

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-146820

(P2016-146820A)

(43) 公開日 平成28年8月18日(2016.8.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	2 G 0 4 1
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A N	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/483 (2006.01)	G O 1 N 33/483 E	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 K	4 B 0 6 4

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-9507 (P2016-9507)
 (22) 出願日 平成28年1月21日 (2016.1.21)
 (62) 分割の表示 特願2014-533442 (P2014-533442)
 の分割
 原出願日 平成24年9月28日 (2012.9.28)
 (31) 優先権主張番号 61/540,454
 (32) 優先日 平成23年9月28日 (2011.9.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513177646
 シービー バイオテクノロジーズ インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 アラバマ州 ハンツビル
 サウスイースト ドニゴール ドライブ
 7712
 (71) 出願人 512252320
 ハン ジャン
 アメリカ合衆国 アラバマ州 ハンツビル
 ドニゴール ドライブ 7712
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アームPCRおよび高処理シーケンシングを用いた抗原特異的適応免疫応答の同定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒト又は動物の血液から単離された抗体からの少なくとも一つのアミノ酸配列を、ヒト又は動物の免疫レパートリーにおける抗体に対応する少なくとも一つのリボ核酸配列と関連させるための方法、及び、合成モノクローナル抗体を産生するために重鎖並びに軽鎖をペアリングするための手段の提供。

【解決手段】ヒト又は動物の対象から取得される血液又は組織から少なくとも一つのリボ核酸配列を単離する工程と、少なくとも一つのリボ核酸配列を取得する工程と、少なくとも一つのリボ核酸配列をヒト又は動物の対象からの免疫レパートリーを含む配列データベースと比較する工程と、少なくとも一つのリボ核酸配列に特異性を持って結合する重鎖及び軽鎖を関連付けるために、抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列をクローニングして発現させる工程と、を含む抗原性の実体に特異的な抗体を同定する方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、所与の抗原性の実体に特異的な抗体を同定するための方法：

- (a) ヒトまたは動物の対象から取得される血液または組織から少なくとも一つの抗体を単離する工程；
- (b) 該少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を取得する工程；
- (c) 抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列を同定するために、該少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を該ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーを含む配列データベースと比較する工程；および
- (d) 少なくとも一つの標的抗原に特異性を持って結合する重鎖および軽鎖を関連付けるために、該抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列をクローニングして発現させる工程。

10

【請求項2】

少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を取得する工程が、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いて実施される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーが、アンプリコンレスキューマルチプレックスPCRによって決定される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

以下の工程を含む、抗原特異的なT細胞を同定するための方法：

- (a) これまでにインビボにおいて抗原で刺激されたことのある対象から血液または組織の試料を取得する工程；
- (b) 血液から末梢血単核細胞を分離し、該末梢血単核細胞をインビトロで培養する工程；
- (c) 該末梢血単核細胞に標的抗原の有効な量をインビトロで添加する工程；
- (d) 該標的抗原添加後、経験的に決定された時期に末梢血単核細胞を収穫する工程；
- (e) 収穫された末梢血単核細胞から、シーケンシングされた免疫レパートリーを産生する工程；
- (f) 収穫されたT細胞からの免疫レパートリーを、標的抗原を添加されたことのない同一対象からの単離されたT細胞から調製されたアームPCRでシーケンシングされた免疫レパートリーと比較する工程；ならびに
- (g) 抗原が添加されなかったT細胞に比べて抗原が添加されたT細胞の数の増加に基づいて、拡張したT細胞を同定する工程。

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2011年9月28日に出願された先行出願の米国特許仮出願第61/540,454号の優先権の恩典を主張する。米国特許仮出願第61/540,454号の内容は参照により本明細書に組み入れられて、これは適用可能な法律および規則によって許容されている。

40

【0002】

発明の分野

本発明は、抗原特異的適応免疫応答の同定のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

モノクローナル抗体(mAb)は、診断用および研究用の物質から治療用医薬品までの範囲の用途に広く用いられている。医療的に有用な抗体(Ab)の産生における重要な工程は、所望の抗原特異的Abの最初の同定である。これは、通常は、ハイブリドーマおよびファージディスプレイなどの手法における多数回の「パニング」を用いて、またはISAAC(Jin

50

, A., et al. (2009), A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med* 15, 1088-1092 (非特許文献1))などのチップベースの方法におけるELISPOTによって実施される。

【0004】

免疫レパトリーは、任意の所与の瞬間における循環中の機能的に多様なBおよびT細胞のすべてから構成されて、HLA型および抗原曝露歴などの遺伝的および環境的な双方の要因によって大きく影響を受ける。

【0005】

TおよびBリンパ球の多様な抗原レセプターは、限定的ではあるが非常に多くの遺伝子セグメントの体細胞性の組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V(可変)、D(多様性)、J(連結)、およびC(定常)は、免疫グロブリンおよびT細胞レセプター(TCR)の結合特異性を決定する。

10

【0006】

モノクローナル抗体産生のためのもっとも重要かつもっとも一般的な方法は、1975年にKohlerおよびMilsteinによって開発された。この方法では、抗原特異的抗体の産生を刺激するために抗原の注入によってマウスを免疫する。個々の抗体形成細胞をマウスの脾臓から単離して、ハイブリドーマを産生するために不死の骨髄細胞と融合する(Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (非特許文献2))。異なる各クローンによって分泌される抗体を、ELISAなどの十分に確立された方法を用いてそれらの抗原結合能力についてアッセイする。もっとも安定かつ生産的なクローンは、インビトロにおける細胞培養手法を用いることによって、またはそれらをハイブリドーマがモノクローナル抗体を腹水として分泌するマウスの腹腔内に注入することのいずれかによって、量産される。

20

【0007】

ハイブリドーマ技術は、歴史的に見て、時間がかかり、しかも労働集約的であり、得られるハイブリドーマは遺伝的に不安定である可能性がある(Chambers, R.S. (2005). High-throughput antibody production. *Curr Opin Chem Biol* 9:46-50 (非特許文献3))。さらに、ハイブリドーマをマウスで増やす場合、多すぎる腹水が蓄積し得て、該動物において疼痛および苦痛を生じる可能性が高い。マウスハイブリドーマから誘導される抗体の治療成功率は、ヒトにおいて異種タンパク質が誘発する高い免疫原性のために、歴史的に低い(Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357 (非特許文献4); Reichert, J.M., et al. (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23, 1073-1078 (非特許文献5))。治療目的に有用な抗体を作るために、しばしば、キメラ化またはヒト化などのさらなる工程が要求される。キメラ化はマウスの可変ドメイン(抗原結合ドメイン)をヒト抗体の定常ドメインと結合する工程を伴い、一方、ヒト化はマウス抗体由来の相補性決定領域(CDR; 可変ドメインの抗原結合ループ)をヒトIgGに移植する工程を伴う。「ヒト化」IgGは、しばしば移植部位に隣接するフレームワーク領域が結合に必要な適正なCDR高次構造に寄与するので(Kipriyanov, S.M., and Le Gall, F. (2004). Generation and production of engineered antibodies. *Mol Biotechnol* 26, 39-60 (非特許文献6))、しばしば、元々のマウス抗体と同じ親和性では抗原に結合しない。完全ヒト抗体の産生のためにその他の方法が開発されていて、現在、臨床試験に入っている抗体の多くは完全ヒトである(Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357 (非特許文献4))。典型的には、それらはヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することのできるトランスジェニックマウスから誘導される(およびハイブリドーマ技術を用いて産生される)か、またはファージディスプレイ技術から誘導される(Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357 (非特許文献4))。ファージディスプレイ技術を用いると、抗体遺伝子が融合タンパク質として系

30

40

50

状バクテリオファージの表面において発現して提示される。提示される抗体遺伝子はしばしば非免疫ドナーのBリンパ球から単離されて、様々な抗原に対するヒト抗体の価値のある供給源として利用することができる固有のライブラリを形成する (Pansri, P., et al. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6 (非特許文献7))

【0008】

ファージディスプレイ抗体ライブラリはファージのコレクションであり、各々のファージ粒子がその表面上に単一の抗体を提示している。ファージライブラリは、高親和性抗原特異的クローンを同定するために、しばしば繰り返し、パニングされなければならない。さらに、ファージディスプレイライブラリはインビトロでの適切な抗体の選択に依存するので、ライブラリは少なくとも 10^8 個の個々のクローンをカバーしなければならない。

10

【0009】

高処理シーケンシングの免疫レパートリー解析への応用は比較的新しく、かつ、極めて強力である。例えば、2009年には1回のシーケンシングの実行がNCBIの全寿命を通じて蓄積されるよりもはるかに多くの特有のCDR3配列を産生した (Wang, C., et al. (2010). High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. Proc Natl Acad Sci USA 107, 1518-1523 (非特許文献8))。必要とされるものは、免疫応答の分析のために高処理スクリーニングを使用するための方法および疾病治療の目的のために該応答の操作のための方法である。

【先行技術文献】

20

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Jin, A., et al. (2009), A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. Nat Med 15, 1088-1092

【非特許文献2】Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497

【非特許文献3】Chambers, R.S. (2005). High-throughput antibody production. Curr Opin Chem Biol 9:46-50

【非特許文献4】Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev Immunol 6, 343-357

30

【非特許文献5】Reichert, J.M., et al. (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. Nat Biotechnol 23, 1073-1078

【非特許文献6】Kipriyanov, S.M., and Le Gall, F. (2004). Generation and production of engineered antibodies. Mol Biotechnol 26, 39-60

【非特許文献7】Pansri, P., et al. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6

【非特許文献8】Wang, C., et al. (2010). High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. Proc Natl Acad Sci USA 107, 1518-1523

40

【発明の概要】

【0011】

本発明は、所与の抗原性の実体に特異的な抗体を同定するための方法であって、ヒトまたは動物の対象から取得される血液または組織試料から少なくとも一つの抗原特異的抗体を単離する工程、少なくとも一つの抗原特異的抗体のアミノ酸配列(例えば、ペプチド配列)を決定する工程、および抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列(antigen-specific clonally-expanded antibody sequence)を同定するために少なくとも一つの抗原特異的抗体のアミノ酸(ペプチド)配列を、ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーを含む配列データベースと比較する工程、ならびに少なくとも一つの標的抗原または

50

そのエピトープに対して特異性を持って結合する重鎖および軽鎖を会合させるために抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列をクローニングおよび発現させる工程を含む方法に関する。

【0012】

本発明は、抗原特異的T細胞を同定するための方法であって、ヒトまたは動物血液の試料から末梢血モノクローナル細胞（PBMC）を単離する工程、PBMCを少なくとも2つのサブセット（抗原を受けない一つの対照サブセットと、経験的に決定された量の抗原を受ける実験サブセット）に分割する工程、インビトロでPBMCを培養する工程、培養開始時に有効な量の標的抗原をインビトロでPBMCに添加する工程、標的抗原の添加後の経験的に決定された時期にPBMCを収穫する工程、収穫したPBMCからアームPCRでシーケンシングした免疫レポーター（刺激されたおよび刺激されていないサブセットからのT細胞レポーターおよびB細胞レポーターの双方）を産生する工程、および免疫レポーターを、標的抗原が添加されていない同一対象からの単離されたPBMCより調製されたアームPCRによりシーケンシングされた免疫レポーターと比較する工程、ならびに抗原が添加されなかったT細胞と比較して抗原が添加されたT細胞の数の増加に基づいて拡張したT細胞を同定する工程を含む方法も提供する。

10

【0013】

同様の方法を、同一の実験からの抗原特異的B細胞応答を同定するために応用し得る。抗原に应答してクローン性に拡張された集団を同定するために、刺激されたおよび刺激されていない双方の試料からのB細胞レポーターを比較する。さらに、分泌された任意の抗原特異的抗体はインビトロの培地から精製され得て、刺激されていないまたは刺激されたレポーターに対するLC質量分析によるペプチドマッチングを利用することによって同定され得る。抗体およびB細胞に特に適用され得る通り、本発明の様々な局面において、少なくとも一つの標的抗原に特異性を持って結合する重鎖および軽鎖の結合ペアをマッチさせるために重鎖および軽鎖のペアをクローニングして発現させる工程を含む工程が加えられてもよい。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、本発明の様々な工程およびそれを種々な使用においてより幅広く用いられることを可能とする特定の修正を記載するダイアグラムである。

30

【図2】図2は、本発明の工程をさらに詳しく記載するダイアグラムである。

【図3】図3は、Fluzone（登録商標）（次の3つの各ウイルスのヘマグルチニン抗原を含む：A/Brisbane/59/2007, IVR-148 (H1N1)、A/Uruguay/716/2007, NYMC X-175C (H3N2) (A/Brisbane/10/2007様ウイルス)、およびB/Brisbane/60/2008)での刺激後に取得された抗体産生細胞から同定されたペプチド配列の試料を示す表である。

【図4】図4は、レポーターデータベースに連結したLC MS/MSを介して決定された抗原特異的ペアについてのELISAアッセイの結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な説明

40

本発明者らは、アンプリコンレスキュードマルチプレックスPCR (amplicon rescued multiplex PCR) (アームPCR、米国特許第7,999,092号に記載)を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC MS/MS) と組み合わせた高処理免疫レポーターシーケンシングと連結する方法を用いて、有機体からの抗原特異的適応免疫応答の迅速かつ直接的な同定を可能とする新しい方法を開発した。本発明は、BおよびT細胞レセプターのV(D)J再配列に関する配列データベースを構築するためにアームPCRおよび高処理シーケンシングを利用する。続いて、精製された抗原特異的抗体のV領域 (または抗原特異的部分) が質量分析ペプチドマッピングを用いて高処理シーケンシングデータベースに照らして同定される。本発明は、インビボおよびインビトロの双方において抗原曝露の前および後のTおよびB細胞のレポーターを比較することによって、抗原特異的レポーター情報を取得す

50

るための方法も提供する。

【0016】

様々な局面において、本発明は、所与の抗原性の実体に特異的な抗体を同定するための方法であって、ヒトまたは動物の対象から取得される血清試料から少なくとも一つの抗原特異的抗体を単離する工程、少なくとも一つの抗原特異的抗体からアミノ酸配列（ペプチド配列）を取得する工程、および、抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列を同定するために、少なくとも一つの抗原特異的抗体のアミノ酸配列を、ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーを含む配列データベースと比較する工程、および、少なくとも一つの標的抗原またはそのエピトープに対して特異性を持って結合する重鎖および軽鎖を会合させるために、抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列をクローニングして発現させる工程を含む方法に関する。

10

【0017】

本発明は、抗原特異的T細胞を同定するための方法であって、これまでにインビボにおいて抗原で刺激された対象から血液試料を取得する工程、該試料からT細胞を単離して該T細胞をインビトロで培養する工程、インビトロで該T細胞に標的抗原の有効な量を添加する工程、該標的抗原の添加後の経験的に決定された時期にT細胞を収穫する工程、収穫された該T細胞からアームPCRでシーケンシングされた免疫レパートリーを産生する工程、免疫レパートリーを、標的抗原を添加されていない同一の該対象からの単離されたT細胞から調製されたアームPCRでシーケンシングされた免疫レパートリーと比較する工程、ならびに抗原を添加されなかったT細胞と比較して、抗原を添加されたT細胞の数の増加に基づいて拡張したT細胞を同定する工程を含む方法も提供する。

20

【0018】

抗体およびB細胞に特に適用され得る通り、本発明の様々な局面において、少なくとも一つの標的抗原に特異性を持って結合する重鎖および軽鎖の結合ペアをマッチさせるために重鎖および軽鎖のペアをクローニングおよび発現させる工程を含む工程が加えられてもよい。さらに、分泌される任意の抗原特異的抗体はインビトロで培地から精製され得て、刺激されていないまたは刺激されたレパートリーに対するLC質量分析ペプチドマッチングを利用することによって同定され得る。

【0019】

本明細書で用いられるように「抗原性の実体」は、例えば、ヒトおよび/または動物の免疫系によって認識される一つまたは複数の抗原またはエピトープを含む、抗原、抗原性の物質、細菌またはウイルスなどの微生物などである。本明細書で用いられるように「免疫レパートリー」は、個々のヒトまたは動物の対象のTおよび/またはB細胞を含む血液試料中の検出可能な可変領域遺伝子再配列のDNAおよび/またはタンパク質の配列を含むデータベースである。本発明の様々な局面において、免疫レパートリーは、例えばアームPCR（米国特許第7,999,092号に記載される）として公知の方法を用いて産生され得る米国特許出願公開第US20100021896号に記載される通りに取得される。T細胞から何十万というシーケンシングの読み取りを産生するための高処理シーケンシングの適用は、例えば、Wangら（Wang, C. et al., High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 26;107(4):1518-23）によって記載されている。

30

40

【0020】

インビトロで抗原特異的T細胞を同定するためのこれまでの試みは、多くのアッセイ手法の感受性および特異性の欠除によって妨害されていた。T細胞レセプター（TCR）は複数の局面においてB細胞レセプター（BCR）と全く異なっている。第一に、TCRは膜結合型であり、BCRのように可溶型としては出現しない。従って、TCRの特異性を決定するためには極めて複雑な細胞アッセイが必要である。第二に、MHCなどの追加的なタンパク質複合体の不在下において、TCRはそれらの標的基質に低い結合親和性を有するのに対して、抗体およびBCRは任意の追加的な補助なしでそれらの基質にしっかりと結合する。TCRは、それらの同属の抗原を結合および認識するためにMHC複合体の助けを必要とする。MHCはそれと

50

一緒にオリジナルの抗原のペプチドを運搬して、それをTCRに与える。現在、抗原特異的TCRの同定のための最も一般的な方法はMHC四量体法(MHC tetramer method)である。この方法では、組み換えMHCはビオチン化されて関心対象のペプチドと共に折り畳まれる。MHCは蛍光標識されたストレプトアビジンによって四量体化される。該四量体は所与のペプチド-MHC複合体に特異的なTCRレセプターを発現するT細胞を特異的に標識する。単一のTCRと単一のMHC分子の間の結合は弱い、四量体は一度に3つのTCRに結合することができるので、四量体が必要である(Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science. 1996. 274: 94-96. J Immunol 187, 7-9.)。

10

【0021】

しかし、抗原特異的T細胞の同定は、疾患の診断において貴重な情報を提供する。例えば、本発明の方法に基づいて、特定の疾患状態と関連することが同定されるT細胞は、まだ診断が行われていないもう一つの個体における疾患の存在に関するマーカーとして容易に用いることができる。本発明の方法を用いたインビボまたはインビトロでの抗原性刺激に応答した増殖に基づいた特異的抗原に関連するT細胞の同定は、例えば、個体が来院時に重大な症状を生じていない無症候性の疾患を有することの確認を医師に提供することもできる。

【0022】

必要な特異性および感受性は、試料採取されたT細胞集団内の様々なT細胞レセプター遺伝子再配列によって示される配列を含む免疫レパトリーの産生のためのアームPCRシーケンシングの使用によって提供される。当初のインビトロT細胞集団ではより高いまたはより低い割合で存在した可能性があるが、抗原に応答して増殖した細胞を同定するために、アームPCRは、検出された配列によって表される通り、細胞の相対的な数の比較を可能とする半定量的結果を提供する。インビトロでの抗原刺激後に集団が顕著に増加したT細胞を表す配列を同定することによって、特定の抗原性の実体に対する細胞性免疫応答に参与するT細胞レセプター配列、従って、関連するT細胞を同定することが可能である。

20

【0023】

本発明の方法では、1例の患者からの血液試料から取得された(T細胞およびB細胞を含む)PBMCを再生記憶および増殖をもたらすためにインビトロで抗原またはそのエピトープで刺激して、続いて、アームPCRシーケンシングを利用する方法によって増幅および検出される配列によって表される試料中のT細胞集団を、インビトロで同一の抗原またはエピトープによる刺激を受けていない同一の個々の患者からの血液試料のT細胞集団から増幅および検出される配列と比較する。

30

【0024】

抗原特異的抗体、特にIgGの単離における最初の工程は、下流の抗原特異的IgGの収量低下に至る可能性のある混入しているあらゆる血清アルブミンおよびその他の血清タンパク質を除去するために、血清から一般的なIgGを精製する工程による。これを実施することができる多くの方法があり、例えば、硫酸塩析とその後のサイズ排除クロマトグラフィー、または直接的なプロテインA、プロテインGもしくはIgSelectのようなアフィニティークロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーを含むがそれらに限定されない。一般的なIgG集団の精製後、免疫親和性精製は抗原特異的抗体を精製するための最も広く用いられる方法である。典型的には、免疫親和性精製は、関心対象の抗原またはエピトープフラグメントを固相支持体に共有結合性に架橋結合する工程を含む。固相支持体マトリックスは、一般に、「活性化」アガロース、架橋結合したアガロース、ポリアクリル系または磁気ビーズであり、これらは市販されている。各々は、支持体マトリックスおよび製造業者の取り扱い説明書に応じて異なるカップリングメカニズムを有する。免疫親和性精製の期間中、一般的なIgG集団は1時間から一晩まで任意の場所に結合することが可能である。未結合の抗体は洗浄によって除去して、特異的な抗体は、一般的にはpHを低下させることによって溶出する(溶液のpHは高度に濃縮したアルカリ性緩衝液を添加することに

40

50

よって即座に回復する)。但し、溶出は様々な方法で、例えば、1.5Mチオシアン酸カリウム、4M尿素、3.5M MgCl₂などの強い試薬を添加することによって、または低pHの緩衝液の勾配を使用することによって実施することができる。

【0025】

本発明の様々な局面において、一般的なIgG集団の単離は、添付する実施例に開示される通り、GE HealthcareからのIgSelectカラムなどのアフィニティークラムを用いて実施される。開示される実施例における抗原特異的集団の免疫親和性精製は、Thermoscientific/PierceからのMicroLink Protein Coupling Kitを用いて製造業者の取り扱い説明書に従って実施される。このケースにおいて、精製される抗原特異的IgGは濃縮されて、重鎖および軽鎖は還元性条件下でSDS-PAGE分析を実施することによって分離された。さらに、濃縮された試料のいくつかは、Fabフラグメントを調製するためにFab Micro Preparationキットに適用された。Fabフラグメントは還元性条件下においてSDS-PAGEゲルにも適用された。重鎖、軽鎖およびFabフラグメントに対応するゲルバンドは、ケラチン混入を避けるような方法で慎重に切り取った。単離された抗体のタンパク質配列の分析は、これまでに文献において記載されたことのある手法である、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて、迅速かつ効率的に実施することができる。対象の免疫レパートリーは、米国特許第7,999,092号および米国特許公開第20100021896号に記載された手法を用いて、例えば、これらの刊行物に開示されたプライマーを用いて、作成され得る。特異的な抗体または抗体の小さなサブセットについて実施されるLC/MS/MSを用いて生成される配列と、抗体が単離される対象の免疫レパートリーの比較は、データ管理および情報技術の技術分野の当業者に公知の手段によって実施され得る。配列の比較は特異的な配列を確認して、所与の時点におけるクローン性の拡張の程度に関する情報を提供し、これは、例えば、ワクチン応答の評価において特に有益であり得る。対応する重鎖および軽鎖をペアとするためのクローニングおよび発現は、当業者に公知の手法を用いて実施することができ、このためのキットは容易に入手可能である。

10

20

【0026】

本発明の方法を用いた抗原特異的抗体の同定は、科学者に、元々の細胞が由来する個体のそれと同一の抗原結合V領域タンパク質配列を有する「モノクローナル」抗体を産生するために適切な重/軽鎖抗体組み合わせの量産を可能とする。末梢血はしばしばこのような細胞の供給源であり、試料は様々な手法を用いて取得され得て、例えば、末梢血単核細胞、脾臓、リンパ節などを含み得る。細胞を取得するための試料採取は、抗原への曝露の前または後の様々な時点で実施することができる。

30

【0027】

重鎖および軽鎖のペアリング情報は高処理シーケンシングの期間中に消失する。この制限を克服するために、重鎖および軽鎖ペアの組み合わせはマイクロタイタープレート上の格子パターンにおいてFabフラグメントとして組み換え技術によって発現することができ、抗原に対するそれらの結合はELISAで測定される。発現は、重鎖(F_D)を表すプラスミドおよび軽鎖(または)のプラスミドを用いて、ヒトインビトロ発現系において実施することができる。しかし、大腸菌(E. coli)、Hek293などの哺乳動物発現系、酵母などを含む、インビトロ、インビボまたは双方の任意の発現系が使用できる。本発明の現在の局面において、クローニングはThermoscientific/PierceからのHuman In Vitro Glycoprotein Expressionキットと共に含まれるpT7CFE1-Chisベクターを用いた同種組み換えを用いて実施された。T7プロモーター、内部リボソーム侵入部位(IRES)、マルチクローニングサイト(MCS)、C末端6xHisタグ、ポリA尾部、およびアンピシリン耐性遺伝子を含む遺伝子標的物のインビトロにおける発現のための本質的要素を含有するベクターは、代表的な第4のフレームワーク領域(FR4)、ならびに重鎖および双方の軽鎖(および)のC領域配列 - 本発明者らは「V対応」カセット(3カセットの全体:重、および のV対応カセット)と呼ぶ - をさらに含むように修正された。FR4は、V領域と、V対応カセットのC領域との組み換えを可能とする重複領域として用いられる。FR4はVベースデータベースから得られる配列アラインメントから決定される通りCDR3の直後の領域における共通配

40

50

列を表して、抗原特異性に結びつけられたCDR3の適正な三次元構造を維持することに役立つ。同定されたV領域は、Fabフラグメントとしてインビトロの系での下流発現のために同種組み換えクローニング (HRC) によって適切な「V対応」カセットに容易に挿入することができる。HRCは、多くの大腸菌株 (クローニングにおいて用いられるRecA欠損株を含む) の、それらの末端の同種配列を共有するDNAフラグメント間のインビボでの分子間組み換えを実施する能力に基づく (Bubeck, P., Winkler, M., and Bautsch, W. (1993). Rapid cloning by homologous recombination in vivo. Nucleic Acids Res 21, 3601-3602 ; Jones, D.H., and Howard, B.H. (1991). A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction. Biotechniques 10, 62-66 ; Oliner, J.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. Nucleic Acids Res 21, 5192-5197)。遺伝子フラグメントは、制限消化、ライゲーションまたはその他の酵素的操作を用いることなく、線状化された標的プラスミドベクターに素早くサブクローニングすることができる (Marsic, D., Hughes, R.C., Byrne-Steele, M.L., and Ng, J.D. (2008). PCR-based gene synthesis to produce recombinant proteins for crystallization. BMC Biotechnol 8, 44.)。V対応カセットにマッチする重複末端は、V対応カセットへの同種配列を含むプライマーを用いたPCRによってV領域に配置される。現在記載されるデザインでは、c-mycタグおよびFLAGタグが、重鎖および軽鎖の双方のV領域に、それぞれ、発現および抗原結合の双方の下流検出を促進するためのPCR増幅期間中に付加された。所与のV領域、F_D、重鎖、または軽鎖の配列をインビトロでの発現に適切な要素を伴うベクターに配置するために、任意のタイプのクローニングを用いることができる；但し、本発明者らは、HRC方法が現在の適用における最も早くかつ容易な解決法であると確信している。第一に、本方法は制限を必要とせず、このことは、多くのV領域を試験するために高処理アプローチを利用するならば重要である。第二に、それは極めて効率的かつ迅速である。本発明者らは、高度に精製されたプライマーおよびFinzymesからのPhusionなどの高忠実度のポリメラーゼ (PCRがV領域を増幅する場合) との組み合わせで用いられる場合、適正な配列を用いて95%の明確な挿入率を立証している。第三に、本発明者らは、制限部位に直接隣接するがプライマーの該部位を含まない重複領域をデザインすることによって、V領域およびC領域の間にシームレスの重複を作ることができた。これは、ベクターにおける必要な制限部位の存在のために、生じることがある最終的なタンパク質産物における追加的なアミノ酸を除去する。

10

20

30

【0028】

インビトロの系において発現すると、タンパク質は金属アフィニティークロマトグラフィーおよびタンパク質のHisタグを用いて精製することができる。これは多くの方法で実施できるが、本記載ではNi-NTA磁気ビーズがその簡便さおよび早さのために利用された。結合は、c-mycおよびFLAGタグの双方に対する抱合検出抗体を用いたELISAを用いて確認することができる。結合ペアが確認されると、それらは比較的容易に別の様式 (scFv、完全長IgGなど) に移すことができ、産生は適用の要件にスケール変更することができる。

【0029】

本発明の方法の一つの重要な利点は、抗体が専らヒトである潜在性を有していて、従って、マウスIgGで遭遇する免疫原性を回避することである。これは、ヒト試料の免疫レパートリーをシーケンシングして質量分析マッピングを用いて該試料から直接、抗原特異的抗体を同定する工程、抗原投与の前および後の該レパートリーを比較する工程、またはインビトロでの培養後に刺激したおよび未刺激の双方の末梢血単核細胞のレパートリーを比較する工程によって達成することができる。さらに、抗体は、マウスハイブリドーマの必要性を完全に回避して組み換え操作によって産生される。

40

【0030】

アームPCRの半定量的な性質は、所与の抗原において、健全な免疫系によってインビボで選択される特異的にアップレギュレートされたクローン集団の同定を可能にする。さらに、抗原への多数回の曝露は抗体応答を洗練するので、この技術は免疫応答の固有の親和

50

性の成熟を利用して特異抗原に対して最も高いアビディティを有するクローン性に拡張された集団を同定することが可能である。従って、ファージディスプレイを用いて要求される何回ものパニングおよびマウスハイブリドーマにおける個々のB細胞クローンの冗長なスクリーニングが回避され得る。

【0031】

さらに、結果として生じるレポトリデータベースは抗体が精製された試料とマッチして、これは公開のデータベースと比較する場合のケースではない。(インビトロおよびインビボの双方において)刺激されたレポトリに対して未刺激のレポトリを比較する場合、アームPCRの半定量的な性質は潜在的に抗原関連性である特異的な相違を正確に指摘する。高処理シーケンシングと連結したアームPCRおよびピロシーケンシングプラットフォームにおける近年の進歩はこのタイプの分析を可能とする。

10

【0032】

この方法は多くの追加的な可能性を有する。例えば、未処置の免疫系を抗原特異的抗体に関して探索して、それによって抗原投与の必要性を減じることが可能であり得る。これは、倫理的にすべての抗原を投与できる訳ではないので、ヒトの対象において好都合である。さらに、抗原全体を用いての精製の代わりにエピトープフラグメントを用いて抗原特異的抗体を精製することができる。これは、利用者に、利用者が関心を持つエピトープ特異的抗体のみを取り出すことを可能とする。

【0033】

本発明は、次の非限定的な実施例によってより詳細に説明され得る。

20

【実施例】

【0034】

ヘマグルチニン(HA)はインフルエンザウイルスの表面に見られる抗原性糖タンパク質であり、免疫応答を惹起するためにワクチンの成分として用いられる。Fluzone(登録商標)の2009~2010の製剤は次の3つの各ウイルスの30 μ g/mlのHAを含有する:A/Brisbane/59/2007, IVR-148(H1N1)、A/Uruguay/716/2007, NYMC X-175C(H3N2)(A/Brisbane/10/2007様ウイルス)、およびB/Brisbane/60/2008。2009~2010インフルエンザワクチンFluzone(登録商標)が2名の健常な志願者に投与され、彼らはワクチン接種前の30日間いつもどおりで気分が良かったことを報告した。2008~2009および2009~2010のワクチンは双方とも、本質的に、同一のインフルエンザA H1N1およびH3N2抗原を含有するが、異なるB株の抗原を含有する。本発明者らの方法を試験して、抗原特異的抗体と液性レポトリシーケンシング結果をマッチングする最も高い確率を提供するために、本発明者らはこれまでに2008~2009インフルエンザワクチンを受けた志願者を選択した。

30

【0035】

試料調製

血液試料は4回の特定の時点で採取した:0日目、ワクチン投与前;3日目、これまでに遭遇した抗原に対するメモリーB細胞応答;7日目、活性化およびメモリーB細胞応答;および21日目、新たに遭遇した抗原に反応してのメモリーB細胞の出現。適切に標識された磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて、B細胞を未処置、活性化およびメモリーのサブタイプに選別した。単離された細胞をRNA保護試薬に再懸濁して、血球計を用いてカウントした。RNAeasyキット(Qiagen)を用いて細胞からRNAを抽出して、4回の時点の血清を-80で保存した。血清の免疫性を実証するためにELISAを用いた(データは示さない)。

40

【0036】

抗原特異的IgGの精製およびLC MS/MS

この時点で、試験は2つの平行な経路を辿った:(1)LC質量分析法を用いた抗原特異的IgGの精製、および(2)B細胞レポトリの分析。抗原特異的な精製方法は図1に示す。簡潔に言うと、抗原特異的IgGは3日目および7日目の血清試料から精製された。個体の各血清試料から一般的なIgG集団を精製するために、2本の1mL IgSelectカラム(GeHealthcare)を用いた。組換えヘマグルチニンA/Brisbane/59/2007およびA/Brisbane/10/2007(Si

50

noBiological Inc.) は、MicroLink Protein Couplingキット (Pierce) を用いてマイクロスピナラムに別々に共有結合性に架橋結合された。合計8本のラムが作成された：各時点について2本の抗原特異的ラムを伴う個体当たり4本。従って、各抗原に対する各志願者の特異抗体応答は別々に評価された。(IgSelectラムを用いて) 精製されたIgGを架橋結合ラムに適用して、抗原特異的IgG集団を低pH緩衝液を用いて溶出した。この過程を3回反復して、溶出液をプールして濃縮した。FabフラグメントもFab Micropreparationキット (Pierce) を用いて生成した。Fabフラグメントは、重鎖の定常ドメインの豊富さが可変領域へのペプチドのマッチを不明瞭とする懸念のために作成した。精製された試料は、SDS-PAGE分析を用いて還元性条件下で分析した。各インフルエンザHAに対する特異的な重鎖、軽鎖およびFabフラグメントをゲルから切り取って、ProtTechのタンパク質同定サービスによるLC質量分析ペプチド同定を用いたタンパク質の同定のために送付した。ProtTechのLC-MS/MSペプチドシーケンシングの期間中、切り取ったバンドをトリプシンプロテアーゼで処理して、HPLCへの注入前に50~200倍に濃縮し、その後、ペプチド混合物を分離する。タンデム質量分析計をオンラインでHPLCに連結して、溶出されたペプチドを衝突誘起解離 (CID) と呼ばれる過程によってフラグメント化する。MS/MSスペクトルはフラグメント化された各ペプチドについて取得する (しばしば、各試料から数千のMS/MSスペクトルがある)。 (特異的なペプチド配列に対応する) 各MS/MSスペクトルは、マッチするペプチドについてタンパク質データベースを検索するために用いた。本発明者らの試験では、B細胞レパートリー遺伝子試験シングの結果が同定のためのデータベースとして用いられた (以下参照)。

10

20

【0037】

アームPCR増幅および高処理シーケンシング

B細胞レパートリー分析のために、双方の個体からの試料をバーコード化してプールし、シーケンシングを一回の操作で実施した。Roche 454 Titaniumシーケンサーを用いた高処理シーケンシングは400 bpまでの読み取りが可能である。従って、重鎖および軽鎖の双方においてフレームワーク1領域から順方向に、およびC領域の最初から逆方向に、配列特異的なプライマーをデザインした。その結果、特異的B細胞クローンのクラススイッチをモニターすることができ、それらのメモリー応答を通しての進行をフォローすることができる。アームPCRを実施し、Roche 454 Titaniumシーケンサーでのシーケンシングのために増幅産物をSeq-Wrightに送付した。得られた重鎖および軽鎖V領域の454シーケンシングデータベースを、LC MS/MSスペクトルを用いたペプチドマッチングのためのデータベースとするためにProtTechに送付した。

30

【0038】

ペプチドシーケンシングの結果

複数の独特のV領域がインフルエンザAの双方の株に対する各個体の応答に関してうまくマッチした。図3は、A/Brisbane/59/2007ヘマグルチニンに対する一つの個体の抗原特異的な重鎖および軽鎖の応答の部分試料のアウトプットを示す。例えば、リストにおける最初の一一致するペプチドは重鎖のCDR3領域全体 (赤で強調表示)、第4のフレームワーク領域、およびC領域の最初を網羅する。このペプチドは独特で、データベース全体で一つの配列に対してのみ一致し、正しい個体に対応する。>gi|xxxxxxx|CPO_IGH_GJQGNIM01EKNU Sの完全なV_H配列は示していない。示されているのは、配列と一致させるために用いられたペプチドのみである。さらに、二番目のパネル (B1) は同一の抗原および個体における軽鎖の一一致を示す。2つの特有の軽鎖マッチが同定された。Fabの結果 (同一の個体について；データは示さず) は、応答がポリクローナル性であることから期待されるいくつかの追加的な特有の重鎖ペプチドマッチを含有する。

40

【0039】

ワクチンにおける双方のFlu A株に対する各個体の応答に関して、いくつかの特有のペプチドがうまくマッチしたので、本発明者らはそれらのインフルエンザA抗原に結合する能力を試験するために、これらのV領域をFabフラグメントとしてクローニングして発現させた。これまでに述べた通り、シーケンシング結果を用いた現在の問題点はその軽鎖を対

50

応する重鎖とマッチさせることができないことである。この問題を克服するために、本発明者らは重鎖および軽鎖のプラスミドの異なる組み合わせをマイクロタイプレートで直接、共発現させた。いくつかの理由によりPierceからのヒトインビトロ糖タンパク質発現系を選択したが、任意の組み換え系で十分なはずである。但し、本発明者らは、本明細書に記載されるようなインビトロの系の使用がいくつかの重要な利点を提供すると確信している。第一に、インビトロの系は、(インビボの系のような)一方のプラスミドの他方を上回る形質転換効率に関する懸念を伴うことなく、2つのプラスミドの同時の共発現のための簡便な方法を提供する。例えば、大腸菌のインビトロにおける転写/翻訳系は、Jiangらによって2つの別々のプラスミド：1つは重鎖および1つは軽鎖を用いて6D9に対するFabフラグメントの産生のために利用された (Jiang, X., Ookubo, Y., Fujii, I., Nakano, H., and Yamane, T. (2002). Expression of Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an Escherichia coli in vitro coupled transcription/translation system. FEBS Lett 514, 290-294.)。本発明者らは、96穴様式において細胞フリーの発現系に添加された重鎖および軽鎖プラスミドの組み合わせを評価するために、この概念を修飾した。細胞フリーの系に対する追加的な利点は、組み換えタンパク質が微生物の細胞内で発現する場合に時折生じる封入体の形成がないことである。記載されるケースにおける遺伝子標的は元々ヒトであるので、それらの産生にはヒト発現系が最も適している。さらに、提案される系は糖タンパク質を産生し、この糖タンパク質はV領域糖鎖形成が抗体の10%において生じ、かつ、それらの抗原結合能に影響し得ることから、重要である (Jacquemin, M., Radcliffe, C. M., Lavend'homme, R., Wormald, M.R., Vanderelst, L, Wallays, G., Dewaele, J., Collen, D., Vermylen, J., Dwek, R.A., et al. (2006). Variable region heavy chain glycosylation determines the anticoagulant activity of a factor VIII antibody. J Thromb Haemost 4, 1047-1055.; Spiegelberg, H.L., Abel, C.A., Fishkin, B.G., and Grey, H.M. (1970). Localization of the carbohydrate within the variable region of light and heavy chains of human gamma g myeloma proteins. Biochemistry 9, 4217-4223.; Zhu, D., McCarthy, H., Ottensmeier, C.H., Johnson, P., Hamblin, T.J., and Stevenson, F.K. (2002). Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. Blood 99, 2562-2568.)。最後に、発現系は迅速であり、6時間未満のうちに発現するタンパク質を提供する。転写/翻訳反応は典型的には25 μ Lであり、発現するタンパク質の40 μ g/ml (合計1 μ g)までを産生し、これはELISAの検出限界(0.0001~0.01 μ g/ml)を十分に上回る。3つの異なる軽鎖と連結した3つの異なる重鎖(9の組み合わせ)の最初の発現の試みから、本発明者らは2つの抗原特異的結合ペアを同定することができた。結合が四重の測定においてアッセイできて、かつ、該結合がELISAおよび450nmでの吸光度の測定で決定される通り依然認められるように、反応をスケールアップするためにインビトロの系を用いた。重鎖は操作されたN末端のc-mycタグを有し、軽鎖はELISAでの検出を容易にするためにN末端のFLAGタグを含有する。

【0040】

インビトロまたはインビボにおける抗原刺激比較

インビボにおける刺激の比較は設定されたスケジュールにおける個体の免疫レパトリーの時間的なモニタリングを指す。例えば、時点は、0日目、抗原投与前；3日目、これまでに遭遇した抗原に対するメモリーB細胞応答；7日目、活性化およびメモリーB細胞応答；ならびに21日目、新たに遭遇した抗原に反応してのメモリーB細胞の出現を含み得るが、これらに限定されるものではない。各時点において免疫レパトリーを試料採取することによって、抗原刺激前および刺激後の異なる時点において循環中のB細胞およびT細胞の分子的なスナップショットを取ることができる。未刺激の試料を基準とする特異的クローン集団の拡張は抗原に対する応答を示している可能性があり、これまで記載された質量分析法の際に用いられた同一の組み換え発現戦略を用いて確認することができる。

【0041】

インビトロでの刺激期間中に、T細胞およびB細胞レパトリーの双方の抗原性メモリー

を試験する。この実験において、PBMCを血液試料から単離し、抗原の存在下および不在化の双方において適切な条件下（プロトコルを参照）で培養する。抗原の量は経験的に決定しなければならない。これらのタイプの実験における状況は、開始レパートリー（ 2×10^6 PBMC）の固有の制限のために異なる。しかし、抗原刺激はメモリーB細胞の形質細胞への拡張および分化に至るはずである。RNAレベルでは、抗原特異的クローンの拡張はアームPCRの半定量的性質のために明らかであるはずであり、これまでに記載されたものと同じの組換え発現戦略を用いることによって確認することができる。さらに、分泌される抗体は増殖培地から（血清と同様に）直接単離することができ、これまでに考察した通り、レパートリーデータベースを用いた抗体の同定にはタンデムLC MS/MSを使用することができる。このタイプの実験は、ヒトにおいて投与することが非倫理的である抗原の使用を含めて、PBMCを刺激するために任意の抗原を選んで使用することができるという付加的な恩典を有する。

【0042】

IgGの精製および同定

IgGは、GEHealthcareからのIgSelectカラムを利用してヒト血清から精製した。結合緩衝液（平衡緩衝液）/洗淨緩衝液：1xPBS（リン酸緩衝生理食塩液）pH 7.4、（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mMリン酸ナトリウム二塩基性、2mMリン酸カリウム一塩基性、およびpH 7.4 - パッケージに含まれている）。溶出緩衝液：100mM グリシンpH 3.0または100mMクエン酸ナトリウムpH 3.0。中和緩衝液：1M Tris-HCl pH 9.0。

【0043】

流量はすべて0.5ml/分（0.5ml/分～1.0ml/分）、毎分約15滴（流量が1.0ml/分ならば30滴）であった。カラムは結合緩衝液10ml（10CV）で平衡化し、血清1mlを結合緩衝液3mlで希釈した。（血清は使用前にろ過滅菌した。）希釈した血清（4ml）をカラムに適用して、洗液をCorning試験管に保存した。カラムは洗淨緩衝液10mlで洗淨した。カラムを洗淨している間に中和緩衝液200 μ Lを3本の試験管に分注した。溶出緩衝液（6ml）をカラムに適用して、溶出液を回収するために2ml毎に「中和した」Corning試験管の1本を使用した。結合緩衝液（10ml）、続いて20%エタノールの5CVをカラムに適用し、このカラムを4で保存した。

【0044】

pHが中性に近いことを確認するために、中和した試験管の1本のpHを1回目の操作時にモニターした。SDS-PAGEは、（1）血清、（2）洗液、および（3～5）選んだIgGを含有するはずの3本のCorning試験管の各々、（7）最終カラム洗液、および（8）LMWについて、12%PAGEゲル上で還元性条件下で実施した。さらに、溶出されたIgGを含有する画分を確認するために、各溶出試験管の280nmでのUV吸光度を測定した。加工工程のために必要に応じて、IgGを含む試験管をプールして濃縮した。

【0045】

架橋結合した抗原カラムを用いた特異的IgGの精製

使用した試薬は、カップリング緩衝液（MicroLink（登録商標）キット）500mL：0.1Mリン酸ナトリウム；0.15M NaCl、pH 7.2；超純水500mL；抗原（組み換えA/Brisbane/10/2007またはA/Brisbane/59/2007ヘマグルチニン - SinoBiologicalのいずれか）100 μ g；精製したIgG 1mlであった。使用した器具は、MicroLink Protein Coupling Kit；0.45 μ mフィルター（または0.8 μ m）；Amicon Ultra - 0.5mL濃縮装置； A_{280} 測定のためのUV；12%SDS Pageゲル、およびSDS試薬を含んだ。

【0046】

カップリング緩衝液は、乾燥混合物を500mlの純水に溶解することによって調製した。抗原はカップリング緩衝液の300 μ lに溶解して、 A_{280} 測定およびSDS PAGEの双方のための試料を確保した。抗原をカラムにカップリングさせるための製造業者の取り扱い説明書に従って、カラムは4で洗淨して保存した。精製したIgG試料を200～300 μ lに濃縮した。アフィニティー精製のための一般的な手順はキットの取り扱い説明書に従って実施した。濃縮されたIgGをカラムに直接適用した。スラリー/IgGを4で一晩、インキュベートし

10

20

30

40

50

た。PBS-Tおよび0.5M NaClで3回、ならびにPBS-Tで3回洗浄後に、溶出を2~3回実施した。溶出後、カラムをカップリング緩衝液で3回洗浄して、通過した一般的なIgGを再度適用して、抗原特異的カラムを用いて一晚、インキュベートした。同一の溶出手順に従って、この過程をもう1回反復した。溶出液をプールして、Amicon Ultra-0.5ml濃縮装置を用いて濃縮した。濃縮した抗原特異的試料の少量を、還元性条件下においてケラチン汚染を避けるよう注意しながら、12% SDS PAGEゲルに適用した。重鎖および軽鎖のバンドを切り取り、レポトリシーケンシングデータベースを用いたLC MS/MS分析のためにProttechに送付した。

【0047】

抗原特異的IgG Fabの調製

使用した試薬は、Pierce Fab Micro Preparation Kit ; 12% BioRad Ready Gel ; 0.5ml エピンドルフチューブ、オートクレーブ済み ; SDS試薬であった。

【0048】

濃縮された抗原特異的IgGのもう一方の部分はPierce Fab Micro Preparation Kitに適用して、Fabフラグメント単離のためのキットの取り扱い説明書に従った。基本的に、IgGは、屈曲性のヒンジにて開裂するパイプを固定化したカラムに通した。通過物を固定化したプロテインAに通して保存した。Fc領域はカラム(プロテインA)に結合したままであったが、Fabアーム(ジスルフィド結合した)は通過物中に溶出した。

【0049】

プロテインAカラムの通過物をAmicon Ultra-0.5 ml濃縮装置を用いて濃縮し、還元性条件下にてケラチン汚染を避けるように注意しながらSDS PAGEを実施した。軽鎖および重鎖のフラグメントはゲル上で重複し、いずれも約25kDaに移動する。Fabフラグメントに対応するバンドを切り取り、ProtTechを用いたタンデムLC MS分析に供した。

【0050】

ELISAプロトコール

用いた試薬には、結合緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、50mM pH 9.6 ; 洗浄緩衝液 : PBS-T (0.05% Tween-20含有PBS) ; 遮断緩衝液 : Pierce Starting Block (登録商標) ; 停止酸 : 2N H₂SO₄または3N HCl ; 100 μg凍結乾燥した組換えヘマグルチニン (A/Brisbane/10/2007および / またはA/Brisbane/50/2007ヘマグルチニン) ; ウサギ抗cmcy-HRP抱合抗体 (1 : 1000) ; ウサギ抗FLAG-HRP抱合抗体 (1 : 1000) ; 1ステップUltraTMBが含まれた。

【0051】

プレートは、凍結乾燥した組換えヘマグルチニン (A/Brisbane/59/2007またはA/Brisbane/10/2007のいずれか) を超純水中に200 μg/mlの最終濃度まで再懸濁した後、重炭酸ナトリウム緩衝液pH 9.6において0.5 μg/ml抗原の100 μlをPolysorpプレート (Nunc.) の各ウェルに添加することによって調製した。プレートを4 で一晚インキュベートした。プレートをPBS-Tで6回洗浄し (洗浄当たり300 μl) 、StartingBlock緩衝液 (Pierce) を用いて30分間、遮断した。(プレートは、この時点で4 で1年まで乾燥状態で保存することができる。) 各プレートに抗原特異的な溶液の100 μlを添加して、4 で一晚インキュベートした。

【0052】

抗原特異的Fabフラグメントの検出および測定

非結合Fabを除去するために、プレートをPBS-Tで6回洗浄した (洗浄当たり300 μl) 。PBS-Tにおける抗cmcyおよび抗FLAG 1 : 1000の混合物の100 μlをプレートの各ウェルに添加して、プレートを室温で3時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで6回洗浄することによって非結合抱合物を除去した。1ステップTMBウルトラの100 μLを各ウェルに添加して、30分まで反応させた。1M H₂SO₄の50 μLを添加することによって反応を停止させ、直ちにプレートを450nmで読み取った。

【0053】

ヒトPBMCの抗原特異的なインビトロでの刺激

10

20

30

40

50

目的は、高処理シーケンシングを用いて応答を評価するために、インビトロで抗原特異的ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の増殖および分化を刺激することであった。

【 0 0 5 4 】

使用した試薬は、4mM L-グルタミンを補充したRPMI-1640培地；10% 熱失活FCS / FBS (ウシ胎児血清)；50U/mlペニシリン；50 µg/mlストレプトマイシン；およびリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) であった。使用した抗原は200 µg/ml組換えヘマグルチニンA/Brisbane/59/2007であった。

【 0 0 5 5 】

全血 (8ml) をCPTバキュテナー試験管に吸引した。末梢血単核細胞 (PBMC) 層を単離して、下流ELISAに干渉し得る任意の血清抗原を除去するために洗浄した。血清は後の分析に備えて - 80 °C で保存した。

10

【 0 0 5 6 】

滅菌した補充RPMI培地の少なくとも100mLを調製して、該培地を4~6ml Corning試験管に分取した。0 µg/ml (未刺激試料)、0.02 µg/ml、0.2 µg/ml、および2 µg/mlを含む、インビトロでPBMCを刺激するための一連の抗原濃度を調製するために、抗原を各Corning試験管に添加した。この培地 (3つのウェル当たり2ml) を、3x4細胞培養プレートの各ウェルに分注して、ウェル当たり 2×10^6 個のPBMCを接種した。続いて、プレートを、5% CO₂を伴う加湿した条件下で37 °CにてCO₂インキュベーター内でインキュベートした。細胞は一日おきにTrypan染色により生育および健康についてモニターした。必要に応じて一日おきに新鮮な培地を添加し、ELISA分析のために毎日、培地100 µlを確保した。細胞は、11日目にクエン酸生理食塩液法を用いてゆっくりと撈拌しながら小さなゴムのへらで収穫した。

20

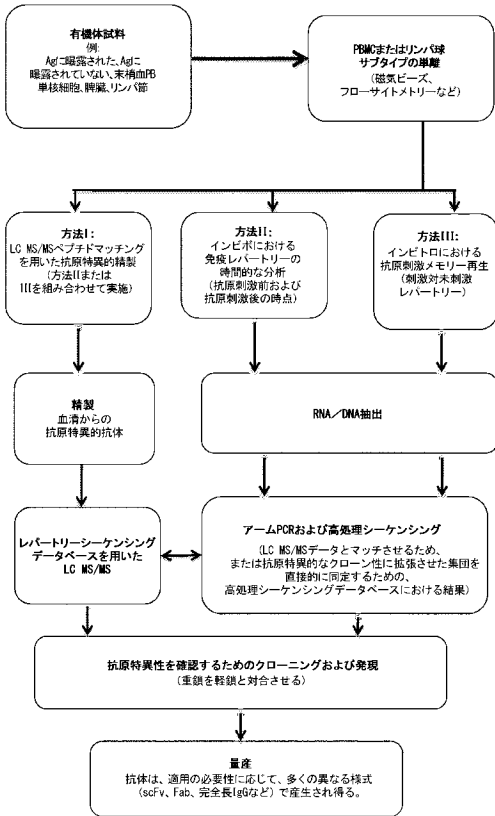
【 0 0 5 7 】

単核細胞の単離

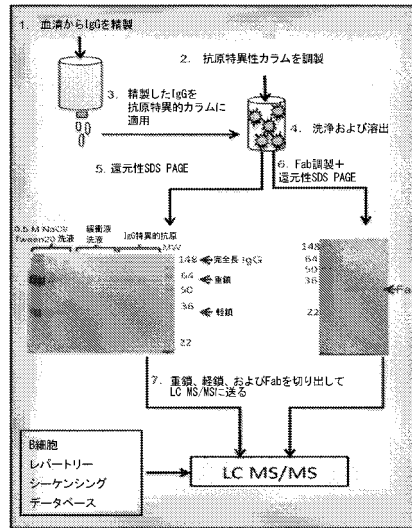
緩衝液Aは、クエン酸ナトリウム6gおよび0.1% FCS (1ml FCS/1L) を含むPBSの1L溶液を作って調製した。血液 (8ml) をCPTバキュテナー試験管に吸引して、該試験管をスイングングケット (swinging bucket) 遠心分離器において室温、1500RCFで15分間、遠心分離した。遠心分離後、試験管を5~10回、静かに上下転倒した。バキュテナーを開けて、血漿分画全体を回収して新しい15ml コニカル試験管に収容した。適切な量の緩衝液Aの添加によって総液量を15mlに増やして、試験管を静かに5回、上下転倒した。試験管を室温、300RCFで15分間、遠心分離した。上清を回収して、緩衝液Aを用いて液量を10mlに調整した。試験管を静かに5回、上下転倒して、この工程を1回、反復した。試験管を室温、300RCFで10分間、遠心分離した。上清を除去して、細胞沈渣を所望の液量に再懸濁した。試験管内容物をピペットを用いて静かに撈拌した。

30

【 図 1 】



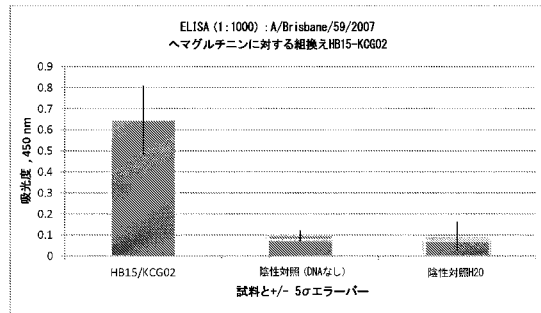
【 図 2 】



【 図 3 】

BYRNE-STELLE_A1_091310_igmp		配列ヘッダー	
スキャン No.	ペプチド配列	スキャン No.	ペプチド配列
344	181RYSRFGGGLTYSSASTK	>gllxxxxxxxxCPH_GH_G0GANNMTERKUS	
342	188772 NLYLQFNEIR	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
334	242427 YRQYKRWGGGLTYSSASTK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
328	163581 DYGGGLTYSSASTK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
276	133181 AEDTAVYCK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
276	133181 AEDTAVYCK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
BYRNE-STELLE_B1_091310_igmp		配列ヘッダー	
スキャン No.	ペプチド配列	スキャン No.	ペプチド配列
369	181833 ANVAVYQKQSDPK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
360	139381 PPSSTGQFDTLK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
334	163178 PSSSSGGLTKLRSK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
2914	121866 SGTSASLAILSK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	
3984	204203 ANFTYLPFSSSEELQAK	>gllxxxxxxxxIENF_TGK_GNPTKQXGTAVID	

【 図 4 】



【配列表】

2016146820000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月19日(2016.2.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、抗原特異的なT細胞を同定するための方法：

- (a) これまでにインビボにおいて抗原で刺激されたことのある対象から血液または組織の試料を取得する工程；
- (b) 血液から末梢血単核細胞を分離し、該末梢血単核細胞をインビトロで培養する工程；
- (c) 該末梢血単核細胞に標的抗原の有効な量をインビトロで添加する工程；
- (d) 該標的抗原添加後、経験的に決定された時期に末梢血単核細胞を収穫する工程；
- (e) 収穫された末梢血単核細胞から、シーケンシングされた免疫レパートリーを産生する工程；
- (f) 収穫されたT細胞からの免疫レパートリーを、標的抗原を添加されたことのない同一対象からの単離されたT細胞から調製されたアームPCRでシーケンシングされた免疫レパートリーと比較する工程；ならびに
- (g) 抗原が添加されなかったT細胞に比べて抗原が添加されたT細胞の数の増加に基づいて、拡張したT細胞を同定する工程。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

同様の方法を、同一の実験からの抗原特異的なB細胞応答を同定するために応用し得る。抗原に应答してクローン性に拡張された集団を同定するために、刺激されたおよび刺激されていない双方の試料からのB細胞レパートリーを比較する。さらに、分泌された任意の抗原特異的な抗体はインビトロの培地から精製され得て、刺激されていないまたは刺激されたレパートリーに対するLC質量分析によるペプチドマッチングを利用することによって同定され得る。抗体およびB細胞に特に適用され得る通り、本発明の様々な局面において、少なくとも一つの標的抗原に特異性を持って結合する重鎖および軽鎖の結合ペアをマッチさせるために重鎖および軽鎖のペアをクローニングして発現させる工程を含む工程が加えられてもよい。

[本発明1001]

以下の工程を含む、所与の抗原性の実体に特異的な抗体を同定するための方法：

- (a) ヒトまたは動物の対象から取得される血液または組織から少なくとも一つの抗体を単離する工程；
- (b) 該少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を取得する工程；
- (c) 抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列を同定するために、該少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を該ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーを含む配列データベースと比較する工程；および
- (d) 少なくとも一つの標的抗原に特異性を持って結合する重鎖および軽鎖を関連付けるために、該抗原特異的なクローン性に拡張された抗体配列をクローニングして発現させる

工程。

[本発明1002]

少なくとも一つの抗体のアミノ酸配列を取得する工程が、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いて実施される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

ヒトまたは動物の対象からの免疫レパートリーが、アンプリコンレスキューマルチプレックスPCRによって決定される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

以下の工程を含む、抗原特異的なT細胞を同定するための方法：

(a) これまでにインビボにおいて抗原で刺激されたことのある対象から血液または組織の試料を取得する工程；

(b) 血液から末梢血単核細胞を分離し、該末梢血単核細胞をインビトロで培養する工程；

(c) 該末梢血単核細胞に標的抗原の有効な量をインビトロで添加する工程；

(d) 該標的抗原添加後、経験的に決定された時期に末梢血単核細胞を収穫する工程；

(e) 収穫された末梢血単核細胞から、シーケンシングされた免疫レパートリーを産生する工程；

(f) 収穫されたT細胞からの免疫レパートリーを、標的抗原を添加されたことのない同一対象からの単離されたT細胞から調製されたアームPCRでシーケンシングされた免疫レパートリーと比較する工程；ならびに

(g) 抗原が添加されなかったT細胞に比べて抗原が添加されたT細胞の数の増加に基づいて、拡張したT細胞を同定する工程。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/62 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	U 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	V 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	X
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 5/0783	
	C 0 7 K 16/06	

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハン ジャン

アメリカ合衆国 アラバマ州 ハンツビル ドニゴール ドライブ 7712

(72)発明者 バーン スティール ミランダ

アメリカ合衆国 アラバマ州 ハンツビル リチャードソン ドライブ ノースウエスト 431

1

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 FA13 GA09 HA01

2G045 AA24 CA25 CB01 DA37 FA34 FB06

4B024 AA01 AA11 BA51 CA02 CA09 DA03 EA04 FA02 GA11

4B063 QA07 QA13 QA18 QQ03 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR32 QR48

QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QX02

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA93X AC14 BA21 BD14 BD50 CA45

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA42 DA76 EA31 EA50 FA71

FA74 GA26

专利名称(译)	使用臂PCR和高处理测序鉴定抗原特异性适应性免疫应答		
公开(公告)号	JP2016146820A	公开(公告)日	2016-08-18
申请号	JP2016009507	申请日	2016-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	CB生物技术公司 韩健		
申请(专利权)人(译)	CB生物技术公司 韩琼		
[标]发明人	ハンジャン バーンスティールミランダ		
发明人	ハンジャン バーン-スティール ミランダ		
IPC分类号	C12Q1/04 G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/483 G01N33/50 G01N27/62 C12P21/08 C12N15/09 C12N5/0783 C07K16/06		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/1018 C07K2317/21 C07K2317/55 C12Q1/6874 G01N33/53 G01N33/56966		
FI分类号	C12Q1/04 G01N33/53.ZNA.N C12Q1/68.A G01N33/483.E G01N33/50.K G01N33/50.U G01N27/62.V G01N27/62.X C12P21/08 C12N15/00.A C12N5/0783 C07K16/06 C12Q1/6874.C C12Q1/6874.Z G01N33/53.NZN.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/FA13 2G041/GA09 2G041/HA01 2G045/AA24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA37 2G045/FA34 2G045/FB06 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA51 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B063/QA07 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AC14 4B065/BA21 4B065/BD14 4B065/BD50 4B065/CA45 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/540454 2011-09-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

从抗体甲至少一个氨基酸序列从人类或动物的血液中分离，对于对应于在人或动物免疫组库的抗体的至少一种DNA序列相关的方法，以及合成单克隆提供配对重链和轻链以产生抗体的手段。分离得自血液或组织中的至少一种抗体是从人或动物受试者获得的，包括：获得至少一种抗体，至少一种抗体的人的氨基酸序列的氨基酸序列的步骤或比较含有从动物受试者的免疫组库，以与特异性结合至少一种靶抗原的重和轻链关联的序列数据库的步骤，延伸到抗原特异性克隆并克隆和表达抗原实体的抗体序列。【选择图】无

B:\PROJETS\ELLE BA_09130_0ppp		B:\PROJETS\ELLE BA_09130_0ppp	
スケジューリング		スケジューリング	
No.	質量	No.	質量
334	242.00	269	180.00
292	1307.72	250	1302.81
334	242.00	334	1611.70
303	1633.81	294	1306.00
276	1331.01	304	242.00
276	1331.01		
B:\PROJETS\ELLE BA_09130_0ppp		B:\PROJETS\ELLE BA_09130_0ppp	
スケジューリング		スケジューリング	
No.	質量	No.	質量
269	180.00	269	180.00
250	1302.81	334	1611.70
334	1611.70	294	1306.00
294	1306.00	304	242.00