agtgaatgac aaaaatattc aagtggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcatcctcg 180

gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240

tggtgatcct gcagtgtggt gggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300

ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcat 360

tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420

agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480

taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600

tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660

tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720

aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780

aggccaaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840

aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900

taaaggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960

gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA
end.
<400> 8
aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt 40

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA
end.
<400> 9
atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

<210> 10
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA
end.
<400> 10
atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg 40

<210> 11

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 11

ctccaattat gaatttatta gtg 23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 12

ggatgtttga agccaagctt cttgg 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 13

gtccatggtg atcctgcagt gtgg 24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc 23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 15

gatatcgctg cgctcgttgt cgac 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagc 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 17

gatatcgctg cgctcgtcgt cgac 24

<210> 18

<1> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 19

atgcgggcat ggactggttc ctgg 24

<210> 20

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

<400> 20

ctatttttca gcttcaggat atgtggg 27

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA
end.
<400> 21
gtctgaagca ttatgtgttg aagc 24

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA
end.
<400> 22
gtgagtacat tcattgtact gtg 23

<210> 23
<211> 575
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus
<400> 23

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala

165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 575
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。上図が非還元条件、下図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-GD3キメラ抗体、3がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、4がSP2/0-GD3キメラ抗体、5がNSO-GD3キメラ抗体(302)、6がNSO-GD3キメラ抗体(GIT)、7が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

【図２】

図２は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体(302)、△がNS0-GD3キメラ抗体(GIT)の活性をそれぞれ示す。

【図３】

図３は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体(302)、△がNS0-GD3キメラ抗体(GIT)の活性をそれぞれ示す。

【図４】

図４は、精製した3種類の抗hIL-5Rα CDR移植抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。上図が非還元条件、下図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-hIL-5RCDR抗体、3がCHO/d-hIL-5RCDR抗体、4がNS0-hIL-5RCDR抗体、5が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

【図５】

図５は、精製した3種類の抗hIL-5Rα CDR移植抗体のhIL-5Rαとの結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はhIL-5Rαとの結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-hIL-5RCDR抗体、●がCHO/d-hIL-5RCDR抗体、□がNS0-hIL-5RCDR抗体の活性をそれぞれ示す。

【図６】

図６は、精製した3種類の抗hIL-5Rα CDR移植抗体のhIL-5R発現マウスT細胞株CTLL-2(h5R)に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-hIL-5RCDR抗体、●がCHO/d-hIL-5RCDR抗体、□がNS0-hIL-5RCDR抗体の活性をそれぞれ示す。

【図７】

図７は、精製した3種類の抗hIL-5Rαの CDR移植抗体のカニクイザルのhIL-5誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数（抗体及びhIL-5の投与開始日を0日とした）をそれぞれ示す。101、102が抗体非投与群、301、302、303がYB2/0-hIL-5RCDR抗体投与群、401、402、403がCHO/d-hIL-5RCDR抗体投与群、501、502、503がNS0-hIL-5RCDR抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

【図８】

図８は、YB2/0が生産した精製抗hIL-5Rα CDR移植抗体（上側）およびNS0が生産した精製抗hIL-5Rα CDR移植抗体（下側）のPA化糖鎖の逆相HPLC溶離の溶離図（左図）とそのPA化糖鎖をα-L-フコシダーゼ処理した後に逆相HPLCで分析して得た溶離図（右図）を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【図９】

図９は、CHO/d細胞が生産した精製抗hIL-5Rα CDR移植抗体からPA化糖鎖を調製し、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【図１０】

図１０は、非吸着画分、吸着画分の一部のGD3との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。下図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

【図１１】

図１１は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製したPA化糖鎖を逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。左図に非吸着画分の溶離図、右図に吸着画分の一部の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【図１２】

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

図１２は、プラスミドCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1の構築を示した図である。

【図１３】

図１３は、プラスミドCHAc-pBSおよびYBAc-pBSの構築を示した図である。

【図１４】

図１４は、プラスミドCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1の構築を示した図である。

【図１５】

図１５は、プラスミドCHAcd-pBSおよびYBAcd-pBSの構築を示した図である。

【図１６】

図５　競合的RT-PCR法を用いた各宿主細胞株におけるFUT8転写産物量の定量結果を示した図である。ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を示す。■がCHO細胞株、□がYB2/0細胞株を宿主細胞として用いた場合をそれぞれ示す。

【図１７】

図１７は、プラスミドmfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

【図１８】

図１８は、プラスミドpBSmfFUT8の構築を示した図である。

【図１９】

図１９は、プラスミドpAGEmfFUT8の構築を示した図である。

【図２０】

図２０は、競合的RT-PCR法を用いたFUT8遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸にβ-actin転写量に対するFUT8転写量の相対値を示した。

【図２１】

図２１は、FUT8遺伝子過剰発現株より精製した抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示した。

【図２２】

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

図２２は、プラスミドCHfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

【図２３】

mfFUT8-6、pAGE249導入株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上図にmfFUT8-6、下図にpAGE249の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

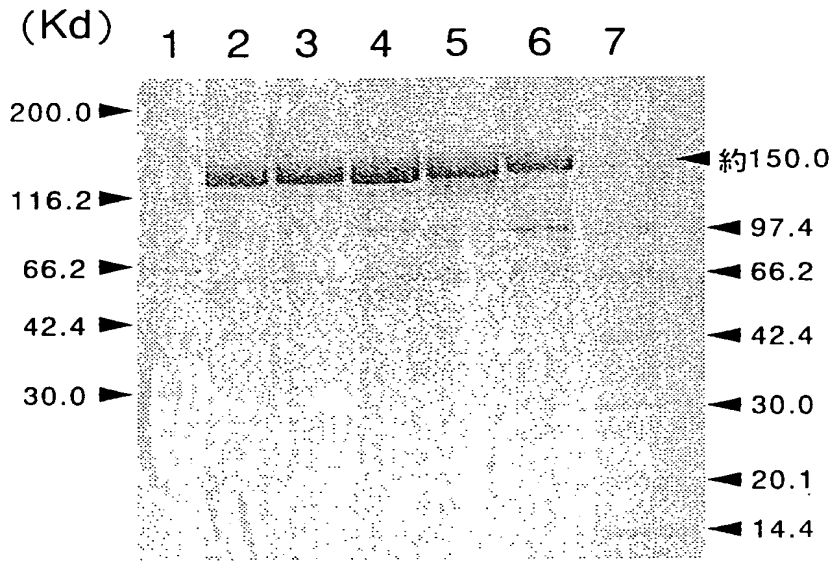
【図２４】

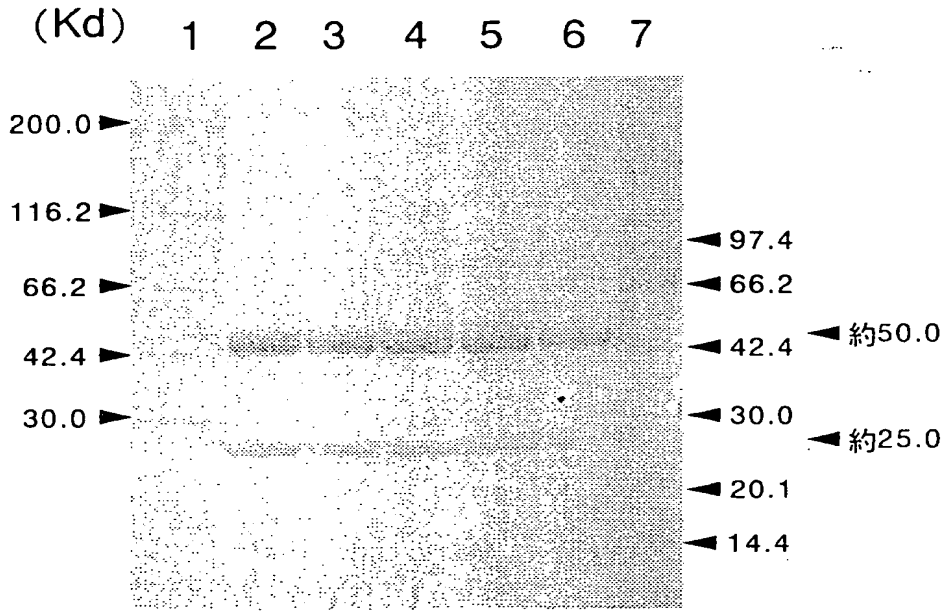
Herceptinから調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相HPLCの分析条件、糖鎖構造、α-1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は図２３と同じ方法で行った。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

【書類名】　図面

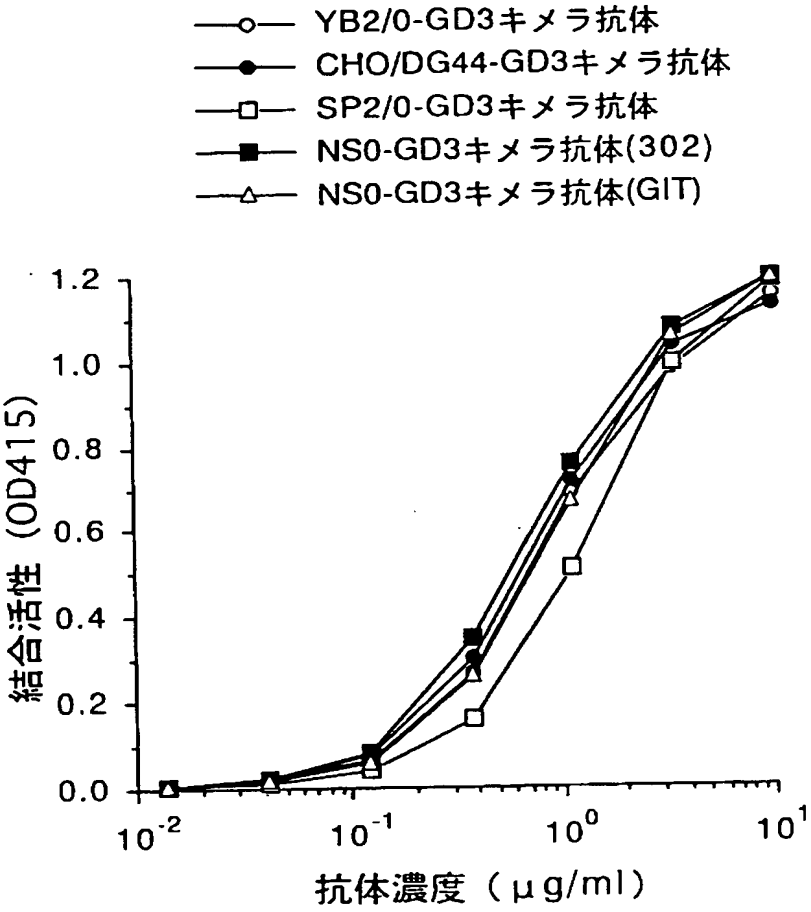
【図１】



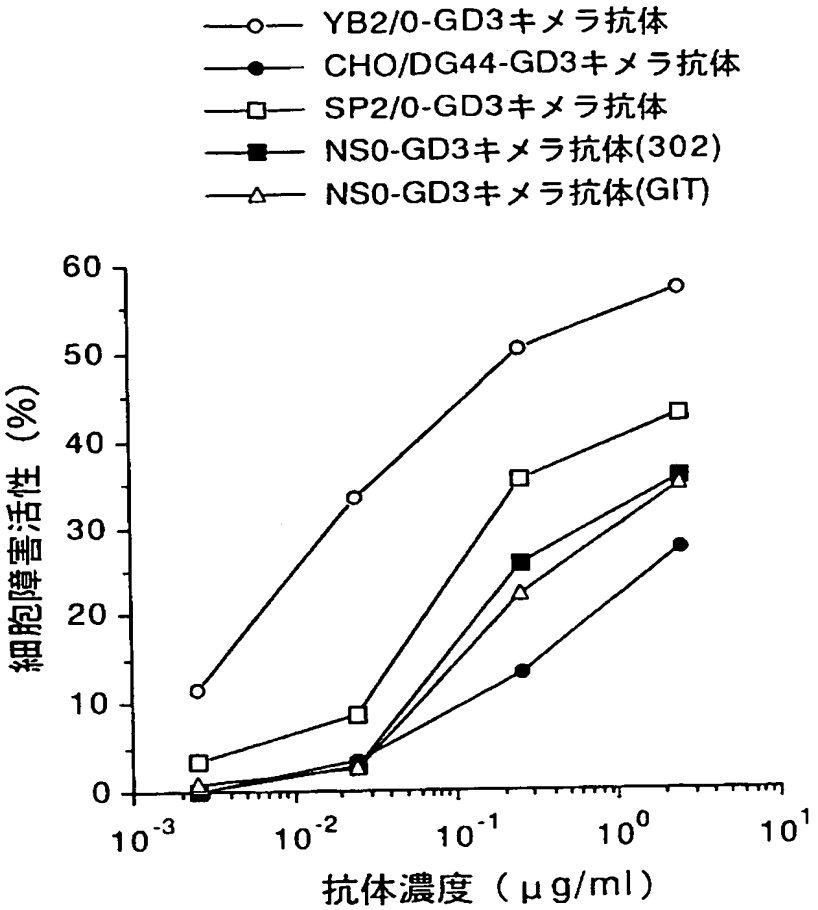


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

【図２】

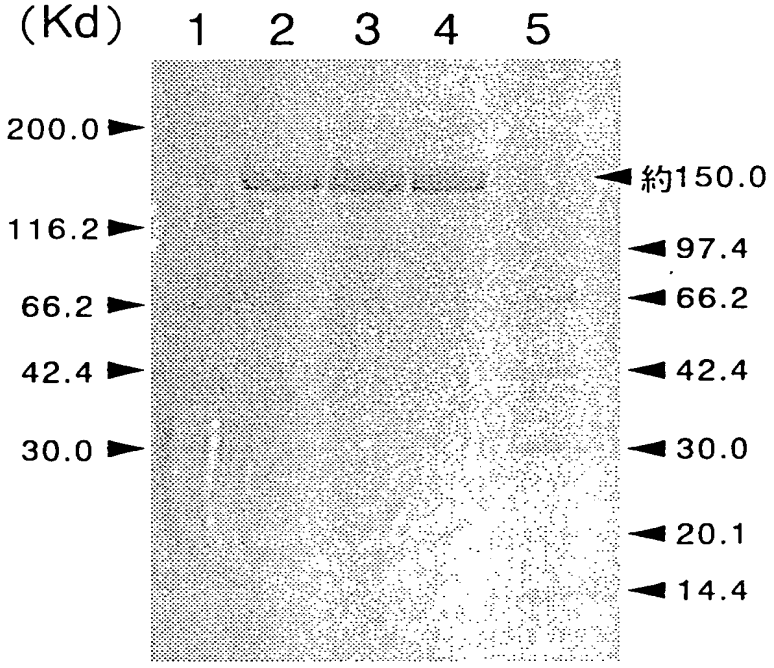

YB2/0-GD3キメラ抗体
CHO/DG44-GD3キメラ抗体
SP2/0-GD3キメラ抗体
NS0-GD3キメラ抗体(302)
NS0-GD3キメラ抗体(GIT)
結合活性（OD415）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
抗体濃度（μg/ml）

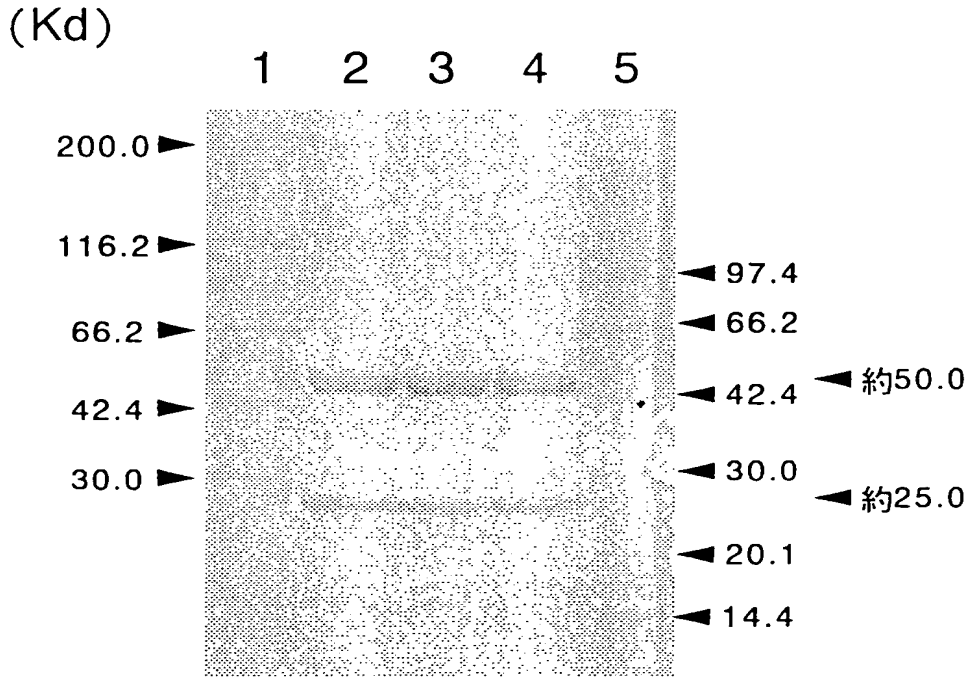
【図３】



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

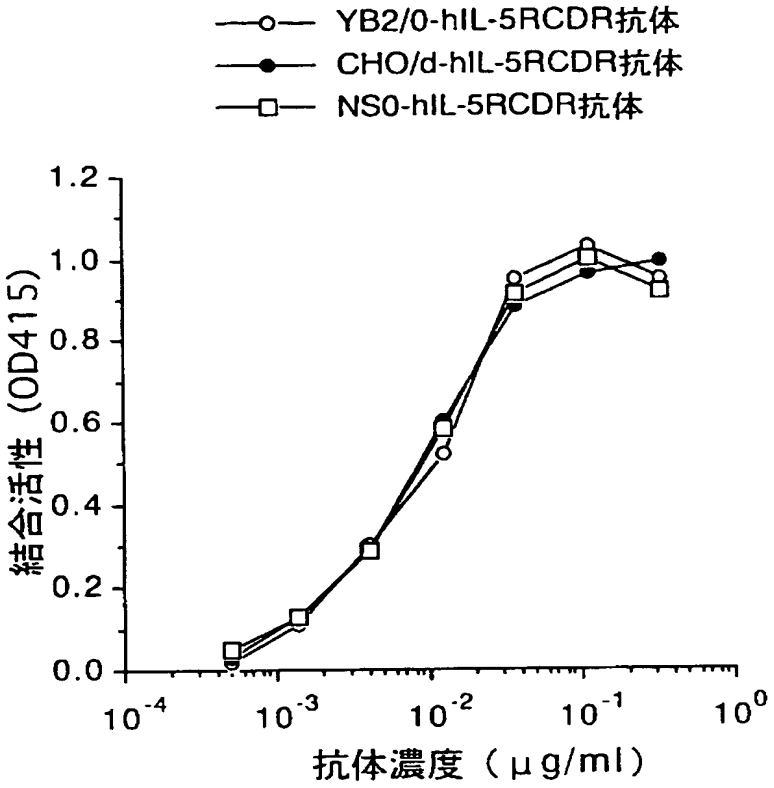
【図４】



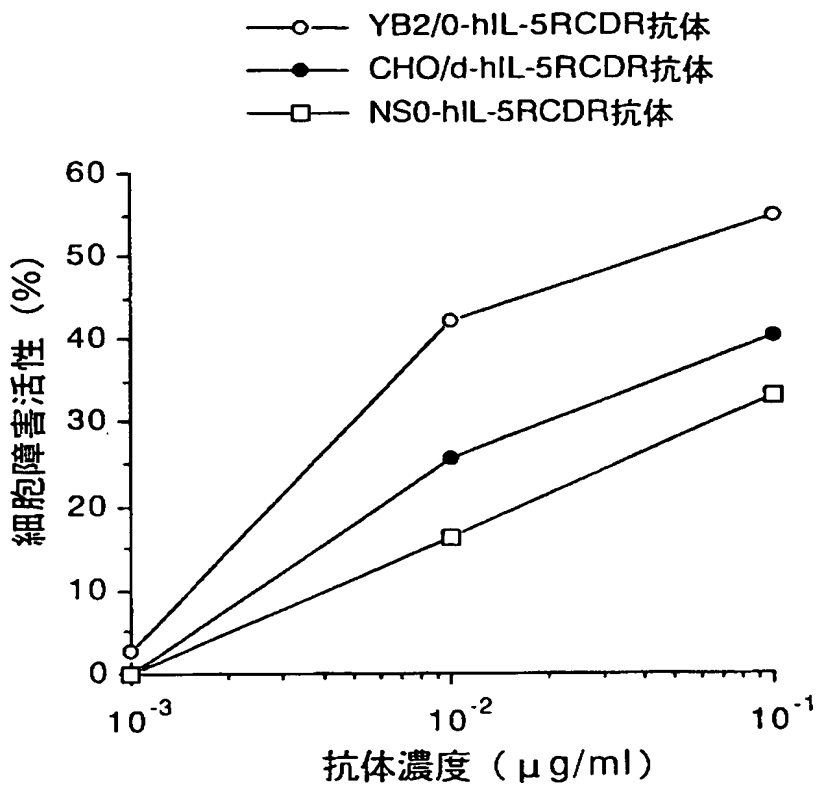


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

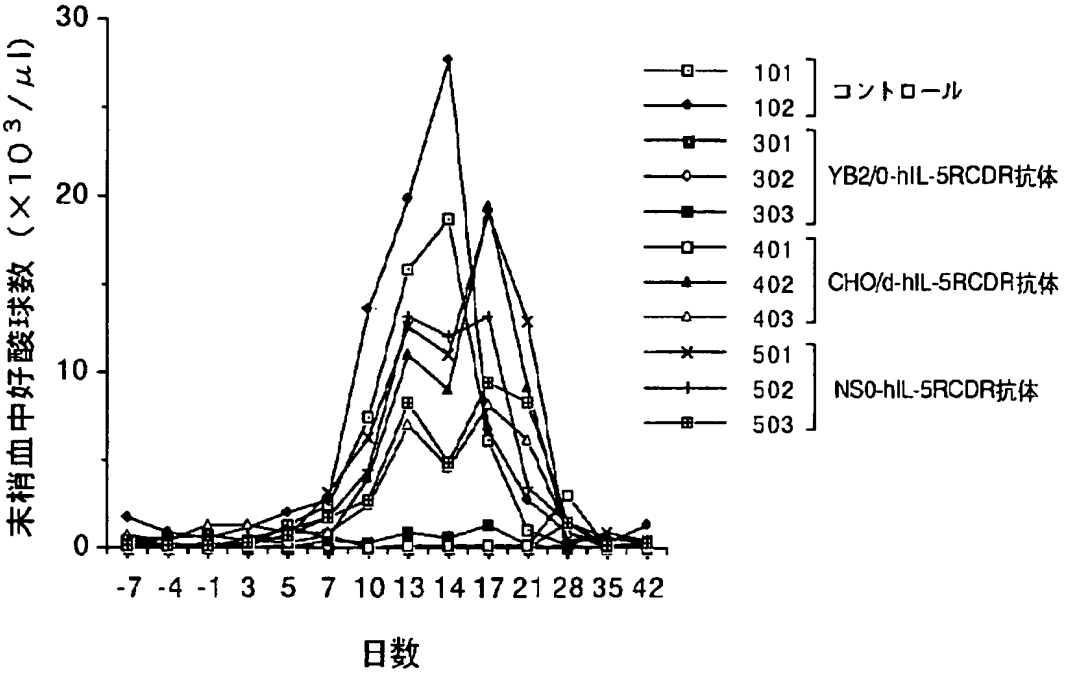
【図５】


YB2/0-hIL-5RCDR抗体
CHO/d-hIL-5RCDR抗体
NS0-hIL-5RCDR抗体
結合活性（OD415）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
抗体濃度（μg/ml）

【図６】


YB2/0-hIL-5RCDR抗体
CHO/d-hIL-5RCDR抗体
NS0-hIL-5RCDR抗体
細胞障害活性（%）
60
50
40
30
20
10
0
10-3
10-2
10-1
抗体濃度（μg/ml）

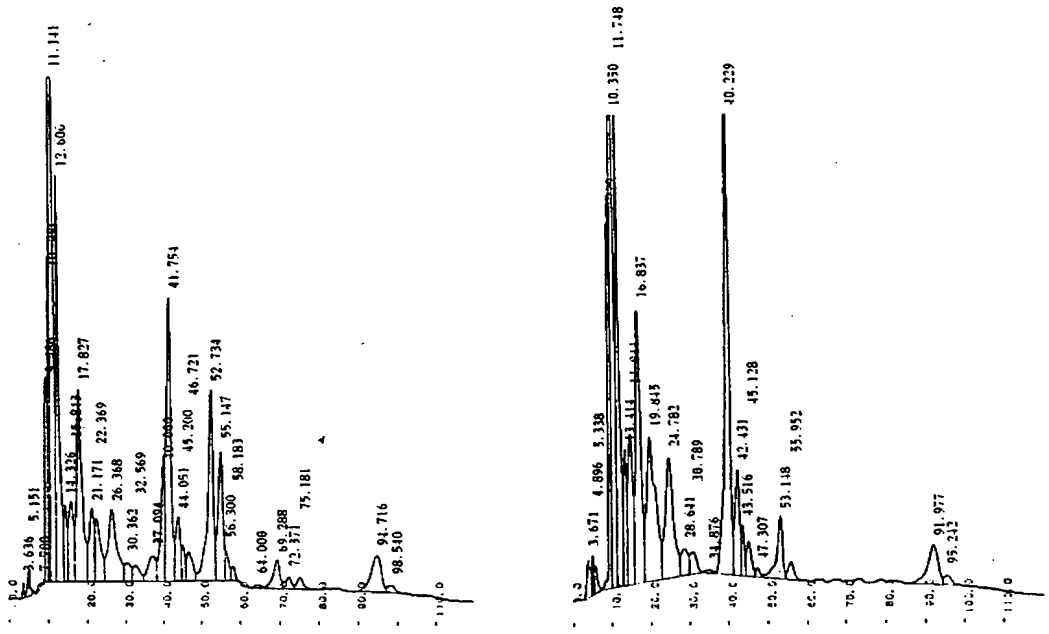
【図７】



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

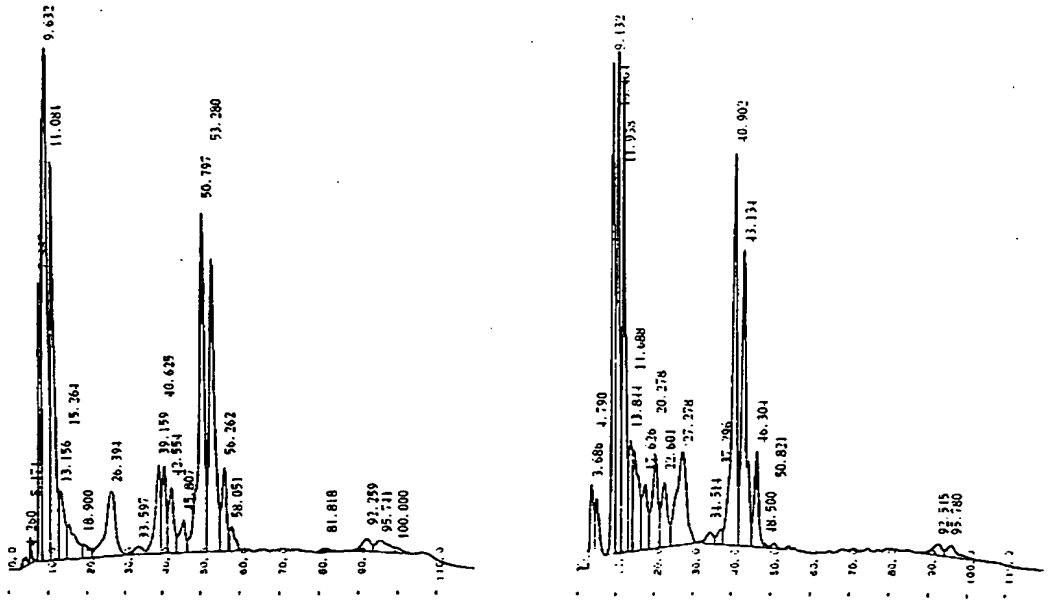
【図８】

YB2/0-hIL-5RCDR 抗体



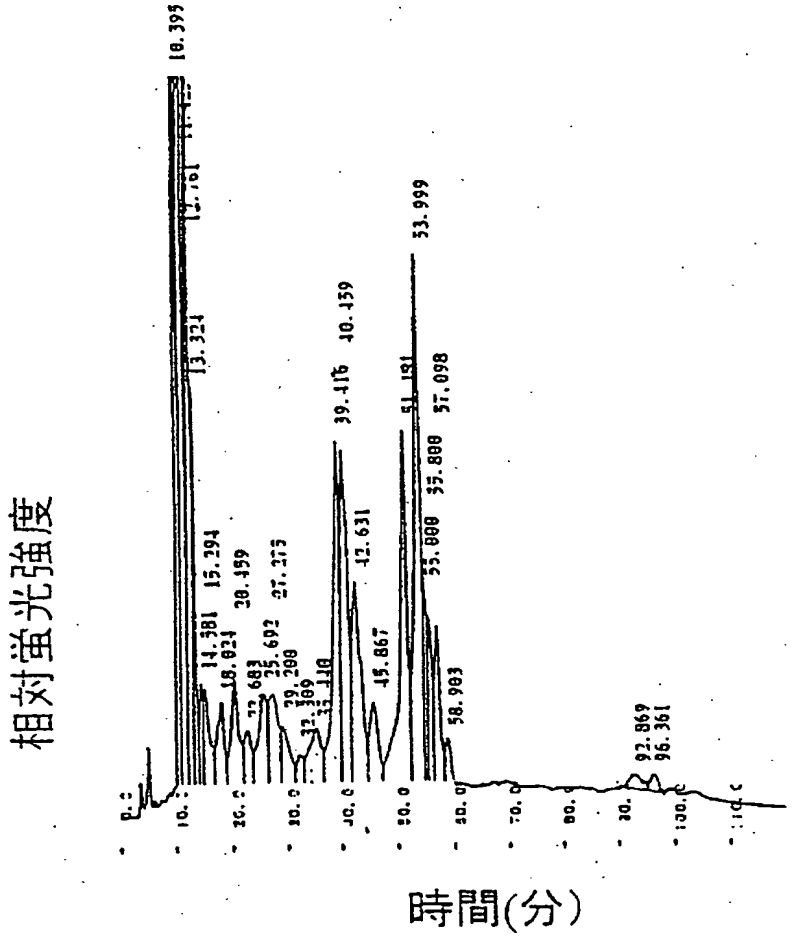
α-L-フコシダーゼ消化後

NS0-hIL-5RCDR 抗体

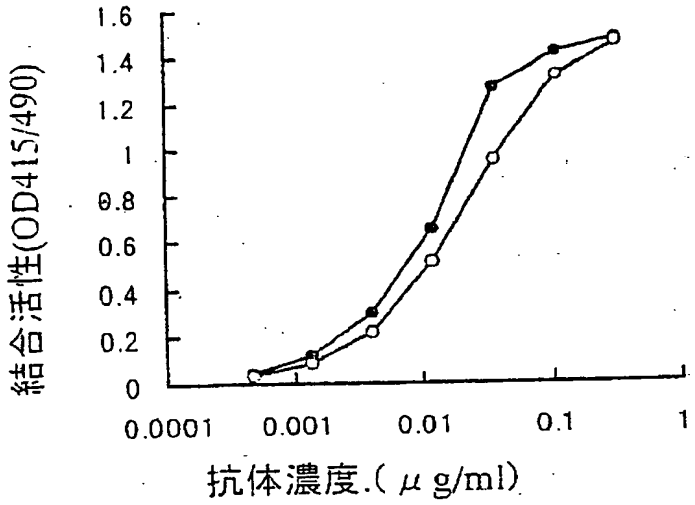


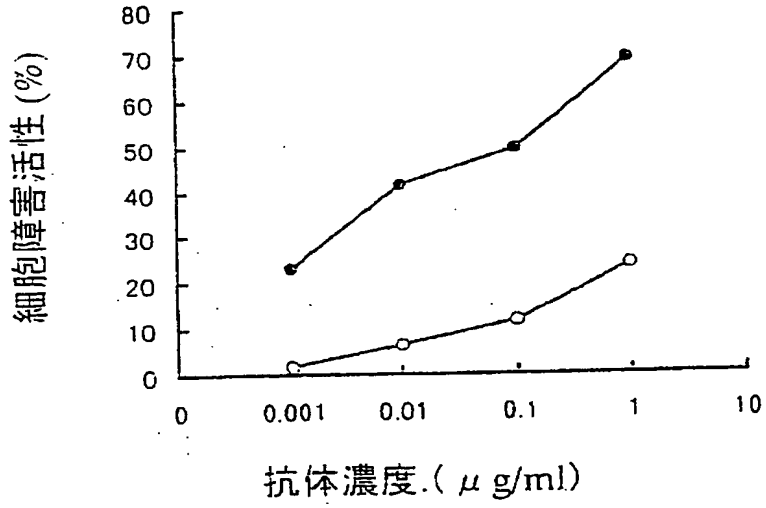
α-L-フコシダーゼ消化後

【図９】


相対蛍光強度
時間(分)
10.395
13.324
15.294
14.381
18.023
20.459
25.692
27.275
29.200
39.416
40.459
42.631
45.867
51.181
53.999
55.800
57.098
58.983
92.869
96.361

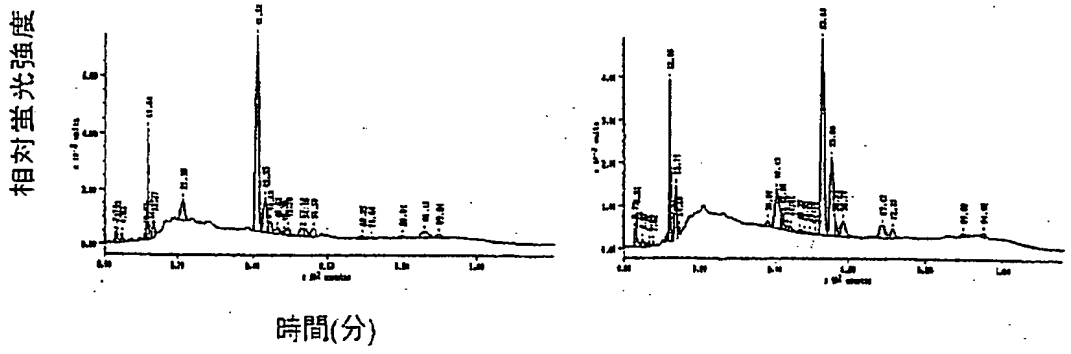
【図１０】



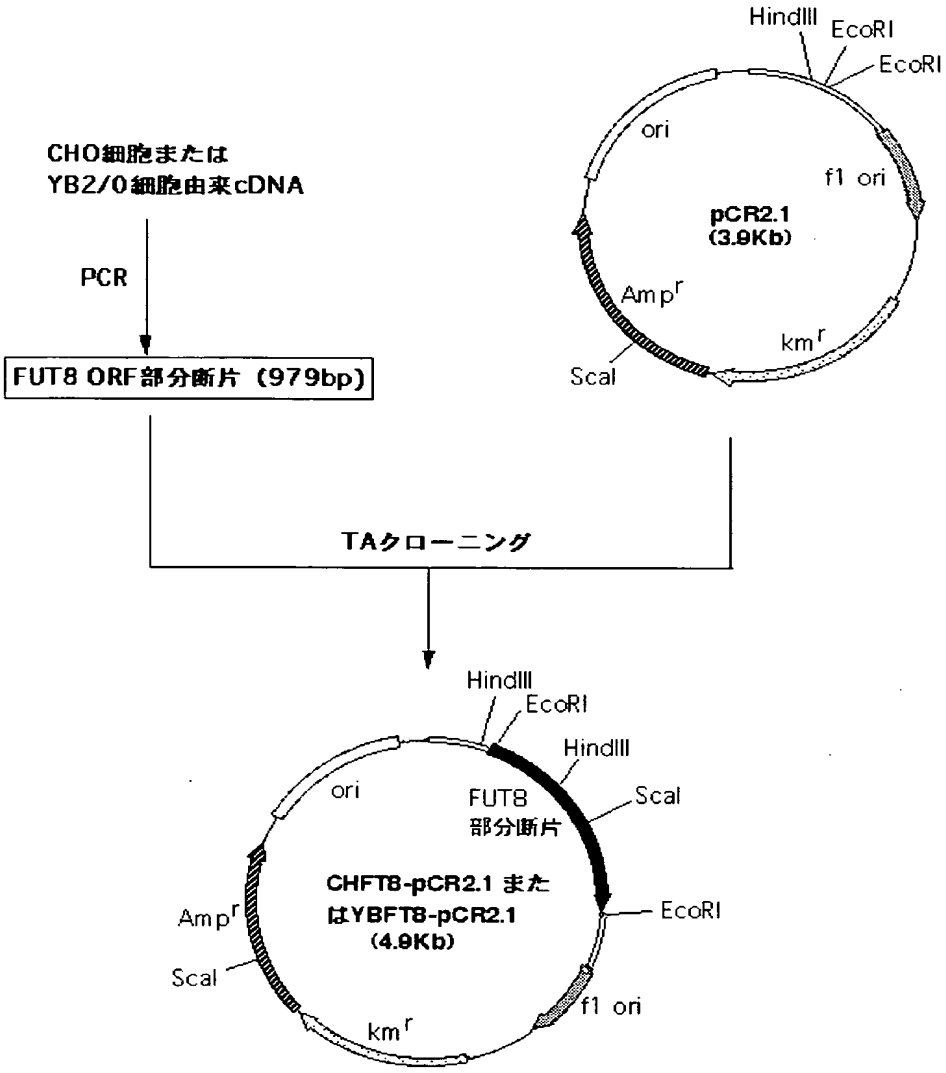


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

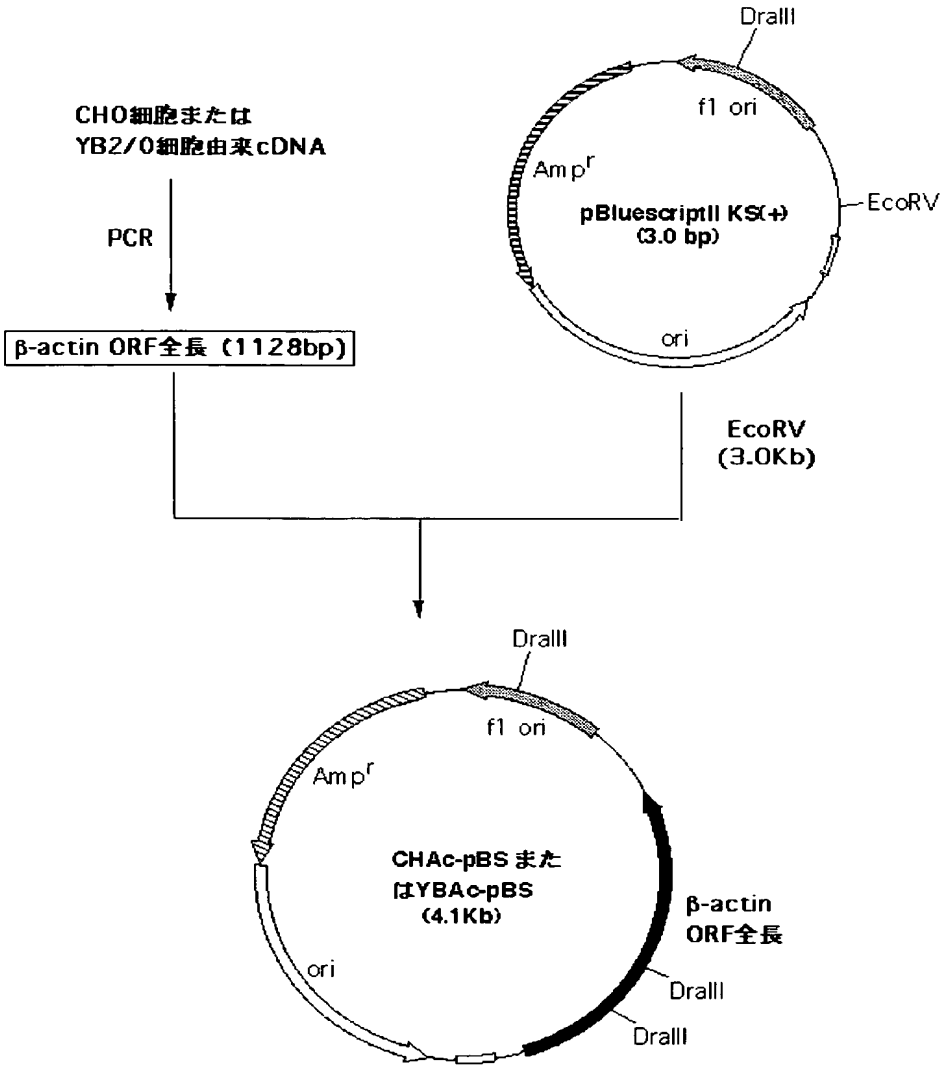
【図１１】



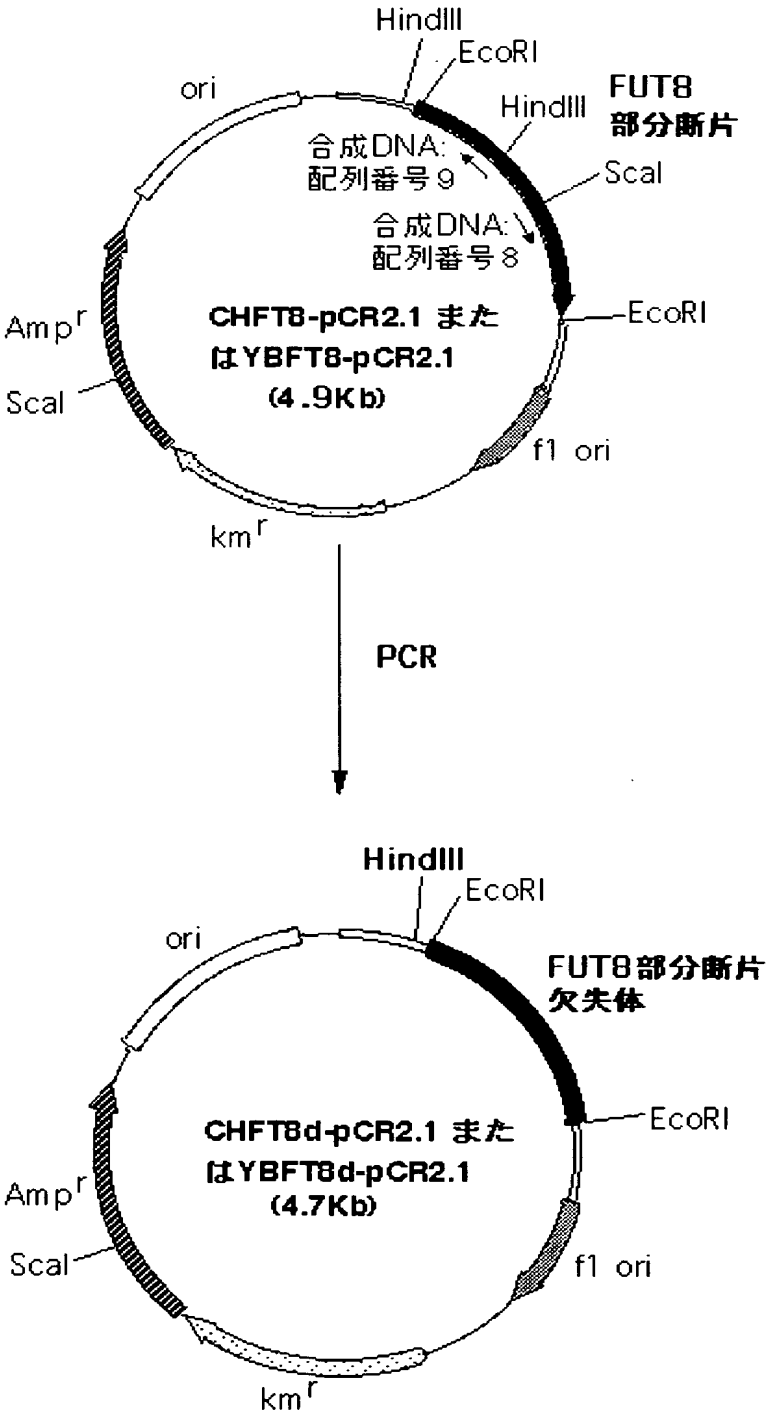
【図１２】


CHO細胞または
YB2/0細胞由来cDNA
PCR
FUT8 ORF部分断片（979bp）
HindIII
EcoRI
EcoRI
ori
f1 ori
pCR2.1
(3.9Kb)
Amp^r
km^r
ScaI
TAクローニング
HindIII
EcoRI
HindIII
ori
FUT8
部分断片
ScaI
CHFT8-pCR2.1 または
はYBFT8-pCR2.1
(4.9Kb)
EcoRI
Amp^r
ScaI
km^r
f1 ori

【図１３】

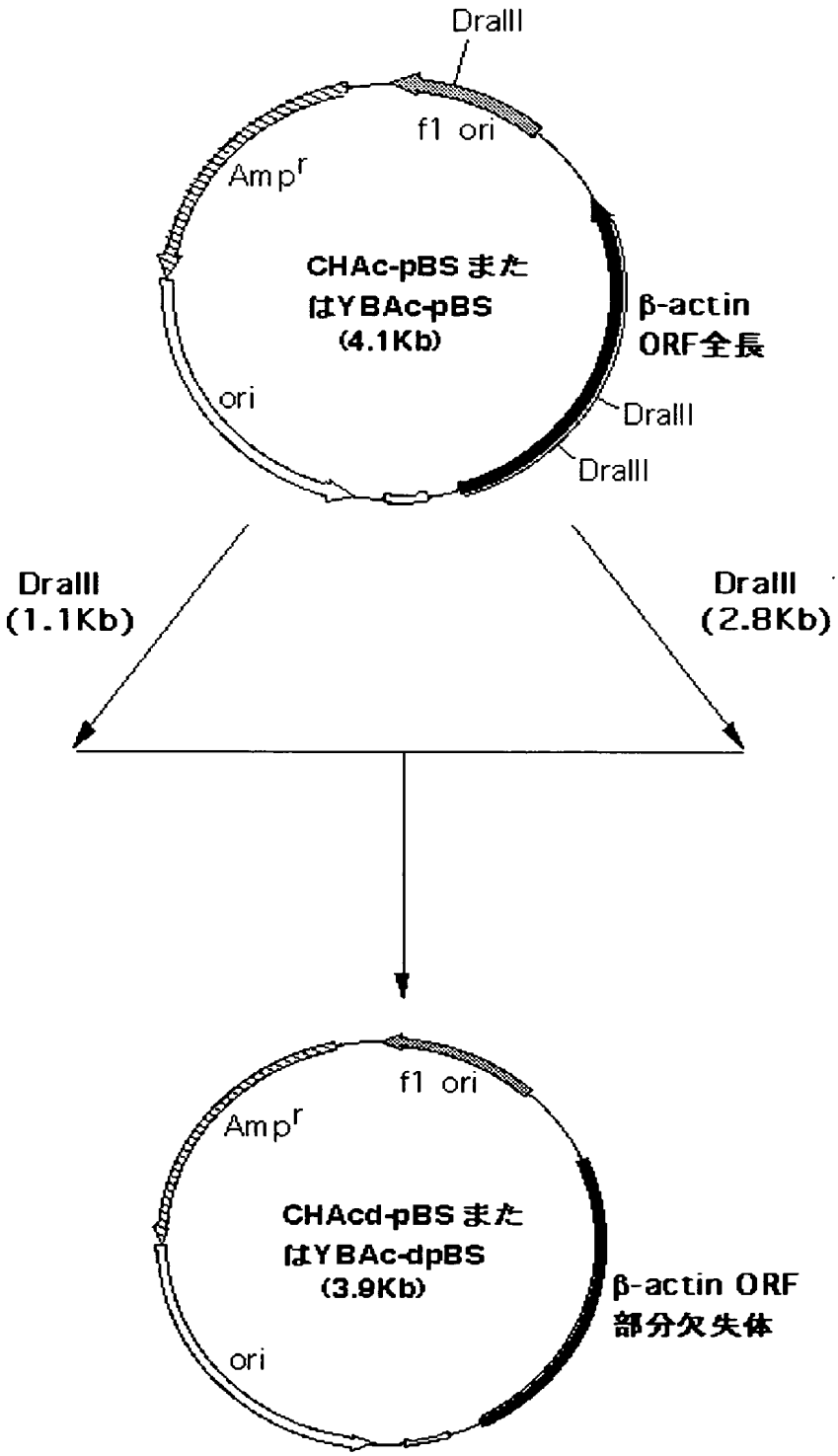

CHO細胞または
YB2/0細胞由来cDNA
PCR
β-actin ORF全長 (1128bp)
DraIII
f1 ori
Amp^r
pBluescriptII KS(+)
(3.0 bp)
EcoRV
ori
EcoRV
(3.0Kb)
DraIII
f1 ori
Amp^r
CHAc-pBS また
はYBAc-pBS
(4.1Kb)
β-actin
ORF全長
ori
DraIII
DraIII

【図１４】

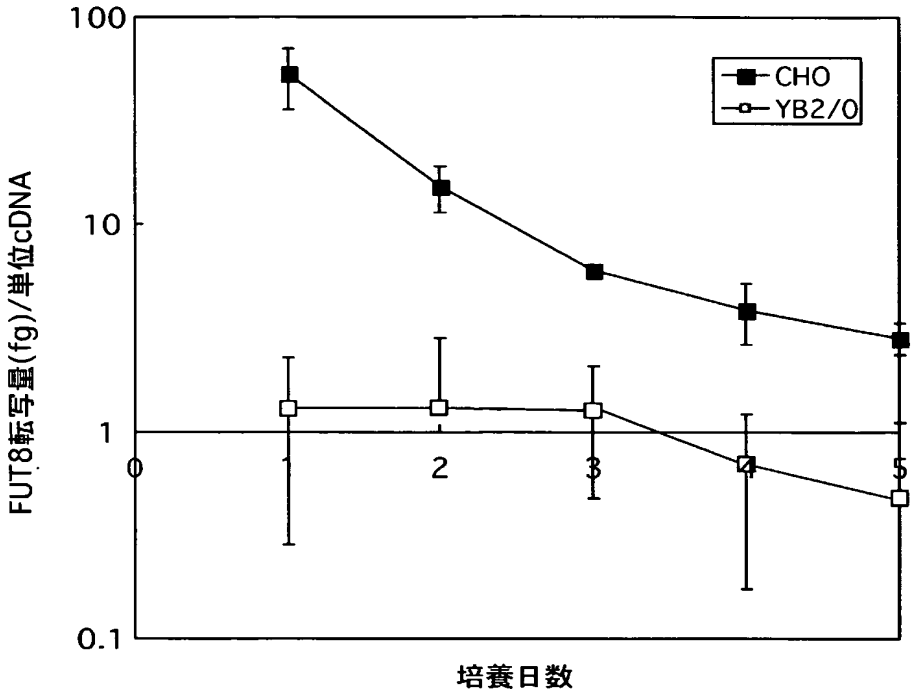


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

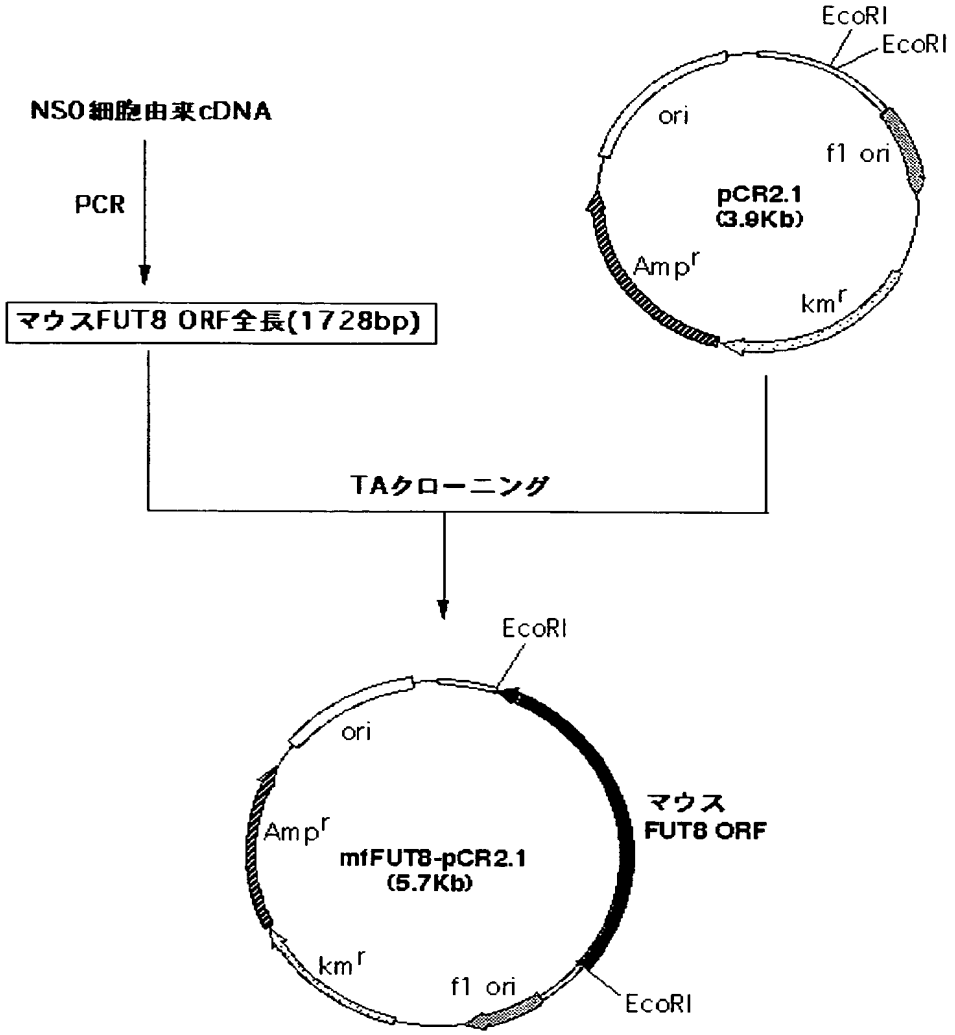
【図１５】


DraIII
f1 ori
Amp^r
CHAc-pBSまたはYBAc-pBS (4.1Kb)
β-actin ORF全長
ori
DraIII
DraIII
DraIII (1.1Kb)
DraIII (2.8Kb)
f1 ori
Amp^r
CHAcd-pBSまたはYBAc-dpBS (3.9Kb)
β-actin ORF部分欠失体
ori

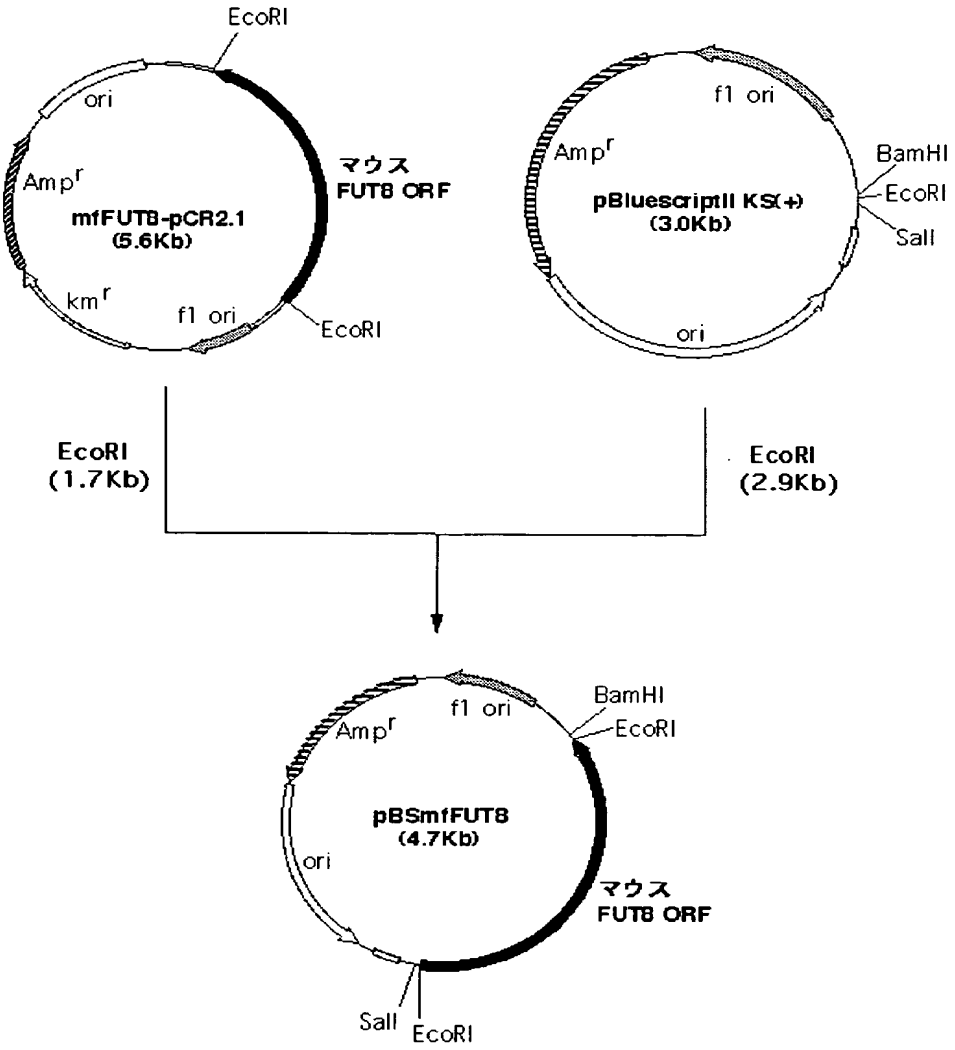
【図１６】



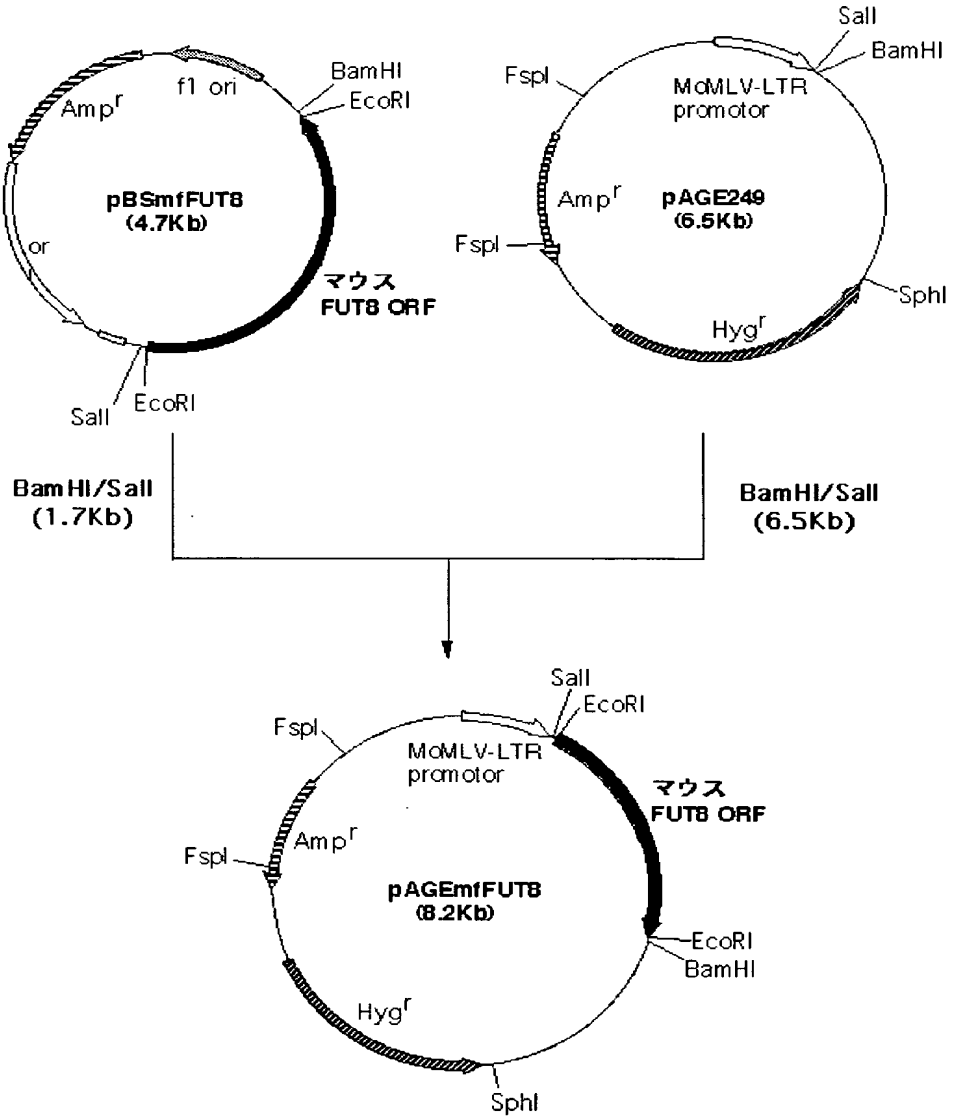
【図１７】


NSO細胞由来cDNA
PCR
マウスFUT8 ORF全長(1728bp)
EcoRI
EcoRI
ori
f1 ori
pCR2.1
(3.9Kb)
Amp^r
km^r
TAクローニング
EcoRI
ori
Amp^r
mfFUT8-pCR2.1
(5.7Kb)
km^r
f1 ori
EcoRI
マウス
FUT8 ORF

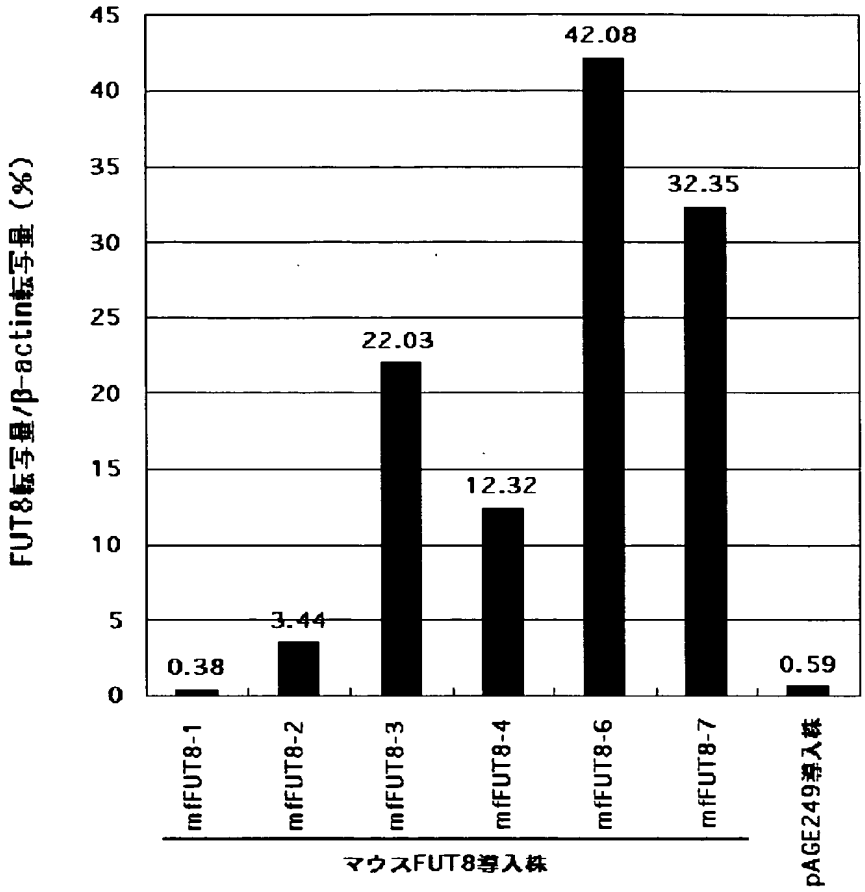
【図１８】


EcoRI
ori
Amp^r
マウス
FUT8 ORF
mfFUT8-pCR2.1
(5.6Kb)
km^r
f1 ori
EcoRI
f1 ori
Amp^r
BamHI
EcoRI
SalI
pBluescriptII KS(+)
(3.0Kb)
ori
EcoRI
(1.7Kb)
EcoRI
(2.9Kb)
f1 ori
BamHI
Amp^r
EcoRI
pBSmfFUT8
(4.7Kb)
ori
マウス
FUT8 ORF
SalI
EcoRI

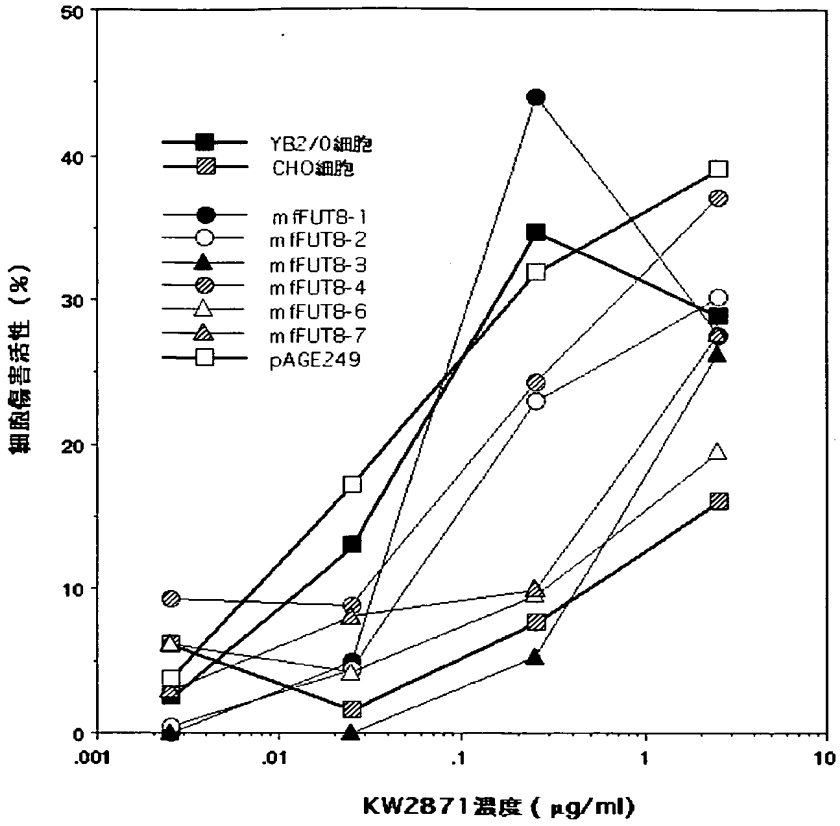
【図１９】


SalI
BamHI
FspI
MoMLV-LTR
promotor
Amp^r
pAGE249
(6.5Kb)
FspI
SphI
Hyg^r
BamHI
EcoRI
f1 ori
Amp^r
pBSmfFUT8
(4.7Kb)
or
マウス
FUT8 ORF
SalI
EcoRI
BamHI/SalI
(1.7Kb)
BamHI/SalI
(6.5Kb)
SalI
EcoRI
FspI
MoMLV-LTR
promotor
マウス
FUT8 ORF
FspI
Amp^r
pAGEmfFUT8
(8.2Kb)
EcoRI
BamHI
Hyg^r
SphI

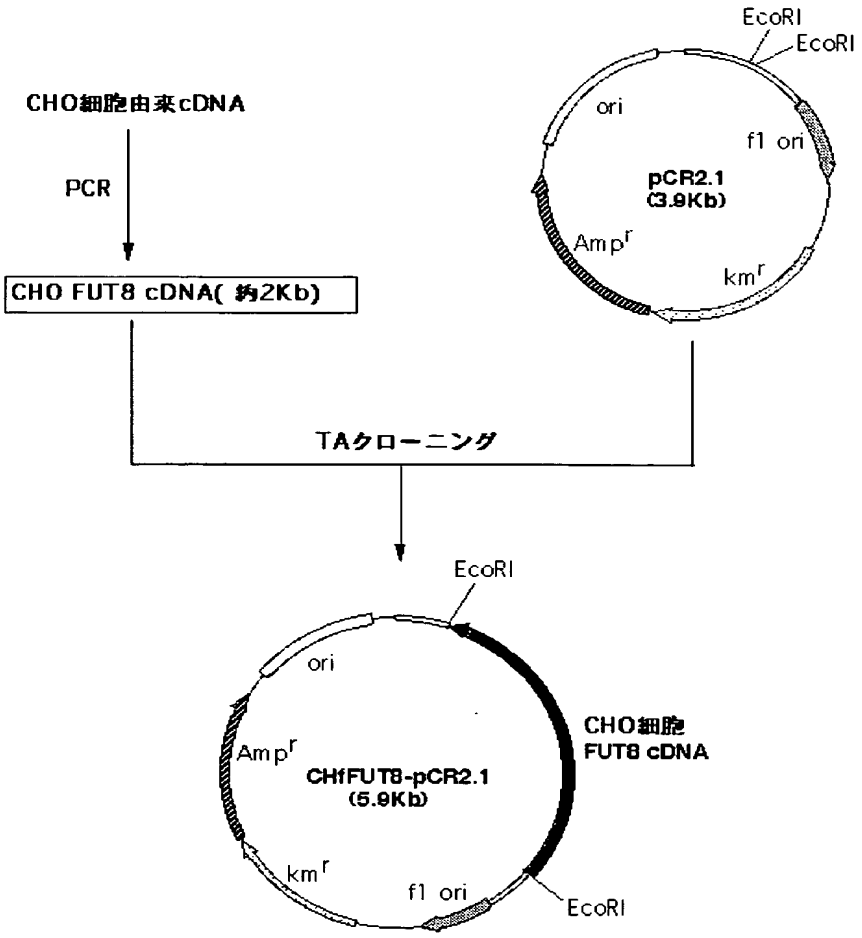
【図２０】


FUT8転写量/β-actin転写量（%）
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.38
3.44
22.03
12.32
42.08
32.35
0.59
mfFUT8-1
mfFUT8-2
mfFUT8-3
mfFUT8-4
mfFUT8-6
mfFUT8-7
pAGE249導入株
マウスFUT8導入株

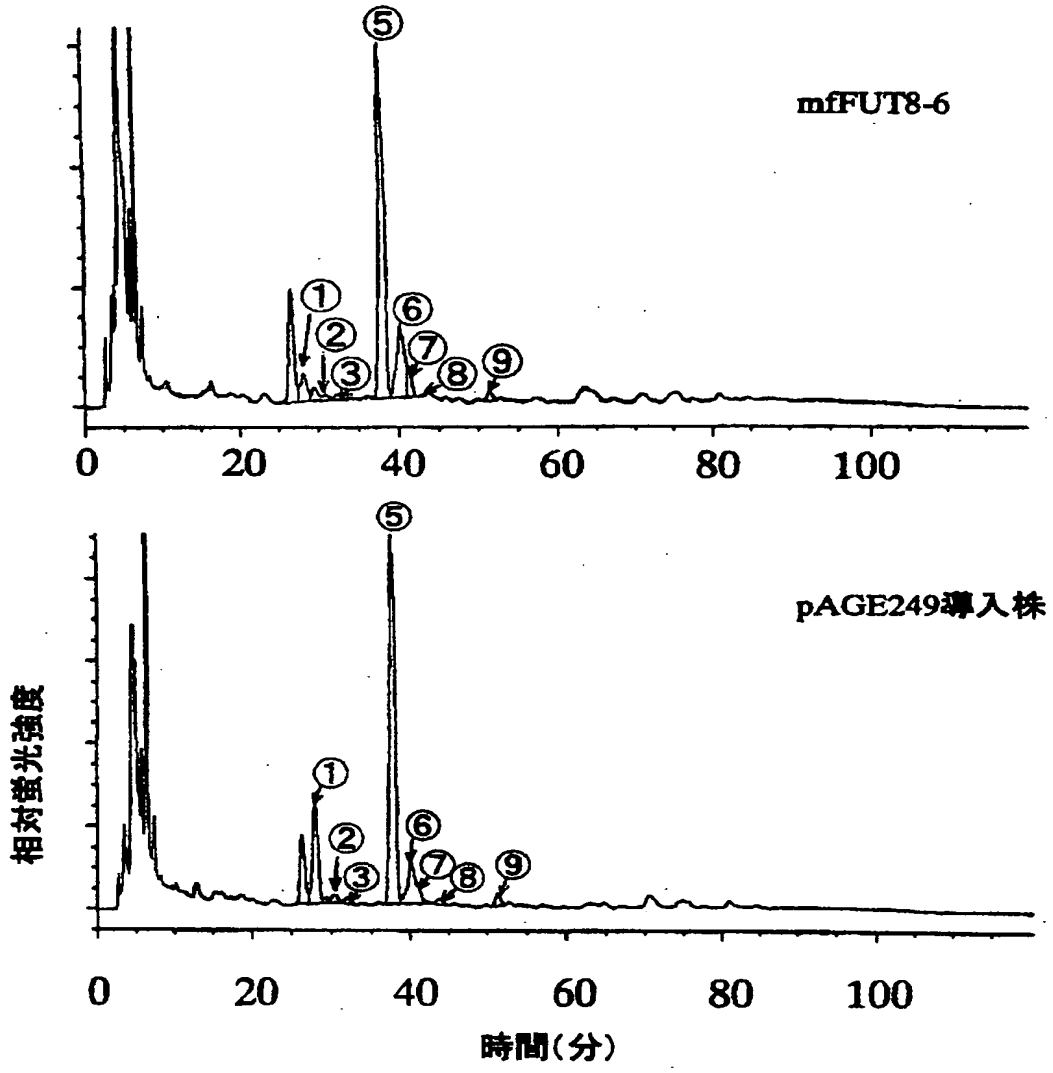
【図２１】


50
40
30
20
10
0
.001
.01
.1
1
10
細胞傷害活性（%）
KW2871濃度（μg/ml）
YB2/0細胞
CHO細胞
mfFUT8-1
mfFUT8-2
mfFUT8-3
mfFUT8-4
mfFUT8-6
mfFUT8-7
pAGE249

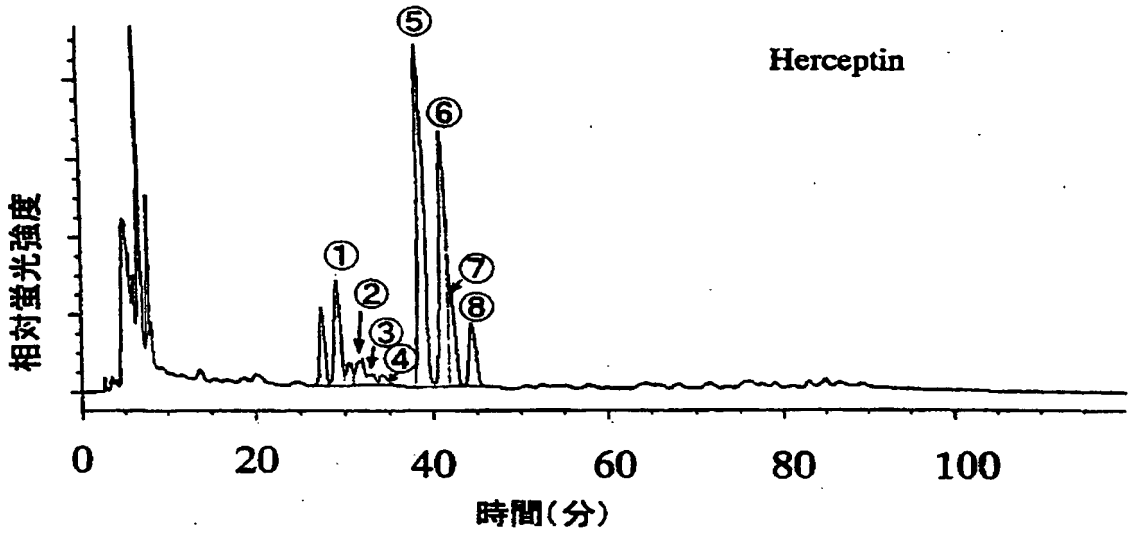
【図２２】


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

【図２３】



【図２４】



【書類名】　要約書

【要約】

【課題】　糖タンパク質の糖鎖構造を制御できる、糖タンパク質生産用の宿主細胞として有用な細胞、特に、エフェクター機能が制御された免疫機能分子を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、ならびにその用途を提供すること。

【解決手段】　糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞、それを用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、それらの用途。

【選択図】　なし。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

特願２０００－３０８５２６

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　[０００００１０２９]

１．変更年月日　　１９９０年　８月　６日
[変更理由]　新規登録
住　所　東京都千代田区大手町１丁目６番１号
氏　名　協和醗酵工業株式会社

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☑ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
h this Office.

願 年 月 日
ite of Application: ２００１年１０月 ５日

願 番 号
plication Number: ＰＣＴ／ＪＰ０１／０８８０４

願 人
licant (s): 協和醗酵工業株式会社

２００４ 年 ７ 月２２ 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office 小 川 洋

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

出証平 １６－５００２８０

受理官庁用写し

特許協力条約に基づく国際出願

願　　書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理官庁記入欄

国際出願番号　PCT/JP01/08394

国際出願日　05.10.01

(受付印)　PCT International Application
日本国特許庁

出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)　P−38524

第I欄　発明の名称

抗体組成物を生産する細胞

第II欄　出願人

氏名 (名称) 及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

協和醗酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo
100-8185 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、発明者でもある。

電話番号：

ファクシミリ番号：

加入電信番号：

国籍 (国名)：日本国 JAPAN

住所 (国名)：日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：☑ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

第III欄　その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

神田 豊　KANDA Yutaka
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6−6, Asahimachi 3−chome, Machida−shi,
Tokyo 194−0023 JAPAN

この欄に記載した者は次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☑ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名)：

住所 (国名)：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

☑ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第IV欄　代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する：☑ 代理人　☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士(10564) 小栗 昌平　OGURI Shohei
弁理士(10547) 本多 弘徳　HONDA Hironori
弁理士(10858) 市川 利光　ICHIKAWA Toshimitsu
弁理士(11510) 高松 猛　TAKAMATSU Takeshi
弁理士 (9034) 栗宇 百合子　KURIU Yuriko
〒107-6028 日本国東京都港区赤坂一丁目12番32号
アーク森ビル28階　栄光特許事務所
Eikoh Patent Office, 28th Floor, ARK Mori Building,
12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107-6028 JAPAN

電話番号：03-5561-3990

ファクシミリ番号：03-5561-3995

加入電信番号：

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第III欄の続き　その他の出願人又は発明者

この続紙を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

佐藤 光男　SATOH Mitsuo
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

中村 和靖　NAKAMURA Kazuyasu
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

内田 和久　UCHIDA Kazuhisa
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

新川 豊英　SHINKAWA Toyohide
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

☑ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

欄III欄の続き　その他の出願人又は発明者

この続紙を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山根 尚子　YAMANE Naoko
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

保坂 絵美　HOSAKA Emi
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山﨑 基生　YAMASAKI Motoo
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

花井 陳雄　HANAI Nobuo
〒194-0023 日本国東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-0023 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：
☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☑ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：
☐ すべての指定国　☐ 米国を除くすべての指定国　☐ 米国のみ　☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第Ⅴ欄　国の指定　(該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う。ほかの種類の保護又は取扱をいずれかの指定国（又はOAPI）で求める場合には追記欄に記載する。

広域特許

☑ＡＰ ＡＲＩＰＯ特許：ＧＨガーナ Ghana，ＧＭガンビア Gambia，ＫＥケニア Kenya，ＬＳレソト Lesotho，ＭＷマラウイ Malawi，ＭＺモザンビーク Mozambique，ＳＤスーダン Sudan，ＳＬシエラ・レオネ Sierra Leone，ＳＺスワジランド Swaziland，ＴＺタンザニア United Republic of Tanzania，ＵＧウガンダ Uganda，ＺＷジンバブエ Zimbabwe，及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国

☑ＥＡ ユーラシア特許：ＡＭアルメニア Armenia，ＡＺアゼルバイジャン Azerbaijan，ＢＹベラルーシ Belarus，ＫＧキルギスタン Kyrgyzstan，ＫＺカザフスタン Kazakhstan，ＭＤモルドヴァ Republic of Moldova，ＲＵロシア Russian Federation，ＴＪタジキスタン Tajikistan，ＴＭトルクメニスタン Turkmenistan，及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

☑ＥＰ ヨーロッパ特許：ＡＴオーストリア Austria，ＢＥベルギー Belgium，ＣＨ and ＬＩスイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein，ＣＹキプロス Cyprus，ＤＥドイツ Germany，ＤＫデンマーク Denmark，ＥＳスペイン Spain，ＦＩフィンランド Finland，ＦＲフランス France，ＧＢ英国 United Kingdom，ＧＲギリシャ Greece，ＩＥアイルランド Ireland，ＩＴイタリア Italy，ＬＵルクセンブルグ Luxembourg，ＭＣモナコ Monaco，ＮＬオランダ Netherlands，ＰＴポルトガル Portugal，ＳＥスウェーデン Sweden，ＴＲトルコ Turkey，及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

☑ＯＡ ＯＡＰＩ特許：ＢＦブルキナ・ファソ Burkina Faso，ＢＪベナン Benin，ＣＦ中央アフリカ Central African Republic，ＣＧコンゴ Congo，ＣＩコートジボアール Côte d'Ivoire，ＣＭカメルーン Cameroon，ＧＡガボン Gabon，ＧＮギニア Guinea，ＧＷギニア・ビサオ Guinea-Bissau，ＭＬマリ Mali，ＭＲモーリタニア Mauritania，ＮＥニジェール Niger，ＳＮセネガル Senegal，ＴＤチャド Chad，ＴＧトーゴ Togo，及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国であり特許協力条約の締約国である他の国 *(他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する)*

国内特許 *(他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する)*

☑ＡＥアラブ首長国連邦 United Arab Emirates
☑ＡＧアンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda
☑ＡＬアルバニア Albania
☑ＡＭアルメニア Armenia
☑ＡＴオーストリア Austria
☑ＡＵオーストラリア Australia
☑ＡＺアゼルバイジャン Azerbaijan
☑ＢＡボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina
☑ＢＢバルバドス Barbados
☑ＢＧブルガリア Bulgaria
☑ＢＲブラジル Brazil
☑ＢＹベラルーシ Belarus
☑ＢＺベリーズ Belize
☑ＣＡカナダ Canada
☑ＣＨandＬＩ スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein
☑ＣＮ中国 China
☑ＣＯコロンビア Colombia
☑ＣＲコスタリカ Costa Rica
☑ＣＵキューバ Cuba
☑ＣＺチェコ Czech Republic
☑ＤＥドイツ Germany
☑ＤＫデンマーク Denmark
☑ＤＭドミニカ Dominica
☑ＤＺアルジェリア Algeria
☑ＥＥエストニア Estonia
☑ＥＳスペイン Spain
☑ＦＩフィンランド Finland
☑ＧＢ英国 United Kingdom
☑ＧＤグレナダ Grenada
☑ＧＥグルジア Georgia
☑ＧＨガーナ Ghana
☑ＧＭガンビア Gambia
☑ＨＲクロアチア Croatia
☑ＨＵハンガリー Hungary
☑ＩＤインドネシア Indonesia
☑ＩＬイスラエル Israel
☑ＩＮインド India
☑ＩＳアイスランド Iceland
☑ＪＰ日本 Japan
☑ＫＥケニア Kenya
☑ＫＧキルギスタン Kyrgyzstan
☑ＫＰ北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea
☑ＫＲ韓国 Republic of Korea
☑ＫＺカザフスタン Kazakhstan
☑ＬＣセント・ルシア Saint Lucia
☑ＬＫスリ・ランカ Sri Lanka
☑ＬＲリベリア Liberia
☑ＬＳレソト Lesotho
☑ＬＴリトアニア Lithuania
☑ＬＵルクセンブルグ Luxembourg
☑ＬＶラトヴィア Latvia
☑ＭＡモロッコ Morocco
☑ＭＤモルドヴァ Republic of Moldova
☑ＭＧマダガスカル Madagascar
☑ＭＫマケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia
☑ＭＮモンゴル Mongolia
☑ＭＷマラウイ Malawi
☑ＭＸメキシコ Mexico
☑ＭＺモザンビーク Mozambique
☑ＮＯノルウェー Norway
☑ＮＺニュー・ジーランド New Zealand
☑ＰＬポーランド Poland
☑ＰＴポルトガル Portugal
☑ＲＯルーマニア Romania
☑ＲＵロシア Russian Federation
☑ＳＤスーダン Sudan
☑ＳＥスウェーデン Sweden
☑ＳＧシンガポール Singapore
☑ＳＩスロヴェニア Slovenia
☑ＳＫスロヴァキア Slovakia
☑ＳＬシエラ・レオネ Sierra Leone
☑ＴＪタジキスタン Tajikistan
☑ＴＭトルクメニスタン Turkmenistan
☑ＴＲトルコ Turkey
☑ＴＴトリニダッド・トバゴ Trinidad and Tobago
☑ＴＺタンザニア United Republic of Tanzania
☑ＵＡウクライナ Ukraine
☑ＵＧウガンダ Uganda
☐ＵＳ米国 United States of America
☑ＵＺウズベキスタン Uzbekistan
☑ＶＮベトナム Viet Nam
☑ＹＵユーゴスラヴィア Yugoslavia
☑ＺＡ南アフリカ共和国 South Africa
☑ＺＷジンバブエ Zimbabwe

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである。

☑ＥＣエクアドル Republic of Ecuador
☑ＰＨフィリピン the Philippines
☐.....

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。但し、追記欄にこの宣言から除く旨の表示をした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。*(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)*

願書の備考参照
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第VI欄　優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願 国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 06. 10. 00	特願2000 −308526	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☑ 上記（ ）の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の（ ）の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。：(1)

*先の出願が、ＡＲＩＰＯの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも１ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則４．１０(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄　国際調査機関

国際調査機関（ＩＳＡ）の選択

ＩＳＡ／ＪＰ

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日. 月. 年）　出願番号　国名（又は広域官庁）

第VIII欄　照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書	5 枚
明細書（配列表を除く）	183 枚
請求の範囲	11 枚
要約書	1 枚
図面	55 枚
明細書の配列表	47 枚
合計	302 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☑ 手数料計算用紙
   ☑ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
   ☑ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
2. ☑ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印（署名）の説明書
5. ☐ 優先権書類（上記第VI欄の（ ）の番号を記載する）：
6. ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）：
7. ☑ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
8. ☑ ヌクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
9. ☑ その他（書類名を詳細に記載する）
   陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名：日本語

第IX欄　提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

小栗　昌平　市川　利光

本多　弘徳　高松　猛　栗宇　百合子

受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日：05.10.01

2. 図面
   ☐ 受理された
   ☐ 不足図面がある

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって、その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）：

4. 特許協力条約第１１条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日：

5. 出願人により特定された国際調査機関：ＩＳＡ／ＪＰ

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日：

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

明　細　書

抗体組成物を生産する細胞

技術分野

本発明は、種々の疾患に有用な抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質などの抗体分子の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、およびその用途に関する。

背景技術

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)］。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、CDR と表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V 領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C 領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト抗体の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR と置換した抗体である。

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒト IgG クラスの抗体が主として利用されている［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)］。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有し

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ていることが報告されている［ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)］。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体の ADCC 活性及び CDC 活性の発現には、抗体 Fc 領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、FcγR と表記する）及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、Cγ2 ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性［ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー(Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)］の他、Cγ2 ドメインに結合している糖鎖の重要性［ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)］が示唆されている。

糖鎖に関しては、ボイド（Boyd）らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）或いはマウスミエローマ NSO 細胞（NSO 細胞）で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の ADCC 活性、CDC 活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することで CDC 活性のみが影響を受け、約 50%程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した［モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)］。また、ライフリー(Lifely)らは、CHO 細胞、NSO 細胞或いはラットミエローマ YO 細胞で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）の糖鎖の分析及び ADCC 活性を測定した結果、YO 細胞由来の CAMPATH-1H が最も高い ADCC 活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc とも表記する）が重要であることを示唆した［グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995) : WO99/54342］。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

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

構造式（Ｉ）

アスパラギンと結合する糖鎖の末端が還元末端、反対側が非還元末端と呼ばれている。N-グリコシド結合糖鎖には、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあることが知られている。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖タンパク質は、小胞体（以下、ＥＲと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ＥＲ内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-Dol とも表記する）と呼ばれるα-イソプレン単位を２０個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸に N-アセチル-グルコサミンが転移され GlcNAc-P-P-Dol となり、続いてもう１個 GlcNAc が転移され GlcNAc-GlcNAc-P-P-Dol となる。次いで、マンノース（以下、Man とも表記する）が５個転移され $(Man)_5$-$(GlcNAc)_2$-P-P-Dol に、さらに、Man が４個、グルコース（以下、Glc とも表記する）が３個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(Glc)_3$-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$-P-P-Dol ができる。この１４個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニン配列を持ったポリペプチドへＥＲ内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸（P-P-Dol）は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、３個の Glc と１ないし２個の Man がＥＲ上で除去され、この除去にはα-1,2-グルコシダーゼ I、α-1,3-グルコシダーゼ II およびα-1,2-マンノシダーゼが関与することが知られている。

ＥＲ上でトリミングを受けた糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加する N-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン１-ホスホジエステルα-N-アセチルグルコサミニダーゼおよびα-マンノシダーゼ I が存在し、Man 残基を５個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型の N-グリコシド結合糖鎖の最初の外側の GlcNAc を付加する N-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI)、２個の Man を除去するα-マンノシダーゼ II、外側から２個目の GlcNAc を付加する N-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII)、還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを付加するα-1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体トラン

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けてN-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

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

生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、１）糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤の応用、２）突然変異体の選択、３）糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の導入などの方法が試みられている。以下に、それら具体的例を述べる。

糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤としては、N-グリコシド結合糖鎖の前駆体であるコアオリゴ糖形成の最初のステップである GlcNAc-P-P-Dol の形成を選択的に阻害するツニカマイシン、グリコシダーゼ I の阻害剤であるカスタノスペルミンや N-メチル-１-デオキシノジリマイシン、グルコシダーゼ II の阻害剤であるブロモコンヅリトール、マンノシダーゼ I の阻害剤である１-デオキシノジリマイシンや 1,4-ジオキシ-1,4-イミノ-D-マンニトール、マンノシダーゼ II の阻害剤であるスワンソニンなどが知られている。糖転移酵素の特異的な阻害剤としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 V（GnTV）などに対する基質のデオキシ誘導体が知られている[グライコバイオロジーシリーズ２―糖鎖の細胞における運命（講談社サンエンティフィック）永井克孝・箱守仙一朗・木幡陽編（1993)]。また、１-デオキシノジリマイシンはコンプレックス型糖鎖の合成を抑え、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖の割合を増加させることが知られている。実際に、これら阻害剤を培地に添加することでIgGの糖鎖構造が変化し、抗原結合性などが変化することが報告されている[モレキュラー・イムノロジー(Molecular. Immunol.), 26, 1113 (1989)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の活性に関する突然変異体は、主に、レクチン耐性株として選択され取得されている。例えば、WGA (*T. vulgaris* 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis* 由来の concanavalin A)、RIC (*R. communis* 由

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris* 由来の leukoagglutinin)、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin)、PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin)などのレクチンを用い、様々な糖鎖構造を有するCHO細胞変異株がレクチン耐性株として取得されている［ソマティク・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol.Genet.), 12, 51 (1986)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットのβ-ガラクトシド-α-2,6-シアリルトランスフェラーゼをCHO 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13848, 1989]。

また、ヒトのβ-ガラクトシド-2-α-フコシルトランスフェラーゼをマウスＬ細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース（以下、Fuc とも表記する）が付加されたＨ抗原（Fucα1-2Galβ1-）の発現が確認されている［サイエンス(Science), 252, 1668, 1991]。さらに、ユマナ（Umana）らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置するN-アセチルグルコサミンの付加が抗体のADCC活性に重要であるとの知見に基づき、β-1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III（GnTIII）を発現させたCHO細胞を作製し親株との比較を行っている。親株のCHO細胞ではGnTIIIの発現が観察されておらず[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 261, 13370, 1984]、作製したGnTIII発現CHO細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べ１６倍高いＡＤＣＣ活性を有していることを確認している［グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995) : WO99/54342]。またこの際、ユマナ（Umana）らは、β-1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素Ｖ（GnTＶ）の遺伝子を導入したCHO細胞も作製しており、GnTIIIまたはGnTＶの過剰発現はCHO細胞に対して毒性を示すことを報告している。

発明の開示

このように、生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とは言い難いため

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、真に重要な糖鎖構造の特定には至っていない。従って、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼす糖鎖構造の同定と、そのような糖鎖構造の付加が可能な宿主細胞の開発が医薬開発の上で求められている。

本発明は、抗体分子の糖鎖構造を制御することが可能な、抗体組成物を生産する宿主細胞、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該製造方法で製造された抗体組成物を提供することを目的とする。

本発明は、以下の (1)～(61) に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞。

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

(3) 抗体分子のクラスが IgG である、(1) または(2)に記載の CHO 細胞。

(4) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した(1)～(3)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(5) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、(4) に記載の CHO 細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(6) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(7) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(8) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(9) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

(10) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(11) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

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

(13) α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

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

(14) α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(15) 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、(4) ～(14)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

(16) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(4) ～(15)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(17) 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(4) ～(16)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(18) 抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(17) 記載の CHO 細胞。

(19) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、(18) 記載の CHO 細胞。

(20) (1) ～(19)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(21) (20) に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(22) CHO 細胞が産生する N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物。

(23) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

α結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

(24) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、(23) 記載の細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(25) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(26) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(27) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

(28) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質。

(29) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(30) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

(31) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素がα-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(23) に記載の細胞。

(32) α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA；

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(33) α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(34) 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、(23) ～(33)のいずれか１項に記載の細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

(35) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(23) ～(34)のいずれか１項に記載の細胞。

(36) (23) ～(35)のいずれか１項に記載の細胞が、下記の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

(c) マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

(37) (23)～(36)のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

(38) 抗体分子のクラスが IgG である、(37) 記載の細胞。

(39) (37) または(38)項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

(40) 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(39) に記載の方法。

(41) (39) または(40)に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(42) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(43) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、(42) 記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(44) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、(42) または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(45) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(46) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(47) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(48) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素がα-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(42) または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(49) α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(48) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA;

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(50) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、(42)～(49)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

(51) (42)～(50)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(52) 抗体分子のクラスがIgGである、(51)に記載の方法。

(53) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(51)または(52)に記載の方法。

(54) (51)～(53)のいずれか1項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(55) (21)、(22)、(41)または(54)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(56) 医薬が、腫瘍を伴なう疾患、アレルギーを伴なう疾患、炎症を伴なう疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴なう疾患または細菌感染を伴なう疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、(55)に記載の医薬。

(57) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)からなる群から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号71で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(58) (57) 記載の蛋白質をコードする DNA。

(59) 以下の (a)、(b)、(c)、(d)及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA；

(c) 配列番号 65 で表される塩基配列を含む DNA；

(d) 配列番号 48 で表される塩基配列を含む DNA；

(e) 配列番号 51 で表される塩基配列を含む DNA。

(60) 以下の (a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれるゲノム DNA。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；

(b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；

(c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

(61) (58) ～(60)のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

本発明の抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞であればいかなる CHO 細胞も包含される。

本発明において、抗体分子とは、抗体の Fc 領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc 領域を含む融合タンパク質などをあげることができる。

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

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

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

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域は V 領域として HV または VH とも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH とも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CL とも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

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

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

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

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

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

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

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現さ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

せたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

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

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

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

抗体の断片とは、上記抗体の Fc 領域を含んだ断片を意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の２量体などがあげられる。

Fc 領域を含む融合タンパク質とは、抗体の Fc 領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどのタンパク質とを融合させた物質を意味する。

本発明において、抗体分子の Fc 領域に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、その N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトースーN-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して１ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

クティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）をあげることができる。

抗体分子の Fc 領域には、後述する N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ１カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体１分子あたり２本の糖鎖が結合している。抗体に結合する N-グルコシド結合糖鎖としては、前記構造式（I）で示されるコア構造を有するいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する２本の N-グルコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc 領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物（以下、本発明の抗体組成物と称する）とは、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する糖鎖から構成されていてもよい。

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

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

本発明の抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは２０％以上、より好ましくは２５％以上、さらに好ましくは３０％以上、特に好ましくは４０％以上、最も好ましくは５０％以上である抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。抗体濃度が低下すれば、それに伴って ADCC 活性が低下するが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

鎖の割合が２０％以上の場合、抗体濃度が低くても高い ADCC 活性を獲得することができる。

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

本発明において、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞とは、チャイニーズハムスター（Chinese hamster ; *Cricetulus griseus*）の卵巣組織から樹立された株化細胞であればいかなる細胞も包含される。その具体的な例としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I,II (p883-900)等の文献に記載されている CHO 細胞をあげることができる。また、ATCC (The American Type Culture Collection) に登録されている CHO-K1 株 (ATCC CCL-61)、DUXB11 株（ATCC CRL-9096）、Pro-5 株（ATCC CRL-1781）や、市販の CHO-S 株 (Lifetechnologies 社 Cat#11619)、あるいはこれら株を様々な培地に馴化させた亜株なども具体的な例としてあげることができる。

本発明において、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に係わる酵素とは、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素のことを意味する。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースは、de novo の合成経路あるいは Salvage 合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべて細胞内 GDP-フコースの合成に係わる酵素に包含される。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの de novo の合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-mannose 4,6-dehydratase (GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ；以下、GMD と表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4,6-reductase (GDP-ケト-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4,6-リダクターゼ；以下、Fx と表記する) などがあげられる。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの Salvage 合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスフォリラーゼ；以下、GFPP と表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、GMD としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GMD のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 65 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 65 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有するアミノ酸配列をコードするDNA などがあげられる。

本発明において、Fx としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、Fx のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、GFPP としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GFPP のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合する反応に影響を与える酵素を意味する。

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

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

本発明において、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、

下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、2、48、51または65で表される塩基配列を有するDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSS

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

C溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０mM塩化ナトリウム、１５mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以下、モレキュラー・クローニング第２版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号１、２、４８、５１または６５で表される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有する DNA、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

本発明において、配列番号２３、２４、７１、７２または７３で表されるアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性または GFPP 活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA,79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA,82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号１、２、６５、４８または５１で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は１個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、１～数十個、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個である。

また、本発明において、用いられる蛋白質が、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性または GFPP 活性を有するためには、それぞれ配列番号２

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

３、２４、７１、７２または７３で表されるアミノ酸配列とＢＬＡＳＴ〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やＦＡＳＴＡ〔Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)〕等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、特に好ましくは９７％以上、最も好ましくは９９％以上の相同性を有する。

本発明のCHO細胞としては、上述の酵素活性が低下または欠失した細胞があげられる。

上述の酵素活性が低下または欠失した細胞としては、すなわち、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株より低下または欠失した細胞を包含する。このような細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

（ａ）酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

（ｂ）酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

（ｃ）酵素についての突然変異を導入する手法；

（ｄ）酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；

（ｅ）N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

などがあげられる。

ここで、レクチンに耐性である株は、ある一定濃度のレクチンを含む培地中で培養した場合に、親株に比べて統計的な有意差を伴って少なくとも２倍、好ましくは３倍、より好ましくは５倍以上生存率に差が生じる性質を獲得する株を選択することで取得することができる。また、レクチンを含む培地中で培養した場合に、ある一定の生存率、例えば８０％の生存率、で培養可能なレクチンの濃度が、親株に比べ少なくとも２倍、好ましくは５倍、より好ましくは１０倍、さらに好ましくは２０倍以上の濃度となる株を選択することでも取得することができる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

本発明の CHO 細胞は、上記の目的とする酵素活性を低下または欠失させる手法を施す前の親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

また、本発明の CHO 細胞は、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が２０％未満である抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

本発明において親株としては、例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下していない細胞があげられる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を低下または欠失させるような処理を施していない細胞が用いられる。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

本発明は、また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合等鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖修飾に関与する酵素の活性が、遺伝子工学的な手法により低下した細胞（以下、本発明の宿主細胞と略記する）に関する。本発明の宿主細胞は、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産するための宿主細胞として有用である。

本発明の宿主細胞としては、抗体分子を発現できる宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。その例として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞の具体的な例としては、後述の３．に記載のものがあげられる。特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞、マウスミエローマ細胞株 NSO 細胞、マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

１．　本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

（１）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

（ａ）アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学，12，239，(1993)、バイオ／テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY)，17，1097，(1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.)，5，1083，(1995)、細胞工学，13，255，(1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)，96，1886 (1999)等に記載されたリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

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

調製したあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

本発明の宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座３―糖質Ⅰ,糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学，別冊，実験プロトコールシリーズ,グライコバイオロジー実験プロト

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

コール,糖タンパク質･糖脂質･プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修（1996）]、モレキュラー･クローニング第２版、カレント･プロトコールズ･イン･モレキュラー･バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やＲＴ-PCR法等があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の５または後述の６に記載の方法があげられる。

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

DNAの調製方法

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNA又はmRNAを調製する。

調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて　細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAを取得することができる。

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

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

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

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

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express［STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)［ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)］、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、λgt10、λgt11［ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach),1, 49 (1985)]、λ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

TriplEx (Clontech社)、λExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

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

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

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)］あるいはＡＢＩＰＲＩＳＭ３７７DNAシークエンサー（PE Biosystems社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

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

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)］あるいはＡＢＩＰＲＩＳＭ３７７DNAシークエンサー

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

決定したcDNAの塩基配列をもとに、ＢＬＡＳＴ等の相同性検索プログラムを用いて、ＧｅｎＢａｎｋ、ＥＭＢＬおよびＤＤＢＪなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号48、51または65に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または2に記載の塩基配列があげられる。

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

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

<u>ゲノムDNAの調製方法</u>

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第２版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム（Genome Systems社）やUniversal GenomeWalker™ Kits（CLONTECH社）などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを単離することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号３に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

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

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

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がＮ３’-Ｐ５’ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがＣ-５プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる［細胞工学，16，1463（1997）］。

（b）相同組換え法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

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

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

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子（例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記１の（１）の（ａ）に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号３に記載の塩基配列があげられる。

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

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

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ８ ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリＡ選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

（ｃ）RDO方法による本発明の細胞の作製

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

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

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

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

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記１の（１）の（ａ）に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

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

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記１の（１）の（ａ）に記載の、導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の１の（５）に記載の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

5または後述の6に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDOのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386, (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285, (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462, (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829, (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768, (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323, (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dematol.), 111, 1172, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43, (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555, (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi方法による本発明の宿主細胞の作製

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

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

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子のコンストラクトを設計する。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

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

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の５または後述の６に記載の方法があげられる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、前記１の（１）の（ａ）に記載されたDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

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

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

（ｅ）トランスポゾンを用いた方法による、本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.), 25, 35, (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の３．に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

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

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の５または後述の６に記載の方法があげられる。

（２）酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、４つのアミノ酸（133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら４つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら４つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDの結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD（配列番号65）では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。

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

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

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

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３．に記載の宿主細胞があげられる。

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）の（ａ）に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の５または後述の６に記載の方法があげられる。

（３）酵素についての突然変異を導入する手法

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

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

方法としては、１）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、２）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、３）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版（朝倉書店）日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法をあげることができる。

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

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

（４）酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA／DNA技術［バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology,9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology,10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology,10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術［Trends in Biotechnology,10, 132 (1992)］等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

る酵素としては、具体的には、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ、α-L-フコシダーゼなどがあげられる。

（5）N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティク・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス（Somatic Cell Mol. Genet.），12，51，(1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

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

具体的には、1μg/ml～1mg/mlの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日～2週間、好ましくは1日～1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによってことで、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

上記方法で得られる株としては、例えば、後述の実施例14(2) で取得したCHO/CCR4-LCA株Nega-13（FERM BP-7756）があげられる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的として、１．に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、１．に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体的は、染色体上の細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法［例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等］により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastcyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、１．に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピューレーティング・マウス・エンブリオ第２版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、１．に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位あるいは３位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法[組織培養，20 (1994)；組織培養，21 (1995)；トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology)，15，45 (1997)]に準じてオーキシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位あるいは３位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

３．抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies，A Laboratory manual，Cold Spring Harbor Laboratory，1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice，Third Edition，Acad. Press，1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering，A Practical Approach，IRL Press at Oxford University Press，1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Saccharomyces cerevisiae、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*等をあげることができる。

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

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

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

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

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］、リン酸カルシウム法［特開平2-227075］、リポ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

フェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法[マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、ＤＥＡＥ-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ４—遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法[マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版]等をあげることができる。

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

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

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

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

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

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

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

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

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

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

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Whitten培地[発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（1987）]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下等の条件下で１～７日間行う。

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

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

培養は、通常ｐＨ６～７、２５～３０℃等の条件下で、１～５日間行う。

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

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

培養は、通常ｐＨ５～９、２０～４０℃の条件下で３～６０日間行う。

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

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

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

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

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

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

（１）ヒト化抗体発現用ベクターの構築

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

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

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

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)］、pAGE103［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)］、pHSG274［ジーン(Gene), 27, 223 (1984)］、pKCR［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)］、pSG1βd2-4［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)］等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

初期プロモーターとエンハンサー［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.),101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR［バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター［セル(Cell), 41, 479 (1985)］とエンハンサー［セル(Cell), 33, 717 (1983)］等があげられる。

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

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

（2）ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF'［ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)］、C600［ジェネティックス(Genetics), 39, 440

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

（３）ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のＨ鎖及びＬ鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＨ鎖及びＬ鎖V領域の全アミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins ofImmunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、Ｈ鎖及びＬ鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のＨ鎖及びＬ鎖V領域のアミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991］と比較することによって見出すことができる。

（４）ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

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

（５）ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のＨ鎖及びＬ鎖V領域をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRを移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク（以下、FRと表記する）のア

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

（６）ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

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

（７）ヒト化抗体の安定的生産

本項３の（４）及び（６）に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体（以下、併せてヒト化抗体と称す）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

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

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

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNSO細胞、SP2/O細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/O細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/O細胞、５に記載本発明の宿主細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate（以下、G418と表記する；SIGMA社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

培地としては、RPMI1640培地（日水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL302培地（JRH社製）、IMDM培地（GIBCO BRL社製）、Hybridoma-SFM培地（GIBCO BRL社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBSと表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法［以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996］等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996］。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動［以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)］やウエスタンブロッティング法［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996］等で測定することができる。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

４．抗体組成物の活性評価

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

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

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

５．各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

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

（１）中性糖・アミノ糖組成分析

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

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置（BioLC）を用いる方法があげられる。BioLCはHPAEC-PAD（high performance anion-exchange chromatography-

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J.Liq.Chromatogr.) , 6,1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

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

(2) 糖鎖構造解析

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

6．抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であり、高いADCC活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記6．に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

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

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

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA（*T. vulgaris*由来のwheat-germ agglutinin)、ConA（*C. ensiformis*由来のconcanavalin A)、RIC（*R. communis*由来の毒素)、L-PHA（*P. vulgaris*由来のleukoagglutinin)、LCA（*L. culinaris*由来のlentil agglutinin)、PSA（*P. sativum*由来のPea lectin)、AAL（*Aleuria aurantia* Lectin)、ACL（*Amaranthus caudatus* Lectin)、BPL（*Bauhinia purpurea* Lectin)、DSL（*Datura stramonium* Lectin)、DBA（*Dolichos biflorus* Agglutinin)、EBL（Elderberry Balk Lectin)、ECL（*Erythrina cristagalli* Lectin)、EEL（*Euonymus europaeus* Lectin)、GNL（*Galanthus nivalis* Lectin)、GSL（*Griffonia simplicifolia* Lectin)、HPA（*Helix pomatia* Agglutinin)、HHL（*Hippeastrum Hybrid* Lectin)、Jacalin、LTL（*Lotus tetragonolobus* Lectin)、LEL（*Lycopersicon esculentum* Lectin)、MAL（*Maackia*

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

amurensis Lectin)、MPL (*Maclura pomifera* Lectin)、NPL (*Narcissus pseudonarcissus* Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (*Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin)、PTL (*Psophocarpus tetragonolobus* Lectin)、RCA (*Ricinus communis* Agglutinin)、STL (*Solanum tuberosum* Lectin)、SJA (*Sophora japonica* Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (*Ulex europaeus* Agglutinin)、VVL (*Vicia villosa* Lectin)、WFA (*Wisteria floribunda* Agglutinin)があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (*Lens Culinaris*由来のLentil Agglutinin)エンドウマメレクチンPSA (*Pisum sativum*由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (*Aleuria aurantia*由来のLectin) をあげることができる。

7．本発明の抗体分子の利用

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウィルスまたは細菌に感染細胞を、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いてウィルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

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

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗GD2抗体（Ohta et al., Anticancer Res., 13, 331-336, 1993）、抗GD3抗体（Ohta et al., Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993)、抗GM2抗体 (Nakamura et al., Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗HER2抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗CD52抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗MAGE抗体 (Jungbluth et al., British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗HM1.24抗体 (Ono et al., Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Ogata et al., Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗ＦＧＦ８抗体 (Matsuzaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8受容体抗体 (Kuo et al., J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗PMSA抗体 (Murphy et al., J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Presta et al., Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997)、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Kanno et al., Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン６抗体 (Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ン６受容体抗体（Sato et al., Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン５抗体（Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン５受容体抗体、抗インターロイキン４抗体（Bird et al., Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン４受容体抗体（Jung et al., J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体（Tempest et al., Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体（Amrani et al., Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗CCR4抗体（Campbell et al., Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体（Peri et al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994）または抗ケモカイン受容体抗体（Wu et al., J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997）であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体（Co et al., J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体（Ferns et al., Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体（Shulman et al., J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997)、抗血液凝固因子抗体（Peter et al., Circulation, 101, 1158-1164, 2000）などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗ｇｐ１２０抗体（Tugarinov et al., Structure, 8, 385-395, 2000)、抗ＣＤ４抗体（Schulze-Koops et al., J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗ＣＣＲ４抗体、抗ベロ毒素抗体（Karmali et al., J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999）などがあげられる。

上記抗体は、ATCC（The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所（現：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

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

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

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

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

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

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

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

図面の簡単な説明

第1図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。1A図が非還元条件、1B図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-GD3キメラ抗体、3がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、4がSP2/0-GD3キメラ抗体、5がNS0-GD3キメラ抗体（302)、6がNS0-GD3キメラ抗体（GIT)、7が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第2図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体（302)、△がNS0-GD3キメラ抗体（GIT）の活性をそれぞれ示す。

第3図は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体（302)、△がNS0-GD3キメラ抗体（GIT）の活性をそれぞれ示す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第4図は、精製した3種類の抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体の SDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。4A 図が非還元条件、4B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、3が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、4が NSO-hIL-5RCDR 抗体、5が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第5図は、精製した3種類の抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体の hIL-5Rαとの結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果を示した図である。縦軸は hIL-5Rαとの結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NSO-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第6図は、精製した3種類の抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体の hIL-5R 発現マウス T 細胞株 CTLL-2（h5R）に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NSO-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第7図は、精製した3種類の抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体のカニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数（抗体及び hIL-5 の投与開始日を 0 日とした）をそれぞれ示す。101、102 が抗体非投与群、301、302、303 が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体投与群、401、402、403 が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体投与群、501、502、503 が NSO-hIL-5RCDR 抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

第8図は、YB2/0 が生産した精製抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体（8A 図）および NSO が生産した精製抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体（8B 図）の PA 化糖鎖の逆相 HPLC 溶離の溶離図（左図）とその PA 化糖鎖をα-L-フコシダーゼ処理した後に逆相 HPLC で分析して得た溶離図（右図）を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第9図は、CHO/d 細胞が生産した精製抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第10図で、10A 図は、非吸着画分、吸着画分の一部の GD3 との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

れぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。10B 図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

第 11 図は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製した PA 化糖鎖を逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。11A 図に非吸着画分の溶離図、11B 図に吸着画分の一部の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 12 図は、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体（12A 図～12F 図）から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 13 図は、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体（50%）、□が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、■が抗 GD3 キメラ抗体（29%）、△が抗 GD3 キメラ抗体（24%）、▲が抗 GD3 キメラ抗体（13%）、×が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

第 14 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体（50%）、□が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、■が抗 GD3 キメラ抗体（29%）、△が抗 GD3 キメラ抗体（24%）、▲が抗 GD3 キメラ抗体（13%）、×が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

第 15 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体（50%）、□が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、■が抗 GD3 キメラ抗体（29%）、△が抗 GD3 キメラ抗体（24%）、▲が抗 GD3 キメラ抗体（13%）、×が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 16 図は、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 17 図は、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 18 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。また、18A 図はドナーA、18 図はドナーB のエフェクター細胞を用いた結果を示す。

第 19 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 20 図は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 21 図は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

第 22 図は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 23 図は、プラスミド CHAcd-pBS および YBAcd-pBS の構築を示した図である。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 24 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた各宿主細胞株における FUT8 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/0 細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第 25 図は、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 26 図は、プラスミド pBSmfFUT8 の構築を示した図である。

第 27 図は、プラスミド pAGEmfFUT8 の構築を示した図である。

第 28 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸にβ-アクチン転写量に対する FUT8 転写量の相対値を示す。

第 29 図は、FUT8 遺伝子過剰発現株より精製した抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。30A 図に mfFUT8-6 株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖、30B 図に pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 32 図は、プラスミド CHfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 33 図は、プラスミド ploxPPuro の構築を示した図である。

第 34 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築を示した図である。

第 35 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築を示した図である。

第 36 図は、プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 37 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 38 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築を示した図である。

第 39 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築を示した図である。

第 40 図は、プラスミド pKOFUT8Puro の構築を示した図である。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 41 図は、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ 遺伝子破壊 CHO 細胞株である 1st.△FUT8 2-46-1 株及び 1st.△FUT8 2-46 株のゲノムサザン解析結果を示した図である。

第 42 図は、FUT8 対立遺伝子破壊株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲、■はそれぞれ、抗 CCR4 キメラ抗体産生 CHO 細胞 5-03 株由来の精製抗体および 1st.△FUT8 2-46-1 株由来の精製抗体の活性をそれぞれ示す。

第 43 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は 5-03 株、■は CHO/CCR4-LCA 株、◆は CHO/CCR4-AAL 株、▲は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 44 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は YB2/0 株（KM2760#58-35-16）、△は 5-03 株、●は CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 45 図は、精製した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。45A 図は 5-03 株が生産する抗体、45B 図は CHO/CCR4-LCA 株が生産する抗体、45C 図は CHO/CCR4-AAL 株が生産する抗体、および 45D 図は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の分析結果を示す。

第 46 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 1 の工程を示した図である。

第 47 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 2 の工程を示した図である。

第 48 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 3 の工程を示した図である。

第 49 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 4 の工程を示した図である。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 50 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 5 の工程を示した図である。

第 51 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 6 の工程を示した図である。

第 52 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示した図である。LCA レクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を 100%とし、2 回測定を行った図である。図中 249 は、発現ベクターpAGE249 を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する生存率を示す。GMD は GMD 発現ベクターpAGE249GMD を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示す。

第 53 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の細胞群が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 54 図は、CHO 細胞由来の GMD cDNA クローン 22-8 の 5'末端にクローン 34-2 の 5'末端を導入したプラスミド CHO-GMD の作製工程を示した図である。

第 55 図は、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChiLHGM4 の構築

抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 GD3 キメラ抗体と表記する）の L 鎖の発現ベクターpChi641LGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI（宝酒造社製）と SalI（宝酒造社製）で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 4.03kb の断片と動物細胞用発現ベクターpAGE107 [サイトテクノロジー（Cytotechnology), 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI（宝酒造社製）と SalI（宝酒造社製）で切断して得られる G418 耐性遺伝子及びスプライシングシグナルを含む約 3.40kb の断片を DNA Ligation Kit（宝酒造社

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

製）を用いて連結、大腸菌 HB101 株［モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989］を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI（宝酒造社製）で切断後、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更に MluI（宝酒造社製）で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクターpChi641HGM4［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)］を制限酵素 XhoI（宝酒造社製）で切断後、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更に MluI（宝酒造社製）で切断して得られる H 鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌 HB101 株［モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989］を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChi641LHGM4 を構築した。

2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4 の 5μg を 4×10^6 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞［ATCC CRL-1662、J.V. Kilmarin et al., J. Cell. Biol. 93, 576-582 (1982)］へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology), 3, 133 (1990)］により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10)［FBS（GIBCO BRL 社製)を 10%含む RPMI1640 培地］に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に 200μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、DHFR の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTX と表記する；SIGMA 社製）を 50nM 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に 1～2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 2ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

このようにして得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-9-51 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6））に FERM BP-6691 として寄託されている。

(2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4 の 4μg を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞[G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-FBS(10) [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(岩城硝子社製) に 200μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 10nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地 [透析牛胎児血清 (以下、dFBS と表記する ; GIBCO BRL 社製)を 10%含む IMDM 培地] に 1～2×10^5細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、10nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 100nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(3) マウスミエローマ NSO 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4 の 5μg を 4×10^6細胞のマウスミエローマ NSO 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, 1990] により導入後、40ml の EX-CELL302-FBS(10) [FBS を 10%、L-グルタミン (以下、L-Gln と表記する ; GIBCO BRL 社製) を 2mM 含む EX-CELL302 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 50nM 含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地（dFBS を 10%、L-Gln を 2mM 含む EX-CELL302 培地）に 1～2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

3. 抗体の GD3 に対する結合活性の測定（ELISA 法）

抗体の GD3 に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmol の GD3 を 10μg のジパルミトイルフォスファチジルコリン（SIGMA 社製）と 5μg のコレステロール（SIGMA 社製）とを含む 2ml のエタノール溶液に溶解した。該溶液の 20μl（40pmol/ウェルとなる）を 96 ウェルの ELISA 用のプレート（Greiner 社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン（以下、BSA と表記する；SIGMA 社製）を含む PBS（以下、1%BSA-PBS と表記する）を 100μl/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を 50μl/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween20（和光純薬社製）を含む PBS（以下、Tween-PBS と表記する）で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50μl/ウェルで加え、室温で 1 時

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液（pH4.2）に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1μl/ml で添加した溶液（以下、同様)] を 50μl/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度（以下、OD415 と表記する）を測定した。

4. 抗 GD3 キメラ抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (1) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを BSA を 0.2%、MTX を 200nM、トリヨードチロニン（以下、T3 と表記する；SIGMA 社製）を 100nM の濃度で含む Hybridoma-SFM 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、2.0L スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて 50rpm の速度で撹拌培養した。37℃の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、YB2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

(2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (2) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、脂肪酸濃縮液（以下、CDLC と表記する；GIBCO BRL 社製）を 0.5%、プルロニック F68（以下、PF68 と表記する；GIBCO BRL 社製）を 0.3%の濃度で含む EX-CELL302 培地に 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁し、175mm^2 フラスコ (Greiner 社製）に 50ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3 キメラ抗体と名付けた。

(3) NSO 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 2mM、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM、FBS を 1%の濃度で含む EX-

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

CELL302 培地に 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁し、175mm^2 フラスコ（Greiner 社製）に 200ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NSO-GD3 キメラ抗体（302）と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、175mm^2 フラスコ（Greiner 社製）に 200ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NSO-GD3 キメラ抗体（GIT）と名付けた。

(4) SP2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

特開平 5-304989（EP533199）に記載の抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン(KM-871（FERM BP-3512)) を G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、175mm^2 フラスコ（Greiner 社製）に 200ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、SP2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

5. 精製した抗 GD3 キメラ抗体の解析

上記実施例 1 の 4 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各 4μg を公知の方法 [ネイチャー（Nature), 227, 680, 1970]に従って SDS-PAGE し、分子量及び精製度を解析した。その結果を第 1 図に示した。第 1 図に示したように、精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン（以下、Kd と表記する）の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量（H 鎖：約 49Kd、L 鎖：約 23Kd、分子全

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

体：約 144Kd）とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S 結合と表記する）が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996］と一致し、各抗 GD3 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

実施例 2. 抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

1. 抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性（ELISA 法）

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の GD3（雪印乳業社製）に対する結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。第 2 図は、添加する抗 GD3 キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 2 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、ほぼ同等の GD3 に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NSO-GD3 キメラ抗体（302）と NSO-GD3 キメラ抗体（GIT）の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

2. 抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性（ADCC 活性）

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株 G-361（ATCC CRL1424）の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $Na_2{}^{51}CrO_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37℃で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、2×10^5細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（Nycomed Pharma AS社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて2×10^6細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の50μl（1×10^4細胞/ウェル）を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を100μl（2×10^5細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる）添加した。更に、各種抗GD3キメラ抗体を各最終濃度0.0025～2.5μg/mlとなるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の^{51}Cr量をγ-カウンターにて測定した。自然解離^{51}Cr量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の^{51}Cr量を測定することにより求めた。全解離^{51}Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の^{51}Cr量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式（II）により求めた。

$$\text{ADCC活性（\%）}=\frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量}-\text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量}-\text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}\times100 \qquad (II)$$

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

その結果を第3図に示した。第3図に示したように、5種類の抗GD3キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3キメラ抗体が最も高いADCC活性を示し、次いでSP2/0-GD3キメラ抗体、NSO-GD3キメラ抗体、CHO-GD3キメラ抗体の順に高いADCC活性を示した。培養に用いた培地の異なるNSO-GD3キメラ抗体（302）とNSO-GD3キメラ抗体（GIT）では、それらのADCC活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体のADCC活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体のFc領域の構造の差に起因していることが推定された。

実施例3．抗ヒトインターロイキン5レセプターα鎖ヒト型CDR移植抗体の作製

1．抗ヒトインターロイキン5レセプターα鎖ヒト型CDR移植抗体の安定生産細胞の作製

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗ヒトインターロイキン5レセプターα鎖ヒト型CDR移植抗体（以下、抗hIL-5RαCDR移植抗体と表記する）の発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗hIL-5RαCDR移植抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

抗hIL-5RαCDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の5μgを4×10^6細胞のラットミエローマYB2/0細胞へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133, 1990］により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10)に懸濁し、96ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に200μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5RαCDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

培養上清中に抗hIL-5RαCDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを50nM含むRPMI1640-FBS(10)培地に$1\sim2\times10^5$細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO_2インキュ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗hIL-5Rα CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗hIL-5Rα CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、抗hIL-5Rα CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例9に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。このようにして得られた抗hIL-5Rα CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンNo.3は平成11年4月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6））にFERM BP-6690として寄託されている。

(2) CHO/dhfr-細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗hIL-5Rα CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の4μgを1.6×10^6細胞のCHO/dhfr-細胞へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology），3，133（1990）］により導入後、10mlのIMDM-FBS(10)に懸濁し、96ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に200μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5Rα CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

培養上清中に抗hIL-5Rα CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを10nM含むIMDM-dFBS(10)培地に$1\sim2\times10^5$細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（岩城硝子社製）に0.5mlずつ分注した。5%CO_2インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、10nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、500nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 500nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(3) マウスミエローマ NSO 細胞を用いた生産細胞の作製

ヤラントン（Yarranton）らの方法［バイオ/テクノロジー（BIO/TECHNOLOGY），10，169 (1992)］に従い、WO97/10354 に記載の抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 上の抗体 H 鎖及び L 鎖 cDNA を用いて抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体発現ベクターを作製し、NSO 細胞を形質転換し、抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として用いた。

2. 抗体の hIL-5Rα に対する結合活性の測定（ELISA 法）

抗体の hIL-5Rα に対する結合活性は以下のようにして測定した。

WO97/10354 に記載の抗 hIL-5Rα マウス抗体 KM1257 を PBS で 10μg/ml の濃度に希釈した溶液の 50μl を 96 ウェルの ELISA 用のプレート（Greiner 社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、4℃で 20 時間反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100μl/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、WO97/10354 に記載の可溶性 hIL-5Rα を 1%BSA-PBS で 0.5μg/ml の濃度に希釈した溶液を 50μl/ウェルで加え、4℃で 20 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型 CDR 移植抗体の各種希釈溶液を 50μl/ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50μl/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50μl/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

3. 抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (1) で得られた抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、175mm^2 フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体は、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

(2) CHO/dhfr-細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (2) で得られた抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、CDLC を 0.5%、PF68 を 0.3%の濃度で含む EX-CELL302 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、4.0L スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 100rpm の速度で撹拌培養した。37℃の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体は、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

(3) NSO 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (3) で得られた抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをヤラントン (Yarranton) らの方法 [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)] に従い、培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体は、NSO-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

4．精製した抗hIL-5Rαの解析

上記実施例3の3項で得られた各種動物細胞で生産、精製した3種類の抗hIL-5Rα CDR移植抗体の各4μgを公知の方法［ネイチャー（Nature），227，680（1970）］に従ってSDS-PAGEし、分子量及び精製度を解析した。その結果を第4図に示した。第4図に示したように、精製した各抗hIL-5Rα CDR移植抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150Kdの単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖：約49Kd、L鎖：約23Kd、分子全体：約144Kd）とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のS-S結合が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual），Cold Spring Harbor Laboratory，Chapter 14，1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス（Monoclonal Antibodies: Principles and Practice），Academic Press Limited，1996］と一致し、各抗hIL-5Rα CDR移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ、精製されたことが確認された。

実施例4．抗hIL-5Rα CDR移植抗体の活性評価

1．抗hIL-5Rα CDR移植抗体のhIL-5Rαに対する結合活性（ELISA法）

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗hIL-5Rα CDR移植抗体のhIL-5Rαに対する結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。第5図は、添加する抗hIL-5Rα CDR移植抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第5図に示したように、3種類の抗hIL-5Rα CDR移植抗体は、ほぼ同等のhIL-5Rαに対する結合活性を示した。この結果は実施例2の1項の結果と同様に、抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

2. 抗hIL-5Rαの CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性（ADCC 活性）

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

WO97/10354 に記載の hIL-5Rα鎖及びβ鎖を発現しているマウス T 細胞株 CTLL-2(h5R) を RPMI1640-FBS(10) 培地で培養し、1×10^6 細胞/0.5ml となるように調製し、放射性物質である $Na_2{}^{51}CrO_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37℃で 1.5 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、2×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Polymorphprep (Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 9×10^6細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の 50μl（1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を 100μl（9×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 90:1 となる）添加した。更に、各種抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体を各最終濃度 0.001～0.1μg/ml となるように加え、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量をγ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

を、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式（II）により求めた。

その結果を第6図に示した。第6図に示したように、3種類の抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体のうち、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、NSO-hIL-5RCDR 抗体の順に高い ADCC 活性を示した。以上の結果は実施例2の2項の結果と同様に、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、2種類のヒト化抗体のいずれの場合も YB2/0 細胞で生産した抗体が最も高い ADCC 活性を示したことから、YB2/0 細胞を用いることにより、ADCC 活性の高い抗体を製造できることが明らかとなった。

3. 抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体の in vivo における活性評価

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体の in vivo における活性を評価するため、以下に示す方法に従い、カニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を検討した。

カニクイザルに初日より hIL-5（調製方法は WO97/10354 に記載）を 1μg/kg で1日1回、計14回背部皮下より投与した。各種抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体を0日の hIL-5 の投与1時間前に 0.3mg/kg で静脈内に単回投与した。抗体非投与群をコントロールとして用いた。抗体投与群は各群3頭（No.301、No.302、No.303、No.401、No.402、No.403、No.501、No.502、No.503）、抗体非投与群は2頭（No.101、No.102）のカニクイザルを用いた。投与開始の7日前より投与後42日目まで経時的に約 1ml の血液を伏在静脈または大腿静脈より採取し、1μl の末梢血中の好酸球数を測定した。その結果を第7図に示した。第7図に示したように、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体を投与した群では、血中好酸球の増加が完全に抑制された。一方、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、1頭で完全な抑制作用が認められたものの、2頭ではその抑制作用は不充分であった。NSO-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、完全な抑制作用は認められず、その効果は不充分であった。

以上の結果は、抗体の in vivo 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体ではその in vivo 活性の高さは、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

実施例4の2項で述べたADCC活性の高さと正の相関が認められたことから、その活性発現には、ADCC活性の高さが極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、ADCC活性の高い抗体は、ヒトの各種疾患の臨床においても有用であることが期待される。

実施例5．ADCC活性を高める糖鎖の解析

1．2-アミノピリジン標識糖鎖（PA化糖鎖）の調製

本発明のヒト化抗体を塩酸による酸加水分解にてシアル酸を除去した。塩酸を完全に除去した後、ヒドラジン分解により糖鎖をタンパク質から切断した［メソッド・オブ・エンザイモロジー（Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.), 95, 197 (1984)]。蛍光標識した糖鎖（PA化糖鎖）を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム（Pharmacia社製）を用いて不純物と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖とした。

2．精製抗hIL-5Rαの CDR移植抗体のPA化糖鎖の逆相HPLC分析

上記実施例5の1項の方法で実施例3で作製された各種抗hIL-5RCDR抗体についてPA化糖鎖を行った後、CLC-ODSカラム（Shimadzu社製）による逆相HPLC分析を行った。過剰量のα-L-フコシダーゼ（ウシ腎由来、SIGMA社製）をPA化糖鎖に添加して消化を行い（37°C、15時間)、逆相HPLCで分析した（第8図)。アスパラギン結合糖鎖は30分間から80分間の範囲に溶出することをTaKaRa社製PA化糖鎖スタンダードを用いて確認した。α-L-フコシダーゼ消化によって、逆相HPLCの溶出位置が移動する糖鎖（48分間から78分間に溶出される糖鎖）の全体に占める割合を計算した。結果を第1表に示す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第１表

抗体の生産細胞	α-1,6-フコース結合糖鎖（%）
YB2/0	47
NS0	73

YB2/0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 47%、NS0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 73%が N グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖（以下、「α-1,6-フコースを持つ糖鎖」とも表記する）であった。よって、YB2/0 細胞で生産した抗体は、NS0 細胞で生産した抗体と比較して N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの６位にフコースが結合していない糖鎖(以下、単に、「α-1,6-フコースを持たない糖鎖」と表記する）の割合がα-1,6-フコースを持たない糖鎖が多かった。

3. 精製抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体の単糖組成分析

トリフルオロ酢酸による酸加水分解により、YB2/0 細胞、NS0 細胞および CHO/d 細胞で生産した抗 hIL-5Rα CDR 移植抗体の糖鎖を単糖に分解し、BioLC (Dionex 社製) を用いて単糖組成分析を行った。

N-グリコシド結合糖鎖のうち、コンプレックス型では、1 本の糖鎖におけるマンノース数は 3 であるため、マンノースを 3 として計算した場合の各単糖の相対比を第 2 表に示す。

第２表

抗体の生産細胞	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	ADCC 活性 (%)*
YB2/0	0.60	4.98	0.30	3.00	42.27
NS0	1.06	3.94	0.66	3.00	16.22
CHO/dhfr-	0.85	3.59	0.49	3.00	25.73
CHO/dhfr-	0.91	3.80	0.27	3.00	25.73

*抗体濃度 0.01μg/ml

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

フコースの相対比は、 YB2/0＜CHO/d＜NSO であり、本結果でも YB2/0 細胞で生産した抗体の糖鎖はフコース含量が最も低かった。

4. CHO/dhfr-細胞生産抗体の糖鎖解析

CHO/dhfr-細胞で生産した精製抗 hIl-5Rαの CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム（島津社製）を用いて逆相 HPLC 分析を行った(第 9 図)。第 9 図において、溶出時間 35～45 分間がフコースを持たない糖鎖、45～60 分間がフコースを持つ糖鎖であった。CHO/dhfr-細胞で生産した抗 hIl-5Rαの CDR 移植抗体は、マウスミエローマ NSO 細胞で生産させた抗体と同様に、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗体よりもフコースを持たない糖鎖の含量が少なかった。

実施例 6. 高 ADCC 活性抗体の分離

フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗 hIl-5Rαの CDR 移植抗体の分離を行った。HPLC は島津社製 LC-6A を用い、流速は 1ml/分、カラム温度は室温で行った。50mM トリス-硫酸緩衝液(pH7.3) で平衡化し、精製された抗 hIL-5Rαの CDR 移植抗体を注入後、0.2Mα-メチルマンノシド（ナカライテスク社製）の直線濃度勾配（60 分間）にて溶出した。抗 hIl-5Rαの CDR 移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分離した。非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5Rαに対する結合活性を測定すると、同様の結合活性を示した(10A 図)。ADCC 活性を測定すると、非吸着画分の方が吸着画分の一部よりも高い(100～1000 倍) ADCC 活性を示した（10B 図)。さらに、非吸着画分、吸着画分の一部から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム（島津社製）を用いて逆相 HPLC 分析を行った（第 11 図)。非吸着画分は主としてフコースのない糖鎖をもつ抗体であり、吸着画分の一部は主としてフコースがある糖鎖もつ抗体であった。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

実施例 7. α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

1. α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 2 項 (1) に記載した方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体を生産する YB2/0 細胞由来の形質転換クローンを得た。それぞれの YB2/0 細胞由来の形質転換クローンより抗体を調製し、それぞれをロット 1、ロット 2、ロット 3 とした。抗 GD3 キメラ抗体ロット 1、ロット 2、ロット 3 の糖鎖分析を、実施例 11 の (6) の方法に従って行った結果、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ 50%、45%、29%であった。以下、これらの試料を、抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、抗 GD3 キメラ抗体 (29%) と表記する。

また、実施例 1 の 2 項 (2) で調製した CHO/DG44 細胞由来の抗 GD3 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 11 の (6)の方法に従って行った結果、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、7%であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (7%) と表記する。

さらに、抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) を用い、抗 GD3 キメラ抗体 (45%):抗 GD3 キメラ抗体 (7%)=5:3 および 1:7 の割合で混合した。これらの試料を、実施例 10 の (6) の方法に従って糖鎖分析を行った結果、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 24%および 13% (分析値) の試料を調製した。これらを以下、抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、抗 GD3 キメラ抗体 (13%) と表記する。

第 12 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2 回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

2. GD3 に対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 7 の 1 項で調製したα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 (雪印乳業社製) に対する結合活性は、実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。その結果、第 13 図に示したように、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも同等の GD3 に対する結合活性を示し、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

3. ヒトメラノーマ細胞株に対するADCC活性の評価

抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

ヒトメラノーマ細胞株 G-361 の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $Na_2{}^{51}CrO_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37℃で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を 5mL 加え、2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) を 0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20 分間) して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離 (1200rpm、5 分間) して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mL の濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の 50μL (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したヒトエフェクター細胞溶液を 100μL (2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。さらに、抗 GD3 キメラ抗体を各最終濃度 0.0005～5μg/mL となるように加え、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量をγ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、ヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性（%）は前記式（II）により求めた。

第 14 図および第 15 図には、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各種濃度（0.0005～5μg/mL）における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー（A、B)のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 14 図および第 15 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性は、いずれの抗体濃度においてもα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が 0.05μg/ml では、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が２４%、２９%、４５%および５０%の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が２０%未満の抗体である、１３%および７%では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 8. α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の活性評価

1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

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

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

10μg の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 を 4×10^6 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞（ATCC CRL1662）へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology), 3, 133 (1990)］により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5)［FBS（PAA ラボラトリーズ社製）を 5%含む Hybridoma-SFM 培地（インビトロジェン社製)］に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に 200μL/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 1mg/mL になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 1mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX（SIGMA 社製）を 50nM 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に 1～2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 1ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、得られたクローン化株を KM2760#58-35-16 と名付けた。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 の 4μg を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS（インビトロジェン社製）を 10%、HT supplement（インビトロジェン社製）を 1 倍濃度で含む IMDM 培地（インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に 100μl/ウェルずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、IMDM-dFBS(10)（透析 FBS を 10%で含む IMDM 培地）に培地交換し、1～2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に 1～2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nM に上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。尚、実施例 9 に示すα-1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

2. 抗体 CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

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

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05μg/mL、50μl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(γ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

抗体溶液として、それぞれ 50μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50μL/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5% SDS 溶液を 50μL/ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。実施例 8 の 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

3. 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760#58-35-16 を 200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5%の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に 2×10^5 細胞/ml となる様に懸濁し、スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 37℃の恒温室内で Fed-Batch 撹拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A (ミリポア社製) カラム及びゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-1 と名づけた。

(2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を生産する形質転換細胞株 5-03 株を IMDM-dFBS(10) 培地中で、182cm² フラスコ (Greiner 社製) にて 5%CO_2 インキュベーター内で 37℃にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を 35ml 注入した。5%CO_2 インキュベーター内で 37℃にて 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体は KM3060 と名付けた。

KM2760-1 および KM3060 の CCR4 に対する結合活性を ELISA により測定した結果、同等の結合活性を示した。

4. 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

本実施例 1 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4μg を公知の方法［ネイチャー (Nature), 227,680, 1970］に従って SDS-PAGE し、分子量及び製精度を解析した。精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖：約 49Kd、L 鎖：約 23Kd、分子全体：約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告［アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996］と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

5. α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 8 の 3 項 (1) で調製した、YB2/0 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 と、実施例 8 の 3 項 (2) で調製した、CHO/DG44 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060 の糖鎖分析を、実施例 10 の (6) の方法に従って行った。α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、KM2760 は 87%、KM3060 は 8%であった。以下、これらの試料を、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) と抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) を用い、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%):抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)＝1:39、16:67、22:57、32:47、42:37 の割合で混合した。これらの試料を実施例 10 の (6) の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ 9%、18%、27%、39%、46%であった。以下、これらの試料を抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) と表記する。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第16図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2回の結果を平均した値を用いた。

6. CCR4部分ペプチドに対する結合活性の評価（ELISA法）

実施例8の5項で調製したα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる6種類の抗CCR4キメラ抗体のCCR4部分ペプチドに対する結合活性は実施例8の2に記載の方法に従って測定した。

その結果、第17図に示したように、6種類の抗CCR4キメラ抗体は、いずれも同等のCCR4に対する結合活性を示し、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

7. ヒトCCR4高発現細胞株に対するADCC活性の評価

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

(1) 標的細胞溶液の調製

WO01/64754に記載のヒトCCR4を発現しているCCR4/EL-4細胞の1.5×10^6細胞を調製し、放射性物質である$Na_2{}^{51}CrO_4$を5.55MBq当量加えて37℃で1時間30分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を7.5mL加え、2×10^5細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(3) ADCC 活性の測定

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

第 18 図および第 19 図には、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の各種濃度（0.001～10μg/mL）における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー（A, B）のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 18 図および第 19 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性はいずれの抗体濃度においてもα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が 0.01μg/ml では、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が２７%、３９%および４６%の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が２０%未満の抗体では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 9. 宿主細胞株におけるα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の転写物の定量

(1) 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（dhfr）を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞およびラットミエローマ YB2/0 細胞より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

CHO/DG44 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、YB2/0 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製)、4mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製) を添加した RPMI1640 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

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

得られた各々の全 RNA3μg に対し、SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。各宿主細胞由来α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8 ともいう)、β-アクチンのクローニングには該反応液の 1 倍濃度液を、競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量には該反応液の 50 倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで-80℃で保管した。

(2) チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得は、以下の手順で行った (第 20 図)。

まず、ヒト FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 121, 626, (1997)] およびブタ FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ケミストリー (J. Biol. Chem.), 271, 27810, (1996)] に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号4および配列番号5に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養2日目のCHO細胞由来cDNAおよびYB2/0細胞由来cDNAを各々1μlを含む25μlの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 4 および配列番号 5)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72℃で10分間加熱する条件で行った。

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片979bpをGENECLEAN Spin Kit (BIO 101社製) を用いて精製し、滅菌水10μlで溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 4μl を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 (配列番号6および7に示す) のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHFUT8-pCR2.1 および YBFUT8-pCR2.1 と称す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(3) チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン cDNA の取得

チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンの取得は、以下の手順で行った（第 21 図）。

まず、チャイニーズハムスターβ-アクチンゲノム配列（GenBank, U20114）およびラットβ-アクチンゲノム配列［ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 11, 1759 (1983)］より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー（配列番号 8 に示す）および翻訳終止コドンを含む各配列特異的なリバースプライマー（配列番号 9 および配列番号 10 に示す）を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ KOD（東洋紡績社製）を用いて、本項（1）で調製した培養 2 日目の CHO 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA 1μl を含む 25μl の反応液［KOD buffer #1（東洋紡績社製）、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l $MgCl_2$、0.4μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 8 および 9、または配列番号 8 および 10）、5% DMSO］を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 4 分間の加熱の後、98℃で 15 秒間、65℃で 2 秒間、74℃で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1128bp を精製した。この DNA 断片に対し、MEGALABEL（宝酒造社製）を用いて、添付の説明書に従い DNA5' 末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 10μl に溶解した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) 3μg（Strategene 社製）を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、16 単位の制限酵素 EcoRV（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5μl を添加して 65℃で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 100μl に溶解した。

上記で得たチャイニーズハムスターcDNA 由来増幅断片およびラット cDNA 由来増幅断片（1192bp）4μl、プラスミド pBluescriptII KS(+)由来の EcoRV-EcoRV 断片（約 3.0Kb）1μl、Ligation High（東洋紡績社製）5μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン各 cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHAc-pBS および YBAc-pBS と称す。

(4) FUT8 スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内の FUT8 遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。FUT8 定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHFT8-pCR2.1 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8-pCR2.1 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 各 cDNA 部分断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 1Kb) がプラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、1μg/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 0.02fg/μl、0.2fg/μl、1fg/μl、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

2fg/μl、10fg/μl、20fg/μl、100fg/μl の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードとした。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールの調製は次のように行った（第 22 図)。DNA ポリメラーゼ KOD（東洋紡績社製）を用いて、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 5ng を含む 25μl の反応液 [KOD buffer #1（東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l $MgCl_2$、0.4μmol/l 遺伝子特異的プライマー（配列番号 11 および 12)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 4 分間の加熱の後、98℃で 15 秒間、65℃で 2 秒間、74℃で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 4.7Kb を精製した。該 DNA 断片に対し、MEGALABEL（宝酒造社製）を用いて、添付の説明書に従い DNA5'末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 50μl に溶解した。上記で得た DNA 断片（約 4.7Kb）5μl および Ligation High（東洋紡績社製）5μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製）および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製）を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列 ScaI-HindIII 間 203bp が欠失したことを確認した。得られた各プラスミドを CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 と称す。

次にプラスミド CHFT8d-pCR2.1 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製）40μl に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8d-pCR2.1 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製）40μl に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 部分断片の内部塩基配列 203bp が欠失した断片を含む EcoRI-EcoRI 断片（約 800bp）がプラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 より分離されたことを確認した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

各反応液より、1μg/ml パン酵母由来 t-RNA（SIGMA 社製）を用いて 2fg/μl の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールとした。

(5) β-アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内のβ-アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項（3）で得たチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+)に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。β-アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBAc-pBS のうち、チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAcd-pBS および YBAcd-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 20 単位の PstI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAc-pBS 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 24 単位の KpnI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片（約 1.2Kb）がプラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、1μg/ml パン酵母由来 t-RNA（SIGMA 社製）を用いて 2pg/μl、1pg/μl、200fg/μl、100fg/μl、20fg/μl の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンのスタンダードとした。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

チャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った（第 23 図）。CHAc-pBS 2μg を 100ng/μl BSA (New England Biolabs 社製）を含む NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製) 100μl に溶解し、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs) を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った後、反応液を 2 等分した。まず一方の反応液には、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5μl を添加し、65℃で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。残る他方の反応液は 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスターβ-アクチン ORF 部分断片を含む約 1.1Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化 DraIII-DraIII 断片 0.5μl、約 1.1Kb の DraIII-DraIII 断片 4.5μl、Ligation High（東洋紡績社製）5μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターβ-アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したことを確認した。本プラスミドを CHAcd-pBS と称す。

また、ラットβ-アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したプラスミドを CHAcd-pBS と同様の工程を経て作製した。本プラスミドを YBAcd-pBS と称す。

次にプラスミド CHAcd-pBS 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 20 単位の PstI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAcd-pBS 2μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40μl に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 24 単位の KpnI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 3 時間

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン各 cDNA ORF 全長の内部塩基配列 180bp が欠失した断片を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片（約 1.0Kb）がプラスミド CHAcd-pBS および YBAcd-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、1μg/ml パン酵母由来 t-RNA（SIGMA 社製）を用いて 200fg/μl の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンの内部コントロールとした。

(6) 競合的 PCR による転写量の定量

本項（4）で作製した FUT8 内部コントロール DNA および本項（1）で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として競合的 PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の FUT8 の転写産物の定量値を算出した。一方、β-アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、β-アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、本項（5）で作製したβ-アクチン内部コントロール DNA および本項（1）で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内のβ-アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

FUT8 の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 ORF 部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット（配列番号 13 および 14 に示す）を設計した。

次に、本項（1）で得た各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5μl および内部コントロール用プラスミド 5μl（10fg）を含む総体積 20μl の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 13 および 14）、5%DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項（4）で得た FUT8 スタンダードプラスミド 5μl（0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg）を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。

β-アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項（3）で得たチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン ORF 全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット（前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す）をそれぞれ設計した。

次に、本項（1）で得られた各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5μl および内部コントロール用プラスミド 5μl（1pg）を含む総体積 20μl の反応液 [ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー(配列番号 15 および配列番号 16、または配列番号 17 および配列番号 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、65℃で 1 分間、72℃で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項（5）で得たβ-アクチンスタンダードプラスミド 5μl（10pg、5pg、1pg、500fg、100fg）を添加した系で PCR をそれぞれ行い、β-アクチン転写量の検量線作製に用いた。

第 3 表

ターゲット遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ（bp） ターゲット	コンペティター
FUT8	F：5’ -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3’ R：5’ -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3’	638	431
β-actin（チャイニーズハムスター）	F：5’ -GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3’ R：5’ -CAGGAAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3’	789	609
β-actin（ラット）	F：5’ -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3’ R：5’ -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3’	789	609

*F：フォワードプライマー、R：リバースプライマー

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7μlを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメージャー(FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を第24図に示した。培養期間を通じてCHO細胞株はYB2/0細胞株の10倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第4表にβ-アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じてYB2/0細胞株のFUT8転写量がβ-アクチンの0.1%前後であるのに対し、CHO細胞株は0.5%～2%であった。

以上の結果より、YB2/0細胞株のFUT8転写産物量はCHO細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第4表

	培養日数				
細胞株	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

実施例 10. 抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞株における α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子の転写物の定量

(1) 各種生産細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞 DCHI01-20 株および 61-33 株より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。DCHI01-20 株は、実施例 1 第 2 項 (2) 記載の CHO/DG44 細胞由来の形質転換クローンである。また 61-33 株は、YB2/0 由来の形質転換細胞 7-9-51 株（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、FERM BP-6691）に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

DCHI01-20 株を 3mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies 社製) および 0.5%脂肪酸濃縮液 (Life Technologies 社製) を添加した EXCELL302 培地 (JRH BIOSCIENCES 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、61-33 株を 0.2% ウシ血清アルブミンフラクション V (Life Technologie 社製) (以下、BSA と略記する) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

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

得られた全 RNA 3μg に対し、SUPERSCRIPT™Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、使用するまで-80℃で保管した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(2) 競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量

本項 (1) で得た抗体生産細胞株由来 cDNA に対し、実施例 9 (6) に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (4) で調製した CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

本項 (1) で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5μl および内部コントロール用プラスミド 5μl (10fg) を含む総体積 20μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5μl (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1μg/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、β-アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、β-アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

β-アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (3) で調製したチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチン

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

のcDNAのORF全長をpBluescriptII KS(+)に組み込んだプラスミドであるCHAc-pBSおよびYBAc-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

β-アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例9(5)で調製した、CHAc-pBSおよびYBAc-pBSのうちチャイニーズハムスターβ-アクチンおよびラットβ-アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られたCHAcd-pBSおよびYBAcd-pBSを、制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

上記で得た各生産細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液5μlおよび内部コントロール用プラスミド5μl(1pg)を含む総体積20μlの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/lβ-アクチン特異的プライマー(配列番号17および18)、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来cDNAに代えて、β-アクチンスタンダードプラスミド10pg、5pg、1pg、500fg、100fgを添加した系でPCRをそれぞれ行い、β-アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1μg/mlパン酵母由来t-RNA(SIGMA社製)を用いた。

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7μlを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain(Molecular Probes社製)に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメージャー(FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 5 表にβ-アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0 細胞由来抗体生産株 61-33 の FUT8 転写量がβ-アクチンの 0.3%以下であるのに対し、CHO 細胞由来抗体生産株 DCHI01-20 は 0.7～1.5%であった。この結果より、YB2/0 細胞由来抗体生産株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 5 表

	培養日数				
細胞株	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

実施例 11. マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子過剰発現株の作製

(1) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）発現プラスミドの構築

10%ウシ胎児血清（Life Technologie 社製）を含む IMDM 培地（Life Technologie 社製）で継代培養したマウスミエローマ NSO 細胞（理化学研究所セルバンク，RCB0213）1×10^7 個に対し、RNAeasy（QIAGEN 社製）を用いて添付の説明書に従い全 RNA を抽出した。全 RNA を 45μl の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製）1μl、付属の 10×DNase buffer 5μl、RNasin Ribonuclease inhibitor（Promega 社製）0.5μl を添加して、37℃で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy（QIAGEN 社製）により全 RNA を再精製し、50μl の滅菌水に溶解した。得られた全 RNA のうち 3μg に対し、SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（dT）をプライマーとした 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

マウス FUT8 cDNA の取得は以下の手順で行った（第 25 図）。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列（GenBank, AB025198）より、翻訳開始コドンを含む配列に特異的なフォワードプライマー（配列番号 19 に示す）および翻訳終止コドンを含む配列特異的なリバースプライマー（配列番号 20 に示す）を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、前述の NSO 細胞由来 cDNA 1 μl を含む 25μl の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、4% DMSO、0.5μmol/l 上記特異的プライマー（配列番号 19 および配列番号 20)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1728bp を精製した。この DNA 断片 4μl を、TOPO TA cloning Kit（Invitrogen 社製）の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377（Parkin Elmer 社製）および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製）を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、マウス FUT8 の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した（その DNA 配列を配列番号 2 に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号 24 に示す)。尚、本配列には、前述の GenBank 上に登録されたマウス FUT8 配列とはアミノ酸置換を伴う 3 塩基の不一致があった。以下、本プラスミドを mfFUT8-pCR2.1 と称す。

続いて、マウス FUT8 ORF 全長配列を含むプラスミド pBSmfFUT8 の構築を以下のように行った（第 26 図)。まず、プラスミド pBluescriptII KS(+) 1μg を (Strategene 社製）を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5μl を添加して 65℃で 30 分間反応させることにより、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水10μlに溶解した。

一方、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 1μg を（Strategene 社製）を NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRI-EcoRI 断片（2.9Kb）1μl、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 由来の EcoRI-EcoRI 断片（1.7Kb） 4μl、Ligation High（東洋紡績社製）5μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pBSmfFUT8 と称す。

上記 pBSmfFUT8 および pAGE249 を用いて、マウス FUT8 発現ベクターpAGEmfFUT8 の構築を以下の手順で行った（第 27 図）。pAGE249 は、pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.), 269, 14730 (1994)] の誘導体であり、pAGE248 よりジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（dhfr）発現ユニットを含む SphI-SphI 断片（2.7Kb）を除去したベクターである。

pAGE249 1μg を Universel BufferH（宝酒造社製）50μl に溶解し、20 単位の制限酵素 SalI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35μl および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5μl を添加して 65℃で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10μl に溶解した。

一方、pBSmfFUT8 1μg を Universel Buffer H（宝酒造社製）50μl に溶解し、20 単位の制限酵素 SalI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pAGE249 由来の BamHI-SalI 断片 (6.5Kb) 1μl、プラスミド pBSmfFUT8 由来の BamHI-SalI 断片 (1.7Kb) 4μl、Ligation High (東洋紡績社製) 5μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pAGEmfFUT8 と称す。

(2) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

本項 (1) で構築したマウス FUT8 発現ベクターpAGEmfFUT8 を 61-33 株へ導入し、FUT8 遺伝子の安定的発現株を取得した。上記 61-33 株は、抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体を高生産する YB2/0 細胞由来の形質転換細胞 7-9-51 株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター, FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

プラスミド pAGEmfFUT8 の 61-33 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pAGEmfFUT8 30μg を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 600μl に溶解し、100 単位の制限酵素 FspI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しエタノール沈殿法を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。次に、61-33 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$) に懸濁して 2×10^7 個/ml とし、細胞懸濁液 200μl (4×10^6 個) を上記線状化プラスミド 10μl (10μg) と混和した。細胞-DNA 混和液を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移した後、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 0.2KV、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を 5%ウシ胎児透析血清 (Life

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Technologie 社製）および 0.2％ BSA（Life Technologie 社製）を添加した Hybridoma-SFM 培地（Life Technologie 社製）10ml に混和し、浮遊細胞用 96 穴プレート（Greiner 社製）に 100μl ずつ分注した。5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清 50μl を除去し、0.5mg/ml Hygromycin B（和光純薬工業社製）、5％ ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）および 0.2％BSA（Life Technologie 社製）を添加した Hybridoma-SFM 培地（Life Technologie 社製）を 100μl ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性を示す 14 株を取得した。

一方、pAGEmfFUT8 の母骨格ベクターであるプラスミド pAGE249 を 61-33 株へ導入することにより、ネガティブコントロール株を作製した。上述の手順で、制限酵素 FspI により線状化したプラスミド pAGE249 10μg をエレクトロポレーション法を用いて 61-33 株 4×10^6cells へ遺伝子導入した。該細胞を 5％ ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）および 0.2％ BSA（Life Technologie 社製）を添加した Hybridoma-SFM 培地（Life Technologie 社製）15ml に混和した後、浮遊細胞用 T75 フラスコ（Greiner 社製）に移し入れ、5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した。培養後、800rpm で 4 分間の遠心分離を行い、上清の半量（7.5ml）を除去した後、0.5mg/ml Hygromycin B（和光純薬工業社製）、5％ ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）および 0.2％BSA（Life Technologie 社製）を添加した Hybridoma-SFM 培地（Life Technologie 社製）7.5ml を添加して懸濁し、浮遊細胞用 T75 フラスコ（Greiner 社製）に移し入れた。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性株を取得した。

(3) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子過剰発現株における該遺伝子発現量の解析

本項（2）で作製した 61-33 株由来マウス FUT8 過剰発現株 14 株より任意に選択した 6 株およびネガティブコントロール株に対し、競合的 RT-PCR を用いて FUT8 発現量の比較を行った。

上記過剰発現株を 0.5mg/ml Hygromycin B（和光純薬工業社製）、5％ ウシ胎児透析血清（Life Technologie 社製）および 0.2%BSA（Life Technologie 社製）を添加

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

したHybridoma-SFM培地（Life Technologie社製）に懸濁し、3×10^5個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ（Greiner社製）に15ml播種した。37℃、5%CO_2の条件下で24時間培養した後、生細胞1×10^7個を回収し、RNAeasy（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い全RNAを抽出した。全RNAを45μlの滅菌水に溶解し、RQ1 Rnase-Free DNase（Promega社製）0.5U/μl、付属の10×DNase buffer 5μl、RNasin Ribonuclease inhibitor（Promega社製）0.5μlを添加して37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy（QIAGEN社製）により全RNAを再精製し、50μlの滅菌水に溶解した。

得られた全RNA2.5μgに対し、SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis（Life Technologies社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（dT）をプライマーとした20μlの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。該反応液を水で50倍希釈し、実施例9（6）に準じて競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量に供した。

各発現株内のFUT8遺伝子由来のmRNA転写量の定量は、以下の手順で行った。FUT8転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例9（2）で調製したラットFUT8のcDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

FUT8定量の内部コントロールとしては、実施例9（4）で調製したYBFT8-pCR2.1のうち、ラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

上記で得た各発現株由来のcDNA溶液の50倍希釈液5μlおよび内部コントロール用プラスミド5μl（10fg）を含む総体積20μlの反応液［ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/lラットFUT8遺伝子特異的プライマー（配列番号13および14）、5% DMSO］で、DNAポリメラーゼExTaq（宝酒造社製）を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

また、各発現株由来cDNAに代えて、FUT8スタンダードプラスミド5μl（0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg）を添加した系でPCRを行い、FUT8転写

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1μg/ml パン酵母由来 t-RNA（SIGMA 社製）を用いた。

一方、β-アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各発現株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、β-アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

β-アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9（3）で調製したラットβ-アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである YBAc-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

β-アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 9（5）で調製した YBAc-pBS のうちラットβ-アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた YBAcd-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各発現株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5μl および内部コントロール用プラスミド 5μl（1pg）を含む総体積 20μl の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l ラットβ-アクチン特異的プライマー（配列番号 17 および 18）、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、65℃で 1 分間、72℃で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各発現株由来 cDNA に代えて、β-アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、β-アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1μg/ml パン酵母由来 t-RNA（SIGMA 社製）を用いた。

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7μl を 1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメージャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 28 図にβ-アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株および pAGE249 導入株は、FUT8 転写量がβ-アクチン転写量の 0.3～10%であり、FUT8 転写量が比較的低い株であった。一方、mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、FUT8 転写量がβ-アクチン転写量の 20～40%であり、FUT8 発現量が比較的高い株であった。

(4) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の精製

本項 (2) で得た FUT8 遺伝子過剰発現株 6 株およびネガティブコントロール株 1 株を、200nmol/l MTX、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T225 フラスコ (IWAKI 社製) 3 本に計 100ml 各々播種した。これらを 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で 7～9 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティーが同程度 (各々30%以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、4℃の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4℃の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、0.22μm 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清 各 100ml をカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

0.15mol/l NaCl 緩衝液（pH8.6）50ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液（pH3.0）2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を 500μl ずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl（pH8.5）100μl と混合して中和した。BCA 法［アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.），150，76（1985）］を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分（計 1.2ml）を選択して合一し、10mol/l クエン酸緩衝液（pH6.0）を用いて 4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22μm 孔径 Millex GV（MILLIPORE 社製）を用いて滅菌濾過した。

(5) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子過剰発現株が産生する抗体の in vitro 細胞傷害活性（ADCC 活性）

本項（4）で精製した抗 GD3 抗体の in vitro 細胞傷害活性を評価するため、GD3 陽性細胞であるヒトメラノーマ培養細胞株 G-361［理化学研究所セルバンク，RCB0991］を用いて ADCC 活性を測定した。

10％ ウシ胎児血清（Life Technologie 社製）を含む RPMI1640 培地（Life Technologie 社製）（以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する）で継代培養した G-361 細胞 1×10^6 個を RPMI1640-FBS(10) 500μl に懸濁し、$Na_2{}^{51}CrO_4$ 3.7MBq を添加して 37℃で 30 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、2×10^5 個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健常人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水（大塚製薬社製）30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep（NYCOMED PHARMA AS 社製） 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2×10^6 個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

96 穴U字底プレート（Falcon 社製）の各穴に標的細胞懸濁液を 50μl ずつ（1×10^4 個/穴）分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を 100μl ずつ（2×10^5 個/穴）分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 20:1 とした。次に 10M クエン酸緩衝液（pH6.0）を用いて、本項（4）で得た各種抗 GD3 抗体より 0.01μg/ml、0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/ml の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに 50μl 添加することにより、終濃度 0.0025μg/ml、0.025μg/ml、0.25μg/ml、2.5μg/ml とした。5%CO_2、37℃の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分の遠心分離を行った。各穴の上清 50μl を 12mm 径 RIA チューブ（IWAKI 社製）に分取し、MINAX-γオートガンマーカウンター5550（PACKRD 社製）を用いて解離 ^{51}Cr 量の測定を行った。

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

第 29 図に各種抗 GD3 抗体の G-361 細胞に対する ADCC 活性を示した。第 28 図において FUT8 発現量が低かった mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株は、ネガティブコントロールである pAGE249 株導入株と同等の高い ADCC 活性を示した。一方、第 28 図において FUT8 発現量が高かった mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、CHO 細胞より取得した抗 GD3 抗体と同等の低い ADCC 活性を示した。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 発現量を調節することにより、産生抗体の ADCC 活性を調節し得ることが示された。

(6) マウスα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子過剰発現株が産生する抗体の糖鎖解析

本項（4）で精製した抗 GD3 抗体の糖鎖解析を行った。mfFUT8-6、pAGE249 株導入株が産生する抗体のヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した［メソッド・オブ・エンザイモロジー（Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。減圧留去

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J.Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った (第 30 図)。ピーク面積から計算すると、mfFUT8-6 のα-1,6-フコースのない糖鎖含量は 10%、α-1,6-フコース結合糖鎖含量は 90%であった。pAGE249 のα-1,6-フコースのない糖鎖含量は 20%、α-1,6-フコース結合糖鎖含量は 80%であった。以上の結果から、FUT8 遺伝子を過剰発現させることにより、産生抗体のα-1,6-フコース結合糖鎖含量が増加することがわかった。

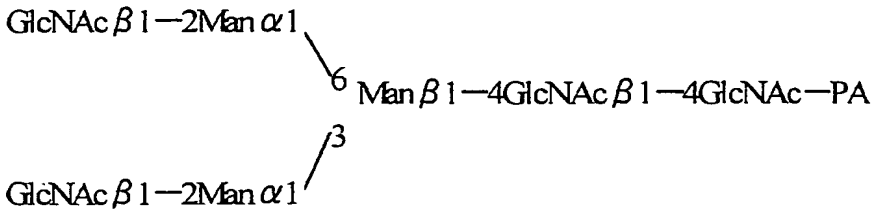
第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。第 30A 図に mfFUT8-6、第 30B 図に pAGE249 の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5%1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

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

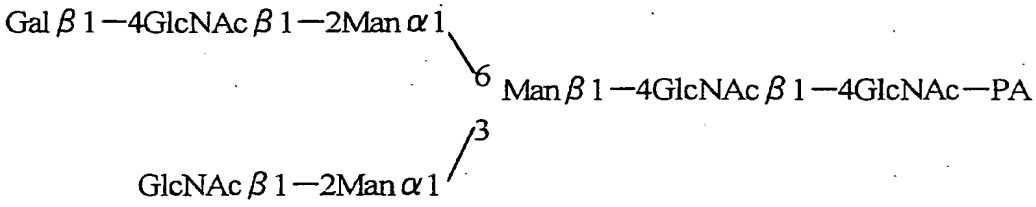
第 30 図と第 31 図で示した (i)～(ix) のピークは、以下の構造を示す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

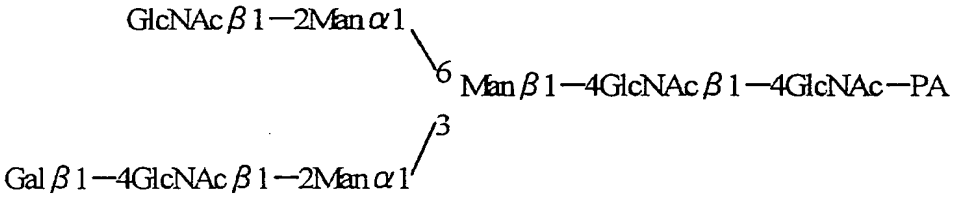
(i)



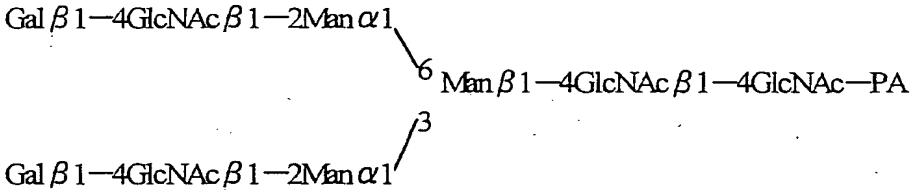
(ii)



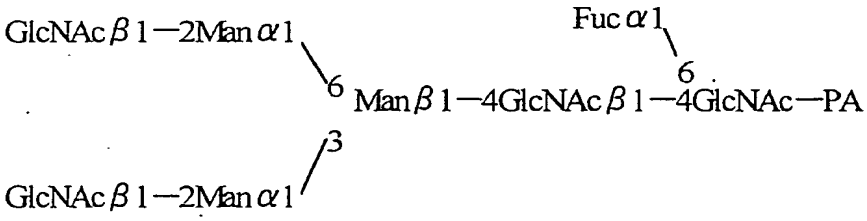
(iii)



(iv)

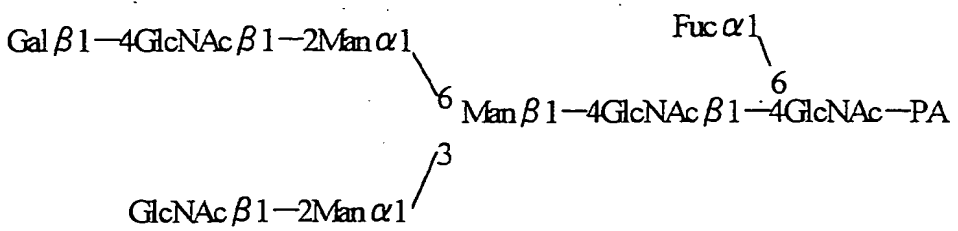


(v)

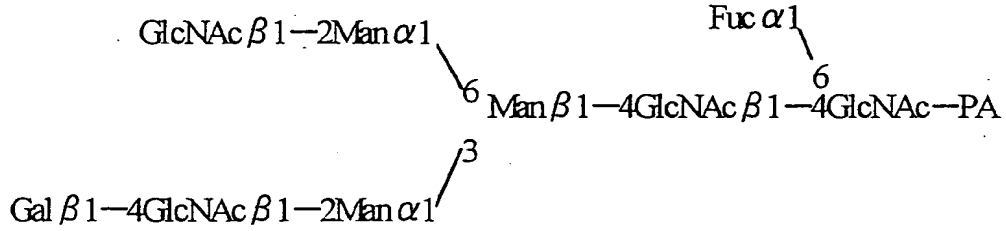


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

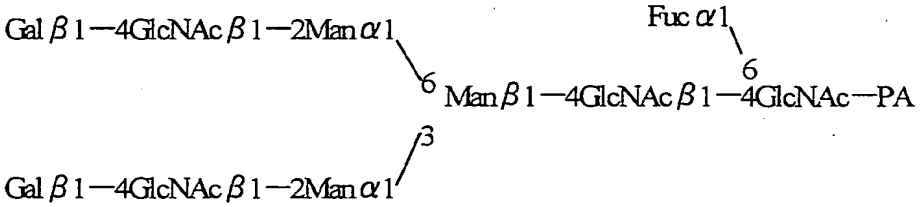
(vi)



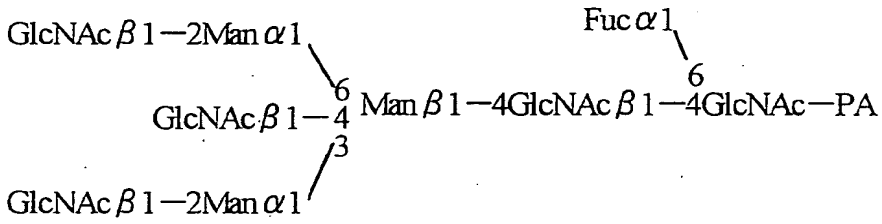
(vii)



(viii)



(ix)



GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。第 30 図と第 31 図において、α-1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)～(ix) のうち (i)～(iv)のピークが占める面積、α-1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)～(ix)のうち (v)～(ix) のピークが占める面積から算出した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

実施例 12. CHO 細胞α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子の取得

(1) CHO 細胞α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）cDNA 配列の取得

実施例 9 (1) において培養 2 日目の CHO/DG44 細胞より調製した一本鎖 cDNA より、以下の手順でチャイニーズハムスターFUT8 cDNA を取得した（第 32 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列（GenBank, AB025198）より、5'側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー（配列番号 21 に示す）および 3'側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー（配列番号 22 に示す)を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、前述の CHO/DG44 細胞由来 cDNA 1μl を含む 25μl の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4%DMSO、0.5μmol/l 上記特異的プライマー（配列番号 21 および配列番号 22)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 2Kb を精製した。この DNA 断片 4μl を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製）の説明書に従ってプラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 8 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製）および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製）を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入 cDNA が、CHO 細胞 FUT8 の ORF 全長を含む配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを CHfFUT8-pCR2.1 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号 23 に示した。

(2) CHO 細胞α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）ゲノム配列の取得

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

実施例 13. α-1,6-フコース転移酵素遺伝子を破壊した CHO 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

CHO 細胞α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を欠失した CHO 細胞を作製し、該細胞が生産する抗体の ADCC 活性を評価した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

1. チャイニーズハムスターα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子エクソン2ターゲティングベクタープラスミドpKOFUT8Puroの構築

(1) プラスミドploxPPuroの構築

以下の手順でプラスミドploxPPuroを構築した（第33図）。

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

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

上記で得たプラスミド pKOSelectPuro 由来の AscI-AscI 断片（約 1.5Kb）4.5μl、プラスミド ploxP 由来の AscI-AscI 断片（約 2.0Kb）0.5μl、Ligation High（東洋紡社製）5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuroと称す。

(2) プラスミドpKOFUT8gE2-1の構築

実施例12（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-2 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-1 を構築した（第34図）。

プラスミド pFUT8fgE2-2 2.0μg を、100μg/ml BSA（New England Biolabs 社製）を含む NEBuffer 1（New England Biolabs 社製）35μl に溶解し、制限酵素 SacI（New England Biolabs 社製）20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA（New England Biolabs 社製）を含む NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）35μl に溶

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

解し、20単位の制限酵素EcoRV（New England Biolabs社製）を加えて37℃で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約1.5KbのDNA断片を精製した。

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

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

(3) プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築

本項（2）で得たプラスミドpKOFUT8gE2-1を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-2を構築した（第35図）。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

一方、プラスミド ploxPPuro 1.0μg を、NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、制限酵素 HpaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100μg/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30μl に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

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

(4) プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pscFUT8gE2-3 を構築した (第 36 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0μg を NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HpaII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、Blunting High (東洋紡社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行って DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS39 (New England Biolabs 社製) 1.0μg を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

(5) プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築

実施例 12（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-3 を構築した（第 37 図）。

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

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+)（Strategene 社製）1.0μg を NEBuffer for EcoRI（New England Biolabs 社製）35μl に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI（New England Biolabs 社製）および 20 単位の制限酵素 HindIII（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HindIII-EcoRI 断片（約 1.8Kb）4.0μl、プラスミド pBluescriptII KS(+)由来の HindIII-EcoRI 断片（約 3.0Kb）1.0μl、Ligation High（東洋紡社製）5.0μl を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアン

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3と称す。

(6) プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築

本項(4)および(5)で得たプラスミドpscFUT8gE2-3およびpKOFUT8gE2-3を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-4を構築した(第38図)。

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(7) プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築

本項 (3) および (6) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 および pKOFUT8gE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-5 を構築した (第 39 図)。

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

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

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.0Kb) 0.5μl、プラスミド pKOFUT8gE2-4 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.4Kb) 4.5μl、Ligation High (東洋紡社製) 5.0μl を混合し、16℃で 15 時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5 と称す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(8) プラスミド pKOFUT8Puro の構築

本項 (7) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-5 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8Puro を構築した (第 40 図)。

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

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

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

2. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を 1 コピー破壊した CHO 細胞の作製

(1) ターゲティングベクターの導入

本実施例第 1 項で構築したチャイニーズハムスターFUT8 ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Puro を実施例 8 の 1(2) で作製した 5-03 株へ導入した。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

った。まず、プラスミド pKOFUT8Puro 150μg を NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 1.8ml に溶解し、600 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1μg/μl 水溶液とした。一方、5-03 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$) に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) を上記線状化プラスミド 4μl (4μg) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。同様にしてキュベット 30 本分に対し遺伝子導入した後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 30 枚へ播種した。5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、15μg/mlPuromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3～4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性株を取得した。

(2) ターゲティングベクター導入株の取得

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

(3) ゲノム PCR による相同組換えの診断

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

まず、本項（2）で作製したレプリカプレートより公知の方法［アナリティカル・バイオケミストリー（Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)］に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々TE-RNase 緩衝液（pH8.0）（10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A）30μl に一晩溶解した。また、実施例 12. で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 26 に示す）およびベクター内の loxP 配列に結合するプライマー（配列番号 27 に示す）を設計した。

DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々10μl 含む 25μl の反応液［ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 26 および配列番号 27)］を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした 38 サイクルの条件で行った。

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(4) ゲノムサザンブロットによる相同組換えの診断

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

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

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

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、実施例 12 で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 28 および配列番号 29) を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 12 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 28 および配列番号 29)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、[α-^{32}P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

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

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

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

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

3. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子を 1 コピー破壊した CHO 細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

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

プラスミド pBS185 の 1st.△FUT8 2-46 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、1st.△FUT8 2-46 株を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO4、1.5mmol/l KH_2PO_4、4.0mmol/l $MgCl_2$] に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200μl (1.6×10^6 個) をプラスミド pBS185 4μg と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250μF の条件で遺伝子導入を行った。導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) 10ml に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%CO_2、37℃の条件下で 24 時間培養した。培養後、上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3〜4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行った。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項 (1) で得た株より任意の 400 個のコロニーを以下の手順で採取した。

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

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

次に、レプリカプレートを 15μg/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 6 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

たピューロマイシン耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、ピューロマイシン存在下で死滅する。 本選択法により 91 個の陽性クローンを見出した。

(3) ゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

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

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

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

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、実施例 12 で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 30 および配列番号 31) を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 12 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 30 および配列番号 31)]

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5μl に対し、[α-^{32}P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製）を用いて放射線標識した。

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

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

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 19.0Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 12.5Kb の DNA 断片が生じる。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からピューロマイシン耐性遺伝子（約 1.5Kb）が除去された場合には、同処理により約 11.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、上記 6 クローンのうち 5 クローンのゲノム DNA より上記約 19.0Kb および約 11.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1：1 であったことから、FUT8 ゲノム領域を 1 コピー破壊した株よりピューロマイシン耐性遺伝子が除去されたことが示された。本クローンを以下、1st.△FUT8 2-46-1 株と称す。尚、上述の 1st.△FUT8 2-46-1 株、1st.△FUT8 2-46 株、及び、5-03 株のゲノムサザンの結果を第 41 図に示した。なお 1st.△FUT8 2-46-1 株は 2-46-1 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7755 として寄託されている。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

4. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子破壊株が産生する抗体の精製

本実施例第3項で得たFUT8対立遺伝子を1コピー破壊した株1st.△FUT8 2-46-1株を、3×10^5個/mlの密度で15μg/ml Puromycin（SIGMA社製）および10%ウシ胎児透析血清（Life Technologie社製）を添加したIMDM培地（Life Technologies社製）へ懸濁後、接着細胞培養用T182フラスコ（Greiner社製）2本に計60ml各々播種した。3日間の培養後、上清を除去し、EXCELL301培地（JRH Biosciences社製）計60mlへ交換した。

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

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

5. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子破壊株が産生する抗体のin vitro細胞傷害活性（ADCC活性）

本実施例第4項で精製した抗CCR4抗体のin vitro細胞傷害活性を評価するため、実施例8に記載のCCR4陽性細胞株CCR4/EL-4を用いたADCC活性を行った。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

一方、健常人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2.5×10^6 個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

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

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10) 150 μl を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸 100 μl および

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

RPMI1640-FBS(10) 50 μl を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。これらの値を用いて前記式（II）により、ADCC 活性を求めた。

第 42 図に各種抗 CCR4 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊した 1st.△FUT8 2-46-1 株より得た抗体は、該遺伝子破壊前の CHO 細胞 5-03 株が産生する抗体に比べ有意に高い ADCC 活性を示した。また、これら抗体での抗原結合活性には変化は観察されなかった。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 対立遺伝子を破壊することにより、産生抗体の ADCC 活性を向上し得ることが確認された。

実施例 14. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

(1) レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

CHO/DG44 細胞を、IMDM-FBS(10) 培地［ウシ胎児血清（FBS）を 10％、HT supplement（GIBCO BRL 社製）を 1 倍濃度含む IMDM 培地］にて接着培養用フラスコ 75cm^2（グライナー社製）中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5ml のダルベッコ PBS（インビトロジェン社製）にて細胞を洗浄後、ダルベッコ PBS で希釈した 0.05％トリプシン（インビトロジェン社製）を 1.5ml 添加して 37℃にて 5 分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、1×10^5 細胞/ml の密度になるように IMDM-FBS(10) 培地を添加して懸濁後、未添加又は 0.1μg/ml のアルキル化剤である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin（以下、MNNG と表記、Sigma 社製）を添加した。CO_2 インキュベータ（TABAI 製）内で 37℃にて 3 日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10) 培地に懸濁後、接着培養用 96 穴プレート（岩城硝子社製）に 1000 細胞/ウエルの密度で播種した。各ウエルには培地中終濃度で 1mg/ml のレンズマメ凝集素（Lens culinaris agglutinin；以下、LCA と表記、Vector 社製）、あるいは 1mg/ml のヒイロチャワンタケ凝集素（Aleuria aurantia Lectin；以下、AAL と表記、Vector 社製）、あるいは 1mg/ml のインゲンマメ凝集素（Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin；以下、L-PHA と表記、Vector 社製）を添加した。CO_2 インキュベータ内で 37℃にて 2 週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性 CHO/DG44 株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性 CHO/DG44 株については、LCA 耐性株を CHO-LCA 株、AAL 耐性株を CHO-AAL 株、L-PHA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

耐性株を CHO-PHA 株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA 株は AAL に対しても耐性であり、CHO-AAL 株は LCA に対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は、LCA や AAL が認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン残基の 6 位とフコースの 1 位がα結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度 1mg/ml のエンドウマメ凝集素（Pisum sativum Agglutinin；以下、PSA と表記、Vector 社製）が添加された培地でも CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤 MNNG 無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、それら株を解析に用いた。

(2) 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞の作製

上記（1）で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、実施例 8 に記載した方法で、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて行い、CHO-LCA 株、CHO-AAL 株、CHO-PHA 株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-LCA 株、CHO-AAL 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-AAL 株、CHO-PHA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-PHA 株と名付けた。なお CHO/CCR4-LCA 株は Nega-13 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7756 として寄託されている。

(3) レクチン耐性 CHO 細胞による高 ADCC 活性抗体の生産

上記（2）で得られた 3 種類の形質転換株を用い、実施例 8 の 3 に記載した方法で精製抗体を取得した。各抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の抗原結合活性は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例 8 で作製した通常の CHO/DG44 細胞を宿主とした組換え細胞株（5-03 株）が生

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例8の7に記載した方法にしたがって各抗CCR4ヒト型キメラ抗体精製標品のADCC活性を評価した。その結果を図43に示した。5-03株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA株及びCHO/CCR4-AAL株が生産した抗体では、約100倍程度のADCC活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA株が生産した抗体では有意なADCC活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA株とYB2/0株が生産した抗体のADCC活性を実施例8の7に記載した方法にしたがって比較したところ、CHO/CCR4-LCA株が生産した抗体は実施例8の1で作製したYB2/0細胞株が生産した抗体KM2760-1と同様に、5-03株が生産した抗体に比べ高いADCC活性を示すことが明らかとなった（第44図）。

(4) レクチン耐性CHO細胞が生産する抗体の糖鎖解析

上記（3）で精製した抗CCR4ヒト型キメラ抗体の糖鎖解析を行った。精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー0.5-10K（ミリポア社製）を用いて10mM KH_2PO_4に溶液を置換した。置換倍率は80倍以上になるように行なった。置換した抗体は、UV-1600（島津社製）を用いて濃度を測定した。抗体のアミノ酸配列から式（III）[アドバンスズ・イン・プロテインケミストリー（Advances in Protein Chemistry), 12, 303, 1962] を用いてモル吸光定数を算出し、280nmの吸光度1.0を1.38mg/mlとして濃度を決定した。

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

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

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

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

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

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

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

n1: 抗体1分子あたりのトリプトファンの数

n2: 抗体1分子あたりのチロシンの数

n3: 抗体1分子あたりのシスチンの数

MW: 抗体の分子量（g/mol）

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

100μg の抗体をヒドラクラブ S-204 用 Test tube に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させた Test tube をホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110℃、1時間反応させた［メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology),83, 263, 1982］。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。Test tube にホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250μl、無水酢酸を 25μl 入れてよく撹拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent を 250μl、無水酢酸を 25μl 加えてよく撹拌させ、室温で 1 時間反応させた。試料を-80℃のフリーザーで凍結させ、約 17 時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa 社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984］。2-アミノピリジン溶液は 2-アミノピリジン 1g に対し HCl760μl を加え（1×PA 溶液）、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に希釈したものを用いた（10 倍希釈 PA 溶液）。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1×PA 溶液 20μl、逆浸透精製水 430μl を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67μl 入れて 100℃、15 分反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2μl 入れて 90℃、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群（PA 化糖鎖群）を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム（Pharmacia 社製）を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mM 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5ml/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム（Shimadzu 社製、φ6.0nm×150nm）を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55℃、流速は 1ml/ml、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分間溶出した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF-MS 分析）におけるポストソース分解（Post Source Decay）分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった（第 45 図)。糖鎖含量は、逆相 HPLC 分析における各 PA 化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端が N-アセチルグルコサミンでない PA 化糖鎖は、不純物由来であるか、PA 化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。

緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）+ 0.5% 1-ブタノールを用い、実施例 11 の（6）と同様に分析した。

第 45 図において、α-1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)～(viii) のうち (i)～(iv) のピークが占める面積、α-1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)～(viii) のうち (v)～(viii) のピークが占める面積から算出した。

レクチン耐性株が生産する抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の糖鎖構造を分析した結果を第 6 表に示した。ここで、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の糖鎖を分析した結果を示したものである。実施例ｄ（4）に記載した方法で分析しピークの面積から計算した、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合（%）を表に示す。

第 6 表

抗体の生産細胞	α-1,6-フコースを持たない複合二本鎖型糖鎖（%）
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体では、分析ピークの面積から計算すると、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、α-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 27%まで上昇していた。一方、PHA 耐性株では 5-03 株

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

と比較して、糖鎖パターン及びα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

実施例 15. レクチン耐性 CHO 細胞株の解析

1. 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における GMD 酵素の発現量解析

実施例 14 で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における、フコース生合成酵素として知られる GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)、GFPP (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase)、FX (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)、及びフコース転移酵素である FUT8 (α-1,6-fucosyltransferase) の各遺伝子の発現量を、RT-PCR 法を用いて解析した。

(1) 各種細胞株からの RNA 調製

CHO/DG44 細胞、実施例 8 の 1(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 5-03、実施例 14(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA をそれぞれ 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内にて継代後 4 日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各 1×10^7 細胞より添付の使用説明書に従って RNA を調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL 社製) を用い、添付の使用説明書に従って各 RNA5μg より 20μl の反応液中にて一本鎖 cDNA を合成した。

(2) RT-PCR 法を用いた GMD 遺伝子の発現量解析

GMD cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 17 の 1 で示す CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 32 で示される塩基配列を有する 24mer の合成 DNA プライマーと配列番号 33 で示される塩基配列を有する 26mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 32 と 33 の合成 DNA プライマ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10μl をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 350bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(3) RT-PCR 法を用いた GFPP 遺伝子の発現量解析

GFPP cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 2 で取得した CHO 細胞由来 GFPP の cDNA 配列に基づいて、配列番号 34 で示される塩基配列を有する 27mer の合成 DNA プライマーと配列番号 35 で示される塩基配列を有する 23mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項（1）で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μM の配列番号 34 と 35 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 24 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10μl をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(4) RT-PCR 法を用いた FX 遺伝子の発現量解析

FX cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 1 で取得した CHO 細胞由来 FX の cDNA 配列に基づいて、配列番号 36 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーと配列番号 37 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項（1）で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μM の配列番号 36 と 37 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10μl をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 300bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(5) RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項（1）で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer（宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 13 と 14 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10μl をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(6) RT-PCR 法を用いたβ-アクチン遺伝子の発現量解析

β-アクチン cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項（1）で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer（宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 15 と 16 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 14 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10μl をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 800bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(7) 各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 遺伝子の発現量

本項 (2) から (6) で測定した各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値を、各細胞株におけるβ-アクチンの cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値で割り、CHO/DG44 細胞における PCR 増幅断片量を 1 とした場合の 5-03 株及び CHO/CCR4-LCA 株における各遺伝子の PCR 増幅断片量を求めた。結果を第 7 表に示す。

第 7 表

	GMD	GEPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞 CHO/CCR4-LCA	0.160	0.886	0.920	0.875

第 7 表で示したように CHO/CCR4-LCA 株の GMD 遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ 1/10 程度に低下していた。なお、本実験は独立して 2 回行い、その平均値を使用した。

2. GMD 遺伝子を強制発現させた抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA を用いた解析

(1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクターpAGE249GMD の構築

実施例 17 の 1 で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 38 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、及び配列番号 39 で示される塩基配列を有する 29mer のプライマーを作製した。続いて、本実施例 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来 GMD 一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 38 と 39 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラ

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

—480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後94℃にて1分間、58℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを8サイクル反復した後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約600bpのDNA断片をGene Clean II kit（BIO101社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue(R)ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドmt-Cを得た（第46図参照）。

次に、実施例17の1で取得したCHO細胞由来GMDのcDNA配列に基づいて、配列番号40で示される塩基配列を有する45merのプライマー、及び配列番号41で示される塩基配列を有する31merのプライマーを作製した。続いて、本実施例1項(1)で作製したCHO細胞由来GMD一本鎖cDNA 0.5μlを鋳型として含む20μlの反応液[1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μMの配列番号40と41の合成DNAプライマー]を調製し、DNAサーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後94℃にて1分間、57℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを8サイクル反復した後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを22サイクル反復した。反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約150pのDNA断片をGene Clean II kit（BIO101社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue(R)ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドATGを得た（第47図参照）。

次に、実施例17の1で作製した3μgのプラスミドCHO-GMDを制限酵素SacI（宝酒造社製）で37℃にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約900bpのDNA断片をGene Clean II kit（BIO101社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。1.4μgのプラスミドmt-Cを制限酵素SacI（宝酒造社製）で37℃にて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なってDNAを回収し、制限酵素EcoRI（宝酒造社

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3.1kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) を得た（第 48 図参照)。

次に、2μg のプラスミド WT-N(-) を制限酵素 BamHI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。3μg のプラスミド pBluescriptSK(-)（Stratagene 社製）を制限酵素 BamHI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) in pBS を得た（第 49 図参照)。

次に、2μg のプラスミド WT-N(-) in pBS を制限酵素 HindIII（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。2μg のプラスミド ATG を制限酵素 HindIII（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean IIkit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、プラスミド WT in pBS を得た（第 50 図参照)。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

次に、2μg のプラスミド pAGE249 を制限酵素 HindIII と BamHI（共に宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 6.5kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。2μg のプラスミド WT in pBS を制限酵素 HindIII と BamHI（共に宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1.2kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株を形質転換し、プラスミド pAGE249GMD を得た（第 51 図参照）。

(2) CHO/CCR4-LCA における GMD 遺伝子の安定発現

制限酵素 EspI（NEW ENGLAND BIOLABS 社製）で切断することにより直鎖状とした CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクターpAGE249GMD を 5μg、1.6×10^6 細胞の CHO/CCR4-LCA 株へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Cytotechnology），3，133（1990）］により導入後、MTX（SIGMA 社製）を 200nM の濃度で含む 30ml の IMDM-dFBS(10) 培地を 10%含む IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）］に懸濁し、182cm^2 フラスコ（Greiner 社製）にて 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml、MTX（SIGMA 社製）を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に培地交換してさらに 19 日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

また同様に、pAGE249 ベクターを上記と同じ方法で CHO/CCR4-LCA 株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

(3) GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の培養及び抗体の精製

本項（2）で取得した GMD を発現している形質転換細胞群を MTX（SUGMA 社製）を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地を用いて、182cm^2 フラスコ（Greiner 社製）にて 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファー（GIBCO BRL 社製）にて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地（JRH 社製）を

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

35ml 注入した。37℃の 5%CO_2インキュベーター内で 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗 CCR4 キメラ抗体を回収、精製した。

(4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

本項（2）で取得した GMD 遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX（SIGMA 社製）を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 6×10^4細胞/ml になるように懸濁し、96 ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に 50 μl/ウェルずつ分注した。続いて、このウェルに MTX（SIGMA 社製）を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 0mg/ml、0.4mg/ml、1.6mg/ml、4mg/ml の濃度で LCA（LENS CULINARIS AGGLUTININ：Vector Laboratories 社製）を懸濁した培地を 50μl ずつ加え、37℃の 5%CO_2インキュベーター内で 96 時間培養した。培養後、WST-I（ベーリンガー社製）を 10μl/ウェルになるよう加え、37℃の 5%CO_2インキュベーター内で 30 分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー（BIO-RAD 社製）にて 450nm と 595nm の吸光度（以下 OD450、OD595 と表記する）を測定した。また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して 2 回行なった。

上記で測定した OD450 から OD595 を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCA を加えていないウェルの細胞生存数を 100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を%で表記し第 52 図に示した。第 52 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株では LCA 耐性度の低下が観察され、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 40%程度、0.8mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 20%程度であった。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株では、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 100%、0.8mg/ml の LCA 存在下においても細胞生存率は 80%程度であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 LCA に対する耐性を獲得していることが示唆された。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(5) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性（ADCC 活性）

本項（3）で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

i）標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地に 500μg/ml の濃度で G418 硫酸塩（ナカライテスク製）を添加した培地で培養した CCR4-EL4 株（実施例 8 の 7 参照）の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $Na_2{}^{51}CrO_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37℃で 90 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、2.5×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

ii）エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

iii）ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記 1）で調製した標的細胞溶液の 50μl（1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで 2）で調製したエフェクター細胞溶液を 100μl（2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる）添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体（本項（3）で精製した抗 CCR4 キメラ抗体、及び KM2760-1、KM3060）を最終濃度 0.0025～2.5μg/ml となるように加え、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量をγ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式（II）により求めた。

ADCC 活性測定の結果を第 53 図に示した。第 53 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、実施例 8 で取得した KM3060 と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と同程度の ADCC 活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 ADCC 活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

(6) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株由来の抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析

本項（3）で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析を実施例 14（4）に示す方法に従って行ない、その解析結果を第 55 図に示した。実施例 14 で作製した CHO/CCR4-LCA より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と比較して、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体では、分析ピークの面積から計算するとα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 9%に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA 株に GMD 遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体のα-1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 5-03 株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

実施例 16. CHO 細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

1. CHO 細胞の FX cDNA 配列の決定

(1) CHO/DG44 細胞由来全 RNA の抽出

CHO/DG44 細胞を 10%ウシ胎児血清（Life Technologies 社製）および 1 倍濃度の HT supplement（Life Technologies 社製）を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）に懸濁し、2×10^5 個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ（Greiner 社製）に 15ml 播種した。37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で培養し、培養

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

2 日目に 1×10^7個を回収後、RNAeasy（QIAGEN 社製）により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

(2) CHO/DG44 細胞由来全一本鎖 cDNA の調製

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

得られた各々の全 RNA3μl に対し SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（dT）をプライマーとした 20μl の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。GFPP および FX のクローニングには該反応液の 50 倍希釈水溶液を使用した。使用するまで-80℃で保管した。

(3) チャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データーベースに登録されているヒト FX の cDNA（Genebank 登録番号 U58766）およびマウスの cDNA（Genebank 登録番号 M30127）に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー（配列番号 42 および配列番号 43 に示す）を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、本項（2）で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1μl を含む 25μl の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 42 および配列番号 43)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は 94℃で 5 分間の加熱の後、94℃で 1 分、58℃で 2 分間、72℃で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 301bp を QiaexII Gel Extraction kit（キアゲン社製）を用いて精製し、滅菌水 20μl で溶出した（以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

幅断片 4μl を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5αをコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A)、69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる)に従って、プラスミド DNA を単離し、FX cDNA 部分断片が組み込まれた 2 クローンを得た。各々pCRFX クローン 8、pCRFX クローン 12 と称す。

FX クローン 8、FX クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Raedy Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの FX のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。

(4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

本項 (1) で抽出した CHO/DG44 全 RNA からの 5'および 3'RACE 用一本鎖 cDNA の作製を、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただし PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

(5) RACE 法によるチャイニーズハムスターFX 全長 cDNA の決定

上記 (3) 項で決定したチャイニーズハムスターFX の部分配列をもとにチャイニーズハムスターFX に特異的な 5'RACE 用プライマーFXGSP1-1 (配列番号 44) および FXGSP1-2 (配列番号 45)、チャイニーズハムスターFX 特異的な 3'RACE 用プライマー FXGSP2-1 (配列番号 46) および FXGSP2-2 (配列番号 47) を設計した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA を 1μl を含む 50μl の反応液 [Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mM dNTPs、0.2μmol/l チャイニーズハムスターFX 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94℃で 5 秒間、68℃で 10 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1μl をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1μl をテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 8 表に示した。

第 8 表

チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCR に用いた

プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp

3' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

PCR 後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20μl で溶出した。上記増幅断片 4μl を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターFX の 5' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を FX5' クローン 25、FX5' クローン 26、FX5' クローン 27、FX5' クローン 28、FX5' クローン 31、FX5' クローン 32 と称す。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

同様にチャイニーズハムスターFX の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々FX3' を FX3' クローン 1、FX3' クローン 3、FX3' クローン 6、FX3' クローン 8、FX3' クローン 9 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFXcDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号 48) に示す。

2. CHO 細胞の GFPP cDNA 配列の決定

(1) チャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片を取得した。まず公的データーベースに登録されているヒト GFPP の cDNA (Genebank 登録番号 AF017445)、該配列と相同性の高いマウス EST 配列 (Genebank 登録番号 AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、および Rat EST 配列 (Genebank 登録番号 BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3 種間で保存性の高い領域にラット GFPP に特異的なプライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 1 (2) で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1μl を含む 25μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5μmol/l 上記 GFPP 特異的プライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94℃で 5 分間の加熱の後、94℃で 1 分、58℃で 2 分間、72℃で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1.4Kbp を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20μl で溶出した。上記増幅断片 4μl を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、GFPP cDNA 部分断片が組み込まれた 3 クローンを得た。各々GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 と称す。

GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Raedy Reaction Kit (Perkin Elmer 社製)を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの GFPP のオープンリーディングフレーム (ORF) の部分配列をコードすることを確認した。

(2) RACE 法によるチャイニーズハムスターGFPP 全長 cDNA の決定

本項 2 (1) で決定したチャイニーズハムスターFX の部分配列をもとにチャイニーズハムスターFX に特異的な 5'RACE 用プライマーGFPP GSP1-1 (配列番号 52) および GFPP GSP1-2 (配列番号 53)、チャイニーズハムスターGFPP 特異的な 3'RACE 用プライマーGFPP GSP2-1 (配列番号 54) および GFPP GSP2-2 (配列番号 55) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA1μl を含む 50μl の反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mM dNTPs、0.2μmol/l チャイニーズハムスターGFPP 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94℃で 5 秒間、68℃で 10 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1μl をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1μl をテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 9 表に示した。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第9表

チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCRに用いた

プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5'RACE	GFPP特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

3'RACE	GFPP特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM(Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP(Nested Univarsal primer)	1400bp

PCR後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片をQiaexII Gel Extraction kit（キアゲン社製）を用いて精製し、滅菌水20μlで溶出した。上記増幅断片4μlをTOPO TA cloning kit（invitrogen社製）の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5αを形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、チャイニーズハムスターGFPPの5'領域を含むcDNA4クローンを得た。各々をGFPP5'クローン1、GFPP5'クローン2、GFPP5'クローン3、GFPP5'クローン4と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPPの3'領域を含むcDNA5クローンを得た。各々をGFPP3'クローン10、GFPP3'クローン16、GFPP3'クローン20と称す。

上記、5'および3'RACEにより取得した各クローンのcDNA部分の塩基配列は、DNAシークエンサー377（Parkin Elmer社製）を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各cDNAの塩基配列を比較し、PCRに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA全長の塩基配列を決定した。決定した配列（配列番号51）に示す。

実施例17. CHO細胞由来GMD遺伝子の取得

1. CHO細胞由来GMD cDNA配列の決定

(1) CHO細胞由来GMD遺伝子のcDNA取得（5'及び3'末端配列を除く部分cDNAの取得）

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

GenBank に登録されているヒト GMD cDNA 配列（GenBank Accession No. AF042377）をクエリーとして、げっ歯類由来 GMD cDNA を公的データベース（BLAST）を用いて検索した結果、3 種類のマウス EST 配列が得られた（GenBank Accesssion No. BE986856、BF158988、BE284785）。これら EST 配列を連結させることにより、推定されるマウス GMD cDNA 配列を決定した。

このマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 56 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、配列番号 57 で示される塩基配列を有する 27mer のプライマー、配列番号 58 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、配列番号 59 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、配列番号 60 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。

続いて、CHO 細胞由来 GMD cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項（1）で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液［1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5μM の合成 DNA プライマー2 種類］を調製した。なお、合成 DNA プライマーには配列番号 56 と配列番号 57、配列番号 58 と配列番号 57、配列番号 56 と配列番号 59、配列番号 56 と配列番号 60 の組み合わせを用いた。該反応液を DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて 94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.2kbp、配列番号 57 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.1kbp、配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 350bp、配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1kbp の DNA 断片が増幅された。これら DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて pT7Blue(R) ベクター（Novagen 社製）に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド 22-8（配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.2kbp の DNA 断片を有する）、23-3（配列番

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

号 58 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.1kbp の DNA 断片を有する)、31-5 (配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーから増幅された約 350bp の DNA 断片を有する)、34-2 (配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1kbp の DNA 断片を有する) を得た。これらプラスミドに含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列を、DNA シークエンサーABI PRISM 377 (パーキンエルマー社製) を用い、常法に従って決定した (5' 末端側の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列、及び 3' 末端側の終了コドンより上流 27 塩基の配列は合成オリゴ DNA 配列由来のため、マウス GMD cDNA 配列である)。

さらに、プラスミド 22-8 と 34-2 に含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA を組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。1μg のプラスミド 22-8 を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2μg のプラスミド 34-2 を制限酵素 EcoRI で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド CHO-GMD を得た (第 54 図参照)。

(2) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 5' 末端配列の決定

CHO 細胞由来ヒト及びマウス GMD cDNA の 5' 末端側非コード (non-coding) 領域の塩基配列より配列番号 61 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、及び CHO 由来 GMD cDNA 配列より配列番号 62 で示される塩基配列を有する 32mer のプライマーを作製し、cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で得られた CHO 細胞由来の一本鎖 cDNA 0.5μl を鋳型として含む 20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 61 と配列番号 62 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間のサイクルを20サイクル行なった後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを18サイクル行なった。該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約300bpのDNA断片をGene Clean II kit（BIO101社製）を用い、添付の説明書に従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue(R)ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド5'GMDを得た。DNAシークエンサー377（パーキンエルマー社製）を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの開始メチオニンより下流28塩基の配列を決定した。

(3) CHO細胞由来GMD cDNAの3'末端配列の決定

CHO細胞由来GMDの3'末端cDNA配列を得るため、以下の方法でRACE法を行なった。実施例15の1項（1）で取得したCHO細胞由来RNAより、3'RACE用一本鎖cDNAの作製をSMART™ RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社製）を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素にはPowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH社製）を用いた。調製後の一本鎖cDNAは、キット添付のTricin-EDTA bufferで10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

続いて、上記3' RACE用一本鎖cDNA 1μlを鋳型として含む20μlの反応液[1×EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの配列番号63で示す24merの合成DNAプライマー［本項（1）で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、1倍濃度のUniversal Primer Mix (SMART™ RACE cDNA Amplification Kitに付属；CLONTECH社製)]を調製し、DNAサーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該PCR反応液より1μlを取り、Tricin-EDTA buffer（CLONTECH社製）で20倍希釈した水溶液1μlを鋳型として含む20μlの反応液［1×EX Taq Buffer（宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製)、0.5μMの配列番号64で示す25merの合成DNAプライマー［本項（1）で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、0.5μMのNested Universal Primer (SMART™

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

RACE cDNA Amplification Kit に付属；CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 700bp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA は DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて pT7Blue(R) ベクター(Novagen 社製）に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株(東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド 3'GMD を得た。DNA シークエンサー377(パーキンエルマー社製）を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の終止コドンより上流 27 塩基の配列、及び 3'側の non-coding 領域 415bp の塩基配列を決定した。

以上、本項（1)、(2)、(3）より決定した CHO 由来 GMD 遺伝子の全長 cDNA 配列を配列番号 65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 71 に示す。

2. CHO/DG44 細胞の GMD 遺伝子を含むゲノム配列の決定

実施例 17 の 1 項で決定したマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 66 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、以下の方法で CHO 細胞由来ゲノム DNA を取得した。CHO/DG44 細胞由来 KC861 株を IMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地[HT supplement（インビトロジェン社製）を 1 倍濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地]に 3×105 細胞/ml になるように懸濁し、接着細胞用平底 6 穴プレート（Greiner 社製）に 2ml/ウェルずつ分注した。37℃の 5%CO_2 インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従ってゲノム DNA を調製し、TE-RNase 緩衝液（pH8.0）(10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A) 150μl に一晩溶解した。

上記で取得した CHO/DG44 細胞由来ゲノム DNA を 100ng、20μl の反応液［1×EX Taq Buffer（宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 59 と配列番号 66 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 100bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex3 を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 67 に示した。

次に、実施例 17 の 1 項で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 68 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、及び配列番号 69 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44 由来ゲノム DNA を 100ng、20μl の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μM の配列番号 68 と配列番号 69 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 200bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5α株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex4 を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 70 に示した。

実施例 18. 市販抗体の糖鎖解析

CHO 細胞を宿主細胞にして産生させた市販抗 HER2/neu 抗体ハーセプチン (Herceptin; GENENTECH 社、Roche 社製) の糖鎖解析を、実施例 10 の (6) の方法にしたがって行った (第 31 図)。ピーク面積から計算すると、 Herceptin のα-1,6-フコースのない糖鎖含量は 16%、α-1,6-フコース結合糖鎖含量は 84%であった。 他

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

の市販抗体に関しても同様の分析を行った結果、Rituxan（GENENTECH 社、Roche 社、IDEC 社製）、Zenapax（Roche 社、PDL 社製）では Herceptin よりもα-1,6-フコースのない糖鎖含量が少なかった。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相 HPLC の分析条件、糖鎖構造、α-1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は実施例 11 の(6)と同じ方法で行った。

産業上の利用可能性

本発明によれば、抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、ならびにその用途を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 4-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 8-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 15-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成 DNA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 26-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 27-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 28-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 29-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 30-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 31-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 35-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 47-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 52-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 53-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 54-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 55-人工配列の説明：合成 DNA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

配列番号 56-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 57-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 58-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 59-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 60-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 61-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 62-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 63-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 64-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 66-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 68-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 69-人工配列の説明：合成 DNA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

請 求 の 範 囲

1. N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞。

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

3. 抗体分子のクラスがIgGである、請求の範囲1または2項に記載のCHO細胞。

4. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した請求の範囲1～3のいずれか1項に記載のCHO細胞。

5. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲4に記載のCHO細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase);

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

6. GMDが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、請求の範囲5に記載のCHO細胞。

(a) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号65で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

7. GMDが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲5に記載のCHO細胞。

(a) 配列番号71で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

8. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

9. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

10. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

11. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

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

13. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

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

14. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

15. 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、請求の範囲 4～14 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法 ;

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法 ;

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法 ;

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法 ;

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

16. 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 4～15 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

17. 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 4～16 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

18. 抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 17 記載の CHO 細胞。

19. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にα結合していない糖鎖である、請求の範囲 18 記載の CHO 細胞。

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

21. 請求の範囲 20 に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

22. CHO 細胞が産生する N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物。

23. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

24. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 23 記載の細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

25. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

26. GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

27. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

28. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

29. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

30. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

31. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素がα-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 23 に記載の細胞。

32. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA；

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

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

33. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

34. 遺伝子工学的な手法が、以下の（a）、（b）、（c）及び（d）からなる群から選ばれる手法である、請求の範囲23～33のいずれか1項に記載の細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

35. 少なくともN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲23～34のいずれか1項に記載の細胞。

36. 請求の範囲23～35のいずれか1項に記載の細胞が、下記の（a）～（i）からなる群から選ばれる細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；

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

(c) マウスミエローマ細胞株NSO細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(i) 受精卵細胞。

37. 請求の範囲 23～36 のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

38. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 37 記載の細胞。

39. 請求の範囲 37 または 38 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

40. 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 39 に記載の方法。

41. 請求の範囲 39 または 40 に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

42. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

43. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、請求の範囲 42 記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

44. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

45. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

46. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

47. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

48. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素がα-1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

49. α-1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 48 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

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

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

50. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、請求の範囲 42～49 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

51. 請求の範囲 42～50 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

52. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 51 に記載の方法。

53. ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 51 または 52 に記載の方法。

54. 請求の範囲 51～53 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

55. 請求の範囲 21、22、41 または 54 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

56. 医薬が、腫瘍を伴なう疾患、アレルギーを伴なう疾患、炎症を伴なう疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴なう疾患または細菌感染を伴なう疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、請求の範囲 55 に記載の医薬。

57. 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)からなる群から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

(f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

58. 請求の範囲 57 記載の蛋白質をコードする DNA。

59. 以下の (a)、(b)、(c)、(d)及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA；

(b) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA；

(c) 配列番号65で表される塩基配列を含むDNA；

(d) 配列番号48で表される塩基配列を含むDNA；

(e) 配列番号51で表される塩基配列を含むDNA。

60. 以下の (a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれるゲノム DNA。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；

(b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；

(c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

61. 請求の範囲 58～60 のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

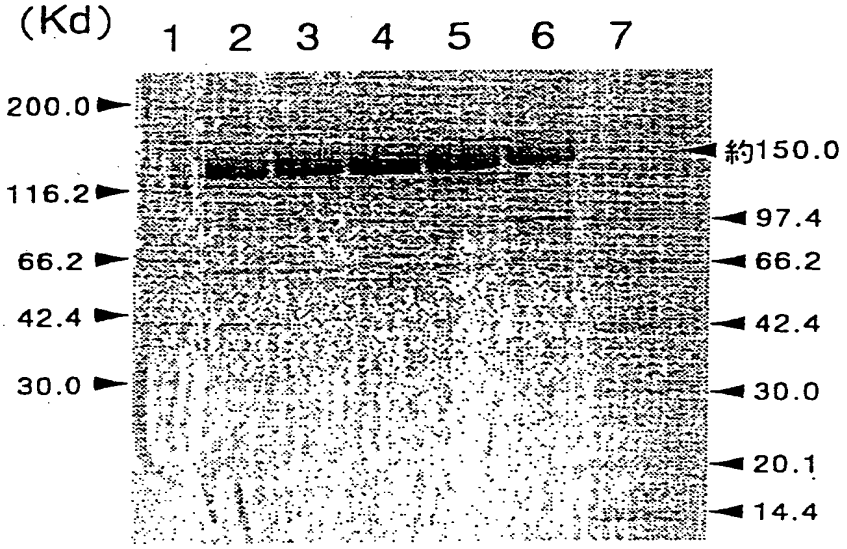
要 約 書

本発明は、種々の疾患に有用な抗体依存性細胞障害活性の高い、抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質等の抗体組成物の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、およびそれら用途に関する。

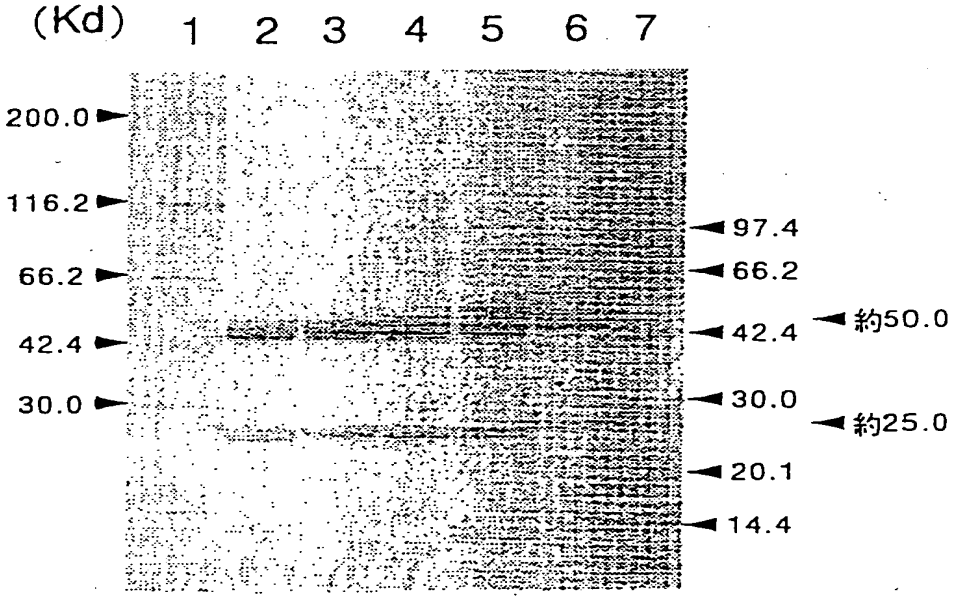
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第１図

1A

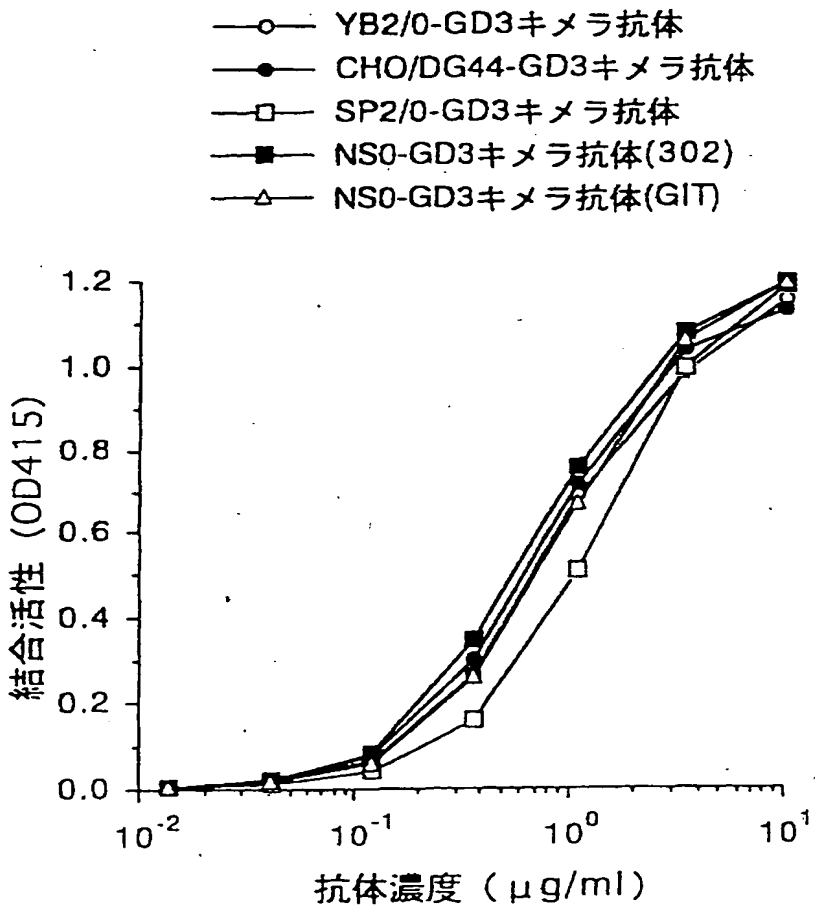


1B



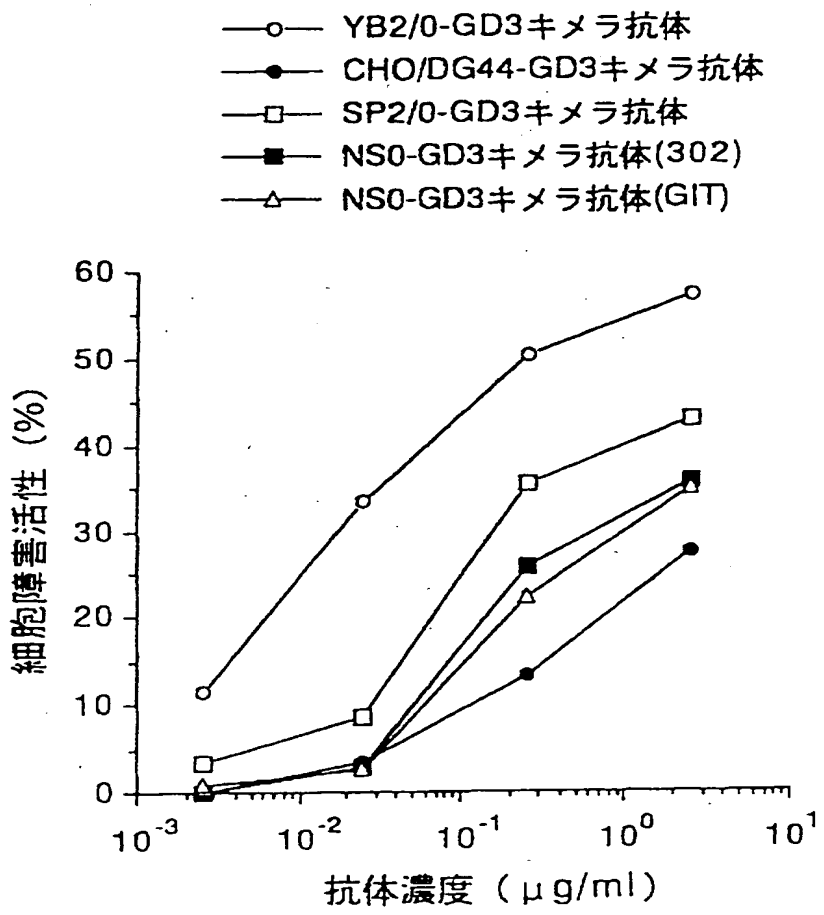
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第２図



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

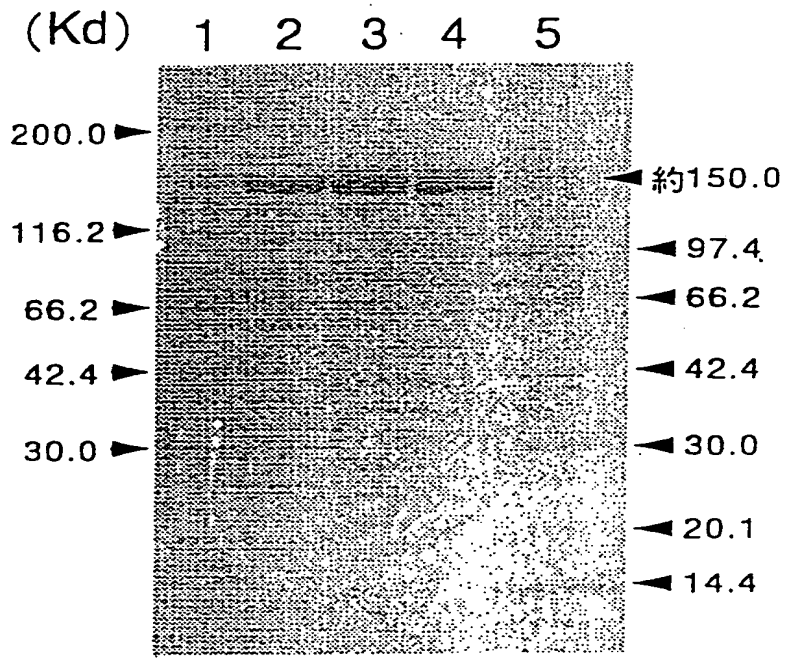
第３図



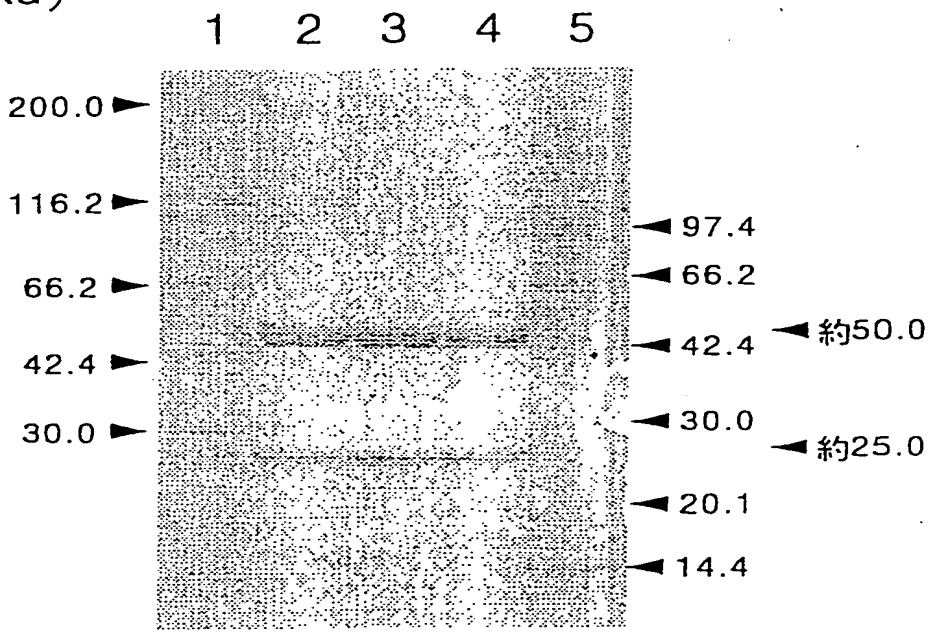
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第４図

4A

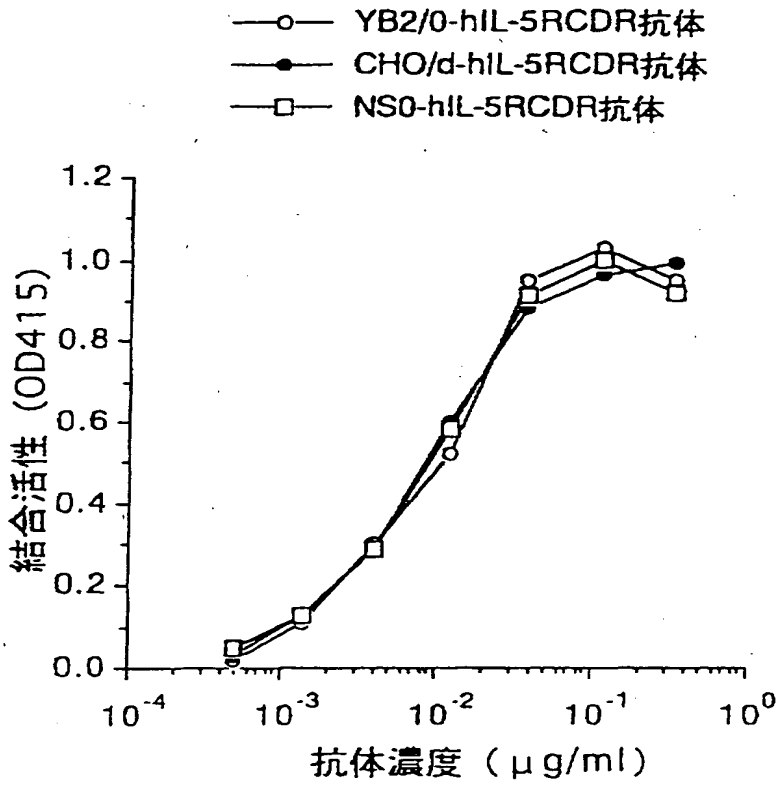


4B



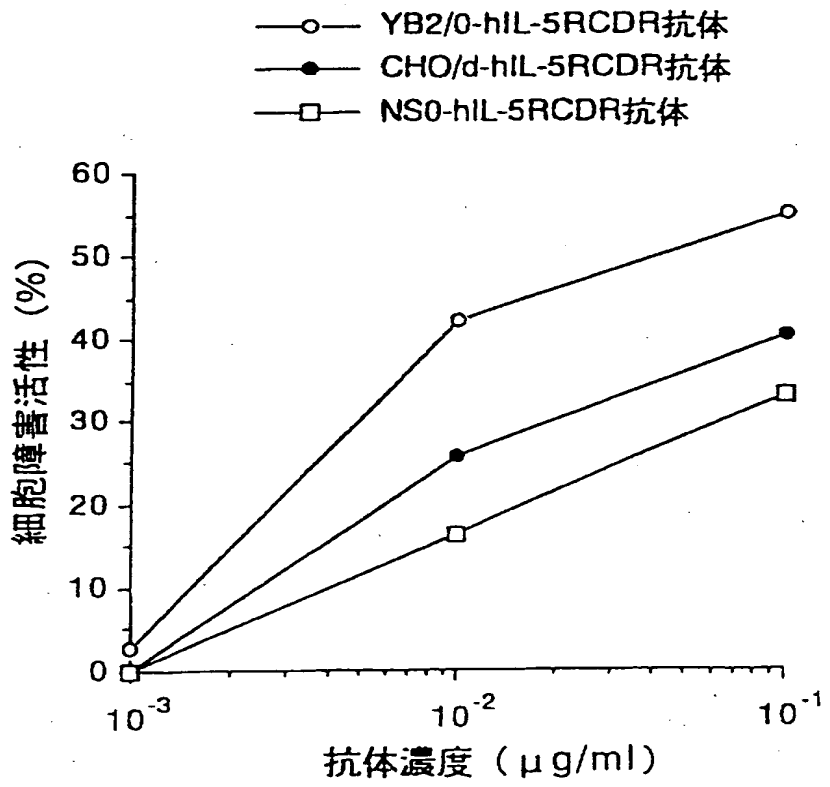
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第５図



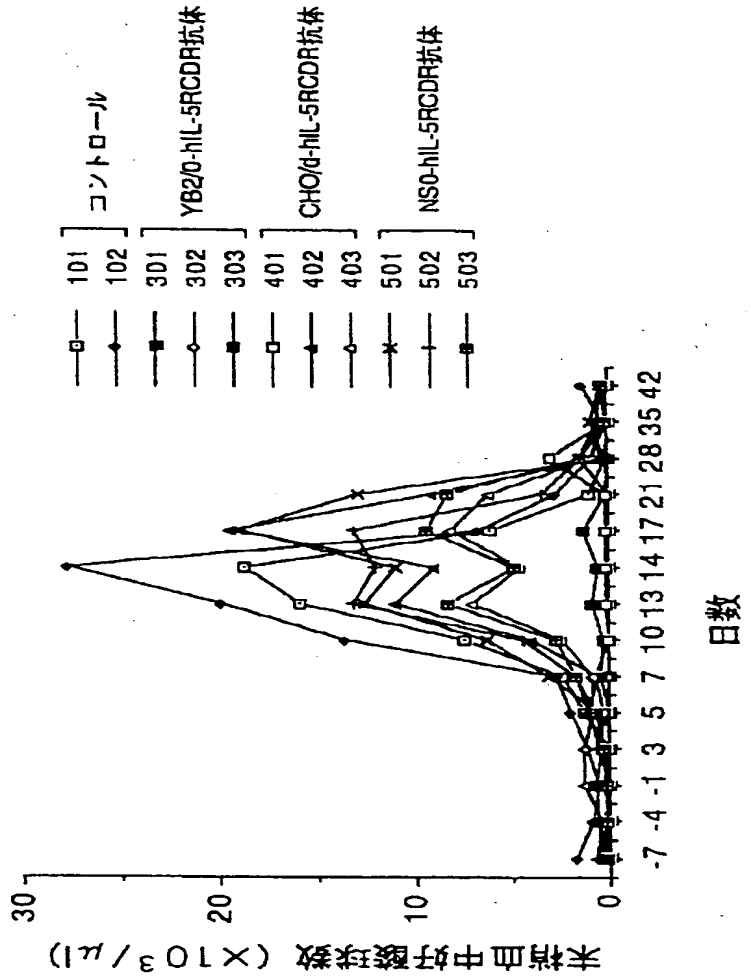
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第６図



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第７図

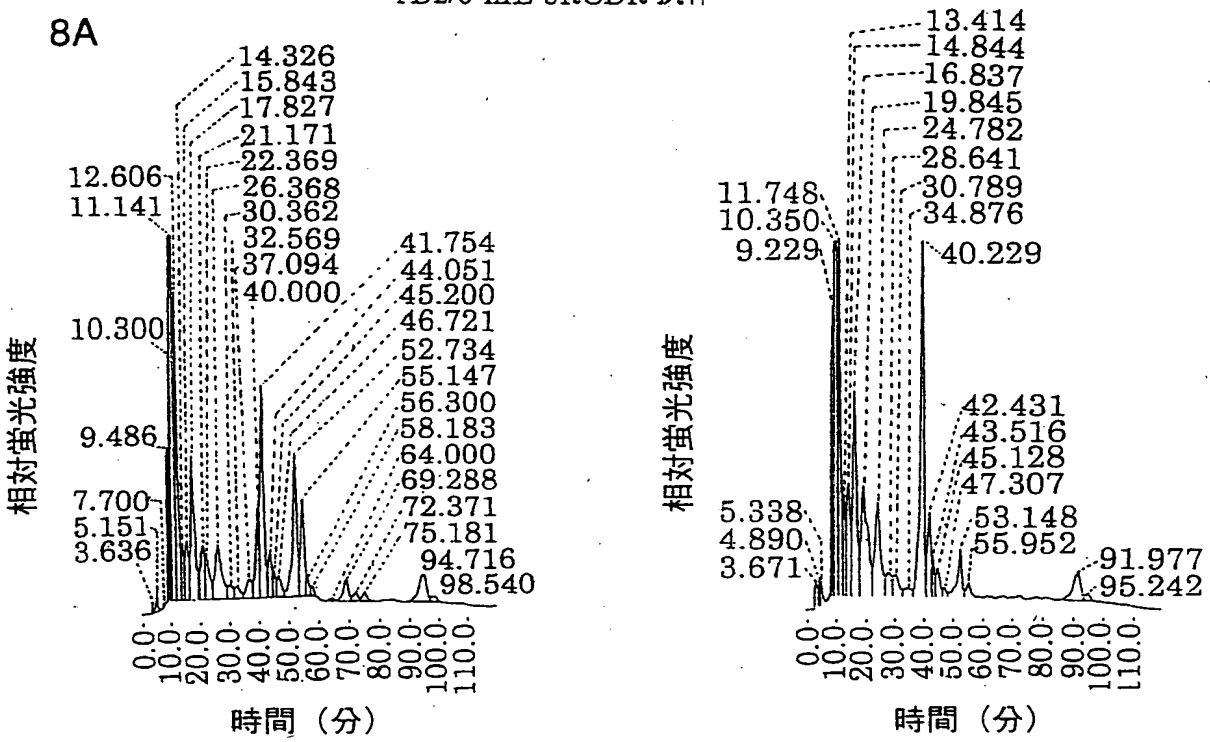


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第８図

YB2/0-hIL-5RCDR 抗体

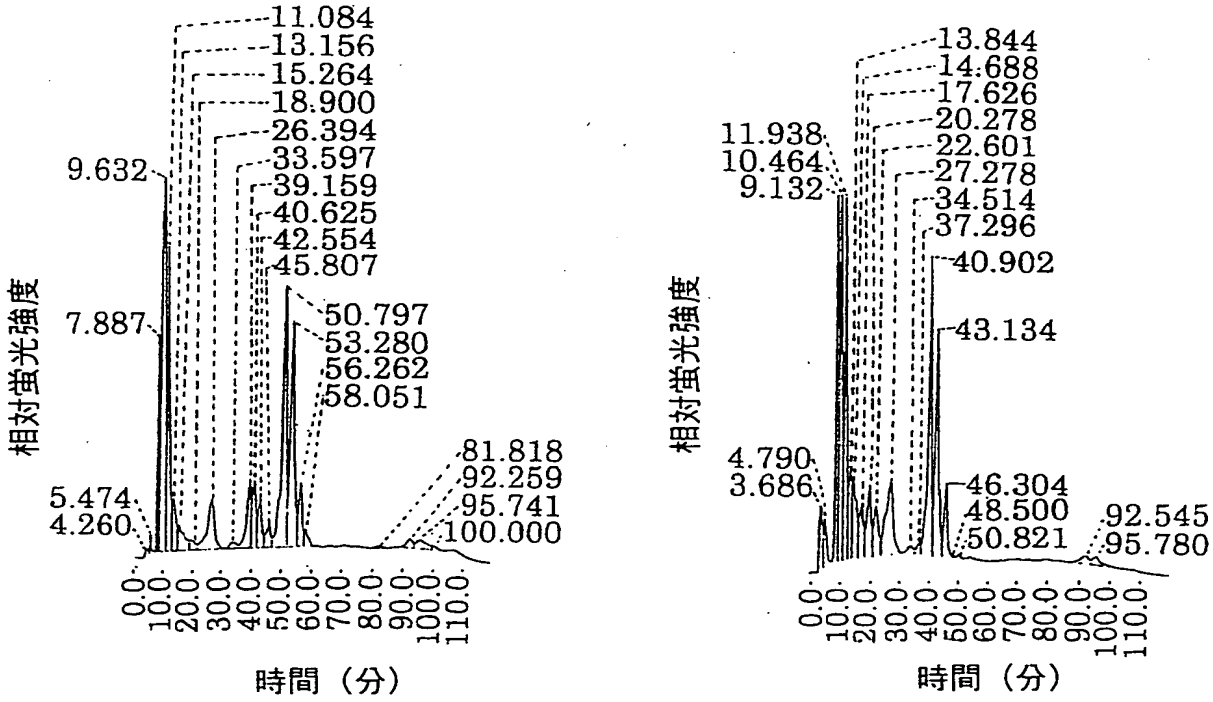
8A



α-L-フコシダーゼ消化後

8B

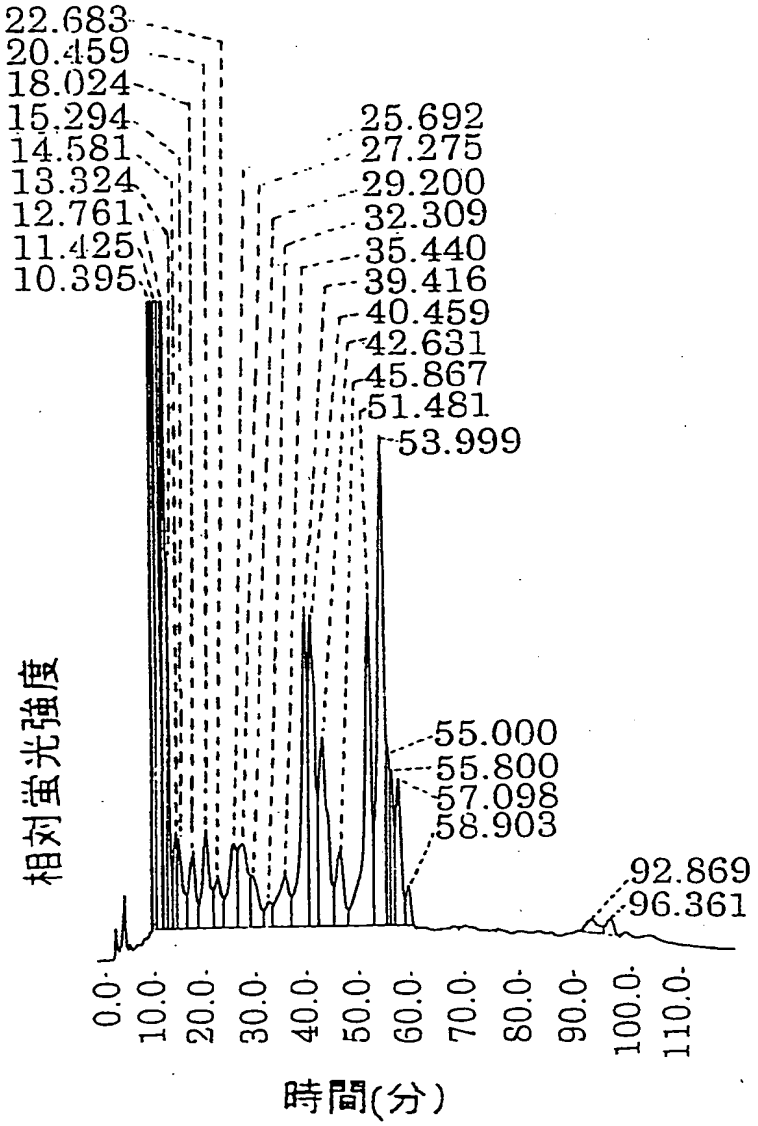
NS0-hIL-5RCDR 抗体



α-L-フコシダーゼ消化後

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

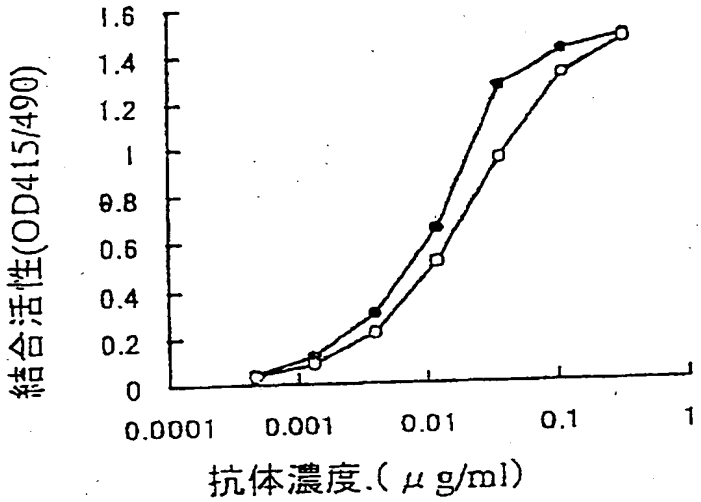
第９図



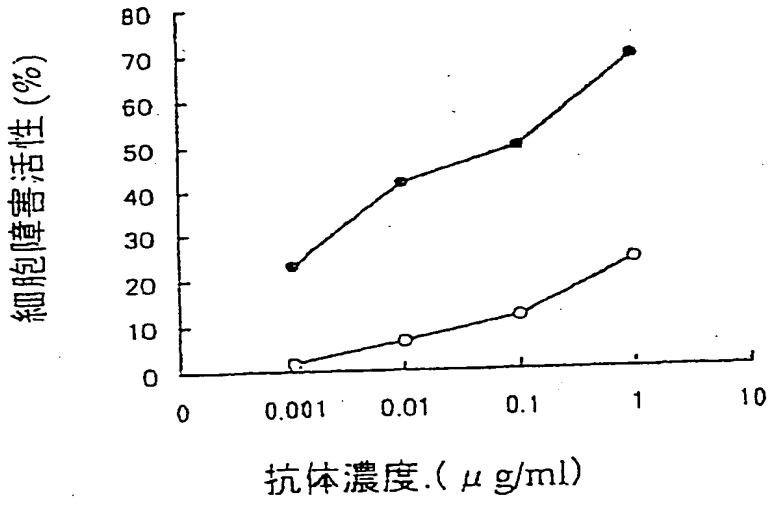
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 10 図

10A



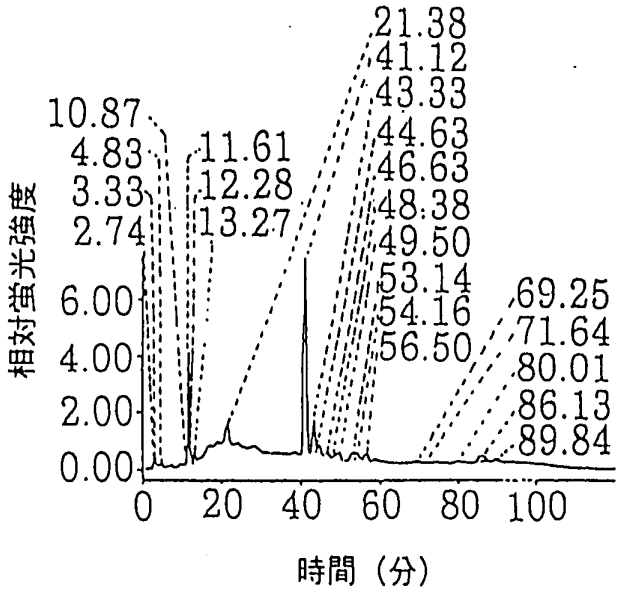
10B



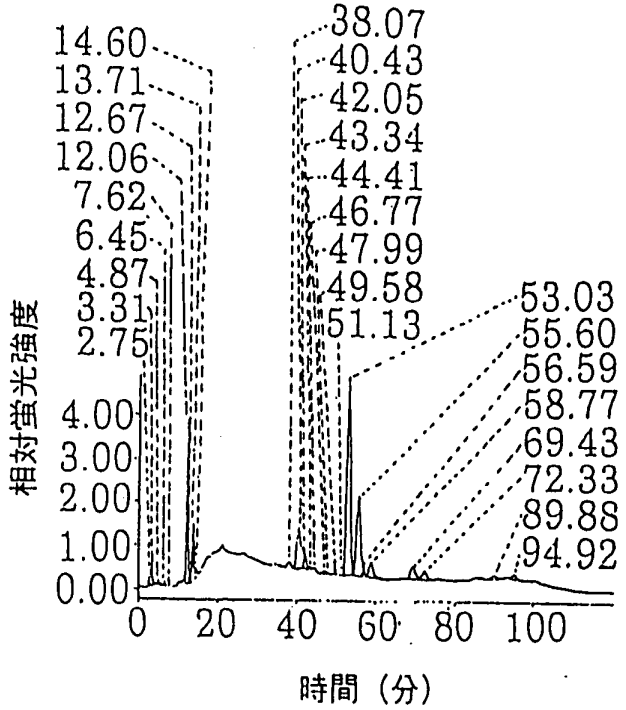
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 11 図

11A

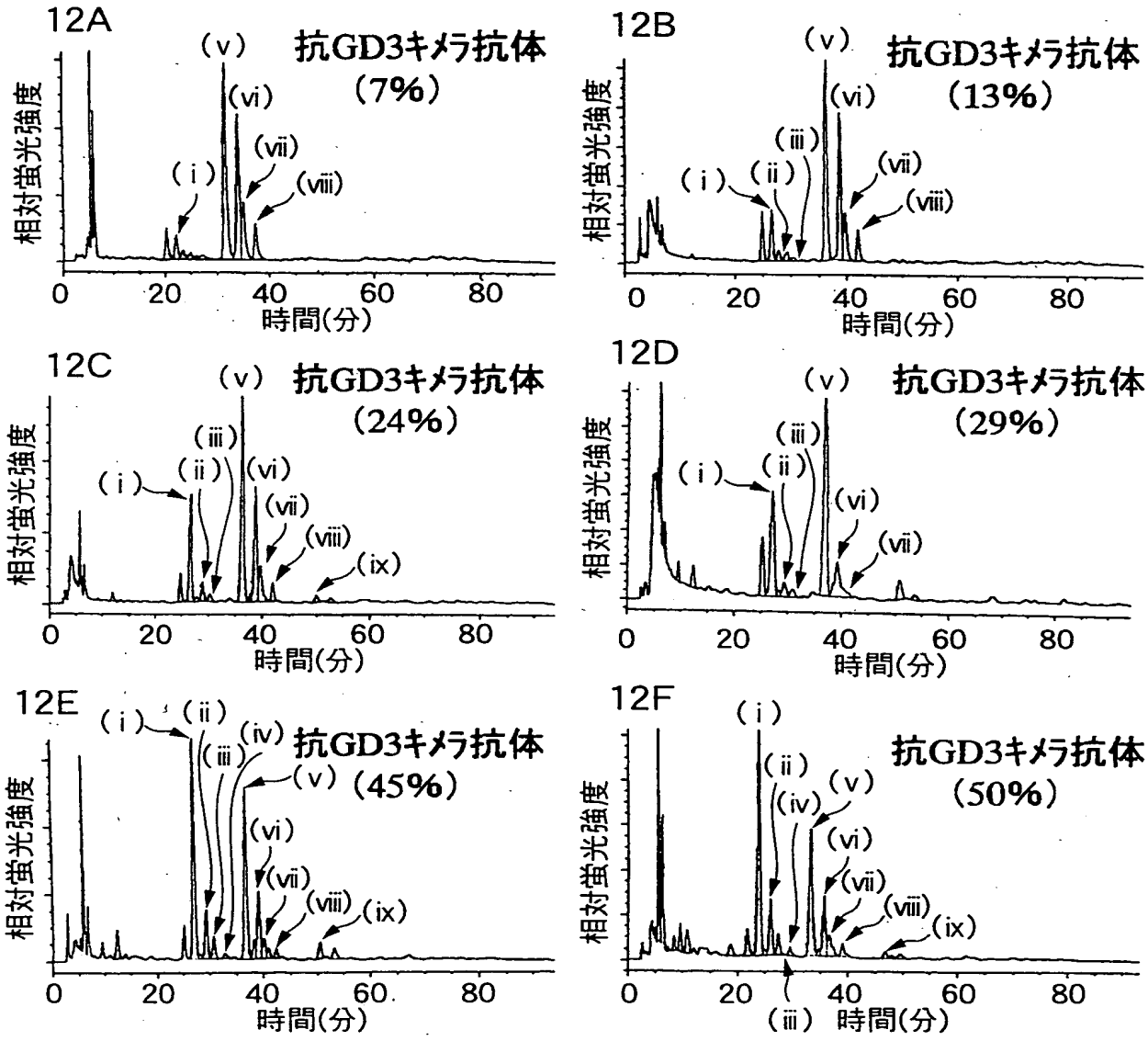


11B



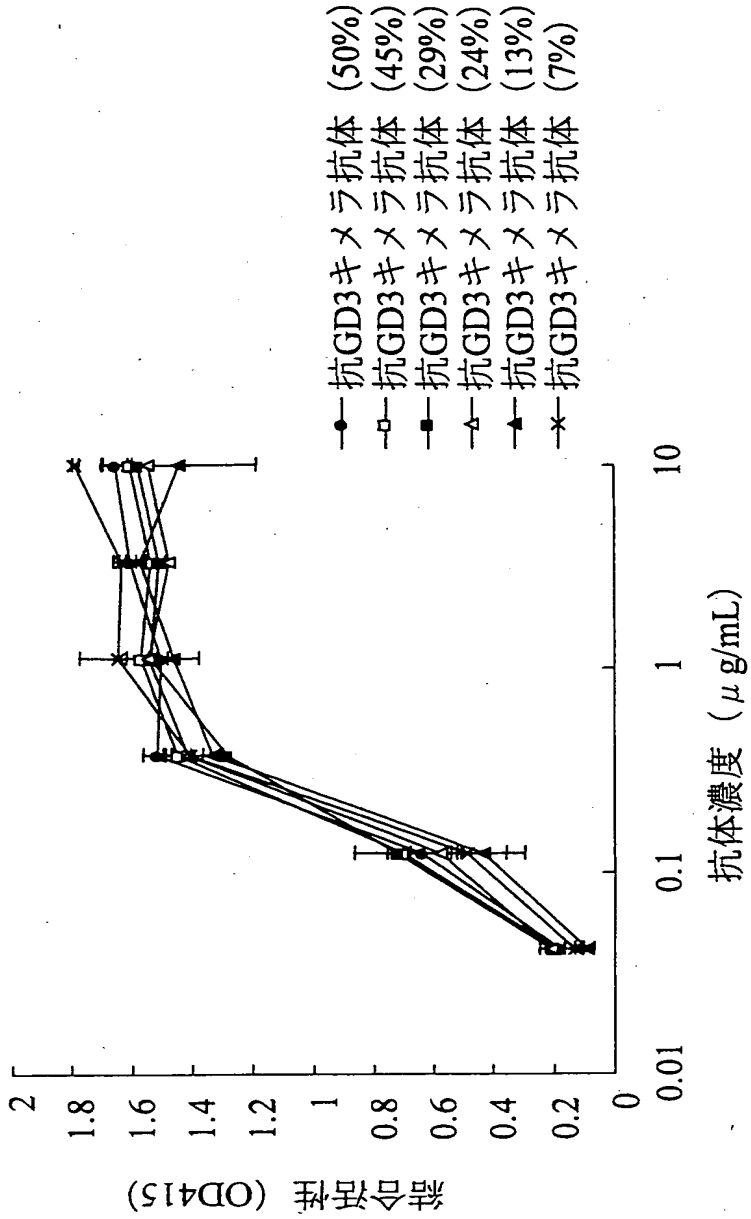
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第12図



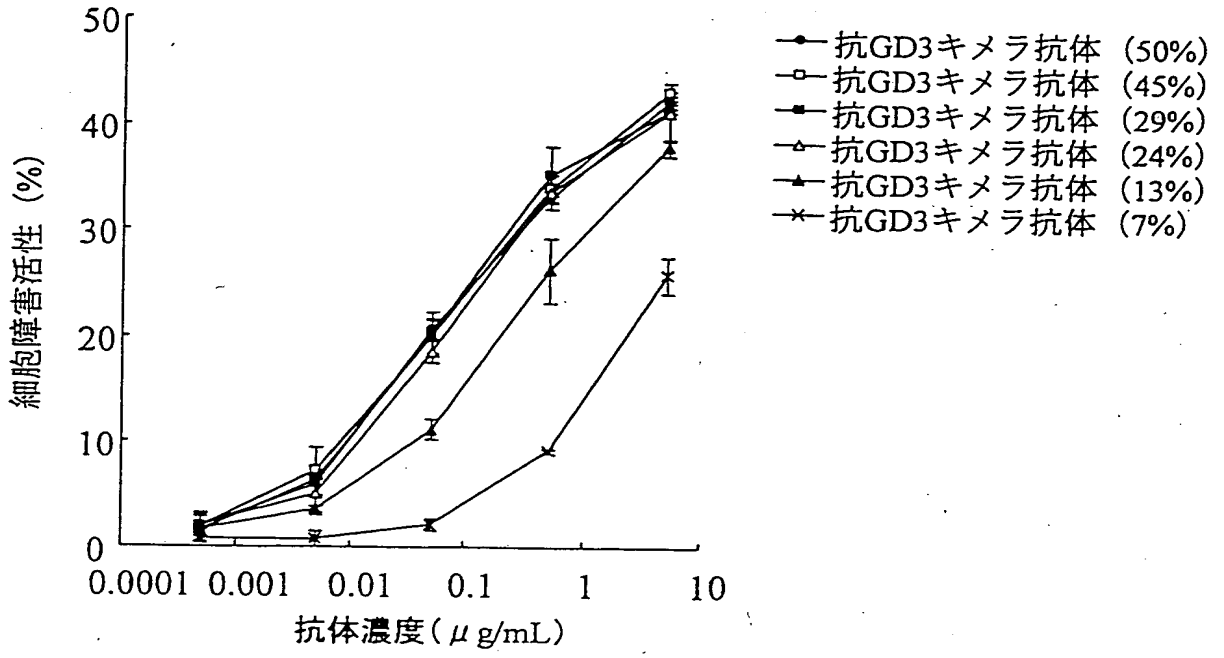
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第13図



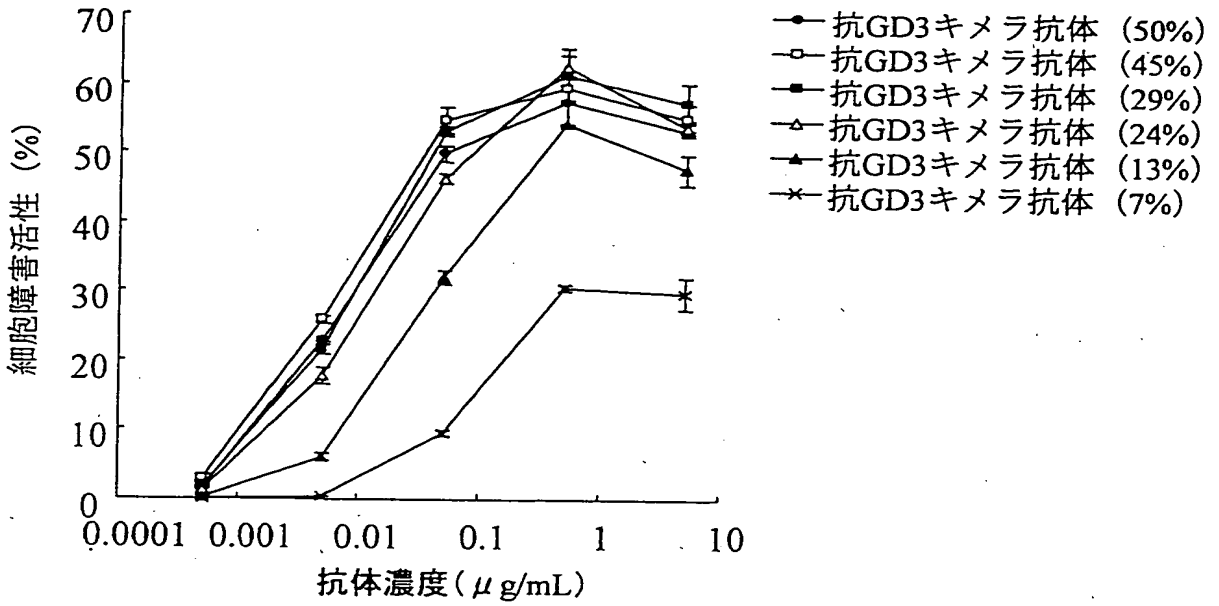
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 14 図



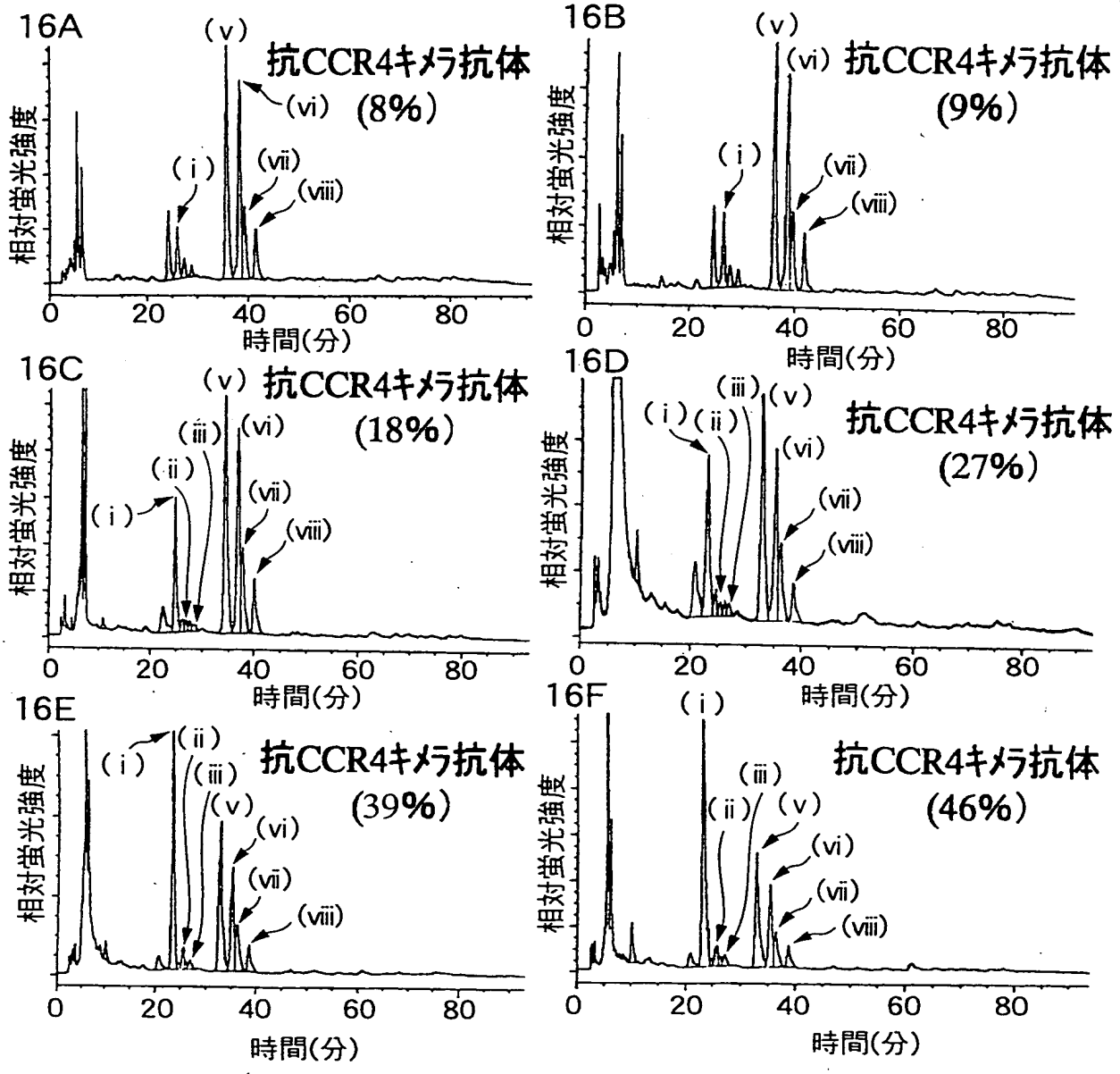
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 15 図



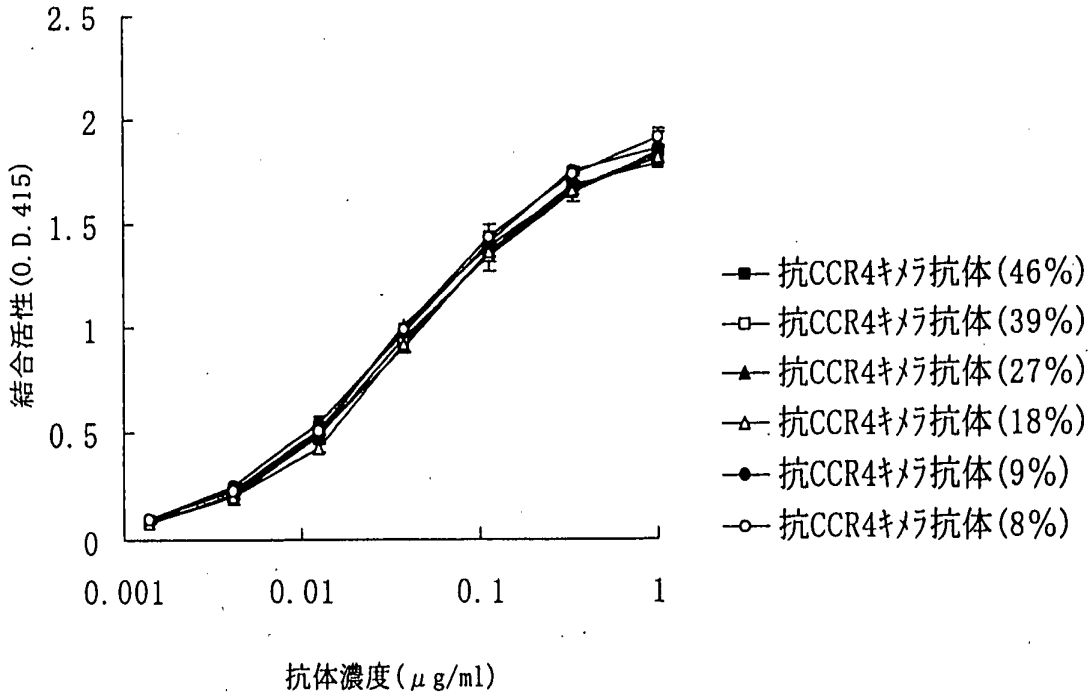
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第16図



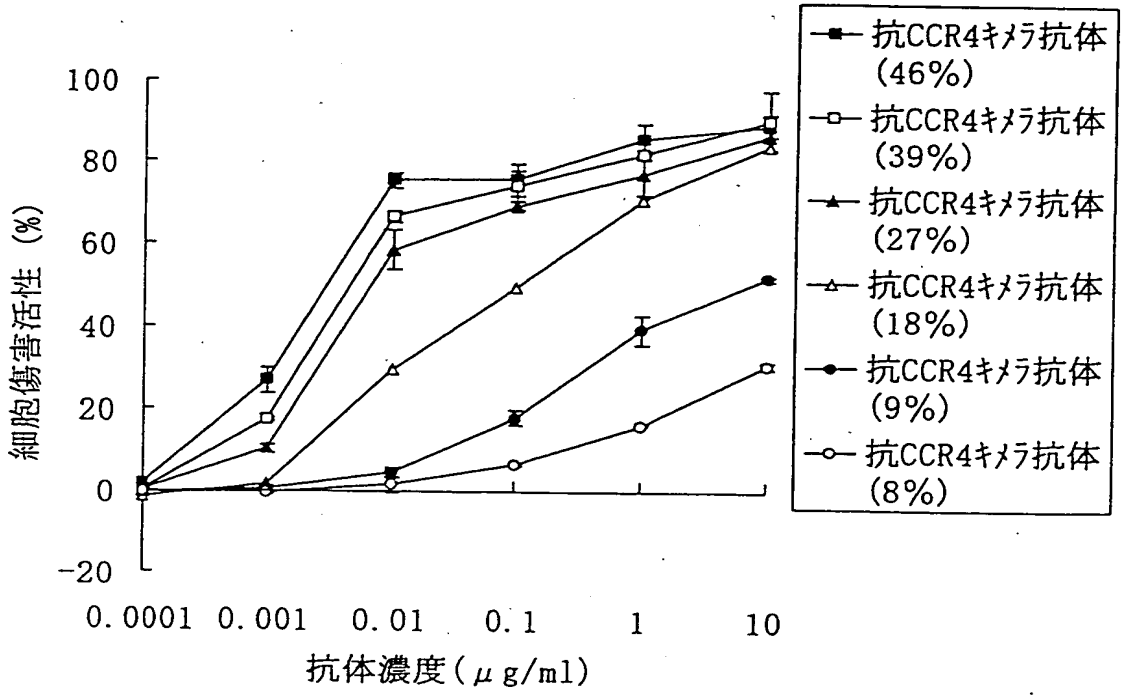
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第17図



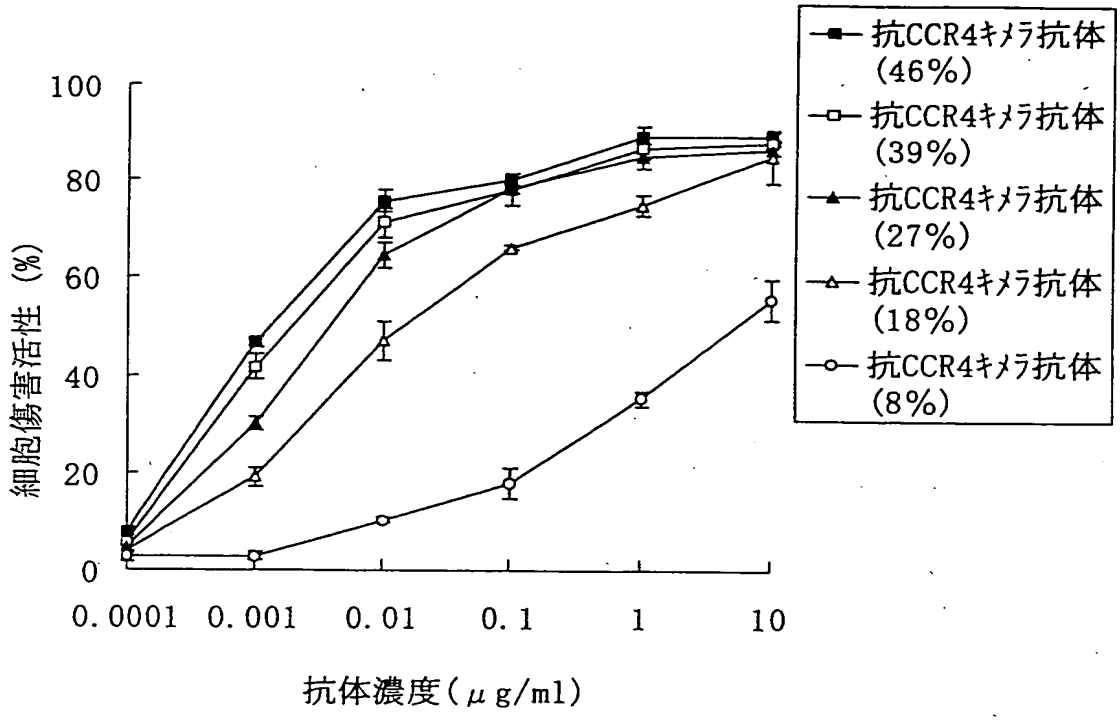
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 18 図



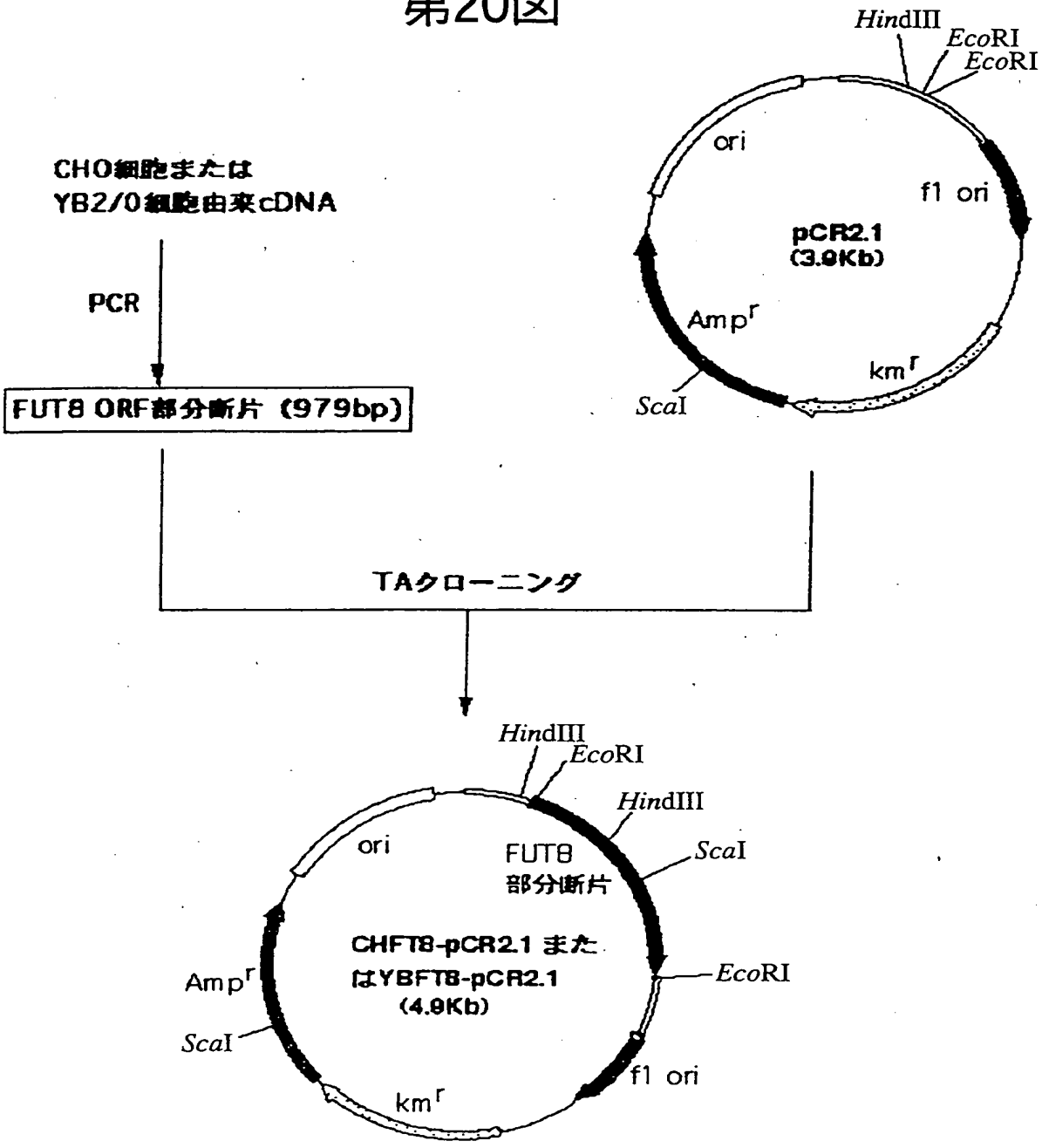
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 19 図



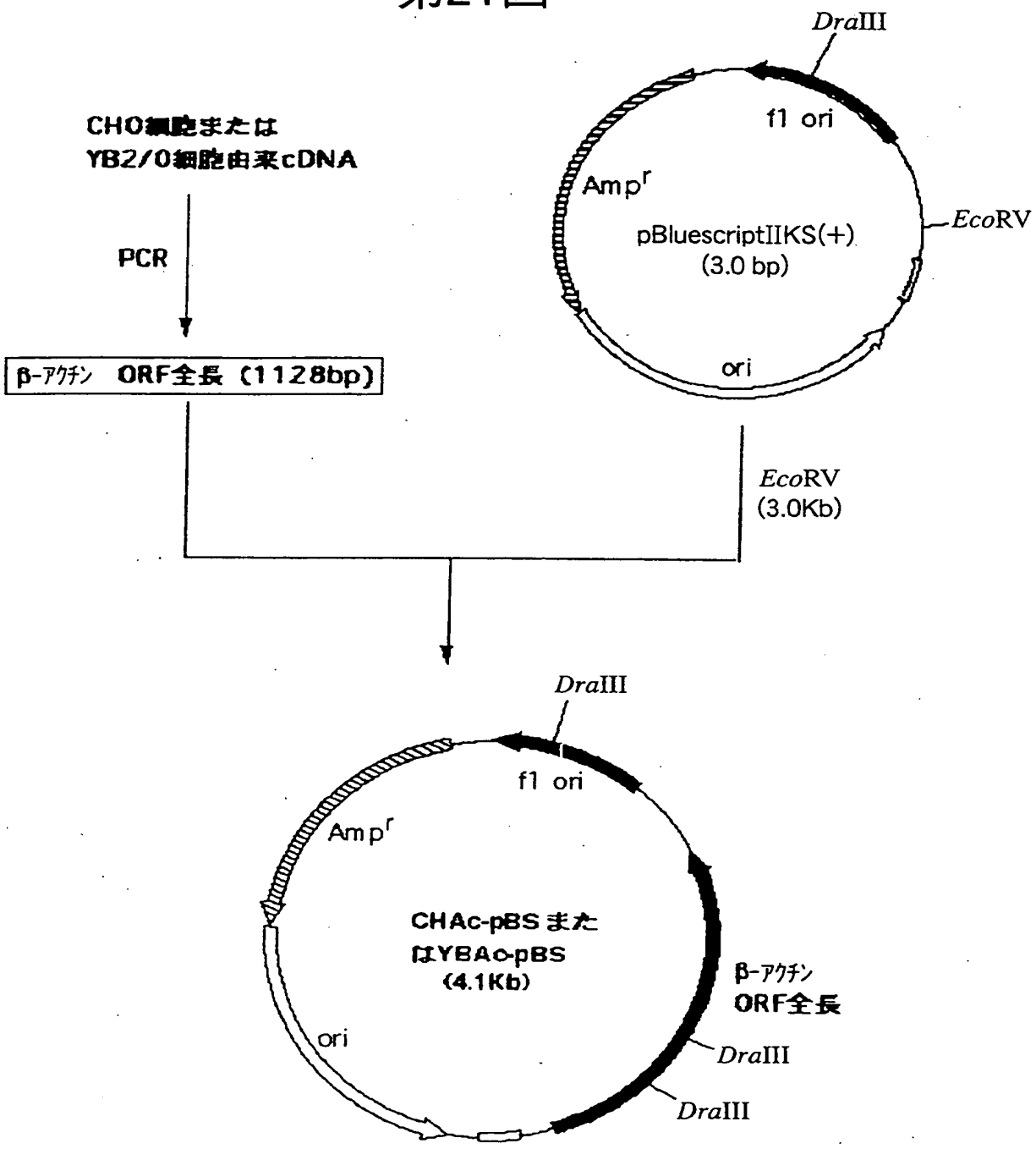
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第20図



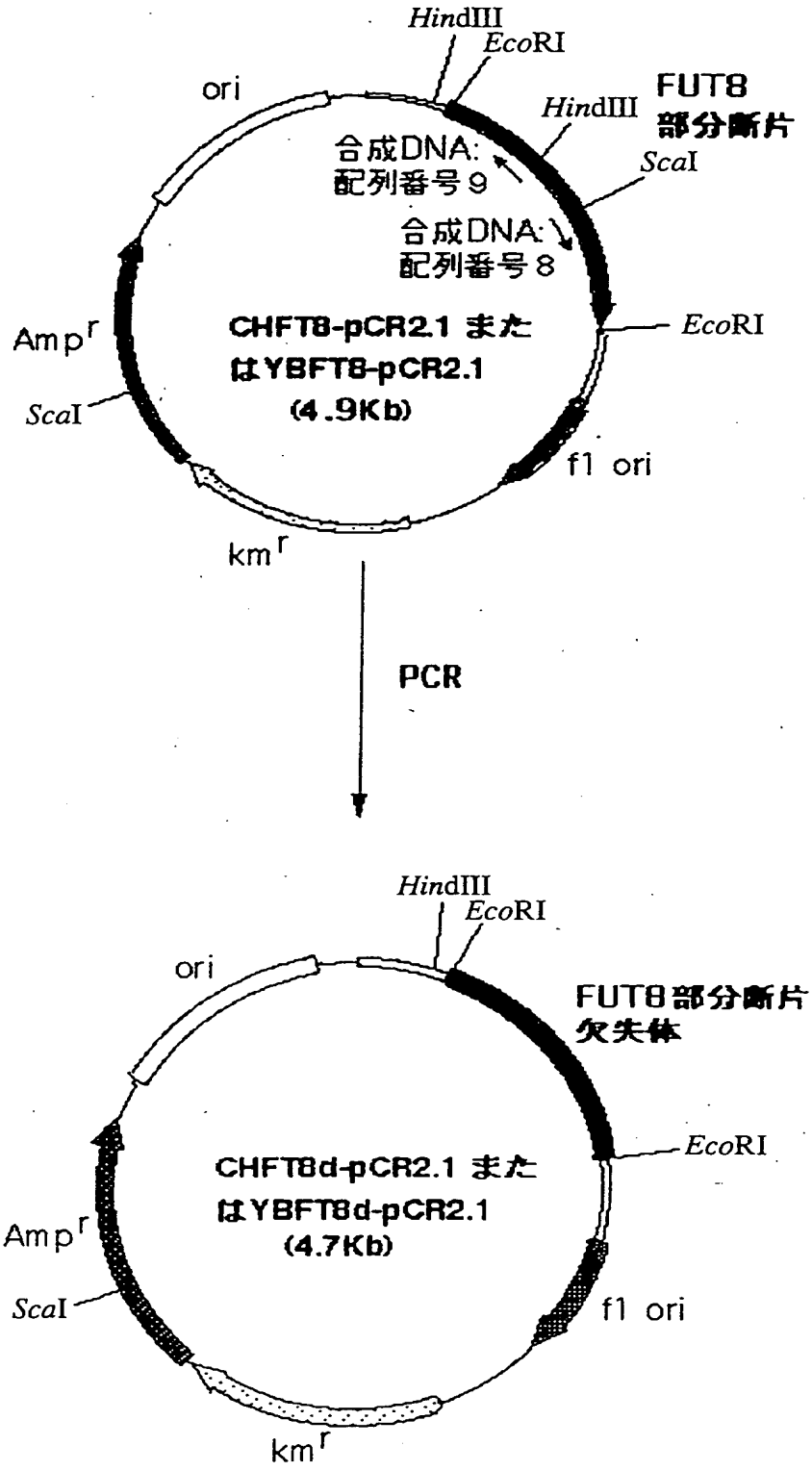
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第21図



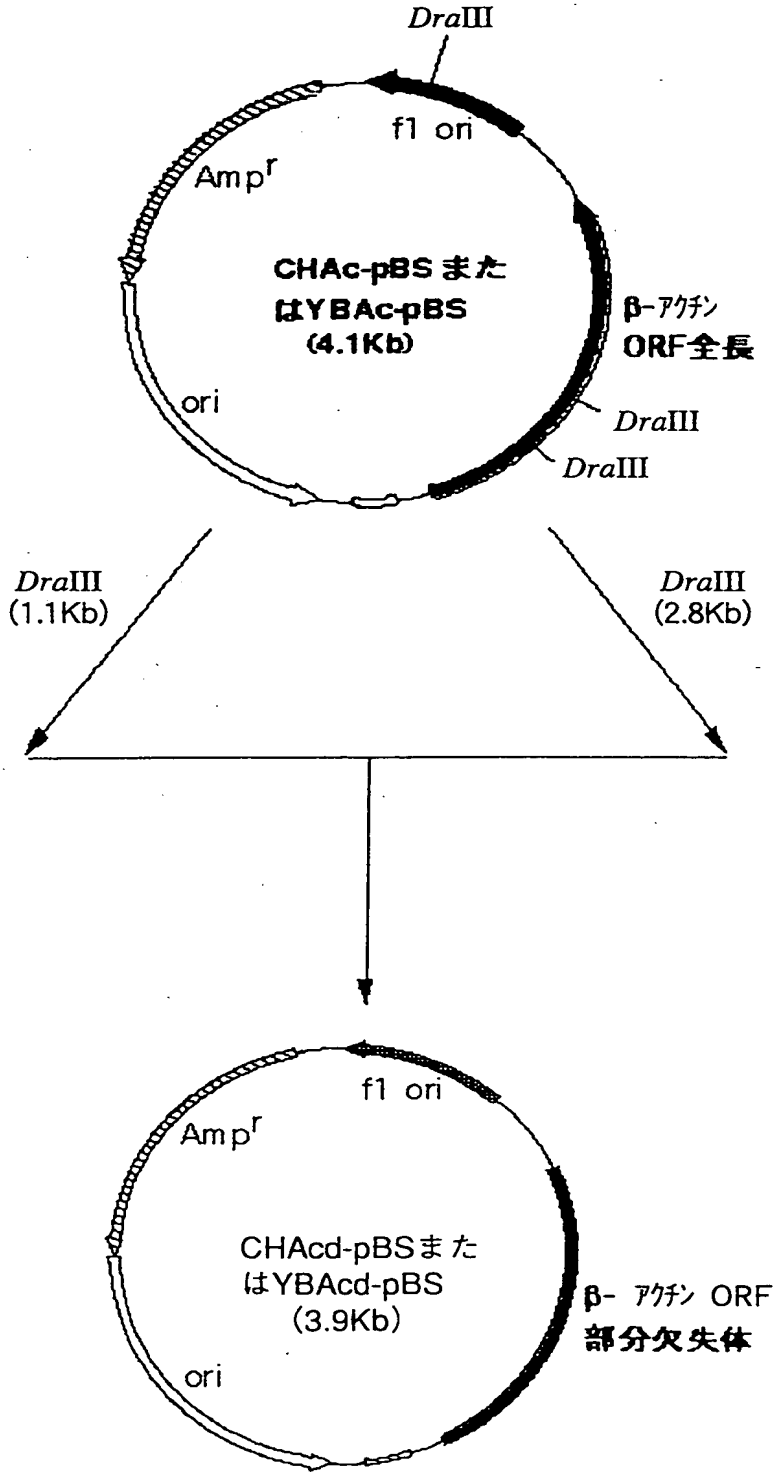
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第22図



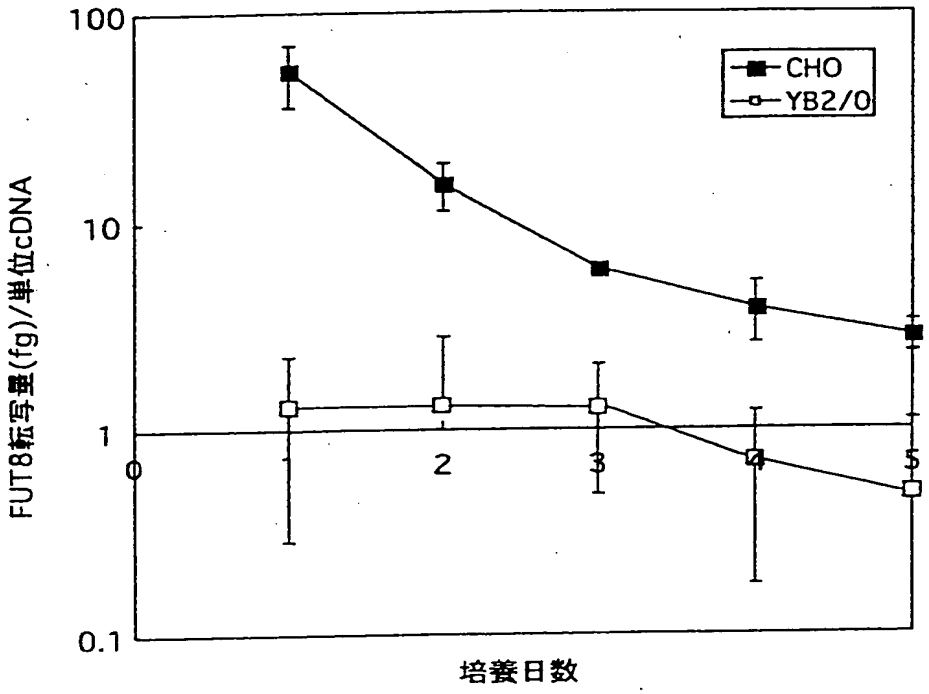
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第23図



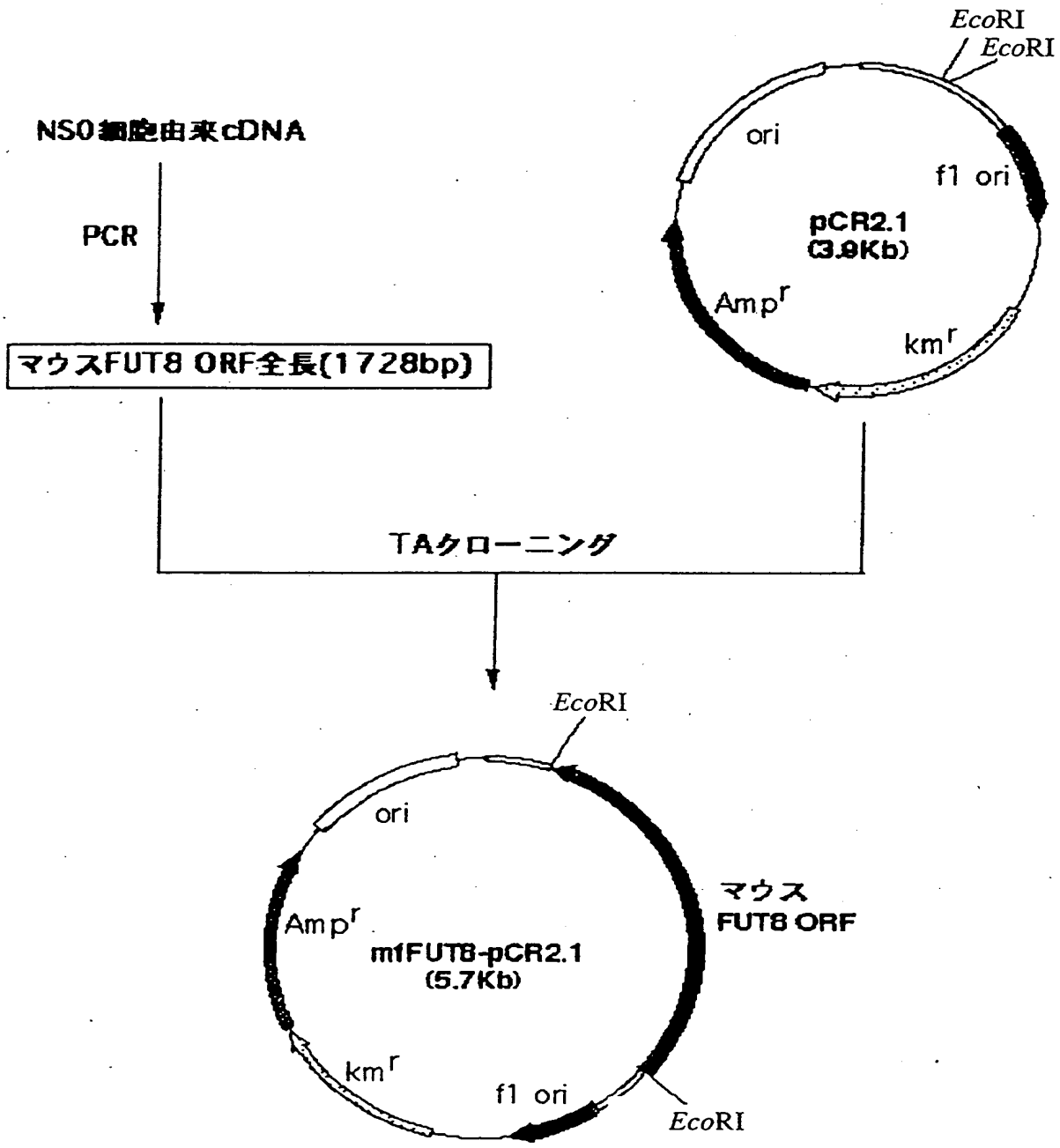
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 24 図



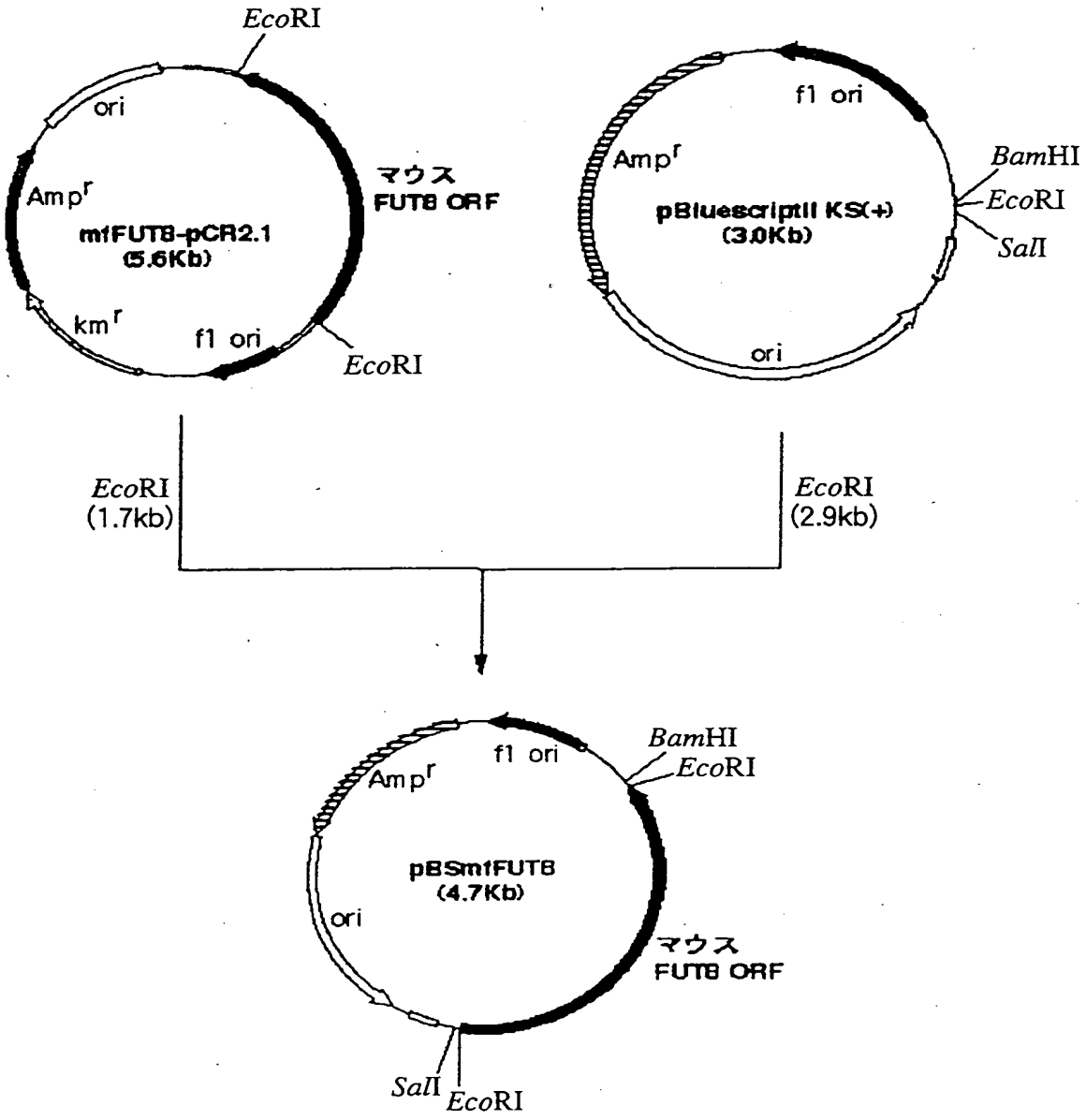
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第25図



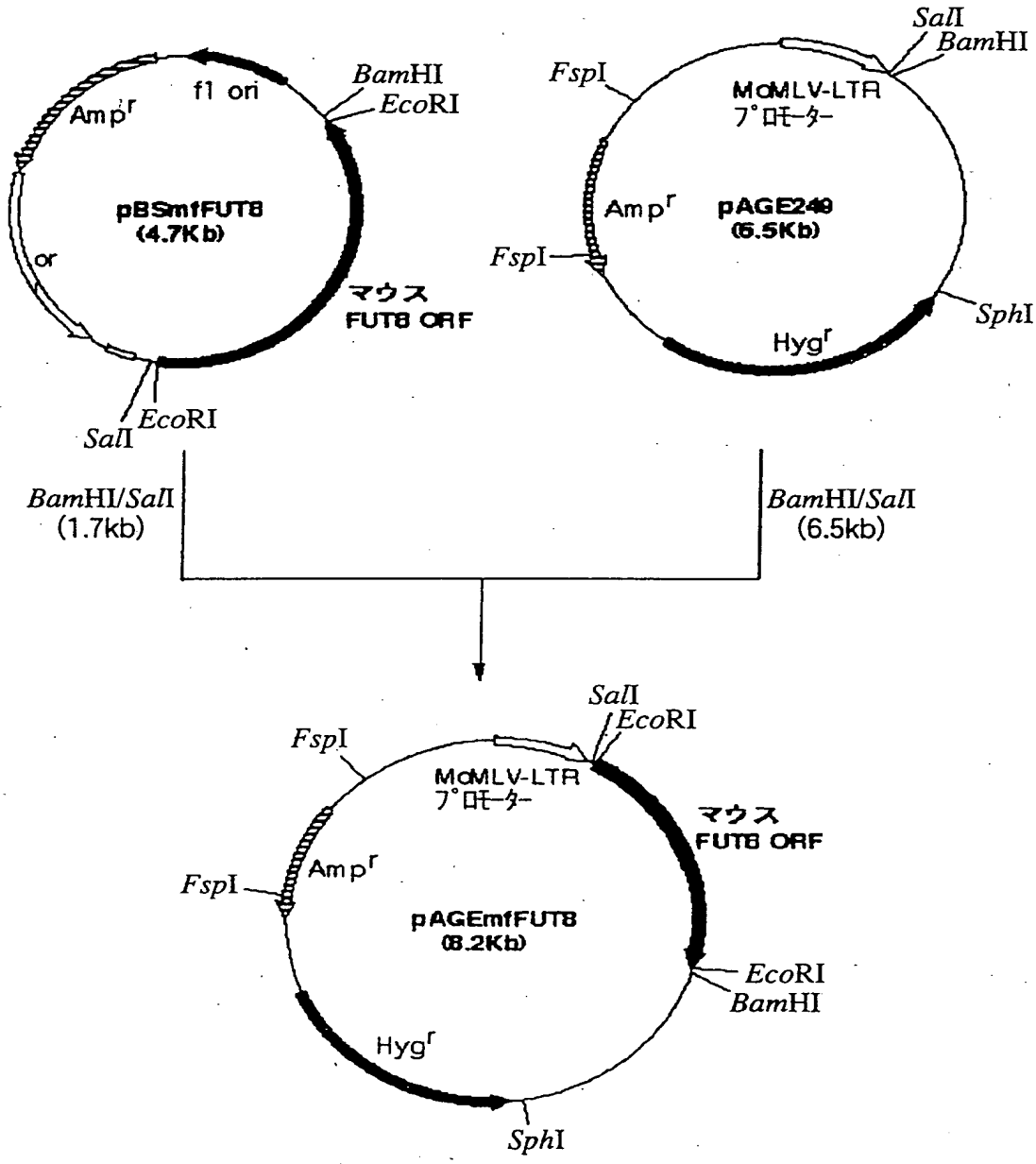
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第26図



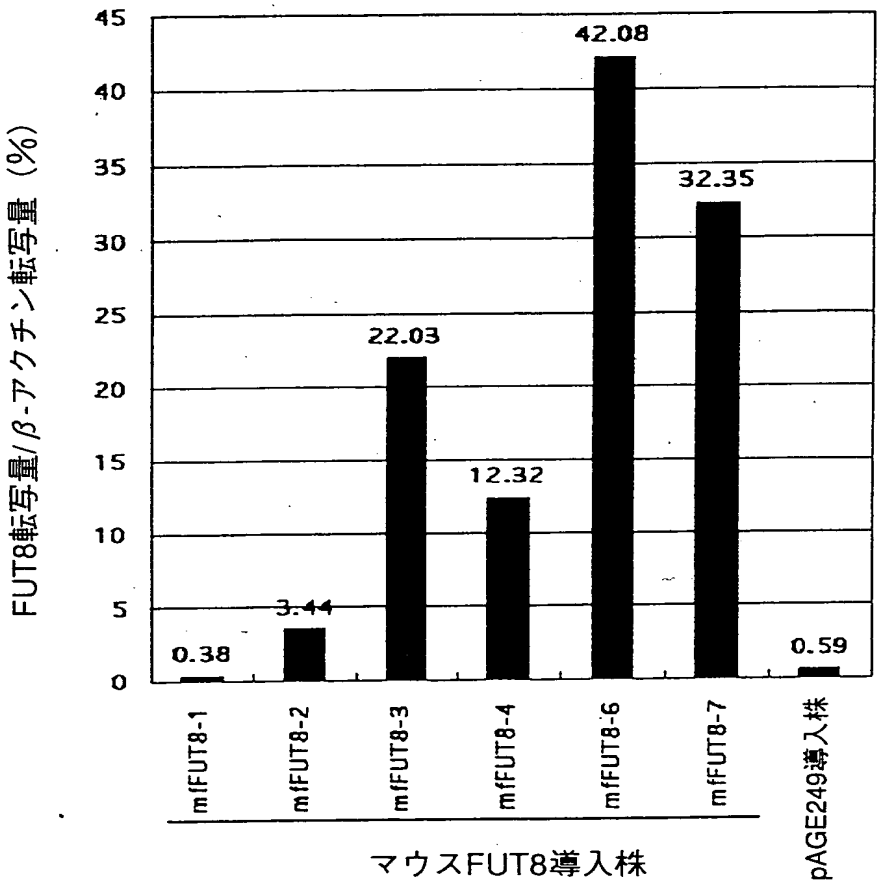
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第27図



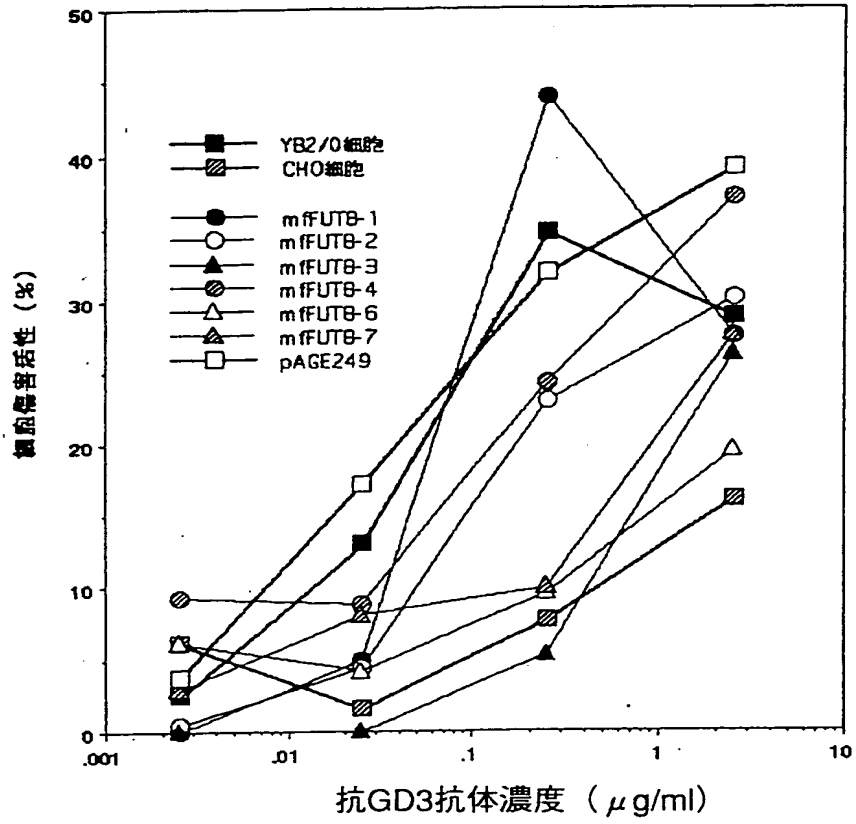
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 28 図



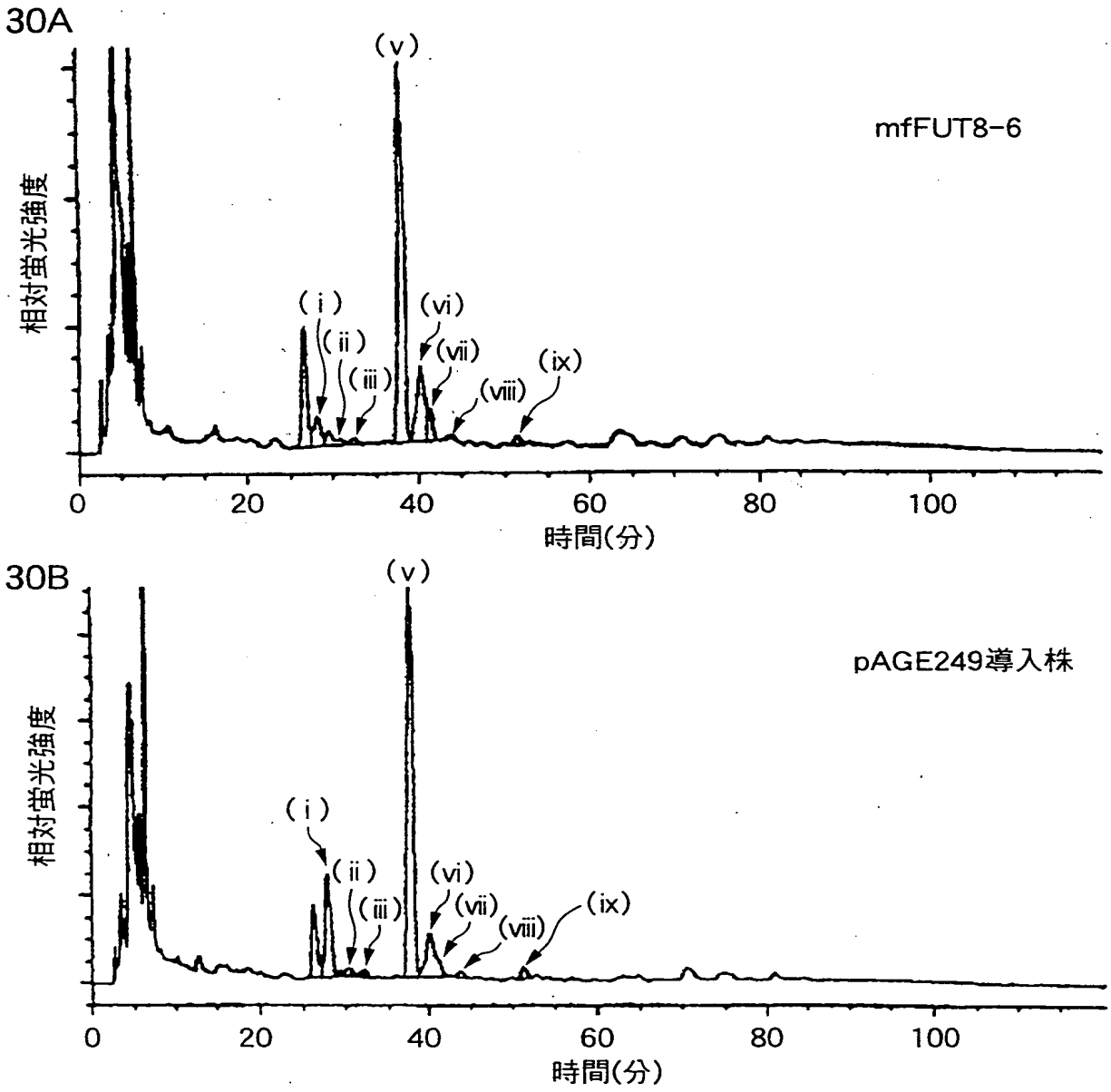
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 29 図



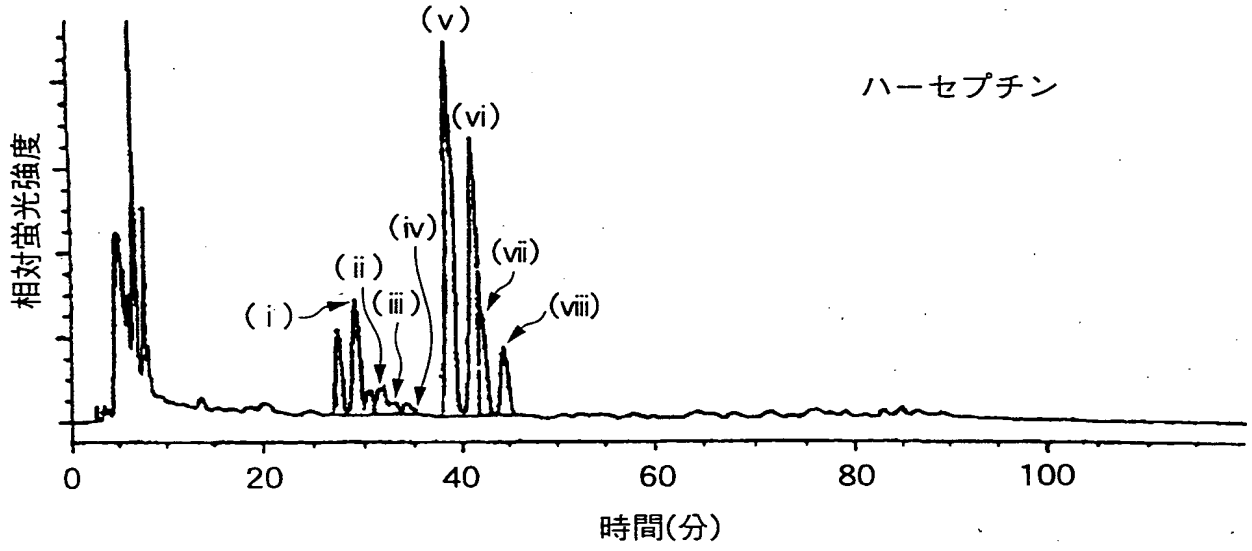
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第30図



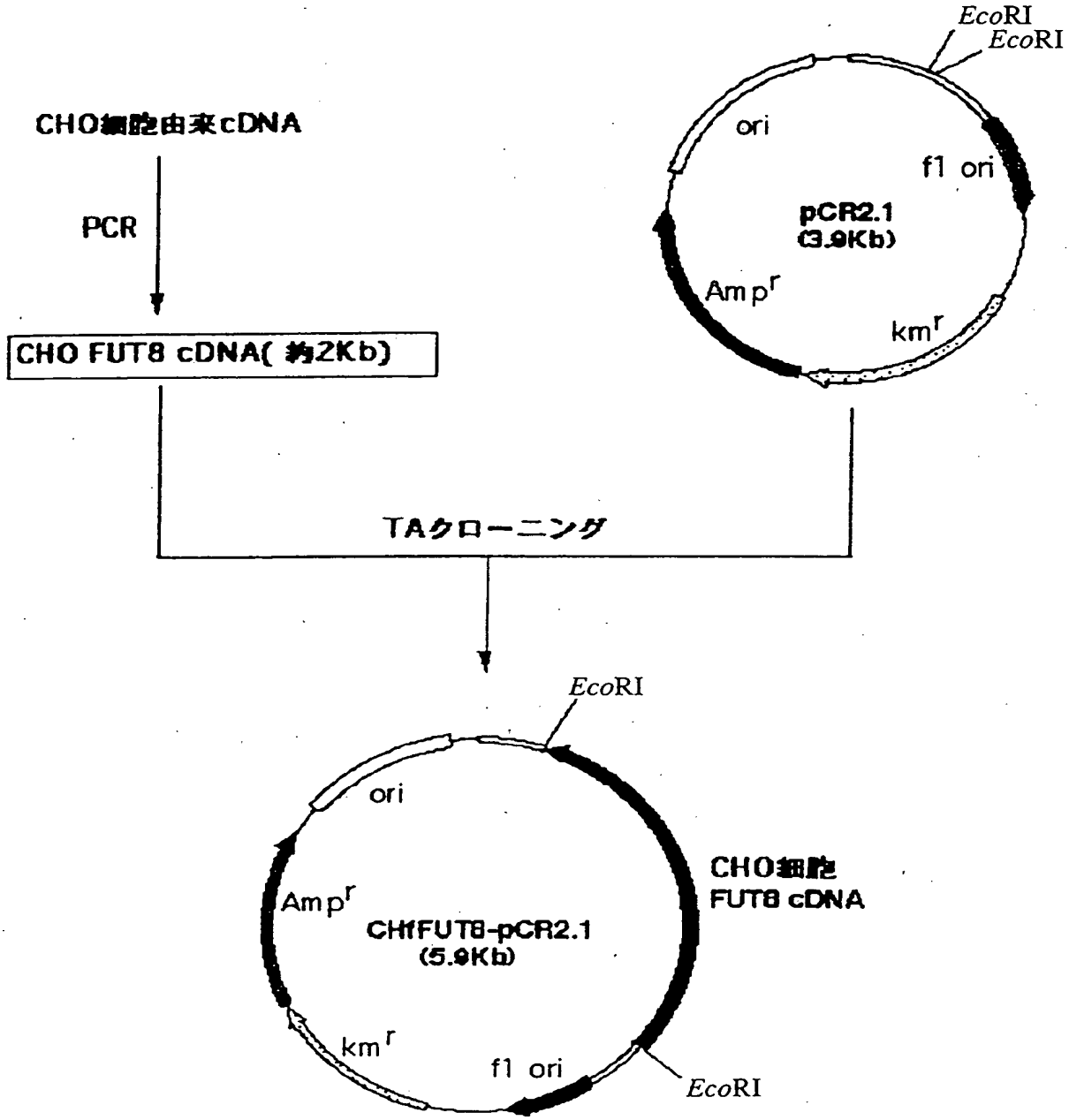
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第31図



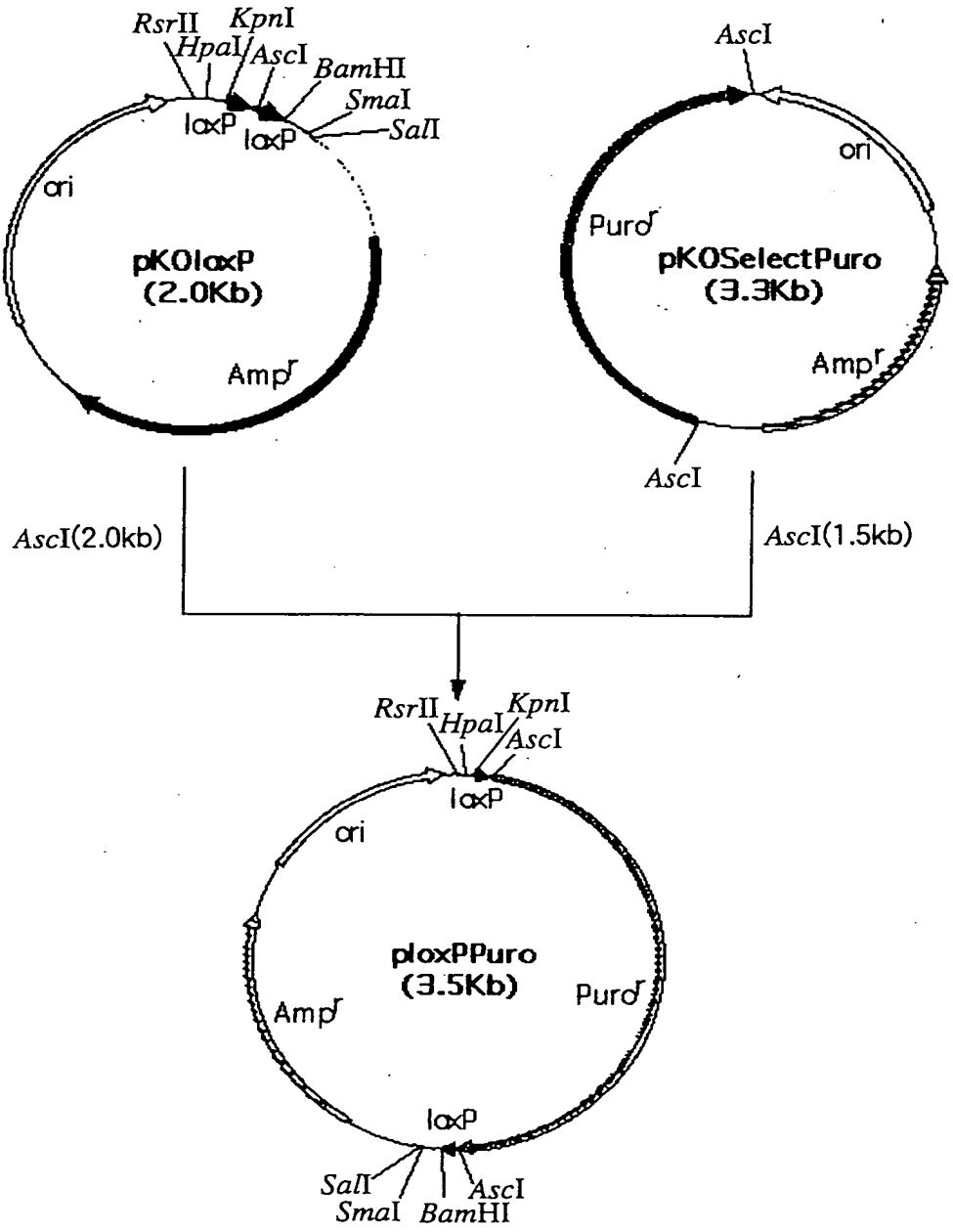
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第32図



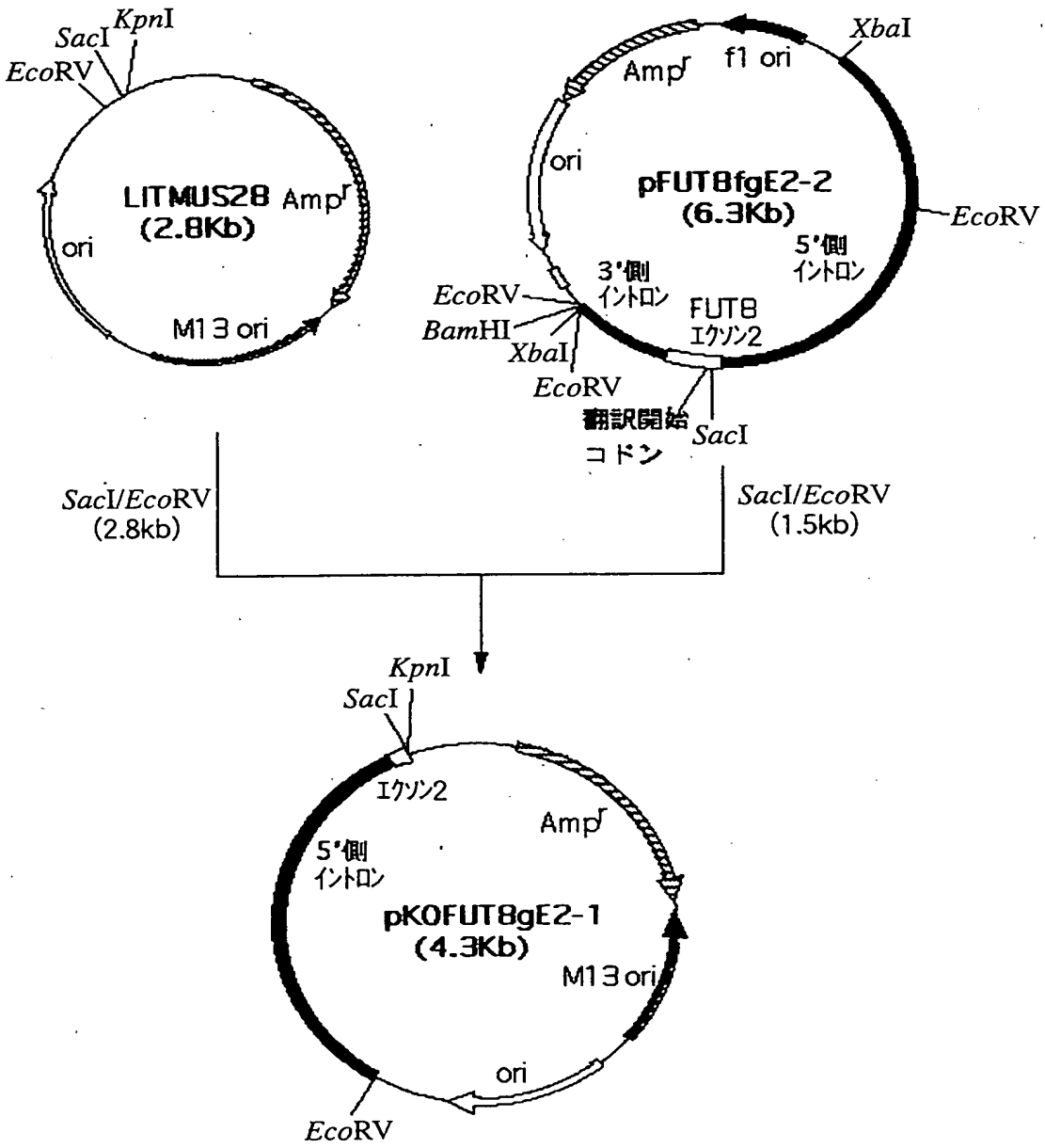
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第33図



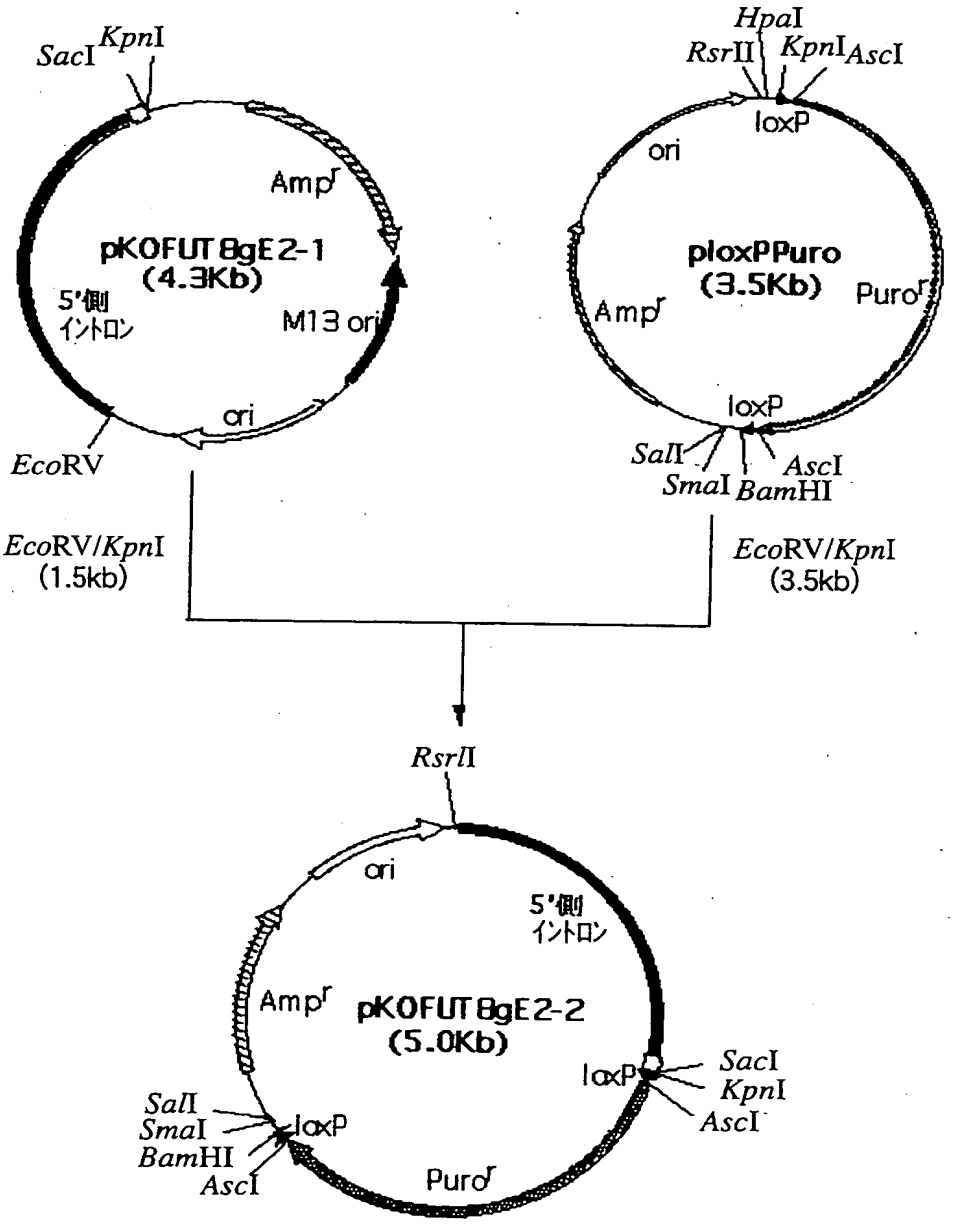
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第34図



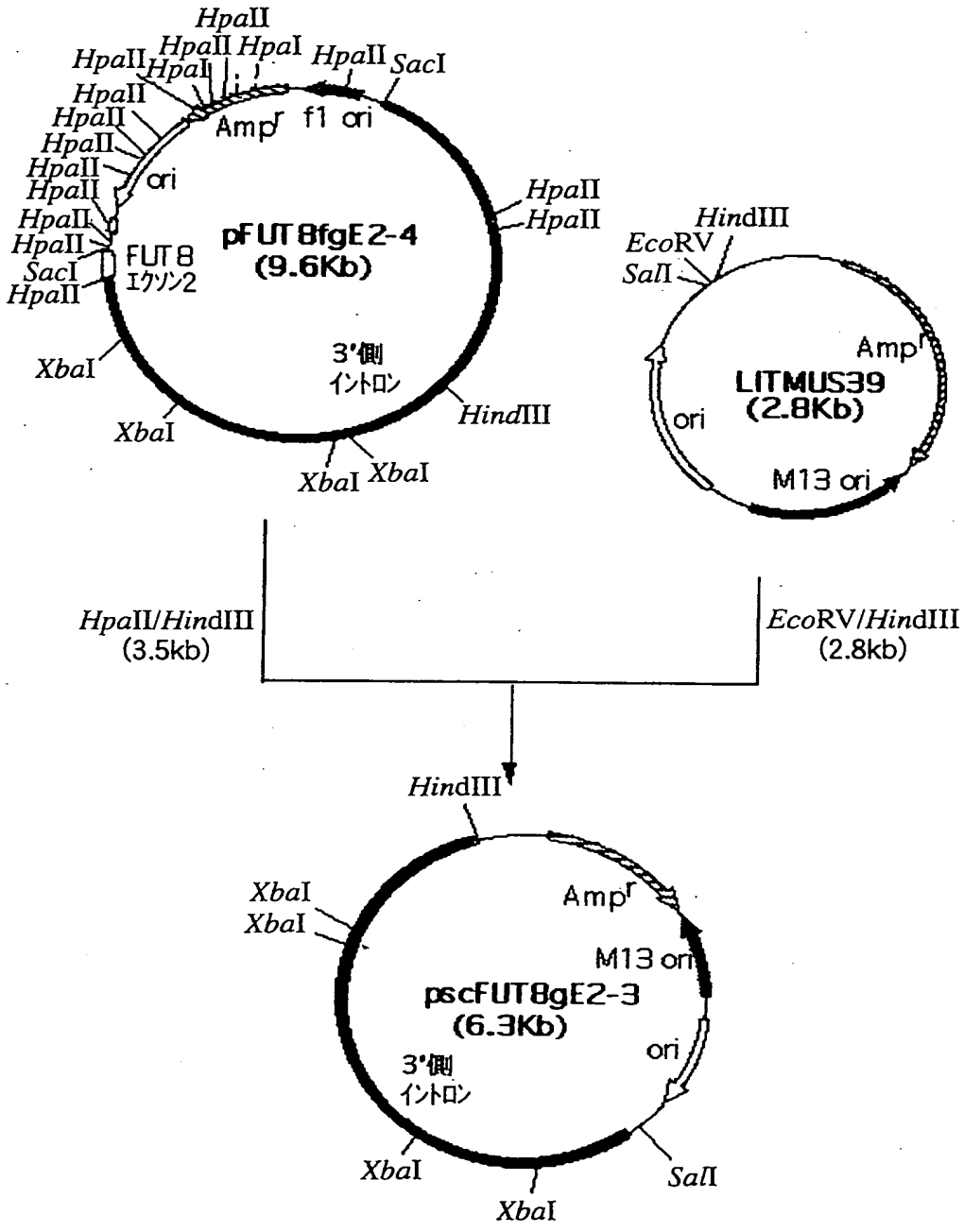
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第35図



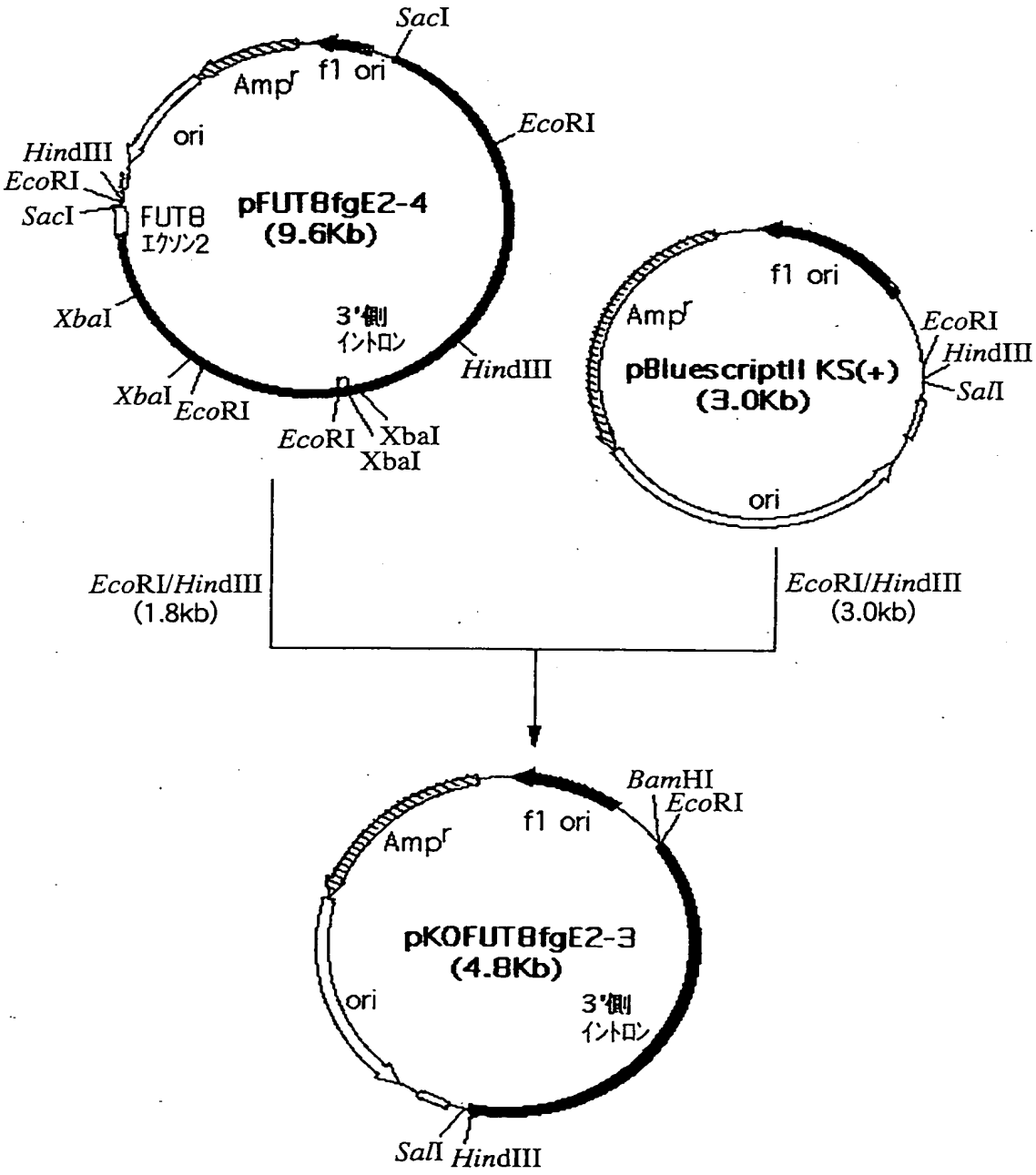
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第36図



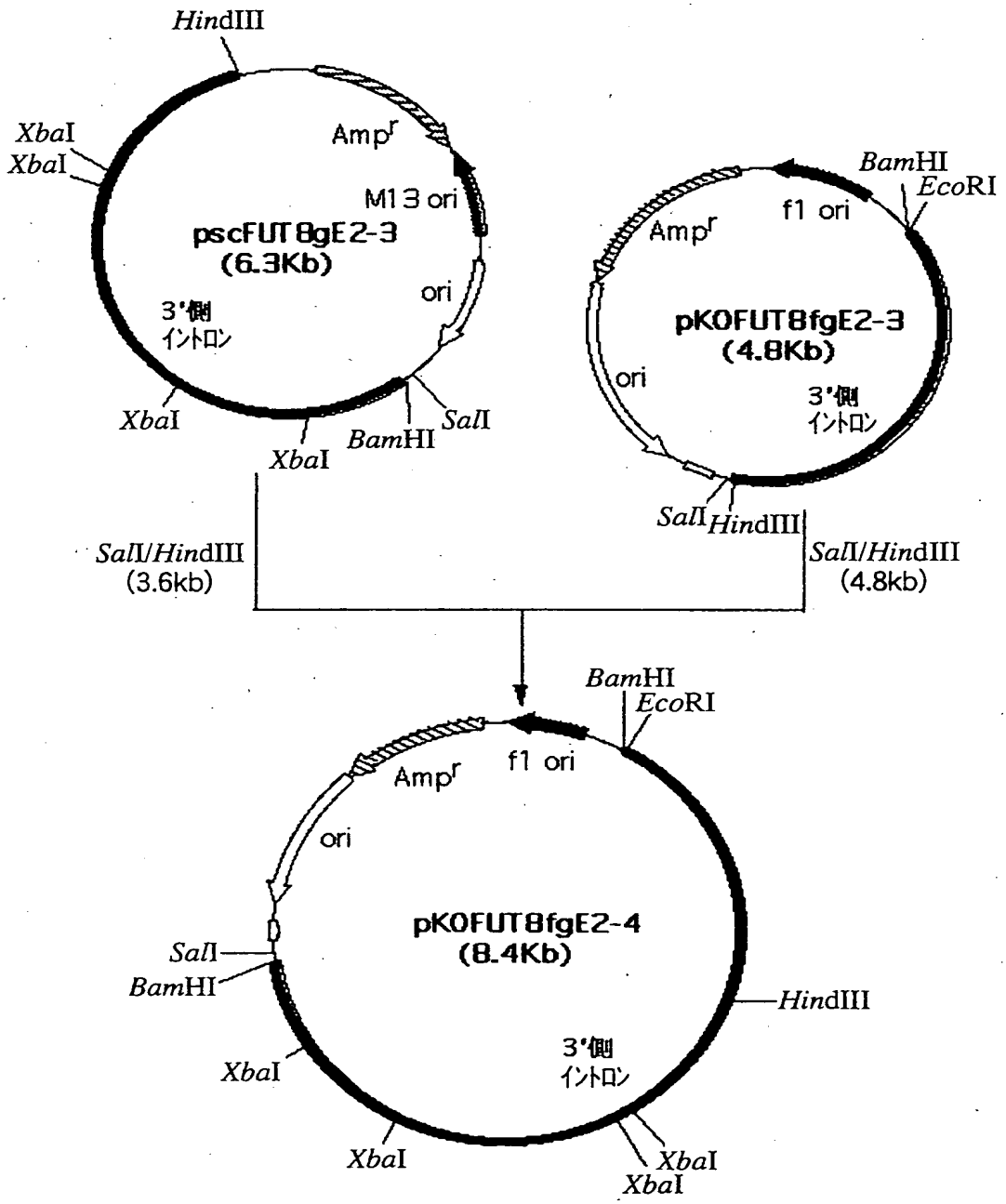
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第37図



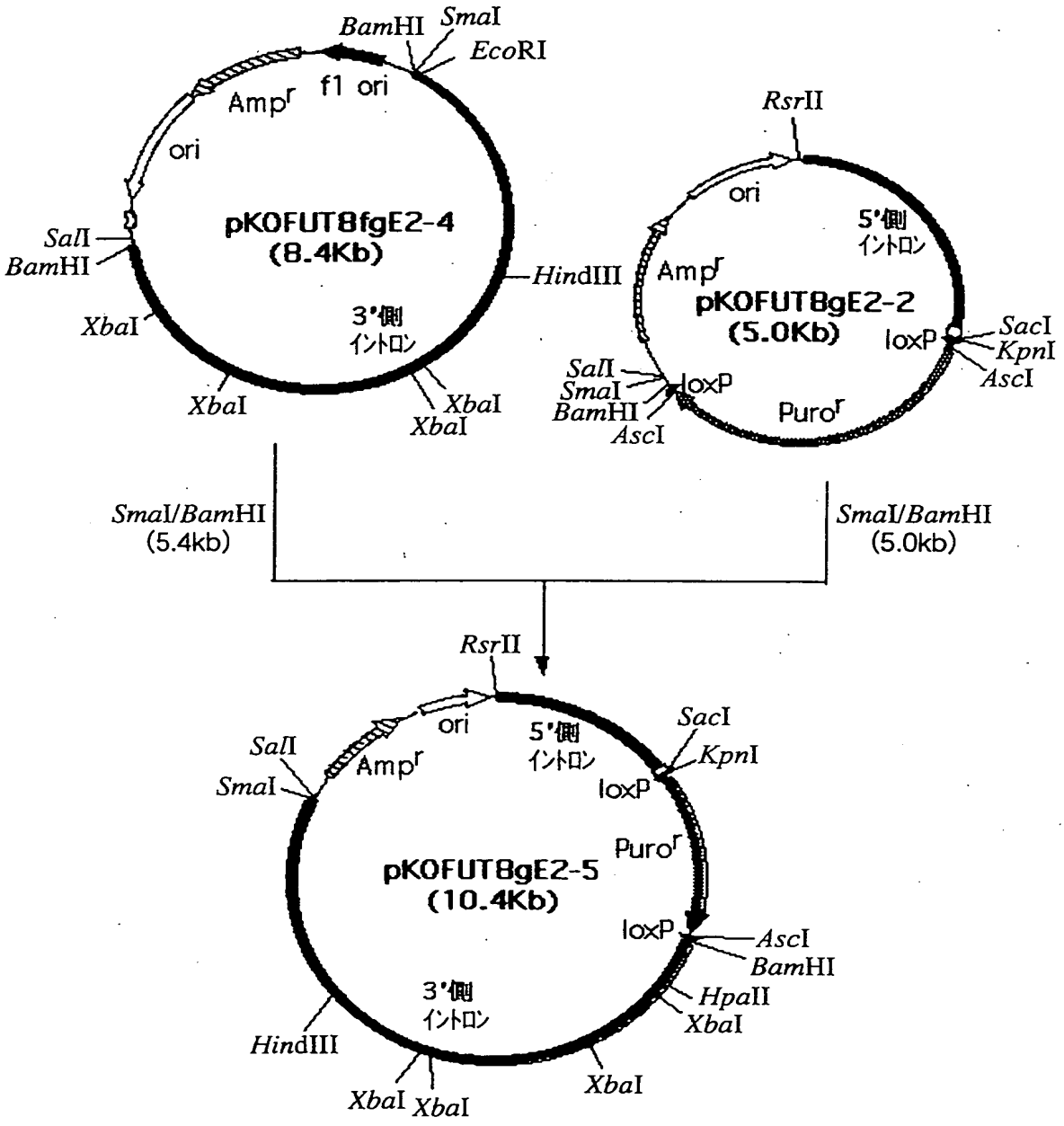
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第38図



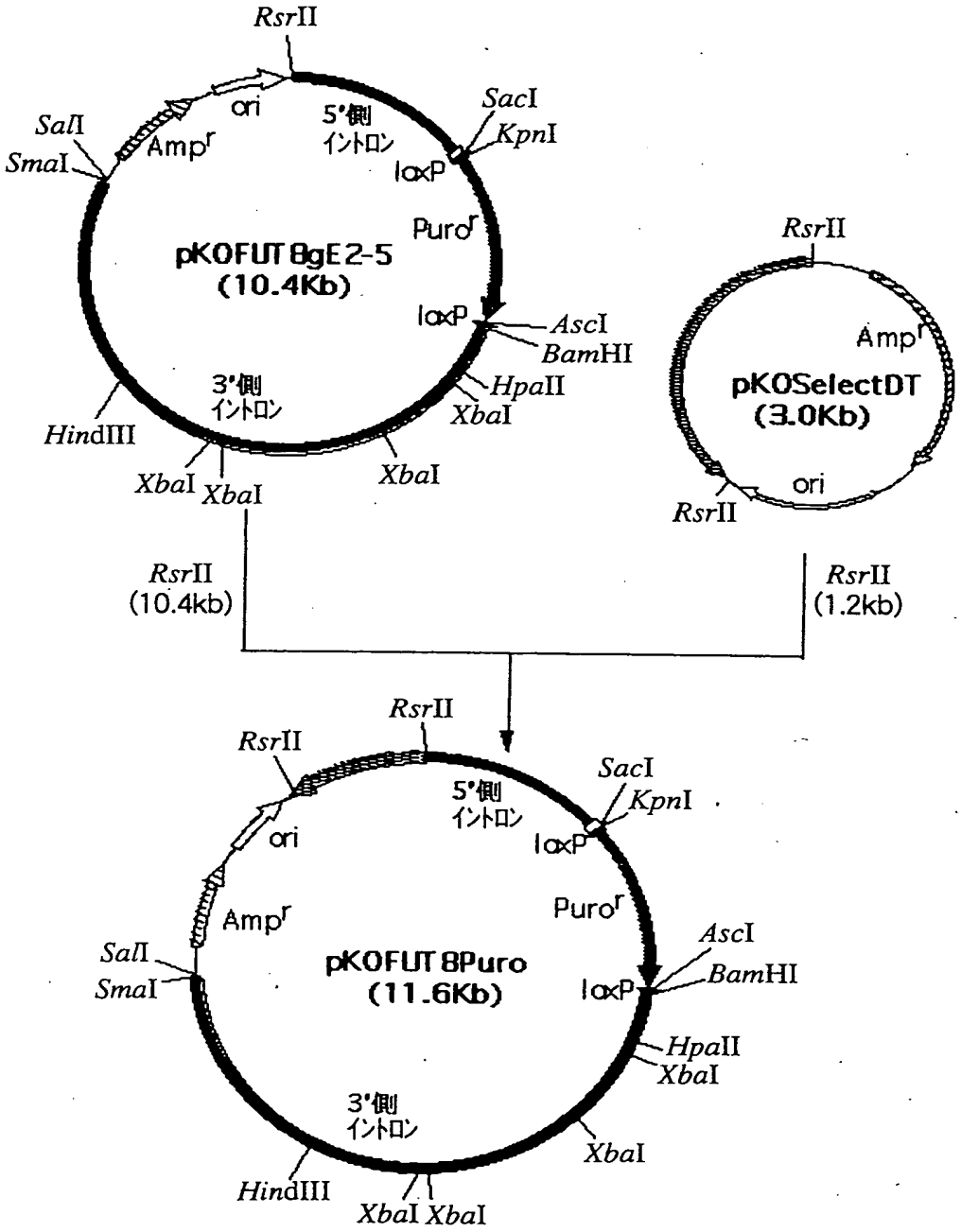
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第39図



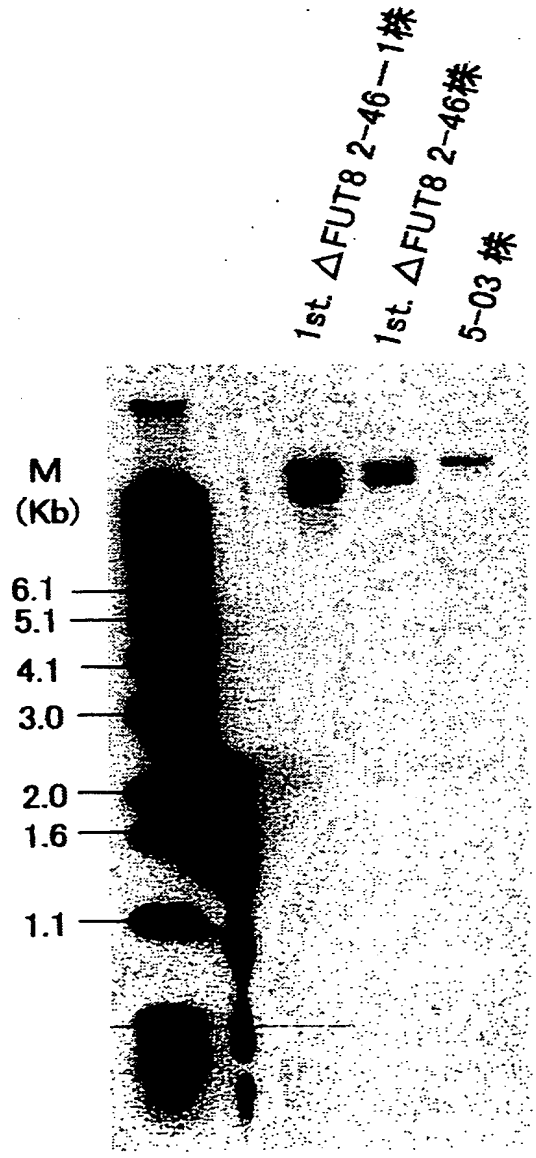
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第40図



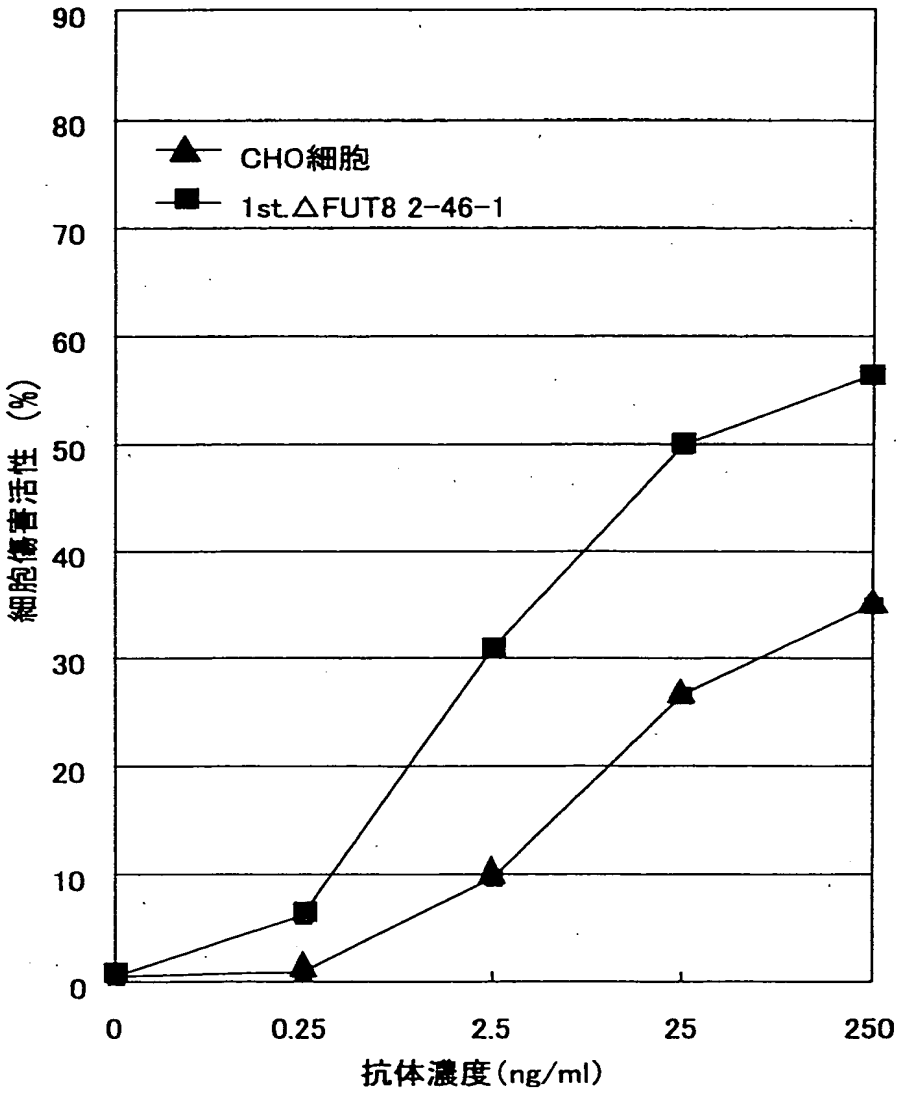
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 41 図



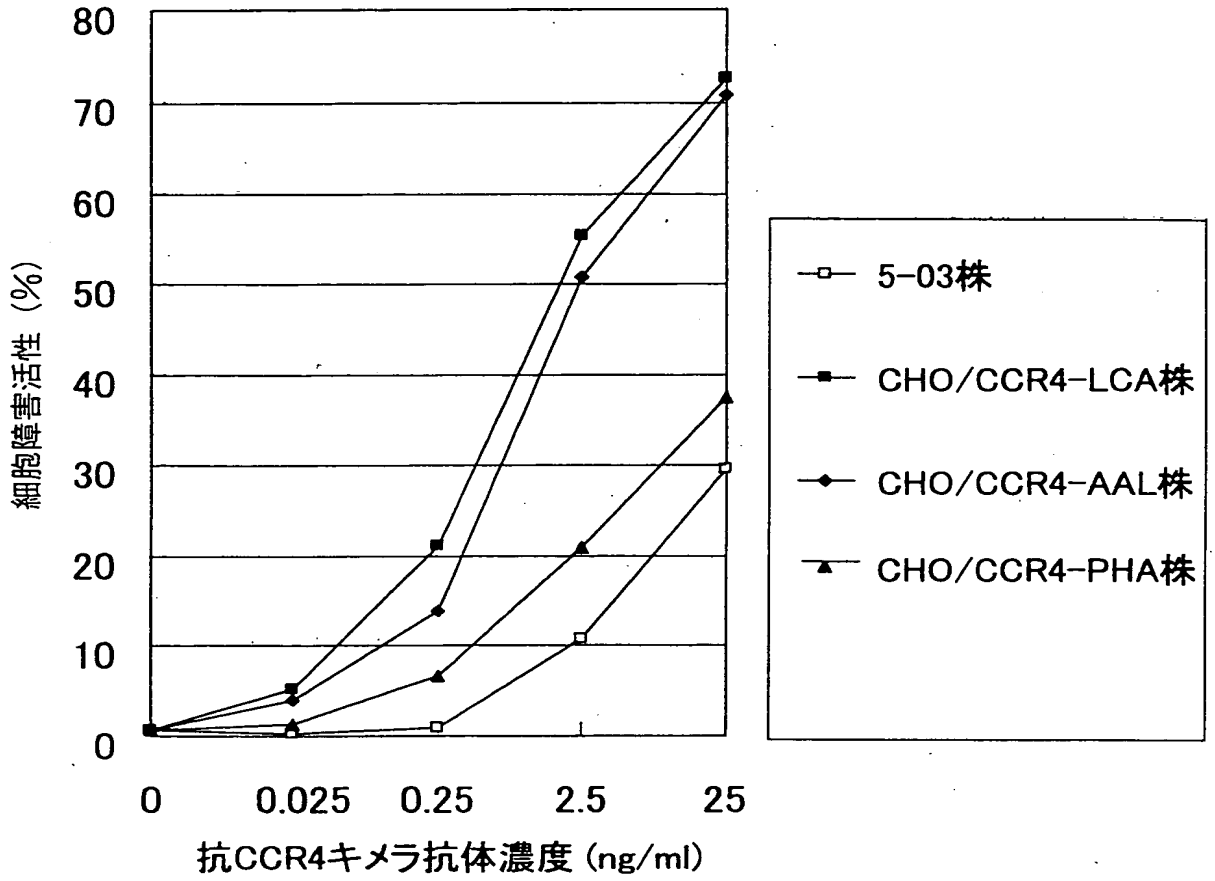
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 42 図



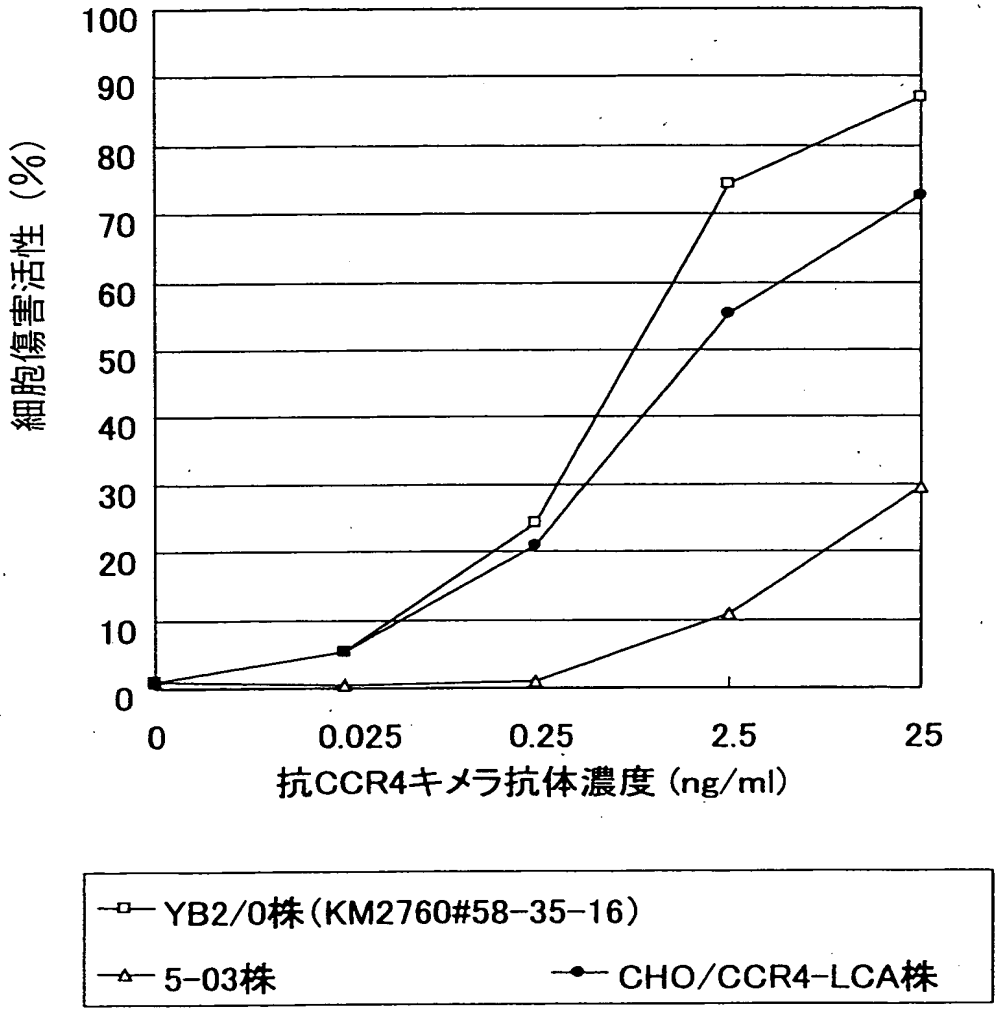
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 43 図



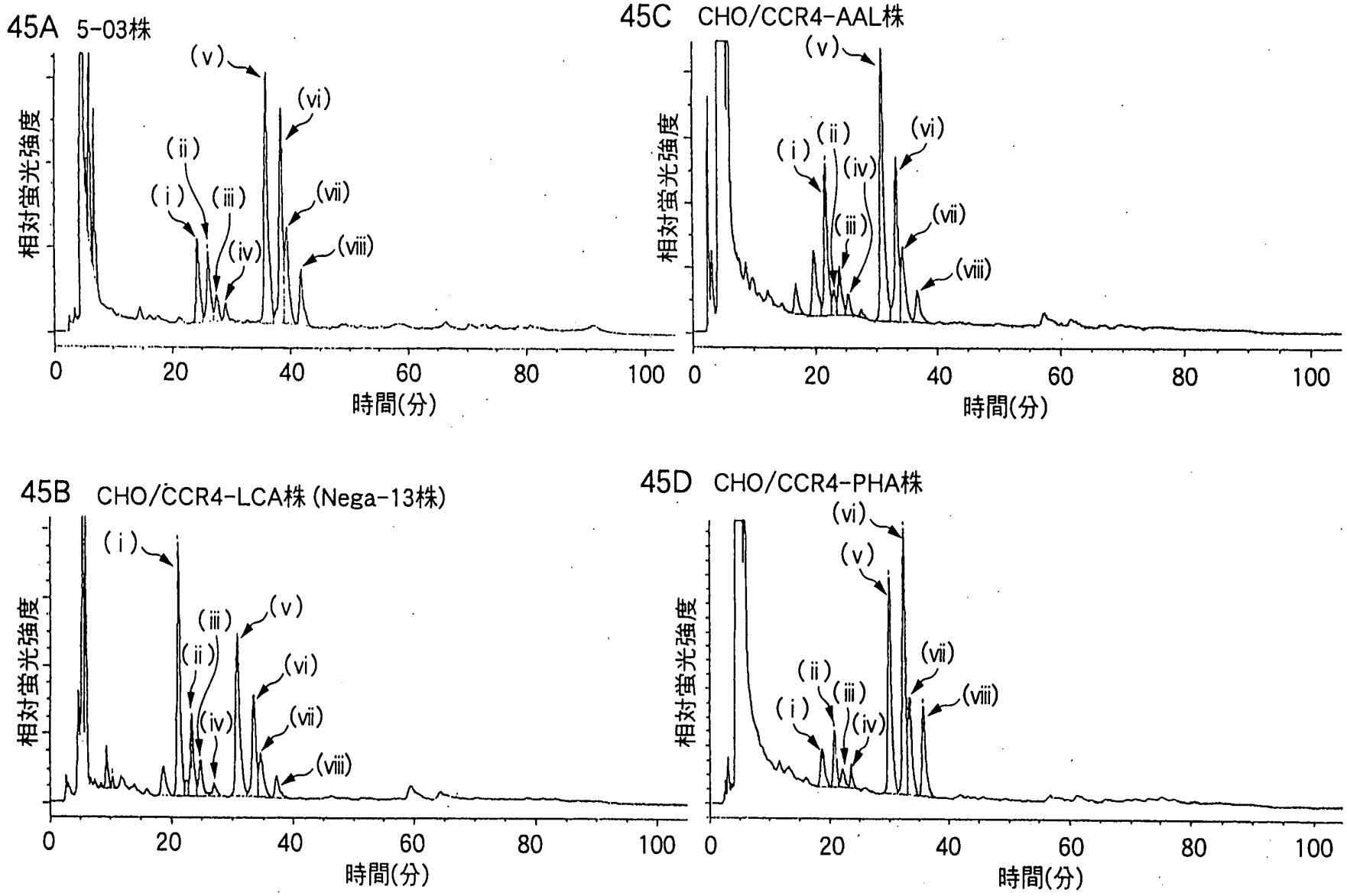
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 44 図



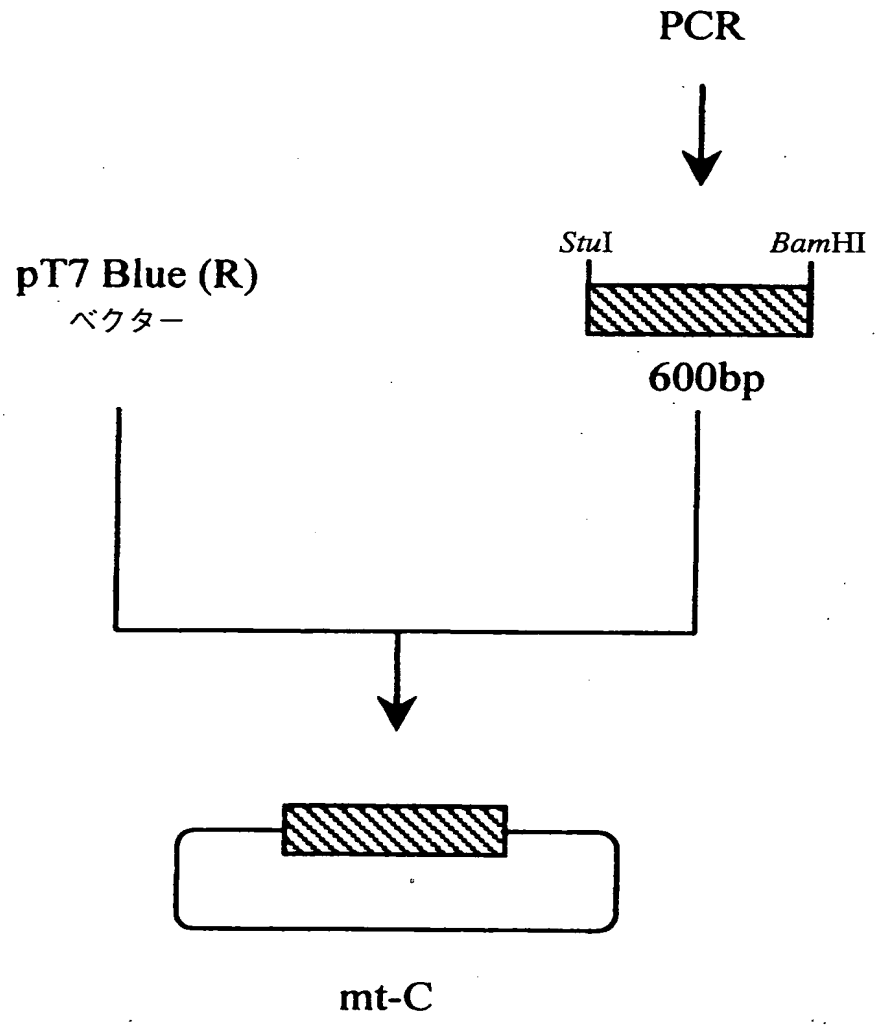
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第45図



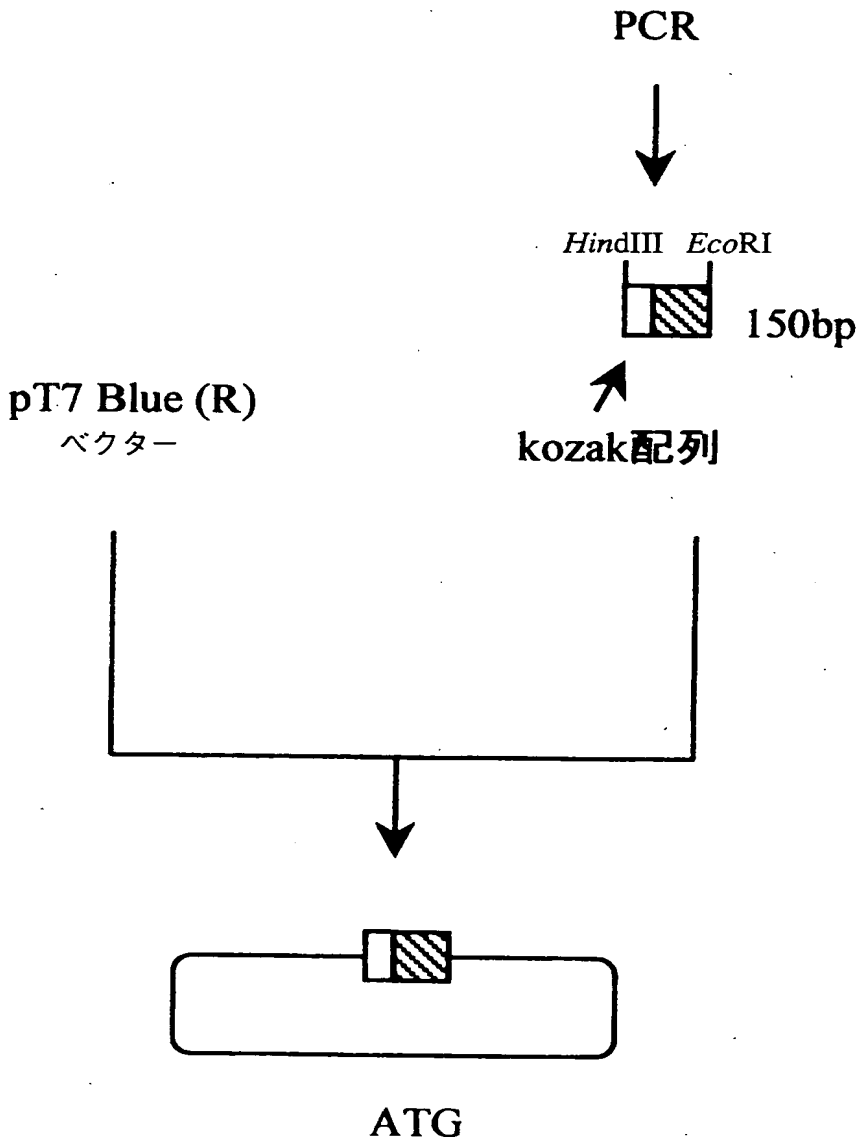
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第46図



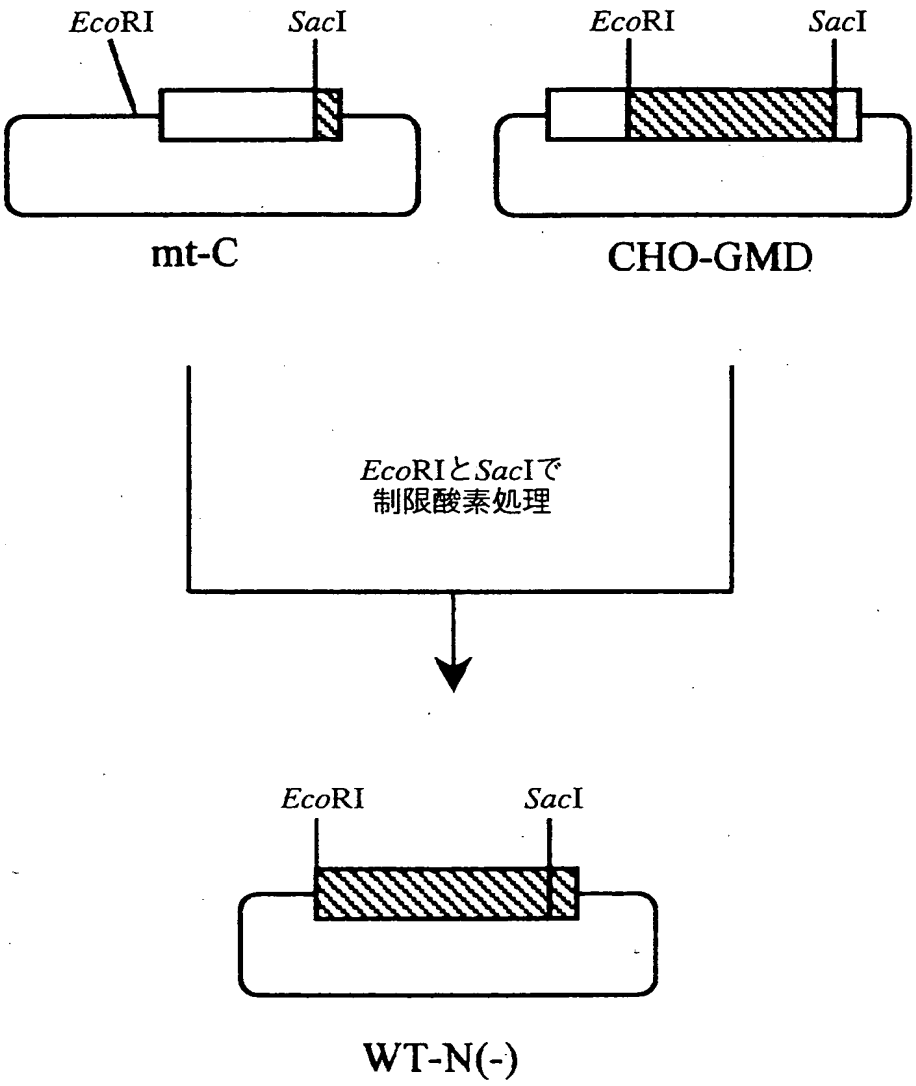
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第47図



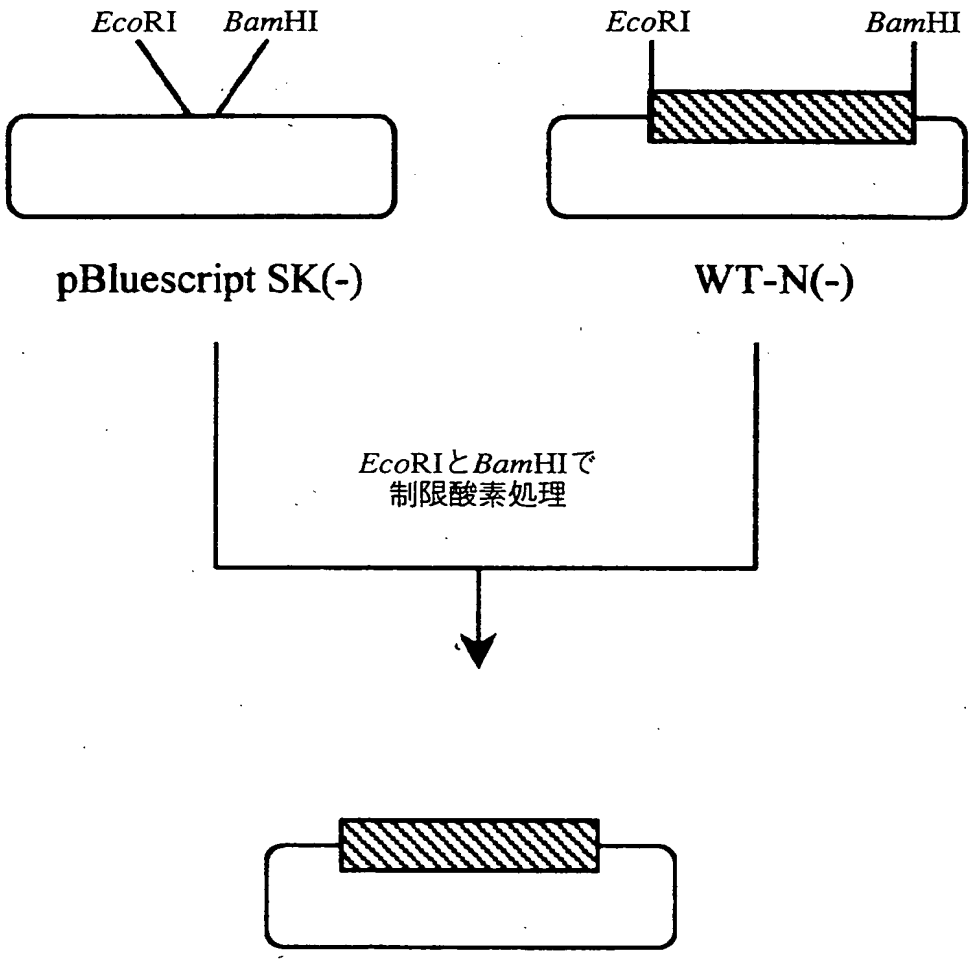
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第48図



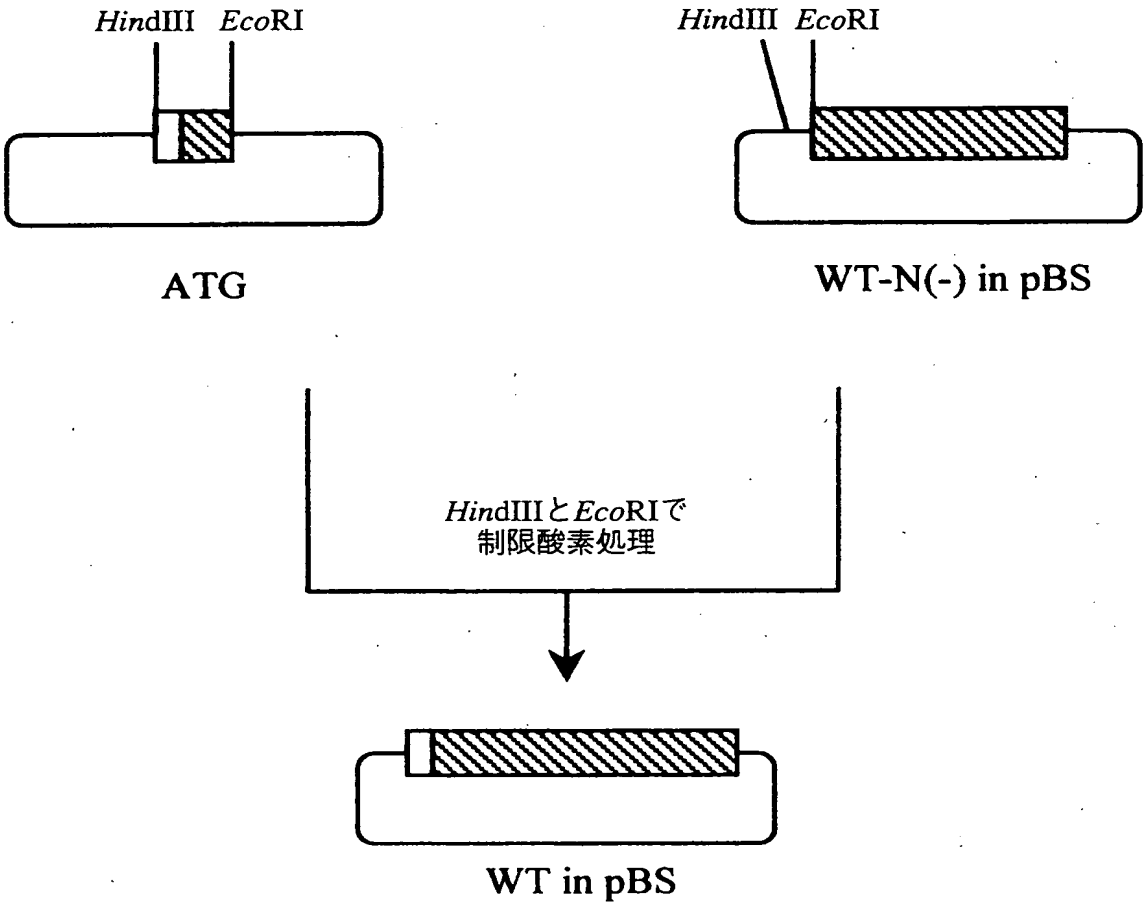
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第49図



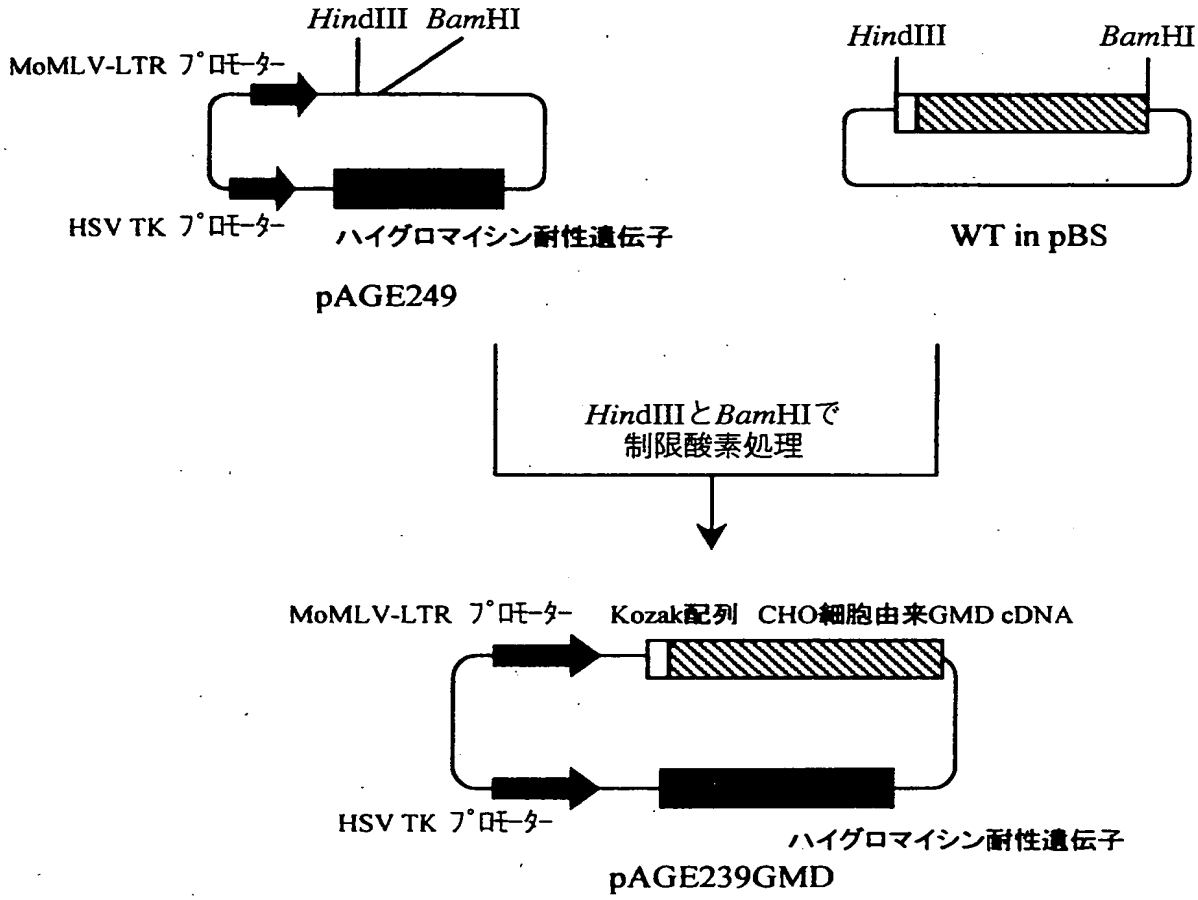
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第50図



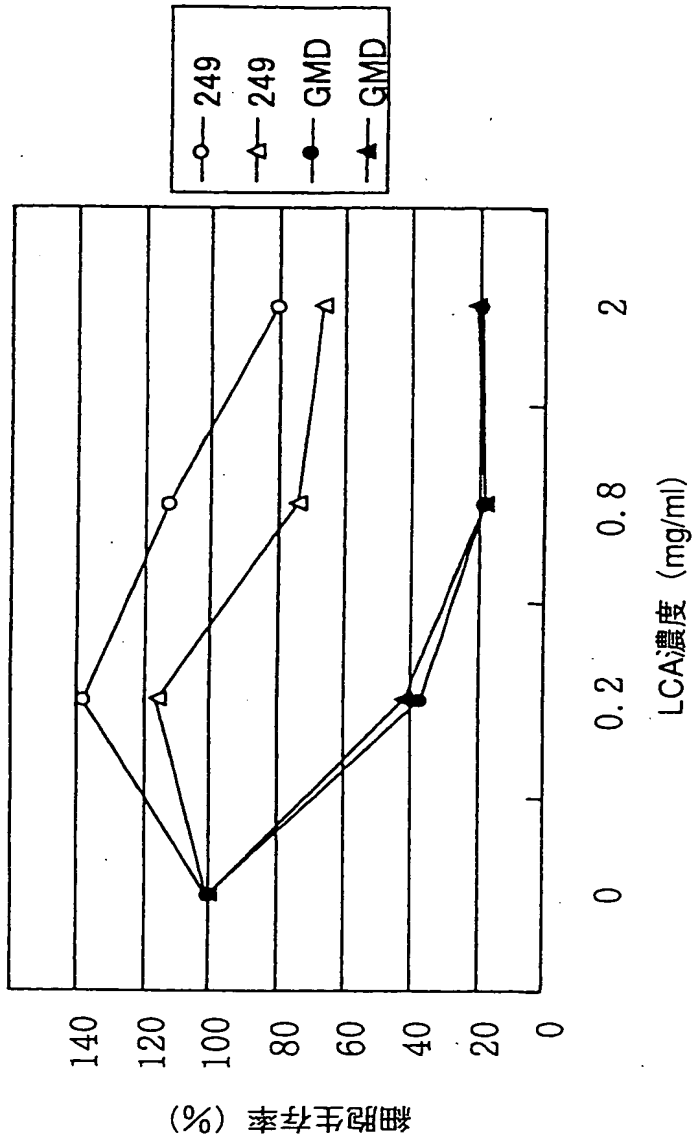
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第51図



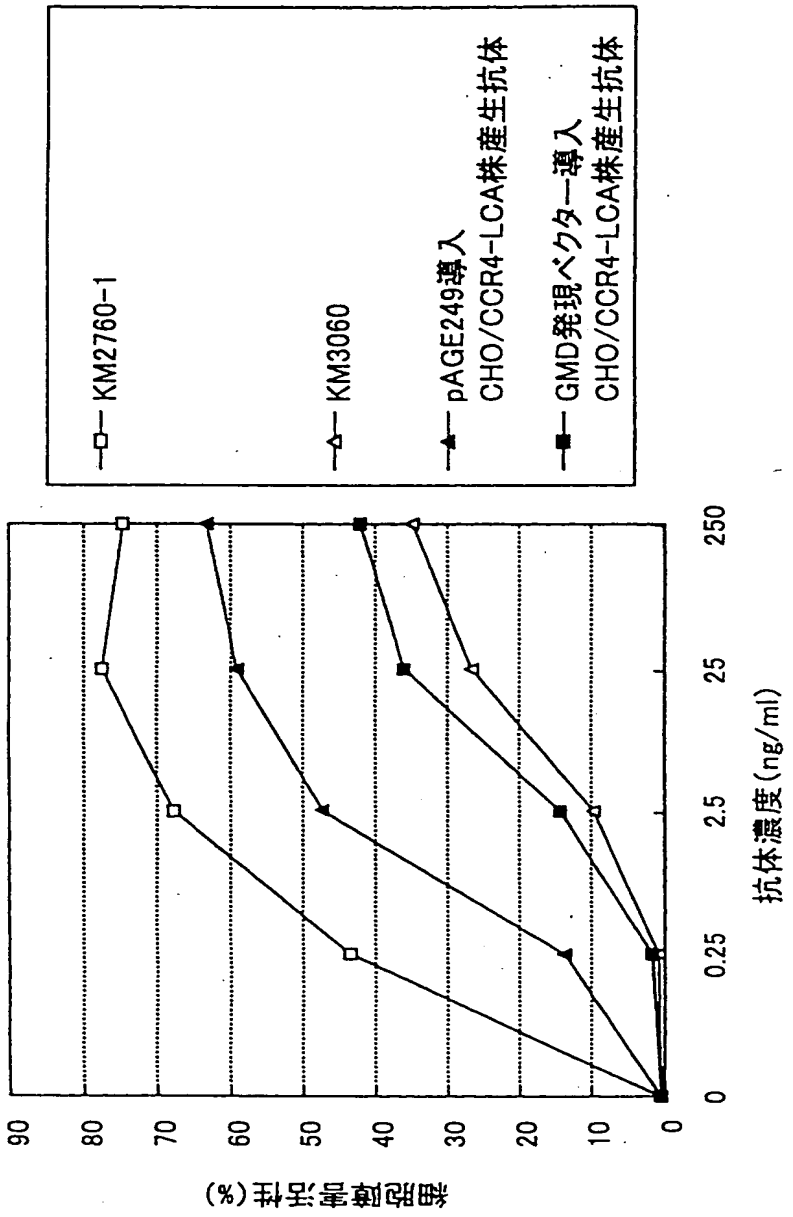
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 52 図



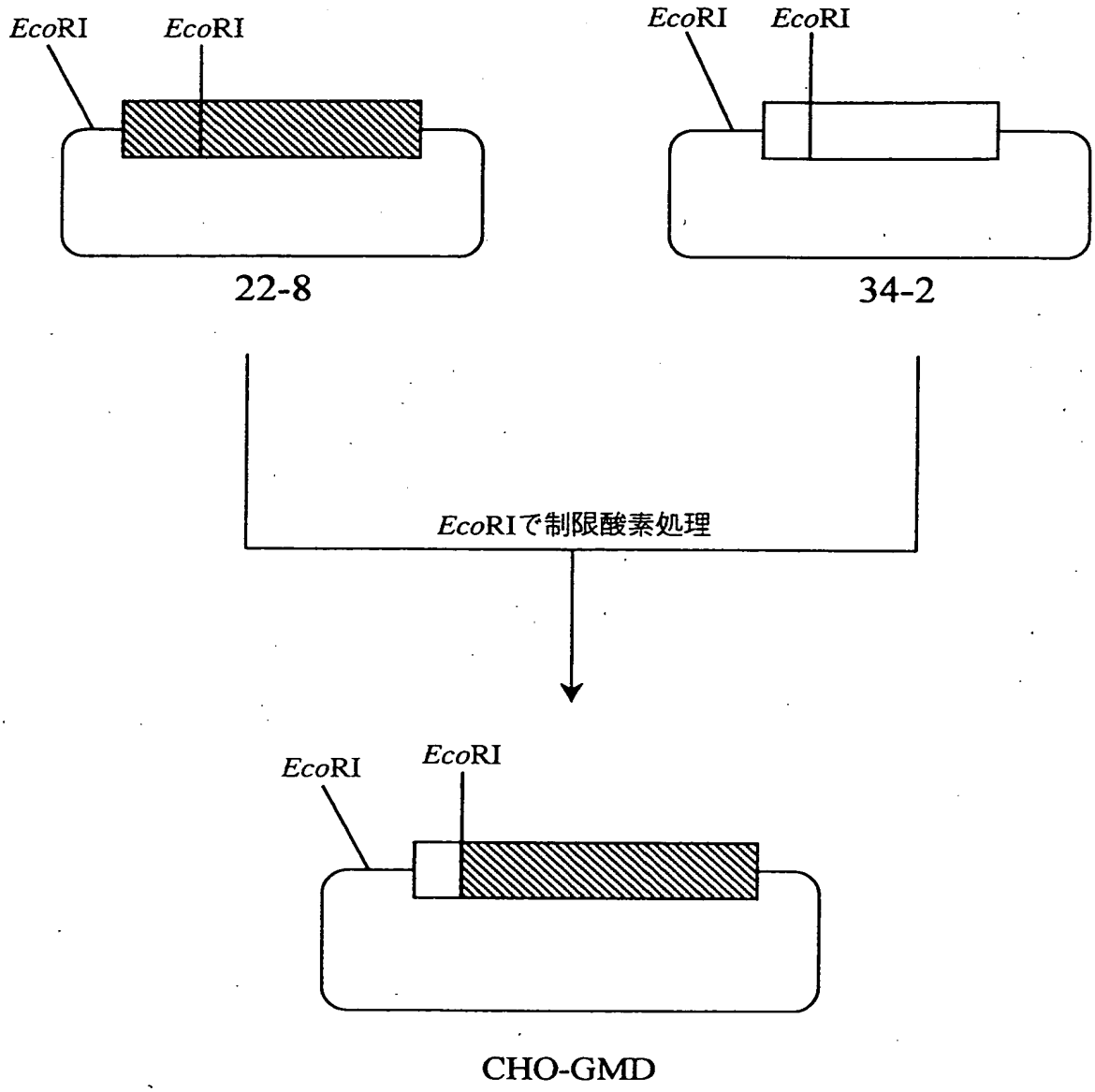
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第 53 図



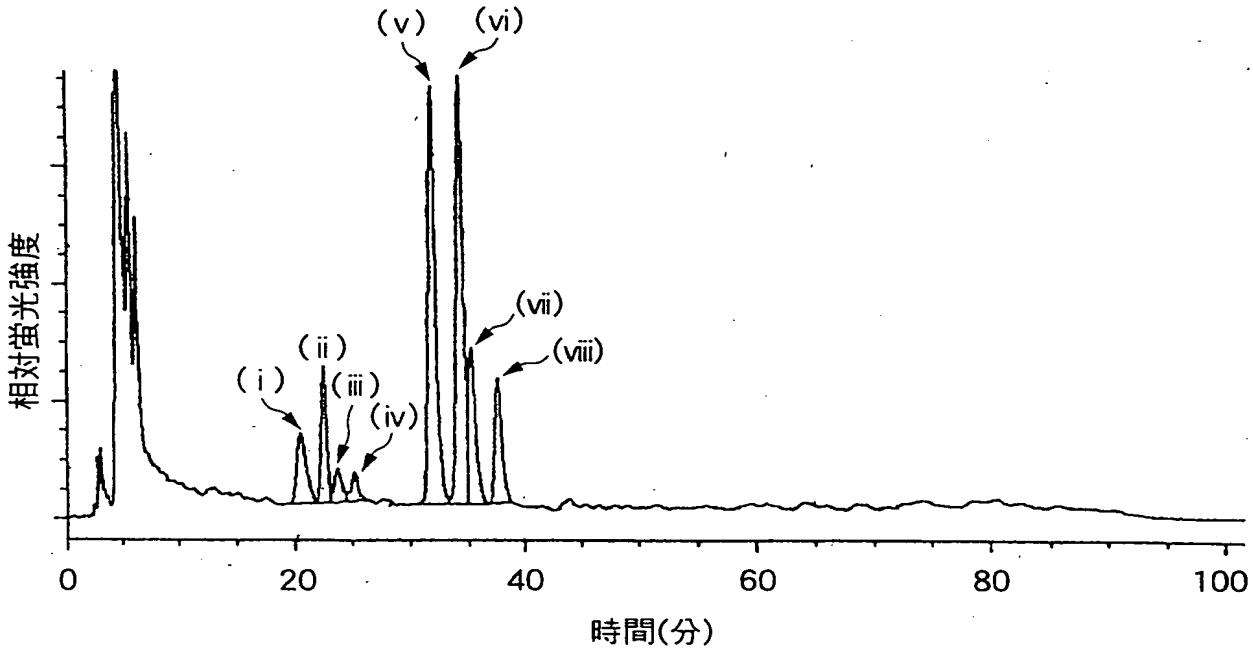
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第54図



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

第55図



Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

<130> P-38524

<150> JP 2000-308526
<151> 2000-10-06

<160> 73

<170> PatentIn Ver. 2.1

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

<400> 1
aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420

ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480

ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540

catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600

tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720

agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780

gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840

tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900

gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020

gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080

gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140

gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200

gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260

gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320

actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380

agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440

cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500

tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560

gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620

attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680

atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740

ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800

cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860

gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920

gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

gaagggctgc tgtgccctca agcccatg 2008

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

<400> 2
atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60

ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120

agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180

aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240

ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300

aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360

aatggagcta aagagctctg gtttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420

gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480

aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540

gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600

cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660

ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780

cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840

gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900

cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960

ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080

ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140

gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200

aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260

tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320

cggtacacag aaaattcact tcggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380

gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440

accctgcatc ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500

ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560

attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620

aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680

aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3
<211> 9196
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 3
tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgctg 60

ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120

atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctattt tgttatacat ttttgcgtaa 180

attattcttt tttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240

ttttgtctat gtatttgcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300

ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgctata taagttgtta 360

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420

atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480

ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600

gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660

ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720

tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780

atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840

aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900

cccaccacct ccagagtggt aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960

aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020

cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080

agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140

atagtcagtg agtatacccc tcccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200

gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260

caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat ccccttttctt 1320

cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380

tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440

tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500

tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560

tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtta gccttctttt ggaattttta 1680

ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740

tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800

ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860

ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920

gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980

ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040

tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100

cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160

aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220

agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280

ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340

gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcatc 2400

acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460

attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520

aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580

tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640

agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700

gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760

aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820

ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880

tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000

attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatttttt 3060

attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120

tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggtaattat 3180

tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcat cagttgtttg 3240

gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300

ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360

tctaagaatg atcatgtgta cagtgcttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420

tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480

agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540

tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600

cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660

aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720

tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780

agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840

cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900

gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960

gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020

tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080

aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140

tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgacccaga aaattttatt 4200

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260

gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320

tccttttttc ttaccacaaa gtatcttgtt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380

aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440

agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500

ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560

caaggaaagg gtccagggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620

cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680

ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740

gacttccccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800

taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860

ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatcttttt taagggacaa 4920

agagtttatt cagattacat tttaaggtga taatgtatga ttgcaaggtt atcaacatgg 4980

cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040

gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100

tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160

catctctcca gtccctcata tggtctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220

aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280

aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340

gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400

tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460

tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580

aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640

caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700

gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760

tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820

tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttgtt ccattctggg 5880

tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaaggtgt ggtagtattg gaaggctctc 5940

aggtatatat ttctatattc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000

ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060

tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120

atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180

ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240

gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300

ttctatattt tttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtgaa catattttca 6360

atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420

tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480

attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540

tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaatct tatatagcat 6600

gttgtttgtt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660

atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720

ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

cttgttttct gtgaattaac ccctttcaa aggtttcttt tctttttttt tttaagggac 6840

aacaagttta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900

ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960

tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020

tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080

atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140

ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200

gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260

gattttgtga agttcctatt caagtccctg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320

aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tacttttta aagttagata ttattttcaa 7380

gtatgttctc ccagtctttg gcttgtattt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440

ttatttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500

tccctcccct cctcccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560

aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620

ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680

cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740

tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800

tcccagatat cagtctgggg tccatgagca acccccttgtt caggtcagtt gtttctgtag 7860

gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920

ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcatc tgcttccatc agctactgga 7980

tgagggctct aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggctttt 8040

aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tccctttttct 8160

tgctctcatc cgttcctccc ctgactagat cttcctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220

tccccttctc cccttctctt tcttctaact ccctctcccc tccacccacg atccccatta 8280

gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340

aatatgctta tatcaggttt attttggcta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400

accttaattg acatgtatcc ttatatttag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460

ttttttttttt ttaaagattt atttatttttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520

caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580

gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640

gtttctttta aagaggatag cagtgcatca tttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700

actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttatc 8760

ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820

ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880

gtgttgacta catgtatgtc tgtgcaccat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940

gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000

aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060

caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagcaccc 9120

atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180

aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4
<211> 25
<212> DNA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4
actcatcttg gaatctcaga attgg 25

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 5
cttgaccgtt tctatcttct ctcg 24

<210> 6
<211> 979
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 6
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgtttag 60

acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120

agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180

tcctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240

tggtgatcct gcagtgtggt gggtatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300

ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360

tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420

ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

taaaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600

ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctcccaggc 660

tgacttcctt gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aaatcatgca 720

aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780

aggccaaaat gcccacaacc agattgcagt ttatcctcac caacctcgaa ctaaagagga 840

aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900

taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaaac aggcctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960

gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 7
<211> 979
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 7
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgtttag 60

acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120

agtgaatgac aaaaatattc aagtggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcatcctcg 180

gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240

tggtgatcct gcagtgtggt gggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300

ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcat 360

tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420

agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480

taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600

tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660

tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720

aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780

aggccaaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840

aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900

taaaggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960

gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 8
aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt 40

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 9
atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

<210> 10
<211> 40

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 10
atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg 40

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 11
ctccaattat gaatttatta gtg 23

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 12
ggatgtttga agccaagctt cttgg 25

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

gtccatggtg atcctgcagt gtgg 24

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 14
caccaatgat atctccaggt tcc 23

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 15
gatatcgctg cgctcgttgt cgac 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 16
caggaaggaa ggctggaaaa gagc 24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

<400> 17
gatatcgctg cgctcgtcgt cgac 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 18
caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 19
atgcgggcat ggactggttc ctgg 24

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 20
ctatttttca gcttcaggat atgtggg 27

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 21
gtctgaagca ttatgtgttg aagc 24

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 22
gtgagtacat tcattgtact gtg 23

<210> 23
<211> 575
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 23
Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 575
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24
Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 18
<212> PRT

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15

Pro Cys

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

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

<400> 26
cttgtgtgac tcttaactct cagag 25

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 27
ccctcgagat aacttcgtat agc 23

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

ggtaggcctc actaactg 18

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 29
catagaaaca agtaacaaca gccag 25

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 30
gagacttcag cccacttcaa ttattggc 28

<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 31
gaggccactt gtgtagcgcc aagtg 25

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

<400> 32
aggaaggtgg cgctcatcac gggc 24

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 33
taaggccaca agtcttaatt gcatcc 26

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 34
caggggtgtt cccttgagga ggtggaa 27

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 35
cccctcacgc atgaagcctg gag 23

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 36
ggcaggagac caccttgcga gtgcccac 28

<210> 37
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 37
ggcgctggct tacccggaga ggaatggg 28

<210> 38
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 38
aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg 28

<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39
cgcggatcct caagcgttgg ggttggtcc 29

<210> 40
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 40
cccaagcttg ccaccatggc tcacgctccc gctagctgcc cgagc 45

<210> 41
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 41
ccggaattct gccaagtatg agccatcctg g 31

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

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

<400> 42
gccatccaga aggtggt 17

<210> 43

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

<400> 43
gtcttgtcag ggaagat 17

<210> 44
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 44
ggcaggagac caccttgcga gtgcccac 28

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 45
gggtgggctg taccttctgg aacagggc 28

<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<400> 46
ggcgctggct tacccggaga ggaatggg 28

<210> 47
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 47
ggaatgggtg tttgtctcctc caaagatgc 28

<210> 48
<211> 1316
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 48
gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactggtg gaaccctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120

gatcctagtg acaggggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180

tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240

ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300

tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360

gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagctttc gaggtgggca ctcgcaaggt 420

ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480

aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540

gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600

ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720

tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcactggac ctagcccggc tcttcatctg 780

ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840

agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900

cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960

tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020

tgcctggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080

tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgtc aagaactgag 1140

gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccaggggggct tcatgcagcc 1200

atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260

ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 49
gatcctgctg ggaccaaaat tgg 23

<210> 50
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<400> 50
cttaacatcc caagggatgc tg 22

<210> 51
<211> 1965
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 51
acgggggget cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60

tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180

agctgaagag aaaggaattg ccccttggag ttaactacca tgttttcact gatcctcctg 240

gaaccaaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300

atggagacaa gtggaattcc ttcacagtcc tgttaattca ctctggtggc tacagtcaac 360

gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420

tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcatgaagc 480

ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540

ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600

gcaccacaca tggagtattt gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660

agtacaggca atgccaccgt ttcctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720

atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780

gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840

cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900

cctatggtga ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020

tcctcaaggg aacacccctg aatgttgttg tccttaataa ctccaggttt tatcacattg 1080

gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140

gcttgcaatc catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200

cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260

aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcggaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320

tcatagaaaa agctgttctg cccccatgtt ctttcgtgtg ctctttaagt gtggagataa 1380

atggacactt agaatattca actatggtgt ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440

ttaaaaccat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttgtt 1500

tagatatttg gaaccttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560

gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttcttctct gagtgagtcg gttgcagcat 1620

cccttgggat gttaaatgcc attcgaaacc attcgccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680

tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740

agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatcttaaa 1800

tacaatggat tttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860

gttcttcttt ctttctcccc tctctccttt cctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920

aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<400> 52
caggggtgtt cccttgagga ggtggaa 27

<210> 53
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 53
cactgagcca ggggccacac agcatcc 27

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 54
cccctcacgc atgaagcctg gag 23

<210> 55
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 55
tgccaccgtt tcctccataa gcccagc 27

<210> 56
<211> 28
<212> DNA

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<213> Artificial Sequence

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

<400> 56
atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga 28

<210> 57
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 57
tcaagcgttt gggttggtcc tcatgag 27

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 58
tccggggatg gcgagatggg caagc 25

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 59
cttgacatgg ctctgggctc caag 24

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 60
ccacttcagt cggtcggtag tattt 25

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 61
cgctcacccg cctgaggcga catg 24

<210> 62
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 62
ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc 32

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

<400> 63
ggggccatgc caaggactat gtcg 24

<210> 64
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 64
atgtggctga tgttacaaaa tgatg 25

<210> 65
<211> 1504
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1119)

<400> 65
atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
20 25 30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
     50                  55                  60

att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg   240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65                  70                  75                  80

aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc   288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85                  90                  95                 100

atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc   336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
                105                 110                 115

cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat   384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
            120                 125                 130

gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt   432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
        135                 140                 145

ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga   480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
    150                 155                 160

aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg   528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165                 170                 175                 180

tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac   576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
                185                 190                 195

ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat   624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
            200                 205                 210

cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc   672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
        215                 220                 225

cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg   720
```

```
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
    230                 235                 240

gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc   768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245                 250                 255                 260

gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc   816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
                265                 270                 275

ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca   864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
            280                 285                 290

ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat   912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
        295                 300                 305

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

ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc   1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325                 330                 335                 340

tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac   1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
                345                 350                 355

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc   1104
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
            360                 365                 370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg   1159
Asn Pro Asn Ala
        375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219
cctgtgtcgt ccccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat 1399
```

ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgacccagca 1459
aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 66
atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67
<211> 59
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 67
ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 68
gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69
accttggata gaaaggggtg gtctc 25

<210> 70
<211> 125
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 70
ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120
agaaa 125

<210> 71
<211> 376
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 71
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15

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

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
85 90 95 100

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
105 110 115

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
            120                 125                 130

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
        135                 140                 145

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
    150                 155                 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165                 170                 175                 180

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
                185                 190                 195

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
            200                 205                 210

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
        215                 220                 225

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
    230                 235                 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245                 250                 255                 260

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
                265                 270                 275

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
            280                 285                 290

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
        295                 300                 305

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
    310                 315                 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325                 330                 335                 340
```

```
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
                345                 350                 355

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
            360                 365                 370

Asn Pro Asn Ala
        375
```

<210> 72
<211> 321
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 72

```
Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1               5                  10                  15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
            20                  25                  30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
        35                  40                  45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
    50                  55                  60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65                  70                  75                  80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
                85                  90                  95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 73
<211> 590
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 73

```
Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser
```


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

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

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

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

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
        515                 520                 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
    530                 535                 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
545                 550                 555                 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
                565                 570                 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
            580                 585                 590
```


Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

名　義　変　更　届

29.10.01

特許庁長官　殿

1. 国際出願の表示　　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０８８０４

2. 出　願　人

名　称　協和醗酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

あて名　〒100-8185　日本国東京都千代田区大手町一丁目６番１号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 JAPAN

国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ

住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

3. 届出の内容

新名義人

事件との関係　すべての指定国における出願人

名　称　協和醗酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

あて名　〒100-8185　日本国東京都千代田区大手町一丁目６番１号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 JAPAN

国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ

住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

事件との関係　すべての指定国における発明者

氏　名　神田　豊　　KANDA Yutaka

あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN

国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ

住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　佐藤　光男　　SATOH　Mitsuo
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　中村　和靖　　NAKAMURA　Kazuyasu
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　内田　和久　　UCHIDA　Kazuhisa
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　新川　豊英　　SHINKAWA　Toyohide
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　山根　尚子　　YAMANE　Naoko
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ.

氏　名　保坂　絵美　　HOSAKA　Emi
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　山野　和也　　YAMANO　Kazuya
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　山﨑　基生　　YAMASAKI　Motoo
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　　ＪＡＰＡＮ

氏　名　花井　陳雄　HANAI　Nobuo
あて名　〒194-0023　日本国東京都町田市旭町三丁目６番６号
協和醗酵工業株式会社　東京研究所内
c/o Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-0023 JAPAN
国　籍　日本国　ＪＡＰＡＮ
住　所　日本国　ＪＡＰＡＮ

4．代　理　人

氏　名　（１０５６４）弁理士　小　栗　　昌　平　　印
OGURI　Shohei
あて名　〒107-6028　日本国東京都港区赤坂一丁目１２番３２号
アーク森ビル２８階　栄光特許事務所
Eikoh Patent Office, 28th Floor, ARK Mori Building,
12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107-6028 JAPAN

氏　名　（１０５４７）弁理士　本　多　　弘　徳　　印
HONDA　Hironori
あて名　同　所

氏　名　（１０８５８）弁理士　市　川　　利　光　　印
ICHIKAWA　Toshimitsu
あて名　同　所

氏　名　（１１５１０）弁理士　高　松　　猛　　印
TAKAMATSU　Takeshi
あて名　同　所

氏　名　（９０３４）弁理士　栗　宇　　百　合　子　　印
KURIU　Yuriko
あて名　同　所

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☑ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☑ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

PATENT APPLICATION FEE DETERMINATION RECORD
Effective January 1, 2003

Application or Docket Number: 09/971,723

CLAIMS AS FILED - PART I

	(Column 1)	(Column 2)
TOTAL CLAIMS		
FOR	NUMBER FILED	NUMBER EXTRA
TOTAL CHARGEABLE CLAIMS	minus 20=	*
INDEPENDENT CLAIMS	minus 3 =	*
MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT		☐

* If the difference in column 1 is less than zero, enter "0" in column 2

SMALL ENTITY TYPE ☐		OR	OTHER THAN SMALL ENTITY	
RATE	FEE		RATE	FEE
BASIC FEE	$375	OR	BASIC FEE	$750
X$ 9=		OR	X$18=	
X42=		OR	X84=	
+140=		OR	+280=	
TOTAL		OR	TOTAL	

8/12/04

CLAIMS AS AMENDED - PART II

AMENDMENT A

	(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA
Total	* 69	Minus	** 74	= 5
Independent	* 7	Minus	*** 7	=
FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM				☐

SMALL ENTITY		OR	OTHER THAN SMALL ENTITY	
RATE	ADDITIONAL FEE		RATE	ADDITIONAL FEE
X$ 9=		OR	X$18=	90
X42=		OR	X84=	84
+140=		OR	+280=	1
TOTAL ADDIT. FEE		OR	TOTAL ADDIT. FEE	

AMENDMENT B

	(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA
Total	*	Minus	**	=
Independent	*	Minus	***	=
FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM				☐

RATE	ADDITIONAL FEE		RATE	ADDITIONAL FEE
X$ 9=		OR	X$18=	
X42=		OR	X84=	
+140=		OR	+280=	
TOTAL ADDIT. FEE		OR	TOTAL ADDIT. FEE	

AMENDMENT C

	(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA
Total	*	Minus	**	=
Independent	*	Minus	***	=
FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM				☐

RATE	ADDITIONAL FEE		RATE	ADDITIONAL FEE
X$ 9=		OR	X$18=	
X42=		OR	X84=	
+140=		OR	+280=	
TOTAL ADDIT. FEE		OR	TOTAL ADDIT. FEE	

* If the entry in column 1 is less than the entry in column 2, write "0" in column 3.
** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 20, enter "20."
***If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 3, enter "3."
The "Highest Number Previously Paid For" (Total or Independent) is the highest number found in the appropriate box in column 1.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
09/971,773	10/09/2001	Yutaka Kanda	249-202	2525

23117 7590 02/13/2004

NIXON & VANDERHYE, PC
1100 N GLEBE ROAD
8TH FLOOR
ARLINGTON, VA 22201-4714

EXAMINER	
KELLY, ROBERT M	

ART UNIT	PAPER NUMBER
1632	

DATE MAILED: 02/13/2004

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

Office Action Summary	Application No.	Applicant(s)	
	09/971,773	KANDA ET AL.	
	Examiner	Art Unit	
	Robert M Kelly	1632	

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cov r sheet with the correspondence address --

Period for Reply

A SHORTENED STATUTORY PERIOD FOR REPLY IS SET TO EXPIRE 3 MONTH(S) FROM THE MAILING DATE OF THIS COMMUNICATION.

- Extensions of time may be available under the provisions of 37 CFR 1.136(a). In no event, however, may a reply be timely filed after SIX (6) MONTHS from the mailing date of this communication.
- If the period for reply specified above is less than thirty (30) days, a reply within the statutory minimum of thirty (30) days will be considered timely.
- If NO period for reply is specified above, the maximum statutory period will apply and will expire SIX (6) MONTHS from the mailing date of this communication.
- Failure to reply within the set or extended period for reply will, by statute, cause the application to become ABANDONED (35 U.S.C. § 133). Any reply received by the Office later than three months after the mailing date of this communication, even if timely filed, may reduce any earned patent term adjustment. See 37 CFR 1.704(b).

Status

1)☒ Responsive to communication(s) filed on *08 December 2003*.

2a)☐ This action is **FINAL**. 2b)☒ This action is non-final.

3)☐ Since this application is in condition for allowance except for formal matters, prosecution as to the merits is closed in accordance with the practice under *Ex parte Quayle*, 1935 C.D. 11, 453 O.G. 213.

Disposition of Claims

4)☒ Claim(s) *1-64* is/are pending in the application.

4a) Of the above claim(s) *2,3,20-22,24-30 and 41-61* is/are withdrawn from consideration.

5)☐ Claim(s) _____ is/are allowed.

6)☒ Claim(s) *1,4,12-19,23, 31-40, and 62-64* is/are rejected.

7)☐ Claim(s) _____ is/are objected to.

8)☐ Claim(s) _____ are subject to restriction and/or election requirement.

Application Papers

9)☒ The specification is objected to by the Examiner.

10)☒ The drawing(s) filed on *19 October 2001* is/are: a)☒ accepted or b)☐ objected to by the Examiner.

Applicant may not request that any objection to the drawing(s) be held in abeyance. See 37 CFR 1.85(a).

Replacement drawing sheet(s) including the correction is required if the drawing(s) is objected to. See 37 CFR 1.121(d).

11)☐ The oath or declaration is objected to by the Examiner. Note the attached Office Action or form PTO-152.

Priority under 35 U.S.C. § 119

12)☒ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).

a)☐ All b)☐ Some * c)☒ None of:

1.☒ Certified copies of the priority documents have been received.

2.☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. _____.

3.☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this National Stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).

* See the attached detailed Office action for a list of the certified copies not received.

Attachment(s)

1) ☒ Notice of References Cited (PTO-892)
2) ☐ Notice of Draftsperson's Patent Drawing Review (PTO-948)
3) ☐ Information Disclosure Statement(s) (PTO-1449 or PTO/SB/08) Paper No(s)/Mail Date _____.
4) ☐ Interview Summary (PTO-413) Paper No(s)/Mail Date. _____.
5) ☐ Notice of Informal Patent Application (PTO-152)
6) ☐ Other: _____.

DETAILED ACTION

Claims 1, 4, 12-19, 23 and 31-40 are considered.

Election/Restrictions

Applicant's election of Group II, Claims 1, 4-19, and 23-40 in Applicant's Amendment, dated December 8, 2003, is acknowledged. Because applicant did not distinctly and specifically point out the supposed errors in the restriction requirement, the election has been treated as an election without traverse (MPEP § 818.03(a)).

Applicant's further elected the following species with regard to Group II: (1) a CHO cell; (2) a gene disruption technique targeting a gene encoding the enzyme as the method to produce the cell; and (3) the enzyme α-1,6-fucosyltransferase as the enzyme that is disrupted, in lieu of the election of one of the GDP-fucose enzymes of claim 5.

For the reasons given above, Claims 5-11 and 24-30 have been withdrawn from consideration, as drawn to a non-elected species, and Claims 1, 4, 12-19, 23, 31-40 and newly presented Claims 62-64 will be considered only with respect to those elected species above. The withdrawn claims, Claims 5-11 and 24-30 will be rejoined for consideration, along with the other non-elected species upon allowance of all of the elected subject matter.

Priority

If applicant desires priority under 35 U.S.C. 119(e) based upon a previously filed application, specific reference to the earlier filed application must be made in the instant application. For benefit claims under 35 U.S.C. 120, 121 or 365(c), the reference must include the

relationship (i.e., continuation, divisional, or continuation-in-part) of the applications. This should appear as the first sentence of the specification following the title, preferably as a separate paragraph unless it appears in an application data sheet. The status of nonprovisional parent application(s) (whether patented or abandoned) should also be included. If a parent application has become a patent, the expression "now Patent No. _____" should follow the filing date of the parent application. If a parent application has become abandoned, the expression "now abandoned" should follow the filing date of the parent application.

If the application is a utility or plant application filed under 35 U.S.C. 111(a) on or after November 29, 2000, the specific reference must be submitted during the pendency of the application and within the later of four months from the actual filing date of the application or sixteen months from the filing date of the prior application. If the application is a utility or plant application which entered the national stage from an international application filed on or after November 29, 2000, after compliance with 35 U.S.C. 371, the specific reference must be submitted during the pendency of the application and within the later of four months from the date on which the national stage commenced under 35 U.S.C. 371(b) or (f) or sixteen months from the filing date of the prior application. See 37 CFR 1.78(a)(2)(ii) and (a)(5)(ii). This time period is not extendable and a failure to submit the reference required by 35 U.S.C. 119(e) and/or 120, where applicable, within this time period is considered a waiver of any benefit of such prior application(s) under 35 U.S.C. 119(e), 120, 121 and 365(c). A priority claim filed after the required time period may be accepted if it is accompanied by a grantable petition to accept an unintentionally delayed claim for priority under 35 U.S.C. 119(e), 120, 121 and 365(c). The

petition must be accompanied by (1) the reference required by 35 U.S.C. 120 or 119(e) and 37 CFR 1.78(a)(2) or (a)(5) to the prior application (unless previously submitted), (2) a surcharge under 37 CFR 1.17(t), and (3) a statement that the entire delay between the date the claim was due under 37 CFR 1.78(a)(2) or (a)(5) and the date the claim was filed was unintentional. The Director may require additional information where there is a question whether the delay was unintentional. The petition should be addressed to: Mail Stop Petition, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450.

It is noted that Applicants have claimed foreign priority benefits under 35 USC 119/365 to Japanese Application No. P. 2000-308526, filed October 6, 2000, and under 35 USC 120/365 to PCT/JP01/08804, filed October 5, 2001.

Moreover, while the PCT document may be obtained, a certified copy of the Japanese Application, translated into English, is required.

Specification

The disclosure is objected to because of the following informalities:

(1) page 4, line 29 cites "Biochemistry, 36, 130 (1997)" however, no such citation exists, and, moreover, the sentence for which this citation is given is unclear – what variety exists?

Appropriate correction is required.

Claim Objections

Claim 1 is objected to because of the following informalities: a CHO cell is inherently derived from Chinese hamster ovary tissue. Appropriate correction is required.

Claim Rejections - 35 USC § 112

The following is a quotation of the second paragraph of 35 U.S.C. 112:

> The specification shall conclude with one or more claims particularly pointing out and distinctly claiming the subject matter which the applicant regards as his invention.

Claims 4 and 12-19 are rejected under 35 U.S.C. 112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention.

With regard to Claim 4, it is unclear how much the activity of an enzyme relating to the modification of a sugar chain in which fucose is bound to the 6-position of N-acetylglucosamine in the reducing end through α(1→6)glycosyl bond in the complex N-glycoside-linked sugar chain must be decreased.

With regard to Claims 13-19, the claims are rejected as depending on a rejected base claim.

Claims 23 and 31-40 are rejected under 35 U.S.C. 112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention.

With regard to Claim 23, it is unclear how much an activity relating to the modification of a sugar chain wherein fucose is bound to the 6-position of N-acetylglucosamine in the reducing end through α(1→6)glycosyl bond in the complex N-glycoside-linked sugar chain must be decreased.

With regard to Claims 31-40, the claims are rejected as depending on a rejected base claim.

Claim 19 is rejected under 35 U.S.C. 112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention.

Claim 19 recites the limitation "wherein the sugar chain to which fucose is not bound is a complex N-glycoside-linked sugar chain in which fucose is not bound to the 6-position of N-acetylglucosamine in the reducing end through α(1→6)glycosyl bond." It is not clear how a sugar chain in which fucose is not bound, could be bound through a specific bond.

Claims 62-63 are rejected under 35 U.S.C. 112, second paragraph, as failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention.

Claim 62 does not further limit the claims from which it depends, because Claim 1, from it depends, through Claim 4, contains all the limitations of Claim 62.

Claim 63 requires the fucose which are not bound in Claim 1 to not be bound through a specific linkage. It is unclear how, if such residues are not bound at all, they could have been otherwise bound through a specific linkage.

The following is a quotation of the first paragraph of 35 U.S.C. 112:

> The specification shall contain a written description of the invention, and of the manner and process of making and using it, in such full, clear, concise, and exact terms as to enable any person skilled in the art to which it pertains, or with which it is most nearly connected, to make and use the same and shall set forth the best mode contemplated by the inventor of carrying out his invention.

Claims 1, 4, 12-19, 23, 31-40 and 62-64 are rejected under 35 U.S.C. 112, first paragraph, because the specification, while being enabling for a CHO cell comprising a deletion of at least exon 2 of one FUT8 gene, which deletion produces a non-functional enzyme, into which a gene encoding an antibody is introduced, such antibody gene being expressed and producing antibodies having complex N-glycoside-linked sugar chains bound to the Fc region, wherein among the total complex N-glycoside-linked sugar chains bound to the Fc region in the composition, the ratio of a sugar chain in which fucose is not bound to N-acetylglucosamine at the 6 position is 20% or more, does not reasonably provide enablement for any CHO cell or any CHO cell comprising any deletion of a gene encoding FUT8 that produces any decrease in such enzyme, into which a gene encoding an antibody is introduced, such antibody gene being expressed and producing antibodies having complex N-glycoside-linked sugar chains bound to the Fc region, wherein among the total complex N-glycoside-linked sugar chains bound to the Fc region in the composition, the ratio of a sugar chain in which fucose is not bound to N-acetylglucosamine is 20% or more. The specification does not enable any person skilled in the art to which it pertains, or with which it is most nearly connected, to make the invention commensurate in scope with these claims.

Background

In determining whether Applicant's claims are enabled, it must be found that one of skill in the art at the time of invention by Applicant would not have had to perform "undue experimentation" to make and/or use the invention claimed. Such a determination is not a simple factual consideration, but is a conclusion reached by weighing at least eight factors as set forth in In re Wands, 858 F.2d at 737, 8 USPQ.2d at 1404. Such factors are:

(1) The breadth of the claims;

(2) The nature of the invention;

(3) The state of the art;

(4) The level of one of ordinary skill in the art;

(5) The level of predictability in the art;

(6) The amount of direction and guidance provided by Applicant;

(7) The existence of working examples; and

(8) The quantity of experimentation needed to make and/or use the invention.

These factors will be analyzed, in turn, to demonstrate that one of ordinary skill in the art would have had to perform "undue experimentation" to make and/or use the invention within its fully-claimed scope, and that, therefore, Applicant's claims are not enabled to their fully-claimed scope.

The Breadth of the Claims

Claims 1, 4, 12-19, 23, and 31-40 are broad in scope. The following paragraphs will outline the full scope of each of these claims. (Applicant is reminded that the invention is only being analyzed to the scope of the species elections made by Applicant, i.e., (1) a CHO cell; (2) a gene disruption technique targeting a gene encoding the enzyme as the method to produce the cell; and (3) the enzyme α-1,6-fucosyltransferase as the enzyme that is disrupted, and that therefore, the outlined scope of the Claims below does not necessarily reflect the actual scope of the claims.)

Claims 1, 4, 12-19, and 62-64 encompass any CHO cell into which any antibody-encoding gene is introduced and in which the antibody is expressed, thereby making antibodies with N-glycoside linked sugar chains in which 80% or less of these sugar chains contain fucose bound to N-acetyl glucoseamine in the reducing end of the sugar chains. Claim 4 limits the CHO cell to one in which the activity of α-1,6-fucosyltransferase is decreased by any amount or deleted. Claim 12 limits the decreased or deleted enzyme to α-1,6-fucosyltransferase. Claim 13 limits the α-1,6-fucosyltransferase to SEQ ID NO 1 or any sequence hybridizing to SEQ ID NO 1 under stringent conditions. Claim 14 limits the α-1,6-fucosyltransferase that is decreased or deleted in Claim 12 to those described by SEQ ID NO 23 or those of SEQ ID NO 23 having any at least one insertion, deletion, substitution, or added amino acid, which also has α-1,6-fucosyltransferase activity, or any amino acid sequence with at least 80% homology with SEQ ID NO 23 and having α-1,6-fucosyltransferase activity. Claim 15 limits the CHO cell of Claim 4 to those in which any gene disruption technique targeting the encoded enzyme has been used to produce the deleted or decreased α-1,6-fucosyltransferase activity. Claim 16 encompasses any CHO cells of Claim 4 that is additionally resistant to any lectin that binds the fucose α(1→6) N-acetylglucosamine on the reducing end of any sugar chain. Claim 17 limits Claim 4 to CHO cells that produce antibody compositions have any amount higher antibody-dependent cytotoxic acitivity than its parent CHO. Claim 18 limits the CHO cell of Claim 17 to those cells that produce antibodies with a higher antibody-dependent cytotoxicity activity higher than antibody compositions in which more than 80% of the sugar chains have fucose α(1→6) N-acetylglucosamine on the reducing end. Claim 19 limits Claim 18 to those that produce sugar chains in which fucose is not bound, to those not bound by an α(1→6) linkage at the reducing

end, to N-acetylglucoseamine. Claim 62 limits the cells of Claim 4 to the same ratios of fucose as Claim 1. Claim 63 requires the linkage through which the fucose is not bound in Claim 4, to be an $\alpha(1\rightarrow6)$ linkage. Claim 64 requires the antibody molecule of Claim 4 to be an IgG molecule.

Claims 23 and 31-40 are drawn to any CHO cell in which the activity of α-1,6-fucosyltransferase is decreased or deleted by a gene disruption technique. Claim 31 limits the enzyme to α-1,6-fucosyltransferase. Claim 32 limits Claim 31 to the DNA sequences comprising either SEQ ID NO 1, or any sequences hybridizing to SEQ ID NO 1 under stringent conditions, or sequences comprising SEQ ID NO 2, or any sequence hybridizing to SEQ ID NO 2 under stringent conditions. Claim 33 limits the protein encoded in Claim 31 to those comprising SEQ ID NO 23 or SEQ ID NO 24, or those sequences having any one or more deletions/insertions/substitutions or additions to either SEQ ID NOS 23 or 24, or any sequence that is 80% or more homolgous to SEQ ID NOS 23 or 24. Claim 34 limits the CHO cell of Claim 23 to one produced by any gene disruption technique. Claim 35 limits Claim 23 to CHOs which are resistant to lectins that recognize fucose bound to N-acetylglucosamine though an $\alpha(1\rightarrow6)$ linkage at the reducing end. Claim 36 limits the cell of Claim 23 to any CHO cell. Claim 37 limits Claim 23 to any CHO into which a gene encoding any antibody is introduced. Claim 38 limits the antibody to any IgG class antibodies. Claim 39 encompasses a method of producing of an antibody composition with the cells of Claim 37, by culturing the cells and recovering the antibody composition from the culture. Claim 40 limits the method Claim 39 to producing antibodies having a higher antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity than the parent cell would produce.

Because these claims encompass a wide variety of CHO cells, a wide variety of mutations to α-1,6-fucosyltransferase, and a wide variety of antibody molecules, having a wide range of fucose compositions, the detail of the disclosure provided by Applicant, in view of the prior art, must encompass a wide area of knowledge to a reasonably comprehensive extent. In other words, those aspects considered broad must be fleshed out to a reasonable extent so that one of ordinary skill in the art, at the time of invention by Applicant (hereinafter the "Artisan"), would be able to practice the invention, and do so to the fully-claimed scope of the invention, without an undue burden being impose such Artisan (undue burden). However, as will be discussed below, this burden has not been met.

The Nature of the Invention

The invention is in the nature of transgenic CHO cells comprising modifications to the glycosylation enzymes to produce transgenic antibodies with higher antibody-dependent cytotoxicity. Such support for this may be found in the specification (pp. 1-9). It is noted that some of Applicant's claims do not even require the production of antibodies, and the Examiner does not see any use for such CHO cells other than to produce antibodies with higher antibody-dependent cytotoxicity (Claims 23, 31-36).

The production of antibodies having different glycosylation characteristics from cells of different species and strains is known in the art, but highly unpredictable. Such is borne out in Raju, et al. (2000) Glycobiology, 10(5): 477-86, p. 483, which indicates (1) speicies variability in glycosylation in IgG antibodies, and (2) within a species, variability in the amounts of specific sugars. Therefore, the art of glycosylation is highly unpredictable, and new inventions in the

field would require a showing that the cell produces the correct types of glycosylation for the antibodies produced from it, as well as in the correct amounts.

With regard to the production of mutations in α-1,6-fucosyltransferase that decrease or completely remove the activity of such enzyme, the nature of this is unpredictable. The Artisan would not be able to reasonably predict that any specific insertion/deletion/substitution or addition or any sequence with 80% homology or sequence identity or hybridizing to the claimed sequences would produce an enzyme with sufficiently reduced activity to produce the claimed glycosolations in any antibody transgenically made in such cells. Such wide variety of changes would need to be determined for the function of the enzyme on a case-by-case basis. Stryer (1988) Biochemistry, 3rd Ed., Freeman and Co., New York, NY, pp. 35-37 underscores the unpredictability of such changes, emphasizing that secondary structure, at the core of protein folding and therefore activity, stating that "*The context in which a peptide segment folds may be crucial.*" (p. 37). What Stryer is getting at here, is that any change in the protein sequence may cause changes to secondary structure, which would then be amplified to higher levels of structure, causing the protein so modified to fold improperly, and altering its function, but such is still unpredictable, even at the level of secondary structure, have only about 60% predictability with the then-known structures. Moreover, Stryer states, "These are encouraging starts, but it is evident that much remains to be accomplished." The influence of such small changes on overall structure, and therefore function, cannot be underestimated, and therefore, it is not predictable that the widely varied changes encompassed by Applicant's claimed invention are not reasonably predictable by the Artisan.

In view of the nature of the invention, the Artisan would require a reasonable assurance that the cells and mutations would produce such altered glycosylation patterns, and produce these antibodies with higher antibody dependent cytotoxicity. Alternatively, direct examples of such would overcome such burden, as if the invention worked for a specific mutation, then it had to have met the requirements.

The State of the Prior Art

The state of the prior art is similarly unenabling for new inventions in the field. With respect to transgenic CHO cells comprising modifications to the glycosylation enzymes to produce transgenic antibodies with higher antibody-dependent cytotoxicity, the unpredictable nature is borne out by the recent article by Shinkawa, et al. (2003) J. Biol. Chem., 278(5): 3466-3473. In Shinkawa, conflicting reports are reviewed for various sugars present in the glycosylated enzyme (e.g., pp. 3471-72, paragraph bridging pages). Moreover, Shinkawa demonstrates the absence of predictability in the field by finding results that conflict with the then-current data, i.e., p. 3472, paragraph bridging columns, and an admission that they were "speculating" when they decided to investigate the contribution of fucose residues to ADCC activity (p. 3472, col. 2, first full paragraph).

With regard the prior art of protein structure and function prediction, and specifically, where and how many mutations may be made within an expressed protein to produce lowered, yet present activities of the protein, the art is similarly unenabling. A recent review by Jones (2001) Pharmacogenomics J., 1(2): 126-34, underscores the fact that the art is not enabling of any mutations, as it is unpredictable. In Jones, the author reviews a series of computational methods used for protein structure, and therefore function, prediction (ABSTRACT), and finds

that "Despite the evident improvements in automatic alignment accuracy in CASP4 [, a general symposium of experts in protein structure fields, providing a survey of methods that would be used to make predictions of the influence of changes to known proteins], there is still a lot to criticize in the comparative modeling field, at least as viewed in the CASP experiment ...." (p. 127, col. 2). Indeed, Jones concludes that "there is still a lot of work to do." And that there exists many problems with each method of structure prediction (CONCLUSIONS in general).

Hence, because the nature of the invention and state of the art evinces a level of unpredictability in the art, as discussed above, and because the art for glycosylation influcences on antibody-dependent cytotoxicity provides not only unpredictable, but conflicting results, absent a largely enabling disclosure by Applicant, by way of specific direction and guidance and examples, the invention claimed by Applicant is not enabled for its fully-claimed scope.

The Level of One of Ordinary Skill in the Art at the Time of Invention

The level of one of skill in the art at the time of invention was advanced, being that of a person holding a Ph.D. or an M.D.; however, because of the immaturity of the art, and its unpredictability, as shown by the other factors, one of skill in the art at the time of invention by Applicant would not have been able to make and/or use the invention claimed, to its fully-claimed scope, without undue experimentation.

The Level of Predictability in the Art

Because the art as shown above discloses conflicting evidence for the roles of sugar residues in antibody-dependent cytotoxicity, and the art does not show an ability to reasonably predict the structure, and therefore function, of an enzyme, after mutating the enzyme in any way, the Artisan would not be able to reasonably predict, in the absence of proof to the contrary,

that such a wide variety of mutations the fucosyltransferase would produce less active enzyme, or that any specific glycosylation would produce higher levels of antibody dependent cytotoxicity.

Hence, absent a strong showing of guidance and direction and/or working examples demonstrating the same, such invention as claimed by Applicant, is not enabled for its fully-claimed scope, because the Artisan could not reasonably predict that such methods would be able to be made, or produce useful product if they were made.

The Amount of Direction and Guidance Provided by Applicant

The specification broadly discusses the pathways involved in glycosylation of proteins in general and the structure of glycosylations, pointing out that it is involves many enzymes that remove and add and modify the glycosylation chains and that the complexity makes it difficult to control such activities, so that a solution to the pathways and their regulation needs to be reached through trial and error (pp. 1-9, p. 9). A summary tracking the claims is then given (pp. 9-24), followed by a brief explanation of the drawings (pp. 24-33). The detailed description discusses, in broad terms, cells and antibodies with glycosylations that represent the claimed invention (pp. 34-46), followed by a broad discussion of the fucosyltransferase enzyme, broadly claiming sequences that hybridize to disclosed sequences under example "stringent" conditions, an broadly discussing such conditions, however such sequences are required to have the activity of the fucosyltransferase enzyme (p. 46). Also, protein sequences of the enzyme are broadly discussed, but require such function of the enzyme itself again (p. 46). Pages 47-48 continue to broadly discuss such requirements, and 48-51 discuss general methods of making such mutant cells and enzymes. Pages 51-115 broadly discuss preparation of host cells, enzyme mutations,

lectin resistant cells, transgenic humans, animals and plants, methods of preparing antibody compositions from the cells, construction of chimeric antibodies, humanized antibodies, glycosylation analysis, and applications of the antibodies of the invention.

However, outside of these broad teachings and assertions, little direction and guidance is given as to how to predict that any specific mutation would produce functional, albeit less functional than wild-type activity in fucosyltransferse, and that such antibodies with the required fucose absent in more than 20% of the glycosylations would produce higher levels of antibody-dependent cytotoxicity.

Because of the lack of direction and guidance that would allow the Artisan to reasonably predict that such mutations would produce the required activity of the fucosyltransferse, and the activity would be reduced to such an extent as required to produce such glycosylations, and that such glycosylated antibody would be produced, and that such glycosylated antibody would then exhibit higher than normal antibody-dependent cytotoxicity, the examples would be required to provide a very strong showing of effectiveness. Absent this strong showing in the examples, it would have required undue experimentation to make and/or use the invention within the fully-claimed scope, as claimed by Applicant.

The Existence of Working Examples

Example 1 demonstrates the production of anti-ganglioside GD3 human chimeric antibodies in a few cell lines, including CHO cells. Example 2 demonstrates the activity evaluation of such antibodies produced, demonstrating a correlation with the fucose present in the glycosylation. Example 3 demonstrates another antibody preparation in various cell lines. Example 4 demonstrates evaluates the activity of these other antibodies preparations, and finds

that the antibody dependent cytotoxicity varies with cell line, and implicates the fucose present in the glycosylation again. Example 4 analyzes the sugar content, underscoring the fucose correlation to antibody dependent cytotoxicity. Example 6 demonstrates the separation of those antibodies having higher antibody dependent cytotoxicity, and correlates it again with the absence of fucose as claimed in the invention. Example 7 evaluates the correlation of fucose with antibody dependent cytotoxicity, demonstrating that the fucose lowers the antibody dependent cytotoxicity, while not affecting the binding of the antibody to its antigen, or changing the antibodies general characteristics. Example 8 evaluates another antibody with respect to the ratio of fucose present, and finds similar results. Example 9 determines the transcription product of the fucosyltransferase. Example 10 repeats example 9 with another cell line. Example 11 demonstrates that overexpression of such fucosyltransferase causes the otherwise-normal antibodies produced to have a lowered antibody-dependent cytotoxicity. Example 12 isolates the fucosyltransferase gene from CHO cells. Example 13 uses a gene-disruption technique to completely delete the activity of the fucosyltransferase in CHO cells, by removing at least exon 4 of α-1,6-fucosyltransferase and shows that antibodies produced form such cells has a higher level of antibody dependent cytotoxicity. Example 14 demonstrates the selection of lectin resistant cells, demonstrating that 2 of 3 cells produced have even higher antibody-dependent cytotoxicity. Examples 14 and 15 analyzes the lectin resistant cell lines, finding other enzymes in the pathways of glycosylation are altered. Example 16 demonstrates an exploration for other enzymes involved in glycosylation and how to isolate the genes encoding such enzymes. Example 17 demonstrates the isolation a GMD gene associated with glycosylation from CHO cells. Example 18 demonstrates the sugar chain analysis of conventionally-available antibodies.

While Applicant has shown that deletion of the activity of α-1,6-fucosyltransferase in CHO cells and expression of antibodies from such cells produces antibodies with higher antibody-dependent cytotoxicity, the Artisan would be able to reasonably predict, in view of the art and Applicants disclosure, that any mutation maintaining 80% homology to the structure of α-1,6-fucosyltransferase, or 80% sequence similarity, or comprising at least one mutation to such sequences would produce any functional, albeit less active α-1,6-fucosyltransferase than wild type, nor would the artisan be able to reasonably predict that a certain level of reduced activity would produce the required level of fucosylation in antibodies so produced which would raise the level of antibody dependent cytotoxicity.

The Quantity of Experimentation Needed to Make and/or Use the Invention

Because of the insufficiency of the working examples and direction and guidance provided by Applicant, the inherent unpredictability in the art, the state of the art, and the nature of the invention, even in the face of an advanced level of skill in the art, the Artisan would be required to perform a large amount of experimentation to make and/or use the invention within its fully-claimed scope. Moreover, outside the use of such CHO cells to produce antibodies with a higher level of antibody dependent cytotoxicity, the Artisan would find no use for any of these cells. Therefore, the Artisan would be required to experiment to find other uses, and to find the amounts and types of mutations in the enzyme that would produce the levels of glycosylations needed.

Conclusion

Because of the large amount of experimentation required to make and/or use the invention to its fully-claimed scope, such experimentation is considered undue, and therefore, the

claims are not enabled for their full scope. What is enabled are recombinant CHO comprising deletions in at least one α-1,6-fucosyltransferase gene, wherein the deletion of said gene encompasses at least exon 4, and further transformed with a gene encoding an antibody molecule, which antibody molecule so expressed in the CHO exhibits higher levels of antibody dependent cytotoxicity, but otherwise normal characteristics.

Claim Rejections - 35 USC § 102

The following is a quotation of the appropriate paragraphs of 35 U.S.C. 102 that form the basis for the rejections under this section made in this Office action:

> A person shall be entitled to a patent unless –
>
> (b) the invention was patented or described in a printed publication in this or a foreign country or in public use or on sale in this country, more than one year prior to the date of application for patent in the United States.

Claim 1 is rejected under 35 U.S.C. 102(b) as being anticipated by Lifely, et al. (1995) Glycobiology, 5(8): 813-22.

Lifely teaches a humanized IgG antibody which is expressed in, *inter alia*, CHO cells (ABSTRACT). As such, Lifely inherently teaches CHO cells into which a gene has been introduced encoding an antibody molecule. Moreover, as claimed by applicant, the characteristics of glycosylation required are inherently produced from such cells.

CONCLUSION

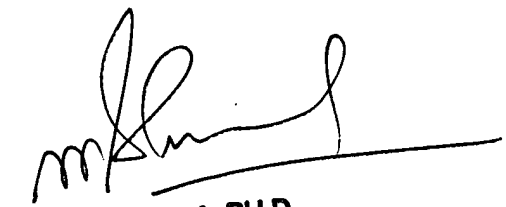
Claims 4, 12-19, 23, and 31-40 are free of the prior art of record.

No Claim is allowed.

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to Robert M Kelly whose telephone number is (571) 272-0729. The examiner can normally be reached on M-F, 9:00am-5:00pm.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Amy Nelson can be reached on (571) 272-0804. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 703-872-9306.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see http://pair-direct.uspto.gov. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).



RAM R. SHUKLA, PH.D.
PRIMARY EXAMINER

Notice of References Cited	Application/Control No. 09/971,773	Applicant(s)/Pat nt Under Reexamination KANDA ET AL.	
	Examiner Robert M Kelly	Art Unit 1632	Page 1 of 2

U.S. PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Name	Classification
	A	US-			
	B	US-			
	C	US-			
	D	US-			
	E	US-			
	F	US-			
	G	US-			
	H	US-			
	I	US-			
	J	US-			
	K	US-			
	L	US-			
	M	US-			

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Country	Name	Classification
	N					
	O					
	P					
	Q					
	R					
	S					
	T					

NON-PATENT DOCUMENTS

*		Include as applicable: Author, Title Date, Publisher, Edition or Volume, Pertinent Pages)
	U	Raju, et al. (2000) Glycobiology, 10(5): 477-86
	V	Stryer (1988) Biochemistry, 3rd Ed., Freeman and Co., New York, NY, pp. 35-37
	W	Shinkawa, et al. (2003) J. Biol. Chem., 278(5): 3466-73
	X	Jones, et al. (2001) Pharmacogenomics J., 1(2): 126-34

*A copy of this reference is not being furnished with this Office action. (See MPEP § 707.05(a).)
Dates in MM-YYYY format are publication dates. Classifications may be US or foreign.

Notice of References Cited	Application/Control No. 09/971,773	Applicant(s)/Patent Under Reexamination KANDA ET AL.	
	Examiner Robert M Kelly	Art Unit 1632	Page 2 of 2

U.S. PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Name	Classification
	A	US-			
	B	US-			
	C	US-			
	D	US-			
	E	US-			
	F	US-			
	G	US-			
	H	US-			
	I	US-			
	J	US-			
	K	US-			
	L	US-			
	M	US-			

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Country	Name	Classification
	N					
	O					
	P					
	Q					
	R					
	S					
	T					

NON-PATENT DOCUMENTS

*		Include as applicable: Author, Title Date, Publisher, Edition or Volume, Pertinent Pages)
	U	Lifely, et al. (1995) Glycobiology, 5(8): 813-22
	V	
	W	
	X	

*A copy of this reference is not being furnished with this Office action. (See MPEP § 707.05(a).)
Dates in MM-YYYY format are publication dates. Classifications may be US or foreign.

Search Notes

Application No.	Applicant(s)	
09/971,773	KANDA ET AL.	
Examiner	**Art Unit**	
Robert M Kelly	1632	

SEARCHED			
Class	Subclass	Date	Examiner
800	8	2/8/2004	RMK
435	326	2/8/2004	RMK
435	70.1	2/8/2004	RMK
435	183	2/8/2004	RMK

INTERFERENCE SEARCHED			
Class	Subclass	Date	Examiner

SEARCH NOTES (INCLUDING SEARCH STRATEGY)		
	DATE	EXMR
chinese hamster ovary, fucosyltransferase, cho, glycosylation, antibody, Ig, N-acetylglucosamine, fucose	2/8/2004	RMK
antibody dependent cytotoxicity, antibody dependent cellular cytotoxicity	2/8/2004	RMK

Index of Claims

Application No.	Applicant(s)
09/971,773	KANDA ET AL.
Examiner	**Art Unit**
Robert M Kelly	1632

√	Rejected	–	(Through num ral) Canc ll d	N	Non-Elected	A	Appeal
=	Allowed	÷	Restricted	I	Interference	O	Objected

Claim		Date								
Final	Original	2/9/04								
	1	✓								
	2	N								
	3	N								
	4	✓								
	5	N								
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
	11	N								
	12	✓								
	13									
	14									
	15									
	16									
	17									
	18									
	19	✓								
	20	N								
	21	N								
	22	N								
	23	✓								
	24	N								
	25									
	26									
	27									
	28									
	29									
	30	N								
	31	✓								
	32									
	33									
	34									
	35									
	36									
	37									
	38									
	39									
	40	✓								
	41	N								
	42									
	43									
	44									
	45									
	46									
	47									
	48									
	49									
	50	N								

Claim		Date								
Final	Original	2/9/04								
	51	N								
	52									
	53									
	54									
	55									
	56									
	57									
	58									
	59	N								
	60	N								
	61	✓								
	62	✓								
	63	✓								
	64	✓								
	65									
	66									
	67									
	68									
	69									
	70									
	71									
	72									
	73									
	74									
	75									
	76									
	77									
	78									
	79									
	80									
	81									
	82									
	83									
	84									
	85									
	86									
	87									
	88									
	89									
	90									
	91									
	92									
	93									
	94									
	95									
	96									
	97									
	98									
	99									
	100									

Claim		Date								
Final	Original									
	101									
	102									
	103									
	104									
	105									
	106									
	107									
	108									
	109									
	110									
	111									
	112									
	113									
	114									
	115									
	116									
	117									
	118									
	119									
	120									
	121									
	122									
	123									
	124									
	125									
	126									
	127									
	128									
	129									
	130									
	131									
	132									
	133									
	134									
	135									
	136									
	137									
	138									
	139									
	140									
	141									
	142									
	143									
	144									
	145									
	146									
	147									
	148									
	149									
	150									

```
=> dis his

     (FILE 'HOME' ENTERED AT 13:39:36 ON 07 FEB 2004)

     FILE 'MEDLINE' ENTERED AT 13:39:42 ON 07 FEB 2004
L1         26932 S CHO OR CHINESE(W)HAMSTER(W)OVARY
L2          3907 S L1 AND ANTIBODY
L3           248 S L2 AND GLYCOSYLATION
L4             1 S L3 AND FUCOSE
L5            10 S L3 AND ACETYLGLUCOSAMINE
L6             0 S L3 AND ANTIBODY(W)DEPENDENT SAME CYTOTOXICITY
L7             0 S L3 AND ANTIBODY(W)DEPENDENT(W)CYTOTOXICITY
L8             1 S L3 AND ANTIBODY(W)DEPENDENT(W)CELLULAR(W)CYTOTOXICITY

     FILE 'MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, SCISEARCH, WPIDS' ENTERED AT
     13:42:51 ON 07 FEB 2004
L9            55 S L4 OR L5 OR L8
L10           35 DUP REM L9 (20 DUPLICATES REMOVED)

=>
```

Freeform Search

Database: US Pre-Grant Publication Full-Text Database
US Patents Full-Text Database
US OCR Full-Text Database
EPO Abstracts Database
JPO Abstracts Database
Derwent World Patents Index
IBM Technical Disclosure Bulletins

Term: L5 and (adcc or "antibody dependent cellular cytotoxicity" or "antibody-dependent cellular cytotoxicity")

Display: 10 **Documents in Display Format:** CIT **Starting with Number** 1

Generate: ○ **Hit List** ◉ **Hit Count** ○ **Side by Side** ○ **Image**

Search Clear Interrupt

Search History

DATE: Saturday, February 07, 2004 Printable Copy Create Case

Set Name side by side	Query	Hit Count	Set Name result set
DB=USPT; PLUR=YES; OP=OR			
L10	L8 and antibody adj dependent adj cellular adj cytotoxicity	3	L10
L9	L8 and antibody adj dependent adj cytotoxicity	0	L9
L8	L7 and fucose	164	L8
L7	l5 and (cho or "Chinese hamster ovary")	164	L7
L6	L5 and (adcc or "antibody dependent cellular cytotoxicity" or "antibody-dependent cellular cytotoxicity")	7	L6
L5	L4 and fucose	316	L5
L4	L3 and glycosylation	6382	L4
L3	L2 and l1	44503	L3
L2	@pd<20001006	6595957	L2
L1	antibody	67113	L1

END OF SEARCH HISTORY

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

STIC Search Report
Biotech-Chem Library

STIC Database Tracking Number: 113237

TO: Robert Kelly
Location: rem-2c55
Art Unit: 1632
February 5, 2004

Case Serial Number: 09971773

2C18

From: P. Sheppard
Location: Remsen Building
Phone: (571) 272-2529

sheppard@uspto.gov

Search Notes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

113237

STIC-Biotech/ChemLib

From: Kelly, Robert
Sent: Friday, January 30, 2004 6:03 PM
To: STIC-Biotech/ChemLib
Subject: 09/971,773

With regard to Application No. 09/971,773, please run the following sequence searches:

Search for SEQ ID NOS: 1, 2, 23 and 24, with results of 80% or greater sequence homology

Also, search these same sequences allowing for at least 1 insertion, deletion, substitution, or addition

Thanks!

Robert M. Kelly, Ph.D.
Room 2C55, Remsen Bldg.
(571) 272-0729

Searcher:_____
Phone:_____
Location:_____
Date Picked Up:_____
Date Completed:_____
Searcher Prep/Review:_____
Clerical:_____
Online time:_____

TYPE OF SEARCH:
NA Sequences:_____
AA Sequences:_____
Structures:_____
Bibliographic:_____
Litigation:_____
Full text:_____
Patent Family:_____
Other:_____

VENDOR/COST (where applic.)
STN:_____
DIALOG:_____
Questel/Orbit:_____
DRLink:_____
Lexis/Nexis:_____
Sequence Sys.:_____
WWW/Internet:_____
Other (specify):_____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

GenCore version 5.1.6
Copyright (c) 1993 - 2004 Compugen Ltd.

OM nucleic - nucleic search, using sw model

Run on: February 2, 2004, 10:19:28 ; Search time 7369.83 Seconds
(without alignments)
11146.322 Million cell updates/sec

Title: US-09-971-773-1
Perfect score: 2008
Sequence: 1 aacagaaacttattttcctg.....gctgtgccctcaagcccatg 2008

Scoring table: IDENTITY_NUC
Gapop 10.0 , Gapext 1.0

Searched: 2888711 seqs, 20454813386 residues

Total number of hits satisfying chosen parameters: 5777422

Minimum DB seq length: 0
Maximum DB seq length: 2000000000

Post-processing: Minimum Match 0%
Maximum Match 100%
Listing first 45 summaries

Database : GenEmbl:*
1: gb_ba:*
2: gb_htg:*
3: gb_in:*
4: gb_om:*
5: gb_ov:*
6: gb_pat:*
7: gb_ph:*
8: gb_pl:*
9: gb_pr:*
10: gb_ro:*
11: gb_sts:*
12: gb_sy:*
13: gb_un:*
14: gb_vi:*
15: em_ba:*
16: em_fun:*
17: em_hum:*
18: em_in:*
19: em_mu:*
20: em_om:*
21: em_or:*
22: em_ov:*
23: em_pat:*
24: em_ph:*
25: em_pl:*
26: em_ro:*
27: em_sts:*
28: em_un:*
29: em_vi:*
30: em_htg_hum:*
31: em_htg_inv:*
32: em_htg_other:*
33: em_htg_mus:*
34: em_htg_pln:*
35: em_htg_rod:*
36: em_htg_mam:*
37: em_htg_vrt:*
38: em_sy:*
39: em_htgo_hum:*
40: em_htgo_mus:*
41: em_htgo_other:*

Pred. No. is the number of results predicted by chance to have a score greater than or equal to the score of the result being printed, and is derived by analysis of the total score distribution.

SUMMARIES

Result No.	Score	% Query Match	Length	DB	ID	Description
1	2008	100.0	2008	6	BD168516	BD168516 Cells pro
2	1809.4	90.1	2976	10	BC010666	BC010666 Mus muscu
3	1804.6	89.9	2176	10	AB025198	AB025198 Mus muscu
4	1584	78.9	1728	6	BD168517	BD168517 Cells pro
5	1575.2	78.4	2796	9	HSA539535	AJ539535 Homo sapi
6	1575.2	78.4	2898	9	HSY17976	Y17976 Homo sapien
7	1575.2	78.4	2902	9	HSA539536	AJ539536 Homo sapi
8	1575.2	78.4	2992	9	HSY17977	Y17977 Homo sapien
9	1575.2	78.4	3186	9	HSY17978	Y17978 Homo sapien
10	1575.2	78.4	3280	9	HSY17979	Y17979 Homo sapien
11	1575.2	78.4	3568	9	HSA536055	AJ536055 Homo sapi
12	1575.2	78.4	3666	9	HSA536053	AJ536053 Homo sapi
13	1575.2	78.4	3772	9	HSA536054	AJ536054 Homo sapi
14	1575.2	78.4	4196	9	HSA536056	AJ536056 Homo sapi
15	1572.8	78.3	2100	6	E15725	E15725 Human mRNA
16	1571.8	78.3	2002	9	D89289	D89289 Homo sapien
17	1568	78.1	2100	6	AR170077	AR170077 Sequence
18	1514.8	75.4	1759	6	AX662735	AX662735 Sequence
19	1514.8	75.4	1759	6	BD087745	BD087745 Plant cel
20	1509.6	75.2	1836	4	D86723	D86723 Porcine mRN
21	1474.2	73.4	1728	6	AR170074	AR170074 Sequence
22	1474.2	73.4	1728	6	E14720	E14720 Procine mRN
23	1469.4	73.2	1728	4	AF247186	AF247186 Bos tauru
24	1256.4	62.6	2682	9	BC025385	BC025385 Homo sapi
25	1090.4	54.3	2129	5	XLA514872	AJ514872 Xenopus l
26	983	49.0	1850	9	AF052088	AF052088 Homo sapi
27	976.4	48.6	979	6	BD168521	BD168521 Cells pro
28	893.2	44.5	979	6	BD168522	BD168522 Cells pro
29	881	43.9	1017	6	E43925	E43925 Antibody re
30	809.8	40.3	1772	9	AB049740	AB049740 Homo sapi
31	599.8	29.9	699	6	E43926	E43926 Antibody re
c 32	446.4	22.2	110000	2	AC129041_1	Continuation (2 of
c 33	446.4	22.2	110000	2	AC129041_2	Continuation (3 of
c 34	446.4	22.2	150709	2	AC134206	AC134206 Rattus no
c 35	446.4	22.2	237954	2	AC128532	AC128532 Rattus no
36	441.8	22.0	844	11	BV033231	BV033231 S212P6677
c 37	441.8	22.0	171073	2	AC132342	AC132342 Mus muscu
38	420.4	20.9	1262	9	HSA514325	AJ514325 Homo sapi
39	420.4	20.9	1396	9	HSA514324	AJ514324 Homo sapi
40	367.6	18.3	1860	3	AF441264	AF441264 Drosophil
41	367.6	18.3	2764	3	AY051451	AY051451 Drosophil
42	336.8	16.8	2860	3	AK113018	AK113018 Ciona int
43	305.6	15.2	394	6	BD071198	BD071198 Secreted
44	302	15.0	9196	6	BD168518	BD168518 Cells pro
45	300.4	15.0	1147	9	AB049828	AB049828 Homo sapi

ALIGNMENTS

RESULT 1
BD168516
LOCUS BD168516 2008 bp DNA linear PAT 17-JAN-2003
DEFINITION Cells producing antibody composition.
ACCESSION BD168516
VERSION BD168516.1 GI:27874328
KEYWORDS WO 0231140-A/1.
SOURCE Cricetulus griseus (Chinese hamster)
ORGANISM Cricetulus griseus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae;
Cricetulus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2008)
AUTHORS Kanda,Y., Sato,M., Nakamura,K., Uchida,K., Shinkawa,T., Yamane,N.,
Hosaka,E., Yamasaki,M. and Hanai,N.

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
  TITLE     Cells producing antibody composition
  JOURNAL   Patent: WO 0231140-A 1 18-APR-2002;
            KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD
COMMENT     OS   Cricetulus griseus (chinese hamster)
            PN   WO 0231140-A/1
            PD   18-APR-2002
            PF   05-OCT-2001 WO 2001JP008804
            PR   06-OCT-2000 JP 00P   308526
            PI   YUTAKA KANDA,MITSUO SATO,KAZAYASU NAKAMURA,KAZUHISA UCHIDA, PI
              TOYOHIDE SHINKAWA,NAOKO YAMANE,EMI HOSAKA,MOTOO YAMASAKI,NOBUO
            PI   HANAI
            PC   C12N5/10,C12P21/08,C07K16/00,A01K67/00,A61K39/395,C12N9/00, PC
              C12N15/52,
            PC   G01N33/53
            CC   Cells producing antibody composition
            FH   Key             Location/Qualifiers
            FT   source          1. .2008
            FT                   /organism='Cricetulus griseus (chinese  FT
                        hamster)'.
FEATURES              Location/Qualifiers
     source           1. .2008
                      /organism="Cricetulus griseus"
                      /mol_type="genomic DNA"
                      /db_xref="taxon:10029"
BASE COUNT       626 a    425 c    465 g    492 t
ORIGIN

  Query Match             100.0%;  Score 2008;  DB 6;  Length 2008;
  Best Local Similarity   100.0%;  Pred. No. 0;
  Matches 2008;  Conservative    0;  Mismatches    0;  Indels    0;  Gaps    0;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCC 120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCC 120

Qy        121 TGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTGGT 180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        121 TGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTGGT 180

Qy        181 CATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTCTT 240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        181 CATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTCTT 240

Qy        241 GCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTC 300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        241 GCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTC 300

Qy        301 CGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAGAA 360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        301 CGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAGAA 360

Qy        361 GAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATGAT 420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        361 GAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATGAT 420

Qy        421 CTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGG 480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        421 CTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGG 480

Qy        481 TTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAAGA 540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        481 TTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAAGA 540

Qy        541 CATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATCTA 600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        541 CATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATCTA 600

Qy        601 TACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATCTG 660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Db        601 TACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATCTG 660

Qy        661 ACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCC 720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        661 ACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCC 720

Qy        721 AGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTG 780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        721 AGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTG 780

Qy        781 GTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAAT 840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        781 GTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAAT 840

Qy        841 TGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACA 900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        841 TGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACA 900

Qy        901 GACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAA 960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        901 GACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAA 960

Qy        961 GTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGGCT 1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        961 GTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGGCT 1020

Qy       1021 GTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGTGG 1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1021 GTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGTGG 1080

Qy       1081 GTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAGAA 1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1081 GTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAGAA 1140

Qy       1141 GAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCACT 1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1141 GAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCACT 1200

Qy       1201 GACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTGAA 1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1201 GACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTGAA 1260

Qy       1261 GAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGGCC 1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1261 GAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGGCC 1320

Qy       1321 ACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTATT 1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1321 ACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTATT 1380

Qy       1381 AGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCACTT 1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1381 AGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCACTT 1440

Qy       1441 CGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTTTT 1500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1441 CGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTTTT 1500

Qy       1501 TCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCTCT 1560
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1501 TCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCTCT 1560

Qy       1561 GCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACCAG 1620
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1561 GCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACCAG 1620

Qy       1621 ATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAGAT 1680
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1621 ATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAGAT 1680

Qy       1681 ATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAACTA 1740
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1681 ATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAACTA 1740
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1741 GGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAATAC 1800
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1741 GGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAATAC 1800

Qy       1801 CCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATTTA 1860
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1801 CCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATTTA 1860

Qy       1861 GTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGACAT 1920
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1861 GTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGACAT 1920

Qy       1921 GCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTTGT 1980
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1921 GCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTTGT 1980

Qy       1981 GAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008
             ||||||||||||||||||||||||||||
Db       1981 GAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008
```

RESULT 2
BC010666
LOCUS BC010666 2976 bp mRNA linear ROD 16-APR-2003
DEFINITION Mus musculus fucosyltransferase 8, mRNA (cDNA clone MGC:11418 IMAGE:3594582), complete cds.
ACCESSION BC010666
VERSION BC010666.1 GI:14715012
KEYWORDS MGC.
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2976)
AUTHORS Strausberg,R.L., Feingold,E.A., Grouse,L.H., Derge,J.G., Klausner,R.D., Collins,F.S., Wagner,L., Shenmen,C.M., Schuler,G.D., Altschul,S.F., Zeeberg,B., Buetow,K.H., Schaefer,C.F., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Jordan,H., Moore,T., Max,S.I., Wang,J., Hsieh,F., Diatchenko,L., Marusina,K., Farmer,A.A., Rubin,G.M., Hong,L., Stapleton,M., Soares,M.B., Bonaldo,M.F., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brownstein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Prange,C., Raha,S.S., Loquellano,N.A., Peters,G.J., Abramson,R.D., Mullahy,S.J., Bosak,S.A., McEwan,P.J., McKernan,K.J., Malek,J.A., Gunaratne,P.H., Richards,S., Worley,K.C., Hale,S., Garcia,A.M., Gay,L.J., Hulyk,S.W., Villalon,D.K., Muzny,D.M., Sodergren,E.J., Lu,X., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E., Ketteman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Madan,A., Young,A.C., Shevchenko,Y., Bouffard,G.G., Blakesley,R.W., Touchman,J.W., Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J., Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Krzywinski,M.I., Skalska,U., Smailus,D.E., Schnerch,A., Schein,J.E., Jones,S.J. and Marra,M.A.
TITLE Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)
MEDLINE 22388257
PUBMED 12477932
REFERENCE 2 (bases 1 to 2976)
AUTHORS Strausberg,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-JUL-2001) National Institutes of Health, Mammalian Gene Collection (MGC), Cancer Genomics Office, National Cancer Institute, 31 Center Drive, Room 11A03, Bethesda, MD 20892-2590, USA
REMARK NIH-MGC Project URL: http://mgc.nci.nih.gov
COMMENT Contact: MGC help desk
Email: cgapbs-r@mail.nih.gov
Tissue Procurement: Jeffrey Green M.D.
cDNA Library Preparation: Life Technologies, Inc.
cDNA Library Arrayed by: The I.M.A.G.E. Consortium (LLNL)
DNA Sequencing by: Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center
Center code: BCM-HGSC
Web site: http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/cdna/
Contact: amg@bcm.tmc.edu
Gunaratne, P.H., Garcia, A.M., Lu, X., Hulyk, S.W., Loulseged, H., Kowis, C.R., Sneed, A.J., Martin, R.G., Muzny, D.M., Nanavati, A.N., Gibbs, R.A.

Clone distribution: MGC clone distribution information can be found through the I.M.A.G.E. Consortium/LLNL at: http://image.llnl.gov
Series: IRAK Plate: 16 Row: l Column: 5
This clone was selected for full length sequencing because it passed the following selection criteria: matched mRNA gi: 8393370.

FEATURES Location/Qualifiers
source 1. .2976
/organism="Mus musculus"
/mol_type="mRNA"
/strain="FVB/N"
/db_xref="taxon:10090"
/clone="MGC:11418 IMAGE:3594582"
/tissue_type="Mammary tumor. C3(1)-Tag model. Infiltrating ductal carcinoma. 5 month old virgin mouse."
/clone_lib="NCI_CGAP_Mam6"
/lab_host="DH10B"
/note="Vector: pCMV-SPORT6"
gene 1. .2976
/gene="Fut8"
/db_xref="LocusID:53618"
/db_xref="MGI:1858901"
CDS 584. .2311
/codon_start=1
/product="fucosyltransferase 8"
/protein_id="AAH10666.1"
/db_xref="GI:14715013"
/db_xref="LocusID:53618"
/translation="MRAWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGTATGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
QARNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKHLEGNELQRHADEILLDLGHHE
RSIMTDLYYLEQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKARKLVCNINKGC
GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGLSTGH
WSGEVNDKNIQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLLRVHGDPAVWWVSQFVKY
LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
LARRMQVDKKDVYLATDDPTLLKEAKTKYSNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
AVYPHKPRTEEEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGINRKLGKTGLYPSYKVREKIETVK
YPTYPEAEK"
BASE COUNT 909 a 626 c 660 g 781 t
ORIGIN

Query Match 90.1%; Score 1809.4; DB 10; Length 2976;
Best Local Similarity 94.1%; Pred. No. 0;
Matches 1891; Conservative 0; Mismatches 116; Indels 2; Gaps 1;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              || |||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Db        483 AAAAGAAACCTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAGTTCTT 542

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGA--AGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              |||||||| ||||| ||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        543 TGAGCTCCAGGAAGATAGAGGACAGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 602

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||
Db        603 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGTTATTTTATATAGGTG 662

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||||||||||||||||||||||||||| || || ||||||||||||||||||||||||
Db        663 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGATCACTCCAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 722

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              |||||||||| || |||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||
Db        723 TTGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAAAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCTGAGTCTC 782

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db        783 TCCGAATACCAGAAGGCCCCATTGACCAGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 842
Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db        843 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGAAATG 902
Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db        903 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCTTAAGAAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 962
Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db        963 GGTTTTTTCTACAAAGCGAACTGAAGAAATTAAAGCATTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1022
Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db       1023 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACACCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 1082
Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db       1083 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGGGATTGGCGTGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1142
Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db       1143 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTCCAGAATCCTAAGGACTGCAGCAAAG 1202
Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db       1203 CCAGGAAGCTGGTGTGTAACATCAATAAAGGCTGTGGCTATGGTTGTCAACTCCATCACG 1262
Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db       1263 TGGTCTACTGTTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1322
Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db       1323 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGTA 1382
Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db       1383 CAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTAAATGACAAAAACATTC 1442
Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db       1443 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGGCCTCCTTACTTACCACTGG 1502
Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db       1503 CTGTTCCAGAAGACCTTGCAGACCGACTCCTAAGAGTCCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1562
Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db       1563 GGGTGTCCCAGTTTGTCAAATACTTGATTCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAAGGAAATAG 1622
Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db       1623 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1682
Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db       1683 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCACCCCATCGAGGAGTACATGGTACACGTTG 1742
Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db       1743 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGATAAAAAAAGAGTATATCTGG 1802
Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db       1803 CTACTGATGATCCTACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1862
Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db       1863 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAATCGGTACACAGAAAATTCAC 1922
Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db       1923 TTCGGGGTGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCACAGGCTGACTTTCTAGTGTGTACTT 1982
Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db       1983 TTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACCCTGCATCCTGATGCCT 2042
Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db       2043 CTGCGAACTTCCATTCTTTGGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAATC 2102
Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db       2103 AGATTGCTGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGAAGAGGAAATTCCAATGGAACCTGGAG 2162
Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db       2163 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTCTAAAGGTATCAACAGAAAAC 2222
Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db       2223 TTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAGT 2282
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATT 1858
Db       2283 ATCCCACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGAAGTAGAAGAGATTAACAACAGAACT 2342
Qy       1859 TAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGAC 1918
Db       2343 CACTTCAGACCATCTCGGCCAAGCAGAAGACGCAGACTAACACGTGGTTCATTGATAGAC 2402
Qy       1919 ATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTT 1978
Db       2403 ACGCTCCACACCAAGAGCAAGCGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTT 2462
Qy       1979 GTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCAT 2007
Db       2463 ATGAAGGGCTGTGGTGCCCTCAAGCCCAT 2491
```

```
RESULT 3
AB025198
LOCUS       AB025198               2176 bp    mRNA    linear   ROD 05-AUG-2000
DEFINITION  Mus musculus mRNA for alpha-1,6-fucosyltransferase, complete cds.
ACCESSION   AB025198
VERSION     AB025198.1  GI:4586553
KEYWORDS    alpha-1,6-fucosyltransferase.
SOURCE      Mus musculus (house mouse)
  ORGANISM  Mus musculus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE   1  (sites)
  AUTHORS   Hayashi,H., Yoneda,A., Asada,M., Ikekita,M. and Imamura,T.
  TITLE     Molecular cloning of mouse alpha-1,6-fucosyltransferase and
            expression of its mRNA in the developing cerebrum
  JOURNAL   DNA Seq. 11 (1-2), 91-96 (2000)
  MEDLINE   20358720
   PUBMED   10902914
REFERENCE   2  (bases 1 to 2176)
  AUTHORS   Hayashi,H., Yoneda,A. and Imamura,T.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-MAR-1999) Toru Imamura, National Institute of
            Bioscience and Human Technology, Biosignaling Department; 1-1
            Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan
            (E-mail:imamura@nibh.go.jp, Tel:81-298-54-6072, Fax:81-298-54-6149)
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2176
                     /organism="Mus musculus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:10090"
```

```
                     /sex="male"
                     /tissue_type="cerebrum"
                     /dev_stage="adult"
     CDS             205. .1932
                     /codon_start=1
                     /product="alpha-1,6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="BAA76392.1"
                     /db_xref="GI:4586554"
                     /translation="MRAWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSTRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGTATGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QARNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKHLEGNELQRHADEILLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKARKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGLSTGH
                     WSGEVNDKNIQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLLRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEQHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPTLLKEANTKYSNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AVYPHKPRTEEEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGINRKLGKTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
BASE COUNT      669 a    474 c    494 g    539 t
ORIGIN
```

Query Match 89.9%; Score 1804.6; DB 10; Length 2176;
Best Local Similarity 94.0%; Pred. No. 0;
Matches 1888; Conservative 0; Mismatches 119; Indels 2; Gaps 1;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||  ||||||  |||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||
Db        104 AAAAGAAACCTATTTTCTTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAGTTCTT 163

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGA--AGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  |||||  |||  |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        164 TGAGCTCCAGGAAGATAGAGGACAGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 223

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||  ||||||||||||||
Db        224 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGTTATTTTATATAGGTG 283

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              ||||||||||||||||||||||||||||||||  ||  ||  |  ||||||||||||||||||||
Db        284 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGATCACTCCACCAGAGAACTCTCCAAGATTC 343

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              ||||||||||  ||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        344 TTGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAAAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCTGAGTCTC 403

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              ||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        404 TCCGAATACCAGAAGGCCCCATTGACCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 463

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
Db        464 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGAAATG 523

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        524 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCTTAAGAAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 583

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||||||||||||  |||  ||||||||||||||  |  ||||||||||  ||||||||||
Db        584 GGTTTTTTCTACAAAGCGAACTGAAGAAATTAAAGCATTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 643

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Db        644 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACACCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 703

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              ||||||||||||||||||||||||||||||  ||  |||||  ||||||||  ||||||||||
Db        704 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGGGATTGGCGTGAAAAAGAGGCCAAAGATC 763

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||  ||||||||||||
Db        764 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTCCAGAATCCTAAGGACTGCAGCAAAG 823

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              ||||  ||||||||  |||||  |||||  ||||||||||||||||||  ||||||||||||  |
Db        824 CCAGGAAGCTGGTGTGTAACATCAATAAAGGCTGTGGCTATGGTTGTCAACTCCATCACG 883

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              ||||  |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        884 TGGTCTACTGTTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 943

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |
Db        944 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGTA 1003

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              |||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||  ||||||||  |||
Db       1004 CAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTAAATGACAAAAACATTC 1063

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||  |||
Db       1064 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGGCCTCCTTACTTACCACTGG 1123

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              ||||  ||||||||||||||||||  ||||||||  ||||||||||||||  ||||||||||||
Db       1124 CTGTTCCAGAAGACCTTGCAGACCGACTCCTAAGAGTCCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1183

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              ||||  |||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||  |||||||
Db       1184 GGGTGTCCCAGTTTGTCAAATACTTGATTCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAAGGAAATAG 1243

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1244 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1303

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  |||||  ||||||||||
Db       1304 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCACCCCATCGAGGAGTACATGGTACACGTTG 1363

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              ||  ||||||||||||||||||  |||||||||  ||||||||||||||||||||  |||||||
Db       1364 AACAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGATAAAAAAAAGAGTATATCTGG 1423

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |  ||||||||  |||  ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Db       1424 CTACTGATGATCCTACTTTGTTAAAGGAGGCAAACACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1483

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||
Db       1484 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAATCGGTACACAGAAAATTCAC 1543

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||  ||||||||||
Db       1544 TTCGGGGTGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCACAGGCTGACTTTCTAGTGTGTACTT 1603

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              ||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
Db       1604 TTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACCCTGCATCCTGATGCCT 1663

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |
Db       1664 CTGCGAACTTCCATTCTTTGGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAATC 1723

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              |||||||  ||||||||||||  ||||||||||  |||||||||  ||  ||||||||||||||
Db       1724 AGATTGCTGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGAAGAGGAAATTCCAATGGAACCTGGAG 1783

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              ||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||  |||||||||  ||||||||||||
Db       1784 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTCTAAAGGTATCAACAGAAAAC 1843

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              |  ||||||||||  |  ||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |
Db       1844 TTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAGT 1903
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATT 1858
Db       1904 ATCCCACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGAAGTAGAAGAGATTAACAACAGAACT 1963

Qy       1859 TAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGAC 1918
Db       1964 CACTTCAGACCATCTCGGCCAAGCAGAAGACGCAGACTAACACGTGGTTCATTGATAGAC 2023

Qy       1919 ATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTT 1978
Db       2024 ACGCTCCACACCAAGAGCAAGCGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTT 2083

Qy       1979 GTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCAT 2007
Db       2084 ATGAAGGGCTGTGGTGCCCTCAAGCCCAT 2112
```

RESULT 4
BD168517
LOCUS BD168517 1728 bp DNA linear PAT 17-JAN-2003
DEFINITION Cells producing antibody composition.
ACCESSION BD168517
VERSION BD168517.1 GI:27874329
KEYWORDS WO 0231140-A/2.
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1728)
AUTHORS Kanda,Y., Sato,M., Nakamura,K., Uchida,K., Shinkawa,T., Yamane,N., Hosaka,E., Yamasaki,M. and Hanai,N.
TITLE Cells producing antibody composition
JOURNAL Patent: WO 0231140-A 2 18-APR-2002;
KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD
COMMENT OS Mus musculus (mouse)
PN WO 0231140-A/2
PD 18-APR-2002
PF 05-OCT-2001 WO 2001JP008804
PR 06-OCT-2000 JP 00P 308526
PI YUTAKA KANDA,MITSUO SATO,KAZAYASU NAKAMURA,KAZUHISA UCHIDA, PI TOYOHIDE SHINKAWA,NAOKO YAMANE,EMI HOSAKA,MOTOO YAMASAKI,NOBUO
PI HANAI
PC C12N5/10,C12P21/08,C07K16/00,A01K67/00,A61K39/395,C12N9/00, PC C12N15/52,
PC G01N33/53
CC Cells producing antibody composition
FH Key Location/Qualifiers
FT source 1. .1728
FT /organism='Mus musculus (mouse)'.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1. .1728
/organism="Mus musculus"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:10090"
BASE COUNT 529 a 365 c 400 g 434 t
ORIGIN

Query Match 78.9%; Score 1584; DB 6; Length 1728;
Best Local Similarity 94.8%; Pred. No. 0;
Matches 1638; Conservative 0; Mismatches 90; Indels 0; Gaps 0;

```
Qy        100 ATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 159
Db          1 ATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 60

Qy        160 TTATTGTTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGC 219
Db         61 TTGTTATTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGATCACTCCAGC 120

Qy        220 AGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTG 279
Db        121 AGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAAAATGAAGACTTG 180

Qy        280 AGGAGAATGGCTGAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACA 339
Db        181 AGGCGAATGGCTGAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCCATTGACCAGGGGACAGCTACA 240

Qy        340 GGAAGAGTCCGTGTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAC 399
Db        241 GGAAGAGTCCGTGTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAC 300

Qy        400 AAGAAACAAGCTAGGAATGATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAA 459
Db        301 AAGAAACAAGCTAGAAATGGTCTGGGGAAGGATCATGAAATCTTAAGAAGGAGGATTGAA 360

Qy        460 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTA 519
Db        361 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGCGAACTGAAGAAATTAAAGCATTTA 420

Qy        520 GAAGGAAACGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAA 579
Db        421 GAAGGAAATGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACACCATGAA 480

Qy        580 AGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGG 639
Db        481 AGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGGGATTGGCGT 540

Qy        640 GAAAAAGAAGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAAT 699
Db        541 GAAAAAGAGGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTCCAGAAT 600

Qy        700 CCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTAT 759
Db        601 CCTAAGGACTGCAGCAAAGCCAGGAAGCTGGTGTGTAACATCAATAAAGGCTGTGGCTAT 660

Qy        760 GGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACA 819
Db        661 GGTTGTCAACTCCATCACGTGGTCTACTGTTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACA 720

Qy        820 CTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGA 879
Db        721 CTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAGA 780

Qy        880 CCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA 939
Db        781 CCTGTAAGTGAGACATGTACAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA 840

Qy        940 GTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGT 999
Db        841 GTAAATGACAAAAACATTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGG 900

Qy       1000 CCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCAT 1059
Db        901 CCTCCTTACTTACCACTGGCTGTTCCAGAAGACCTTGCAGACCGACTCCTAAGAGTCCAT 960

Qy       1060 GGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCT 1119
Db        961 GGTGACCCTGCAGTGTGGTGGGTGTCCCAGTTTGTCAAATACTTGATTCGTCCACAACCT 1020

Qy       1120 TGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1179
Db       1021 TGGCTGGAAAAGGAAATAGAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1080

Qy       1180 GGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAG 1239
Db       1081 GGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCACCCCATCGAG 1140

Qy       1240 GAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGAT 1299
Db       1141 GAGTACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGAT 1200

Qy       1300 AAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAG 1359
Db       1201 AAAAAAAGAGTATATCTGGCTACTGATGATCCTACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAG 1260

Qy       1360 TACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAAC 1419
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1261 TACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAAT 1320

Qy       1420 CGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCT 1479
             || |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||||
Db       1321 CGGTACACAGAAAATTCACTTCGGGGTGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCACAGGCT 1380

Qy       1480 GACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1539
             ||||| || |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Db       1381 GACTTTCTAGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1440

Qy       1540 ACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGA 1599
             || |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Db       1441 ACCCTGCATCCTGATGCCTCTGCGAACTTCCATTCTTTGGATGACATCTACTATTTTGGA 1500

Qy       1600 GGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAA 1659
             |||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||| |||||||||| ||||||||
Db       1501 GGCCAAAATGCCCACAATCAGATTGCTGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGAAGAGGAA 1560

Qy       1660 ATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCT 1719
             || || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |||
Db       1561 ATTCCAATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTCT 1620

Qy       1720 AAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAG 1779
             |||||| |||||||||||||| |||||||||||  | || || ||||||||||||||||||
Db       1621 AAAGGTATCAACAGAAAACTTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGAG 1680

Qy       1780 AAGATAGAAACAGTCAAATACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAG 1827
             ||||||||||||||||| || || ||||||||||||||||||||||||
Db       1681 AAGATAGAAACAGTCAAGTATCCCACATATCCTGAAGCTGAAAAATAG 1728


RESULT 5
HSA539535
LOCUS       HSA539535               2796 bp    mRNA    linear   PRI 03-FEB-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), clone
            CD-L1.
ACCESSION   AJ539535
VERSION     AJ539535.1  GI:28200807
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2796)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-JAN-2003) Oriol R., U504, Inserm, 16 Av. Paul
            Vaillant-Couturier, 94807, FRANCE
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2796
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="CD-L1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .2796
                     /gene="FUT8"
     CDS             326. .2053
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fucose in alpha1,6 linkage to the internal
                     GlcNAc of the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD62444.1"
                     /db_xref="GI:28200808"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPETADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    2766. .2771
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      2777
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT      874 a    552 c    605 g    765 t
ORIGIN

  Query Match           78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 2796;
  Best Local Similarity  87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||  ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||
Db        225 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 284

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  |||| ||||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db        285 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 344

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Db        345 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 404

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
Db        405 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 464

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | |||||||| || |||||||||| || |||||||||||||| ||||||| || ||||
Db        465 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 524

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| |||||||| || ||||||
Db        525 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 584

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db        585 AAGAGCAGCTTGTTAAGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 644

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              |||||| |||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        645 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 704

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Db        705 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 764

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||
Db        765 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 824

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||
Db        825 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 884

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db        885 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 944
Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db        945 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1004
Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db       1005 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1064
Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db       1065 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1124
Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db       1125 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1184
Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db       1185 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1244
Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db       1245 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1304
Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db       1305 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1364
Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db       1365 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1424
Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db       1425 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1484
Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db       1485 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1544
Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db       1545 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1604
Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db       1605 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1664
Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db       1665 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1724
Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db       1725 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1784
Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db       1785 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1844
Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db       1845 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 1904
Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db       1905 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 1964
Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1965 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2024
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
Db       2025 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2084
Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
Db       2085 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2144
Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
Db       2145 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2204
Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
Db       2205 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2260
```

```
RESULT 6
HSY17976
LOCUS       HSY17976               2898 bp    mRNA    linear   PRI 17-SEP-1998
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase,
            transcript B1.
ACCESSION   Y17976
VERSION     Y17976.1  GI:3451262
KEYWORDS    FUT8 gene; glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Cailleau,A., Balanzino,L., Candelier,J.J., Oriol,R. and
            Mollicone,R.
  TITLE     Differential splice variants of human FUT8 embryonic cDNA
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2898)
  AUTHORS   Cailleau,A.L.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-AUG-1998) A.L.V. Cailleau, INSERM U178, 16 av P.V.
            Couturier, 94807 Villejuif Cedex, FRANCE
COMMENT     Related entry: D89289.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2898
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23"
                     /clone="FUT8 transcript B1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
     gene            1. .2898
                     /gene="FUT8"
     exon            1. .101
                     /gene="FUT8"
                     /note="B"
     exon            102. .200
                     /gene="FUT8"
                     /note="C"
     exon            201. .>2156
                     /gene="FUT8"
                     /note="D"
     CDS             429. .2156
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /note="allele I"
                     /codon_start=1
                     /product="glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAA76985.1"
                     /db_xref="GI:3451263"
                     /db_xref="SPTREMBL:O00235"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
```

```
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     variation       2218
                     /gene="FUT8"
                     /note="II"
                     /frequency=".5"
                     /replace="c"
     polyA_signal    2758. .2763
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    2770. .2775
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    2869. .2874
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
BASE COUNT      881 a    589 c    641 g    787 t
ORIGIN

  Query Match           78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 2898;
  Best Local Similarity  87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||| |||| |||||| |  ||| |||||||||| ||||||||
Db        328 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 387

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              |||||||| ||   ||  |||| ||||||||| |||||||||||| ||||||||||
Db        388 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 447

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db        448 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 507

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
Db        508 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 567

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | ||||||||| || |||||||||||| || |||||||||||||||| ||||||| || ||||
Db        568 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 627

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||| || |||||||
Db        628 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 687

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db        688 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 747

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              ||||||| |||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        748 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 807

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||||
Db        808 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 867

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||
Db        868 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 927

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||
Db        928 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 987

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Db        988 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1047

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              ||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Db       1048 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1107

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              |||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1108 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1167

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1168 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1227

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1228 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1287

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              |||||||||||||| |||||||||||||| || ||||| |||||||| || ||||||||||
Db       1288 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1347

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              |||||||||||||||| |||||||||||  |  |||| |||||||| ||||||||||||
Db       1348 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1407

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              |||| || |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| |||| |||||||
Db       1408 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1467

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1468 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1527

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              | |||||||||||||||||| |||||||||||||||| || |||||||| || ||||
Db       1528 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1587

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              |||||||||||||||||| | |||||||||| ||||||| |||||||||||||||| |||
Db       1588 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1647

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |||| |||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Db       1648 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1707

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1708 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1767

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||| || |||||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||||||||||
Db       1768 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1827

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Db       1828 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1887

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||| |
Db       1888 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1947

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  ||||| |||||||||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||
Db       1948 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2007

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              |||||||||||||||||||||||| |||||| |||| || |||||||||||||||| |||
Db       2008 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2067
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db       2068 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2127

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
Db       2128 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2187

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
Db       2188 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2247

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
Db       2248 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2307

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
Db       2308 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2363
```

RESULT 7
HSA539536

```
LOCUS       HSA539536               2902 bp    mRNA    linear   PRI 03-FEB-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), clone
            DCD-L2.
ACCESSION   AJ539536
VERSION     AJ539536.1  GI:28200809
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2902)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-JAN-2003) Oriol R., U504, Inserm, 16 Av. Paul
            Vaillant-Couturier, 94807, FRANCE
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2902
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="CD-L2"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .2902
                     /gene="FUT8"
     CDS             326. .2053
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fucose in alpha1,6 linkage to the internal
                     GlcNAc of the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD62445.1"
                     /db_xref="GI:28200810"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    2853. .2858
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      2887
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT      907 a    561 c    627 g    807 t
ORIGIN
```

Query Match 78.4%; Score 1575.2; DB 9; Length 2902;
Best Local Similarity 87.5%; Pred. No. 0;
Matches 1781; Conservative 0; Mismatches 223; Indels 32; Gaps 4;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
Db        225 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 284

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
Db        285 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 344

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
Db        345 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 404

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
Db        405 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 464

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
Db        465 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 524

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
Db        525 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 584

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db        585 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 644

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db        645 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 704

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db        705 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 764

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db        765 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 824

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db        825 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 884

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db        885 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 944

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db        945 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1004

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db       1005 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1064
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1065 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1124

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1125 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1184

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              |||||||||||| |||||||||||||| || ||||| |||||||| || ||||||||||
Db       1185 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1244

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              |||||||||||||||| |||||||||||  |  |||| |||||||| ||||||||||||
Db       1245 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1304

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              |||| || |||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| ||||  |||||||
Db       1305 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1364

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1365 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1424

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              | |||||||||||||||||| |||||||||||||||| || |||||||| || ||||
Db       1425 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1484

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              |||||||||||||||||| | |||||||||| ||||||| |||||||||||||||| |||
Db       1485 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1544

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Db       1545 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1604

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1605 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1664

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||| || |||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||||||||||
Db       1665 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1724

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Db       1725 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1784

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||| |
Db       1785 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1844

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  ||||| |||||||||| ||||||  ||| ||||| ||||||||||||||||
Db       1845 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 1904

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              |||||||||||||||||||||||||||||| |||| || |||||||||||||||| |||
Db       1905 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 1964

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              | ||||  || ||||| || || |||||||||| |||||||||||||||| ||||| |
Db       1965 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2024

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
              |||| |||||||||||| ||||| ||||| || |    || |||||||  ||
Db       2025 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2084

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
                   | ||  || | |||||.|||| | |||||| | | |||   ||
Db       2085 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2144
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
                  || ||   | | |  ||    ||| |  ||| ||||||||||||  |||||||
Db       2145 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2204

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
              || | ||| | | ||||||||  |||||||  |||||||||  ||||    | ||
Db       2205 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2260
```

```
RESULT 8
HSY17977
LOCUS       HSY17977                2992 bp    mRNA    linear   PRI 17-SEP-1998
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase,
            transcript B2.
ACCESSION   Y17977
VERSION     Y17977.1  GI:3451264
KEYWORDS    FUT8 gene; glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Cailleau,A., Balanzino,L., Candelier,J.J., Oriol,R. and
            Mollicone,R.
  TITLE     Differential splice variants of human FUT8 embryonic cDNA
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2992)
  AUTHORS   Cailleau,A.L.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-AUG-1998) A.L.V. Cailleau, INSERM U178, 16 av P.V.
            Couturier, 94807 Villejuif Cedex, FRANCE
COMMENT     Related entry: D89289.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2992
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /isolate="transcript B2"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
     gene            1. .2992
                     /gene="FUT8"
     exon            1. .101
                     /gene="FUT8"
                     /note="B"
     exon            102. .200
                     /gene="FUT8"
                     /note="C"
     exon            201. .>2156
                     /gene="FUT8"
                     /note="D"
     CDS             429. .2156
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /note="allele I"
                     /codon_start=1
                     /product="glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAA76986.1"
                     /db_xref="GI:3451265"
                     /db_xref="SPTREMBL:O00235"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
```

```
     variation       2218
                     /gene="FUT8"
                     /note="II"
                     /frequency=".5"
                     /replace="c"
     polyA_signal    2758. .2763
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    2770. .2775
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    2869. .2874
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
BASE COUNT      905 a    597 c    663 g    827 t
ORIGIN
```

Query Match 78.4%; Score 1575.2; DB 9; Length 2992;
Best Local Similarity 87.5%; Pred. No. 0;
Matches 1781; Conservative 0; Mismatches 223; Indels 32; Gaps 4;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||| ||||  ||||||     |    |||     |||||||||| ||||||||
Db        328 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 387

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  ||||  |||||||||  |||||||||||| ||||||||||
Db        388 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 447

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
Db        448 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 507

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              ||||  |||||  |||||||||||||| |||||  ||  ||||||  |||||||  ||||||||||
Db        508 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 567

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | ||||||||  ||  ||||||||||  ||  ||||||||||||||  |||||||  ||  ||||
Db        568 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 627

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              ||||  |||||||||||||||||||||||||||  ||||||  |||||||||  ||  |||||||
Db        628 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 687

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              ||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | ||  ||||
Db        688 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 747

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              ||||||  |||||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        748 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 807

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              |||||||  |||||  |||||||||||||||||||||||  ||||||||||  ||||||||||
Db        808 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 867

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||
Db        868 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 927

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||
Db        928 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 987

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              |||||||  |||||  ||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||
Db        988 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1047

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              |||  |||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||
Db       1048 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1107

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              ||||  |||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1108 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1167

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||  |||||  ||||||||||||||||||||
Db       1168 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1227

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              |||||||  ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1228 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1287

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              ||||||||||||  ||||||||||||||  ||  |||||  ||||||||  ||  ||||||||||
Db       1288 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1347

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              ||||||||||||||||  ||||||||||  |  ||||  ||||||||  ||||||||||||
Db       1348 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1407

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              ||||  ||  ||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||  ||||  |||||||
Db       1408 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1467

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1468 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1527

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              | ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||  ||  |||||||  ||  ||||
Db       1528 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1587

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              ||||||||||||||||||  | ||||||||||  |||||||  ||||||||||||||  |||
Db       1588 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1647

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              ||||  ||||||||||||||  ||||||||||||||  |||||||||  ||||||||||||||
Db       1648 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1707

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||||||||||
Db       1708 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1767

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              ||||  ||  ||||||||||||||||  ||||||||  |||||  ||||||||  ||||||||||
Db       1768 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1827

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              ||||||||||||||||  |  ||||||||||||||  ||||||||||  ||||||||||||
Db       1828 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1887

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||  |
Db       1888 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1947

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  |||||  ||||||||||  ||||||  |||  |||||  ||||||||||||||||
Db       1948 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2007

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              ||||||||||||||||||||  ||||||  ||||  ||  ||||||||||||||||  |||
Db       2008 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2067

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              | ||||  ||  |||||  ||  ||  ||||||||||  ||||||||||||||||||  |
Db       2068 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2127

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
              ||||  ||||||||||  |||||  |||||  ||  |    ||  |||||||  ||
Db       2128 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2187

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
                    | ||  || | |||||| ||||| | |||||| |*| |||   ||
Db       2188 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2247

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
                || ||   | | |  ||    ||| |  ||| ||||||||||||  |||||||
Db       2248 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2307

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
              || | ||| | | ||||||||  |||||||  |||||||||  ||||    | ||
Db       2308 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2363


RESULT 9
HSY17978
LOCUS       HSY17978               3186 bp    mRNA    linear   PRI 06-NOV-1998
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase
            transcript A1.
ACCESSION   Y17978
VERSION     Y17978.1  GI:3451266
KEYWORDS    FUT8 gene; glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Cailleau,A., Balanzino,L., Candelier,J.J., Oriol,R. and
            Mollicone,R.
  TITLE     Differential splice variants of human FUT8 embryonic cDNA
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3186)
  AUTHORS   Cailleau,A.L.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-AUG-1998) A.L.V. Cailleau, INSERM U178, 16 av P.V.
            Couturier, 94807 Villejuif Cedex, FRANCE
COMMENT     Related entry: D89289.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .3186
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23"
                     /clone="FUT8 transcript A1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
     gene            1. .3186
                     /gene="FUT8"
     exon            1. .389
                     /gene="FUT8"
                     /note="A"
     exon            390. .488
                     /gene="FUT8"
                     /note="C"
     exon            489. .>2444
                     /gene="FUT8"
                     /note="D"
     CDS             717. .2444
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /note="allele I"
                     /codon_start=1
                     /product="glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAA76987.1"
                     /db_xref="GI:3451267"
                     /db_xref="SPTREMBL:O00235"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     variation       2506
                     /gene="FUT8"
                     /note="II"
                     /frequency=".5"
                     /replace="c"
     polyA_signal    3046. .3051
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    3058. .3063
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    3157. .3162
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
BASE COUNT      910 a    710 c    721 g    840 t      5 others
ORIGIN

  Query Match           78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 3186;
  Best Local Similarity  87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy         1 AACAGAAACTTATTTCCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
             |||||||   ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||
Db       616 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 675

Qy        61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
             ||||||||  ||    ||  |||| |||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db       676 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 735

Qy       119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db       736 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 795

Qy       179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
             |||| |||||  |||||||||||||  |||| || ||||||  |||||| ||||||||||
Db       796 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 855

Qy       239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
             | ||||||| || |||||||||| || ||||||||||||||| ||||||| || ||||
Db       856 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 915

Qy       299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
             |||| |||||||||||||||||||||||| |||||| |||||||| || |||||||
Db       916 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 975

Qy       359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
             |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db       976 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1035

Qy       419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
             |||||| |||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db      1036 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1095

Qy       479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
             ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Db      1096 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1155

Qy       539 GACATGCAGATGAAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
             |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| ||||
Db      1156 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1215

Qy       599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
             |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||
Db      1216 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1275

Qy       659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
             ||||||| ||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Db      1276 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1335

Qy       719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1336 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1395

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838

Db       1396 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1455

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898

Db       1456 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1515

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958

Db       1516 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1575

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018

Db       1576 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1635

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078

Db       1636 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1695

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138

Db       1696 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1755

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198

Db       1756 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1815

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258

Db       1816 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1875

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318

Db       1876 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1935

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378

Db       1936 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1995

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438

Db       1996 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2055

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498

Db       2056 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2115

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558

Db       2116 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2175

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618

Db       2176 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2235

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678

Db       2236 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2295

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738

Db       2296 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2355

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798

Db       2356 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2415

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848

Db       2416 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2475

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893

Db       2476 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2535

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949

Db       2536 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2595

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004

Db       2596 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2651
```

RESULT 10
HSY17979

```
LOCUS       HSY17979               3280 bp    mRNA    linear   PRI 06-NOV-1998
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase
            transcript A2.
ACCESSION   Y17979
VERSION     Y17979.1  GI:3451268
KEYWORDS    FUT8 gene; glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Cailleau,A., Balanzino,L., Candelier,J.J., Oriol,R. and
            Mollicone,R.
  TITLE     Differential splice variants of human FUT8 embryonic cDNA
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3280)
  AUTHORS   Cailleau,A.L.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-AUG-1998) A.L.V. Cailleau, INSERM U178, 16 av P.V.
            Couturier, 94807 Villejuif Cedex, FRANCE
COMMENT     Related entry: D89289.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .3280
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23"
                     /clone="FUT8 transcript A2"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
     gene            1. .3280
                     /gene="FUT8"
     exon            1. .389
                     /gene="FUT8"
                     /note="A"
     exon            390. .488
                     /gene="FUT8"
                     /note="C"
     exon            489. .>2444
                     /gene="FUT8"
                     /note="D"
     CDS             717. .2444
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /note="allele I"
                     /codon_start=1
                     /product="glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAA76988.1"
                     /db_xref="GI:3451269"
                     /db_xref="SPTREMBL:O00235"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     variation       2506
                     /gene="FUT8"
                     /note="II"
                     /frequency=".5"
                     /replace="c"
     polyA_signal    3046. .3051
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    3058. .3063
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
     polyA_signal    3157. .3162
                     /gene="FUT8"
                     /note="putative"
BASE COUNT      934 a    718 c    743 g    880 t      5 others
ORIGIN

  Query Match             78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 3280;
  Best Local Similarity   87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy        1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
Db      616 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 675

Qy       61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
Db      676 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 735

Qy      119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
Db      736 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 795

Qy      179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
Db      796 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 855

Qy      239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
Db      856 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 915

Qy      299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
Db      916 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 975

Qy      359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db      976 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1035

Qy      419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db     1036 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1095

Qy      479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db     1096 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1155

Qy      539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db     1156 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1215

Qy      599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db     1216 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1275

Qy      659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db     1276 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1335

Qy      719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db     1336 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1395

Qy      779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db     1396 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1455

Qy      839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db     1456 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1515

Qy      899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db     1516 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1575

Qy      959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db     1576 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1635

Qy     1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db     1636 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1695

Qy     1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db     1696 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1755

Qy     1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db     1756 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1815

Qy     1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db     1816 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1875

Qy     1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db     1876 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1935

Qy     1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db     1936 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1995

Qy     1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db     1996 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2055

Qy     1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db     2056 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2115

Qy     1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db     2116 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2175

Qy     1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db     2176 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2235

Qy     1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db     2236 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2295

Qy     1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db     2296 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2355

Qy     1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db     2356 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2415
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
             |||| |||||||||||| ||||| ||||| || |     || ||||||| ||
Db       2416 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2475

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
                  | ||  || | |||||| ||||| | |||||| | | |||   ||
Db       2476 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2535

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
                ||  ||    | | |  ||    ||| |  ||| ||||||||||||  |||||||
Db       2536 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2595

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
              || | ||| | | ||||||||  |||||||  |||||||||  ||||    | ||
Db       2596 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 2651
```

```
RESULT 11
HSA536055
LOCUS       HSA536055              3568 bp    mRNA    linear   PRI 08-JAN-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), splice
            variant B5.
ACCESSION   AJ536055
VERSION     AJ536055.1  GI:27552399
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3568)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-JAN-2003) Oriol R., U504, INSERM, 16 Avenue Paul
            Vaillant-Couturier, Villejuif, 94807, FRANCE
COMMENT     related splice variants AJ536053.1, AJ536054.1 and AJ536056.1.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .3568
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="B2D-L1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .3568
                     /gene="FUT8"
     CDS             1098. .2825
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fuc in alpha1,6 to the internal GlcNAc of
                     the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD59926.1"
                     /db_xref="GI:27552400"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    3538. .3543
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      3553
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT     1054 a    751 c    788 g    975 t
ORIGIN
```

Query Match 78.4%; Score 1575.2; DB 9; Length 3568;
Best Local Similarity 87.5%; Pred. No. 0;
Matches 1781; Conservative 0; Mismatches 223; Indels 32; Gaps 4;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||   ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||
Db        997 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 1056

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||    ||  ||||  |||||||||  ||||||||||||  ||||||||||||
Db       1057 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 1116

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
Db       1117 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 1176

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              ||||  |||||  ||||||||||||||  |||||  ||  ||||||  |||||||  ||||||||||
Db       1177 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 1236

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | ||||||||  ||  ||||||||||||  ||  ||||||||||||||||  |||||||  ||  ||||
Db       1237 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 1296

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              ||||  ||||||||||||||||||||||||||  ||||||  |||||||||  ||  |||||||
Db       1297 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 1356

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | ||  ||||
Db       1357 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1416

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              ||||||  ||||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1417 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1476

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              |||||||  |||||  ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||  ||||||||||
Db       1477 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1536

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||
Db       1537 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1596

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||  ||||||||||
Db       1597 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1656

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              |||||||  |||||  ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Db       1657 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1716

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              |||  ||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||
Db       1717 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1776

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              ||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1777 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1836

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              ||||||||||||||||||  ||||||||||||||  |||||  ||||||||||||||||||||
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1837 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1896
Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db       1897 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1956
Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db       1957 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 2016
Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db       2017 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 2076
Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db       2077 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 2136
Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db       2137 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 2196
Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db       2197 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 2256
Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db       2257 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 2316
Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db       2317 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 2376
Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db       2377 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2436
Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db       2437 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2496
Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db       2497 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2556
Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db       2557 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2616
Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db       2617 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2676
Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db       2677 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2736
Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db       2737 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2796
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
Db       2797 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2856
Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
Db       2857 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2916
Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
Db       2917 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2976
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
Db       2977 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 3032
```

```
RESULT 12
HSA536053
LOCUS       HSA536053               3666 bp    mRNA    linear   PRI 08-JAN-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), splice
            variant B3.
ACCESSION   AJ536053
VERSION     AJ536053.1  GI:27552395
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3666)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-JAN-2003) Oriol R., U504, INSERM, 16 Avenue Paul
            Vaillant-Couturier, Villejuif, 94807, FRANCE
COMMENT     related splice variants AJ536054.1, AJ536055.1 and AJ536056.1.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .3666
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="B2CD-L1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .3666
                     /gene="FUT8"
     CDS             1196. .2923
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fuc in alpha1,6 to the internal GlcNAc of
                     the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD59924.1"
                     /db_xref="GI:27552396"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    3636. .3641
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      3651
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT     1077 a    768 c    808 g   1013 t
ORIGIN

  Query Match           78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 3666;
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Best Local Similarity   87.5%;  Pred. No. 0;
Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||| ||||  ||||||     |    |||     |||||||||| ||||||||
Db       1095 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 1154

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              |||||||| ||   ||  ||||  |||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db       1155 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 1214

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db       1215 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 1274

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
Db       1275 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 1334

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | |||||||| || |||||||||| || ||||||||||||||| ||||||| || ||||
Db       1335 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 1394

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||| || |||||||
Db       1395 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 1454

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db       1455 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1514

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              |||||| |||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1515 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1574

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Db       1575 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1634

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||
Db       1635 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1694

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1695 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1754

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Db       1755 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1814

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              ||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Db       1815 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1874

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              |||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1875 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1934

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              |||||||||||||||||| |||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1935 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1994

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1995 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 2054

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              |||||||||||| |||||||||||| || ||||| |||||||| || ||||||||||
Db       2055 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 2114

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              |||||||||||||||| |||||||||||  |  |||| |||||||| |||||||||||||
Db       2115 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 2174

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              |||| || |||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| |||| |||||||
Db       2175 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 2234

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       2235 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 2294

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              | |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||| || |||||||| || ||||
Db       2295 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 2354

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              |||||||||||||||||| | |||||||||| ||||||| ||||||||||||||| |||
Db       2355 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 2414

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Db       2415 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 2474

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Db       2475 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2534

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||| || |||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||||||||||
Db       2535 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2594

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Db       2595 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2654

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||| |
Db       2655 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2714

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  ||||| |||||||||| ||||||  ||| ||||| ||||||||||||||||
Db       2715 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2774

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              |||||||||||||||||||| |||||| |||| || |||||||||||||||| |||
Db       2775 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2834

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              | ||||  || ||||| || || |||||||||||| ||||||||||||||||| ||||| |
Db       2835 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2894

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
              |||| |||||||||| ||||| ||||| || |    || ||||||| ||
Db       2895 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2954

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
                  | ||  || | |||||| ||||| | |||||| | | |||   ||
Db       2955 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 3014

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
                  || ||   | | |  ||     ||| |  ||| ||||||||||||  |||||||
Db       3015 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 3074

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
              || | ||| | | ||||||||  |||||||  |||||||| ||||    | ||
Db       3075 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 3130


RESULT 13
HSA536054
LOCUS       HSA536054              3772 bp    mRNA    linear   PRI 08-JAN-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), splice
            variant B4.
ACCESSION   AJ536054
```

```
VERSION     AJ536054.1  GI:27552397
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3772)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-JAN-2003) Oriol R., U504, INSERM, 16 Avenue Paul
            Vaillant-Couturier, Villejuif, 94807, FRANCE
COMMENT     related splice variants AJ536053.1, AJ536055.1 and AJ536056.1.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .3772
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="B2CD-L2"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .3772
                     /gene="FUT8"
     CDS             1196. .2923
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fuc in alpha1,6 to the internal GlcNAc of
                     the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD59925.1"
                     /db_xref="GI:27552398"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    3723. .3728
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      3757
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT     1110 a    777 c    830 g   1055 t
ORIGIN

  Query Match           78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 3772;
  Best Local Similarity  87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||   ||||  ||||||     |    |||     |||||||||| ||||||||
Db       1095 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 1154

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  |||| |||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db       1155 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 1214

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db       1215 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 1274

Qy        179 GTCATTTGGTTCCAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              ||||  |||||  |||||||||||||  |||||  ||  ||||||  |||||||  |||||||||
Db       1275 GTCACTTGGTACCAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 1334

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              |  ||||||||  ||  ||||||||||  ||  ||||||||||||||  |||||||  ||  ||||
Db       1335 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 1394

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              ||||  ||||||||||||||||||||||||||||  ||||||  |||||||||  ||  |||||||
Db       1395 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 1454

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | ||  ||||
Db       1455 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1514

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              ||||||  ||||||||||||||||  |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1515 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1574

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              |||||||  |||||  ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||  ||||||||||
Db       1575 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1634

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||  ||||
Db       1635 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1694

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              ||||||||||||||  ||||||||||||||||||  ||||||||||||||  ||||||||||
Db       1695 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1754

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              |||||||  |||||  ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Db       1755 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1814

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              |||  |||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||
Db       1815 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1874

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              ||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1875 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1934

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              ||||||||||||||||||  ||||||||||||||  |||||  ||||||||||||||||||||
Db       1935 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1994

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              |||||||  ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1995 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 2054

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              ||||||||||||  ||||||||||||||  ||  |||||  ||||||||  ||  ||||||||||
Db       2055 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 2114

Qy        1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
               ||||||||||||||  ||||||||||  |  ||||  ||||||||  ||||||||||||||
Db       2115 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 2174

Qy        1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
               ||||  ||  ||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||  ||||  |||||||
Db       2175 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 2234

Qy        1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
               |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       2235 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 2294

Qy        1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
               | ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||  ||  ||||||||  ||  ||||
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       2295 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 2354

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              |||||||||||||||||| | |||||||||| |||||| |||||||||||||| |||
Db       2355 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 2414

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Db       2415 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 2474

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Db       2475 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2534

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||| || |||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||||||||||
Db       2535 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2594

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Db       2595 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2654

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||| |
Db       2655 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2714

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  ||||| |||||||||| ||||||  ||| ||||| ||||||||||||||||
Db       2715 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2774

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              |||||||||||||||||||| |||||| |||| || |||||||||||||||| |||
Db       2775 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2834

Qy       1739 TAGGAAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              | ||||  || ||||| || || |||||||||| ||||||||||||||| ||||| |
Db       2835 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2894

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
              |||| |||||||||| ||||| ||||| || |    || ||||||| ||
Db       2895 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2954

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
                  | ||  || | |||||| ||||| | |||||| | | |||   ||
Db       2955 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 3014

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
                  || ||   | | |   ||     ||| |  ||| ||||||||||   |||||||
Db       3015 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 3074

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
              || | ||| | | ||||||||  |||||||   |||||||||  ||||    | ||
Db       3075 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 3130


RESULT 14
HSA536056
LOCUS       HSA536056               4196 bp    mRNA    linear   PRI 08-JAN-2003
DEFINITION  Homo sapiens mRNA for alpha6-fucosyltransferase (FUT8 gene), splice
            variant B6.
ACCESSION   AJ536056
VERSION     AJ536056.1  GI:27552401
KEYWORDS    alpha6-fucosyltransferase; FUT8 gene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Mollicone,R., Michalski,J.C., Bauvy,C., Cailleau-Thomas,A.,
            Candelier,J.J., Martinez-Duncker,I., Breton,C., Codogno,P. and
            Oriol,R.
  TITLE     Splice variants of alpha6-fucosyltransferase are expressed early in
            human embryogenesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 4196)
  AUTHORS   Oriol,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-JAN-2003) Oriol R., U504, INSERM, 16 Avenue Paul
            Vaillant-Couturier, Villejuif, 94807, FRANCE
COMMENT     related splice variants AJ536053.1, AJ536054.1 and AJ536055.1.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .4196
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="14"
                     /map="14q23.2"
                     /clone="B3CD-L1"
                     /tissue_type="whole embryo"
                     /dev_stage="40-70 days"
                     /country="France:Paris"
     gene            1. .4196
                     /gene="FUT8"
     CDS             1726. .3453
                     /gene="FUT8"
                     /EC_number="2.4.1.68"
                     /function="adds fuc in alpha1,6 to the internal GlcNAc of
                     the core chitobiose"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="alpha6-fucosyltransferase"
                     /protein_id="CAD59927.1"
                     /db_xref="GI:27552402"
                     /translation="MRPWTGSWRWIMLILFAWGTLLFYIGGHLVRDNDHPDHSSRELS
                     KILAKLERLKQQNEDLRRMAESLRIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKK
                     QTRNGLGKDHEILRRRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHE
                     RSIMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKKLVCNINKGC
                     GYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGISTGH
                     WSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLVRVHGDPAVWWVSQFVKY
                     LIRPQPWLEKEIEEATKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQL
                     LARRMQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGV
                     ILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQI
                     AIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDGYSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVK
                     YPTYPEAEK"
     polyA_signal    4166. .4171
                     /gene="FUT8"
     polyA_site      4181
                     /gene="FUT8"
BASE COUNT     1245 a    854 c    900 g   1197 t
ORIGIN

  Query Match             78.4%;  Score 1575.2;  DB 9;  Length 4196;
  Best Local Similarity   87.5%;  Pred. No. 0;
  Matches 1781;  Conservative    0;  Mismatches  223;  Indels   32;  Gaps    4;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||   ||||  ||||||      |     |||     |||||||||| ||||||||
Db       1625 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 1684

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||    ||  |||| |||||||| |||||||||||||| ||||||||||||
Db       1685 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 1744

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db       1745 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 1804

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| |||||| ||||||||||
Db       1805 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 1864

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | |||||||| || |||||||||| || ||||||||||||||| ||||||| || ||||
Db       1865 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 1924

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db      1925 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 1984
Qy       359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db      1985 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 2044
Qy       419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db      2045 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 2104
Qy       479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db      2105 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 2164
Qy       539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db      2165 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 2224
Qy       599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db      2225 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 2284
Qy       659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db      2285 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 2344
Qy       719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db      2345 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 2404
Qy       779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db      2405 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 2464
Qy       839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db      2465 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 2524
Qy       899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db      2525 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 2584
Qy       959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db      2585 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 2644
Qy      1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db      2645 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 2704
Qy      1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db      2705 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 2764
Qy      1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db      2765 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 2824
Qy      1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db      2825 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 2884
Qy      1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db      2885 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 2944
Qy      1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db      2945 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 3004
Qy      1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db      3005 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 3064
Qy      1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db      3065 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 3124
Qy      1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db      3125 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 3184
Qy      1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db      3185 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 3244
Qy      1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db      3245 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 3304
Qy      1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db      3305 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 3364
Qy      1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db      3365 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 3424
Qy      1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
Db      3425 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 3484
Qy      1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
Db      3485 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTGAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 3544
Qy      1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
Db      3545 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 3604
Qy      1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCC 2004
Db      3605 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCTCATACCC 3660
```

RESULT 15
E15725

```
LOCUS       E15725                 2100 bp    DNA     linear   PAT 28-JUL-1999
DEFINITION  Human mRNA for alpha-1,6-fucosyltransferase, complete cds.
ACCESSION   E15725
VERSION     E15725.1  GI:5710408
KEYWORDS    JP 1998084975-A/1.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2100)
  AUTHORS   Taniguchi,N., Uozumi,H. and Yanagiya,S.
  TITLE     ALPHA-1,6-FUCOSYLTRANSFERASE GENE DERIVED FROM HUMAN
  JOURNAL   Patent: JP 1998084975-A 1 07-APR-1998;
            TOYOBO CO LTD
COMMENT     OS   Homo sapiens (human)
            PN   JP 1998084975-A/1
            PD   07-APR-1998
            PF   17-JUN-1997 JP 1997159692
            PR   22-JUL-1996 JP 96P   192260
            PI   TANIGUCHI NAOYUKI, UOZUMI HISAFUMI, YANAGIYA SHUSAKU PC
            C12N15/09,C07H21/04,C12N1/21,C12N9/10,(C12N15/09,C12R1:91), PC
            (C12N1/21,
            PC   C12R1:19),(C12N9/10,C12R1:19);
            CC   strandedness: Double;
            CC   topology: Linear;
            FH   Key             Location/Qualifiers
            FH
            FT   source          1. .2100
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
            FT                   /organism='Homo sapiens'
            FT                   /cell_type='stomach cancer cell' FT
                  /cell_line='MKN45'
            FT   CDS             198. .1925
            FT                   /product='alpha-1,6-fucosyltransferase'.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1. .2100
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
BASE COUNT      651 a    436 c    489 g    524 t
ORIGIN
```

Query Match 78.3%; Score 1572.8; DB 6; Length 2100;
Best Local Similarity 90.2%; Pred. No. 0;
Matches 1694; Conservative 0; Mismatches 182; Indels 2; Gaps 1;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||| ||||  ||||||   |   |||   |||||||||| ||||||||
Db         97 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 156

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  ||||  ||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||
Db        157 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 216

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db        217 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 276

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
Db        277 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 336

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | |||||||| || |||||||||||| || ||||||||||||||| ||||||| || ||||
Db        337 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 396

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              |||| ||||||||||||||||||||||||||||| |||||| |||||||| || |||||||
Db        397 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 456

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db        457 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 516

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              |||||| |||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        517 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 576

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Db        577 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 636

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||
Db        637 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 696

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||
Db        697 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 756

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        757 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 816

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              ||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Db        817 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 876

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              |||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        877 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 936

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              |||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db        937 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 996

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        997 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1056

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
              |||||||||||| |||||||||||||| || ||||| |||||||| || ||||||||||
Db       1057 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1116

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
              |||||||||||||||| ||||||||||  |  |||| |||||||| ||||||||||||||
Db       1117 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1176

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
              |||| || |||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| |||| |||||||
Db       1177 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1236

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
              ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1237 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1296

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
              | |||||||||||||||||| |||||||||||||||| || |||||||| || ||||
Db       1297 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1356

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
              |||||||||||||||||||| | |||||||||| ||||||| |||||||||||||| |||
Db       1357 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1416

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
              |||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Db       1417 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1476

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
              |||||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Db       1477 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1536

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
              |||| || |||||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||||||||
Db       1537 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1596

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
              |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Db       1597 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1656

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||| |
Db       1657 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1716

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
              | |||||  ||||| |||||||||| |||||  ||| ||||| ||||||||||||||||
Db       1717 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 1776

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
              |||||||||||||||||||| |||||| |||| || |||||||||||||||||| |||
Db       1777 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 1836

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
              | ||||  || ||||| || || |||||||||| |||||||||||||||| ||||| |
Db       1837 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 1896

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATT 1858
              |||| |||||||||| ||||| |||| || |   || |||||| ||| ||  || |
Db       1897 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 1956

Qy       1859 TAGTTCAGACCATCTCAG 1876
                |||||   | | |||||
Db       1957 CAGTTCGACCAAACTCAG 1974
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Search completed: February 2, 2004, 16:22:47
Job time : 7393.83 secs

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

GenCore version 5.1.6
Copyright (c) 1993 - 2004 Compugen Ltd.

OM nucleic - nucleic search, using sw model

Run on: February 2, 2004, 10:17:23 ; Search time 543.385 Seconds
(without alignments)
9975.371 Million cell updates/sec

Title: US-09-971-773-1
Perfect score: 2008
Sequence: 1 aacagaaacttatttttcctg.....gctgtgccctcaagcccatg 2008

Scoring table: IDENTITY_NUC
Gapop 10.0 , Gapext 1.0

Searched: 2552756 seqs, 1349719017 residues

Total number of hits satisfying chosen parameters: 5105512

Minimum DB seq length: 0
Maximum DB seq length: 2000000000

Post-processing: Minimum Match 0%
Maximum Match 100%
Listing first 45 summaries

Database : N_Geneseq_19Jun03:*
1: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1980.DAT:*
2: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1981.DAT:*
3: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1982.DAT:*
4: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1983.DAT:*
5: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1984.DAT:*
6: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1985.DAT:*
7: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1986.DAT:*
8: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1987.DAT:*
9: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1988.DAT:*
10: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1989.DAT:*
11: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1990.DAT:*
12: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1991.DAT:*
13: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1992.DAT:*
14: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1993.DAT:*
15: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1994.DAT:*
16: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1995.DAT:*
17: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1996.DAT:*
18: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1997.DAT:*
19: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1998.DAT:*
20: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA1999.DAT:*
21: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA2000.DAT:*
22: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA2001A.DAT:*
23: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA2001B.DAT:*
24: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA2002.DAT:*
25: /SIDS1/gcgdata/geneseq/geneseqn-embl/NA2003.DAT:*

Pred. No. is the number of results predicted by chance to have a score greater than or equal to the score of the result being printed, and is derived by analysis of the total score distribution.

SUMMARIES

	Result No.	Score	% Query Match	Length	DB	ID	Description
	1	2008	100.0	2008	24	ABK70031	Antibody productio
	2	1585.6	79.0	3291	23	ABV22468	Human prostate exp
	3	1585.6	79.0	3291	23	ABV28283	Human prostate exp
	4	1584	78.9	1728	24	ABK70032	Antibody productio
	5	1574.2	78.4	3007	22	AAH33315	Human colon cancer
	6	1572.8	78.3	2100	18	AAT76574	Human alpha 1-6 fu
	7	1514.8	75.4	1759	24	ABA98809	Alpha1,6-fucosyl t
	8	1474.2	73.4	1728	18	AAT76573	Pig alpha 1-6 fuco
	9	976.4	48.6	979	21	AAC63891	Chinese hamster FU
	10	976.4	48.6	979	24	ABK70036	Antibody productio
	11	893.2	44.5	979	21	AAC63892	Rat FUT8 cDNA. Ra
	12	893.2	44.5	979	24	ABK70037	Antibody productio
	13	881	43.9	1017	22	AAF87952	Human alpha 1-6 fu
	14	599.8	29.9	699	22	AAF87953	Human alpha 1-6 fu
	15	367.6	18.3	2761	23	ABL04601	Drosophila melanog
	16	305.6	15.2	394	20	AAV89049	EST clone CB100.
	17	302	15.0	9196	24	ABK70033	Antibody productio
	18	285.6	14.2	503	22	AAK11265	Human brain expres
	19	285.6	14.2	503	22	AAI42879	Probe #11565 used
c	20	231	11.5	4682	23	ABL04600	Drosophila melanog
	21	218.8	10.9	551	22	AAK11037	Human brain expres
	22	218.8	10.9	551	22	AAI42659	Probe #11345 used
	23	213.4	10.6	248	22	ABA47883	Human breast cell
	24	213.4	10.6	248	22	ABA65776	Human foetal liver
	25	213.4	10.6	248	22	ABA32861	Probe #11327 for g
	26	213.4	10.6	248	22	AAK14177	Human brain expres
	27	213.4	10.6	248	22	AAK25142	Human brain expres
	28	213.4	10.6	248	22	AAK39911	Human bone marrow
	29	213.4	10.6	248	22	AAI20722	Probe #10655 for g
	30	213.4	10.6	248	22	AAI45939	Probe #14625 used
	31	213.4	10.6	248	22	AAI57183	Probe #25869 used
	32	213.4	10.6	248	22	AAI06420	Probe #6411 used t
	33	213.4	10.6	248	23	ABS39501	Human liver single
	34	213.4	10.6	248	24	ABS14010	Human genome-deriv
	35	149	7.4	481	25	ABT21901	Breast cancer mark
	36	136.4	6.8	384	22	ABA42755	Human breast cell
	37	136.4	6.8	384	22	ABA53183	Human foetal liver
	38	136.4	6.8	384	22	ABA22955	Probe #1421 for ge
	39	136.4	6.8	384	22	AAK01429	Human brain expres
	40	136.4	6.8	384	22	AAK26877	Human bone marrow
	41	136.4	6.8	384	22	AAI11508	Probe #1441 for ge
	42	136.4	6.8	384	22	AAI32785	Probe #1471 used t
	43	136.4	6.8	384	22	AAI01422	Probe #1413 used t
	44	136.4	6.8	384	23	ABS26469	Human liver single
	45	136.4	6.8	384	24	ABS01477	Human genome-deriv

ALIGNMENTS

RESULT 1
ABK70031
ID ABK70031 standard; cDNA; 2008 BP.
XX
AC ABK70031;
XX
DT 15-JUL-2002 (first entry)
XX
DE Antibody production method related cDNA #1.
XX
KW Antibody production; cytostatic; immunomodulator; vasotropic; virucide;
KW antibacterial; antiinflammatory; antiallergic; allergy; inflammation;
KW autoimmune disease; Chinese hamster ovarian tissue-originated cell; CHO;
KW tumour; circulatory disease; infection; primer; ss.
XX
OS Cricetulus griseus.
XX
PN WO200231140-A1.
XX
PD 18-APR-2002.
XX
PF 05-OCT-2001; 2001WO-JP08804.
XX
PR 06-OCT-2000; 2000JP-0308526.
XX
PA (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI Kanda Y, Satoh M, Nakamura K, Uchida K, Shinkawa T, Yamane N;
PI Hosaka E, Yamano K, Yamasaki M, Hanai N;
XX
DR WPI; 2002-340182/37.

XX
PT Cells producing antibody compositions including antibody fragments and
PT fusion proteins with Fc domain of antibody, useful for prevention or
PT treatment of cancer, immune diseases, circulatory diseases and
PT infections -
XX
PS Claim 13; Page 1-3; 314pp; Japanese.
XX
CC This invention relates to novel method for antibody production
CC comprising a Chinese hamster ovarian tissue-originated (CHO) cell
CC transferred with a gene encoding an antibody molecule for producing a
CC composition comprising an antibody molecule with an Fc domain bonded
CC to the N-glycoside linkage complex sugar chain. The produced antibody
CC compositions are drugs for prevention or treatment of diseases
CC accompanying tumour, allergy or inflammation, autoimmune diseases,
CC circulatory diseases, and viral and bacterial infections. The
CC antibodies can be stably produced using the method of the invention
CC with high binding activity and potency thus leading to high safety and
CC reduced side effects when applied alone or in combination with other
CC drugs for therapy. The present sequence represents a nucleotide
CC molecule used in the method of the invention.
XX
SQ Sequence 2008 BP; 626 A; 425 C; 465 G; 492 T; 0 other;

Query Match 100.0%; Score 2008; DB 24; Length 2008;
Best Local Similarity 100.0%; Pred. No. 0;
Matches 2008; Conservative 0; Mismatches 0; Indels 0; Gaps 0;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCC 120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db         61 TGAGCTCCGAGAAGACAGAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCC 120

Qy        121 TGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTGGT 180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        121 TGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTGGT 180

Qy        181 CATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTCTT 240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        181 CATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTCTT 240

Qy        241 GCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTC 300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        241 GCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTC 300

Qy        301 CGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAGAA 360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        301 CGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAGAA 360

Qy        361 GAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATGAT 420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        361 GAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATGAT 420

Qy        421 CTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGG 480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        421 CTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGG 480

Qy        481 TTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAAGA 540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        481 TTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAAGA 540

Qy        541 CATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATCTA 600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        541 CATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATCTA 600

Qy        601 TACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATCTG 660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        601 TACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATCTG 660

Qy        661 ACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCC 720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        661 ACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCC 720

Qy        721 AGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTG 780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        721 AGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTG 780

Qy        781 GTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAAT 840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        781 GTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAAT 840

Qy        841 TGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACA 900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        841 TGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACA 900

Qy        901 GACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAA 960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        901 GACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAA 960

Qy        961 GTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGGCT 1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        961 GTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGGCT 1020

Qy       1021 GTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGTGG 1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1021 GTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGTGG 1080

Qy       1081 GTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAGAA 1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1081 GTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAGAA 1140

Qy       1141 GAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCACT 1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1141 GAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCACT 1200

Qy       1201 GACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTGAA 1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1201 GACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTGAA 1260

Qy       1261 GAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGGCC 1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1261 GAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGGCC 1320

Qy       1321 ACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTATT 1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1321 ACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTATT 1380

Qy       1381 AGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCACTT 1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1381 AGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCACTT 1440

Qy       1441 CGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTTTT 1500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1441 CGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTTTT 1500

Qy       1501 TCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCTCT 1560
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1501 TCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCTCT 1560

Qy       1561 GCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACCAG 1620
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1561 GCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACCAG 1620

Qy       1621 ATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAGAT 1680
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1621 ATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAGAT 1680

Qy       1681 ATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAACTA 1740
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1681 ATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAACTA 1740

Qy       1741 GGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAATAC 1800
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1741 GGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAATAC 1800

Qy       1801 CCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATTTA 1860
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1801 CCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATTTA 1860

Qy       1861 GTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGACAT 1920
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1861 GTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAGACTAACATATGGTTCATTGACAGACAT 1920

Qy       1921 GCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTTGT 1980
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1921 GCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCTCAGATGCTGCACTGGTGGAACGCCTCTTTGT 1980

Qy       1981 GAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008
             ||||||||||||||||||||||||||||
Db       1981 GAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008
```

RESULT 2
ABV22468
ID ABV22468 standard; cDNA; 3291 BP.
XX
AC ABV22468;
XX
DT 13-SEP-2002 (first entry)
XX
DE Human prostate expression marker cDNA 22459.
XX
KW Human; prostate cancer; cytostatic; carcinogen; pharmacodyanamic marker;
KW pharmacogenomic marker; gene; ss.
XX
OS Homo sapiens.
XX
PN WO200160860-A2.
XX
PD 23-AUG-2001.
XX
PF 20-FEB-2001; 2001WO-US05171.
XX
PR 17-FEB-2000; 2000US-183319P.
PR 16-MAR-2000; 2000US-189862P.
PR 25-MAY-2000; 2000US-207454P.
PR 09-JUN-2000; 2000US-211314P.
PR 18-JUL-2000; 2000US-219007P.
PR 13-DEC-2000; 2000US-255281P.
XX
PA (MILL-) MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE INC.
XX
PI Schlegel R, Endege WO, Monahan JE;
XX
DR WPI; 2001-662795/76.
XX
PT Novel isolated nucleic acid molecule associated with cancerous state of
PT prostate cells and correlating with presence of prostate cancer, useful
PT for detecting presence of prostate cancer, stage of prostate cancer -
XX
PS Claim 1; Page 3914; 11750pp; English.
XX
CC The invention relates to an isolated nucleic acid molecule (I) comprising
CC a nucleotide sequence given in Tables 1-9 (ABV00010-ABV62213) of the
CC specification or its complement. (I) is useful for:
CC (a) assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer;
CC (b) monitoring the progression of prostate cancer in a patient;
CC (c) assessing the efficacy of a test compound to inhibit prostate
CC cancer in a patient;
CC (d) assessing the efficacy of a therapy for inhibiting prostate cancer
CC in a patient;
CC (e) selecting a composition for inhibiting prostate cancer in a patient;
CC (f) assessing the prostate cell carcinogenic potential of a compound;
CC (g) determining whether prostate cancer has metastasized in a patient;
CC (h) assessing the aggressiveness or indolence of prostate cancer in a
CC patient;
CC (I) is also useful as a pharmacodyanamic or pharmacogenomic marker.
XX
SQ Sequence 3291 BP; 925 A; 729 C; 745 G; 871 T; 21 other;

Query Match 79.0%; Score 1585.6; DB 23; Length 3291;
Best Local Similarity 87.7%; Pred. No. 0;
Matches 1789; Conservative 0; Mismatches 219; Indels 32; Gaps 4;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||   ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||
Db        626 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 685

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  |||| |||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db        686 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 745

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db        746 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 805

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| ||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
Db        806 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 865

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
              | |||||||| || |||||||||||| || |||||||||||||| ||||||| || ||||
Db        866 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 925

Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
              |||| |||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||| || |||||||
Db        926 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 985

Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
              |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || ||||
Db        986 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1045

Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
              |||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1046 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1105

Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Db       1106 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1165

Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
              |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||
Db       1166 GACATGCAGATGAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1225

Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
              |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||
Db       1226 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1285

Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
              ||||||| ||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Db       1286 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1345

Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
              ||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Db       1346 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1405

Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
              |||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1406 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1465

Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Db       1466 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1525

Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1526 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1585

Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1586 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1645

Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078

Db       1646 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1705

Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138

Db       1706 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1765

Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198

Db       1766 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1825

Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258

Db       1826 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1885

Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318

Db       1886 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1945

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378

Db       1946 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 2005

Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438

Db       2006 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2065

Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498

Db       2066 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2125

Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558

Db       2126 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2185

Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618

Db       2186 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2245

Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678

Db       2246 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2305

Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738

Db       2306 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2365

Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798

Db       2366 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2425

Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848

Db       2426 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2485

Qy       1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893

Db       2486 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTCAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2545

Qy       1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949

Db       2546 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2605

Qy       1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008

Db       2606 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCCTCATACCCATG 2665
```

RESULT 3

```
ABV28283
ID   ABV28283 standard; cDNA; 3291 BP.
XX
AC   ABV28283;
XX
DT   16-SEP-2002  (first entry)
XX
DE   Human prostate expression marker cDNA 28274.
XX
KW   Human; prostate cancer; cytostatic; carcinogen; pharmacodyanamic marker;
KW   pharmacogenomic marker; gene; ss.
XX
OS   Homo sapiens.
XX
PN   WO200160860-A2.
XX
PD   23-AUG-2001.
XX
PF   20-FEB-2001; 2001WO-US05171.
XX
PR   17-FEB-2000; 2000US-183319P.
PR   16-MAR-2000; 2000US-189862P.
PR   25-MAY-2000; 2000US-207454P.
PR   09-JUN-2000; 2000US-211314P.
PR   18-JUL-2000; 2000US-219007P.
PR   13-DEC-2000; 2000US-255281P.
XX
PA   (MILL-) MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE INC.
XX
PI   Schlegel R,  Endege WO,  Monahan JE;
XX
DR   WPI; 2001-662795/76.
XX
PT   Novel isolated nucleic acid molecule associated with cancerous state of
PT   prostate cells and correlating with presence of prostate cancer, useful
PT   for detecting presence of prostate cancer, stage of prostate cancer  -
XX
PS   Claim 1; Page 5883; 11750pp; English.
XX
CC   The invention relates to an isolated nucleic acid molecule (I) comprising
CC   a nucleotide sequence given in Tables 1-9 (ABV00010-ABV62213) of the
CC   specification or its complement. (I) is useful for:
CC   (a) assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer;
CC   (b) monitoring the progression of prostate cancer in a patient;
CC   (c) assessing the efficacy of a test compound to inhibit prostate
CC   cancer in a patient;
CC   (d) assessing the efficacy of a therapy for inhibiting prostate cancer
CC   in a patient;
CC   (e) selecting a composition for inhibiting prostate cancer in a patient;
CC   (f) assessing the prostate cell carcinogenic potential of a compound;
CC   (g) determining whether prostate cancer has metastasized in a patient;
CC   (h) assessing the aggressiveness or indolence of prostate cancer in a
CC   patient;
CC   (I) is also useful as a pharmacodyanamic or pharmacogenomic marker.
XX
SQ   Sequence 3291 BP; 925 A; 729 C; 745 G; 871 T; 21 other;
```

Query Match 79.0%; Score 1585.6; DB 23; Length 3291;
Best Local Similarity 87.7%; Pred. No. 0;
Matches 1789; Conservative 0; Mismatches 219; Indels 32; Gaps 4;

```
Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60

Db        626 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 685

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118

Db        686 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 745

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178

Db        746 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 805
```

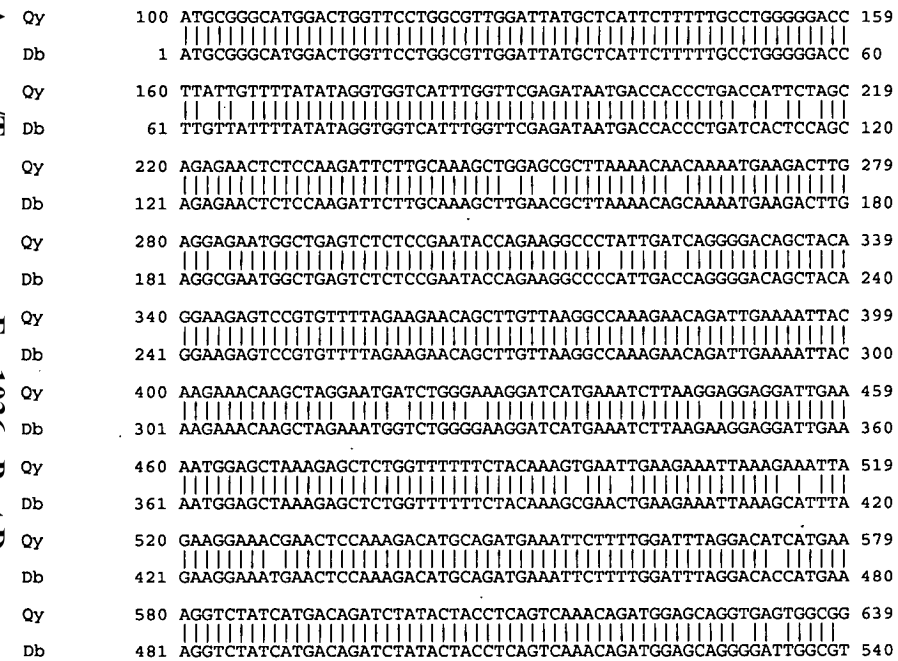
Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy      179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
Db      806 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 865

Qy      239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
Db      866 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 925

Qy      299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
Db      926 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 985

Qy      359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db      986 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 1045

Qy      419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db      1046 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 1105

Qy      479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db      1106 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 1165

Qy      539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db      1166 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 1225

Qy      599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db      1226 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 1285

Qy      659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db      1286 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 1345

Qy      719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db      1346 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 1405

Qy      779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db      1406 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 1465

Qy      839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db      1466 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 1525

Qy      899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db      1526 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1585

Qy      959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db      1586 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1645

Qy      1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db      1646 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1705

Qy      1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db      1706 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1765

Qy      1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db      1766 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1825

Qy      1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db      1826 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1885

Qy      1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db      1886 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1945

Qy      1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db      1946 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 2005

Qy      1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db      2006 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 2065

Qy      1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db      2066 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 2125

Qy      1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db      2126 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 2185

Qy      1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db      2186 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 2245

Qy      1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db      2246 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 2305

Qy      1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db      2306 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 2365

Qy      1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db      2366 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 2425

Qy      1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA---------- 1848
Db      2426 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 2485

Qy      1849 -----CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG---------- 1893
Db      2486 CAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTCAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTGA 2545

Qy      1894 ----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCCT 1949
Db      2546 TCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTGA 2605

Qy      1950 CAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCATG 2008
Db      2606 CATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCCTCATACCCATG 2665


RESULT 4
ABK70032
ID   ABK70032 standard; cDNA; 1728 BP.
XX
AC   ABK70032;
XX
DT   15-JUL-2002  (first entry)
XX
DE   Antibody production method related cDNA #2.
XX
KW   Antibody production; cytostatic; immunomodulator; vasotropic; virucide;
KW   antibacterial; antiinflammatory; antiallergic; allergy; inflammation;
KW   autoimmune disease; Chinese hamster ovarian tissue-originated cell; CHO;
KW   tumour; circulatory disease; infection; primer; ss.
XX
OS   Mus musculus.
XX
PN   WO200231140-A1.
XX
PD   18-APR-2002.
XX
```

PF 05-OCT-2001; 2001WO-JP08804.
XX
PR 06-OCT-2000; 2000JP-0308526.
XX
PA (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI Kanda Y, Satoh M, Nakamura K, Uchida K, Shinkawa T, Yamane N;
PI Hosaka E, Yamano K, Yamasaki M, Hanai N;
XX
DR WPI; 2002-340182/37.
XX
PT Cells producing antibody compositions including antibody fragments and
PT fusion proteins with Fc domain of antibody, useful for prevention or
PT treatment of cancer, immune diseases, circulatory diseases and
PT infections -
XX
PS Claim 32; Page 4-11; 314pp; Japanese.
XX
CC This invention relates to novel method for antibody production
CC comprising a Chinese hamster ovarian tissue-originated (CHO) cell
CC transferred with a gene encoding an antibody molecule for producing a
CC composition comprising an antibody molecule with an Fc domain bonded
CC to the N-glycoside linkage complex sugar chain. The produced antibody
CC compositions are drugs for prevention or treatment of diseases
CC accompanying tumour, allergy or inflammation, autoimmune diseases,
CC circulatory diseases, and viral and bacterial infections. The
CC antibodies can be stably produced using the method of the invention
CC with high binding activity and potency thus leading to high safety and
CC reduced side effects when applied alone or in combination with other
CC drugs for therapy. The present sequence represents a nucleotide
CC molecule used in the method of the invention.
XX
SQ Sequence 1728 BP; 529 A; 365 C; 400 G; 434 T; 0 other;

Query Match 78.9%; Score 1584; DB 24; Length 1728;
Best Local Similarity 94.8%; Pred. No. 0;
Matches 1638; Conservative 0; Mismatches 90; Indels 0; Gaps 0;



Qy 100 ATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 159
Db 1 ATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 60

Qy 160 TTATTGTTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGC 219
Db 61 TTGTTATTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGATCACTCCAGC 120

Qy 220 AGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTG 279
Db 121 AGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAAAATGAAGACTTG 180

Qy 280 AGGAGAATGGCTGAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACA 339
Db 181 AGGCGAATGGCTGAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCCATTGACCAGGGGACAGCTACA 240

Qy 340 GGAAGAGTCCGTGTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAC 399
Db 241 GGAAGAGTCCGTGTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAC 300

Qy 400 AAGAAACAAGCTAGGAATGATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAA 459
Db 301 AAGAAACAAGCTAGAAATGGTCTGGGGAAGGATCATGAAATCTTAAGAAGGAGGATTGAA 360

Qy 460 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTA 519
Db 361 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGCGAACTGAAGAAATTAAAGCATTTA 420

Qy 520 GAAGGAAACGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAA 579
Db 421 GAAGGAAATGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACACCATGAA 480

Qy 580 AGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGG 639
Db 481 AGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGGGATTGGCGT 540

Qy 640 GAAAAAGAAGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAAT 699
Db 541 GAAAAAGAGGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTCCAGAAT 600

Qy 700 CCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTAT 759
Db 601 CCTAAGGACTGCAGCAAAGCCAGGAAGCTGGTGTGTAACATCAATAAAGGCTGTGGCTAT 660

Qy 760 GGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACA 819
Db 661 GGTTGTCAACTCCATCACGTGGTCTACTGTTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACA 720

Qy 820 CTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGA 879
Db 721 CTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAGA 780

Qy 880 CCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA 939
Db 781 CCTGTAAGTGAGACATGTACAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA 840

Qy 940 GTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGT 999
Db 841 GTAAATGACAAAAACATTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGG 900

Qy 1000 CCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCAT 1059
Db 901 CCTCCTTACTTACCACTGGCTGTTCCAGAAGACCTTGCAGACCGACTCCTAAGAGTCCAT 960

Qy 1060 GGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCT 1119
Db 961 GGTGACCCTGCAGTGTGGTGGGTGTCCCAGTTTGTCAAATACTTGATTCGTCCACAACCT 1020

Qy 1120 TGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1179
Db 1021 TGGCTGGAAAAGGAAATAGAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1080

Qy 1180 GGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAG 1239
Db 1081 GGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCACCCCATCGAG 1140

Qy 1240 GAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGAT 1299
Db 1141 GAGTACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGAT 1200

Qy 1300 AAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAG 1359
Db 1201 AAAAAAAGAGTATATCTGGCTACTGATGATCCTACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAG 1260

Qy 1360 TACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAAC 1419
Db 1261 TACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAAT 1320

Qy 1420 CGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCT 1479
Db 1321 CGGTACACAGAAAATTCACTTCGGGGTGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCACAGGCT 1380

Qy 1480 GACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1539
Db 1381 GACTTTCTAGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1440

Qy 1540 ACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGA 1599
Db 1441 ACCCTGCATCCTGATGCCTCTGCGAACTTCCATTCTTTGGATGACATCTACTATTTTGGA 1500

Qy 1600 GGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAA 1659
Db 1501 GGCCAAAATGCCCACAATCAGATTGCTGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGAAGAGGAA 1560

Qy 1660 ATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCT 1719
Db 1561 ATTCCAATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTCT 1620

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1720 AAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAG 1779
             |||||| |||||||||||||| |||||||||||| | || || ||||||||||||||||||
Db       1621 AAAGGTATCAACAGAAAACTTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGAG 1680

Qy       1780 AAGATAGAAACAGTCAAATACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAG 1827
             |||||||||||||||||| || || ||||||||||||||||||||||||
Db       1681 AAGATAGAAACAGTCAAGTATCCCACATATCCTGAAGCTGAAAAATAG 1728


RESULT 5
AAH33315
ID   AAH33315 standard; cDNA; 3007 BP.
XX
AC   AAH33315;
XX
DT   03-SEP-2001  (first entry)
XX
DE   Human colon cancer antigen encoding cDNA SEQ ID NO:371.
XX
KW   Human; colon cancer; colon cancer antigen; diagnosis; detection;
KW   colorectal carcinoma; chromosome 14; ss.
XX
OS   Homo sapiens.
XX
PN   WO200122920-A2.
XX
PD   05-APR-2001.
XX
PF   28-SEP-2000; 2000WO-US26524.
XX
PR   29-SEP-1999;   99US-0157137.
PR   03-NOV-1999;   99US-0163280.
XX
PA   (HUMA-) HUMAN GENOME SCI INC.
XX
PI   Ruben SM,  Barash SC,  Birse CE,  Rosen CA;
XX
DR   WPI; 2001-235357/24.
DR   P-PSDB; AAG73884.
XX
PT   Nucleic acids encoding 4277 human colon cancer-associated polypeptides,
PT   useful for preventing, diagnosing and/or treating colorectal cancers -
XX
PS   Claim 1; Page 2480-2481; 9803pp; English.
XX
CC   AAH32943 to AAH37195 and AAG73514 to AAG77788 represent human colon
CC   cancer-associated nucleic acid molecules (N) and proteins (P), where
CC   the proteins are collectively known as colon cancer antigens. The colon
CC   cancer antigens have cytostatic activity and can be used in gene
CC   therapy and vaccine production. N and P may be used in the prevention,
CC   diagnosis and treatment of diseases associated with inappropriate P
CC   expression. For example, N and P may be used to treat disorders
CC   associated with decreased expression by rectifying mutations or deletions
CC   in a patient's genome that affect the activity of P by expressing
CC   inactive proteins or to supplement the patients own production of P.
CC   Additionally, N may be used to produce the colon cancer-associated Ps,
CC   by inserting the nucleic acids into a host cell and culturing the cell
CC   to express the proteins. N and P can be used in the prevention, diagnosis
CC   and treatment of colorectal carcinomas and cancers. AAH37196 to AAH37204
CC   and AAB77789 represent sequences used in the exemplification of the
CC   present invention.
CC   N.B. Pages 666 to 682 and page 7053 of the sequence listing were
CC   missing at time of publication, meaning no sequences are present for
CC   SEQ ID NO:1027 to 1052, 7921 and 7922.
XX
SQ   Sequence 3007 BP; 900 A; 597 C; 668 G; 834 T; 8 other;

  Query Match             78.4%;  Score 1574.2;  DB 22;  Length 3007;
  Best Local Similarity   87.6%;  Pred. No. 0;
  Matches 1788;  Conservative    1;  Mismatches  219;  Indels   33;  Gaps    5;

Qy          1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
              |||||||   ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||

Db        319 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 378

Qy         61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
              ||||||||  ||   ||  |||| |||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db        379 TGAGCTCCAGGACTYCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 438

Qy        119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
              |||||||||||:|||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||
Db        439 CCTGGCGTTGGAWTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 498

Qy        179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
              |||| ||||| |||||||||||||| |||| || |||||| ||||||| |||||||||
Db        499 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 558

Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTG-AGTCT 297
              | |||||||| || |||||||||| || |||||||||||||| ||||||| | | |||
Db        559 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAAATCT 618

Qy        298 CTCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTA 357
              ||||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||| || ||||||
Db        619 CTCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTA 678

Qy        358 GAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAAT 417
              ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | || |||
Db        679 GAAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAAT 738

Qy        418 GATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTC 477
              | |||||| |||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        739 GGTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTC 798

Qy        478 TGGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAA 537
              |||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||
Db        799 TGGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAA 858

Qy        538 AGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGAT 597
              |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| |||
Db        859 AGACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGAT 918

Qy        598 CTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGAT 657
              |||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||| |||||||||
Db        919 CTATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGAT 978

Qy        658 CTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAA 717
              |||||||| |||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Db        979 CTGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAA 1038

Qy        718 GCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCAT 777
              |||| ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||
Db       1039 GCCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCAT 1098

Qy        778 GTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAG 837
              ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1099 GTGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAG 1158

Qy        838 AATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGC 897
              |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| |||||||||||||||||||
Db       1159 AATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGC 1218

Qy        898 ACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTT 957
              ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1219 ACAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTT 1278

Qy        958 CAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTG 1017
              |||||||||||||| |||||||||||||| || ||||| |||||||| || |||||||||
Db       1279 CAAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTG 1338

Qy       1018 GCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG 1077
              |||||||||||||||||| |||||||||||  | |||| |||||||| ||||||||||||
Db       1339 GCTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGG 1398

Qy       1078 TGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATA 1137
              ||||| || |||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| ||||  ||||||
Db       1399 TGGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATA 1458
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1138 GAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGC 1197
             |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db       1459 GAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGC 1518

Qy       1198 ACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTT 1257
             || |||||||||||||||||||| |||||||||||||||| || |||||||| || |||
Db       1519 ACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTT 1578

Qy       1258 GAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAAGAGTGTATCTG 1317
             |||||||||||||||||||| | |||||||||| ||||||| ||||||||||||||| ||
Db       1579 GAAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTG 1638

Qy       1318 GCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTT 1377
             ||||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||
Db       1639 GCCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTT 1698

Qy       1378 ATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCA 1437
             |||||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Db       1699 ATTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCA 1758

Qy       1438 CTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACT 1497
             ||||| || |||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| |||||||||
Db       1759 CTTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACT 1818

Qy       1498 TTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCC 1557
             |||||||||||||||| | |||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||
Db       1819 TTTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCC 1878

Qy       1558 TCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAAC 1617
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Db       1879 TCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAAT 1938

Qy       1618 CAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGA 1677
             || |||||  |||| |||||||||| |||||| ||| ||||| ||||||||||||||||
Db       1939 CAAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGA 1998

Qy       1678 GATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAA 1737
             |||||||||||||||||||||| |||||| |||| || |||||||||||||||| |||
Db       1999 GATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAA 2058

Qy       1738 CTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAA 1797
               | ||||  || ||||| || || |||||||||| |||||||||||||||| |||||
Db       2059 TTGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAG 2118

Qy       1798 TACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAA--------- 1848
             ||||| |||||||||| ||||| ||||| || |    || ||||||| ||
Db       2119 TACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAAC 2178

Qy       1849 ------CAACAGAATTTAGTTCAGACCATCTCAGCCAAGCAGAAGACCCAG--------- 1893
                   | ||  || | |||||| ||||| |||||||| | | |||   ||
Db       2179 TCAGTTCGACCAAACTCAGTTCAAACCATTTCAGCCAAACTGTAGATGAAGAGGGCTCTG 2238

Qy       1894 -----ACTAACATATGGTTCATTGACAGACATGCTCCGCACCAAGAGCAAGTGGGAACCC 1948
                  || ||   | | |  ||    ||| |  ||| ||||||||||||  |||||||
Db       2239 ATCTAACAAAATAAGGTTATATGAGTAGATACTCTCAGCACCAAGAGCAGCTGGGAACTG 2298

Qy       1949 TCAGATGCTGC-ACTGGTGGAACGCCTCTTTGTGAAGGGCTGCTGTGCCCTCAAGCCCAT 2007
              || | ||| | | |||||||| |||||||   ||||||||| |||||||| |||||
Db       2299 ACATAGGCTTCAATTGGTGGAATTCCTCTTTAACAAGGGCTGCAATGCCCTCATACCCAT 2358

Qy       2008 G 2008
              |
Db       2359 G 2359


RESULT 6
AAT76574
ID   AAT76574 standard; cDNA to mRNA; 2100 BP.
XX
AC   AAT76574;
XX
DT   05-MAR-1998  (first entry)
XX
DE   Human alpha 1-6 fucosyltransferase gene.
XX
KW   Alpha 1-6 fucosyltransferase; enzyme; pig; human; fucose transfer;
KW   guanosine diphosphate; sugar chain synthesis; modification; antibody;
KW   GlcNAc; cancer diagnosis; ss.
XX
OS   Homo sapiens.
XX
FH   Key             Location/Qualifiers
FT   CDS             198..1925
FT                   /*tag=  a
XX
PN   WO9727303-A1.
XX
PD   31-JUL-1997.
XX
PF   23-JAN-1997;   97WO-JP00171.
XX
PR   22-JUL-1996;   96JP-0192260.
PR   24-JAN-1996;   96JP-0010365.
PR   21-JUN-1996;   96JP-0161648.
PR   24-JUN-1996;   96JP-0162813.
XX
PA   (TOYM ) TOYO BOSEKI KK.
XX
PI   Shiba T,  Taniguchi N,  Uozumi N,  Yanagidani S;
XX
DR   WPI; 1997-393690/36.
DR   P-PSDB; AAW22125.
XX
PT   Human or pig alpha 1-6 fucosyl:transferase and DNA encoding it - for
PT   synthesis and modification of sugar chains and used as an antigen
PT   for production of diagnostic antibodies
XX
PS   Claim 18; Page 39-43; 61pp; Japanese.
XX
CC   AAT76573 and AAT76574 represent the coding sequences for the pig and
CC   human alpha 1-6 fucosyltransferases of the invention, respectively. The
CC   encoded enzyme transfers fucose from guanosine diphosphate to the
CC   6-hydroxyl group of the GlcNAc nearest to R in the receptor molecule:
CC   (GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-6)(GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-3)Manbeta
CC   1-4GlcNAcbeta 1-4GlcNAc-R to give (GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-6)(GlcNAcbeta
CC   1-2Manalpha 1-3)Manbeta 1-4GlcNAcbeta 1-4(Fucalpha 1-6)GlcNAc-R. It has
CC   an optimum pH of about 7.0 (pig) or 7.5 (human), and is stable over the
CC   pH range 4-10 after 5 hours at 4 degrees C. The optimum working
CC   temperature of the enzyme is 30-37 degrees C. A bivalent metal is not
CC   required for activity of the enzyme, and the enzyme is not inhibited in
CC   the presence of 5 mM EDTA. The enzyme is useful in the synthesis and
CC   modification of sugar chains, and as antigen for the production of
CC   antibodies recognising the enzyme. The antibodies can be used for the
CC   diagnosis of cancer and other diseases.
XX
SQ   Sequence 2100 BP; 651 A; 436 C; 489 G; 524 T; 0 other;

  Query Match           78.3%;  Score 1572.8;  DB 18;  Length 2100;
  Best Local Similarity   90.2%;  Pred. No. 0;
  Matches 1694;  Conservative    0;  Mismatches  182;  Indels    2;  Gaps    1;

Qy         1 AACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACCAGAGTACAATGTTTCCAATTCTT 60
             |||||||   ||||  ||||||     |     |||     |||||||||| ||||||||
Db        97 AACAGAAGTCTATTCACCTGTGCACTAACTAGAAACAGAGTTACAATGTTTTCAATTCTT 156

Qy        61 TGAGCTCCGAGAAGACA--GAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTT 118
             ||||||||  ||   ||  |||| ||||||||| |||||||||||| ||||||||||||
Db       157 TGAGCTCCAGGACTCCAGGGAAGTGAGTTGAAAATCTGAAAATGCGGCCATGGACTGGTT 216

Qy       119 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG 178
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
Db       217 CCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTTATATAGGTG 276

Qy       179 GTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC 238
             |||| ||||| |||||||||||||| ||||| || |||||| ||||||| ||||||||||
```

```
Db        277 GTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTC 336
Qy        239 TTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTC 298
Db        337 TGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTC 396
Qy        299 TCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAG 358
Db        397 TCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAG 456
Qy        359 AAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAAGCTAGGAATG 418
Db        457 AAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATG 516
Qy        419 ATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 478
Db        517 GTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCT 576
Qy        479 GGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTAGAAGGAAACGAACTCCAAA 538
Db        577 GGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTAGAAGGAAATGAACTCCAAA 636
Qy        539 GACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATCATGACAGATC 598
Db        637 GACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAATGACGGATC 696
Qy        599 TATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATC 658
Db        697 TATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATC 756
Qy        659 TGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 718
Db        757 TGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAG 816
Qy        719 CCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATG 778
Db        817 CCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATG 876
Qy        779 TGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 838
Db        877 TGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGA 936
Qy        839 ATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCA 898
Db        937 ATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCA 996
Qy        899 CAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 958
Db        997 CAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAAGTGAAGGACAAAAATGTTC 1056
Qy        959 AAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGTCCTCCTTACTTACCCTTGG 1018
Db       1057 AAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATTTACCCTTGG 1116
Qy       1019 CTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGGT 1078
Db       1117 CTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGT 1176
Qy       1079 GGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAG 1138
Db       1177 GGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAG 1236
Qy       1139 AAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1198
Db       1237 AAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCA 1296
Qy       1199 CTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGAATACATGGTACACGTTG 1258
Db       1297 CAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTG 1356
Qy       1259 AAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGATAAAAAAAGAGTGTATCTGG 1318
Db       1357 AAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGG 1416

Qy       1319 CCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTACTCCAATTATGAATTTA 1378
Db       1417 CCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAGTACCCCAATTATGAATTTA 1476
Qy       1379 TTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAACCGATACACAGAAAATTCAC 1438
Db       1477 TTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAGAAAATTCAC 1536
Qy       1439 TTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCTGACTTCCTTGTGTGTACTT 1498
Db       1537 TTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTT 1596
Qy       1499 TTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAAACACTGCATCCTGATGCCT 1558
Db       1597 TTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCT 1656
Qy       1559 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGAGGCCAAAATGCCCACAACC 1618
Db       1657 CTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATC 1716
Qy       1619 AGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAACCTGGAG 1678
Db       1717 AAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCCATGGAACCTGGAG 1776
Qy       1679 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACAGAAAAC 1738
Db       1777 ATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAAT 1836
Qy       1739 TAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAGAAGATAGAAACAGTCAAAT 1798
Db       1837 TGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAGAAGATAGAAACGGTCAAGT 1896
Qy       1799 ACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAGATGGAGTGTAAGAGATTAACAACAGAATT 1858
Db       1897 ACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAGCTCAGATGGAAGAGATAAACGACCAAACT 1956
Qy       1859 TAGTTCAGACCATCTCAG 1876
Db       1957 CAGTTCGACCAAACTCAG 1974
```

RESULT 7
ABA98809
ID ABA98809 standard; cDNA; 1759 BP.
XX
AC ABA98809;
XX
DT 07-MAY-2002 (first entry)
XX
DE Alpha1,6-fucosyl transferase cDNA.
XX
KW Plant; glycoprotein; alpha1,6-fucosyl transferase; alpha1,6-FT;
KW enzyme; ss.
XX
OS Homo sapiens.
XX
FH Key   Location/Qualifiers
FT CDS   17..1744
FT   /*tag= a
FT   /product= "Alpha1,6-fucosyl transferase"
XX
PN JP2001333787-A.
XX
PD 04-DEC-2001.
XX
PF 06-MAR-2001; 2001JP-0062704.
XX
PR 22-MAR-2000; 2000JP-0081059.
XX
PA (TANI/) TANIGUCHI N.
PA (SEKI/) SEKI T.
PA (FUJI/) FUJIYAMA K.

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
XX
DR   WPI; 2002-158816/21.
DR   P-PSDB; ABB08405.
XX
PT   A plant cell with an animal type sugar chain adding function, for the
PT   preparation of a glycoprotein with an animal type sugar chain -
XX
PS   Example 1; Page 22-24; 38pp; Japanese.
XX
CC   The invention relates to a plant cell with an animal type sugar chain
CC   adding function, created by transforming a tobacco cell with a gene
CC   encoding an enzyme derived from an animal which can transfer a fucose
CC   residue to the reductive end acetylglucosamine residue of a sugar chain.
CC   The gene that is introduced into the plant cell encodes the enzyme
CC   alpha1,6-fucosyl transferase. The method of the invention is useful for
CC   the preparation of a glycoprotein having animal type sugar chain. The
CC   current sequence represents alpha1,6-fucosyl transferase cDNA.
XX
SQ   Sequence 1759 BP; 533 A; 367 C; 418 G; 441 T; 0 other;

  Query Match             75.4%;  Score 1514.8;  DB 24;  Length 1759;
  Best Local Similarity   92.1%;  Pred. No. 0;
  Matches 1597;  Conservative    0;  Mismatches  137;  Indels    0;  Gaps    0;

Qy         96 GAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGG 155
Db         13 GAAAATGCGGCCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGG 72

Qy        156 GACCTTATTGTTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTC 215
Db         73 GACCTTGCTGTTTTTATATAGGTGGTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTC 132

Qy        216 TAGCAGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGA 275
Db        133 TAGCCGAGAACTGTCCAAGATTCTGGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGA 192

Qy        276 CTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGC 335
Db        193 CTTGAGGCGAATGGCCGAATCTCTCCGGATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGC 252

Qy        336 TACAGGAAGAGTCCGTGTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAA 395
Db        253 TATAGGAAGAGTACGCGTTTTAGAAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAA 312

Qy        396 TTACAAGAAACAAGCTAGGAATGATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGAT 455
Db        313 TTACAAGAAACAGACCAGAAATGGTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAGGAGGAT 372

Qy        456 TGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAA 515
Db        373 TGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAA 432

Qy        516 ATTAGAAGGAAACGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCA 575
Db        433 CTTAGAAGGAAATGAACTCCAAAGACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCA 492

Qy        576 TGAAAGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTG 635
Db        493 TGAAAGGTCTATAATGACGGATCTATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTG 552

Qy        636 GCGGGAAAAAGAAGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCA 695
Db        553 GCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATCTGACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCA 612

Qy        696 GAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGG 755
Db        613 GAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAAAAAGCTGGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGG 672

Qy        756 CTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCG 815
Db        673 CTATGGCTGTCAGCTCCATCATGTGGTCTACTGCTTCATGATTGCATATGGCACCCAGCG 732

Qy        816 AACACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTT 875
Db        733 AACACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTATT 792

Qy        876 TAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGG 935
Db        793 TAGGCCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGG 852

Qy        936 TGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCC 995
Db        853 TGAAGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCC 912

Qy        996 TCGTCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGT 1055
Db        913 CCGTCCTCCATATTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGT 972

Qy       1056 CCATGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACA 1115
Db        973 GCATGGTGACCCTGCAGTGTGGTGGGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACA 1032

Qy       1116 ACCTTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGT 1175
Db       1033 GCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAGAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGT 1092

Qy       1176 TATTGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCAT 1235
Db       1093 TATTGGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCCTTCCATCCCAT 1152

Qy       1236 TGAGGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGT 1295
Db       1153 TGAAGAGTACATGGTGCATGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAATGCAAGT 1212

Qy       1296 GGATAAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGAC 1355
Db       1213 GGACAAAAAAAAGAGTGTATTTGGCCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAAC 1272

Qy       1356 AAAGTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACA 1415
Db       1273 AAAGTACCCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCA 1332

Qy       1416 CAACCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCA 1475
Db       1333 CAATCGATACACAGAAAATTCACTTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCA 1392

Qy       1476 GGCTGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCAT 1535
Db       1393 GGCAGACTTCCTAGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTAT 1452

Qy       1536 GCAAACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTT 1595
Db       1453 GCAAACACTACATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTT 1512

Qy       1596 TGGAGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGA 1655
Db       1513 TGGGGGCCAGAATGCCCACAATCAAATTGCCATTTATGCTCACCAACCCCGAACTGCAGA 1572

Qy       1656 GGAAATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTA 1715
Db       1573 TGAAATTCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGATGGCTA 1632

Qy       1716 CTCTAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCG 1775
Db       1633 TTCTAAAGGTGTCAACAGGAAATTGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCG 1692

Qy       1776 AGAGAAGATAGAAACAGTCAAATACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATAGAG 1829
Db       1693 AGAGAAGATAGAAACGGTCAAGTACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAAAG 1746


RESULT 8
AAT76573
ID   AAT76573 standard; cDNA to mRNA; 1728 BP.
XX
AC   AAT76573;
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

XX
DT 05-MAR-1998 (first entry)
XX
DE Pig alpha 1-6 fucosyltransferase gene.
XX
KW Alpha 1-6 fucosyltransferase; enzyme; pig; human; fucose transfer;
KW guanosine diphosphate; sugar chain synthesis; modification; antibody;
KW GlcNAc; cancer diagnosis; ss.
XX
OS Sus scrofa.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FT CDS 1..1728
FT /*tag= a
XX
PN WO9727303-A1.
XX
PD 31-JUL-1997.
XX
PF 23-JAN-1997; 97WO-JP00171.
XX
PR 22-JUL-1996; 96JP-0192260.
PR 24-JAN-1996; 96JP-0010365.
PR 21-JUN-1996; 96JP-0161648.
PR 24-JUN-1996; 96JP-0162813.
XX
PA (TOYM) TOYO BOSEKI KK.
XX
PI Shiba T, Taniguchi N, Uozumi N, Yanagidani S;
XX
DR WPI; 1997-393690/36.
DR P-PSDB; AAW22124.
XX
PT Human or pig alpha 1-6 fucosyl:transferase and DNA encoding it - for
PT synthesis and modification of sugar chains and used as an antigen
PT for production of diagnostic antibodies
XX
PS Claim 5; Page 30-34; 61pp; Japanese.
XX
CC AAT76573 and AAT76574 represent the coding sequences for the pig and
CC human alpha 1-6 fucosyltransferases of the invention, respectively. The
CC encoded enzyme transfers fucose from guanosine diphosphate to the
CC 6-hydroxyl group of the GlcNAc nearest to R in the receptor molecule:
CC (GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-6)(GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-3)Manbeta
CC 1-4GlcNAcbeta 1-4GlcNAc-R to give (GlcNAcbeta 1-2Manalpha 1-6)(GlcNAcbeta
CC 1-2Manalpha 1-3)Manbeta 1-4GlcNAcbeta 1-4(Fucalpha 1-6)GlcNAc-R. It has
CC an optimum pH of about 7.0 (pig) or 7.5 (human), and is stable over the
CC pH range 4-10 after 5 hours at 4 degrees C. The optimum working
CC temperature of the enzyme is 30-37 degrees C. A bivalent metal is not
CC required for activity of the enzyme, and the enzyme is not inhibited in
CC the presence of 5 mM EDTA. The enzyme is useful in the synthesis and
CC modification of sugar chains, and as antigen for the production of
CC antibodies recognising the enzyme. The antibodies can be used for the
CC diagnosis of cancer and other diseases.
XX
SQ Sequence 1728 BP; 521 A; 362 C; 419 G; 426 T; 0 other;

Query Match 73.4%; Score 1474.2; DB 18; Length 1728;
Best Local Similarity 90.9%; Pred. No. 0;
Matches 1569; Conservative 0; Mismatches 158; Indels 0; Gaps 0;

```
Qy        100 ATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 159
              |||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db          1 ATGCGGCCATGGACTGGTTCGTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACC 60

Qy        160 TTATTGTTTTATATAGGTGGTCATTTGGTTCGAGATAATGACCACCCTGACCATTCTAGC 219
              ||  | ||||| |||||||||||| ||||| ||||||||||||||| |||| || ||||||
Db         61 TTGCTATTTTACATAGGTGGTCACTTGGTACGAGATAATGACCACTCTGATCACTCTAGC 120

Qy        220 AGAGAACTCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTG 279
              ||||||| ||||||||| | |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Db        121 CGAGAACTGTCCAAGATTTTGGCAAAGCTGGAACGCTTAAAACAACAAAATGAAGACTTG 180

Qy        280 AGGAGAATGGCTCAGTCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCTATTGATCAGGGGACAGCTACA 339
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||| ||
Db        181 AGGAGAATGGCTGAATCTCTCCGAATACCAGAAGGCCCCATTGATCAGGGGCCAGCTTCA 240

Qy        340 GGAAGAGTCCGTCTTTTAGAAGAACAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAC 399
              |||||||| |||| ||||||||| ||  || | ||||||||||||||||||||||||||||
Db        241 GGAAGAGTTCGTGCTTTAGAAGAGCAATTTATGAAGGCCAAAGAACAGATTGAAAATTAT 300

Qy        400 AAGAAACAAGCTAGGAATGATCTGGGAAAGGATCATGAAATCTTAAGGAGGAGGATTGAA 459
              |||||||| |||  |||| ||  || ||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Db        301 AAGAAACAAACTAAAATGGTCCAGGGAAGGATCATGAAATCCTAAGGAGGAGGATTGAA 360

Qy        460 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAAATTA 519
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| |||
Db        361 AATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTTCTACAAAGTGAGTTGAAGAAATTAAAGAATTTA 420

Qy        520 GAAGGAAACGAACTCCAAAGACATGCAGATGAAATTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAA 579
              |||||||| |||||||||||||||||||||||| |||| |  ||||| ||||||||||||
Db        421 GAAGGAAATGAACTCCAAAGACATGCAGATGAATTTCTATCAGATTTGGGACATCATGAA 480

Qy        580 AGGTCTATCATGACAGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGAGCAGGTGAGTGGCGG 639
              |||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||
Db        481 AGGTCTATAATGACGGATCTATACTACCTCAGTCAAACAGATGGGGCAGGTGATTGGCGT 540

Qy        640 GAAAAAGAAGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTGCAGAAT 699
              ||||| || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        541 GAAAAGGAGGCCAAAGATCTGACAGAGCTGGTCCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAAT 600

Qy        700 CCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTAT 759
              |||||||||||||||||||  ||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||
Db        601 CCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAAGAAGCTAGTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTAT 660

Qy        760 GGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGAACA 819
              || ||||| |||||||||||| || |||||||| |||||||| ||||||||||||||||||
Db        661 GGCTGTCAGCTCCATCATGTAGTGTACTGCTTTATGATTGCATATGGCACCCAGCGAACA 720

Qy        820 CTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGA 879
              |||  |||||||||||| |||||||||| |||||||| |||||||| ||||||||||||
Db        721 CTCGCCTTGGAATCTCACAATTGGCGCTACGCTACTGGGGGATGGGAAACTGTGTTTAGA 780

Qy        880 CCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA 939
              |||||||||||||| |||||||||| |||||| |||||||||||| ||||||||||||||
Db        781 CCTGTAAGTGAGACGTGCACAGACAGATCTGGCAGCTCCACTGGACATTGGTCAGGTGAA 840

Qy        940 GTGAAGGACAAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCGT 999
              || |||||||||||||||| ||||| |||||||||||||||||  | |||||||||
Db        841 GTAAAGGACAAAAATGTTCAGGTGGTTGAGCTCCCCATTGTAGACAGTGTTCATCCTCGT 900

Qy       1000 CCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCAT 1059
              ||||| || |||||| |||||||||||||||||||||||||||  | ||||||||
Db        901 CCTCCATATTTACCCCTGGCTGTCCCAGAAGACCTTGCAGATCGACTTGTACGAGTCCAT 960

Qy       1060 GGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACCT 1119
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| || ||||||||
Db        961 GGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAGTACTTGATTCGCCCACAACCC 1020

Qy       1120 TGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1179
              |||||||||| |||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Db       1021 TGGCTGGAAAAGGAAATAGAAGAGGCCACCAAGAAGCTAGGCTTCAAACATCCAGTTATT 1080

Qy       1180 GGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAG 1239
              |||||||||| |||||||||| | |||||||||||| | |||||||||||||||||||||
Db       1081 GGAGTCCATGTTAGACGCACAGACAAAGTGGGAGCGGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAG 1140

Qy       1240 GAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGAT 1299
              ||||||| ||| |||||||||||| | |||||||||| |  |||||||| ||||||||
Db       1141 GAATACACGGTGCACGTTGAAGAAGACTTTCAGCTTCTTGCTCGCAGAATGCAAGTGGAT 1200

Qy       1300 AAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAG 1359
              |||||||| ||||||| ||||||| |||||||||| |||||||||| |||||||| ||||||
Db       1201 AAAAAAAGGGTGTATTTGGCCACAGATGACCCTGCTTTGTTAAAAGAGGCAAAAACAAAG 1260

Qy       1360 TACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAAC 1419
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Db       1261 TACCCCAGTTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATCTCTTGGTCAGCTGGACTACATAAT 1320

Qy       1420 CGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCT 1479

Db       1321 CGATATACAGAAAATTCACTTCGGGGTGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGCA 1380

Qy       1480 GACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1539

Db       1381 GACTTCCTAGTGTGTACTTTTTCATCGCAGGTCTGTAGAGTTGCTTATGAAATCATGCAA 1440

Qy       1540 ACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGA 1599

Db       1441 GCGCTGCATCCTGATGCCTCTGCGAACTTCCGTTCTTTGGATGACATCTACTATTTTGGA 1500

Qy       1600 GGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAA 1659

Db       1501 GGCCCAAATGCCCACAACCAAATTGCCATTTATCCTCACCAACCTCGAACTGAAGGAGAA 1560

Qy       1660 ATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTCT 1719

Db       1561 ATCCCCATGGAACCTGGAGATATTATTGGTGTGGCTGGAAATCACTGGGATGGCTATCCT 1620

Qy       1720 AAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGAG 1779

Db       1621 AAAGGTGTTAACAGAAAACTGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAG 1680

Qy       1780 AAGATAGAAACAGTCAAATACCCTACATATCCTGAAGCTGAAAAATA 1826

Db       1681 AAGATAGAAACAGTCAAGTACCCCACATATCCCGAGGCTGACAAGTA 1727


RESULT 9
AAC63891
ID   AAC63891 standard; cDNA; 979 BP.
XX
AC   AAC63891;
XX
DT   09-FEB-2001  (first entry)
XX
DE   Chinese hamster FUT8 cDNA.
XX
KW   Immunologically functional molecule; immune system; immunomodulation;
KW   glycosylation; fucose; N-acetylglucosamine; cancer; circulatory disease;
KW   viral infection; bacterial infection; allergy; autoimmune disease;
KW   inflammation; antibody; Chinese hamster; FUT8; ss.
XX
OS   Cricetulus griseus.
XX
PN   WO200061739-A1.
XX
PD   19-OCT-2000.
XX
PF   07-APR-2000; 2000WO-JP02260.
XX
PR   09-APR-1999;   99JP-0103158.
XX
PA   (KYOW ) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI   Hanai N,  Nakamura K,  Shoji E,  Yamasaki M,  Uchida K,  Shinkawa T;
PI   Imabeppu S,  Kanda Y,  Yamane N,  Anazawa H;
XX
DR   WPI; 2000-665129/64.
XX
PT   Control of activity of antibodies and other immunologically functional
PT   molecules by addition or removal of fucose from sugar chain for
PT   diagnosis and treatment of cancer, allergy and other diseases  -
XX
PS   Example 8; Page 72-73; 81pp; Japanese.
XX
CC   The invention relates to a method for controlling the activity of an
CC   immunologically functional molecule (e.g., an antibody) where the
CC   control is effected by the presence or absence of fucose bound to an
CC   N-acetylglucosamine residue at the reducing end of the sugar chain on
CC   the immunologically functional molecule. The invention also relates to
CC   methods for the diagnosis, prevention or treatment of diseases which
CC   involve the modified immunologically functional molecule, and agents
CC   which stimulate the activity of an immunologically functional molecule.
CC   The methods of the invention are used for the diagnosis, treatment and
CC   prevention of a broad range of diseases including cancer, circulatory
CC   disease, viral or bacterial infection, allergy, autoimmune disease and
CC   inflammation. The present sequence represents a Chinese hamster FUT8
CC   cDNA isolated in an exemplification of the invention.
XX
SQ   Sequence 979 BP; 286 A; 227 C; 218 G; 248 T; 0 other;

  Query Match             48.6%;  Score 976.4;  DB 21;  Length 979;
  Best Local Similarity   99.9%;  Pred. No. 7.6e-280;
  Matches  977;  Conservative    0;  Mismatches    1;  Indels    0;  Gaps    0;

Qy        819 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 878

Db          1 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 60

Qy        879 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 938

Db         61 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 120

Qy        939 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 998

Db        121 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 180

Qy        999 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 1058

Db        181 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 240

Qy       1059 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 1118

Db        241 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 300

Qy       1119 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 1178

Db        301 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 360

Qy       1179 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 1238

Db        361 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 420

Qy       1239 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 1298

Db        421 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 480

Qy       1299 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 1358

Db        481 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 540

Qy       1359 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 1418

Db        541 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 600

Qy       1419 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 1478

Db        601 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 660

Qy       1479 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 1538

Db        661 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 720

Qy       1539 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 1598

Db        721 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 780

Qy       1599 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 1658

Db        781 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 840
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
Qy       1659 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 1718
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        841 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 900

Qy       1719 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 1778
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        901 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 960

Qy       1779 GAAGATAGAAACAGTCAA 1796
             |||||||||||| |||||
Db        961 GAAGATAGAAACGGTCAA 978


RESULT 10
ABK70036
ID   ABK70036 standard; cDNA; 979 BP.
XX
AC   ABK70036;
XX
DT   15-JUL-2002  (first entry)
XX
DE   Antibody production method related cDNA #4.
XX
KW   Antibody production; cytostatic; immunomodulator; vasotropic; virucide;
KW   antibacterial; antiinflammatory; antiallergic; allergy; inflammation;
KW   autoimmune disease; Chinese hamster ovarian tissue-originated cell; CHO;
KW   tumour; circulatory disease; infection; primer; ss.
XX
OS   Cricetulus griseus.
XX
PN   WO200231140-A1.
XX
PD   18-APR-2002.
XX
PF   05-OCT-2001; 2001WO-JP08804.
XX
PR   06-OCT-2000; 2000JP-0308526.
XX
PA   (KYOW ) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI   Kanda Y,  Satoh M,  Nakamura K,  Uchida K,  Shinkawa T,  Yamane N;
PI   Hosaka E,  Yamano K,  Yamasaki M,  Hanai N;
XX
DR   WPI; 2002-340182/37.
XX
PT   Cells producing antibody compositions including antibody fragments and
PT   fusion proteins with Fc domain of antibody, useful for prevention or
PT   treatment of cancer, immune diseases, circulatory diseases and
PT   infections  -
XX
PS   Example 9; Page 12-13; 314pp; Japanese.
XX
CC   This invention relates to novel method for antibody production
CC   comprising a Chinese hamster ovarian tissue-originated (CHO) cell
CC   transferred with a gene encoding an antibody molecule for producing a
CC   composition comprising an antibody molecule with an Fc domain bonded
CC   to the N-glycoside linkage complex sugar chain. The produced antibody
CC   compositions are drugs for prevention or treatment of diseases
CC   accompanying tumour, allergy or inflammation, autoimmune diseases,
CC   circulatory diseases, and viral and bacterial infections. The
CC   antibodies can be stably produced using the method of the invention
CC   with high binding activity and potency thus leading to high safety and
CC   reduced side effects when applied alone or in combination with other
CC   drugs for therapy. The present sequence represents a nucleotide
CC   molecule used in the method of the invention.
XX
SQ   Sequence 979 BP; 286 A; 227 C; 218 G; 248 T; 0 other;

  Query Match             48.6%;  Score 976.4;  DB 24;  Length 979;
  Best Local Similarity   99.9%;  Pred. No. 7.6e-280;
  Matches  977;  Conservative    0;  Mismatches    1;  Indels    0;  Gaps    0;

Qy        819 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 878
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db          1 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 60

Qy        879 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 938
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db         61 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 120

Qy        939 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 998
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        121 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 180

Qy        999 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 1058
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        181 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 240

Qy       1059 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 1118
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        241 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 300

Qy       1119 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 1178
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        301 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 360

Qy       1179 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 1238
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        361 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 420

Qy       1239 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 1298
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        421 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 480

Qy       1299 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 1358
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        481 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 540

Qy       1359 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 1418
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        541 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 600

Qy       1419 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 1478
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        601 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 660

Qy       1479 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 1538
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        661 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 720

Qy       1539 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 1598
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        721 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 780

Qy       1599 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 1658
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        781 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 840

Qy       1659 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 1718
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        841 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 900

Qy       1719 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 1778
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        901 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 960

Qy       1779 GAAGATAGAAACAGTCAA 1796
             |||||||||||| |||||
Db        961 GAAGATAGAAACGGTCAA 978


RESULT 11
AAC63892
ID   AAC63892 standard; cDNA; 979 BP.
XX
AC   AAC63892;
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

XX
DT 09-FEB-2001 (first entry)
XX
DE Rat FUT8 cDNA.
XX
KW Immunologically functional molecule; immune system; immunomodulation;
KW glycosylation; fucose; N-acetylglucosamine; cancer; circulatory disease;
KW viral infection; bacterial infection; allergy; autoimmune disease;
KW inflammation; antibody; rat; FUT8; ss.
XX
OS Rattus sp.
XX
PN WO200061739-A1.
XX
PD 19-OCT-2000.
XX
PF 07-APR-2000; 2000WO-JP02260.
XX
PR 09-APR-1999; 99JP-0103158.
XX
PA (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI Hanai N, Nakamura K, Shoji E, Yamasaki M, Uchida K, Shinkawa T;
PI Imabeppu S, Kanda Y, Yamane N, Anazawa H;
XX
DR WPI; 2000-665129/64.
XX
PT Control of activity of antibodies and other immunologically functional
PT molecules by addition or removal of fucose from sugar chain for
PT diagnosis and treatment of cancer, allergy and other diseases -
XX
PS Example 8; Page 73-74; 81pp; Japanese.
XX
CC The invention relates to a method for controlling the activity of an
CC immunologically functional molecule (e.g., an antibody) where the
CC control is effected by the presence or absence of fucose bound to an
CC N-acetylglucosamine residue at the reducing end of the sugar chain on
CC the immunologically functional molecule. The invention also relates to
CC methods for the diagnosis, prevention or treatment of diseases which
CC involve the modified immunologically functional molecule, and agents
CC which stimulate the activity of an immunologically functional molecule.
CC The methods of the invention are used for the diagnosis, treatment and
CC prevention of a broad range of diseases including cancer, circulatory
CC disease, viral or bacterial infection, allergy, autoimmune disease and
CC inflammation. The present sequence represents a rat FUT8 cDNA isolated
CC in an exemplification of the invention.
XX
SQ Sequence 979 BP; 283 A; 223 C; 220 G; 253 T; 0 other;

Query Match 44.5%; Score 893.2; DB 21; Length 979;
Best Local Similarity 94.6%; Pred. No. 4.5e-255;
Matches 925; Conservative 0; Mismatches 53; Indels 0; Gaps 0;

```
Qy        819 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 878
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Db          1 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAG 60

Qy        879 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 938
              |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Db         61 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 120

Qy        939 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 998
              |||||| |||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||| ||||||||
Db        121 AGTGAATGACAAAAATATTCAAGTGGTGGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTTCATCCTCG 180

Qy        999 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 1058
              |||||||||||||  ||||||| |||||||||||||||||||||| | ||||||||
Db        181 GCCTCCTTACTTACCACTGGCTGTTCCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCGTAAGAGTCCA 240

Qy       1059 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 1118
              |||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||| ||||| ||||||||||||
Db        241 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTGTCCCAGTTCGTCAAATATTTGATTCGTCCACAACC 300

Qy       1119 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 1178
              |||||| |||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||
Db        301 TTGGCTAGAAAAGGAAATAGAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTCAT 360

Qy       1179 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 1238
              |||||||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||
Db        361 TGGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAGGCAGCCTTCCATCCCATCGA 420

Qy       1239 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 1298
              || |||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||
Db        421 AGAGTACATGGTACATGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGA 480

Qy       1299 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 1358
              |||||||||||| |||||||| || |||||||| |||||||||||||||||||||||||
Db        481 TAAAAAAAGAGTATATCTGGCTACCGATGACCCTGCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 540

Qy       1359 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 1418
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Db        541 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 600

Qy       1419 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 1478
              || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Db        601 TCGGTACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCTCAGGC 660

Qy       1479 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 1538
              ||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Db        661 TGACTTCCTAGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 720

Qy       1539 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 1598
              ||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Db        721 AACCCTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCACTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 780

Qy       1599 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 1658
              |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||| | |||||
Db        781 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCCGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGATGAGGA 840

Qy       1659 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 1718
              ||| || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| ||
Db        841 AATTCCAATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTC 900

Qy       1719 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 1778
              |||||||||||||||||||| |||||||||||| | || || |||||||||||||||||
Db        901 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGA 960

Qy       1779 GAAGATAGAAACAGTCAA 1796
              |||||||||||| |||||
Db        961 GAAGATAGAAACGGTCAA 978
```

RESULT 12
ABK70037
ID ABK70037 standard; cDNA; 979 BP.
XX
AC ABK70037;
XX
DT 15-JUL-2002 (first entry)
XX
DE Antibody production method related cDNA #5.
XX
KW Antibody production; cytostatic; immunomodulator; vasotropic; virucide;
KW antibacterial; antiinflammatory; antiallergic; allergy; inflammation;
KW autoimmune disease; Chinese hamster ovarian tissue-originated cell; CHO;
KW tumour; circulatory disease; infection; primer; ss.
XX
OS Rattus norvegicus.
XX
PN WO200231140-A1.
XX
PD 18-APR-2002.
XX
PF 05-OCT-2001; 2001WO-JP08804.
XX
PR 06-OCT-2000; 2000JP-0308526.

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D

```
XX
PA   (KYOW ) KYOWA HAKKO KOGYO KK.
XX
PI   Kanda Y,  Satoh M,  Nakamura K,  Uchida K,  Shinkawa T,  Yamane N;
PI   Hosaka E,  Yamano K,  Yamasaki M,  Hanai N;
XX
DR   WPI; 2002-340182/37.
XX
PT   Cells producing antibody compositions including antibody fragments and
PT   fusion proteins with Fc domain of antibody, useful for prevention or
PT   treatment of cancer, immune diseases, circulatory diseases and
PT   infections -
XX
PS   Example 9; Page 13-14; 314pp; Japanese.
XX
CC   This invention relates to novel method for antibody production
CC   comprising a Chinese hamster ovarian tissue-originated (CHO) cell
CC   transferred with a gene encoding an antibody molecule for producing a
CC   composition comprising an antibody molecule with an Fc domain bonded
CC   to the N-glycoside linkage complex sugar chain. The produced antibody
CC   compositions are drugs for prevention or treatment of diseases
CC   accompanying tumour, allergy or inflammation, autoimmune diseases,
CC   circulatory diseases, and viral and bacterial infections. The
CC   antibodies can be stably produced using the method of the invention
CC   with high binding activity and potency thus leading to high safety and
CC   reduced side effects when applied alone or in combination with other
CC   drugs for therapy. The present sequence represents a nucleotide
CC   molecule used in the method of the invention.
XX
SQ   Sequence 979 BP; 283 A; 223 C; 220 G; 253 T; 0 other;

  Query Match             44.5%;  Score 893.2;  DB 24;  Length 979;
  Best Local Similarity   94.6%;  Pred. No. 4.5e-255;
  Matches  925;  Conservative    0;  Mismatches   53;  Indels    0;  Gaps    0;

Qy        819 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG 878
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Db          1 ACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGACTGTGTTTAG 60

Qy        879 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 938
              |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Db         61 ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGATCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGA 120

Qy        939 AGTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTCCATCCTCG 998
              |||||| ||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||| ||||||||
Db        121 AGTGAATGACAAAAATATTCAAGTGGTGGAGCTCCCCATTGTAGACAGCCTTCATCCTCG 180

Qy        999 TCCTCCTTACTTACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCA 1058
              ||||||||||||||  ||||||| |||||||||||||||||||||| | ||||||||
Db        181 GCCTCCTTACTTACCACTGGCTGTTCCAGAAGACCTTGCAGATCGACTCGTAAGAGTCCA 240

Qy       1059 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTATCCCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGTCCACAACC 1118
              |||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||| ||||| ||||||||||
Db        241 TGGTGATCCTGCAGTGTGGTGGGTGTCCCAGTTCGTCAAATATTTGATTCGTCCACAACC 300

Qy       1119 TTGGCTGGAAAGGGAAATAGAAGAAACCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTAT 1178
              |||||| |||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||
Db        301 TTGGCTAGAAAAGGAAATAGAAGAAGCCACCAAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTCAT 360

Qy       1179 TGGAGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGA 1238
              |||||||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||
Db        361 TGGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAGGCAGCCTTCCATCCCATCGA 420

Qy       1239 GGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAATGAAAGTGGA 1298
              || |||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||
Db        421 AGAGTACATGGTACATGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGCACGCAGAATGCAAGTGGA 480

Qy       1299 TAAAAAAAGAGTGTATCTGGCCACTGATGACCCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 1358
              |||||||||||| |||||||| || ||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Db        481 TAAAAAAAGAGTATATCTGGCTACCGATGACCCTGCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAA 540

Qy       1359 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 1418
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Db        541 GTACTCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCTTGGTCAGCTGGACTACACAA 600

Qy       1419 CCGATACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCCCAGGC 1478
              || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Db        601 TCGGTACACAGAAAATTCACTTCGGGGCGTGATCCTGGATATACACTTTCTCTCTCAGGC 660

Qy       1479 TGACTTCCTTGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTAGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 1538
              ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Db        661 TGACTTCCTAGTGTGTACTTTTTCATCCCAGGTCTGTCGGGTTGCTTATGAAATCATGCA 720

Qy       1539 AACACTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 1598
              ||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Db        721 AACCCTGCATCCTGATGCCTCTGCAAACTTCCACTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGG 780

Qy       1599 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCAGTTTATCCTCACCAACCTCGAACTAAAGAGGA 1658
              |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||| | |||||
Db        781 AGGCCAAAATGCCCACAACCAGATTGCCGTTTATCCTCACAAACCTCGAACTGATGAGGA 840

Qy       1659 AATCCCCATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGAATGGTTACTC 1718
              ||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||
Db        841 AATTCCAATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAACCATTGGGATGGTTATTC 900

Qy       1719 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTAGGAAAAACAGGCCTGTACCCTTCCTACAAAGTCCGAGA 1778
              |||||||||||||||||||| |||||||||||| | || || ||||||||||||||||||
Db        901 TAAAGGTGTCAACAGAAAACTTGGAAAAACAGGCTTATATCCCTCCTACAAAGTCCGAGA 960

Qy       1779 GAAGATAGAAACAGTCAA 1796
              |||||||||||| |||||
Db        961 GAAGATAGAAACGGTCAA 978


RESULT 13
AAF87952
ID   AAF87952 standard; DNA; 1017 BP.
XX
AC   AAF87952;
XX
DT   20-JUL-2001  (first entry)
XX
DE   Human alpha 1-6 fucosyltransferase 237-575 encoding DNA SEQ ID NO:1.
XX
KW   Human; alpha 1-6 fucosyltransferase; alpha 1-6 fucT; antibody;
KW   alpha 1-6 fucose transferase; anti-human alpha 1-6 fucT; immunoassay;
KW   ds.
XX
OS   Homo sapiens.
XX
FH   Key             Location/Qualifiers
FT   CDS             1..1017
FT                   /*tag=  a
FT                   /partial
FT                   /product= "alpha 1-6 fucosyltransferase 237-575"
XX
PN   JP2001011097-A.
XX
PD   16-JAN-2001.
XX
PF   29-JUN-1999;   99JP-0183569.
XX
PR   29-JUN-1999;   99JP-0183569.
XX
PA   (FJRE ) FUJIREBIO KK.
XX
DR   WPI; 2001-275926/29.
DR   P-PSDB; AAB75061.
XX
PT   Novel anti-human alpha1-6 fucose transferase antibody useful for
PT   immunoassay -
XX
PS   Example 1; Page 6-7; 11pp; Japanese.
XX
CC   The present invention describes an anti-human alpha 1-6
CC   fucosyltransferase (alpha 1-6 fucT, also called alpha 1-6 fucose
```

Aragen/Transposagen Ex. 1036 - Part D