

(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2004-123695

(P2004-123695A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18	C07K 16/18	4B024
C07K 16/28	C07K 16/28	4B064
C12P 21/02	C12P 21/02 ZNAC	4H045
GO1N 33/53	GO1N 33/53 D	
// C12N 15/09	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 86 頁)

(21) 出願番号	特願2003-86460 (P2003-86460)	(71) 出願人	502116287
(22) 出願日	平成15年3月26日 (2003.3.26)		アレクシオン ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2000-528865 (P2000-528865) の分割		, インコーポレイテッド
原出願日	平成11年1月22日 (1999.1.22)		アメリカ合衆国 コネチカット 0641
(31) 優先権主張番号	60/072, 253		O, チェシャー, ノッター ドライブ
(32) 優先日	平成10年1月23日 (1998.1.23)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100062409
Windows			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 成長因子模倣物質、成長因子および阻害因子の同定に用いられる方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】細胞表面分子に対するアゴニスト抗体の製造方法、ならびに細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法を提供すること。

【解決手段】細胞表面分子に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、表面分子を有する細胞で動物を免疫化することにより、該表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、該抗体をコードする核酸配列を含む、該複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、該ライブラリーからの該核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、該抗体を表面ディスプレイさせ、標的細胞を用いて該表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、該細胞表面分子に関するアゴニスト抗体である抗体を同定し、そして該アゴニスト抗体を合成する段階を含む方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞表面分子に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、
表面分子を有する細胞で動物を免疫化することにより、該表面分子に対する 1 つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、
該抗体をコードする核酸配列を含む、該複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、
該ライブラリーからの該核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、該抗体を表面ディスプレイさせ、
標的細胞を用いて該表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、該細胞表面分子に関するアゴニスト抗体である抗体を同定し、そして
該アゴニスト抗体を合成する
段階を含む方法。

10

【請求項 2】

細胞で動物を免疫化することにより生産された細胞表面分子に対するアゴニスト抗体。

【請求項 3】

前記細胞が、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P - 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞、および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される、請求項 2 記載の抗体。

20

【請求項 4】

請求項 1 記載の方法により生産された細胞表面分子に対するアゴニスト抗体。

【請求項 5】

細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、
細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する細胞で動物を免疫化することにより、該表面分子に対する 1 つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、
該抗体をコードする核酸配列を含む、該複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、
該ライブラリーからの該核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、該抗体が表面ディスプレイされ
標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、そして
該阻害性抗体を合成する
段階を含む方法。

30

【請求項 6】

細胞で動物を免疫化することにより製造された、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体に対する阻害性抗体。

40

【請求項 7】

前記細胞が、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P - 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される、請求項 6 記載の阻害性抗体。

【請求項 8】

50

請求項5記載の方法により製造される、細胞の増殖、分化または活性化に関する受容体に対する阻害性抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

(発明の分野)

本発明は、成長因子、阻害因子およびそれらの受容体の分野に関するものである。

【0002】

【従来技術】

(発明の背景)

以下、関連性のある技術について検討しているが、いずれも後記請求の範囲に先行する技術であるとは認められていない。

【0003】

慣用的手段、すなわちタンパク質精製および発現スクリーニングでは、同定される成長因子およびサイトカインの数は限られている。

【0004】

造血において、例えば、サイトカイン類は、全ての成熟した高度分化血液細胞の発達に必要とされる。血液細胞はすべて、自己再生が行われ得るかまたは始原細胞を生じさせ得る多能性幹細胞の共通プールに由来すると考えられている。サイトカイン類は、幹および始原細胞の連続した同調的分化および増殖を含む複雑なプロセスを制御する。多くのサイトカインは、骨髄支質細胞により局所産生される。他は体の他の領域で生成される。中には広い特異性を有するサイトカインもあり、多能性幹細胞に作用して、それらを分化、自己再生および増殖に誘導する。他は、造血後期で特定細胞系に作用する。多くのサイトカインはまた、成熟細胞の活性に影響を及ぼし、外因抗原に対する免疫応答において一定の役割を演じる。既知サイトカインの多くおよび造血におけるそれらの主要役割については、表1に記載されている(メトカーフ, D. およびニコラ, N. A. 1995. The Hemopoietic colony-Stimulating Factors 中。ケンプリッジ・ユニバーシティー・プレス、ニューヨーク、カラード, R. E. およびギアリング, A. J. H. 1994. The Cytokine Facts Book 中。アカデミック・プレス・インコーポレイテッド、サンディエゴ、カリフォルニア、ハン布林, A. S. 1993. Cytokines and Cytokine Receptors 中。オックスフォード・ユニバーシティー・プレス・インコーポレイテッド、ニューヨーク)。

【0005】

【表1】

10

20

30

I L - 3	広い特異性、多能性幹細胞に作用して分化、自己再生および増殖を行わせる。骨髓様始原細胞は、初期赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、マクロファージおよび巨核球に発達する。	
GM - C S F	広い特異性、多能性幹細胞に作用して分化、自己再生および増殖を行わせる。好中球、マクロファージおよび好酸球を生じさせる。	
G - C S F	造血後期に作用して、主に好中球およびそれらの前駆体の発達を促進する。	10
M - C S F	造血後期に作用して、マクロファージ発生を促す。	
エリトロポイエチン	調節に関与。赤血球および巨核球を刺激して、I L - 3またはGM - C S Fの存在下で発生させる。	
I L - 1	幹細胞をプライミングして、C S Fに対し応答性にする。他の細胞を誘導してGM - C S Fを生産させる。	20
I L - 2	T細胞分割およびMKおよびB細胞の活性化を促進する。	
I L - 4	マスト細胞生産を促進する。	
I L - 5	好酸球分化を促進する。	
I L - 6	B細胞分化を誘導する。	
I L - 7	骨髓および胸腺支質細胞により生産される。前B細胞および初期胸腺細胞の増殖および分化において重要である。	
I L - 8	好中球を活性化する。	30

(表1の続き)

IL-9	T細胞増殖を刺激する。赤血球に関する分化因子。	
IL-10	サイトカイン生産を抑制する。	
IL-11	巨核球に関する分化因子。	
SCF(キット-リガンド)	他の成長因子と共力することにより初期造血始原細胞からのコロニー形成を促進する。マスト細胞増殖を促進する。造血幹細胞および他の細胞型の生残を促進する。細胞接着および移動における役割を演じる。	10
TNF- α 、 β	BおよびT細胞増殖を高め、顆粒球およびマクロファージを活性化し、サイトカイン分泌を誘導する。	
ガンマーインターフェロン	B細胞増殖および分化を高め、マクロファージを活性化し、他のサイトカインの分泌を増加させる。	
ILF	造血幹細胞の生残を助ける。	20
TPO	血小板生産を刺激する。	
Flk2/flt3リガンド	初期造血細胞前駆体の増殖を刺激する。	

天然成長因子およびサイトカイン以外にも、アゴニスト抗体が発見された。アゴニスト抗体は、受容体の天然リガンドによく似た抗体である。アゴニスト抗体は、慣用的モノクローナル抗体技術を用いることにより、造血および関連のある成長および分化経路において同定された。アゴニスト抗体は、肝癌貫膜キナーゼ(Htk)、CD34⁺ヒト骨髄細胞におけるチロシンキナーゼおよびヒト肝細胞癌腫セルラインに対して同定された(ベネットら、B. D.、ワング、Z.、クァング、W. J.、ワング、A.、グループマン、J. E.、ゴエデル、D. V.、スカッデン、D. T.、J. Biol. Chem. 269: 14211-14218、1994)。アゴニスト抗体はまた、flt3/flk2に対しても産生された(ベネットら、アメリカ合衆国特許第5635388号)。

【0006】

エリトロポイエチンによく似た抗体は、エリトロポイエチン受容体に対して生成されたモノクローナル抗体のスクリーニングを通じて同定された。この抗体は、2量体形成を介して受容体応答を促進する(シュナイダーら、Blood 89: 473、1997)。リガンドによく似た他の抗体もまた同定された(カハンら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75: 4209、1978)。

【0007】

病状によっては、受容体に結合する抗体が天然リガンドの作用を模倣し得る場合もある。甲状腺機能亢進症(グレーブス病)の場合、TSH受容体に結合し、これらの受容体を活性化する抗体の異常産生が起きる(コスギ、S.、バン、T.、コーン、L. D.、Mol. Endocrinol. 7: 114-130、1993、ルンドゲート、M. E.、ヴァサート、G.、Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 9: 95-113、1995)。

【0008】

増殖または分化を促進する抗体とは対照的に、細胞表面受容体に結合し、リガンド結合を効果的に妨害する阻害性抗体が同定された。これらの抗体は、同じ結合部位に関して天然

分子と競合するか、または極めて接近した部位に結合することによって天然結合部位を遮断することにより作用する。c-fms受容体に対する抗体(ストウ, T., ニシカワ, S., オガワ, M., カタオカ, H., オオノ, N., イザワ, A., ハヤシ, S., ニシカワ, S., Oncogene 11: 2469-2476, 1995)およびc-kit受容体に対する抗体(コダマ, H., ノセ, M., ニイダ, S., ニシカワ, S., ニシカワ, S., Exp. Hematol. 22: 979-984, 1994)を含め、これらのタイプの阻害性抗体について文献に多くの例が記載されている。

【0009】

別法として、阻害性抗体の中には、天然阻害性分子を模倣することにより作用し得るものもある。造血に対する抑制効果をもつサイトカイン類が同定された(ケセンベリー, P. J., 1995. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. Williams Hematology 中、第5版、ピュトラー, E., リヒトマン, M. A., コラー, B. S., キップス, T. J. 編、マクグロウ・ヒル・ユナイテッド・ステーツ)。これらの阻害性分子は、S相中に細胞分裂を抑制するか、表面サイトカイン受容体発現を調節するか、または細胞からのサイトカインの放出を抑制することにより作用する。トランスフォーミング増殖因子-B(TGF-B)は、初期幹細胞を抑制し、さらなる成熟細胞を刺激する。阻害作用をもつ他のサイトカインには、H-サブユニットフェリチン、プロスタグランジンE1およびE2、インヒピンおよびラクトフェリンがある(ケセンベリー1995)。ケモカインファミリーにおける造血阻害因子には、マクロファージ-炎症タンパク-1a、マクロファージ-炎症タンパク-2a、血小板因子-4、インターロイキン-8、インターフェロン誘導性タンパク-10および数種の小ペプチドがある(ケセンベリー、1995)。阻害因子の作用は、受容体の2量体化、または結合が引き金となる受容体の配座変化を必要とし得る。阻害性抗体は、2量体化または受容体配座の変化を促進することによって同様に阻害性リガンドを模倣し得る。

10

20

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、細胞表面分子に対するアゴニスト抗体の製造方法、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法、ならびに細胞の増殖、分化、生存または活性化に参与する受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体の同定方法を提供することを目的とする。

30

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化、生存または活性化に参与する受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体の同定方法であって、上記受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、上記抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体が表面ディスプレイされ、そして標的細胞を用いて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体を同定する段階を含む。

40

【0012】

本発明の方法は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体が表面ディスプレイされ、そして標的細胞を用いて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を同定する段階を含む。

【0013】

50

1つの実施形態では、上記抗体は、s c F vフラグメントであり得る。

【0014】

1つの実施形態では、上記抗体は、F a bフラグメントであり得る。

【0015】

1つの実施形態では、上記表面ディスプレイベクターは、ファージミドベクターであり得る。

【0016】

本発明の方法は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体のs c F vフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、s c F vフラグメントがファージミド表面にディスプレイされ、標的細胞の細胞表面分子への結合についてファージミドにディスプレイされたs c F vフラグメントをふるい分けし、そして機能検定において細胞表面分子と結合するs c F vフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む。

10

【0017】

本発明の方法は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体のF a bフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、F a bフラグメントを表面ディスプレイさせ、標的細胞の細胞表面分子への結合について表面ディスプレイされたF a bフラグメントをふるい分けし、細胞表面分子と結合するF a bフラグメントを2量体化し、そして機能検定において、2量体化F a bフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む。

20

【0018】

1つの実施形態では、上記表面ディスプレイベクターは、ファージミドベクターであり得る。

30

【0019】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミA G M領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(E S)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に参与する細胞、R B C溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓C D 3 4⁺細胞、F D C P - 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T Aネズミ造血幹セルライン、P 1 9奇形癌細胞およびN T e r a - 2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

40

【0020】

本発明の製造方法は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体を表面ディスプレイさせ、標的細胞を用いて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体である抗体を同定し、そしてアゴニスト抗体を合成する段階を含む。

【0021】

50

1つの実施形態では、上記ライブラリーは、組み合わせライブラリーであり得る。

【0022】

本発明の方法は、アゴニスト抗体に関するスクリーニング方法であって、抗体が指向される受容体を発現する標的細胞の存在下で抗体フラグメントを発現する細胞を成長させ、そして抗体フラグメントをスクリーニングすることにより、アゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む。

【0023】

本発明のアゴニスト抗体は、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより生産された成長因子受容体に対するアゴニスト抗体である。

【0024】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に参与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞、およびNTera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

【0025】

本発明のアゴニスト抗体は、上記の方法により生産された成長因子受容体に対するアゴニスト抗体である。

【0026】

本発明の組み合わせライブラリーは、幹/始原細胞で動物を免疫化することによって生産された免疫細胞から作成される。

【0027】

本発明の組み合わせライブラリーは、幹/始原細胞で免疫化された動物の免疫細胞からの核酸配列を含む抗体分子またはそのフラグメントをコードする。

【0028】

本発明の組み合わせライブラリーは、幹/始原細胞の表面分子に指向される。

【0029】

本発明の組み合わせライブラリーは、細胞の増殖、分化、生存または活性化に参与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体またはその抗体フラグメントを発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む複数の免疫細胞からライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより抗体を表面ディスプレイさせることにより作成される。

【0030】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に参与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびNTera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

【0031】

1つの実施形態では、上記抗体は、scFvフラグメントであり得る。

【0032】

1つの実施形態では、上記抗体は、Fabフラグメントであり得る。

【0033】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、上記組み合わせライブラリーによりコードされる抗体またはそのフラグメントは、ファージミドにおいて表面ディスプレイされ得る。

【0034】

本発明の製造方法は、細胞の増殖、分化、生存または活性化に関する受容体に対する抗体またはそのフラグメントをコードする組み合わせ抗体ライブラリーの製造方法であって、受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体または抗体フラグメントを発現する複数の免疫細胞を生産し、複数の免疫細胞から、抗体フラグメントの可変および定常領域をコードする核酸配列を得、抗体フラグメントの可変領域をコードする核酸配列をランダムに組み合わせることにより、抗体フラグメントをコードする核酸配列の組み合わせライブラリーを製造し、ライブラリーの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体フラグメントが表面ディスプレイされる段階を含む。

10

【0035】

1つの実施形態では、上記方法において、さらに、抗体フラグメントをコードする核酸配列を得る前に、幹/始原細胞への結合について免疫化動物から得られた血清をスクリーニングする段階を含み得る。

【0036】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に関する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびNTera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

20

【0037】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に関する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体を表面ディスプレイさせ、そして標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む。

30

【0038】

1つの実施形態では、上記抗体は、scFvフラグメントであり得る。

【0039】

1つの実施形態では、上記抗体は、Fabフラグメントであり得る。

【0040】

1つの実施形態では、上記表面ディスプレイベクターは、ファージミドベクターであり得る。

40

【0041】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に関する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントは表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、そして機能検定において、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻

50

害するものについて細胞表面分子に結合する s c F v フラグメントをスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む。

【0042】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体の F a b フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、F a b フラグメントを表面ディスプレイさせ、標的細胞の細胞表面分子への結合について表面ディスプレイされた F a b フラグメントをふるい分けし、細胞表面分子と結合する F a b フラグメントを2量体化し、そして機能検定において、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて単量体および2量体化 F a b フラグメントの両方をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む。

10

【0043】

1つの実施形態では、上記表面ディスプレイベクターは、ファージミドベクターであり得る。

【0044】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P - 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

20

【0045】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体が表面ディスプレイされ、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、そして阻害性抗体を合成する段階を含む。

30

【0046】

1つの実施形態では、上記ライブラリーは、組み合わせライブラリーであり得る。

【0047】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体についてスクリーニングする方法であって、抗体が指向されている受容体を発現する標的細胞の存在下で抗体フラグメントを発現する細胞を成長させ、そして標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて抗体フラグメントをスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む。

40

【0048】

本発明の阻害性抗体は、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造された、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体に対する阻害性抗体である。

【0049】

1つの実施形態では、上記幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌

50

細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹（ES）セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に関する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびN.T.e.r.a.-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され得る。

【0050】

本発明の阻害性抗体は、上記の方法により製造される、細胞の増殖、分化または活性化に関する受容体に対する阻害性抗体である。

【0051】

本発明の方法は、細胞の増殖、分化、活性化または生存に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化、活性化または生存に関する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞が生産され、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより抗体が表面ディスプレイされ、そして標的細胞の増殖、分化、活性化または生存を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法。

【0052】

【発明の実施の形態】

（発明の要旨）

本発明は、分化経路、発達経路、細胞生存および細胞の機能活性化または阻害に関する新規の成長因子模倣物質、成長因子受容体、天然成長因子、成長因子受容体拮抗物質（アンタゴニスト）および阻害因子を同定するために免疫系方法を利用する。上記経路には、造血、神経系発達および再生および器官/組織発達および再生があるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、本発明は、顆粒球、単核球、マクロファージ、好酸球、巨核球、マスト細胞、赤血球、T-リンパ球、B-リンパ球および樹状細胞を含む各造血系統内における様々な段階での多能性幹細胞、多能性始原細胞および単能性細胞を含む造血細胞の増殖および分化に影響を及ぼす成長因子、模倣物質および阻害因子の同定に関するものである。

【0053】

本発明の広範囲スクリーニングおよび同定方法により、細胞表面分子に結合する分子の多大なレパートリーを通じた選択およびスクリーニングが可能となり、増殖、分化、発達、細胞生存、機能活性化または機能抑制作用を有するものが見出される。好ましい態様において、本方法では、組み合わせライブラリーおよびファージミドを使用することにより、様々な細胞系統の増殖、分化、生存または活性化においてアゴニストまたは阻害因子として行動する第1世代模倣分子（アゴニスト抗体）または阻害性分子（阻害性抗体）（例、天然阻害因子またはアンタゴニスト抗体によく似た抗体）が同定される。第1世代アゴニストおよび阻害因子は、治療剤として（例、アゴニストの場合：臨床的に関連性のある細胞型の増幅、遺伝子治療を目的としてエクスピボで増殖および分化させる、例、阻害因子の場合：癌細胞が分裂し続け、化学療法剤に対する感受性を強めるためにのみ正常細胞の増殖を抑制、または病気または障害に関する細胞、例えばアレルギー反応に関する細胞集団の増殖または分化を抑制）、診断試薬として、および基礎および臨床研究（例、細胞、例えば造血細胞の細胞選別用および細胞、例えば造血細胞の同定用抗体）において直接使用され得る。第1世代アゴニストおよび阻害因子はまた、受容体、および究極的にはそれらが模倣する天然因子のクローン化に使用され得る。これらの研究から得られる天然因子は、多くの病状で臨床的に使用され得る。例えば、新規造血増殖因子および模倣物質から恩恵を被る者には、化学療法、骨髄移植および骨髄増殖性疾患を含む、病気または処置に関連した免疫抑制に苦しむHIV感染患者を含めあらゆる患者が含まれるが、これらに限定はされないものとし、この種類の治療剤の医療設備は増大されることになる。

【0054】

10

20

30

40

50

本発明の一態様では、ヒトまたはネズミ幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、これらの細胞表面に表出されたエピトープに対して産生した抗体の免疫レパートリーライブラリーを生成する。一次細胞の混合物が使用されるため、免疫原は、様々な細胞型に関する発達、分化、生存、活性化および不活化の多様な相異なる段階に關与する細胞表面受容体の一部を示す何千の潜在的エピトープを発現することになる。興味の対象であるエピトープは、増殖、分化、発達、生存または活性化の増強または阻害に導くシグナル伝達カスケードに連係する細胞表面受容体である。例えば、造血起源の細胞に作用する抗体を産生させるためには、骨髓細胞は注入される細胞の一選択肢となる。

【0055】

新規成長因子、阻害因子および関連分子の本発見方法は、造血に加えて他の分化/発達経路にも適用され得る。例えば、動物(ウサギ、ニワトリまたは他の動物)は、ネズミまたはヒト胎生期癌細胞、例えばネズミP19細胞(マクバーニー, M. W., ロジャーズ, B. J., *Developmental Biology* 89: 503-508, 1982)またはヒトNTera-2cl.D1細胞(アンドリュース, P. W., ダムジャンフ, I., サイモン, D., バンディング, G. S., カーリン, C., ドラコポリ, N. C., フォフ, J., *Laboratory Investigation* 50: 147-162, 1984)により免疫化され得る。これらの細胞は多能性であるが、通常の培養条件下において十分には分化しない。それらは、神経および膠細胞(一般的には誘発剤、例えばレチノイン酸の存在下)または心筋および骨格筋(例えば、DMSOの存在下)に分化誘導され得る。これらの細胞で免疫化することにより、これらおよび他の経路への分化に關与するアゴニスト抗体、阻害性抗体および成長因子の同定が可能となる。

【0056】

別法として、動物は、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞により免疫化され得る。この場合、内胚葉由来の組織および器官、例えば肺、肝臓、膵臓、胃、食道、咽頭、腸または唾液腺の発達を促進または抑制するアゴニスト抗体または阻害性抗体が同定され得る。

【0057】

また、ネズミ多能性胚性幹細胞による免疫化も可能である。胚性幹細胞(ES細胞)は、全能であり、インビトロ増殖し得る初期哺乳類細胞から誘導される。それらは全胚性3胚葉およびそれらの誘導体に分化する(エヴァンズ, M., カウフマン, M., *Nature* 292: 154, 1981, マーチン, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634, 1981)。さらに、ヒトESセルラインは、免疫原として使用され得る(トムソン, J. A., イツコヴィッツ-エルドール, J., シャピロ, S. S., ワクニッツ, M. A., スウィエルギエル, J. J., マーシャル, V. S., ジョーンズ, J. M., *Science* 282: 1145-1147, 1998, ボングソ, A., C. Y. フォング, S. C. NgおよびS. ラトナム, *Hum. Reprod.* 9: 2110, 1994)。この場合、様々な胚構造への分化を促進または抑制するアゴニスト抗体または阻害性抗体が同定され得る。

【0058】

免疫化後、組み合わせ抗体フラグメントライブラリーを免疫化動物から構築する。本発明はまた、免疫化に使用される様々な細胞の表面成分へ指向したこれらの組み合わせライブラリーについても包含する。これらのライブラリーからは、天然ライブラリーまたは合成ライブラリーの場合と比べて興味の対象である抗原に対する特異抗体が高頻度で得られる。また、1-3回のブースター免疫化が行われた動物から生成されたライブラリーによって、親和力の成熟故に、親和力が高い抗体フラグメントが得られる。

【0059】

別法として、好ましさでは劣る態様において、既成抗体ライブラリー、例えば合成抗体ファージディスプレイライブラリーがスクリーニングされ得る。しかしながら、これらは標的とされるライブラリーではないため、興味の対象であるアゴニスト抗体または阻害性抗体は存在し得ない。若干の合成抗体ファージディスプレイライブラリーは、広い類別の結合特異性を含む。ライブラリーは、ランダムオリゴヌクレオチド合成を用いて作成された

(バルバス, C. F. III、パイン, J. D.、ホエクストラ, D. M.、ラーナー, R. A.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4457-4461、1992、ソデルリンド, E.、ヴェルゲレス, M.、ボレベック, C. A.、Gene 160: 269-272、1995)。さらに、ヒト1本鎖Fv (scFv) 抗体フラグメントの大型ファージディスプレイライブラリーは、生殖系列VH遺伝子を合成重鎖CDR3領域および様々な軽鎖配列と合わせるにより構築された(ド・クルイフ, J.、ボエル, E.、ログテンバーグ, T.、J. Mol. Biol. 248: 97-105、1995、アカマツ, Y.、コール, M. S.、ツソ, J. Y.、ツルシタ, N.、J. Immunol. 151: 4651-4659、1993)。他の合成ライブラリーについても報告されている(フーシュ, P.、デュベル, S.、ブレイトリング, F.、ブラウナゲル, M.、クレウイングハウス, I.、リトル, M.、Cell Biophys. 21: 81-91、1992、フーゲンブーム, H. R. およびウィンター, G.、J. Mol. Biol. 227: 381-388、1992)。

10

【0060】

本発明において、免疫化動物からの発現ライブラリーは、好ましくはFabフラグメントライブラリーまたは1本鎖可変領域ライブラリー(scFv)として構築される。Fabフラグメントライブラリーは、天然抗原認識部位を維持しており、親和力の維持を確保するのに有用である。全結合性ドメインが一ポリペプチドに含まれるため1本鎖ライブラリーが有用である。

【0061】

抗体または抗体フラグメントは、様々な方法でのスクリーニング目的のため標的細胞に供与され得る。まず、それらは、バクテリオファージ、ファージミド、原核生物細胞、例えばエシェリキア・コリ(E. coli)、真核生物細胞、例えば哺乳類細胞または酵母で表面ディスプレイ(露呈)されるかまたはリボソームでディスプレイされ得る。表面ディスプレイされた抗体は、表面ディスプレイ抗体を担う独立体(バクテリオファージ、ファージミド、細菌細胞または哺乳類細胞)を標的細胞と接触させることにより、標的細胞への結合を行わせ、非結合独立体を除去し、結合したままの独立体があればそれらを増幅することによりスクリーニングされ、バイオアッセイでさらに試験される。別法として、共培養はスクリーニング目的に使用され得る。抗体産生細胞、バクテリオファージまたはファージミドを生産する細菌細胞、抗体産生細菌細胞、抗体産生真核生物細胞を、標的細胞の存在下で増殖させる(共培養)。抗体は、細胞、バクテリオファージまたはファージミドの表面に供与されるか、培地中に分泌される。第3に、標的細胞への提供手段は、分泌された抗体を利用することによるものである。

20

30

【0062】

抗体ディスプレイは、バクテリオファージ(フーズ, W. D.、サストリー, L.、アイヴァーソン, S. A.、カング, A. S.、アルディング-ミーズ, M.、バートン, D. R.、ベンコヴィック, S. J. およびラーナー, R. A.、Science, 246: 1275-1281、1989、マカファーティ, J.、フリフィスス, A. D.、ウィンター, G.、チスウェル, D. J.、Nature 348: 552-554、1990、チャング, C. N.、ランドルフィ, N. F. およびクイーン, C.、J. Immunol. 147: 3610-3614、1991)、ファージミド(バルバスIII, C. F.、カング, C. F.、ラーナー, R. A. およびベンコヴィック, S. J.、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 7978-7982、1991)の表面および原核生物細胞、例えばエシェリキア・コリ(E. coli)(フーシュ, P.、ブレイドリング, F.、ベルシェアウス, T.、リトル, M.、Biotechnol. 9: 1369-1372、1991、フランシスコ, J. A.、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 10444-10448、1993、チェン, G.、クラウド, J.、ゲオルギオウ, G.、アイヴァーソン, B. L.、Biotechnol. Prog. 12: 572-574、1996)の表面で行われた。抗体は、真核生物細胞において細胞内発現され、分泌された。抗体はまた、真核生物細胞(酵母)

40

50

の表面でも発現された。哺乳類CHO細胞およびCOS細胞は、抗体分泌によく利用されている(トリル, J. J.、シャツマン, A. R.、ガングリー, S.、Curr. Opin. Biotechnol. 6: 553-560、1995、フォウザー, L. A.、スヴァンベルグ, S. L.、リン, B. Y.、ベネディクト, M.、ケレハー, K.、クミング, D. A.、リーデル, G. E.、Biotechnology (NY) 10: 1121-1127、1992)。GPIアンカーは、様々なタンパク質を細胞表面に固定するのによく利用される。真核生物細胞において、抗体フラグメントは、GPIアンカーを用いて原形質膜の表面にディスプレイされ得る。GPIアンカーに連係された融合タンパク質は、細胞表面での異種タンパク質発現に広く使用されている(スカロン, B. J.、カド-フォング, H.、ネットレトン, M. Y.、コチャン, J. P.、Biotechnology 10: 550-556、1992)。酵母では、抗体発現は細胞内(カールソン, J. R. およびヴァイスマン, I. L.、Mol. Cell. Biol.、8: 2647-2650、1988、ポウディッシュ, K. S.、タング, Y.、ヒックス, J. B. およびヒルヴァート, D.、J. Biol. Chem. 266: 11901-11908、1991) および表面(ボダー, E. T. およびウィットラップ, K. D.、Nat. Biotechnol. 15: 553-557、1997)で行われている。様々な安定したベクターおよび有効なプロモーターおよび分泌シグナルは、興味の対象であるタンパク質の分泌を遺伝子工学的に操作する場合に酵母において利用可能である。これらは、モア、D. T.、ダヴィドウ、L. S.、Methods Enzymol 194: 491-507 (1991)で概説されている。酵母表面における異種タンパク質の細胞表面発現については、最近になって概説された(ゲオルギオウ, G.、スタソポウロス, C.、ダウファァーティ, P. S.、ナヤック, A. R.、アイヴァーソン, B. L.、カーティス, R. I I I、Nat. Biotechnol. 15: 29-34、1997)。先導配列から下流のクローニングフラグメント、メイティング・ファクターアルファは、異種タンパク質の分泌に有効に使用されている(スワート, A. C.、スワート, P.、ロウクス, S. P.、ファン・デル・メルヴェ, K. J.、プレトリウス, I. S.、ステイン, A. J.、Endocr. Res. 21: 289-295、1995)。さらに、多数の異種タンパク質が、メタノールオキシダーゼプロモーターを用いることによりメチロトロピック(methylotropic)酵母ピチア・バストリス(Pichia pastoris)においてリットル当たりグラムよりも大きいレベルで生産されている(スリークリシュナ, K.、ブランカンブ, R. G.、クロップ, K. E.、ブランケンシップ, D. T.、ツァイ, J. T.、スミス, P. L.、ヴィエルシュケ, J. D.、スブラマニウム, A.、ビルケンバーガー, L. A.、Gene 190: 55-62、1997)。当業界における平均的技術者であれば、これらおよび他の公知技術に基いて抗体分子およびフラグメントの表面ディスプレイおよび分泌を容易に達成することができる。

【0063】

当技術分野の実践者であれば、表面ディスプレイまたは分泌されていない標的細胞に抗体または抗体フラグメントを提供する他の手段も可能であり、本発明での使用に適していることを認めるはずである。これらの方法には、原核生物リボソームディスプレイ(ヘインズ, J. およびブラックサン, A.、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、94: 4937-4942、1997) および真核生物リボソームディスプレイ(トランスローカス・セラピューティックス、ケンブリッジ、イギリス国)があるが、これらに限定されるわけではない。

【0064】

好ましくは、ライブラリーは、迅速なスクリーニングを可能にするファージミドベクターにおいて構築される。ファージミドは、ヘルパーファージによる重感染を必要とする。重感染により、プラスミドをファージミド粒子にパッケージするのに要求される残りのファージ成分が提供される。各ファージミドは、1個のファージミド粒子につき、コートタンパク質融合体として表面にディスプレイされた、ほぼ1つまたはそれ以上の抗体結合部位

を含む。残りのコートタンパク質については、ヘルパーファージが寄与するため野生型であり、増幅を目的とするエシェリキア・コリ (*E. coli*) へのファージミドの有効な再感染が可能となる。遺伝子 III コートタンパク質の機能的ドメインは、抗体フラグメントのディスプレイ用の融合相手として好ましい。しかしながら、ファージ表面ディスプレイを可能にする、ファージの完全長または機能的ドメインコートタンパク質、例えば遺伝子 VII I を利用することも可能である (カング, A. S., バルバス III I, C. F., ジャンダ, K. D., ベンコヴィック, S. J. およびラーナー, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 4363-4366, 1991)。

【0065】

表面ディスプレイ抗体分子またはフラグメントの初回スクリーニングは、好ましくはふるい分けにより行われる (デクルイフ, J., タースタッペン, L., ポエル, E., ログテンバーグ, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3938-3942, 1995)。モノマー性抗原結合部位のふるい分けには、親和力および特異性に基いてクローンを選別するという利点があるため、高親和力結合剤を分離すべく集団をスキュー (歪曲) させる。典型的には、数ラウンドの選択および増幅を行うことにより、結合分子が濃縮される。ふるい分けは、抗体が指向する細胞表面受容体または密接に関連した受容体を発現する標的細胞を用いて行われる。別法として、細胞は、蛍光活性化細胞選択装置 (FACS) 選別法または磁気選別法により分離され得る。細胞の特異集団に接着するファージは、細菌細胞の溶離および感染により増殖され得る。

【0066】

初回スクリーニングの別法では、抗体が指向される細胞表面受容体または密接に関連した受容体を発現する標的細胞とファージで表面ディスプレイされた抗体分子またはフラグメントとの結合を検出するが、この結果、結合したファージは受容体のエンドサイトーシスによりインターナリゼーションされる。これらのファージは、例えば表面結合ファージを溶離し、細胞を溶解した後、電気泳動にかけ、インターナリゼーションされたファージ DNA を回収することにより同定され得る。

【0067】

特異結合抗体の別の可能な同定方法では、放射性標識細胞ライゼートまたは膜製品を使用し、これらを 1 または 2 次元ゲルでの電気泳動にかけ、固定化固体支持膜に移動させる。ファージをハイブリダイズし、興味の対象である特異スポットから溶離する。スポットは、興味の対象である細胞表面分子を有する標的細胞および当然それらを有しない非関連細胞が呈する膜タンパク質のパターン比較に基いて選択され得る。

【0068】

次いで、標的細胞に特異結合する表面ディスプレイ抗体 (標的細胞の表面に残っているものまたはインターナリゼーションされたもの) を、様々なバイオアッセイまたは受容体検定法を用いることにより、増殖、分化、細胞生存または活性化の促進または抑制能力について様々な標的細胞およびセルラインに対しスクリーニングする。2 量体化は、造血系受容体を含む多くの受容体の活性化に関する先行必要条件であることが多い (The Hematopoietic Colony-Stimulating Factors, D. M. メトカーフ, N. A. ニコラ (1995) ケンブリッジ・ユニバーシティー・プレス、ニューヨーク)。すなわち、ふるい分けに続いて、標的細胞における結合性細胞表面分子として確認された抗体フラグメントを、2 量体としてバイオアッセイまたは受容体検定法で試験する。拮抗物質として作用する阻害性抗体は、特にそれらがアゴニストの結合から受容体を遮断するだけの場合、必ずしも 2 量体である必要がないこともあり得るが、阻害性抗体が天然阻害性分子を模倣する場合、機能的であるためには 2 量体であることが要求され得る。

【0069】

本発明は、成長関連分子の他の同定方法を凌ぐ幾つかの利点を提供する。成長因子を分離する先行方法では、分離的生化的特徴による条件培地からの活性因子の精製を利用した。これらの方法は、かなりの量で因子が存在することを必要とした。他の方法は、バイオ

10

20

30

40

50

アッセイと同様セルラインを用い、cDNAプールの直接発現スクリーニングを使用する。この場合、発現スクリーンにおけるポリペプチド鎖の適切な折り畳みの場合と同様、転写レベルは、有効な因子同定における一要因である。また、調節因子の多くが共同で作用するとき最も効果的に機能するように設計されたことはますます明白になっており、単に増殖および/または分化に影響すべく作用するだけの因子が同定され得るに過ぎないという点でこれらの方法は制限される。

【0070】

対照的に、本発明では、結合分子について直接選択し、次いで結合分子の全レパートリーにわたってスクリーニングすることにより、増殖的または分化的作用を有するものが見出される。組み合わせライブラリーとして大きな免疫レパートリーであると、重および軽鎖結合領域のランダムな会合が可能となり、候補のアゴニストおよび阻害因子がさらに増大される。また、請求の範囲に記載された方法は、伝統的なモノクローナル抗体技術の制限（1免疫化動物当たりの骨髄腫細胞へのB細胞融合の数により制限されている）を受けることはなく、大きな免疫レパートリー全体におよぶスクリーニングを可能にする。さらに、細胞-細胞接触を通じた局所制御および体液調節分子の両方が増殖、発達、分化、細胞生存、機能活性化および機能抑制に関与していることが知られているため、これらのスクリーニング方法は、調節因子のタイプまたはその生成起点もしくは部位に限定されない。さらに、本スクリーニング方法は、生化学的機能、既知遺伝子との十分な配列類似性または起点部位を全く前提とはしていない。請求項に記載された同定およびスクリーニング方法は、迅速性、費用効果および単純さを含め、慣用的スクリーニング方法を凌ぐ幾つかの実践的な利点を呈する。現行方法はまた、同時多試料分析法を提供するもので、さらに多くのAbフラグメントがスクリーニングに利用可能となる。

10

20

【0071】

本発明はまた、抗体が結合する受容体を発現する細胞（標的細胞）の存在下で抗体を発現する細胞を共培養することによる抗体（アゴニストまたは阻害性）スクリーニング方法を包含する。

【0072】

一旦アゴニスト抗体または阻害性抗体が同定されると、それらは当業界技術者に公知の標準組換え技術を用いて合成され得る。これらの抗体およびそれらの製造方法もまた、請求項に記載された発明に包含される。さらに本発明は、上記抗体を用いることにより抗体と結合する受容体を同定および抗体が模倣し得る天然成長因子または阻害因子を同定する方法を包含する。

30

【0073】

さらに、本発明は、特定細胞型またはその前駆体の増殖または分化を刺激することによりその細胞型が欠乏した患者を処置するためのアゴニスト抗体の用途および特定細胞型を阻害するための阻害抗体の用途、および特定細胞型を同定するための抗体の用途を包含する。

【0074】

また、細胞の特異集団を同定および分離するためのアゴニストおよび阻害抗体の用途も本発明に包含される。

40

【0075】

第1の態様において、本発明は、細胞の増殖、分化、生存または活性化に関与する受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体の同定方法であって、受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生産し、抗体をコードする核酸配列を含む複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、抗体が表面ディスプレイされるようにライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化し、そして標的細胞を用いて表面ディスプレイ抗体をスクリーニングすることにより受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0076】

50

「細胞の増殖、分化、生存または活性化に關与する受容体」とは、受容体をディスプレイする細胞の増殖、分化、発達、生存または活性化の増強または抑制に導くシグナル伝達カスケードに連係された受容体を包含する。増殖は、タンパク質合成速度、染色体複製、細胞サイズまたは細胞数の変化により検出される細胞周期の様々な段階を通じた能動的な分裂および進行である。分化は、外因性因子への暴露の結果として生じる、特殊機能をもつ異なるタイプの細胞の生産が導かれる細胞形態、行動または機能の変化、または細胞が成熟し、多能性が低下する遺伝子発現の変化を含む。活性化は、細胞がG₀を脱して、G₁へ入るが、第2シグナルを受けるまではDNA合成も分裂もしないプロセスである。活性化は、活性化遺伝子および活性化抗原の特異的なセットの発現を伴う。例えば、B細胞に關する活性化抗原には、CD23、表面IgMおよびCD40がある。生存は、細胞にアポトーシスまたはプログラム（予定）細胞死または壊死が起こっていないことを意味する。本発明はまだ未発見の受容体に指向された抗体を包含するが、当業界における一平均的技術者であれば結果的に細胞が呈する行動、例えば増殖、分化、活性化または生存により抗体と受容体の結合を検出することはできるため、受容体の同定は必ずしも必要ではない。

10

【0077】

好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹（ES）セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形腫細胞、およびNtera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択され、抗体はscFvまたはFabフラグメントであり、表面ディスプレイベクターはファージミドであり、ライブラリーは組み合わせライブラリーである。

20

【0078】

別の態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成させ、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターにクローン化することにより抗体を表面ディスプレイさせ、標的細胞を用いて表面ディスプレイ抗体をスクリーニングすることにより成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0079】

「アゴニスト抗体」とは、細胞表面受容体をディスプレイする細胞の増殖、分化、活性化、生存または生存能力保存に導くシグナル伝達カスケードに連係された細胞表面受容体に結合する抗体全体またはそのフラグメント、例えばFabフラグメントおよびscFvフラグメントを包含する。

【0080】

「成長因子受容体」とは、成長因子または別のリガンドへ結合し、原形質膜（すなわち細胞表面）上に呈された成長因子受容体を有する細胞の増殖、分化、生存または活性化に導くシグナル伝達カスケードに参与する分子を包含する。

40

【0081】

「動物を免疫化する」とは、細胞、例えば幹/始原細胞を、例えば腹腔内、静脈内、皮下または筋肉内といったいずれかの投与経路により1またはそれ以上の動物に注入することによって、細胞表面上の分子に対して動物により免疫応答が発せられることを意味する。初回免疫化は、アジュバントの存在下で行われ得る。同じ抗原による増強（ブースト）後に初回免疫化を行うことが多く、その結果より大きな応答が発せられ、産生された抗体の親和力が増強される。典型的には、1～3回のブースター免疫化が、2～8週間の間隔、

50

通常3 - 4週間隔で行われる。典型的には、単一より多数の動物が免疫化される。

【0082】

「幹/始原細胞」とは、多能性である細胞および多能性である細胞およびまた細胞の増殖、分化、活性化または生存に關与する細胞表面受容体を有する多能性または多能性細胞から誘導される最終段階または終末分化細胞を包含する。多能性細胞(幹細胞)は、全細胞系統に分化することができる。例えば、ヒト胚性幹(ES)細胞は、胚の全3胚葉およびそれらの誘導体に分化する。最も未成熟な造血幹細胞は、全系統の成熟造血細胞を形成し、動物の造血組織を再構成することができる。多能性細胞(始原細胞)は、限られた数の系統(典型的には2または3)への分化に制限されている。造血幹/始原細胞は骨髓および循環血液中に存在する。幹/始原細胞には、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびNTera-2多能性胎生期癌細胞があるが、これらに限定はされない。免疫化用の細胞は、これらの供給源のいずれからでも入手され得る。

10

【0083】

「表面分子」とは、分子の少なくとも一部が原形質膜(細胞膜)の細胞外面にある原形質膜(細胞膜)タンパク質分子を包含する。

20

【0084】

「1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞」とは、免疫化動物からの血液またはリンパ様器官、例えば骨髓、脾臓およびリンパ節からの抗体産生細胞の集合を意味する。

【0085】

「ライブラリー」とは、生物の免疫レパートリーを代表する核酸分子の集合を意味し、本発明では關連のある幹/始原細胞の成長因子受容体に指向された抗体およびフラグメントをコードする分子が含まれる。ライブラリーは、典型的にはベクター、例えば表面ディスプレイベクターでクローン化された核酸分子として提供される。

30

【0086】

「表面ディスプレイベクター」とは、表面ディスプレイタンパク質の少なくとも機能的ドメイン、すなわち細胞からの輸送を指令する先導配列、および抗体配列を挿入するためのクローニング部位を担う核酸ベクターを意味し、結果的に抗体融合遺伝子が得られる。表面ディスプレイベクターは、宿主細胞において、抗体またはフラグメントが表面ディスプレイされるように表面ディスプレイタンパク質またはその機能的ドメインおよび抗体またはそのフラグメントから成る融合タンパク質の生産を可能にする。すなわち、抗体またはフラグメントは、表面ディスプレイタンパク質のドメインに連係された、機能的結合性ポリペプチドとして表面に提供されている。表面ディスプレイは、バクテリオファージ、ファージミド、細菌細胞または哺乳類細胞の表面で行われ得る。表面ディスプレイベクターの例には、pCOMB3、SurfZAP、pCANTAB5EおよびpEXmid3があるが、これらに限定はされない。当業界の実践者であれば、これらおよび他の表面ディスプレイベクターについては熟知しているはずで、容易に他の類似ベクターを構築し得る。表面ディスプレイされた抗体は、それらが位置する原形質(細胞)膜の細胞外側から提供された抗原に結合することができる。

40

【0087】

「スクリーニング」とは、アゴニスト抗体または阻害性抗体である抗体の同定方法を用いることを意味する。アゴニスト抗体の場合、スクリーニングでは、標的細胞の受容体に結合する抗体を同定し、その結果、その細胞の増殖、分化、生存または活性化に導くシグナル伝達カスケードに参与する受容体を誘発または活性化する。スクリーニングには、標的

50

細胞上の受容体に対する抗体の結合能力の測定（結合後に細胞表面に残存する抗体および結合後にインターナリゼーションされる抗体の両方を含む）および/または受容体への抗体の結合に伴う細胞応答を測定する検定のみが含まれる。これらには、分化、増殖、細胞生存または活性化（例えば下流エフェクター遺伝子の転写の変化）を検出するバイオアッセイおよび化学プロセス、例えば燐酸化を検出する生化学検定が含まれる。阻害性抗体の場合、スクリーニングには、細胞の受容体に結合する抗体の同定が含まれ、その場合、受容体へ抗体が結合すると、その細胞の成長、増殖、分化、活性化または生存が抑制される。スクリーニングには、細胞上の受容体に対する抗体の結合能力の測定（結合後に細胞表面に残存する抗体および結合後にインターナリゼーションされる抗体の両方を含む）および/または受容体への抗体の結合に伴う細胞応答を測定する検定のみが含まれる。これらには、分化、増殖、細胞生存または活性化（例えば下流エフェクター遺伝子の転写の変化）を検出するバイオアッセイおよび化学的プロセス、例えば燐酸化を検出する生化学検定が含まれる。

10

20

30

40

50

【0088】

「標的細胞」とは、アゴニスト抗体または阻害性抗体が結合する受容体をディスプレイする細胞を包含する。標的細胞における成長因子受容体は、幹/始原細胞に存在する受容体と同じであるか高い関連性を示すものである。造血細胞の場合、これらは一次造血細胞、幾つかの因子依存性ネズミセルラインおよびヒト白血病セルラインを包含し得るが、これらに限定はされない。標的細胞は、免疫原として使用されるのと同じ一次細胞型、細胞型の集団、またはセルラインまたは別の細胞型またはセルラインであり得る。標的細胞は、使用される免疫原に基いて選択される。例えば、赤血球溶解試薬および遠心分離で処理することにより赤血球および血小板が除去されたヒト一次骨髄吸引液で広範に免疫化することにより、多様な細胞表面受容体に対する特異性を有する抗体が当然得られる。この場合の標的細胞は、同じ免疫原を含み得、そこで多様な抗体が分離されるか、または標的細胞は細胞、例えばCD34⁺細胞の選別集団を含み得ることにより、特異的細胞系に対する抗体が同定される。広範な免疫原による別の標的選択肢は、ネズミ造血セルラインFDCP-混合を用いることである。この場合、インビトロ成長することができる、細胞のより均一な集団がその利点を有するが、ネズミ標的を用いて同定されたアゴニスト抗体は、ヒト細胞に対する効果を促進するその能力についてさらに特性確認されなければならない。別法として、細胞、例えばCD34⁺細胞の選別集団から成る免疫原を用いると、標的としてCD34⁺細胞、またはFDCP-混合セルラインが使用され得る。すなわち、免疫原および標的細胞の適切な選択が、関連性のある抗体を同定するための鍵である。当業界における平均的技術者であれば、求められる抗体の性質に基いて適当な標的細胞を容易に決定できるはずであり、すなわち、前駆体細胞の成長に関係するだけの受容体に指向された抗体は、標的細胞が初期系統細胞であることを必要とする。

【0089】

好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対して1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成させ、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をウイルス性ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体をウイルス表面にディスプレイさせ、標的細胞を用いてウイルス表面にディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を同定する段階を含む方法の特徴としている。

【0090】

「ウイルス性ディスプレイベクター」とは、ウイルス表面に抗体またはそのフラグメントをディスプレイさせ得るベクターを包含する。好ましくは、ウイルス性ベクターはバクテリオファージ（例、f1、M13、fd、T3、T4、T7）またはファージミドベクターである。バクテリオファージは、細菌細胞に感染し、複製し、それらのゲノムをパッケージすることができ、細胞からの放出時他の細胞に感染することによりこのサイクルを

続行し得るウイルスである。ファージミドは、上記生活サイクルに要求される必須遺伝子を欠くウイルスであり、それらは別のヘルパーファージにより提供される。当業界の平均的技術者であれば、本発明の請求項に記載された用途に適したウイルス、バクテリオファージおよびファージミドベクターについては熟知しているはずである。ウイルス性ディスプレイベクターの例には、pRL4 (プロリファロン、LLC、サンディエゴ、カリフォルニア)、pCOMB3 (バートン、D.R. およびバルバス、C.F. III、Advances in Immunology 57: 191-280、1994)、SurfZAPベクター (ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア)、pCANTAB5E (ファーマシア、ピスカタウェイ、ニュージャージー)、pEXmid3 (ソダーリンド、E.、ラガークヴィスト、A.C.、デュエナス、M.、マルムボーグ、A.C.、アヤラ、M.、ダニエルソン、L.、ボレベック、C.A.、Biotechnology 11: 503-507、1993) がある。

10

【0091】

さらに好ましい態様において、ウイルス性ベクターは、バクテリオファージおよびファージミドベクターから成る群から選ばれる。

【0092】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成させ、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することによりscFvフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、標的細胞を用いてファージミド表面にディスプレイされたscFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0093】

「scFvフラグメント」とは、完全な抗原結合ドメインが単一ポリペプチド内に含まれる1本鎖抗体フラグメントを包含する。

【0094】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することによりscFvフラグメントを表面ディスプレイさせ、標的細胞を用いて表面ディスプレイされたscFvフラグメントをスクリーニングすることにより成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0095】

さらに好ましい態様では、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージ表面で抗体を発現させ得るバクテリオファージベクターである。

40

【0096】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、標的細胞の細胞表面分子への結合に関してファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントをふるい分けし、細胞表面分子に結合するscFvフラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより成長因子受容体に関するアゴニスト抗体を同定する段階を含む方

50

法を特徴とする。

【0097】

「ふるい分け」とは、標的細胞に特異結合する抗体を濃厚にすべく標的細胞にディスプレイされた、興味の対象である抗原、すなわち抗体または抗体フラグメントが指向される受容体を含む細胞表面分子に表面ディスプレイライブラリー（バクテリオファージ、ファージミドまたは細胞）を暴露することを意味する。例えば、標的細胞は、例えばプラスチック表面に固定化されるか、または遠心分離により固定または捕獲され得る。バクテリオファージ、ファージミドまたは細胞総体にディスプレイされた特異抗体またはフラグメントが標的細胞に結合した後、表面ディスプレイライブラリーの残りは洗浄により除去される。結合および洗浄後、特異抗体結合を示すバクテリオファージ、ファージミド、細胞を（例、低pHにより）溶離する。ふるい分けプロセスは、一般的には数ラウンド反復される。バクテリオファージまたはファージミドを使用する場合、各ラウンド後溶離されたファージミドまたはバクテリオファージは、宿主細胞で増幅され得る。別法として、蛍光活性化細胞選別法（FACS）または磁気細胞選別法を、ハイスループットスクリーニングに使用することにより、関連のある結合抗体が同定され得る。表面ディスプレイ分子のFACS選別方法は、ゲオルギオウ，G．、スタソポウロス，C．、ダウファーティー，P．、S．、ナヤック，A．R．、アイヴァーソン，B．L．およびカーティス，R．I I I、Nature Biotechnology 15：29 - 34（1996）に記載されている。これらの方法は、当業界の平均的技術者により表面ディスプレイ抗体フラグメントのスクリーニングに容易に適用され得る。s c S vフラグメントに関するふるい分けは、一クローニング戦略が使用される故に、2量体として実施され得るが、単量体として実施され得る場合もある。別法として、受容体を認識するバクテリオファージまたはファージミドはまた、細胞表面に結合されたままのバクテリオファージまたはファージミドを除去し、次いで細胞を溶解することによりインターナリゼーションされたバクテリオファージまたはファージミドを回収する、インターナリゼーション方法を用いて同定され得る。別の方法では、膜タンパク質を標的細胞から分離し、これらの膜タンパク質の特異フラクションに抗体を結合させる。

10

20

【0098】

「細胞表面分子に結合（する）」とは、抗体産生を誘う受容体の抗原決定基または密接な関連のある抗原決定基、例えば同じか関連した種類に属する受容体または別の種類で関連のある受容体における抗原決定基に対する抗体フラグメントの抗原結合ドメインの結合を意味する。

30

【0099】

「機能検定でスクリーニング（する）」とは、標的細胞に対する抗体の作用（すなわち、増殖、分化、発達、生存または活性化に影響する、標的細胞でディスプレイされた成長因子受容体への抗体の結合）を測定するための個々またはプールでの表面発現された抗体（アゴニストまたは阻害性）の試験を意味する。ふるい分けにより標的細胞に結合することが測定された抗体フラグメントのみを、それに続いて機能検定でスクリーニングにかける。アゴニスト抗体フラグメントに関する機能検定において、スクリーニングされるのはs c F v 2量体である。s c F v 2量体分子のスクリーニングは、表面ディスプレイ分子、可溶性s c F v分子または分泌分子として行われ得る。阻害性抗体フラグメントに関する機能検定において、抗体フラグメントは、独立して単量体および2量体および表面ディスプレイ分子または可溶性分子としてスクリーニングされる。s c F vフラグメントが成長因子受容体へ結合し、その活性化を遮断する拮抗物質として作用する場合、それは単量体として作用し得る。しかしながら、s c F vフラグメントが天然阻害性分子の模倣物質として作用する場合、アゴニスト抗体の場合と同様2量体であることが必要である。機能検定におけるスクリーニングは、バイオアッセイ（例えばコロニー形成の試験、³Hチミジン取り込みまたはBrdU取り込みによるDNA合成の測定、遺伝子転写の変化に関する検定、または増殖に対する効果についてスクリーニングするのに使用され得る細胞酵素の測定）または生化学検定（例えば受容体リン酸化）のいずれかを含む。当業界の平均的技

40

50

術者であれば、細胞増殖、分化、生存および活性化の検出に適したバイオアッセイおよび生化学検定については熟知しているはずである。

【0100】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、そして2量体化Fabフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0101】

「Fabフラグメント」とは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が別々のポリペプチドに含まれている抗体のフラグメントを意味する。ポリペプチドは、少なくとも1つのジスルフィド結合により互いに共有結合されている。存在する不変領域は、天然または異なる種類に由来し得、ハイブリッドまたはキメラFabとしても知られている。

【0102】

Fabフラグメントは一般に単量体であるが、ふるい分けは先に記載したように標的細胞を用いて行われる。

20

【0103】

「2量体化(する)」とは、複数の成長因子受容体への結合が行われ得るように抗体フラグメントに含まれる2つの抗体結合ドメインの会合を誘起することを意味する。2量体化が達成され得る一法は、個々の抗体フラグメントを2量体化ドメイン、例えばjun(コステルニー, S. A., コール, M. S. およびツソ, J. Y., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992, デクルイフ, J. およびログテンバーグ, T., J. Biol. Chem. 271:7630-7634, 1996)に連係させることによるものであり、2つのタンパク質フラグメントはこれらのドメインの相互作用を通じて安定して会合し得る。

30

【0104】

「機能検定におけるスクリーニング」は、scFvフラグメントについて先に記載した通り、標的細胞を用いて行われる。標的細胞に結合する単量体Fab分子は、2量体化され、2量体としてスクリーニングされる。これらは、表面ディスプレイされ得るが、好ましくは可溶性分子としてスクリーニングされる。

【0105】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントを表面ディスプレイし、表面ディスプレイFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子に結合するFabフラグメントを2量体化し、2量体化Fabフラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む方法の特徴とする。

40

【0106】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターはバクテリオファージベクターであり、バクテリオファージの表面で抗体を発現させ得る。

【0107】

50

アゴニスト抗体同定方法の他の好ましい態様において、動物はウサギまたはニワトリである。幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P - 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞、および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

【0108】

10

好ましい動物の選択は2つの面を有する。免疫原に関する種の差異により免疫応答が発生され得る場合には、ウサギは抗体生産に關して有効に常用され、一般には第一の選択肢である。しかしながら、ニワトリは、抗体が誘導されるさらに進化した明確な環境を提供する。ウサギおよびマウスはヒト抗原によっては免疫応答を發しない場合もあるため、これは重要な考察である。しかしながら、当業界の技術者であれば、使用に適した他の動物についても熟知しているはずである。

【0109】

本発明における有用な細胞には、動物から単離された一次細胞、一次細胞か系ビトロ培養された細胞および培養で連続的に増殖され得る確立されたセルラインがある。

【0110】

20

「未選別ヒト骨髄細胞」とは、全ての他の細胞系が存在するように、最小限の操作が加えられたヒト骨髄吸引液、例えば赤血球を溶解し、遠心分離により血小板を除去すべく処理された吸引液の標本を意味する。

【0111】

「ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞」とは、末梢血中で循環している細胞、例えば血流中へ放出され、骨髄に起点を有した単核細胞または C D 3 4 ⁺ 細胞を包含する。

【0112】

「選別ヒト骨髄細胞」とは、細胞表面マーカーまたは細胞決定因子を使用することにより、細胞の混合物を種々の集団に分離する分離プロセスが行われたヒト骨髄細胞を包含する。選別は、F A C S (蛍光活性化細胞選択装置) または抗体カクテル、マイクロビーズおよび磁石を用いる磁気分離法によるものであり得る。選別は、興味の対象である細胞に關する正の選択 (例、C D 3 4 ⁺ 細胞、 - C D 3 4 抗体で選択することにより、C D 3 4 抗原を発現する細胞が分離される) または望ましくない細胞が集団から除去される負の選択 (例、C D 3 8 抗体の使用により所定の集団から C D 3 8 ⁺ 細胞が除去される) であり得る。

30

【0113】

未選別および選別ネズミ骨髄細胞については、ヒト細胞に關する記載と同じであるが、ただし、関連のあるネズミ表面抗原が適用される。

【0114】

「胎児肝細胞」とは、卵黄嚢の血島から胎児肝臓へ移動した細胞を包含し、それらは胎児性赤血球、マクロファージおよび幹/始原細胞を含む造血細胞へ成長する。それらは、ジョーダン, C . T . , マッカーン, J . P . , レミシュカ, I . R . , C e l l 61 : 953 - 963 (1990) に記載された要領で得られる。さらに、特異抗体 A A 4 . 1 を用いることにより、多能性幹/始原細胞を含む胎児肝組織の分集団が濃化され得る (ジョーダン, C . T . , マッカーン, J . P . , レミシュカ, I . R . , C e l l 61 : 953 - 963, 1990) 。上記細胞は、表面マーカーとして C D 3 4 および A C 1 3 を有する。

40

【0115】

「卵黄嚢細胞」とは、発達中の生物における最初の造血細胞の起源である細胞を意味する。卵黄嚢の胚体外組織内細胞は、卵黄嚢の血島から胎児肝臓へ移動し、そこで胎児性赤血

50

球、マクロファージ、幹細胞および始原細胞を含む造血細胞の大集団を形成する。

【0116】

「ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統」とは、奇形癌から誘導され得るかまたはインビトロ培養され得る正常胚の直接培養による多能性細胞であって、多能性であり、様々な誘導剤の存在下で分化誘導され得る細胞を包含する。

【0117】

「ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統」とは、奇形癌から誘導される移植可能な癌細胞を包含し、分裂し続け、さらに多くの分化組織を生成している未分化幹細胞と混合された、多様な分化組織を含む細胞の無秩序な集塊である。奇形癌細胞は、永久セルラインとして培養中で増殖され得、適当な培地においてそれらは分化せず無期限に増殖し続ける。しかしながら、これらの細胞は多能性であり、そこでは多系統分化が誘導され得る。分化誘導剤、例えばレチノイン酸を加えることにより培地が変えられる場合、または細胞を凝集させ得る場合、様々な見かけ上正常な特化細胞型への分化が誘発され得る。

10

【0118】

「ネズミ多能性胚性細胞」とは、ネズミ未分化胚芽細胞から誘導された細胞であり、未分化胚芽細胞へ注入されると、細胞は生殖系列をコロニー化し、マウスを再構成し得る。

【0119】

「ヒト胚性幹(ES)セルライン」とは、全能性であり、インビトロ増殖し得る初期哺乳類胚から誘導されるセルラインを意味する(トムソン, J. A.、イツコヴィッツ-エルドール, J.、シャピロ, S. S.、ワクニッツ, M. A.、スウィエルギエル, J. J.、マーシャル, V. S.、ジョーンズ, J. M.、Science 282: 1145-1147、1998、ポングソ, A.、C. Y. フォング、S. C. Ng および S. ラトナム、Hum. Reprod. 9: 2110、1994)。

20

【0120】

「ネズミ AGM から誘導された細胞」とは、ネズミ胚形成中に高レベルの造血幹/始原細胞を含む哺乳類胚において背側大動脈、性腺および中腎を含む領域から誘導された細胞を意味する(メドヴィンスキー, A. L.、サモイリナ, N. L.、ムラー, A. M.、ズィエルザック, E. A.、Nature 364: 64-67、1993、メドヴィンスキー, A. L.、ガン, O. I.、セメノヴァ, M. L.、サモイリナ, N. L. Blood 87: 557-566、1996)。

30

【0121】

「器官または組織再生に関与する細胞」とは、二重分裂する細胞、例えば腎臓細胞、血管の内層を形成する内皮細胞、および肝細胞(ミチャロポウロス, G. K. およびデフランセス, M. C.、Science 276: 60-66、1997)、および幹細胞手段により再生される他の細胞集団、例えば表皮、骨、骨格筋および神経組織(マッケイ, R.、Science 276: 66-71、1997)を包含する。

【0122】

「造血細胞」とは、血液形成細胞を意味する。

【0123】

「神経起源の細胞」とは、外胚葉から生じ、神経管または神経堤へ発育し、究極的には中枢神経系および末梢神経系を形成する細胞を意味する。

40

【0124】

「RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞」とは、RBC溶解および洗浄を通じて赤血球(RBC)および血小板の大多数が除去された全骨髄吸引液を意味する。この集団は、全ての他の造血系統を含むと予測される。

【0125】

「ヒト骨(髄)単核細胞」とは、単一核を含む循環血液および骨髄中の細胞、例えば単核球、リンパ球およびNK細胞を包含する。これらの細胞は、1.077g/mの密度に調節されたポリスクロースおよびナトリウムジアトリゾエートから成るヒストパーク1077溶液(シグマ・ディアグノスティックス、セントルイス、ミズーリ)または類似製品に

50

残存する赤血球、血小板および顆粒球から分離され得る。

【0126】

「ヒト骨髄CD34⁺細胞」とは、細胞表面でCD34表面マーカーを発現するヒト骨髄から誘導された幹/始原細胞の集合体を意味する。典型的には、これらの細胞は、CD34分子に特異的な抗体を用いる磁気またはFAC選別法を用いて分離される。

【0127】

「FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン」とは、モロニーネズミ白血病ウイルスおよびラウス肉腫ウイルスのsrc癌遺伝子の組換え体に感染させた長期ネズミ骨髄培養物からクローン化され、分離されたネズミセルラインを意味する(スプーンサー, E., ハイワース, C.M., ダン, A., デキスター, T.M., Differentiation 31:111-118, 1986)。これらのセルラインは、造血幹細胞の特徴の多くを有する。

【0128】

「B6SUTAネズミ造血幹セルライン」とは、連続マウス骨髄培養物から除去された非接着性細胞集団から確立された因子依存的造血セルラインを意味する(グリーンバーガー, J.S., サカキーニー, M.A., ハンプリーズ, R.K., イーブズ, C.J. およびエクナー, R.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935, 1983)。

【0129】

「P19奇形癌細胞」とは、マクバーニーらにより開始されたセルライン(マクバーニー, M.W. およびロジャーズ, B.J., Developmental Biology 89:503-508, 1982)、すなわちC3H/He系統マウスで誘導された胎生期癌に由来する奇形癌セルラインを意味する。

【0130】

「NTera-2多能性胎生期癌細胞」とは、Tera-2細胞のヌードマウス異種移植腫瘍から確立されたNTera-2細胞の単一細胞クローンから誘導された多能性ヒト胎生期癌セルラインを意味する(アンドリュース, P.W., ダムジャノフ, I., サイモン, D., バンディング, G.S., カーリン, C., ドラコポリ, N.C., フォフ, J., Laboratory Investigation 50:147-162, 1984)。Tera-2細胞は、精巣の一次胎生期癌を患う男性からの肺転移から分離された。

【0131】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有するヒト骨髄細胞により動物を免疫化し、動物から一次および/または二次リンパ様器官を採取し、器官からRNAを分離し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、RNAからのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、標的細胞における細胞表面分子への結合についてファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントをふるい分けし、機能検定で細胞表面分子と結合するscFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0132】

「採取する(こと)」とは、動物を殺し、一次および/または二次リンパ様器官、例えば血液、脾臓および骨髄を集めることを意味する。

【0133】

「一次および二次リンパ様器官」とは、血液、骨髄、脾臓およびリンパ節といった器官を包含するが、これらに限定されるわけではない。

【0134】

「RNAを分離する(こと)」とは、リボヌクレアーゼ活性を阻害する薬剤、例えばフェ

10

20

30

40

50

ノールおよびグアニジンチオシアネート（モレキュラー・リサーチ・センター、インコーポレイテッド、シンシナティ、オハイオ）の存在下で細胞を溶解し、遠心分離または当業界の実践者によく知られている他の方法によりDNAおよびタンパク質からRNAを分離することを意味する。

【0135】

さらに好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹（ES）セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄CD34⁺細胞、FDCP-混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびN.T.e.r.a.-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

10

【0136】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有するヒト骨髄細胞により動物を免疫化し、動物から一次または二次リンパ様器官を採取し、器官からRNAを分離し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、RNAからのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することによりFabフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、機能検定で2量体化Fabフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0137】

さらに好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹（ES）セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄CD34⁺細胞、FDCP混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびN.T.e.r.a.-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

30

【0138】

本発明はまた、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体を表面ディスプレイし、標的細胞を用いて表面ディスプレイされている抗体をスクリーニングすることにより、成長因子受容体細胞に関するアゴニスト抗体を同定し、アゴニスト抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

40

【0139】

「アゴニスト抗体を合成すること」とは、アゴニスト抗体をコードする核酸を抗体細胞へ導入することにより、抗体を合成し、それが分離され得るように好ましくは細胞外培地中へそれを分泌させることを意味する。異種タンパク質の高レベル発現は、エシェリキア・コリ（*E. coli*）、サッカロマイシス・セレヴィシヤエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）、哺乳類細胞、植物、および昆虫細胞を含む多くの異なる系で達成されている。遺伝子操作が行われた抗体フラグメントは、細菌（ブラックサン、A.、Nature 34

50

7 : 497 - 498、1990)、酵母(カールソン, J. R. およびヴァイスマン, I. L.、Mol. Cell. Biol. 8 : 2647 - 2650、1988)、植物(ヒアット, A.、カファーキー, R.、ポウディッシュ, K.、Nature 342 : 76 - 78、1989)および哺乳類細胞を含むこれらの生物の多くで発現されている。分子標識、例えばHIS6の組込みにより、培地または細胞ライゼートからのニッケルキレートクロマトグラフィーによる迅速かつ効果的な精製が行われる(クロイハー, M.、ラフィオーニ, S.、スティーレ, R. E.、Biochim. Biophys. Acta. 1250 : 29 - 34、1995、バークス, E. A. およびアイヴァーソン, B. L.、Biotechnol. Prog. 11 : 112 - 114、1995)。当業界の実践者であれば、異種タンパク質を合成するためのこれらおよび他の方法については熟知しており、抗体合成にそれらの方法を容易に適用でき得る。

10

【0140】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をウイルス性ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体をウイルス表面にディスプレイさせ、標的細胞を用いて成長因子受容体に対するアゴニスト抗体である抗体についてウイルス表面にディスプレイされた抗体をスクリーニングし、アゴニスト抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0141】

さらに好ましい態様において、ウイルス性ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターまたはファージミドベクターである。

【0142】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドへクローン化することにより、scFvフラグメントはファージミド表面にディスプレイされ、標的細胞の細胞表面分子への結合についてファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントをふるい分けし、機能検定で細胞表面分子に結合するscFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0143】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の製造方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、標的細胞の細胞表面分子への結合についてファージミドにディスプレイされたFabフラグメントをふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、2量体化Fabフラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

40

【0144】

さらに好ましい態様において、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の同定および製造方法では、ライブラリーは組み合わせライブラリーである。標的細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞

50

、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。s c F v フラグメントのスクリーニングは、標的細胞の増殖、分化または活性化に關するバイオアッセイにより行われる。s c F v フラグメントのスクリーニングは、下流遺伝子の転写における変化または受容体の燐酸化に關する検定により行われる。2 量体化 F a b フラグメントのスクリーニングは、標的細胞の増殖、分化または活性化に關するバイオアッセイにより行われる。2 量体化 F a b フラグメントのスクリーニングは、下流遺伝子の転写における変化または受容体のリン酸化に關する検定により行われる。

10

【 0 1 4 5 】

「組み合わせライブラリー」とは、生物の免疫レパートリーを代表する核酸分子の集合体を意味するもので、転位した重および軽鎖 V 遺伝子がランダムに合わされて、多くの人工的 V 遺伝子の組み合わせが作成されている。これにより、スクリーニングされ得る抗体分子の数は顕著に増大する。組み合わせライブラリーは、“ P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s ” 編集：ブライアン K . ケイ、ジル・ウィンターおよびジョン・マカファーティー、6 章：“ C o n s t r u c t i o n a n d S c r e e n i n g o f A n t i b o d y D i s p l a y L i b r a r i e s ”、ジョン・マカファーティーおよびケビン S . ジョンソン、アカデミック・プレス、サンディエゴ、カリフォルニア (1 9 9 6) に記載された要領で構築され得る。本発明の組み合わせライブラリーは、免疫化に使用される特定細胞型の表面分子に指向された抗体またはそのフラグメントをコードする核酸配列を含む生物の免疫レパートリーをコードする核酸配列の集合体を表わす。細胞表面分子に指向したものを含め、人工的 V 遺伝子組み合わせが製造されるので、重および軽鎖 V 遺伝子の転位は、これらの表面分子に指向された抗体分子の数を単に増大させるのに役立つ。核酸のこの組織的集合体により、免疫化に使用される細胞型の細胞表面にディスプレイされた、細胞の増殖、分化、活性化または生存の促進または抑制に導くシグナル伝達カスケードに連係された受容体、例えば成長因子受容体に特異結合する抗体分子またはそのフラグメントの分離を目的とする用途が増加している。

20

30

【 0 1 4 6 】

また、「増殖または分化に關するバイオアッセイ」は、細胞の生存および活性化も包含するものとする。例えば、上記検定には、B r d u 取り込み、トリチウム化チミジン取り込み、細胞酵素レベル、例えばミトコンドリアデヒドロゲナーゼの変化、可視的コロニー形成、p H 変化、C a ⁺⁺ 濃度変化および遺伝子転写の変化の測定があるが、これらに限定はされない。

【 0 1 4 7 】

「下流遺伝子の転写における変化について検定する (こと) 」とは、シグナル伝達カスケードの一部として調節されるいずれかの遺伝子、例えば核転写因子、例えば c - m y c、c - j u n、N F - κ B および c - f o s の転写の変化について検定することを意味する。例えば、短期間 (例、2 時間) 候補抗体に飢餓 (血清および成長因子欠乏) 標的細胞を暴露し、細胞から R N A を分離する。転写における変化は、1 つまたはそれ以上の下流遺伝子に特異的なプライマーを用いて R T - P C R を含む方法により検出 (定量) され得、次いでアガロースゲル電気泳動または特異遺伝子用のプローブを結合させた珪素ウェーハーへの R N A のハイブリダイゼーションが行われる。上記チップを用いることにより、多くの遺伝子が同時に検定され得る。

40

【 0 1 4 8 】

「受容体のリン酸化について検定する (こと) 」とは、抗体による受容体の免疫沈降が行われ、次いで γ - A T P を提供し、受容体のリン酸化について S D S - P A G E または八

50

イスルーブットスクリーンによりリン酸化産物を調べることである。

【0149】

本発明はまた、成長因子受容体の同定方法であって、受容体に対するアゴニスト抗体を生成し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0150】

一旦アゴニスト抗体が同定されると、それを用いることにより、それが結合している受容体が同定され得る。当業界の平均的技術者であれば、受容体の同定に有用である、例えば免疫沈降および/または免疫アフィニティー精製(スプリンガー, T. A. (1997)、“Isolation of Proteins Using Antibodies”、Current Protocols in Immunology 中、(J. E. コリガン、A. M. クリスピーク、D. H. マルグリーズ、E. M. シェヴァッチ、W. ストローパー編) 821-829頁、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、ニューヨーク)といった技術については熟知しているはずである。

10

【0151】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントは表面ディスプレイされ、標的細胞を用いて表面ディスプレイscFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いることにより、受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0152】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面におけるものである。

【0153】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントがファージミドの表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、機能検定で細胞表面分子と結合する上記scFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0154】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントを表面ディスプレイし、表面ディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、機能検定で細胞表面分子と結合する上記scFvフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

40

【0155】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体の同定方法であって、成長因子受

50

容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を細胞表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントが表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、機能検定で2量体化Fabフラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0156】

10

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージ表面におけるものである。

【0157】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子受容体の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントがファージミドの表面にディスプレイされ、標的細胞の細胞表面分子への結合についてファージミドにディスプレイされたFabフラグメントをふるい分けし、細胞表面分子に結合するFabフラグメントを2量体化し、2量体化Fabフラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0158】

さらに好ましい態様では、成長因子受容体は、造血成長因子受容体である。

【0159】

「造血成長因子受容体」とは、幹/始原または成熟血液細胞の増殖、分化、細胞生存または機能活性化に関する造血起源の細胞で発現された受容体を包含する。

【0160】

さらに本発明は、成長因子の同定方法であって、成長因子受容体に対してアゴニスト抗体を産生させ、このアゴニスト抗体を用いて受容体を同定し、この受容体を用いて成長因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0161】

天然成長因子が成長因子受容体を用いることにより同定され得る方法が若干存在する。例えば、発現用の誘導性プロモーター下でクローン化受容体により細胞を形質転換することは可能であり、その後バイオアッセイにおける効果についてcDNAプールのスクリーニングが行われる。例えば、サイトセンサー・マイクロフィジオメーター・システム(モレキュラー・デヴァイシーズ、サニーヴェイル、カリフォルニア)、すなわちシグナル伝達経路に関する予備知識が無い場合に受容体伝達応答を監視するバイオセンサーの使用がある。別法として、キメラ受容体を製造することにより、十分に特定されたバイオアッセイを設定することが可能であり、例えば特異的リポーター遺伝子発現の増加がある。例えば、新規受容体の細胞外ドメインは、十分に特性確認された受容体、特に下流シグナル発生事象が特定されたものの細胞内ドメインに融合され得る。次いで、cDNAプールは、リポーター遺伝子発現に関するバイオアッセイでスクリーニングされ得る。当業界の平均的技術者であれば、これらおよび他の有用な技術については熟知しているはずである。

40

【0162】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラ

50

リーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより s c F v フラグメントが表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされた s c F v フラグメントをスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、このアゴニスト抗体を用いて受容体を同定し、この受容体を用いて成長因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0163】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージ表面上である。

【0164】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の s c F v フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、s c F v フラグメントがファージミド表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされた s c F v フラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子に結合する s c F v フラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定し、受容体を用いて成長因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0165】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の F a b フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、F a b フラグメントが表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされた F a b フラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合する F a b フラグメントを2量体化し、2量体化 F a b フラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に対するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定し、受容体を用いて成長因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0166】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージ表面上である。

【0167】

別の好ましい態様において、本発明は、成長因子の同定方法であって、成長因子受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の F a b フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、F a b フラグメントがファージミド表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされた F a b フラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子に結合する F a b フラグメントを2量体化し、2量体化 F a b フラグメントを機能検定でスクリーニングすることにより、成長因子受容体に関するアゴニスト抗体であるものを同定し、アゴニスト抗体を用いて受容体を同定し、受容体を用いて成長因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0168】

さらに好ましい態様において、成長因子は造血成長因子であり、成長因子は、次の細胞型、すなわち未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄から生じるヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M

10

20

30

40

50

領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞、および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞の増殖、分化、活性化または生存に影響を及ぼす。

【 0 1 6 9 】

本発明はまた、アゴニスト抗体のスクリーニング方法であって、抗体が指向される受容体を発現する標的細胞の存在下で抗体フラグメントを発現する細胞を成長させ、抗体フラグメントをスクリーニングすることにより、アゴニスト抗体であるものを同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【 0 1 7 0 】

「抗体フラグメントを発現する細胞」とは、宿主細胞に特異的なプロモーターおよびシグナル配列に連係された抗体フラグメントのクローン化コピーを担う原核生物または真核生物細胞を包含し、貫膜 2 量体化ドメインを含み得る、細胞表面抗体をディスプレイさせ得るか (レモン, M . A . 、トルートライン, H . R . 、アダムズ, P . D . 、ブルンガー, A . T . 、エンゲルマン, D . M . 、Nat . S t r u c t . B i o l . 1 : 1 5 7 - 1 6 3 、 1 9 9 4) 、または抗体フラグメントの単量体および 2 量体を分泌させ得る。

【 0 1 7 1 】

「標的細胞の存在下で」とは、抗体またはフラグメントを発現する細胞および抗体が結合する受容体を発現する細胞を共培養することを意味する。

20

【 0 1 7 2 】

スクリーニングには、抗体フラグメントが標的細胞の増殖、分化、活性化または生存を刺激するか否かを決定する他のバイオアッセイまたは生化学検定が含まれる。

【 0 1 7 3 】

好ましい態様において、抗体フラグメントを発現する細胞は、細菌細胞、哺乳類細胞または酵母である。

【 0 1 7 4 】

「細菌細胞」とは、全ての原核生物細胞、通常全ての遺伝子型のエシェリキア・コリ (E . c o l i) または細胞表面ディスプレイ分子を生産する細菌細胞を意味する。

30

【 0 1 7 5 】

「哺乳類細胞」とは、哺乳類由来の全ての細胞で、通常インビトロ成長能力をもつクローン性である。

【 0 1 7 6 】

「酵母」とは、表面ディスプレイまたは分泌される抗体分子を製造すべく遺伝子操作が加えられたプラスミドまたは組込まれた D N A の発現を可能にする酵母細胞、典型的にはサッカロマイシス・セレヴィシヤエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 、シゾサッカマイシス・ポンベ (S c h i t z o s a c c h a m y c e s p o m b e) 、またはピチア・パストリス (P i c h i a p a s t o r i s) を包含する。

【 0 1 7 7 】

別の態様において、本発明は、幹 / 始原細胞で動物を免疫化することにより製造された成長因子受容体に対するアゴニスト抗体の特徴とする。

40

【 0 1 7 8 】

好ましい態様において、幹 / 始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞

50

胞および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

【 0 1 7 9 】

別の好ましい態様において、本発明は、本発明方法により製造された成長因子受容体に対するアゴニスト抗体を特徴とする。

【 0 1 8 0 】

本発明はまた、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより生成された免疫細胞から作成された組み合わせライブラリーを特徴とする。別め態様において、本発明は、幹/始原細胞により免疫化された動物の免疫細胞からの核酸配列を含む抗体分子またはそのフラグメントをコードする組み合わせライブラリーを特徴とする。さらに別の態様において、本発明は、幹/始原細胞上の表面分子に指向した組み合わせ抗体フラグメントライブラリーを特徴とする。さらに別の態様において、本発明は、細胞増殖、分化、生存または活性化に関与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子の1つまたはそれ以上の抗体またはその抗体フラグメントを発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体またはその抗体フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体を表面ディスプレイさせることにより作成された組み合わせライブラリーを特徴とする。好ましい態様において、受容体は成長因子受容体である。

10

【 0 1 8 1 】

さらに別の態様において、本発明は、細胞の増殖、分化、生存または活性化に関与する受容体に対する抗体またはそのフラグメントをコードする組み合わせ抗体ライブラリーの製造方法であって、受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体または抗体フラグメントを発現する複数の免疫細胞を生成し、複数の免疫細胞から、抗体フラグメントの可変および不変領域をコードする核酸配列を得、抗体フラグメントの可変領域をコードする核酸配列をランダムに合わせることにより、抗体フラグメントをコードする核酸配列の組み合わせライブラリーを製造し、ライブラリーの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体フラグメントをディスプレイさせる段階を含む方法の特徴とする。好ましい態様において、受容体は成長因子受容体である。

20

【 0 1 8 2 】

「ランダムに組み合わせる」とは、転位した重および軽鎖可変遺伝子をコードする核酸配列を合わせ、例えばPCRオーバーラップ反応を用いることにより、多くの人工的な可変遺伝子の組弄合わせを作成することを意味する。

30

【 0 1 8 3 】

好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髄細胞、ヒト骨髄を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髄細胞、未選別ネズミ骨髄細胞、選別ネズミ骨髄細胞、胎児肝細胞、卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ胚性胎児性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に関与する細胞、R B C 溶解を被ったヒト骨髄細胞、ヒト骨髄単核細胞、ヒト骨髄 C D 3 4 ⁺ 細胞、F D C P 混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T A ネズミ造血幹セルライン、P 1 9 奇形癌細胞および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。動物は、ウサギまたはニワトリである。抗体またはそのフラグメントは、s c F v フラグメントである。抗体またはそのフラグメントは、F a b フラグメントである。組み合わせライブラリーによりコードされる抗体またはそのフラグメントは、ファージミドに表面ディスプレイされている。さらに、この製造方法は、抗体フラグメントをコードする核酸配列を得る前に、幹/始原細胞への結合について免疫化動物から採取した血清をスクリーニングする段階を含む。

40

【 0 1 8 4 】

本発明はまた、細胞の増殖、分化、活性化または生存に対して抑制的な抗体の同定、合成

50

および使用に向けられた様々な均等内容の態様を特徴としている。これらの態様は、アゴニスト抗体に関するものと類似しており、当業界の一平均的技術者であれば、阻害性抗体へ適用するべくこれらを適応させることができるはずである。

【0185】

さらに、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に關与する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体を表面ディスプレイし、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0186】

「阻害性抗体」とは、細胞の増殖、分化、活性化、阻害または生存に關与するシグナル伝達カスケードに連係され、一細胞の増殖、分化、活性化または生存を阻害する細胞表面受容体へ結合する、FabフラグメントおよびscFvフラグメントなどを含む、抗体全体またはそのフラグメントを包含する。阻害性抗体は、細胞の増殖、分化、活性化または生存を促進する受容体の作用を遮断するかまたは負の成長シグナルを送る受容体に結合する阻害性分子を模倣することにより阻害し得る。

【0187】

「増殖」とは、タンパク質合成速度の変化、染色体複製、細胞サイズまたは細胞数により検出される細胞周期の様々な段階を通しての活発な分裂および進行を意味する。

20

【0188】

「分化」とは、外因性因子への暴露の結果として、特殊機能をもつ異なる型の細胞の生成を誘導する細胞の形態、行動または機能の変化、または遺伝子発現における変化を意味する。分化は、当業界でその語を使用する場合と同様、細胞が成熟し、多能性が低下するプロセスを指す。

【0189】

「活性化」とは、細胞がG₀を脱し、G₁に入るプロセスを意味するが、ただしDNAを合成せず、第2シグナルを受けるまで分裂もしない。活性化は、活性化遺伝子および活性化抗原の特異なセットの発現に伴う。

30

【0190】

「生存」とは、細胞がアポトーシスまたは予定細胞死または壊死を被っていないことを意味する。

【0191】

増殖、分化、活性化または生存に關与する受容体は、阻害性抗体が拮抗物質または遮断抗体として作用している場合アゴニスト抗体と結合するのと同じ受容体を代表し得る。受容体は、阻害性抗体が阻害性因子を模倣している場合アゴニスト抗体が結合する成長因子受容体とは異なり得る。

【0192】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に關する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をウイルスディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体をウイルス表面にディスプレイさせ、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてウイルス表面にディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

40

【0193】

50

さらに好ましい態様において、ウイルス性ベクターは、バクテリオファージおよびファージミドベクターから成る群から選択される。

【0194】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントがファージミド表面にディスプレイされ、ファージミド表面にディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0195】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントが表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0196】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

【0197】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対して1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントはファージミド表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、機能検定で細胞表面分子と結合するscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0198】

ふるい分けおよびスクリーニングは、以前に記載された要領で行われる。

【0199】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントが表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子に結合するscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

40

50

【0200】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

【0201】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントをファージミドの表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子に結合するFabフラグメントを2量体化し、細胞表面分子に結合する単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0202】

ふるい分けおよびスクリーニングは、scFvフラグメントの場合と同様に行われる。

【0203】

「Fabフラグメントを2量体化すること」とは、細胞表面分子に結合するFabフラグメントの代表的部分が2量体化されていることを意味する。Fabフラグメントの残りは、単量体として残される。単量体および2量体は両方とも機能検定で試験される。

20

【0204】

「単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を機能検定でスクリーニングする」とは、単量体および2量体が独立してスクリーニングされることを意味する(scFvフラグメントに関する検討を参照)。さらに、Fabフラグメント(単量体および2量体)は、表面ディスプレイされているかまたは可溶性分子であり得る。

【0205】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントを表面ディスプレイさせ、表面ディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、上記細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、標的分子の細胞表面分子に結合する単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0206】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターはバクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

40

【0207】

阻害性抗体の同定方法のさらに好ましい態様において、動物はウサギまたはニワトリである。幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびN.T.e.r.a

50

- 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

【0208】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞により動物を免疫化し、動物から一次または二次リンパ様器官を採取し、器官からRNAを分離し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、RNAからのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することによりscFvフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。 10

【0209】

さらに好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびNTera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。 20

【0210】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化し、一次または二次リンパ様器官を動物から採取し、器官からRNAを分離し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、RNAからのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントをファージミドの表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、上記細胞表面分子を結合するFabフラグメントを2量体化し、上記細胞表面分子と結合する単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。 30

【0211】

さらに好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(ES)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞およびNTera-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。 40

【0212】

本発明はまた、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体は表面ディスプレイされ、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた抗体をスクリーニングすることにより、阻害 50

性抗体を同定し、阻害性抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

【0213】

阻害性抗体の合成は、アゴニスト抗体に関して前述した要領で行われる。

【0214】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体をコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をウイルスディスプレイベクターへクローン化することにより、抗体がウイルスの表面にディスプレイされ、ウイルス表面にディスプレイされた抗体を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0215】

さらに好ましい態様において、ウイルスベクターは、バクテリオファージベクターまたはファージミドベクターである。

【0216】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のs c F vフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドへクローン化することにより、s c F vフラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたs c F vフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定により細胞表面分子と結合するs c F vフラグメントをスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0217】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のF a bフラグメントをコードする核酸配列を含む、上記複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、F a bフラグメントがファージミドの表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされたF a bフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するF a bフラグメントを2量体化し、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて細胞表面分子に結合する単量体および2量体化F a bフラグメントの両方を機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を合成する段階を含む方法の特徴とする。

30

40

【0218】

請求項に記載された阻害性抗体同定方法におけるさらに好ましい態様において、ライブラリーは組み合わせライブラリーである。標的細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミA G M領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹(E S)セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、R B C溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓C D 3 4⁺細胞、F D C P混合ネズミ造血幹セルライン、B 6 S U T Aネズミ造血幹セルライン、P 1

50

9 奇形癌細胞、および N T e r a - 2 多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。s c F v フラグメントの機能検定によるスクリーニングは、標的細胞の増殖、分化または活性化の阻害に関するバイオアッセイによるものである。2 量体化 F a b フラグメントの機能検定によるスクリーニングは、標的細胞の増殖、分化または活性化の阻害に関するバイオアッセイによるものである。

【0219】

別の態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体の同定方法であって、受容体に対して阻害性抗体を産生させ、阻害性抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0220】

受容体に対する阻害性抗体を用いた受容体の同定は、アゴニスト抗体に關して前述した要領に従い行われる。

【0221】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化、生存または活性化に關与する受容体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の s c F v フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、s c F v フラグメントを表面ディスプレイさせ、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて表面ディスプレイされた s c F v フラグメントをスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0222】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターはバクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

【0223】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の s c F v フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、s c F v フラグメントをファージミド表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされた s c F v フラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、上記細胞表面分子に結合する s c F v フラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、その阻害性抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0224】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体の F a b フラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、F a b フラグメントを細胞の表面にディスプレイし、標的細胞の細胞表面分子への結合について細胞表面にディスプレイされた F a b フラグメントをふるい分けし、細胞表面分子と結合する F a b フラグメントを2量体化し、標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて単量体および2量体化 F a b フラグメントの両方を機能検定でスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を用いて上記受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

20

30

40

50

【0225】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターはバクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

【0226】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に関する受容体の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントをファージミドの表面にディスプレイさせ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞における細胞表面分子への結合性についてふるい分けし、上記細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、機能検定で標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについて単量体および2量体化Fabフラグメントの両方をスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を用いて受容体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0227】

細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体の同定方法のさらに好ましい態様において、受容体は造血受容体である。

【0228】

さらに本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に対する阻害性因子の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体に対する阻害性抗体を産生させ、その阻害性抗体を用いて受容体を同定し、その受容体を用いて阻害性因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

【0229】

成長因子の同定に關して前述したように、この受容体は抑制性因子の同定に使用される。

【0230】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に対する阻害性因子の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントが細胞表面に表面ディスプレイされ、表面ディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、阻害性抗体を用いて受容体を同定し、受容体を用いて阻害性因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

30

【0231】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターはバクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

40

【0232】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に対する阻害性因子の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のscFvフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、scFvフラグメントがファージミドの表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされたscFvフラグメントを標的細胞における細胞表面分子への結合についてふるい分けし、機能検定で細胞表面分子と結合するscFvフラグメントを標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害

50

するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、その阻害性抗体を用いて受容体を同定し、その受容体を用いて阻害性因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0233】

別の好ましい態様において、本発明は、阻害性因子の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対する1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列を表面ディスプレイベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントを表面ディスプレイし、表面ディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞における細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、機能検定で単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、その阻害性抗体を用いて受容体を同定し、その受容体を用いて阻害性因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

10

【0234】

さらに好ましい態様において、表面ディスプレイベクターは、バクテリオファージベクターであり、表面ディスプレイはバクテリオファージの表面上である。

【0235】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞の増殖、分化または活性化に対する阻害性因子の同定方法であって、細胞の増殖、分化または活性化に關与する受容体を含む表面分子を有する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより、表面分子に対して1つまたはそれ以上の抗体を発現する複数の免疫細胞を生成し、抗体のFabフラグメントをコードする核酸配列を含む、複数の免疫細胞からのライブラリーを作成し、ライブラリーからの核酸配列をファージミドベクターへクローン化することにより、Fabフラグメントはファージミド表面にディスプレイされ、ファージミドにディスプレイされたFabフラグメントを標的細胞の細胞表面分子への結合についてふるい分けし、細胞表面分子と結合するFabフラグメントを2量体化し、機能検定で単量体および2量体化Fabフラグメントの両方を標的細胞の増殖、分化または活性化を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定し、その阻害性抗体を用いて受容体を同定し、その受容体を用いて阻害性因子を同定する段階を含む方法の特徴とする。

20

30

【0236】

阻害性因子同定方法のさらに好ましい態様において、阻害性因子は造血因子である。

【0237】

別の態様において、本発明は、細胞の増殖、分化、活性化または生存に關する阻害性抗体のスクリーニング方法であって、抗体に指向される受容体を発現する標的細胞の存在下で抗体フラグメントを発現する細胞を成長させ、抗体フラグメントを標的細胞の増殖、分化、活性化または生存を阻害するものについてスクリーニングすることにより、阻害性抗体を同定する段階を含む方法の特徴とする。

【0238】

さらに好ましい態様において、抗体フラグメントを発現する細胞は、細菌細胞、哺乳類細胞および酵母から成る群から選択される。

40

【0239】

また、本発明は、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造される増殖、分化、活性化または生存に關与する受容体に対する阻害性抗体を特徴とする。

【0240】

好ましい態様において、幹/始原細胞は、未選別ヒト骨髓細胞、ヒト骨髓を起点とするヒト末梢血細胞、選別ヒト骨髓細胞、未選別ネズミ骨髓細胞、選別ネズミ骨髓細胞、胎児肝細胞、卵黄囊細胞、ネズミAGM領域から誘導された細胞、ヒトまたはネズミ胎生期癌細胞または系統、ヒトまたはマウス多能性奇形癌細胞または系統、ネズミ多能性胚性細胞、

50

ヒト胚性幹（ES）セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に關与する細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、FDCP混合ネズミ造血幹セルライン、B6SUTAネズミ造血幹セルライン、P19奇形癌細胞、およびN.T.e.r.a.-2多能性胎生期癌細胞から成る群から選択される。

【0241】

さらに好ましい態様において、本発明は、阻害性抗体の製造方法のいずれかにより製造された増殖、分化、活性化または生存に關与する受容体に対する阻害性抗体を特徴とする。

【0242】

さらに、本発明は、ある細胞集団の欠損を特徴とする病気または障害がある患者の処置方法であって、集団中の細胞の増殖または分化を刺激する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造されたアゴニスト抗体の治療有効量を患者に投与する段階を含む方法を特徴とする。

10

【0243】

「ある細胞集団の欠損を特徴とする病気または障害」は、例えば、患者に存在する所定の系統（複数も可）の細胞数が正常値より少ない病気、障害または造血抑制に關連した処置に關して使用される。例えば、化学療法を受けている患者が示す好中球および血小板のレベルは正常値より低い。貧血は赤血球レベルが正常値より低い場合の例である。

【0244】

「投与する（こと）」とは、抗体の供給を意味する。

【0245】

「治療有効量」とは、病気または病状に伴う症状の幾つかを少なくとも部分的に軽減または排除する量を意味する。

20

【0246】

好ましい態様において、細胞集団は造血細胞集団である。

【0247】

別の好ましい態様において、本発明は、細胞集団の欠損を特徴とする病気または障害をもつ患者の処置方法であって、集団中の細胞の増殖または分化を刺激する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造されたアゴニスト抗体と患者の細胞をエクスピボで接触させる段階を含む方法を特徴とする。

【0248】

「エクスピボ」とは、生体外を意味する。当業界の平均的技術者であれば、患者からの細胞摘出、患者の体外にある細胞の維持および患者への細胞の再導入に關する技術については熟知しているはずである。

30

【0249】

好ましい態様において、細胞集団は造血細胞集団である。

【0250】

別の態様において、本発明は、ある細胞集団の増加を特徴とする病気または障害をもつ患者の処置方法であって、細胞集団の増殖または分化を阻害する幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造される阻害性抗体の治療有効量を患者に投与する段階を含む方法を特徴とする。

40

【0251】

「ある細胞集団の増加を特徴とする病気または障害」とは、所定の系統、統（複数も可）の細胞数が正常値より多く患者に存在する病気または障害を意味する。例えば、慢性骨髄性白血病は、造血幹細胞における染色体転座の存在に起因する骨髓増殖を特徴とする。血小板減少症は、巨核球数の増加を特徴とする病気である。

【0252】

好ましい態様において、細胞集団は、造血細胞集団である。

【0253】

別の態様において、本発明は、異常増殖を呈する細胞を特徴とする病気または障害をもつ患者の処置方法であって、正常細胞の増殖または分化を阻害し、幹/始原細胞で動物を免

50

疫化することにより製造された阻害性抗体の一定量を患者に投与し、異常増殖を呈する細胞を殺す段階を含む方法を特徴とする。

【0254】

「異常増殖を呈する細胞」とは、増殖制御を呈しない細胞、例えば癌細胞を意味する。

【0255】

「殺す(こと)」とは、細胞死を誘発する因子、例えば放射線または化学療法剤に異常増殖を呈する細胞を曝すことを意味する。当業界の平均的技術者であれば、患者への上記因子の投与については熟知しているはずである。殺すのはインビボまたはエクシボで行われ得る。

【0256】

好ましい態様において、細胞は造血細胞である。

【0257】

別の態様において、本発明は、異常増殖を呈する細胞を特徴とする病気または障害をもつ患者の処置方法であって、抗体が異常増殖を呈する細胞に結合し、それらを死に至らしめるように、細胞に特異結合し、毒素または放射性標識に連係されており、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造された抗体の一定量を患者に投与する段階を含む方法を特徴とする。

【0258】

本発明の抗体は、毒素タンパク質に結合されることにより、悪性腫瘍または他の病状の処置に使用され得る融合免疫毒素を形成し得る。抗体結合ドメインに連係され得る毒性タンパク質には、特に、ジフテリア毒素、シュードモナス(Pseudomonas)・エキソトキシンAがある(ハートラー, A. A.、フランケル, A. E.、J. Clin. Oncol. 7: 1932-42、1989参照)。当業界の平均的技術者であれば、上記の融合免疫毒素の構築については熟知しているはずである。

【0259】

本発明はまた、細胞の同定方法であって、抗体が細胞と特異結合する条件下、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造される細胞型に特異的な抗体を細胞と接触させ、抗体の結合を検出する段階を含む方法を特徴とする。

【0260】

「特異的に結合する」とは、抗原決定基への結合が特定細胞型に特異的であることを意味する。

【0261】

好ましい態様において、細胞は造血細胞であり、抗体は放射性標識に連係されている。

【0262】

当業界の技術者であれば、造影剤としての抗体の用途については熟知しているはずである(ブライツ, H. B.、タイラー, A.、ピョルン, M. J.、レズリー, T.、ワイデン, P. L.、Clin. Nucl. Med. 22: 615-620、1997およびリ・デストリ, G.、グレコ, S.、リンツイヴィロ, C.、ラカルプト, A.、クレリ, R.、ディ・カタルド, A.、Surg. Today 28: 1233-1236、1998参照)。

【0263】

別の態様において、本発明は、特異細胞の集団を分離する方法であって、潜在的に特異細胞を含む試料を、抗体が細胞の集団に特異結合する条件下幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造された細胞の集団に特異結合する抗体と接触させ、結合抗体を用いて細胞の集団を分離する段階を含む方法を特徴とする。

【0264】

「結合抗体を用いて分離する(こと)」とは、同定された抗体を、細胞分離方法、例えば蛍光活性化細胞選別法(FACS)または磁気選別方法で用いることを意味する。FACS選別法では、抗体は蛍光分子にコンジュゲートされていることが多い。磁気選別方法では、抗体は直接的または間接的に磁気マイクロビーズに連係されている。

10

20

30

40

50

【0265】

好ましい態様において、細胞は造血細胞である。

【0266】

別の態様において、本発明は、細胞集団の増幅方法であって、細胞の増殖または分化を刺激し、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造されたアゴニスト抗体と細胞集団を接触させる段階を含む方法の特徴とする。

【0267】

「増幅すること」とは、一細胞または複数の細胞の増殖を誘発することである。

【0268】

好ましい態様において、細胞は造血細胞である。

10

【0269】

別の態様において、本発明は、幹/始原細胞で動物を免疫化することにより製造される抗体またはそのフラグメントを受容体へ結合させることにより幹/始原細胞の表面に存在する、細胞の増殖、分化、生存または活性化に関与する受容体の活性を調節する方法を提供する。

【0270】

「調節すること」とは、受容体の活性化を刺激、抑制または遮断することを意味する。

【0271】

さらに好ましい態様において、受容体は成長因子受容体である。

20

【0272】

本発明の他の特徴および利点は、以下のその好ましい態様に関する記載および請求の範囲から明白である。

【0273】

この明細書で引用された文献、出版物および特許は全て、そのまま引用して説明の一部とする。

【0274】

(好ましい態様の記載)

以下、実施例により、本発明の様々な態様および具体例についてさらに詳述するが、一切範囲の限定を意図したものではない。当業界の者であれば、造血細胞に関する実施例が、他の細胞系統、の増殖、分化、活性化および生存に関与する他の因子のスクリーニングにも適用可能であることは認めるところである。さらに、当業界の平均的技術者であれば、これらの阻害性抗体、受容体および阻害因子の同定方法を理解し、容易に適応させることができるはずである。

30

【0275】

【実施例】

(実施例1：造血成長因子受容体に対するアゴニスト抗体に関するスクリーニング)
(免疫化)

ニワトリおよびウサギを、ヒト骨髄細胞(選別および未選別)(ポイエティック・テクノロジー、ジャーマンタウン、メリーランド)、ネズミ骨髄細胞(選別および未選別)(ラビット・アンド・ローデント・ダイアグノスティック・アソシエイツ、サンディエゴ、カリフォルニア)、胎児肝細胞(ジョーダン, C. T.、マッカーン, J. P.、レミシュカ, I. R.、Cell 61: 953-963 (1990)に記載された要領で入手)の各々により別々に免疫化する。さらに、特異抗体AA4.1を用いることにより、幹細胞、卵黄嚢細胞(ラビット・アンド・ローデント・ダイアグノスティック・アソシエイツ、サンディエゴ、カリフォルニア)、単核細胞製品(ポイエティック・テクノロジー、ジャーマンタウン、メリーランド)について強化することができる。免疫化は、ネズミ造血セルライン、例えばFDCP-混合(スプーンサー, E.、ヘイワース, C. M.、ダン, A.、デキスター, T. M.、Differentiation 31: 111-118、1986)およびB6SUTA(グリーンバーガー, J. S.、サカキーニ

40

50

、M. A.、ハンフリーズ、R. K.、イーブズ、C. J.、エクナー、R. J.、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80: 2931-2935、1983)により行われ得る。また、先に記載したように、循環血から分離された造血幹/始原細胞も使用され得る。さらに、免疫化は、他の細胞、例えばP19細胞、NTera-2細胞およびヒトESセルラインにより実施され得る。骨髓細胞の選別は、磁気ビーズに結合された抗体(例、 α -CD34)を用いる磁気選別法により行われる。細胞は、細胞表面分子を認識するモノクローナル抗体により予めコーティングされる。モノクローナル抗体は、ビーズにコンジュゲートされた2次抗体により磁気ビーズに結合される。次いで、細胞を磁石により取り除く。磁気選別法は、興味の対象である細胞が抗体により結合される正の選択(例、抗体に結合された幹細胞集団)(ミルテニ・バイオテック、アウバーン、カリフォルニア)または望ましくない細胞を磁石により捉える負の選択(ステム・セル・テクノロジー、バンクーバーBC、カナダ国)であり得る。

10

【0276】

蛍光活性化選別法では、蛍光性分子にコンジュゲートされた抗体で標識した細胞を、フロー・サイトメーター、例えばベクトン・ディッキンソンFACSIVまたはFACSヴァンテージサイトメーターまたは均等内容の選別機で電子工学的に選別する。蛍光性分子コンジュゲート抗体は、特異的な細胞表面抗原を認識する。これらの抗体は、蛍光マーカー、例えばフルオレセイン・イソチオシアネート(FITC)またはフィコエリスリン(PE)(ベクトン・ディッキンソン、サンホセ、カリフォルニア、バイオソース・インターナショナル、カムリーロ、カリフォルニア)にコンジュゲートされる。

20

【0277】

免疫化は、腹腔内、皮下、筋肉内、静脈内を含むいずれかの常用経路で行われ得るが、これらに限定はされない。免疫は、アジュバントの存在下または非存在下であり得る。一般に、100-1000万個の細胞を一次免疫で注射する。例えばRBCが溶解され、血小板が除去された骨髓製品により広範に免疫化された動物は、幹/始原細胞を含め、残存する系統の全てを有する。これらのタイプの骨髓製品を用いることにより、抗原に対する応答は、広範な種類の表面受容体に対して産生された抗体により当然非常に広範なものとなる。選別された集団、例えばCD34⁺細胞により免疫化された動物の場合、免疫応答における多様性は低くなるが、幹細胞または一系統に特異的な効果をもつ抗体の同定が容易になり得る。

30

【0278】

一次免疫後、動物に対し、同じ免疫原により1回またはそれ以上ブースターを与えると、二次免疫応答が生じる。2次免疫応答から作成されたライブラリーからは、親和力の成熟によりさらに高い親和力をもつ抗体フラグメントが当然得られる。

【0279】

前免疫後ブースター免疫化を行い、血液を集め、血清を血清抗体評価用に製造する。標的細胞に対する免疫前および免疫血清による間接的細胞ELISAを用いることにより、特性未確認の細胞抗原に対する抗体についてスクリーニングする。これらの全細胞ELISAにおいて、標的細胞(1×10^7 細胞/ml)をマイクロタイタープレート(1×10^6 細胞/ウェル)へ分配し、徐々に沈降させる($1500 \text{ rpm} / 4 / 5'$)。培養上清を吸引により除去する。細胞を洗浄緩衝液(PBS/1%BSA/0.1%NaN₃)で簡単に洗浄し、沈降させる。細胞を、1/50、1/100、1/500、1/1000、1/5000の血清希釈液を含む100 μ l溶液に再懸濁する。細胞および抗体を4で1時間インキュベーションする。試料が再び徐々に沈降する。上清を吸引により除去し、細胞を洗浄緩衝液で2回洗浄する。ペレットを100 μ lの2^o抗体-酵素コンジュゲート(アルカリ性ホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートした2次ヤギ抗ウサギまたはヤギ抗ニワトリ抗体)に再懸濁する。プレートを4/1時間でインキュベーションし、次いで細胞を洗浄緩衝液により2回洗浄する。ペレットを現像剤試薬、100 μ l/ウェルに再懸濁する。現像剤は、アルカリ性ホスファターゼ2次抗体の場合PNPP(シグマ、セントルイス、ミズーリ)または西洋ワサビペルオキシダ

40

50

ーゼ抗体の場合 A B T S (シグマ、セントルイス、ミズーリ) である。酵素反応を続行させ、適当な波長で視覚的にまたはマイクロタイタープレートリーダーで読み取る。陽性血清 E L I S A 試験結果を生じる免疫化のもののみ、この方法の次の段階にもって行く (ライブラリー構築)。

【0280】

(ライブラリー構築)

最終ブースト後1週間以内に、陽性血清 E L I S A 試験後、動物を捕獲し、1次および2次リンパ様器官 (脾臓、骨髄および血液) を採取する。末梢血リンパ球を、フィコルまたはパーコルクッション (シグマ、セントルイス、ミズーリ) において血液から分離する。フェノール/グアニジンチオシアネート方法 (トライ・リエイジェント、モレキュラー・リサーチ・センター、シンシナチ、オハイオ) により脾臓、骨髄および末梢血リンパ球から R N A を分離する。第一鎖 c D N A 合成キット (ベーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、インディアナ) を使用し、オリゴ (d T)₁₅ プライマー、デオキシヌクレオチドおよび A M V 逆転写酵素を用いて R N A を c D N A に逆転写する。

10

【0281】

F a b フラグメントおよび/または1本鎖可変領域 (s c F v) 発現ライブラリーを、各免疫化動物から構築する。各ライブラリーのための表面ディスプレイベクターは p R L 4 であり (図1参照)、パッケージされたファージミド粒子の表面でキメラ発現産物をディスプレイさせ得る。p R L 4 は、p C o m b 3 H の修飾バージョンである (バルバス, C . F . I I I およびバートン, D . R . , 1994. *Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*。コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・コース・マニュアル、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、バートン, D . R . , バルバス, C . F . I I I, *Advances in Immunology* 57: 191 - 280, 1994、ラング, I . M . , チュアング, T . L . , バルバス, C . F . I I I, シュリーフ, R . R . , *J . Biol . Chem .* 271: 30126 - 30135, 1996)。それは、プライマー N P C A M B - F 1 (C A C C A T G G C G C A T A C C C G T A C G A C G T T C C G G A C T A C G C T T C T T A G G A G G G T G G T G G C T C T , 配列番号1) および N P C 3 A M B - B (G C T T A C A A T T T C C C A G A T C T G C G , 配列番号2) および鑄型プラスミド p C o m b 3 H (バルバス, C . F . I I I およびバートン, D . R . , コールドスプリング・ラボラトリー・コース・マニュアル、*Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*、1994) を用いる P C R 増幅により構築された。これは、血球凝集素デカペプチド (H A - d p) (フィールド, J . , ニカワ, J . I . , プロエク, D . , マクドナルド, B . , ロジャーズ, L . , ウィルソン, I . A . , ラーナー, R . A . , ウィグラー, M . , *Mol . Cell . Biol .* 8: 2159 - 2165, 1988)、アンバー停止コドン (T A G) および遺伝子 I I I を含むフラグメントを増幅する。生成した P C R 産物は、H I S 6 配列および S f i I および S p e I 制限部位が 5' 末端に加えられた、プライマー N P C 3 A M B - F 2 (G A G G A G G A G G A G G A G G A G A C T A G T G G C C A G G C C G G C C A G C A C C A T C A C C A T C A C C A T G G C G C A T A C C C G T , 配列番号3) および N P C 3 A M B - B (配列番号2) による2次 P C R 反応における鑄型として使用された。最終 P C R 産物をベクター p C o m b 3 H へクローン化し、配列分析および機能発現により確認した。p R L 4 において、抗体フラグメントを S f i I 制限部位へクローン化する。

20

30

40

【0282】

p R L 4 において、1本鎖抗体フラグメントをエシェリキア・コリ (E . c o l i) l a c Z プロモーター、リボソーム結合部位および o m p A 先導配列の下流にクローン化する。これらのエレメントにより、I P T G による発現が誘導され、O m p A 先導配列を介したペリプラズムへの分泌が行われ得る。

【0283】

50

pRL4における最終ハイブリッドFab発現構築物では、軽および重鎖は単一SfiIフラグメントとしてクローン化される。この方法の場合、軽鎖フラグメントをエシェリキア・コリ(E. coli) lacZプロモーター、リボソーム結合部位およびompA先導配列の下流にクローン化する。これらのエレメントによりIPTGによる発現が誘導され、ompA先導配列を介した細胞からの分泌が行われ得る。軽鎖フラグメントの後には、PCRプライマーにより提供された配列が続き、停止コドン、第2リボソーム結合部位およびエシェリキア・コリ(E. coli) pelB先導配列が含まれる。ハイブリッド重鎖遺伝子を、繊維状ファージ遺伝子III(gIII)配列(アミノ酸230-406)との枠で融合させる。アンバー停止コドンは融合接合点に存在する。supE細菌宿主、例えばER2357(ニューイングランド・バイオラプズ、ベヴァリー、マサチューセツ)では、アンバー突然変異誘発は抑制されている。プロモーター誘導時、単一ポリシストロン性メッセージは転写され、2つのポリペプチド、軽鎖および重鎖遺伝III融合タンパク質として翻訳される。合成後、これらのポリペプチドは、先導配列により指令される通り細菌ペリプラズム空間へ輸送される。ペリプラズム空間において、重鎖pIII融合タンパク質は膜へ挿入され、軽および重鎖はジスルフィド結合により共有結合され、抗原結合部位を形成する。ヒト不変域CH1およびCL配列は、重および軽鎖間にジスルフィド結合を形成するシステインを含む。ヘルパーファージによる重感染時、これらのフラグメントはFab-pIII融合体としてファージ表面の細胞から輸送される。非supE宿主、例えばTOP10F'(インヴィトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア)において、アンバー停止コドンが認識され、可溶性Fabフラグメントが生成される。

pRL4の他の特徴には、2種の分子標識、HAおよびHis6がある。HA標識は、HA.11抗体(パブコ、バーケリー、カリフォルニア)により認識される。His6標識により、ニッケル-キレートクロマトグラフィー(キアゲン、サンタカリタ、カリフォルニア)による抗体フラグメントのアフィニティー精製が行われ得る。

10

20

30

40

50

【0284】

(ScFvフラグメント)

1本鎖可変域ライブラリー(scFv)を、各免疫化動物から構築する。全結合ドメインが一つのポリペプチドに含まれるため、1本鎖ライブラリーは有用である。軽鎖可変域は、リンカー領域により重鎖可変域から分離される。短いリンカー(<11アミノ酸)の使用は、-ScFvのV_Hが別のScFv分子のV_Lと会合している場合およびその逆の場合の2量体複合体に適しており、これらの分子はジアボディ(diabody)と称す(コート, A. A., マーキィ, R. L., カードウエル, J. B., グルエン, L. C., イヴァンチ, N., ローレンス, M. G., ら, Eur. J. Biochem. 221: 151-157, 1994)。これは、単量体ScFvの折り畳みが<11アミノ酸のリンカーにより損なわれるためである(アルフザン, K., タッキネン, K., シズマン, D., ソダールンド, H. およびティエリ, T. T., Protein-Eng. 8: 725-731, 1995)。長いリンカー(>11アミノ酸)は単量体ScFvから単一抗原結合ドメインへの折り畳みに好都合であるため、2量体形成は除外される。この実施例において、scFvフラグメントは、7アミノ酸長の短いリンカーまたは18アミノ酸長の長いリンカーにより構築される。

【0285】

pRL4の設計は、下記で詳述されているようにファージ表面における可溶性形態でのscFv抗原結合ドメインの2量体化を可能にする。プラスミドがsupE細菌宿主、例えばER2537(F'Sup E、ニューイングランド・バイオラプズ、ベヴァリー、マサチューセツ)へ形質転換されるとき、アンバー突然変異誘発は時間のほぼ50パーセント抑制される。こうして、発現されたscFvの半分は繊維状ファージ遺伝子IIIタンパク質(アミノ酸230-406)と融合され、他の半分は遺伝子IIIの直前に終結され、可溶性scFvが生成される。scFv-pIII融合体および可溶性scFv生成物は両方とも、OmpAシグナル配列を有し、ペリプラズムへ輸送され、そこでそれらはジアボディと称される2量体scFv複合体を形成し得る(コート, A. A., マル

ビィ, R. L.、カードウェル, J. B.、グルエン, L. C.、イヴァンチ, N.、ローレンス, M. C.ら、*Eur. J. Biochem.* 221: 151-157、1994)。ジァボディは、1つの scFv の V_H が第2の scFv-pIII の V_L と一対になり、2価抗体フラグメントが形成されるように折り重なることが予測される。ヘルパーファージによる重感染時、これらのジァボディは pIII-抗体フラグメントとしてファージ表面で細胞から輸送される。非 supE 宿主、例えば TOP10F' (インヴィトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア) では、アンバー停止コドンが認識され、可溶性 scFv ジァボディが生成される。

【0286】

図2AおよびBは、scFvクローニング計画で使用されるプライマーの概略図である。免疫グロブリン可変域は全て、抗原結合部位を形成すべく企図された相補性決定領域(CDR)としても知られている、高頻度可変領域、およびフレームワーク領域(FR)として知られている、頻度の劣る可変領域により構成される。オリゴは、所定の生物体の公表された抗体の全フレームワーク領域にアニーリングし、それらを増幅するように設計されている。多くの生物体からの抗体配列は、単一出典：カバット, E. A.、ウー, T. T.、ペリー, H. M.、ゴッテスマン, K. S. およびフォエラー, C. 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 1-3巻、保健福祉省、公衆衛生総局、国立衛生研究所、NIH公開第91-3242号に編集されている。様々な動物の全免疫グロブリンレパートリーの増幅用プライマーから成るセットが開発され、記載されたように有効に使用されている(バルバス, C. F. III およびパートン, D. R.、1994. *Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・コース・マニュアル)。これらのプライマーは、クローニング用制限部位、およびPCRオーバーラップ伸長に使用される、軽および重鎖可変域を単一ポリペプチドへ連係するアミノ酸を提供するための軽および重鎖可変域間のリンカー配列を含む。リンカー配列は短い(例えば7アミノ酸をコードする)または長い(例えば18アミノ酸をコードする)ものであり得る。ウサギ可変軽鎖「フォワード」プライマーは、特異的軽鎖群(複数も可)のフレームワーク1(FR1)内の配列に結合する。縮重は、単一プライマーが他の密接に関連したFR1可変領域配列を増幅するようにプライマーへ組込まれる。制限部位は各プライマーの5'末端に組込まれ、クローニングを容易にする。同様に、各々特異的な群(複数も可)のウサギ軽鎖FR4領域とアニーリングするウサギ可変軽鎖配列用「リバース」プライマーが存在する。制限部位およびリンカー配列は、「リバース」プライマーの各々の3'末端に組込まれる。1本鎖短ライブラリーの場合、配列は5'-GGAAGAAGAGGAACC-3'(配列番号34)である。ウサギ重鎖可変域フラグメントの場合、FR領域に結合する配列も同様に設計されるが、ただしプライマーは公開されたウサギ重鎖配列(カバット, E. A.ら、1991)にアニーリングするよう設計されている。制限部位およびリンカー配列は、これらのプライマーの各々の5'末端に組込まれ、PCR増幅の第2ラウンド中に使用される。重鎖可変領域プライマーに組込まれたリンカー配列は、軽鎖リンカー配列5'-GGTGGTTCGTCTAGATCTTCC-3'(配列番号35)の逆補体である。簡単に述べると、可変重(V_H)および軽(V_L)鎖は別々に増幅され、次いでリンカー領域を通じたオーバーラップ伸長によりPCR増幅の追加ラウンド用に合わされ、scFvフラグメント産物を生成する。このクローニング段階はまた、重および軽鎖をランダムに会合させ得る。生成したアニーリング産物の最終5'および3'末端に結合するオリゴを用いて全生成物が増幅される。最終PCR産物は、各々短いリンカー(7アミノ酸)により分離された V_H 領域および V_L 領域を含み、pRL4へクローン化される(図1)。scFv長ライブラリー構築するためには、方法は同じであるが、ただし軽鎖リバースプライマーへ組込まれたリンカーの配列は33ヌクレオチド伸長され、追加の11アミノ酸をコードする。この場合、配列CCCACCACCCGCCCGAGCCACC GCCACCCAGAGGA(配列番号36)は、7アミノ酸短リンカーをコードするヌクレオチドのちょうど3'に含

まれる。s c F v 長ライブラリー用の重鎖プライマーは、s c F v 短ライブラリーに使用されるものと同一である。当業界の一平均的技術者であれば、多くの異なる種からの大きな免疫グロブリンレパートリーライブラリーを増幅する他のプライマーをこれらの設計から推定し、設計することができるはずである。

【0287】

重および軽鎖可変域遺伝子は、鋳型としてcDNAを用いるPCRにより別々に増幅される。使用されるプライマーは、免疫化された動物により異なる。ウサギからのs c F vライブラリーの構築は、次の要領で行われる(図2参照)。軽鎖可変領域遺伝子を、フォワードカッププライマーRSCVK-1(GGGCCCAAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA、配列番号4)、RSCVK-2(GGGCCCAAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA、配列番号5)、RSCVK-3(GGGCCCAAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA、配列番号6)およびフォワードラムダプライマーRSC1ambda1RSC1-1(GGGCCCAAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCGCCCTC、配列番号7)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)を用いて第1鎖cDNAから増幅する(図2A参照)。これらのプライマーは、異なる軽鎖群(カバット, E. A. ら、1991)のフレームワーク1(FR1)配列に結合し、クローニング目的用に可変配列の制限酵素部位5'を加える。カップ軽鎖増幅用のリバースプライマーは、RKB9J0-B(GGAAGATCTAGAGGAACCACTTAGGATCTCCAAGCTCGGTCCTC、配列番号8)、RKB9J10-B(GGAAGATCTAGAGGAACCACTTTGATTTCCACATTTGGTGCC、配列番号9)、RKB42J0-B(GGAAGATCTAGAGGAACCACTTTGACSAACCACTCGGTCCTC、配列番号10)であり、およびラムダ軽鎖増幅用のリバースプライマーはRj1ambda0-B(GGAAGATCTAGAGGAACCAACCGCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCTC、配列番号11)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)である(図2A参照)。これらのプライマーはカップおよびラムダ軽鎖群のFR4配列に結合し、PCRオーバーラップ伸長によりリンカー配列を生成するのに使用される外延配列を含む。軽鎖反応において、各カップフォワードプライマーは、9種の別々の反応において各カップリバースプライマーと対を成す。10番目の軽鎖反応は2つのラムダプライマーを用いる。重鎖可変領域遺伝子を、フォワードプライマーRSCVH01(GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG、配列番号12)、RSCVH02(GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAAGTCGGTGAAGGAGTCCGAG、配列番号13)、RSCVH03(GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAAGTCGYTGGAGGAGTCCGGG、配列番号14)およびRSCVH04(GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAAGSAGCAGCTGRTGGAGTCCGG、配列番号15)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)を用いて増幅する(図2B参照)。これらのオリゴヌクレオチドは可変領域フレームワーク1配列に結合し、オーバーラップPCR伸長によりリンカー配列を生成するのに使用される5'伸長部を含む。重鎖増幅用リバースプライマーは、RSCG-B(CCTGGCCCGGCCCTGGCCACTAGTGACTGAYGGAGCCCTTAGGTTGCC、配列番号16)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)である(図2B参照)。RSCG-Bは、ウサギ定常FR4/CH1配列に結合し、制限部位の伸長部を担うため、クローニングが容易になる。重鎖PCR反応において、各フォワードプライマーは、4種の独立した重鎖反作用のリバースプライマーと一対になる。

【0288】

重および軽鎖増幅およびフラグメントのゲル精製後、軽鎖および重鎖フラグメントを全て合わせると、追加ラウンドのPCR増幅により、オーバーラップ伸長が行われる。この最終オーバーラップPCR反応において、軽鎖可変領域フラグメントおよび重鎖可変領域フラグメントをアニーリングし、増幅する。このPCR反応は、プライマーRSC-F(G

A G G A G G A G G A G G A G G A G G C G G G G C C C A G G C G G C C G A G C T C
 、配列番号17)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)(図2A参照)
 およびRSC-B(GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTGGCCCGGCCCTG
 GCCACTAGTG、配列番号18)(ギブコ/BRL、ガイザーズバーグ、メリーラ
 ンド)(図2B参照)を用いており、これらは軽および重鎖可変領域配列に遺伝子工学的
 操作が加えられた制限部位に結合する。このクローニング段階により、重および軽鎖のラン
 ダムな会合が行われる。PCR産物は、SfiIにより制限される。最終SfiI制限
 フラグメントは、各々リンカーにより分離された1つの重鎖可変領域および1つの軽鎖可
 変領域を含んでおり、pRL4のSfiI部位へクローン化される(図4参照)。連結反
 応は、エシェリキア・コリ(E.coli)ER2537遺伝子型:F'proA⁺B⁺
 1acI^q / (lacZ)M15/fhuA2(tonA)(lac-proAB)
 supEthi-1(hsdMS-mcrB)5へ形質転換され、アンピシリン耐性(Amp^R)コロニーは全形質転換体のフラクシオンで選択される。形質転換体の残りを液
 体培養で増幅する。コロニー数を用いて、コロニーの大きさを測定する。抗体フラグメン
 トがプラスミドで有効にクローン化されたことを確認するため、制限消化による個々のク
 ローンのランダムな分析により、適当な大きさの挿入体に関するチェックを行う。scF
 vフラグメントの単一ライブラリーは、10⁷を越える個々の成分を含む。

【0289】

pRL4における最終1本鎖発現構築物では、1本鎖抗体フラグメントを、エシェリキア
 ・コリ(E.coli)lacZプロモーター、リボソーム結合部位およびompA先
 導配列の下流にクローン化する。これらのエレメントにより、IPTGによる発現が誘導
 され、サブレッサー株ER2537での発現時ompA先導配列を介して細胞から分泌
 が行われる。1本鎖フラグメントを繊維状ファージ遺伝III(gIII)配列(アミノ
 酸230-406)との枠で融合する。gIIITanパク質生成物、pIIIは、感染性
 に必要な小コートタンパク質である。IPTGによるプロモーター誘導時、1本鎖抗体-
 pIII融合体が合成され、細菌ペリプラズム空間へ輸送される。ペリプラズム空間では
 、scFv-遺伝III融合タンパク質は膜中へ挿入される。ヘルパーファージによる重
 感染時、これらのフラグメントは、pIII-抗体フラグメントとしてファージ表面にあ
 る細胞から輸送される。ファージミド表面において融合に使用される他の可能なタンパク
 質には、繊維状コートタンパク質pVIIおよび他のコートタンパク質がある。

【0290】

ニワトリscFvライブラリーの場合、方法は本質的には同じであるが、ただし、使用さ
 れるプライマーはニワトリ軽および重鎖配列に特異的である(カバット, E.A.ら、1
 991)。プライマー伸長配列およびリンカー配列は、ウサギプライマーと同じであり、
 pRL4へのクローニングが簡易化される。例に示されたプライマーおよびカバット, E
 .A.らにより開示された配列に基くと、当業界の平均的技術者であれば、いかなる種類
 に関するプライマーでも容易に設計し、scFvライブラリーを構築することができる。

【0291】

(Fabフラグメント)

Fabフラグメントライブラリーは、天然抗原認識部位を維持しており、親和力の維持を
 確保するのに有用である。

【0292】

プライマーは、公開されたERおよび定常領域配列に基いて設計される(カバット, E.
 A.ら、1991)。現行の計画では、プライマーは、ハイブリッド抗体フラグメント構
 築(ウサギ可変/ヒト定常)に使用されるが、プライマーはいかなる種類からの定常領域
 の場合でも同様に設計され得る。例えば、ウサギから誘導されたFabフラグメントライ
 ブラリーは、ウサギからの可変および定常の両領域を有し得る。この場合、可変領域フォ
 ワードプライマーは同じ状態のままであるが、リバースプライマーは、ウサギカップ軽鎖
 、ウサギラムダ軽鎖またはウサギ重鎖配列からの定常領域配列を含む。ハイブリッドFa
 bライブラリーもまた構築され得る。これらのライブラリーは、免疫化動物からの可変領

域およびヒト IgG1からの定常領域 (C_L および C_H1) により構成される。ハイブリッド Fab の場合、各 Fab フラグメントは、免疫化動物からの可変領域およびヒト IgG1からの定常領域 (C_L および C_H1) により構成される。ウサギおよびニワトリの免疫グロブリンレパートリーの増幅用およびキメラ Fab 生成用プライマーから成るセットが開発されている (バルバス, C. F. I I I およびバートン, D. R., 1994. *Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*. コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・コース・マニュアル、および組み合わせライブラリーからのモノクローナル抗体に関する1997年11月コース、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー)。「フォワード」プライマーは「リバース」プライマーと一対になって、ウサギ可変カッパ配列をPCR増幅し、一フォワードプライマーは一リバースプライマーと一対になって、ラムダ軽鎖可変領域配列が増幅される。ヒト定常カッパ配列は、ファージディスプレイプラスミドにおいて公開されたヒトカッパ定常領域配列 (カバット, E. A. ら、1991) にアニーリングする「フォワード」プライマー、および pel B 先導配列にアニーリングするリバースプライマーを用いてヒト抗体 Fab (パーソン, M. A., カオチエン, R. H. およびバートン, D. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 2432 - 2436, 1991) を担うファージディスプレイプラスミドから増幅される。全軽鎖フラグメントがヒト定常カッパフラグメントとプールされるオーバーラップPCR反応により、ハイブリッド軽鎖フラグメントが生成される。重鎖についても同様の方法を用いることにより、ハイブリッド重鎖フラグメントが生成される。最終および第3ラウンドのPCR反応において、ハイブリッド軽鎖をハイブリッド重鎖とプールし、オーバーラップPCR増幅を外部プライマーで遂行すると、各々ハイブリッド軽鎖およびハイブリッド重鎖の両配列をもつフラグメントが生成される。

10

20

【0293】

重および軽鎖可変領域遺伝子を、鋳型としてcDNAを用いるPCRにより増幅する。ウサギFabフラグメントライブラリーの場合、構築は次の要領で行われる。フォワードプライマーRSCVK1 (配列番号4)、RSCVK2 (配列番号5)、RSCVK3 (配列番号6) (オペロン・テクノロジーズ、アラメダ、カリフォルニア) を用いて、軽鎖可変領域遺伝子を増幅する (図3A参照)。これらのプライマーは、異なるカッパ軽鎖群 (カバット, E. A. ら、1991) のフレームワーク1 (FR1) 配列に結合し、クローニング目的のため可変配列の制限酵素部位5'を組込む。この種類から抗体ライブラリーを構築するためのウサギカッパ軽鎖およびガンマ重鎖をコードするmRNA増幅用ウサギプライマーの設計および利用については、ラング, I. M., バルバス, C. F. I I I、シュリーフ, R. R., Gene 172: 295 - 298 (1996) に記載されている。ラムダ軽鎖をフォワードプライマーRSC L - 1 (配列番号7) により増幅する。カッパ軽鎖増幅用リバースプライマーは、RHHybK1 - B (AGATGGTGCA GCCACAGTTCTGTTTGA TTTCCACATTTGGTGCC、配列番号19)、RHHybK2 - B (AGATGGTGCA GCCACAGTTCTGTTAGGATCTCCAGCTCTCGGTC CC、配列番号20)、RHHybK3 - B (AGATGGTGCA GCCACAGTTGCTTTGAC SACCACCTCTCGGTC CC、配列番号21) (オペロン・テクノロジーズ、アラメダ、カリフォルニア) である (図3A参照)。ラムダ軽鎖用リバースプライマーは、RHHybL - B (AGATGGTGCA GCCACAGTTCTGGCTCTGTTGACGGTCA GCTGGGTC CC、配列番号22) である。これらのプライマーは、軽鎖群 (カバット, E. A. ら、1991) のFR4配列に結合し、ヒト定常領域配列の伸長部を含む。この伸長部によって、ヒトカッパ鎖定常領域配列がPCR反応の第2ラウンドにおいて付加され得る。軽鎖反応では、各カッパフォワードプライマーは、9種の独立したPCR反応において各カッパリバースプライマーと一対になる。第10軽鎖PCR反応は、ラムダフォワードおよびリバースプライマーを用いる。ヒト定常カッパ配列は、いずれのヒトカッパ鎖クローンからでも増幅され得る。この場合、フォワードプライマー、HKC - F (CGA A C T G T G G C T G C A C C A T

30

40

50

CTGTC、配列番号23)(図3B参照)は、カバット, E.A.ら(1991)が発表したようにヒト定常カッパ配列に結合する。リバースプライマー、リードB(GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC、配列番号24)は、pComb3Hにクローン化されたヒトカッパ鎖のプラスミド配列に結合する。別法として、プライマーは、エシェリキア・コリ(E.coli)での発現に必要な配列(例、停止コドン、リボソーム結合部位、およびpe1B先導配列)を組み込むように設計され得る。フラグメントのゲル精製後、第2PCR反応が遂行され、そこで可変領域PCRフラグメント全てがヒト定常カッパPCRフラグメントおよびプライマーRSC-F(配列番号17)(図3A参照)およびリードB(配列番号24)と組み合わせられる。この反応により、ヒト定常カッパ配列への軽鎖可変領域の融合が行われる。

10

【0294】

重鎖可変領域遺伝子は、ラング, I.M., バルバス, C.F.III, シュリーフ, R.R., Gene 172:295-8(1996)に記載されたように、フォワードプライマーRhyVH1(GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG、配列番号25)、RhyVH2(GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAAGTCGGTGAAGGAGTCCGAG、配列番号26)、RhyVH3(GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAAGTCGGYTTGGAGGAGTCCGGG、配列番号27)およびRhyVH4(GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAAGSAGCAGCTGRTGGAGTCCGG、配列番号28)を用いて増幅される(図3C参照)。これらのプライマーは、pe1B先導配列をコードする5'配列を含む。ウサギ重鎖リバースプライマー、RHhyIgGCH1-B(CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARAGAGAYGGTGAACCAAGGTTGCC、配列番号29)は、ウサギ定常FR4配列に結合し、ヒト定常C_H1配列の伸長部を有する。従って、4種の独立したPCR反応は、各フォワードプライマーおよびリバースプライマーにより遂行される。ヒト定常IgG配列は、鋳型としてpCOMB3Hにおけるヒト抗体クローンおよびヒト定常IgG配列、HIgGCH1-F(GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC、配列番号30)にアニーリングするフォワードプライマーおよびプラスミド配列にアニーリングするリバースプライマー、dp-seq(AGAAAGCGTAGTCCGGAAACGTC、配列番号31)を用いたPCRにより増幅され得る(図3)。別法として、ヒト配列は、カバット, E.A.ら(1991)により発表されたように定常領域配列にアニーリングし、クローニング目的でリバースプライマーの制限部位が組み込まれるプライマーを用いることにより、いずれのヒト抗体cDNAライブラリーからでも増幅され得る。フラグメントのゲル精製後、第2セットの重鎖PCR反応が遂行され、重鎖可変領域増幅フラグメントは全てヒト重鎖定常領域フラグメントと組み合わせられる。プライマーリードVH(GCTGCCCAACCAGCCATGGCC、配列番号32)およびdp-ex(GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGAAAGCGTAGTCCGGAAACGTC、配列番号33)を用いるオーバーラップPCR伸長反応により(図3D参照)、ヒト定常領域配列へ重鎖可変領域が融合され得る。最終オーバーラップPCR反応において、ハイブリッド軽鎖およびハイブリッド重鎖はアニーリングされ、プライマーRSC-F(配列番号17)およびdp-ex(配列番号33)を用いて増幅される。生成したフラグメントは、適当な酵素で制限され、ゲル精製され、SfiI消化pRL4へハイブリッド軽および重鎖の両方を含む単一SfiIフラグメントとしてクローン化される。図5は、pRL4へクローン化された最終ハイブリッドFabフラグメントを説明するFabクローニング計画の概略図を示す。連結反応は、エシェリキア・コリ(E.coli)ER2537へ形質転換され、アンピシリン耐性(Amp^R)コロニーは形質転換全てのフラクションで選択される。残りは液体培養で増幅される。コロニー数を用いて、ライブラリーの大きさを測定する。

20

30

40

【0295】

ニワトリFabフラグメントライブラリーの場合、方法は本質的には同じであるが、ただし使用されるプライマーはニワトリ軽および重鎖配列に特異的である(カバット, E.A.

50

ら、1991)。プライマー伸長配列はウサギプライマーと同じであり、pRL4へのクローニングが簡易化され、ハイブリッドFab融合体が生成される。

【0296】

ライブラリーが構築された後、標的細胞を用いてそれらをスクリーニングする。

【0297】

(標的細胞)

標的細胞は、使用された免疫原、所望の生成物およびスクリーンの目標に基いて選択される。非常に広範なスクリーンの場合、造血細胞系統の大多数が細胞の免疫化集団に存在することが重要である。例えば、幹細胞、始原細胞、リンパ球、単球およびNK細胞を含むことが予測される、単核細胞から成る集団による免疫化はかなり広範囲であり、幹細胞、異なる系統の始原細胞、リンパ球、単球またはNK細胞に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体を産生させる潜在性を有する。さらに広範なスクリーンでは、RBC(赤血球)溶解および洗浄により赤血球および血小板の大部分を失った全骨髓吸引液を使用する。この集団は、他の全ての造血系統を包含するものと予測される。これらのライブラリーが一旦構築されると、スクリーニング用標的細胞はスクリーンの目標により変化する。一度に多重系統について関連のある抗体を同定するために、標的細胞集団は免疫原と同じであり得、細胞の多様な集団であり同様に非常に広範であり得る。これらの試験により、一度に広範で多様な細胞に対する興味深いアゴニストおよび阻害因子が見出される。多様な細胞集団に関するハイスループットスクリーニングの場合、抗体ライブラリーの各成分が様々な成熟段階で各細胞系統に暴露されているのを確認することが必要である。これに代わる方法では、標的集団を単一系統に限定することにより、単一系統に関連のある抗体を同定する。例えば、好中球は、タースタッペン, L.W., サフォード, M., ローケン, M.R., Leukemia 4:657-663(1990)に記載されているようにフロー・サイトメトリーにおける光散乱シグナルおよびモノクローナル抗体、CD11b、CD15およびCD16の組み合わせを用いて他の系統の細胞から分離され得る。多くの他の造血系統を標的細胞として使用するため分離することにより、特異系統に対して関連のある抗体が同定され得る。

10

20

【0298】

別法として、ヒト造血幹細胞再生または分化に関してある一定の役割を演じる関連抗体が同定され得る。試験によると、ヒト骨髓細胞のCD34⁺CD38フラクションは、長期移植および多系統分化を可能にする幹細胞を含むことが示されている(Williams Hematologyで再検討、第5版編者:エルネスト・ビュートラー、マーシャルA.リヒトマン、パリーS.カラー、トーマスJ.キップスマクグロウーヒル、アメリカ合衆国、ピーターJ.ケセンベリーによる「造血幹細胞、始原細胞およびサイトカイン類」の章中)。幹細胞はヒト骨髓細胞の非常に小さいフラクションを占めるため(1×10⁵骨髓細胞中1未満)、始原ヒト幹細胞の表面に特異的なリガンドは、ヒトCD34⁺選別1次ヒト細胞を免疫原として使用した抗体ライブラリーから同定され得る。この場合、標的細胞はCD34⁺集団であり得、CD34⁺CD38⁻細胞を認識する抗体はFACS選別法、磁気選別法により、または上記標的細胞でのふるい分けにより同定され得る。この場合における別の標的は、ネズミ造血幹セルライン、例えばFDCP-ミックスまたはネズミ多能性造血幹セルラインであり得る(スプーンサー, E., ハイワース, C.M., ダン, A., デキスター, T.M. 1986. Differentiation 31:111-118)。標的としてセルラインを用いる利点は、その利用能、クローン特性および操作し易さである。

30

40

【0299】

従って、標的細胞は、使用された免疫原、所望の最終生成物、所望のスクリーンの範囲、利用能、扱い易さを含む基準に基づいて選択される。

【0300】

最初の標的細胞がネズミ細胞である場合、結局試験は適当なヒトセルラインで行われる。

【0301】

50

造血にとって好ましい1次細胞およびセルラインは、溶解された全血、ヒト骨髄単核細胞、FDCP-ミックス、およびCD34⁺選別骨髄細胞である。P19細胞の場合、好ましい標的はp19細胞であり、NTERA細胞の場合好ましい標的細胞はNTERA細胞である。

【0302】

(ふるい分け)

ファージ(バクテリオファージまたはファージミド)ディスプレイ抗体ライブラリーは、ふるい分けと呼ばれる方法およびFACS選別法および磁気細胞選別法を用いることにより、マウスセルライン、ヒトセルラインおよび選別および未選別1次骨髄試料を含め、様々な標的細胞に結合し、細胞表面に残存しているかまたはインターナリゼーションされる抗体フラグメントを担うファージについて選択される。全細胞ふるい分け方法については以前に報告されている(シーゲル, D.L., チャング, T.Y., ラッセル, S.L. およびブニャ, V.Y., J. Immunol. Methods 1997, 206: 73-85)。

10

【0303】

選択方法の実施前に、初回ライブラリーを宿主細胞(ER2537)へ電気穿孔する。ライブラリー培養物を対数相まで増殖し、ヘルパーファージ、例えばVCSM13など、市販のヘルパーファージ(ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア)により重感染させる。重感染により、プラスミドをファージミド粒子にパッケージするのに必要とされる残存ファージ成分が提供される。一夜増殖後、培養上清中のファージミドはポリエチレングリコール(PEG)により沈降する。PEG上清を、ふるい分け(細胞表面、インターナリゼーションおよび膜)、FACS選別および磁気選別に使用することにより、非結合剤から結合抗体が精製される。

20

【0304】

ふるい分けにおいて、抗体-ファージライブラリーを、標的細胞とインキュベーションし、非接着ファージを多数回洗浄により除去する。典型的なふるい分けプロトコールは次の通りである:

1. PBS + 1% BSA または 10% FBS + 4% 粉乳 + NaN₃ によりファージ粒子を遮断する(インターナリゼーションされた抗体を検定する場合を除く)。
2. 標的細胞を遮断されたファージ(約5 × 10⁶ 細胞)に加える
3. 4 または 37 で混合し、ゆっくりと回転させる。
4. 1 ml の氷冷 PBS / 1% BSA / NaN₃ または室温 PBS / 1% BSA / NaN₃ により細胞を2回洗浄する。
5. 細胞に結合した特異抗体-ファージを、室温で5~10分間、低pH、例えばPBS中76ミリモルのクエン酸、pH 2.5により溶離させ得る。
6. 溶離されたファージを1モルのトリス-HCl、pH 7.4により中和する。
7. 中和後、抗体-ファージを用いて、ER2537菌に感染し、次ラウンドのふるい分けを行うため一夜増殖中に増幅させる。

30

【0305】

一般に、3-4ラウンドのふるい分けを各ライブラリーに対して行う。市販の2次抗体(ヒツジ抗M13抗体-HRP)を用いるファージELISAまたはPR4配列からの各抗体に組込まれたHA標識を認識する市販のHA.11抗体(バブコ、パーケリー、カリフォルニア)を用いる可溶性抗体ELISAを、各ふるい分けラウンド後に全細胞において遂行することにより、非結合剤全体に対する結合抗体の濃厚化が評価され得る。最終ラウンドのふるい分け後、抗体-ファージを寒天平板から単一コロニーとして選び取り、モノクローナル抗体-ファージとして増殖させ、特異的結合剤を同定するため全細胞でのELISAによりスクリーニングする。具体的には、抗体-ファージをTop10F'菌へ感染させ、単一コロニー用に平板培養する。単一コロニーを寒天平板から選び取り、成長させ、IPTGにより誘導する。特異的結合剤を同定するため、可溶性抗体を全細胞でのELISAによりスクリーニングする。生存細胞に加えて、スクリーニングは、無傷で

40

50

軽く固定された標的細胞に対して行われ得る。

【0306】

標的細胞が細胞表面マーカーにより特定され得る場合、関連のある抗体 - ファージは、FACSまたは磁気選別法により同定され得る。例えばCD34⁺細胞が免疫原として使用され、所望の抗体フラグメントがCD34⁺CD38⁻細胞またはCD34⁺CD38⁺細胞に結合する場合、ファージ抗体ライブラリーを細胞のCD34⁺集団に加え、インキュベーションすることにより、細胞表面への抗体 - ファージ結合が行われる。結合後、細胞を洗浄し、沈殿させ、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) - コンジュゲートCD38抗体溶液に再懸濁する。インキュベーションおよび洗浄後、細胞選別を遂行する。FACS選別法を有効に用いることにより、白血球のサブセットに特異的なファージ抗体が同定された (デクルイフ, J., タースタッペン, L., ポエル, E., ログテンバーグ, T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 3938 - 3942, 1995)。ファージを低pHで2集団CD34⁺CD38⁻細胞またはCD34⁺CD38⁺細胞から溶離し、中和し、細菌細胞の感染に使用する。次いで、ファージまたは可溶性抗体は、さらなる分析用に個々のコロニーから製造され得る。CD34⁺CD34⁻細胞に指向された抗体の場合、異種集団における細胞の全部または大部分に存在する構造と相互作用するファージは、CD38⁺細胞によって吸収されることにより、CD38⁻細胞に特異的なファージの濃厚化が有効に行われる。蛍光活性化細胞選別中に細胞および結合されたファージで発揮されるかなりのせん断力により、比較的高い親和力の抗体について選択される。

10

20

【0307】

別法として、吸着性細胞を用いることにより、細胞表面に非特異的に結合するかまたは幹/始原細胞に特異的ではない共通抗原、例えば細胞のハウスキーピング機能に關与する受容体に結合するファージが排除され得る。CD34⁺幹/始原細胞に關する吸着性細胞は、さらに分化されたCD34⁻細胞であり、CD34⁺細胞と共にドーピング処理され得る。

【0308】

ファージ抗体ライブラリーを、CD34⁺:CD34⁻細胞集団の1:5混合物に加え (例えば、単核細胞は主としてCD34⁻であり、予め選別されたCD34⁺細胞に加えられ得る)、インキュベーションすると、細胞表面への抗体 - ファージ結合が行われ得る。結合後、細胞を洗浄し、沈殿させ、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) コンジュゲートCD34抗体溶液およびフィコエリスリン (PE) コンジュゲートCD38抗体溶液に再懸濁する。インキュベーションおよび洗浄後、細胞選別を行うことにより、2種の別々の細胞集団; CD34⁺CD38⁺およびCD34⁺CD38⁻を集める。ファージを、低pHで2つの集団から溶離し、中和し、細菌細胞感染に使用する。次いで、ファージまたは可溶性抗体は、さらなる分析用に個々のコロニーから製造され得る。こうして、異種集団における細胞の全部または大部分に存在する構造と相互作用するファージは、CD34⁻単核細胞の存在により吸着され、CD34⁺細胞に特異的なファージの濃厚化が有効に行われる。

30

【0309】

FACS選別法に代わる方法として、CD34⁺CD38⁻細胞およびCD34⁺CD38⁺細胞に特異的な抗体/ファージ - 抗体の同定に磁気選別法も使用され得る。磁気選別法の場合、非特異抗体の高いバックグラウンドを生じ得るが、FACS選別法よりも精密さは劣り得る。

40

【0310】

標的細胞が細胞表面マーカー、例えばN.T.e.r.a.-2細胞により容易には同定され得ない場合、関連のある抗体 - ファージは、過剰の吸着性細胞の存在または非存在下でFACS選別法または磁気選別法と同じ技術を用いて同定され得る。過剰の吸着性細胞の存在下で選別する場合、興味の対象である細胞集団はビオチニル化され得、過剰の無関連吸着性細胞、例えば線維芽セルラインが加えられ、混合物に対するファージ抗体が結合され、フ

50

ァージ - 抗体が結合した興味の対象である細胞は、ストレプトタバジン - P E コンジュゲートを用いて取り出される。

【0311】

いずれの特定種類の標的細胞型であっても、吸着性細胞は、標的細胞よりもさらに分化されているか、異種または非関連細胞型のものが選択される。典型的には、吸着性細胞は標的細胞に存在する特異的表面分子を欠いているが、多くの細胞に共通する表面分子を有する。好ましい吸着性細胞は線維芽細胞である。

【0312】

また、受容体を認識する抗体をディスプレイするァージは、インターナリゼーションプロトコールを用いて同定され得る。例えば、哺乳類細胞を氷冷緩衝液（例えば、5% F B S 含有 P B S ）で洗浄し、次いで単量体または2量体抗体をディスプレイするァージミドに氷上における15分～1時間のインキュベーションの間暴露する。次いで、細胞を氷冷緩衝液で洗浄し、新鮮な培養培地へ投じ、37 でインキュベーションすることにより、インターナリゼーションさせる。次いで細胞を溶解して、インターナリゼーションされたァージミドを回収する。ァージミドは、細菌細胞へのァージミド粒子の直接感染により回収され得るか、または別法として、ァージミドは細菌細胞の電気穿孔により回収され得、ァージミドによりコードされる抗生物質耐性で選択される。

10

【0313】

別法として、受容体を認識する抗体をディスプレイするァージは、膜ふるい分けによりスクリーニングされ得る。興味の対象である細胞、例えば幹セルラインまたは N T e r a - 2 セルラインおよび非関連細胞型、例えば線維芽セルラインからタンパク質を単離する。1または2次元ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によりタンパク質を分離する。電気泳動後、タンパク質を膜支持体、例えばニトロセルロースまたはナイロンへ移動させる。タンパク質は移動前に染色され得、別法として、同一ゲルを電気泳動に用いることにより、一方は銀またはクーマシーブルーで染色されてタンパク質バンドまたはスポットが検出され得、他方は膜ふるい分けに使用される。膜の特異領域は、非関連細胞型と興味の対象であるセルラインとの比較に基いたふるい分け用に選択され得、別法として多くのスポットを含む膜の大きい方の領域が選択され得る。パターンが比較され、2種のセルライン間で異なる領域が選択され得る。これらの領域をふるい分け用固体支持体として膜から切り取る。ァージをこれらの領域に適用すると、結合が行われる。膜を洗浄し、ァージを膜から溶離し、細菌細胞へ感染させ、増幅させる。

20

30

【0314】

上記スクリーニング方法から、造血細胞または他の細胞におけるランダムな細胞表面標的に非共有結合的に結合するァージ表面にディスプレイされた抗体結合部位の多様なコレクションが構築され得る。F A C S 選別法、磁気選別法またはふるい分け後、クローンは個々に分析され得る。

【0315】

(2量体化)

ふるい分けにより高親和力抗体結合剤を分離後、アゴニスト抗体の機能的スクリーンに関するバイオアッセイを実施する。2量体化は、多くの受容体の活性化に関する先行条件であることが多いため、バイオアッセイは、2量体化の促進を介して受容体を刺激するアゴニスト抗体に焦点をあわせる。先に報告されたように、1本鎖の多価性はリンカー設計で取り組まれている。F a b フラグメントの多価性は、若干の方法で取り組まれ得る。文献における若干の最近の報告は、ァージディスプレイに適用可能な2量体抗体フラグメント形成における成果を示している（デクルイフ, J. およびログテンバーグ, T. 1996. J. Biol. Chem. 271: 7630 - 7634、パック, P. およびブラックサン, A. 1992. Biochemistry 31: 1579 - 1584、およびホリガー, P. およびウィンター, G. 1993. Current Opin. Biotech. 4: 446 - 449）。2価 F a b は少なくとも2方法で作成され得る。一法では、2量体化は、p R L 4 へ2量体化ドメインを付加することにより達成され、p R L 8

40

50

が形成される(図5B参照)。これらのベクターで利用されることにより、Fabフラグメントの多価性が得られる若干の2量体化ドメイン(lexA、Znフィンガー、fos、junなど)が存在する。2量体化ドメインは、次のjun(デクルイフ, J. およびログテンバーグ, T., J. Biol. Chem. 271: 7630-7634, 1996、コステルニー, S. A., コール, M. S. およびツォ, J. Y., J. Immunol. 148: 1547-1553, 1992)、LexA 2量体化領域(キム, B. およびリトル, J. W., Science 255: 203-206, 1992)、酵母GCN4 2量体化ドメイン(バン・ヘーケレン, W. J., セラーズ, J. W., ストルール, K., Nucleic Acids Res. 20: 3721-3724, 1992)、バクテリオファージMuからのGinインベルターゼ(スパエニー デッキング, L., シュライヒェル, E., フランケン, K., バン・デ・プッテ, P., ゴーゼン, N., J. Bacteriol. 34: 1779-1786, 1995)、エシェリキア・コリ(E. coli) NTRCタンパク質2量体化ドメイン(クローゼ, K. E., ノース, A. K., ステッドマン, K. M., クスツ, S., J. Mol. Biol. 241: 233-245, 1994)およびHSV-1 ICP4 2量体化ドメイン(ガリナリ, P., ヴィーバウエル, K., ナルディ, M. C., ジリクニイ, J., J. Virol. 68: 3809-3820, 1994)から選択されるが、これらに限定はされない。また、好熱性(thermus)生物からの高温2量体ドメインも利用され得る(マクベアス, G., カスト, P., ヒルヴァート, D., Biochemistry 37: 100062-73, 1998 およびマクベアス, G., カスト, P., ヒルヴァート, D., Science 279: 1958-61, 1998)。これらは、分子へ組込まれると、2量体化を行わせ得る機能的ドメインである。当業界の平均的技術者であれば、これらおよび他の2量体化ドメイン並びにタンパク質を2量体化するためのそれらの用途については熟知しているはずである。Fabライブラリーのふるい分けまたは選別段階後、ふるい分けされた分子のライブラリーをSacIおよびSpeIで制限し、pRL8へクローン化する。FACS選別またはふるい分け後、個々にまたは全部一緒にpRL8ベクターへサブクローニングすると、バイオアッセイで分析するための2量体可溶性結合性Fabが発現され得る。pRL8では、抗体フラグメントはペリプラズム空間へ輸送され、そこで2量体を形成する。この方法の利点は、それによって単量体Fabフラグメントのふるい分けが可能となり、高親和力Fabに適していることである。

10

20

30

【0316】

別の方法では2次抗体を使用する。pRL4は、市販されているHA.11抗体(バブコ、パーケリー、カリフォルニア)により認識される血球凝集素デカペプチド標識を有する。バイオアッセイで試験されるためFACS選別法またはふるい分けで同定されたFabを、バイオアッセイへ加える前に、2量体化を促進するHA.11と前インキュベーションする。

【0317】

(バイオアッセイ)

一旦結合性scFvがふるい分けにより同定されると、各々ファージ表面で特有の2量体化scFvを発現する、個々のクローンを標的細胞に対する増殖、分化・活性化または生存作用について試験する。さらに、可溶性2量体化scFvをバイオアッセイで試験する。選択されたファージをTop10F'へ単純形質転換すると、細菌製造可溶性scFvがペリプラズムへ分泌され得る。個々のエシェリキア・コリ(E. coli)形質転換体のライゼートは、アゴニスト作用について試験され得る。Fab抗体は2量体化のためpRL8へ移され(図5B参照)、細菌性宿主Top10F'において可溶性2量体化Fabフラグメントとして発現される。

40

【0318】

多くのバイオアッセイが、ハイスルーブットスクリーニングで使用され得る。当業界の平均的技術者であれば、これらおよび他の適当なバイオアッセイについては熟知しているはずである。DNA合成または酵素活性が分析され得る幾つかの非放射性検定法が開発され

50

た。例えば、モスマンにより報告された検定法（モスマン，T．、1983．J．Immunol．Methods 65：55-57）に基いたMTT細胞増殖検定法（カタログ番号G4000）（プロメガ・コーポレーション、マディソン、ウィスコンシン）が使用され得る。このプロトコールは迅速かつ容易であり、1日以内に結果が出る。この検定法の場合、MTT（3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド）、テトラゾリウム塩は、生きている細胞におけるミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性により青色ホルマザン生成物に変換される。デヒドロゲナーゼ含有量、従って製造された着色生成物の量は細胞数に比例する。着色生成物は、570nmでのELISAプレートリーダーで検出可能である。検定はトリプリケイトで全部一緒に96ウェルマイクロタイタープレートで遂行される。簡単に述べると、一次造血細胞または成長因子依存性セルラインを、96ウェルプレートに入れた培養培地中100 μ lアリコートで平板培養する。様々な濃度の抗体または対照成長因子を加えた後、細胞を十分な加湿雰囲気中37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO₂で48-72時間インキュベーションする。MTTを各ウェルに加え、ELISAプレートリーダーにより増殖を監視する。

【0319】

例えば、TF-1細胞を用いる増殖検定法において、抗体を発現するファージミドを含む細菌細胞を、哺乳類細胞培地および細菌培地の混合物である培地（TF-1細胞の場合：RPMI2.7/SD 0.3/Carb 100 μ g/ml）1ml中96ウェルの深いウェルプレートにおいて37 $^{\circ}$ Cで一夜培養する。TF-1細胞は、多様なサイトカインに応答するヒト骨髄赤白血球セルラインである（キタムラ，T．、タンゲ，T．、テラサワ，T．、チバ，S．、クワキ，T．、ミヤガワ，K．、ピアオ，Y．F．、ミヤゾノ，K．、ウラベ，A．、タカク，F．、Cell Physiol 140：323-334、1989、キタムラ，T．、トージョー，A．、クワキ，T．、チバ，S．、ミヤゾノ，K．、ウラベ，A．、タカク，F．、Blood 73：375-380、1989、キタムラ，T．、タカク，F．、ミヤジマ，A．、Int．Immunol 3：571-577、1991）。翌日、一夜培養物を新しいトレイへ1/10継代培養し、37 $^{\circ}$ Cで2時間放置する。37 $^{\circ}$ Cで4時間IPTGによる誘導後、プレートを室温で2000rpm/15'の遠心分離にかける。50 μ lの各培養上清を96ウェルフィルタートレー（ミリポア）で濾過し、96ウェル検定プレートを滅菌する。哺乳類細胞を前洗浄することにより、成長因子を除去し、1 \times 10⁵細胞/mlの濃度で再懸濁する。50 μ l細胞を各ウェルに加える。検定プレートを37 $^{\circ}$ C/5%CO₂インキュベーター中で72時間インキュベーションする。72時間後、1ウェル当たり40 μ lの培地/MTS/PMSを加えることにより、トレイを展開する。MTSはMTTの改良が加えられた可溶性の高いバージョンである。両検定とも、テトラゾリウム塩の細胞変換に基いている。ATM増殖検定キット（カタログ番号G5421）は、プロメガ、インコーポレイテッド（マディソン、ウィスコンシン）から購入され得る。プレートを37 $^{\circ}$ C/CO₂インキュベーターで保持し、マイクロプレート読み取り装置により1時間、4時間、8時間日にOD₄₉₀で読み取る。

【0320】

サイトカインの活性は相乗的であることが多い。相乗作用は、2種の異なる受容体ヘリガン드가結合し、次いで正確なシグナルを送ること、またはリガンダ/受容体の相互作用が細胞を促して第2サイトカインへ応答させるプライミング作用により証明され得る。さらに、リネッジ発達の初期に作用するサイトカインは、発達経路の後期段階で作用するサイトカインよりも相乗的であることが多い。従って、成長因子の最適下限濃度をこれらのバイオアッセイで使用することにより、相乗作用が調べられ得る。最適下限濃度に関する条件は各検定法に関して決定される。これは、成長因子の系列希釈液を個々におよび混合物として検定法に加え、それ未満では混合物と比較して単一因子が応答を促進しないレベル、およびそれ未満では混合物がバイオアッセイで応答を促進しないレベルを測定することにより行われる。また骨髄間質細胞をバイオアッセイで加えることにより、相乗的応答においてある一定の役割を演じ得る他の必要因子が提供され得る。

【0321】

さらに、細胞増殖は、DNA合成をモニターすることにより調べられ得る。5 - ブロモ - 2' - デオキシ - ウリジン (BrdU) 取り込み (ベーリンガー・マンハイム・インディアナポリス、インディアナ) を調べる非放射性の比色分析検定法は、マイクロタイタープレート形式で遂行され得る。ここで、細胞を96ウェルプレートで培養し、BrdUおよび最適下限濃度のサイトカインとインキュベーションする。ペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体による標識後にBrdUの量が測定される。最終結果を405nmのELISAプレート読取装置により分析する。

【0322】

増殖の指標としてDNAの合成速度を測定する放射性有糸分裂誘発検定法 (ライネスおよびロス、Methods of Enzymology, 109: 749 - 773, 1985) もまた使用され得る。これらの検定法では、標的細胞における $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み速度の変化が検査される。また、これらの検定法により、多くの抗体フラグメントの同時かつ迅速なスクリーニングが可能となる。それらは、多くの異なる細胞の成長に対する刺激および抑制作用を評価する好都合な方法として汎用されている。細胞を、指数的成長速度に達するまで懸濁液中で培養する。次いで、細胞を、培養されていた培地から洗浄除去し、新しい培地で再培養する。細胞を、約 $1 - 2 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度で総容量100 μl 中96ウェルプレートに等分する。ファージ上清の希釈液、可溶性2量体化FabまたはscFv抗体を加え、細胞を37の温度でガス供給CO₂インキュベーター中18 - 48時間インキュベーションする。インキュベーション後、 $[^3\text{H}]$ チミジン (937 kBq) を各ウェルに加え、さらに4時間インキュベーションする。次いで、細胞をインキュベーターから取り出し、ベンチトップ式マイクロプレートシンチレーション計数管、例えばパカード・トップ・カウントNXTインスツルメント (パカード、メリデン、コネティカット) で直接計数する。別法として、細胞は、ミリポア細胞採取装置 (ミリポア、ベッドフォード、マサチューセッツ) または類似装置においてGF/Cフィルターへ連続転移され得る。次いで、フィルターに保持された酸不溶性物質に伴う放射能を測定する。市販されている成長因子の希釈物を陽性対照ウェルに適用する。陰性対照には、同様に試験されたプラスミドまたは非関連抗体を含む非挿入体を担う細胞からの上清が含まれる。標準物質および試験下にあるファージ上清の希釈物の相対成長促進活性を比較して、試料における成長促進活性を定量する。

【0323】

第2メッセンジャーを検定するかまたは転写リードアウト検定により、活性化は試験され得る。

【0324】

生存は、例えば、検定法、例えばトンネル (tunnel) 検定法を用いてアポトーシスを監視することにより、または当業界の実践者に公知の他の方法により検定され得る。

【0325】

細胞シグナル伝達、キナーゼおよびホスファターゼの活性および最後にアゴニスト活性の結果としての細胞活性を分析する他の有用な検定法には、第2メッセンジャー、例えばcAMP、Ca⁺⁺、ジアシルグリセリン (DAG) およびイソシトール1, 4, 5 - トリホスフェート (IP3) 生成の測定が含まれる。ハイスループットスクリーニング検定法での細胞内カルシウム濃度、細胞内pHおよび膜電位におけるスパイクの測定は、器具、例えばFLIPRフルオロメトリック・イメージング・プレート・リーダー・システム (モレキュラー・デバイーズ、サニーヴィル、カリフォルニア) を用いて遂行され得る。若干の蛍光プローブが、第2メッセンジャー濃度検査に利用可能である (モレキュラー・デバイーズ、ユージーンOR)。また、第2メッセンジャー濃度の測定は、単一細胞レベルでも行われ得る (デベルナルディ, M. A. およびブルーカー, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4577 - 4582, 1996)。さらに、他のシグナル送信事象、例えばリン酸化、アポトーシスまたは特異遺伝子のRNAまたはタンパク質レベルを調べる検定法も有用である。例えば、大部分のサイトカインは、酵素P

I 3 - Kを活性化することが示された(シルヴェノイネン, O., イーレ, J. N., Signaling by the Hematopoietic Cytokine Receptorsで概説, R. G. ランデス・カンパニー、オースティン、テキサス、1996)。さらに、チロシンキナーゼのJak群は、サイトカイン受容体シグナル送信の中心伝達物質であることが示された(イーレ, J. N., ヴィッツン, B. A., ケレ, F. W. Annu. Rev. Immunol. 13: 369 - 398, 1995)。さらに、幾つかの他のチロシンキナーゼ、例えばSrc群の構成員は、ある種のサイトカイン刺激に応答して活性化される。RNAまたはタンパク質の場合、c-Jun、c-FosおよびNf は、サイトカイン刺激時に急速かつ一時的にアップレギュレーションされ、c-Myc誘導は緩慢である。これらのタンパク質は、G1トランジションおよび増殖に要求される(シルヴェノイネン, O., イーレ, J. N. Signaling by Hematopoietic Cytokine Receptorsにおいて概説, R. G. ランデス・カンパニー、オースティン、テキサス1996)。これらの転写物の増加を検出するハイスループットスクリーンも利用され得る。

【0326】

転写リードアウト検定法において、特異遺伝子の転写における変化は、成長因子または成長因子模倣物質(アゴニスト抗体または阻害性抗体)へ細胞を暴露した後に観察される。例えば、mycリードアウト検定において、細胞、例えばIL-3依存性FDCP-混合セルラインから8時間IL-3成長因子を奪った後、これを成長因子模倣物質または天然成長因子に37で2時間暴露する。この時点で、細胞を採取し、RNAを分離し、myc遺伝子に特異的なプライマーを用いて逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を遂行する。RT-PCR反応を水平アガロースゲル電気泳動にかけることにより、PCR産物を定量する。この場合、単一遺伝子の発現がモニターされている。

【0327】

別法として、遺伝子発現の変化に関する検定法はCHIP技術を用いて監視され得、アゴニスト抗体は、高プローブ感受性条件およびダイナミックレンジ下で同定され得る。こうして、1000以下であれば発現の変化について分析され得る。モニターされ得る所望の遺伝子としては、特にc-myc、c-jun、NF- が挙げられる。これらの遺伝子は様々なシグナル変換経路の下流であり、それらの発現は当然分裂促進因子応答時に変化する。市販されているCHIP(アフィメトリックス、サンタクララ、カリフォルニア)のタイプでは、所望の試験遺伝子からのオリゴヌクレオチドがガラス表面にプリントアウトされ得る。標的細胞を試験アゴニスト抗体に暴露する。試験アゴニスト抗体に暴露された細胞からRNAを分離し、cDNAにコピーし、そしてビオチンの存在下インビトロで転写する。インビトロ転写され、ビオチニル化されたmRNAのハイブリダイゼーションを、これらの配列におけるプローブとして使用する。次いで、チップを走査することにより、試験アゴニスト抗体への暴露時に転写の増加を示す遺伝子を測定する。CHIP技術の別のバージョン(インサイト、パロアルト、カリフォルニア)の場合、DNAの量はガラス上では正規化されないため、競合的ハイブリダイゼーションが設定される。アゴニストへの暴露の前後にRNAを細胞から分離する。各試料からcDNAを作成し、その場合cDNA反応には一標識、例えばCy-3が組み込まれており、他のcDNA集団には異なる標識、例えばCy-5が組み込まれている。シグナルを検出し、二重レーザーで比較することにより、イメージを集める。

【0328】

(視覚的検定法)

また、上記検定法で増殖応答を示す全てのscFvまたはFabについて、伝統的なメチルセルロースコロニー形成検定法(ステム・セル・テクノロジーズ、バンクーバーBC、カナダ国)により試験を行う。これらの検定法において、コロニー成長、および形態学的変化を光学顕微鏡により評価する。

【0329】

半固体寒天培養物またはメチルセルロースにおける増殖または分化作用に関する視覚的検

査は、未選別または選別一次造血細胞および幹セルライン（ステム・セル・テクノロジーズ、バンクーバーBC、カナダ国）を用いて遂行され得る（イーヴズ、C. J. Assays of Hemopoietic Progenitor cells. Williams Hematology 5 (E. ピュートラー、M. A. リヒトマン、B. S. コラーおよびT. J. キップス編)、マクグロウーヒル、インコーポレイテッド、L22-L26頁、1995)。

【0330】

造血コロニー検定法では、造血細胞の成長および分化を最大限にする培養培地が使用される。メチルセルロースを加えることにより、単一始原細胞のクローン子孫が一箇所に留まるため、異なるコロニーの認識および列挙が容易になる。必要な成分は全て塩基性メチルセルロース培地（例えばイスコヴェMDM、BSA、 β -メルカプトエタノール、L-グルタミン）に加えられ、ただしコロニー刺激因子を補う。試験抗体（ファージ上清、可溶性抗体）を加えることにより、それらが成長因子と置き換えられ得るか否かを見る。空气中5%CO₂の37℃加湿雰囲気中で抗体追加後、メチルセルロース培養中の造血細胞を10-12日間インキュベーションする。インキュベーションの10-12日後、反転顕微鏡を用いてコロニーを計数する。さらに8-10日後、コロニーを再び計数する。成長因子が存在する場合および存在しない場合の抗体および対照含有培地間の比較を行う。さらに、コロニーをメチルセルロースから選取り、ライト染料で染色することにより個々の細胞が細胞学的に検査され得る（Atlas of Hematological Cytology参照、F. G. J. ヘイホーおよびR. J. フレマンズ、ウィリー-インターサイエンス 1970)。

10

20

【0331】

視覚的検定法の別の例は、骨髓細胞とのピチア共培養である。例えば、1回またはそれ以上のFACSまたは磁気選別法によるCD34⁺またはヒト胎児肝臓ライブラリーのふるい分け後、抗体遺伝子を、ふるい分けされたライブラリーからピチア発現ベクターへクローン化することにより、抗体遺伝子はpGAPプロモーターの制御下におかれ、 β -因子先導配列を用いて細胞から分泌される（インビトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア）（ダス、R. C.、シュルツ、J. L.、レーマン、D. J.、Mol. Gen. Genet. 218:240-8、1989)。ピチア形質転換体（Pichia transformants）をYPD+ゼオシンで選択する。コロニーを「イスコヴェスプレート」（イスコヴェス培地+寒天）にレプリカ平板培養する。細胞を5mlイスコヴェス培地中プレートからこすり落とし、遠心分離し、0.6mlのイスコヴェス培地に再懸濁し、計数する。加えられた成長因子（カタログ#4230ステム・セル・テクノロジーズ、バンクーバーBC、カナダ国）を含まないメチルセルロース培地を解凍する。5000のピチア細胞および50000のヒト骨髓CD34⁺細胞を、3cm皿1枚につき培地中で培養する。37℃5%CO₂の加湿雰囲気中でプレートをインキュベーションする。5-12日目に評価を行う。骨髓コロニーが示されると、近くの酵母をメチルセルロースから摘み取り、同様の方法で再試験する。抗体遺伝子は、全細胞PCRおよびECORIIによる制限消化によりピチアからフィンガープリンティングされ得る。培地へ放出される抗体を精製し、FACS選別法で使用するすることにより、他の既知フルオレセインコンジュゲート抗体の存在下、抗体が結合する細胞の集団が検査され得る。ここで、1次抗体は酵母から分泌される。2次抗体は、HA.11-FITCコンジュゲート（バブコ、パーケリー、カリフォルニア）である。

30

40

【0332】

（幹細胞検定法）

幹細胞特異的検定法で同定された候補を、血清不含有培地でのそれらの再生刺激能力（ステム・セル・テクノロジーズ、バンクーバーBC、カナダ国）、およびアゴニスト存在下で培養された細胞が長期培養開始細胞（LTC-IC）を生じる能力についてさらに分析する（ステム・セル・テクノロジーズ、バンクーバーBC、カナダ国）。LTC-ICをインビトロ拡張させると思われるアゴニストを、制限酵素フットプリント法およびDNA

50

配列決定を含むDNA分析にかけることにより、特有のクローンが同定される。特有のアゴニストをさらに検定することにより、アゴニストの存在下で培養された細胞が、放射線照射マウス（ホジソン，G.S.およびブラドレイ，T.R.、Nature 281: 381-382、1979、ハリソン，D.E.、Blood 55: 77-81、1980）またはNOD/SCIDマウス（コネアリー，E.、カシュマン，J.、ペッツァー，A.、イアーズ，C.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 9836-9841、1997）において長期移植を支持するか否かを測定する。これらの基準により興味深いものであることが判明したアゴニストを配列分析、結合性試験にかけ、使用することにより、免疫沈降、タンパク質配列分析およびデータベース検索を通して受容体が同定される。

10

【0333】

(受容体の作用)

受容体が未知の場合でも、受容体がキナーゼをコードするかまたは受容体がキナーゼ活性を誘発する場合、試験化合物（抗体）の存在下で受容体含有膜抽出物を[- 32P] ATPとインキュベーションすることにより、受容体リン酸化が検査され得る。次いで、ゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーにより、抽出物を受容体リン酸化について検査する。受容体リン酸化を調べるこれらおよび他の技術は、当業界実践者には熟知されている。

【0334】

(抗体の合成)

一旦抗体フラグメントがバイオアッセイで同定されると、それらは可溶性抗体フラグメントとして高レベル発現に関して選択される。可溶性ScFvフラグメントまたはFabフラグメントは、細菌性宿主、例えばTop10F'（インピトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア）で分離され得る。

20

【0335】

細胞の単一コロニーを成長させ、ベクターで遺伝子操作されたHis6配列を用いて、例えばニッケル-キレートクロマトグラフィー方法により可溶性抗体フラグメントを精製する。

【0336】

当業界の平均的技術者が公知技術を用いれば、他の生物体、例えば酵母、哺乳類、昆虫および植物でも抗体を合成することができるはずである（カールソン，J.R.およびワイスマン，I.L.、Mol. Cell. Biol.、8: 2647-2650、1988、トリル，J.J.、シャツマン，A.R.、ガングリー，S.、Curr. Opin. Biotechnol. 6: 553-560、1995、ハイアット，A.、カファーキー，R.、パウディッシュ，K.、Nature 342: 76-78、1989）。

30

【0337】

(実施例2：成長因子受容体の同定)

増殖および/または分化していると思われる細胞型によって、第1世代アゴニスト分子を範ちゅうに分類した。受容体は、免疫沈降およびアフィニティークロマトグラフィーおよび化学的架橋、次いでタンパク質配列決定およびデータベース検索を含む若干の方法を用いて同定され得る。

40

【0338】

免疫沈降では、細胞を放射性標識し、デタージェント、例えばトリトンX-100の存在下で溶解し、そして結合タンパク質を抗体により沈降させ、SDS-PAGE、次いでオートラジオグラフィーにより分析し得る。従って、これにより受容体の検出、その分子サイズの特性検定、および他のサブユニットまたは会合タンパク質の同定が行われる。さらに、タンパク質を電気泳動的にポリビニリデンジフルオリド(PVDF)のシートへ移動させ、クーマシーブルーで染色し得る。分離されたバンドを取り出し、自動タンパク質配列決定装置で分析した後、データベース検索することにより、その受容体が新規であるか、以前に同定されたものであるかを測定することができる。さらに、タンパク質をタンパ

50

ク質分解酵素で開製することにより、内部アミノ酸配列が測定され得る。

【0339】

慣用的免疫アフィニティー精製では、抗体を固体相マトリックスに共有結合的に結合させる。典型的には、抗体をセファロースに結合させる。細胞ライゼートをデタージェント、例えばトリトンX-100の存在下で製造して内在性膜タンパク質を溶解および可溶化したものを製造する。ライゼートをカラムに適用し、カラムを洗浄し、高pHまたは低pH緩衝液への短時間暴露により結合タンパク質を溶離する。各々に続いて、部分アミノ酸配列決定およびデータベース検索を行う。別法として、特異的溶離は、可溶性scFvにより行われ得る。プレカラムを用いて非特異的結合を低減化することが多い。多数の種類が存在する場合、無傷細胞への放射性標識scFvの細胞表面放射性受容体架橋によりどれがアゴニストに関するリガンド結合性サブユニットであるかが決定され得る。 10

【0340】

また、発現クローニング方法も使用され得る。cDNAライブラリーは、抗体に応答する細胞から構築される。ライブラリーは哺乳類発現ベクターへクローン化され、哺乳類細胞へトランスフェクションされる。受容体を発現する細胞は、アフィニティークロマトグラフィーまたは「常用のふるい分け」により同定され、その場合単一種の抗体ファージが、各々異なるcDNAクローンを発現している細胞のプールと接触した状態に置かれている。

【0341】

一旦受容体が同定されると、それは標準分子生物学的技術を用いてクローン化され得る。哺乳類細胞において受容体をコードするcDNAによる一時的トランスフェクション検定法を実施することにより、それが抗体の認識する受容体であることが立証され得る。例えば、COS細胞は、受容体発現に利用され得る(ネイル, J. D., セラズ, J. C., マスグロブ, L. C., ダック, L. W., Mol. Cell. Endocrinol., 127: 143-154, 1997)。 20

【0342】

(天然リガンドの同定)

新たに同定された受容体の天然リガンドは、哺乳類細胞または酵母、好ましくは通常では受容体を発現しない細胞において、受容体を異種発現することにより同定され得る。発現されたcDNAライブラリーから分泌された因子のプールは、受容体発現細胞に加えられ、アゴニストの同定に使用されたのと同じバイオアッセイで分析され得る(リー, F., Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 4360, 1985, 参照)。一時的発現系に加えて、レトロウイルスベクターにおける永久発現系もまたこれらの検定法で使用され得る(レイナー, J. R. およびゴンダ, T. J., Mol. Cell. Biol., 14: 880, 1994)。陽性応答は、特異的リガンドcDNAを発現する個々のクローンへリンクされる。さらに、リガンドおよびアゴニスト抗体(ただし、¹²⁵Iまたは蛍光化合物により標識されている)により競合実験が遂行され得る。 30

【0343】

当業界の平均的技術者であれば、受容体が判明した場合に天然リガンドを同定するこれらおよび他の技術については熟知しているはずである。 40

【0344】

(阻害性抗体に関するスクリーニング)

阻害性抗体は、アゴニスト抗体に関するスクリーニングに使用されたのと同じ検定法、ふるい分けおよびバイオアッセイを用いてスクリーニングされる。しかしながら、バイオアッセイでは、追加の成長因子、例えばIL-3を培養に含ませることにより、細胞を成長させ得、増殖、分化、生存または活性化の阻害が観察される。

【0345】

(実施例3:造血細胞および他の細胞型に対するファージディスプレイライブラリー)

次の細胞またはセルライン:ヒト骨髓単核細胞、ヒト骨髓CD34⁺細胞、RBC溶解を被ったヒト骨髓細胞、ヒト胎児肝細胞、ヒトNTera-2セルライン、ネズミP19セ 50

ルラインおよびマウス F D C P - 混合セルラインにより、動物（ウサギ）を個々に免疫化した。実施例 1 のプロトコールに従い、3 週間の間隔で 3 - 5 回強い陽性応答が検出されるまでウサギを全細胞により免疫化した。

【0346】

免疫化の前、約 5 m l の血液を各動物から採血した。直ちに血液を凝固させ、遠心分離にかけ、細胞を沈殿させ、血清を新しい管に移すことにより血液を血清に加工処理した。各動物からの血清を - 20 で貯蔵した。初回免疫化および 2 回のブースト後、血液を再び各動物から集め、血清に加工処理した。免疫前血清を免疫後血清と比較しながら全細胞 E L I S A を遂行した。血清の希釈物、例えば P B S 中 5 % 牛乳中で 1 / 50、1 / 100、1 / 500、1 / 1000、1 / 5000 を製造した。免疫化に使用したのと同タイプの細胞 (1×10^6) をプレートに適用し、血清希釈物を加え、細胞をインキュベーションした。2 次抗体は、試験されている宿主動物 I g G に対する酵素コンジュゲート抗体、例えばヤギ抗ウサギ I g G アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートまたはペルオキシダーゼコンジュゲートであった。結果を視覚的に読み取るか、またはプレートを遠心分離し、上清を除去し、E L I S A プレート読み取りのため新しいウェルに入れた。読取り値をグラフ化することにより、半最大血清応答、または最大応答と同等またはその半分の応答を与える希釈物を測定した。

10

【0347】

陽性応答が検出されると、動物を殺し、脾臓、骨髄および末梢血リンパ球を集めた。R N A をこれらの器官から分離し、実施例 1 と同様にライブラリーを構築することにより、ファージミド表面にディスプレイされた抗体フラグメントライブラリーが作成された。連結反応を E R 2 5 3 7 へ電気穿孔した。小アリコートで培養して、実施例 1 と同様にライブラリーのクローニング効率および潜在的な多様性を測定した。結果を表 2 に示す。

20

【0348】

【表 2】

表2

A b の名称/型	抗原	血清応答	潜在的多様性
B1/scFv短	hBM単核細胞	1/300	5.2×10^7
B2/scFv長	hBM単核細胞	1/300	1.3×10^8
B3/キメラ Fab	hBM単核細胞	1/300	1.6×10^8
F1/scFv短	hBM CD34+	1/400	3.0×10^8
F2/scFv長	hBM CD34+	1/400	1.5×10^8
F3/キメラ Fab	hBM CD34+	1/400	5.2×10^8
G1/scFv短	hBM CD34+	1/1000	2.3×10^8
G2/scFv長	hBM CD34+	1/1000	1.9×10^8
J1/scFv短	hBM RBC融解	1/250	3.5×10^8
J2/scFv長	hBM RBC融解	1/250	4.1×10^8
K1/scFv短	hBM RBC融解	1/1000	5.3×10^8
K2/scFv長	hBM RBC融解	1/1000	4.9×10^8
T1/scFv短	h肝臓	1/1000	1.8×10^9
T2/scFv長	h肝臓	1/1000	1.9×10^9
U1/scFv短	h肝臓	1/750	5×10^8
U2/scFv長	h肝臓	1/750	1.6×10^9
PQ1/scFv短	n Ntera-2	1/500	nd
PQ2/scFv長	h Ntera-2	1/500	nd
MN1/scFv短	m P19	1/500	1.0×10^9
MN2/scFv長	m P19	1/500	2.5×10^9
BBCC1/ scFv短	m FDCP-混合	1/1000	nd
BBCC2/ scFv長	m FDCP-混合	1/1000	nd
h = ヒト BM = 骨髄 m = ネズミ nd = 実際値は未測定。			

10

20

30

当業界の平均的技術者であれば、上記プロトコルを用いて他の動物、例えばニワトリを、他の細胞型および系統、例えば卵黄嚢細胞、ネズミ A G M 領域から誘導された細胞、ネズミ多能性胚性細胞、ヒト胚性幹 (E S) セルライン、神経起源の細胞、器官または組織再生に参与する細胞で免疫化することにより、若干の細胞型で様々な受容体に対してファージディスプレイ抗体フラグメントの追加ライブラリーが作成され得ることは認めるところである。

40

【 0 3 4 9 】

(医薬製剤および投与経路)

ここに記載された薬剤は、ヒト患者自体に対し、またはそれを適当な担体または賦形剤 (複数も可) と混合した医薬組成物で投与され得る。本発明化合物の製剤および投与技術については、 " Remington ' s Pharmaceutical Science s " マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、ペンシルベニア、最新版に記載されている。

【 0 3 5 0 】

(投与経路)

適当な投与経路としては、例えば経口、直腸、経粘膜または腸管投与、非経口デリバリー

50

、例えば筋肉内、皮下、骨髄内注射、並びに鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内または眼内注射が挙げられる。

【0351】

別法として、薬剤は、全身的ではなく局所的に投与され得る。

【0352】

さらに、薬剤は、標的とされる薬剤送達系、例えば腫瘍特異抗体で被覆されたりリポソームで投与され得る。リポソームは、標的とされ、腫瘍により選択的に取り込まれる。

【0353】

(組成物/製剤)

本発明の医薬組成物は、自体公知の方法で、例えば慣用的な混合、溶解、造粒、糖衣錠形成、糊状化、乳化、カプセル封入、包括(固定)化または凍結乾燥方法を使って製造され得る。

10

【0354】

すなわち本発明に従い使用される医薬組成物は、医薬的に使用され得る製剤へ活性分子を加工処理し易くする賦形剤および補助剤を含む1種またはそれ以上の生理学的に許容し得る担体を用いて常法により製剤化され得る。適切な製剤は、選択された投与経路により異なる。

【0355】

注射の場合、本発明薬剤は、水溶液、好ましくは生理学的に適合し得る緩衝液、例えばハanks溶液、リンゲル液または生理食塩緩衝液で製剤化され得る。経粘膜投与の場合、浸透される障壁に適した浸透剤が製剤において使用される。上記浸透剤は当業界では公知である。

20

【0356】

経口投与の場合、薬剤は、当業界で公知の医薬的に許容し得る担体と活性分子を合わせるにより、容易に製剤化され得る。上記担体により、本発明化合物は、処置される患者による経口摂取用の錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化され得る。経口投与用医薬製剤は、固体賦形剤を用い、所望により生成した混合物を粉碎し、適当な補助剤を添加後に顆粒混合物を加工処理すると、所望ならば、錠剤または糖衣錠コアが得られる。適当な賦形剤は、特に充填剤、例えば糖類、例えば乳糖、しょ糖、マンニトールまたはソルビトール、セルロース製剤、例えば、とうもろこし澱粉、小麦澱粉、米澱粉、ジャガイモ澱粉、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび/またはポリビニルピロリドン(PVP)である。所望ならば、崩壊剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムが添加され得る。

30

【0357】

糖衣錠コアには、適当なコーティングが施される。この目的の場合、濃縮糖溶液が使用され得、所望によりアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物が含まれ得る。染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに加えることにより、活性化化合物用量の異なる組み合わせが同定または特性検定され得る。

40

【0358】

経口使用され得る医薬製剤は、ゼラチンでできたプッシュフィット(押ばめ)式カプセル、およびゼラチンでできた軟性封入カプセルおよび可塑剤、例えばグリセリンまたはソルビトールを含む。プッシュフィット式カプセルは、充填剤、例えば乳糖、結合剤、例えば澱粉、および/または滑沢剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウムおよび、所望により安定剤と混合した形で有効成分を含み得る。軟カプセルでは、活性化化合物は、適当な液体、例えば脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤も添加され得る。経口投与用製剤は全て、上記投与に適した用量とすべきである。

50

【0359】

類投与の場合、薬剤は、慣用的方法で製剤化された錠剤またはトローチ剤形態を取り得る。

【0360】

吸入投与の場合、本発明に従い使用される薬剤は、好都合には加圧パックまたは噴霧器からのエアゾル噴霧状形態で送達され、その場合適当な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスが使用される。加圧エアゾルの場合、取りつけられた弁で計量された量を送達することにより用量単位が決定され得る。例えば吸入器または吹送器で使用されるゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物および適当な粉末基剤、例えば乳糖または澱粉の粉末混合物を含む形で製剤化され得る。

10

【0361】

薬剤は、注射、例えばボラス注射または連続注入による非経口投与用に製剤化され得る。注射用製剤は、保存剤が添加された、単位用量形態、例えばアンプルまたは多用量容器で提供され得る。組成物は、油状または水性賦形剤中懸濁液、溶液または乳液といった形態をとり得、製剤用薬剤、例えば懸濁剤、安定剤および/または分散剤を含み得る。

【0362】

非経口投与用医薬製剤は、水溶性形態の活性分子水溶液を含む。さらに、活性分子の懸濁液は、油状注射懸濁液として製造され得る。適当な親油性溶媒または賦形剤には、脂肪油、例えばごま油または合成脂肪酸エステル、例えばエチルオレートまたはトリグリセリド、またはリポソームが含まれる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘稠性を高める物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含み得る。所望により、懸濁液はまた、適当な安定剤または化合物の溶解度を高める薬剤を含有することにより、高濃縮液の製造が可能となり得る。

20

【0363】

別法として、有効成分は、使用前に適当な賦形剤、例えば滅菌発熱物質不含有水により構成される粉末形態であり得る。

【0364】

薬剤はまた、直腸用組成物で、例えば慣用的坐剤基剤、例えばココアバターまたは他のグリセリドを含有する、例えば坐剤または停留浣腸として製剤化され得る。

30

【0365】

先に記載された製剤に加えて、薬剤はまた、デポ製剤として製剤化され得る。上記長期作用製剤は、内植（例えば皮下または筋肉内）または筋肉内注射により投与され得る。すなわち、例えば、薬剤は、適当なポリマー性または疎水性材料（例えば許容し得る油中エマルジョンとして）またはイオン交換樹脂により、または低可溶性誘導体として、例えば低可溶性塩として製剤化され得る。

【0366】

本発明の疎水性薬剤用医薬用担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマー、および水相を含む共溶媒系である。共溶媒系は、V P D 溶媒系であり得る。V P D は、3 % w / v ベンジルアルコール、8 % w / v の非極性界面活性剤ポリソルベート 80 および 65 % w / v ポリエチレングリコール 300 に無水エタノールを適量加えて容量を満たした溶液である。V P D 共溶媒系（V P D : 5 W）は、水溶液中 5 % デキストロースで 1 : 1 希釈した V P D により構成される。この共溶媒系は疎水性化合物でも十分溶解し、それ自体全身投与しても毒性は低い。当然、共溶媒系の比率はその溶解度および毒性特性を破壊することなくかなり変動され得る。さらに、上記共溶媒成分も他の成分に変えられ得る。例えば他の低毒性非極性界面活性剤がポリソルベート 80 の代わりに使用され得る。ポリエチレングリコールのフラクションサイズも変動され得る。他の生物適合性ポリマーでも、ポリエチレングリコールの代わりに使用され得、例えばポリビニルピロリドンがある。他の糖類または多糖類もデキストロースの代わりに使用され得る。

40

【0367】

50

別法として、疎水性医薬化合物用の他の送達系が使用され得る。リポソームおよびエマルジョンは、疎水性薬剤用のデリバリー賦形剤または担体のよく知られた例である。ある種の有機溶媒、例えばジメチルスルホキシドもまた使用され得るが、通常は毒性が大きくなるという犠牲を払うことになる。さらに、化合物は、持続放出系、例えば治療剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを用いて送達され得る。様々な持続放出マトリックスは既に確立されており、当業界の技術者により熟知されている。持続放出性カプセルは、それらの化学的性質によって、数週間以下から100日を越える期間にわたって化合物を放出し得る。治療用試薬の化学的性質および生物学的安定性により、タンパク質安定化のための追加的方法が用いられ得る。

【0368】

医薬組成物はまた、適当な固体またはゲル相担体または賦形剤を含み得る。上記担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチンおよびポリマー類、例えばポリエチレングリコールがあるが、これらに限定はされない。

【0369】

本発明薬剤の多くは、医薬的に和合し得る対イオンを伴う塩類として提供され得る。医薬的に和合し得る塩類は多くの酸により形成され得、例えば塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等があるが限定的ではない。塩類は、対応する遊離塩基形態である水性または他のプロトン性溶媒に溶け易くなる傾向がある。

【0370】

(有効用量)

本発明での使用に適した医薬組成物は、有効成分がその意図された目的を達成するのに有効な量で含まれている組成物を包含する。さらに具体的には、治療有効量とは、処置されている対象の病気の症状を予防、軽減または改善するかまたは生存期間を延長するのに有効な薬剤量を意味する。治療有効量の決定は、当業界の技術者が特に本明細書における詳細な開示を考慮すれば十分にできる範囲内のことである。

【0371】

本発明方法で使用されているいずれかの薬剤の場合、治療有効用量は、細胞培養検定から最初に評価され得る。例えば、動物モデルにおいて、細胞培養で測定された IC_{50} (例、細胞増殖または分化を促進または阻害する試験分子濃度)を含む循環濃度範囲を達成する
30

【0372】

本明細書に記載されている薬剤の毒性および治療効力は、例えば、 LD_{50} (集団の50%にとって致死的な用量)および ED_{50} (集団の50%において治療上有効な用量)を測定するための細胞培養物または実験動物における標準製薬的方法により測定され得る。毒性および治療効果間の用量比は治療指数であり、それは LD_{50} および ED_{50} 間の比として表わされ得る。高い治療指数を呈する分子が好ましい。これらの細胞培養検定および動物試験から得られたデータは、ヒトに使用される用量範囲の製剤化で使用され得る。上記分子の用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を伴わない ED_{50} を含む循環濃度の
40

【0373】

服用量および間隔を個々に調節することにより、細胞の増殖または分化を促進または阻害するのに十分な活性部分の血漿レベルまたは最少有効濃度(MEC)が提供され得る。MECは各薬剤によって変化するが、記載された検定法を用いてインビトロデータから評価され得る。MECの達成に必要な用量は、個々の特性および投与経路により異なる。しか
50

しながら、HPLC検定法またはバイオアッセイを用いることにより、血漿濃度が測定され得る。

【0374】

服用間隔はまた、MEC値を用いて決定され得る。時間の10 - 90%、好ましくは30 - 90%および最も好ましくは50 - 90%の間MECを越える血漿レベルを維持する摂取法を用いて化合物を投与するべきである。

【0375】

局所投与または選択的摂取の場合、薬剤の有効局所濃度は、血漿濃度とは関連し得ない。

【0376】

勿論、投与される薬剤の量は、処置されている対象、対象の体重、苦痛の重症度、投与方法および担当医の判断によって異なる。 10

【0377】

(治療)

本発明の請求の範囲に含まれる抗体および因子は、様々な臨床的に関連のある細胞型の増幅に有用である。処置は、インビボまたはエクシボであり得る。例えば、アゴニスト抗体は、例えば患者に存在する所定の系統(複数も可)の細胞数が正常値より少ない場合である造血抑制に関連した病気、障害または処置により誘発される造血細胞集団の欠乏に苦しむ患者の処置に有用である。以下、本発明の請求の範囲に記載された抗体および因子で処置され得る状態の僅か一部ではあるが例が示されており、当業界の実践者であれば上記処置から利益を被る他の疾患および状態を同定できるはずである。例えば、HIV感染患者、化学療法を受けている患者、骨髄移植患者および骨髄増殖性疾患に苦しむ患者が示す特異的造血系統のレベルは正常より低い。好中球減少症は、循環している末期分化好中球の数の減少である。好中球減少症は、ウイルスおよび重度細菌感染症、薬剤、例えばある種の抗生物質および抗痙攣薬への暴露、自己免疫プロセス、例えば全身性エリテマトーデスに見られる病状、骨髄浸潤性プロセス、例えば白血病、転移性腫瘍および骨髄線維症、および先天性代謝異常、例えばプロピオン酸血症およびイソ吉草酸血症を含む、若干の病態生理学的状態に二次的またはそれに随伴して現れる。慢性原発性好中球減少疾患の中には、例えば周期性好中球減少症のように遺伝的に伝わるものもあるが、他は免疫機能障害に随伴して発生し、例えばエプスタイン バールウイルスまたはヒト免疫不全ウイルス感染により発症する。他の病状は、シュバツハマン症候群を含む慢性特発性好中球減少症、X連鎖無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症および機能低下細胞性免疫に随伴し得る。後天性顆粒球減少症は、骨髄での顆粒球産生が損なわれたことによる循環血中における顆粒球数の低減化を特徴とする血液疾患である。腎臓透析を受けている患者は、赤血球レベルが正常値より低い処置関連の貧血を患うことが多い。再生不良性貧血では、骨髄抑制が汎血球減少を誘発し得るかまたは赤血球、白血球または血小板にのみ影響を及ぼし得る。アゴニスト抗体および因子により、特異細胞集団、例えば造血細胞の欠乏を特徴とするこれらおよび他の病気および障害に対する治療剤の医療設備は増大される。 20 30

【0378】

本発明の請求の範囲に含まれる抗体および因子はまた、臨床的に関連のある細胞型の抑制に有用である。例えば、造血細胞集団の異常増殖には、患者に存在する所定の系統(複数も可)の細胞の数が正常より多い疾患がある。慢性骨髄性白血病は、造血幹細胞における染色体転座の存在に起因する骨髄増殖を特徴とする病気である。血小板減少症は、巨核球数の増加を特徴とする病気である。真性赤血球増加症は、顆粒球、単球、および血小板数並びに赤血球数が通常高い骨髄増殖性症候群の一形態である。この病気は、過剰増殖する幹細胞の腫瘍性クローンにより誘発される。アレルギー疾患、例えば鼻炎、喘息および湿疹では、好塩基性細胞、マスト細胞および好酸球の過剰生産が存する。本発明の請求の範囲により示された好酸球、マスト細胞および好塩基性細胞生産の阻害物質は、重症アレルギー患者に対する治療薬として役立つ。さらに、阻害物質を化学療法で臨床的に使用することにより、正常細胞の増殖が抑制され得、癌細胞は細胞周期を通して増殖を続行するため化学療法剤に対する感受性が高められる。 40 50

【0379】

また本発明の請求の範囲に含まれる分子は、細胞のエクスピボ増殖および分化に使用され得る。これは遺伝子治療目的、例えば伝統的なウイルスベクター方法、および自己骨髄移植に有用である。造血始原細胞への遺伝子の転移は、悪性および非悪性疾患に対する遺伝子治療の主要目標である。使用されている大部分の遺伝子治療ベクターは、細胞DNAへのウイルスゲノムの組込みに関する有糸分裂を必要とする。単一幹細胞が分裂して多くの子孫細胞を形成するため、組込みは好ましい。ベクター露出前または間に投与されたアゴニスト抗体、因子または上記の組み合わせ、幹細胞のエクスピボ増殖を促進し得る。

【0380】

さらに、本発明の抗体は、放射線免疫治療用に放射性標識され得るかまたは毒素にコンジュゲートされて上記毒素を特異細胞型に送達することにより、それらの細胞を殺し得る。 10

【0381】

(診断および精製)

請求の範囲に含まれる分子は、細胞系統に特異的な抗体フラグメントが、蛍光マーカースにコンジュゲートされているかまたは1次抗体として使用され、それに伴う2次抗体が蛍光マーカースにコンジュゲートされる診断で使用され得、またフロー・サイトメトリー分析で使用されることにより、例えば患者の血液または骨髄において、臨床的に関連のある細胞型を同定し得る。さらに、これらの分子は、細胞分離方法、例えば蛍光活性化細胞選別法(FACS)または磁気選別法で使用され得る。蛍光活性化細胞選別法では、蛍光分子で標識した細胞をフロー・サイトメーター、例えばベクトン・ディッキンソン(サンホセ、カリフォルニア)FACSIVサイトメーターまたは均等内容の器具で電子的に選別する。 20
蛍光分子は、特異的細胞表面抗原を認識する抗体である。抗体を、蛍光マーカース、例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリスリン(PE)にコンジュゲートする。磁気選別法では、抗体を磁気マイクロビーズに直接的または間接的にコンジュゲートする。細胞は、細胞表面分子、例えば増殖、分化、活性化または生存に
関与する受容体を認識するアゴニスト抗体または阻害性抗体でプレコーティングされる。抗体は、アゴニスト抗体または阻害性抗体、例えば各抗体へ遺伝子操作されたHA分子標識に結合する2次免疫グロブリンとコンジュゲートした磁気ビーズに結合される。次いで、細胞を磁石で取り除く。磁気選別法は、興味の対象である細胞が抗体すなわち磁石により結合されている正の選択、または望ましくない細胞を磁石上へ分離する負の選択であり 30
得る。

【0382】

別法として、放射性標識抗体は、診断目的に使用され得る。

【0383】

他の態様も請求の範囲内に含まれる。

【0384】

【発明の効果】

本発明により、細胞表面分子に対するアゴニスト抗体の製造方法、細胞の増殖、分化または活性化に関する阻害性抗体の製造方法、ならびに細胞の増殖、分化、生存または活性化に
関与する受容体に対するアゴニスト抗体または阻害性抗体の同定方法が提供される。 40

【0385】

本発明の同定およびスクリーニング方法は、迅速性、費用効果および単純さを含め、慣用的スクリーニング方法を凌ぐ幾つかの実践的な利点を呈する。現行方法はまた、同時多試料分析法を提供するもので、さらに多くのAbフラグメントがスクリーニングに利用可能となる。

【0386】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ALEXIONANTIBODY TECHNOLOGIES, INC.

<120> METHODSAND COMPOSITIONS FOR THE IDENTIFICATION
OF GROWTH FACTORMIMETICS, GROWTH FACTORS
AND INHIBITORS

10

<130> F1-03L90806

<150> US60/072,253

<151> 1998-01-23

<160> 36

20

<170> FastSEQfor Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

30

<400> 1

cacca**tg**gcgcata**cc**cgta cgacg**tt**ccg gactacg**ctt** c**tt**aggag**gg** **tg**gt**gg**ctct 60

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

40

<213>SYNTHETIC

<400> 2

gcttacaatttcccagatctgcg

23

<210> 3

10

<211> 70

<212> DNA

<213>SYNTHETIC

<400> 3

gaggaggaggaggagac tagtggccag gccggccagc accatcacca tcaccatggc
gcatacccg

60

70

20

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213>SYNTHETIC

30

<220>

<223> The letter "m" stands for a or c.

<400> 4

gggccaggcggccgagctc gtgmtgaccagactcca

38

40

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "m" stands for a or c.

<400> 5

10

gggcccaggccggccgagctc gaimtgaccagactcca

38

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 6

~~gg~~ccccagggcccgagctc gtgatgaccagactgaa

38

10

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<490> 7

~~gg~~ccccagggcccgagctc gtgctgactcagtcgccctc

40

20

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 8

ggaagatctagaggaaccac ctaggatctc cagctcggctcc

42

30

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

40

<213> SYNTHETIC

<400> 9

ggaagatctagaggaaccac ctttgatttc cacatiggtgcc 42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "s" stands for c or g.

<400> 10

ggaagatctagaggaaccac ctttgacsac caccicgggtccc 42

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 11

ggaagatctagaggaaccac cgctgtgac ggtcagctgggtccc 45

<210> 12

<211> 42

10

20

30

40

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "r" stands for a or g.

<400> 12

10

ggigggttcctctagatcttc ccagtcgggtg gaggagtcrrgg

42

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

20

<400> 13

ggigggttcctctagatcttc ccagtcgggtg aaggagtcrrgag

42

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

30

<220>

<223> The letter "y" stands for c or t.

<400> 14

40

ggtaggttcctctagatcttc ccagtcgytg gaggagtccggg

42

<210> 15

<211> 44

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

10

<220>

<223> The letter "s" stands for c or g.

The letter "r" stands for a or g.

<400> 15

ggtaggttcctctagatcttc ccagsagcag ctgrtggagtccgg

44

20

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "y" stands for c or t.

30

<400> 16

ccctggccggcctggccacta gtgactgayg gaggccttaggttgccc

41

<210> 17

<211> 41

40

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 17

gaggaggaggaggaggaggc gggcccagg cggccgagct c 41

10

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 18

20

gaggaggaggaggaggagcc tggccggcct ggccactagtg 41

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

30

<400> 19

agatggcagccacagttc gtttgatttc cacattggtg cc 42

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

40

<400> 20

aga**tggtgcagccacagttc gtaggatctc cagctcgggtccc** 42

<210> 21

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

10

<220>

<223> The letter "s" stands for c or g.

<400> 21

20

aga**tggtgcagccacagttg cttgacsac caccctcgggtccc** 42

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

30

<400> 22

aga**tggtgcagccacagttc ggctgtgac ggtcagctgggtccc** 45

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

40

<400> 23

cgaactgtggctgcaccatctgtc

24

<210> 24

<211> 21

10

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 24

ggccaiggctggttgggcagc

21

20

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "r" stands for a or g.

30

<400> 25

gctgccaaccagccaiggc ccagtcggtg gaggagtcrrgg

42

<210> 26

<211> 42

40

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 26

gcigcccaaccagccaiggc ccagtcggtg aaggagtcgag 42

<210> 27

<211> 42

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "y" stands for c or t.

<400> 27

gcigcccaaccagccaiggc ccagtcgytg gaggagtcggg 42

<210> 28

<211> 44

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<220>

<223> The letter "s" stands for c or g.

The letter "r" stands for a or g.

<400> 28

10

20

30

40

gctgccaaccagccaatggc ccagsagcag ctgrtggagtcgg

44

<210> 29

<211> 45

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

10

<220>

<223> The letter "r" stands for a or g.

The letter "y" stands for c or t.

<400> 29

cgatggcccttggagg ctgargagay ggtgaccagggtgcc

45

20

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 30

30

gcctccaccaaggcccatcggc

24

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

40

<400> 31

agaagcgtagtcggaacgtc

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

10

<400> 32

gctgcccaccagccatggcc

21

<210> 33

<211> 39

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

20

<400> 33

gaggaggaggaggagag aagcgtagtcggaacgtc

39

30

<210> 34

<211> 15

<212> DNA

<213> SYNTHETIC

<400> 34

40

ggagaagaggaacc**15****<210> 35****<211> 21****<212> DNA****<213> SYNTHETIC****<400> 35**

10

gggggttcgtctagatctcc**21****<210> 36****<211> 33****<212> DNA****<213> SYNTHETIC****<400> 36**

20

cccaccaccgcccagaccac cgccaccagagga**33****【図面の簡単な説明】**

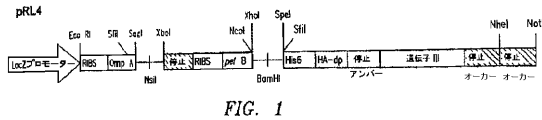
30

【図 1】 図 1 は、ファージディスプレイに使用されるベクターの概略図を示す。**【図 2 a】** 図 2 a は、s c F v クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 2 b】** 図 2 b は、s c F v クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 3 a】** 図 3 a は、F a b クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 3 b】** 図 3 b は、F a b クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 3 c】** 図 3 c は、F a b クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 3 d】** 図 3 d は、F a b クローニング計画で使用されるプライマーの概略図を示す。**【図 4】** 図 4 は、S c F v クローニング計画の概略図を示す。

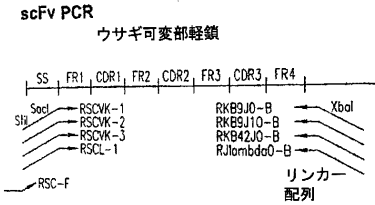
40

【図 5 a】 図 5 a は、F a b クローニング計画で使用されるベクターの概略図を示す。**【図 5 b】** 5 b は、F a b クローニング計画で使用されるベクターの概略図を示す。

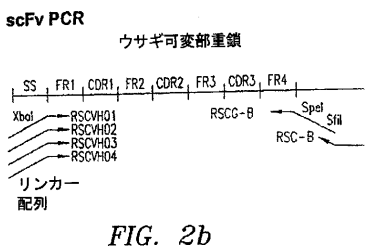
【 図 1 】



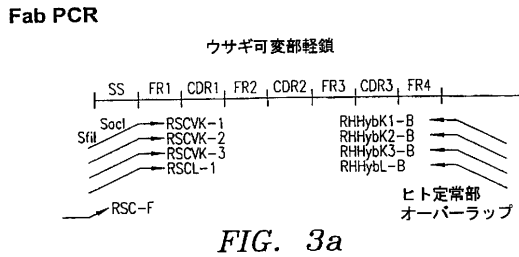
【 図 2 a 】



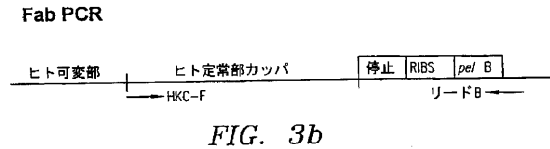
【 図 2 b 】



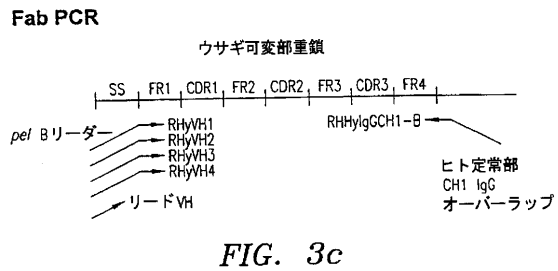
【 図 3 a 】



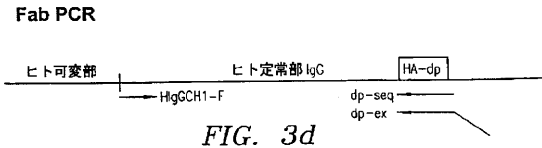
【 図 3 b 】



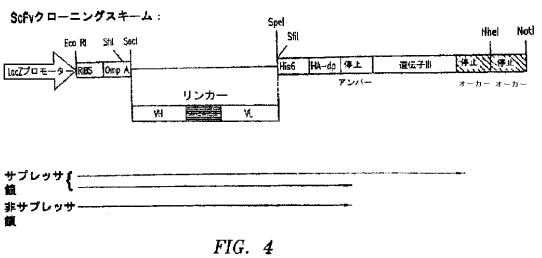
【 図 3 c 】



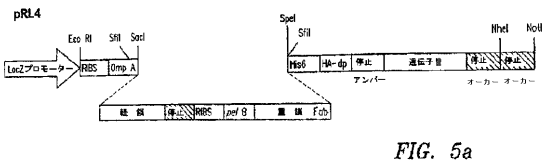
【 図 3 d 】



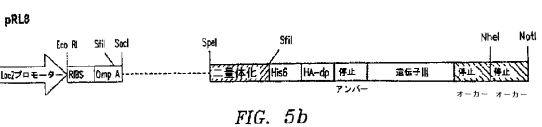
【 図 4 】



【 図 5 a 】



【 図 5 b 】



フロントページの続き

(72)発明者 キャサリン・エス・ボーディッシュ

アメリカ合衆国92014カリフォルニア州デル・マール、ボキタ・ドライブ13754番

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA43 BA44 BA45 BA46 BA61 CA01 CA04 CA11 DA02
DA03 DA06 EA03 EA04 FA04 FA08 FA10 FA20 GA11 GA14
GA18
4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC24 CE07 CE10 DA13
4H045 AA11 AA20 CA40 CA41 CA42 CA45 DA75 EA50 FA74 GA22

专利名称(译)	用于鉴定生长因子模拟物，生长因子和抑制剂的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2004123695A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2003086460	申请日	2003-03-26
申请(专利权)人(译)	Alexion公司制药公司		
[标]发明人	キャサリンエスポーディッシュ		
发明人	キャサリン・エス・ポーディッシュ		
IPC分类号	G01N33/53 C07H21/04 C07K16/18 C07K16/28 C12N15/09 C12N15/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C40B20/04 C40B30/04 C40B40/02 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/74		
CPC分类号	C40B40/02 C07K16/2863 C07K2317/55 C07K2317/622 C12N15/1037 G01N33/56972 G01N33/74 G01N2500/00		
FI分类号	C07K16/18 C07K16/28 C12P21/02.ZNA.C G01N33/53.D C12N15/00.A C12N15/10.P C12N15/10.Z C12P21/02.CZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/BA45 4B024/BA46 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA04 4B024/FA08 4B024/FA10 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/GA18 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/CE10 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/CA42 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/072253 1998-01-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供产生针对细胞表面分子的激动剂抗体的方法和产生涉及细胞增殖，分化或活化的抑制性抗体的方法。一种产生针对细胞表面分子的激动剂抗体的方法，包括用具有表面分子的细胞免疫动物，从而将表达一种或多种抗体的多种免疫细胞固定于表面分子从所述多个免疫细胞产生文库，所述免疫细胞包含编码所述抗体的核酸序列，并将所述核酸序列从所述文库克隆到表面展示载体中，以在表面展示上筛选所述抗体通过用靶细胞筛选所述表面展示的抗体并合成所述激动剂抗体，鉴定作为所述细胞表面分子的激动剂抗体的抗体。【选择图】无

(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2004-123 (P2004-1238)
		(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.
(51) Int. Cl. ⁷ C07K 16/18 C07K 16/28 C12P 21/02 G01N 33/53 // C12N 15/09	F I C07K 16/18 C07K 16/28 C12P 21/02 G01N 33/53 C12N 15/00	テーマコード(参考) 4B024 4B064 4H045 Z N A C D A
		審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 86)
(21) 出願番号 特願2003-86460 (P2003-86460) (22) 出願日 平成15年3月26日(2003.3.26) (62) 分割の表示 特願2000-528865 (P2000-528865)の分割 原出願日 平成11年1月22日(1999.1.22) (31) 優先権主張番号 60/072,253 (32) 優先日 平成10年1月23日(1998.1.23) (33) 優先権主張国 米国(US) (特許庁注：以下のものは登録商標) Windows	(71) 出願人 502116287 アレクシオン ファーマシューティカル、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 コネチカット O G O、チェシャー、ノッター ドラウ 3 5 2 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀景 (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹	