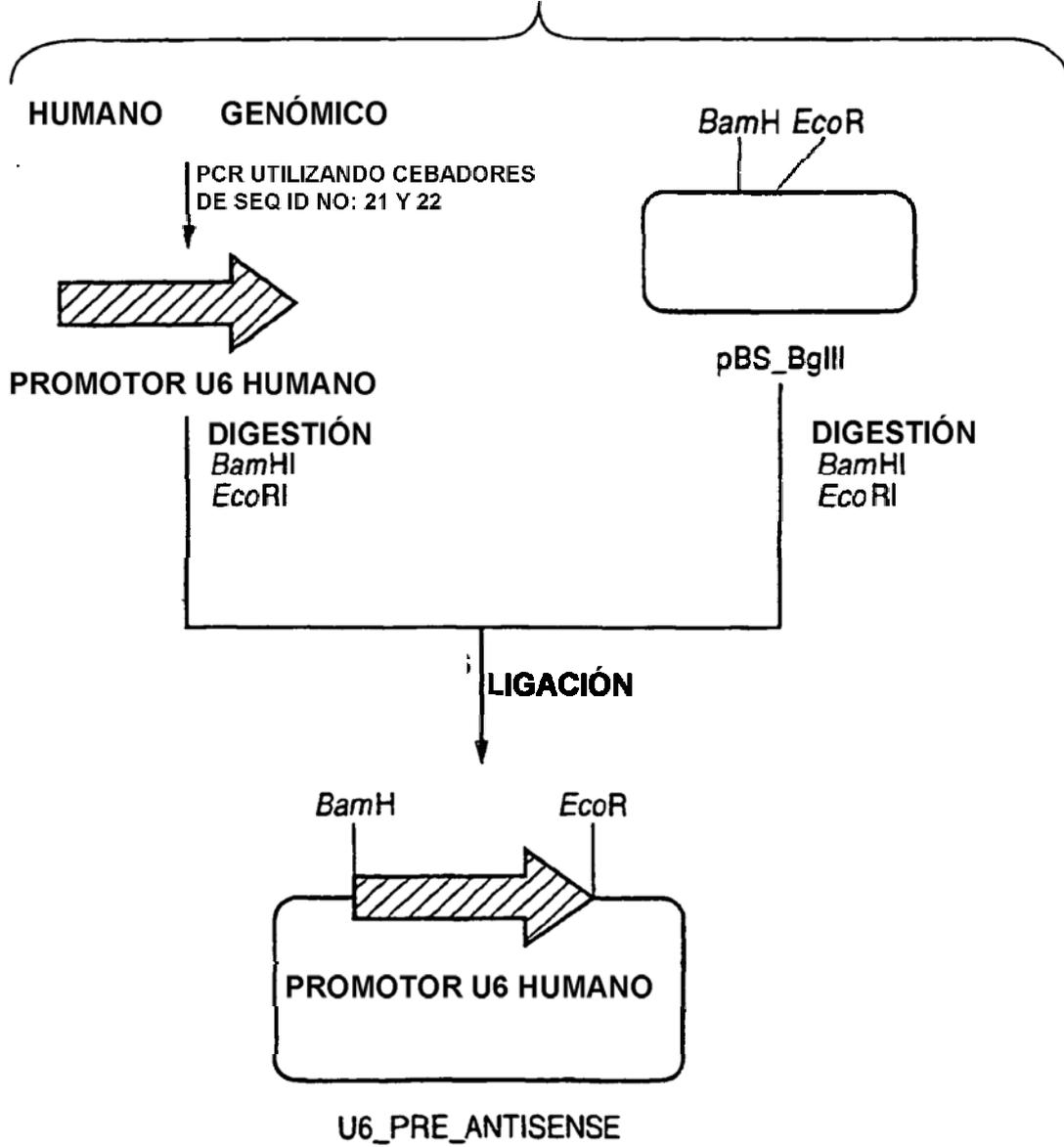


FIG. 8

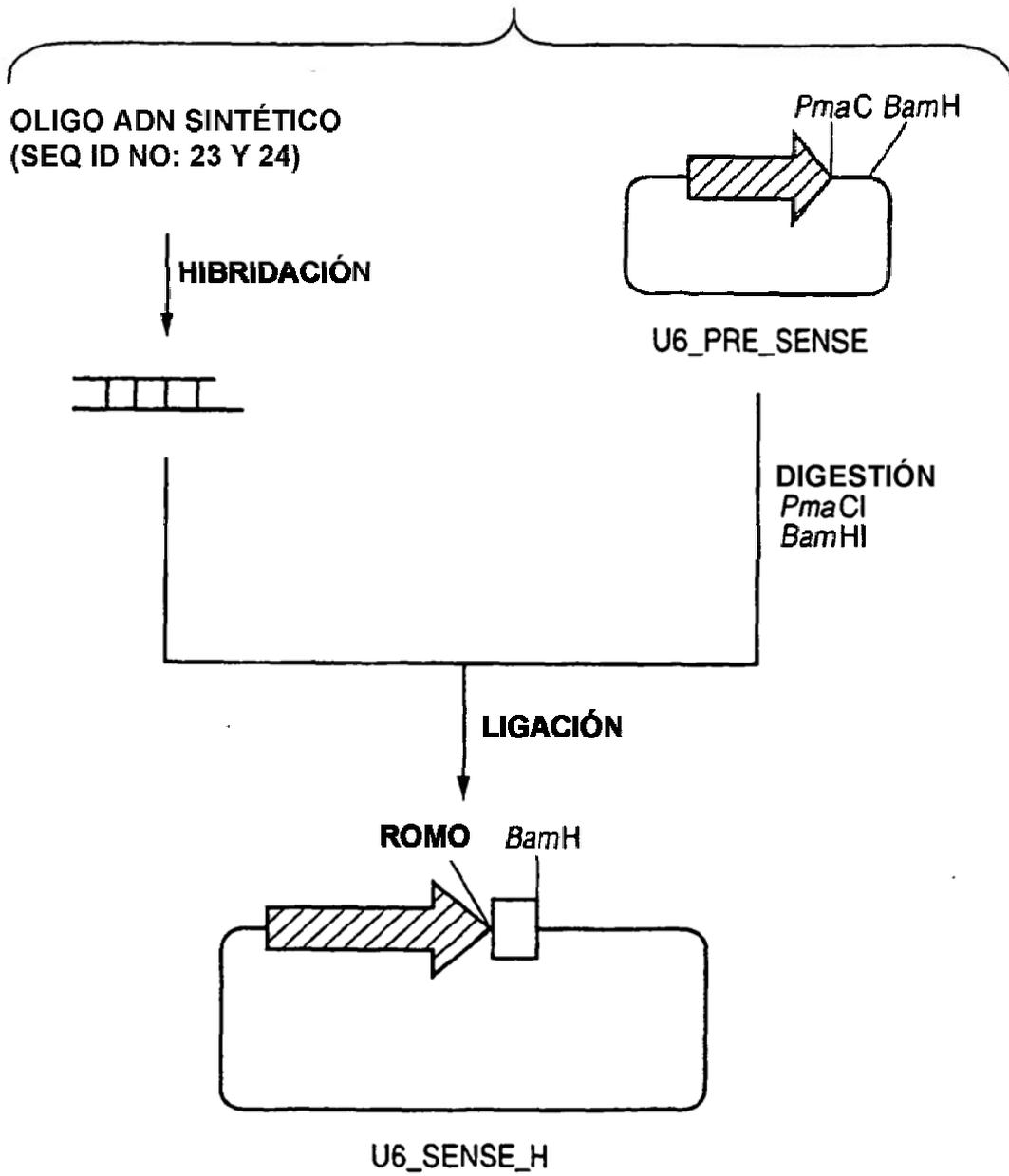


FIG. 9

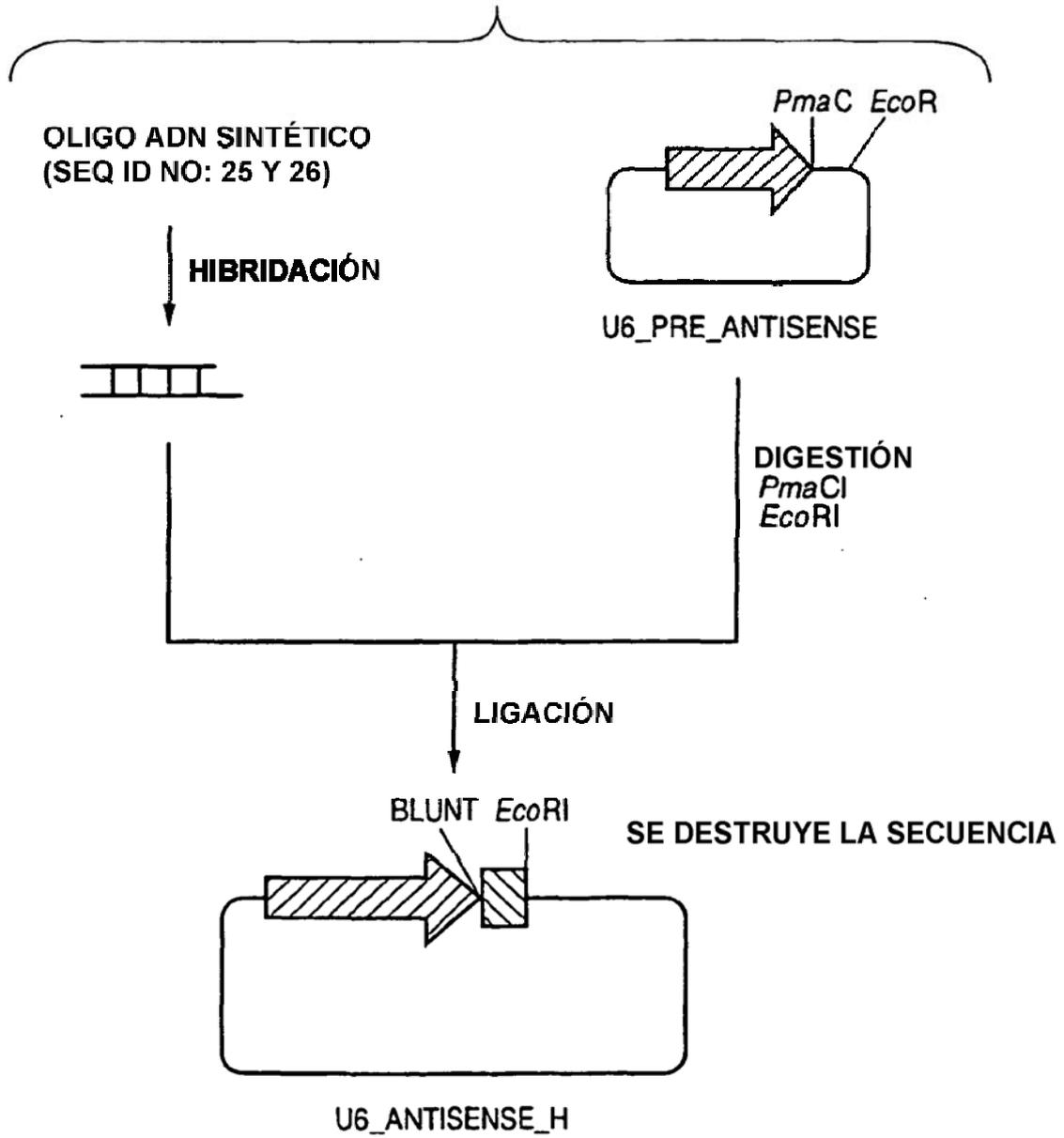


FIG. 10

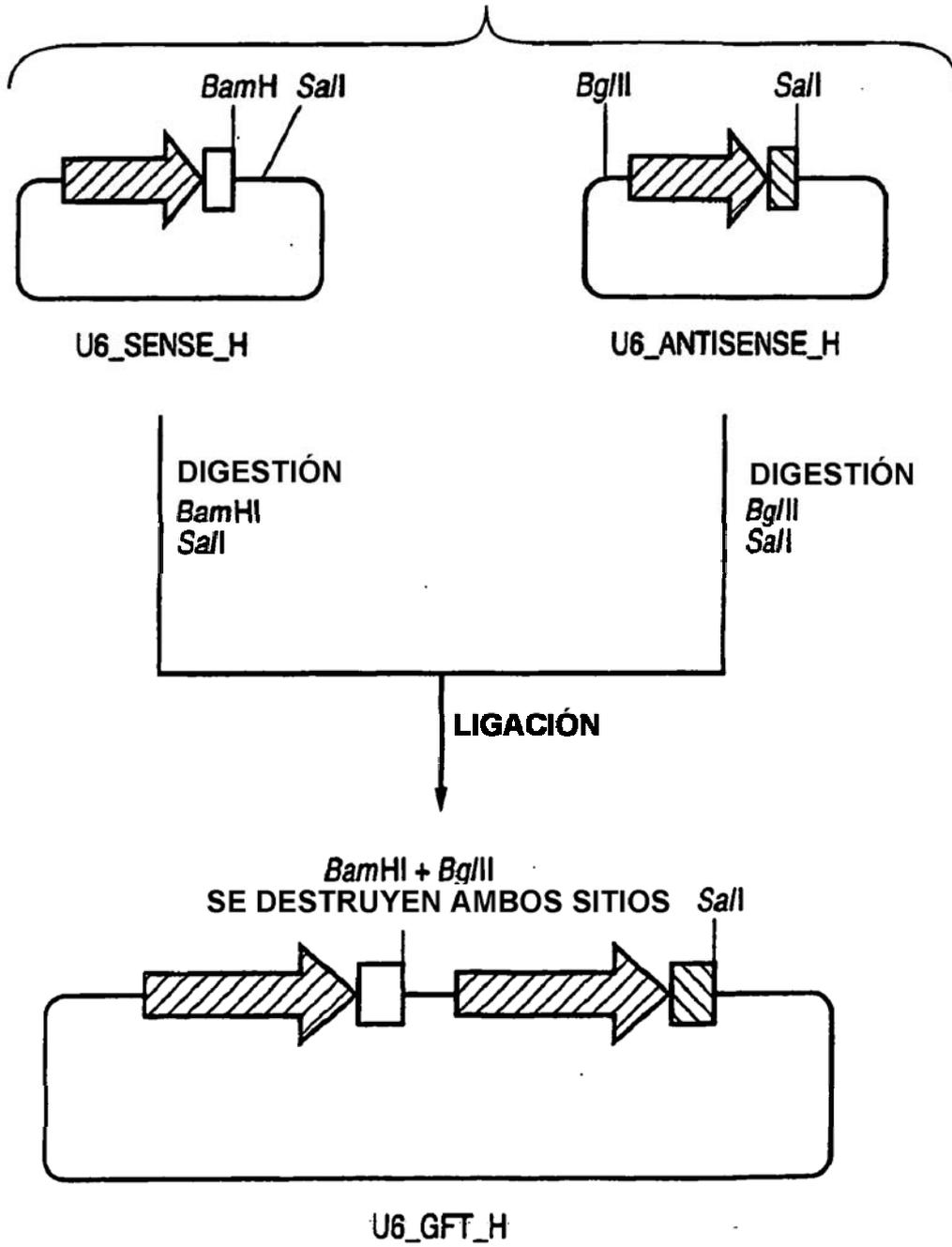


FIG. 11

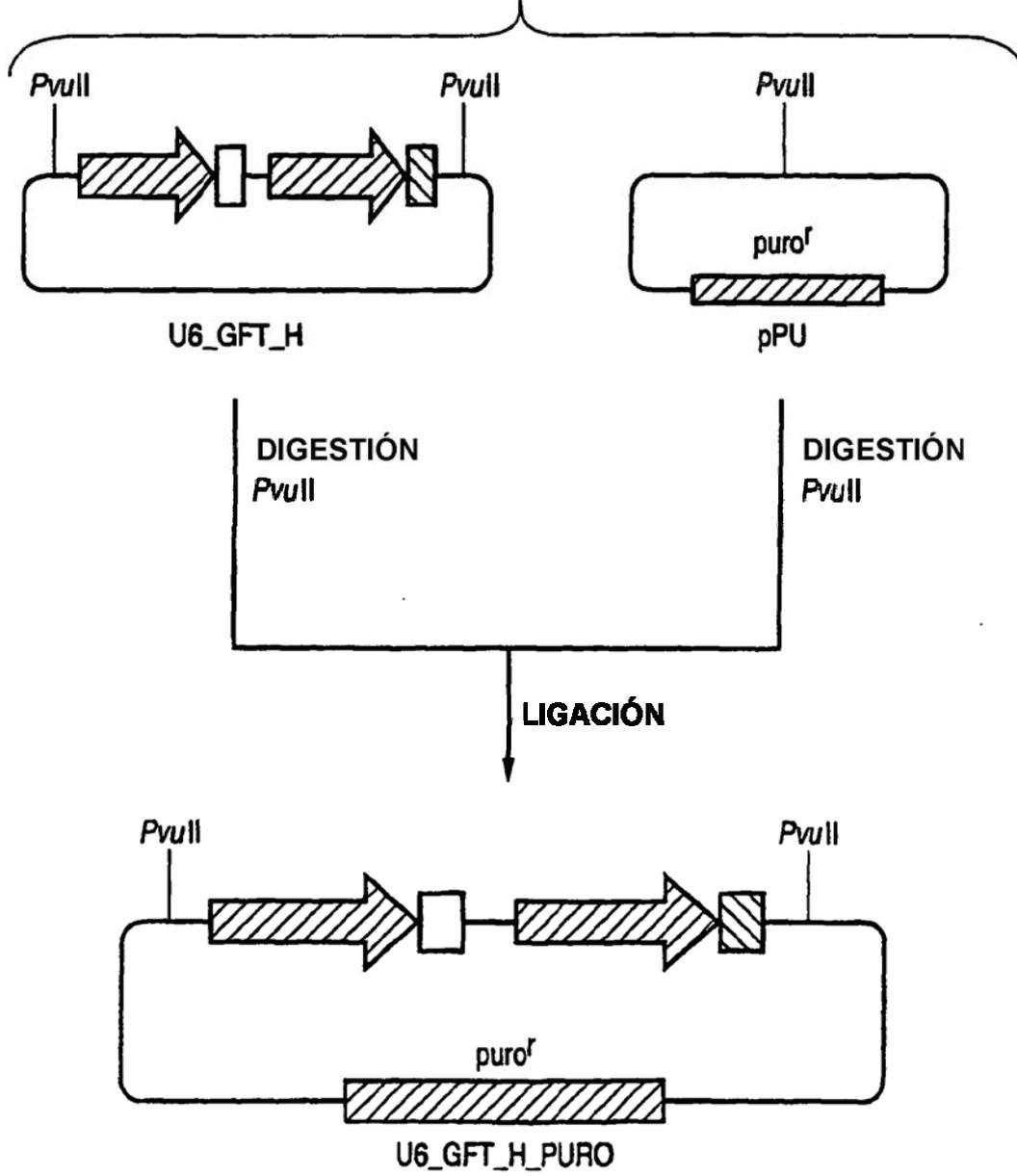


FIG. 12

