

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-503907  
(P2015-503907A)

(43) 公表日 平成27年2月5日(2015.2.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	2G045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 5/00 101	4B024
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/21 ZNA	4B063
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/19	4B064
C40B 40/02 (2006.01)	C12N 1/15	4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-547977 (P2014-547977)  
 (86) (22) 出願日 平成24年12月19日 (2012.12.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年8月7日 (2014.8.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/076163  
 (87) 国際公開番号 W02013/092720  
 (87) 国際公開日 平成25年6月27日 (2013.6.27)  
 (31) 優先権主張番号 11195375.8  
 (32) 優先日 平成23年12月22日 (2011.12.22)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 12179029.9  
 (32) 優先日 平成24年8月2日 (2012.8.2)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

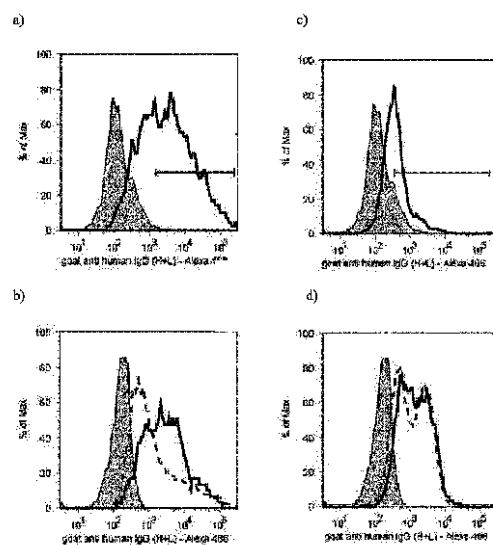
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核細胞のための全長抗体提示システムおよびその使用

(57) 【要約】

以下の段階を含む、二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法を、本明細書において報告する：(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、それにより該細胞の集団の各細胞が、レンチウイルス核酸によってコードされ、かつ2つ以上の抗原または同じ抗原上の2つ以上のエピトープに特異的に結合する膜結合型全長抗体を提示する、段階、および(b) 該真核細胞の集団から、該提示された膜結合型全長抗体の特性に従って細胞を選択する段階、ここで該レンチウイルスのウイルス粒子の集団の各レンチウイルスのウイルス粒子は、該膜結合型抗体を発現させるためのEV71-IRESを含むバイシストロニック発現カセットを含む。

Figure 6



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の段階を含む、二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法：

- (a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々がバイシストロニック発現カセットを含み、該カセットが、EV71-IRESの上流のホール (hole) 遺伝子座またはノブ (knob) 遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞が共通の軽鎖を発現し、該重鎖の一方または両方がそれらのC末端において膜貫通ドメインをさらに含む、段階、ならびに
- (b) 該真核細胞の集団から、提示された膜結合型全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

10

## 【請求項2】

EV71-IRESの下流の重鎖のみが、そのC末端において膜貫通ドメインを含むことを特徴とする、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

以下の段階を含む、二重特異性抗体を分泌する細胞を選択する方法：

- (a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々が、分泌型二重特異性抗体をコードするバイシストロニック発現カセットを含み、該カセットが、EV71-IRESの上流のホール遺伝子座またはノブ遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞が共通の軽鎖を発現する、段階ならびに
- (b) 該真核細胞の集団から、分泌された全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

20

## 【請求項4】

真核細胞の集団の各細胞が、単一の全長二重特異性抗体を提示するかまたは分泌することを特徴とする、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項5】

第1段階として、以下の段階のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする、請求項1~4のいずれか一項記載の方法：

・トランスジェニック動物を関心対象の抗原で免疫化する段階であって、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する、段階、および/または

・FACSによるバルク選別により、該免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、および/または

・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階。

40

## 【請求項6】

以下の段階を含むことを特徴とする、請求項1~2および4~5のいずれか一項記載の方法：

・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸 (2.2 kbp) のPCRを行う段階であって、膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターにクローニングし、任意で、該ベクターの制限切断および再連結により、存在するのであれば該第1重鎖の膜貫通ドメインを除去する、段階。

## 【請求項7】

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

50

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・任意で、膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、請求項1~2および4~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸

を含むことを特徴とする、請求項3~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

抗体が二価二重特異性抗体であることを特徴とする、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

抗体が2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合することを特徴とする、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、請求項1~12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

10

20

30

40

50

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、請求項1～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

以下の段階を含む、抗体を発現する細胞を選択する方法：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該細胞の集団の各細胞が膜結合型全長抗体を提示し、該抗体の少なくとも2つの鎖がバイシストロニック発現カセットによりコードされ、かつ該抗体が1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する、段階、および

(b) 該真核細胞の集団から、該提示された膜結合型全長抗体の特性に従って細胞を選択する段階、

ここで、該レンチウイルスのウイルス粒子の集団の、各レンチウイルスのウイルス粒子は、該膜結合型抗体を発現させるためのEV71-IRESを含むバイシストロニック発現カセットを含む。

【請求項22】

レンチウイルスのウイルス粒子の集団の、レンチウイルスのウイルス粒子の各バイシストロニック発現カセットが、1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する、親抗体の異なる変種をコードすることを特徴とする、請求項21記載の方法。

【請求項23】

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、請求項21～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・任意で、膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、請求項21～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・そのC末端においてscFvと結合している全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、請求項21～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

10

20

30

40

50

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・そのC末端においてscFabと結合している全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、請求項21～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

真核細胞の集団の各細胞が、膜結合型全長抗体を提示し、かつ全長抗体を分泌することを特徴とする、請求項21～26のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項28】

真核細胞の集団の各細胞が、単一の全長抗体を提示し、かつ分泌することを特徴とする、請求項21～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

抗体が抗原に特異的に結合することを特徴とする、請求項21～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

抗体が二価単一特異性抗体であることを特徴とする、請求項21～23のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項31】

抗体が二価二重特異性抗体であることを特徴とする、請求項21～22および24のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】

抗体が四価二重特異性抗体であることを特徴とする、請求項21～22および25～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

抗体が2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合することを特徴とする、請求項21～28および31～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、請求項31～33のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項35】

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、請求項31～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項36】

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、請求項21～35のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項37】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項21～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項21～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、請求項21～38のいずれか一項記載の方法。

50

## 【請求項 4 0】

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、請求項21～39のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 1】

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、請求項21～40のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 2】

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、請求項21～41のいずれか一項記載の方法。

10

## 【請求項 4 3】

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、請求項21～42のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 4】

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

20

を含むバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 4 5】

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

30

を含むバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 4 6】

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、請求項44～45のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 4 7】

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、請求項44～46のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

40

## 【請求項 4 8】

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、請求項44～47のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 4 9】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項44～48のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 5 0】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項44～49のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

## 【請求項 5 1】

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重

50

鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、請求項44～50のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

【請求項52】

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、請求項44～51のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

【請求項53】

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、請求項44～52のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

10

【請求項54】

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、請求項44～53のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

【請求項55】

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、請求項44～54のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット。

【請求項56】

請求項44～55のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセットを含む真核細胞。

【請求項57】

バイシストロニック発現カセットが細胞中に形質導入されていることを特徴とする、請求項56記載の真核細胞。

20

【請求項58】

哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項56～57のいずれか一項記載の真核細胞。

【請求項59】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項58記載の真核細胞。

【請求項60】

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

30

を含む、バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクター。

【請求項61】

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

40

を含む、バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクター。

【請求項62】

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、請求項60～61のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

【請求項63】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項60～62のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

50

## 【請求項64】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項60～63のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

## 【請求項65】

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、請求項60～64のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

## 【請求項66】

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、請求項60～65のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

10

## 【請求項67】

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、請求項60～66のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

## 【請求項68】

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、請求項60～67のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

## 【請求項69】

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、請求項60～68のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

20

## 【請求項70】

請求項60～69のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターを含む真核細胞。

## 【請求項71】

レンチウイルスベクターが細胞中に形質導入されていることを特徴とする、請求項70記載の真核細胞。

## 【請求項72】

哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項70～71のいずれか一項記載の真核細胞。

## 【請求項73】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項72記載の真核細胞。

30

## 【請求項74】

全長抗体の提示もしくは分泌またはその両方のための真核細胞の集団を作製するための、請求項60～69のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。

## 【請求項75】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項74記載の使用。

## 【請求項76】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項75記載の使用。

40

## 【請求項77】

それぞれが請求項60～69のいずれか一項記載の発現ベクターを含む2つ以上のレンチウイルス粒子を含むレンチウイルスベクターライブラリーであって、各ベクターによってコードされる抗体の少なくとも1アミノ酸が互いに異なる、レンチウイルスベクターライブラリー。

## 【請求項78】

1,000～1,000,000個の異なる発現ベクターを含むことを特徴とする、請求項77記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

## 【請求項79】

ベクターライブラリーのベクターによってコードされる抗体が、抗体のCDRのうちの1つ

50

における少なくとも1アミノ酸残基が異なることを特徴とする、請求項77～78のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項80】

CDRが重鎖CDR3であることを特徴とする、請求項79記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項81】

発現ベクターライブラリーが、親発現ベクターの1つまたは複数のCDR中の1つまたは複数のアミノ酸残基のランダム化によって得られることを特徴とする、請求項77～80のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項82】

レンチウイルス発現ベクターライブラリーが、2つの異なる半抗体をコードする核酸の組み合わせによって得られることを特徴とする、請求項77～81のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項83】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生するB細胞のプールから得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸を用いることによって生じることを特徴とする、請求項77～82のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項84】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られる、HCVRコード核酸およびLCVRコード核酸のプールより選択されるHCVRコード核酸とLCVRコード核酸の対を用いることにより生じることを特徴とする、請求項77～82のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項85】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるHCVRコード核酸と単一のLCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるHCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、請求項77～82のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項86】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるLCVRコード核酸と単一のHCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるLCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、請求項77～82のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項87】

単一B細胞がB細胞のクローン集団であることを特徴とする、請求項77～86のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項88】

レンチウイルス発現ライブラリーの多様性の生成が以下の段階を含むことを特徴とする、請求項77～87のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー：

(a)：

- (i) B細胞の亜集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

10

20

30

40

50

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅する段階；  
 (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅する段階；および

(v) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(b)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第1プールを作製する段階、

(vi) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第2プールを作製する段階、および

(vii) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(c)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および

(vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第2 DNA分子の対を提供する段階；または

(d)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および

(vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第1 DNA分子の対を提供する段階。

【請求項 89】

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、請求項77～88のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項 90】

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、請求項77～89のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項 91】

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1

10

20

30

40

50

-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、請求項77~90のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項92】

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、請求項77~91のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

【請求項93】

それぞれが、請求項44~55のいずれか一項記載のバイシストロニック発現カセット、または請求項60~69のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターを含む2つ以上の真核細胞を含む真核細胞ライブラリーであって、各細胞によって発現される抗体の少なくとも1アミノ酸が互いに異なる、真核細胞ライブラリー。

10

【請求項94】

請求項77~92のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターライブラリーを含む真核細胞ライブラリー。

【請求項95】

真核細胞ライブラリーの各真核細胞が単一抗体を発現することを特徴とする、請求項94記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項96】

真核細胞ライブラリーの各真核細胞が単一抗体を提示することを特徴とする、請求項94~95のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項97】

コード核酸が免疫化動物のB細胞の集団に由来する抗体のライブラリーを発現する真核細胞の集団であることを特徴とする、請求項94~96のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

20

【請求項98】

B細胞が、関心対象の1つまたは複数の抗原に対するそれらの特異性について事前選択されることを特徴とする、請求項97記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項99】

各細胞が第1抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第1発現カセットと第2抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第2発現カセットとを含む、真核細胞の集団であることを特徴とする、請求項94~98のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

30

【請求項100】

各細胞が第1抗原に結合する第1全長抗体軽鎖および第1全長抗体重鎖をコードする第1発現カセットと第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体軽鎖および第2全長抗体重鎖をコードする第2発現カセットとを含む、真核細胞の集団であることを特徴とする、請求項94~99のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項101】

各細胞が第1抗原に特異的に結合する第1全長抗体重鎖および第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体重鎖をコードする発現カセットを含む、共通の軽鎖を発現する真核細胞の集団であることを特徴とする、請求項94~100のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

40

【請求項102】

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、請求項94~102のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項103】

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、請求項94~101のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項104】

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むこ

50

とを特徴とする、請求項94～103のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項105】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項94～104のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項106】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項94～105のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項107】

単離されたB細胞の集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団が、(a) 血液；(b) 二次リンパ器官、特に脾臓またはリンパ節；(c) 骨髄；および (d) 記憶B細胞を含む組織より選択される供給源に由来することを特徴とする、請求項94～106のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

10

【請求項108】

単離されたB細胞の集団が、末梢血単核細胞 (PBMC) を含むか、または特にはこれからなることを特徴とする、請求項107記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項109】

動物が哺乳類、特にラット、マウス、ウサギ、またはヒトであることを特徴とする、請求項94～108のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項110】

動物がトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギまたはヒトであることを特徴とする、請求項109記載の真核細胞ライブラリー。

20

【請求項111】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項94～110のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；および
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞または単一B細胞を選択すること。

【請求項112】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項94～111のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 担体を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で被覆すること；
- (b) 単離されたB細胞の集団を該担体と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を介して該B細胞を該担体に結合させることを可能にする、こと；
- (c) 結合していないB細胞を除去することであって、特に該担体がビーズを含むかまたはさらに特にはビーズからなり、なおさらに特には該ビーズが常磁性ビーズである、こと；ならびに
- (d) 該常磁性ビーズからB細胞の亜集団または単一B細胞を回収すること。

30

【請求項113】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、FACS選別によって行われることを特徴とする、請求項94～112のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

40

【請求項114】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項94～113のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、こと；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合して

50

いるB細胞を分離すること。

【請求項 1 1 5】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項94～114のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；

(b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞の集団または単一B細胞を選択すること；ならびに

(c) 少なくとも1つの付加的なパラメータについてB細胞を選択することであって、特に、この少なくとも1つの付加的なパラメータについての選択が以下のものである、こと；

(i) B細胞特異的マーカー、特にCD19もしくはB220の存在、およびB細胞の生存より選択されるパラメータについての陽性選択；ならびに / または

(ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

【請求項 1 1 6】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する段階が、クラススイッチしたB細胞、特にIgMおよび / またはIgD陰性B細胞、最も特にはIgMおよびIgD陰性B細胞を選択することをさらに含むことを特徴とする、請求項94～115のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項 1 1 7】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項94～116のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が第1蛍光色素で標識されており、特に該蛍光色素がAlexa 647 nm、Alexa 488、またはAlexa 546 nmである、こと；

(b) 単離されたB細胞の集団の細胞を抗IgM抗体および / または抗IgD抗体と接触させることであって、該抗IgM抗体および / または該抗IgD抗体が第2蛍光色素および / または第3蛍光色素で標識されており、該第2蛍光色素および / または該第3蛍光色素が、該第1蛍光色素によって放出される蛍光の波長とは異なる波長で蛍光を放出する、こと；ならびに

(c) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているが該抗IgM抗体には結合していない、および / または該抗IgD抗体には結合していないB細胞の集団または単一B細胞を分離すること。

【請求項 1 1 8】

ライブラリーがウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーであり、ライブラリーを真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団に導入することが、真核細胞、特に哺乳動物細胞にウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーを感染させることによって行われ、さらに特には、感染が、最大限で10、特に最大限で1、より特には最大限で0.2、および最も特には最大限で0.1の感染効率で行われることを特徴とする、請求項94～117のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項 1 1 9】

感染効率が約0.1であることを特徴とする、請求項118記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項 1 2 0】

細胞の単離がFACS選別によって行われることを特徴とし、1つの態様において細胞の単離が以下の段階を含む、請求項94～119のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で染色する段階であって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、段階；および

(b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階。

## 【請求項 1 2 1】

FACS選別によって、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階が、少なくとも1つの付加的なパラメータを用いて細胞をさらに選択する段階を含むことを特徴とする、請求項94～120のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

## 【請求項 1 2 2】

方法が以下の段階をさらに含むことを特徴とする、請求項94～122のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の存在下で、個々の細胞の少なくとも1つ、特に正確に1つを培養する段階；
- (b) 関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するという、該真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の能力を確認する段階。

10

## 【請求項 1 2 3】

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または、特におよび真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、(a) BHK 21細胞、特にATCC CCL-10；(b) Neuro-2a細胞；(c) HEK-293T細胞、特にATCC CRL-11268；(d) CHO-K1細胞、特にATCC CRL-62；および (e) HEK293細胞より選択される細胞を含むか、または特にはそれらの細胞からなることを特徴とする、請求項94～122のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

## 【請求項 1 2 4】

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、CHO-K1細胞を含むか、または特にはCHO-K1細胞からなり、さらに特には発現ライブラリーがレンチウイルス発現ライブラリーであることを特徴とする、請求項94～123のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

20

## 【請求項 1 2 5】

以下の段階を含む、関心対象の抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞を選択する方法：

- (a) B細胞の集団から、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する抗体を分泌するB細胞の亜集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団を任意で選択する段階、
- (b) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する1つまたは複数の抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階；

30

(i) 該B細胞の亜集団からDNA分子のプールを増幅すること、または関心対象の1つもしくは2つの抗原に特異的に結合する単一の抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化によりDNA分子のライブラリーを作製することを含む、多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶性および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること；

(c) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階；

40

(d) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(e) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の1つもしくは複数の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

## 【請求項 1 2 6】

以下の段階を含む、(関心対象の2つの抗原に特異的に結合する)二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法：

- (a) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが二重特異性抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階；

50

(i) 単一の二重特異性抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化により多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 全長二重特異性抗体を膜結合型として発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること；

(b) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階；

(c) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(d) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

10

【請求項127】

抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階が以下を含むことを特徴とする、請求項125～126のいずれか一項記載の方法：

(1) B細胞の亜集団から、重鎖可変領域 (HCVR) をコードするDNA分子の第1プールを増幅すること；および

(2) 該B細胞の亜集団から、軽鎖可変領域 (LCVR) をコードするDNA分子の第2プールを増幅すること；

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

20

【請求項128】

関心対象の1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階が以下を含むことを特徴とする、請求項125～127のいずれか一項記載の方法：

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団から、HCVRをコードするDNA分子およびLCVRをコードするDNA分子を増幅すること、ならびに

(2) 少なくとも1つのコドンランダム化することにより、該HCVRをコードするDNA分子および/または該LCVRをコードするDNA分子をランダム化することであって、それによってHCVRをコードする多数のDNA分子およびLCVRをコードする多数のDNA分子を作製すること；

30

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該ランダム化された多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

【請求項129】

レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階が以下を含むことを特徴とする、請求項125～128のいずれか一項記載の方法：

40

(i) 以下を含む、抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること：

(1) B細胞の亜集団からmRNAを単離すること；

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること；

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅すること；および

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅すること；

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA

50

分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子をクローニングすること。

【請求項130】

レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階が以下を含むことを特徴とする、請求項135～129のいずれか一項記載の方法：

(i) 以下を含む、1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること：

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からmRNAを単離すること；

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること；

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅すること；および

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅すること；

(5) 該第1 DNA分子および/または該第2 DNA分子をランダム化することであって、それによってDNA分子の第1プールおよびDNA分子の第2プールを作製すること、

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子をクローニングすること。

【請求項131】

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、請求項125～130のいずれか一項記載の方法。

【請求項132】

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、請求項131記載の方法。

【請求項133】

動物が、ヒツジ、ヘラジカ、シカ、ロバ、ミュールジカ、ミンク、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、ハムスター、モルモット、およびマウスからなる群より選択されることを特徴とし、1つの態様において、動物が、マウス、ラット、または霊長類である、請求項125～132のいずれか一項記載の方法。

【請求項134】

動物が非ヒト霊長類またはヒトであることを特徴とする、請求項125～133のいずれか一項記載の方法。

【請求項135】

動物が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニック動物であることを特徴とする、請求項125～134のいずれか一項記載の方法。

【請求項136】

関心対象の抗原と特異的に結合するというそれらの能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択することによって核酸が得られることを特徴とする、請求項125～135のいずれか一項記載の方法。

【請求項137】

関心対象の1つまたは2つの抗原と特異的に結合するというその能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団から単一B細胞を選択することによって核酸が得られることを特徴とする、請求項125～136のいずれか一項記載の方法。

【請求項138】

単一B細胞がクローンB細胞集団であることを特徴とする、請求項125～137のいずれか一項記載の方法。

【請求項139】

単一B細胞またはクローンB細胞集団の単離されたmRNAから可変ドメインコード核酸を増幅し、増幅されたmRNAをcDNAに転写することによって核酸が得られることを特徴とする、

請求項125～138のいずれか一項記載の方法。

【請求項140】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生するB細胞のプールから得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸を用いることによって生じることを特徴とする、請求項125～139のいずれか一項記載の方法。

【請求項141】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られるHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸のプールより選択されるHCVRコード核酸とLCVRコード核酸の対を用いることにより生じることを特徴とする、請求項125～140のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項142】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるHCVRコード核酸と単一のLCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるHCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、請求項125～140のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項143】

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるLCVRコード核酸と単一のHCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるLCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、請求項125～142のいずれか一項記載の方法。

【請求項144】

単一B細胞がB細胞のクローン集団であることを特徴とする、請求項125～143のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項145】

レンチウイルス発現ライブラリーの多様性の生成が以下の段階を含むことを特徴とする、請求項125～144のいずれか一項記載の方法：

(a)：

- (i) B細胞の亜集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅する段階；および
- (v) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

40

(b)：

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌ

50

クレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第1プールを作製する段階、

(vi) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第2プールを作製する段階、および

(vii) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(c)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および

(vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第2 DNA分子の対を提供する段階；または

(d)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および

(vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第1 DNA分子の対を提供する段階。

【請求項146】

抗原特異的抗体の可変性が、異なる軽鎖可変領域と重鎖可変領域ランダムに組み合わせることによって増加することを特徴とする、請求項125～145のいずれか一項記載の方法。

【請求項147】

単離されたB細胞の集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団が、(a) 血液；(b) 二次リンパ器官、特に脾臓またはリンパ節；(c) 骨髄；および (d) 記憶B細胞を含む組織より選択される供給源に由来することを特徴とする、請求項125～146のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項148】

単離されたB細胞の集団が、末梢血単核細胞 (PBMC) を含むか、または特にはこれからなることを特徴とする、請求項147記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項149】

動物が哺乳類、特にラット、マウス、ウサギ、またはヒトであることを特徴とする、請求項125～148のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項150】

動物がトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギまたはヒトであることを特徴とする、請求項149記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項151】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項125～150のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；および

10

20

30

40

50

(b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞または単一B細胞を選択すること。

【請求項152】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項125～151のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 担体に関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で被覆すること；
- (b) 単離されたB細胞の集団を該担体と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を介して該B細胞を該担体に結合させることを可能にする、こと；
- (c) 結合していないB細胞を除去することであって、特に該担体がビーズを含むかまたはさらに特にはビーズからなり、なおさらに特には該ビーズが常磁性ビーズである、こと；ならびに
- (d) 該常磁性ビーズからB細胞の亜集団または単一B細胞を回収すること。

10

【請求項153】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、FACS選別によって行われることを特徴とする、請求項125～152のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項154】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項125～153のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

20

- (a) 単離されたB細胞の集団に関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、こと；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているB細胞を分離すること。

【請求項155】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項125～154のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞の集団または単一B細胞を選択すること；ならびに
- (c) 少なくとも1つの付加的なパラメータについてB細胞を選択することであって、特に、この少なくとも1つの付加的なパラメータについての選択が以下のものである、こと：
  - (i) B細胞特異的マーカー、特にCD19もしくはB220の存在、およびB細胞の生存より選択されるパラメータについての陽性選択；ならびに / または
  - (ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

30

【請求項156】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する段階が、クラススイッチしたB細胞、特にIgMおよび / またはIgD陰性B細胞、最も特にはIgMおよびIgD陰性B細胞を選択することをさらに含むことを特徴とする、請求項125～155のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

40

【請求項157】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、請求項125～156のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団に関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が第1蛍光色素で標識されており、特に該蛍光色素がAlexa 647 nm、Alexa 488、またはAlexa 546 nmである、こと；

50

(b) 単離されたB細胞の集団の細胞を抗IgM抗体および/または抗IgD抗体と接触させることであって、該抗IgM抗体および/または該抗IgD抗体が第2蛍光色素および/または第3蛍光色素で標識されており、該第2蛍光色素および/または該第3蛍光色素が、該第1蛍光色素によって放出される蛍光の波長とは異なる波長で蛍光を放出する、こと；ならびに  
(c) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているが該抗IgM抗体には結合していない、および/または該抗IgD抗体には結合していないB細胞の集団または単一B細胞を分離すること。

【請求項158】

ライブラリーがウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーであり、ライブラリーを真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団に導入することが、真核細胞、特に哺乳動物細胞にウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーを感染させることによって行われ、さらに特には、感染が、最大限で10、特に最大限で1、より特には最大限で0.2、および最も特には最大限で0.1の感染効率で行われることを特徴とする、請求項125～157のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項159】

感染効率が約0.1であることを特徴とする、請求項158記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項160】

細胞の単離がFACS選別によって行われることを特徴とし、1つの態様において細胞の単離が以下の段階を含む、請求項125～159のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で染色する段階であって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、段階；および  
(b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階。

【請求項161】

FACS選別によって、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階が、少なくとも1つの付加的なパラメータを用いて細胞をさらに選択することを含むことを特徴とする、請求項125～160のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項162】

少なくとも1つの付加的なパラメータが以下より選択されることを特徴とする、請求項161記載の真核細胞ライブラリー：

- (i) 細胞の生存についての陽性選択；ならびに/または  
(ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

【請求項163】

方法が以下の段階をさらに含むことを特徴とする、請求項125～162のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の存在下で、個々の細胞の少なくとも1つ、特に正確に1つを培養する段階；  
(b) 関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するという、該真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の能力を確認する段階。

【請求項164】

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または、特におよび真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、(a) BHK 21細胞、特にATCC CCL-10；(b) Neuro-2a細胞；(c) HEK-293T細胞、特にATCC CRL-11268；(d) CHO-K1細胞、特にATCC CRL-62；および (e) HEK293細胞より選択される細胞を含むか、または特にはそれらからなることを特徴とする、請求項125～163のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項165】

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または真核細胞、特に哺乳動物細胞

の第2集団が、CHO-K1細胞を含むか、または特にCHO-K1細胞からなり、さらに特に発現ライブラリーがレンチウイルス発現ライブラリーであることを特徴とする、請求項125～164のいずれか一項記載の真核細胞ライブラリー。

【請求項166】

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：1つは、SEQ ID NO: 6～SEQ ID NO: 10のプライマーのうちの一つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 11のプライマーを用いる、ノブ鎖のためであり、1つは、SEQ ID NO: 1～SEQ ID NO: 4のプライマーのうちの一つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 5のプライマーを用いる、ホール鎖のためである、シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階

連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESへ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、連結する段階

- ・ウイルス生成段階、共通鎖を安定して発現する哺乳動物細胞の感染段階、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、

・例えばSEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 30のプライマーを用いた、EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の（TMドメインを有さない）可変ドメインコード核酸のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

【請求項167】

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階

連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの上流へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、連結する段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、哺乳動物細胞膜に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、

・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸（2.2 kbp）のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング段階、該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメインの除去段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、二重特異性抗体の選択段階。

【請求項168】

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階  
連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を、第1シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないホール遺伝子座へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を、第2シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないノブ遺伝子座へ、連結する段階であって、ただし少なくとも一方は膜貫通ドメインを有する、段階
- ・ウイルス生成（1つは該第1シャトルベクターに関し、および1つは該第2シャトルベクターに関する）段階、該第1ウイルスおよび該第2ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の連続的な感染段階、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、
- ・重鎖可変ドメインコード核酸のPCR段階、および第3シャトルベクター中の、膜貫通ドメインおよびEV71-IRESを含まないパイシストロニック発現単位へのクローニング段階、
- ・ウイルス生成段階、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

10

## 【請求項169】

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法：

20

- ・第1実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の第1抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する段階、

- ・第2実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の第2抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現し、ただし、該第1抗原と該第2抗原が異なる段階、

- ・1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該第1免疫化実験動物および該第2免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、

30

- ・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

- ・第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結段階、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインを有する各他方の遺伝子座への連結段階であって、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、該第1重鎖可変ドメインが該第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが該第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が異なる、段階

40

- ・ウイルス生成段階

- ・該ウイルスを用いた、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、

- ・二重標識された形質導入細胞のFACSによる、細胞の表面上に二重特異性抗体を提示する細胞の選択段階、

- ・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸（2.2 kbp）のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング段階、該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメインの除去段階、

50

・ウイルス生成段階、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

【請求項170】

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法：

・実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ鎖を発現する段階、

・1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、

・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

・重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの下流の、膜貫通ドメインを有する重鎖遺伝子座への連結段階であって、該シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターが、IRESの上流に共通鎖コード核酸を含む、段階

・ウイルス生成段階、

・該ウイルスを用いた、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、

・抗原特異的に標識された形質導入細胞のFACSによる、1つの態様ではFACSによるバルク選別による、細胞の表面上に抗体を提示する細胞の選択段階、

・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、選択された各細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

・第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結段階、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインをもたない各他方の遺伝子座への連結段階であって、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよい、段階

・ウイルス生成段階、

・該ウイルスを用いた、共通鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、

・二重特異性抗体を分泌する細胞の選択段階。

【請求項171】

抗体の生成のための、請求項1~170のいずれか一項記載の方法を用いて選択された細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体の分野、特にそのような抗体をコードする核酸に関する。本発明は、関心対象の1つまたは複数の抗原と特異的に結合し得る抗体、特に全長モノクローナル抗体、特に二重特異性モノクローナル抗体を発現し、かつその表面上に提示する真核細胞を作製し選択する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

## 発明の背景

組換え抗体を単離するための公知の方法は、ファージディスプレイ (Hogenboom, *Methods Mol. Biol.* 178 (2002) 1-37 (非特許文献1))、リボソーム/mRNAディスプレイ (Lipovsek and Plueckthun, *J. Immunol. Method* 290 (2004) 51-67 (非特許文献2))、および微生物細胞ディスプレイ (Boder and Wittrup, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 553-557 (非特許文献3)) である。

### 【0003】

哺乳動物細胞における全抗体のワクシニアウイルス媒介性発現に基づいたスクリーニングシステムは、US 2002/0123057 (特許文献1) に記載されている。別のスクリーニングシステムは、哺乳動物細胞における抗体の細胞表面発現に基づいている (Ho, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 9637-9642 (非特許文献4))。

10

### 【0004】

ファージディスプレイでは、1回のパニングラウンドでクローン $10^{12} \sim 10^{13}$ 個のスクリーニングが可能であるのに対して (Barbas III, et al., (eds.), *Phage Display - A Laboratory manual*, Cold Spring Harbour Press, (2001) (非特許文献5))、細胞当たり1抗体形式での哺乳動物スクリーニング手順の処理量は、クローン約 $10^6 \sim 10^7$ 個の同時解析に限定される。

### 【0005】

細胞ディスプレイは、COS細胞においては、Higuchi et al.により記載されている (*J. Immunol. Meth.* 202 (1997) 193-204 (非特許文献6))。Beerli et al.は、BHK細胞における、抗原特異的B細胞から作製されたシンドビスウイルスベースのscFv細胞表面ディスプレイライブラリーを報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 14336-14341 (非特許文献7))。Ho and Pastanは、HEK293細胞を用いた方法 (scFv) を報告している (*Methods Mol. Biol.* 562 (2009) 99-113 (非特許文献8))。リンパ球ディスプレイは、Alonso-Camino et al.によって報告されている (*PLoS One.* 4 (2009) e7174 (非特許文献9))。Zhou et al.は、HEK293細胞を用いる方法を報告している (*Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42 (2010) 575-584 (非特許文献10))。Zhou et al.は、Flp-Inシステムを報告している (*MAbs.* 2 (2010) 508-518 (非特許文献11))。

20

### 【0006】

Taube, R., et alは、ヒト細胞およびレンチウイルスのウイルス粒子の表面上でのヒト抗体の安定発現を報告している (*PLOS One* 3 (2008) e3181 (非特許文献12))。

30

### 【0007】

WO 2007/047578 (特許文献2) では、抗体ライブラリーの細胞ディスプレイが報告されている。

### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

### 【0008】

【特許文献1】US 2002/0123057

【特許文献2】WO 2007/047578

#### 【非特許文献】

40

### 【0009】

【非特許文献1】Hogenboom, *Methods Mol. Biol.* 178 (2002) 1-37

【非特許文献2】Lipovsek and Plueckthun, *J. Immunol. Method* 290 (2004) 51-67

【非特許文献3】Boder and Wittrup, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 553-557

【非特許文献4】Ho, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 9637-9642

【非特許文献5】Barbas III, et al., (eds.), *Phage Display - A Laboratory manual*, Cold Spring Harbour Press, (2001)

【非特許文献6】*J. Immunol. Meth.* 202 (1997) 193-204

【非特許文献7】*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 14336-14341

【非特許文献8】*Methods Mol. Biol.* 562 (2009) 99-113

50

【非特許文献 9】PLoS One. 4 (2009) e7174

【非特許文献 10】Acta Biochim. Biophys. Sin. 42 (2010) 575-584

【非特許文献 11】MAbs. 2 (2010) 508-518

【非特許文献 12】PLOS One 3 (2008) e3181

【発明の概要】

【0010】

バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスのウイルス粒子を使用することにより、全長抗体が発現され、かつ真核細胞上に提示され得ることが見出された。本明細書において報告される、レンチウイルスのウイルス粒子を用いた真核細胞上の全長抗体の発現は、抗体軽鎖と抗体重鎖の発現カセットまたは2つの抗体重鎖の発現カセットのいずれかを連結しているEV71のIRES（内部リボソーム進入部位）エレメントを使用することによって可能となる。

10

【0011】

レンチウイルスベクター内に抗体軽鎖発現カセットおよび抗体重鎖発現カセットが存在する場合、抗体重鎖発現カセットは、C末端抗体ドメインをコードするエクソンの後に、可溶性抗体重鎖に加えてまた膜結合型抗体重鎖を発現させるための手段を提供する非構成的スプライス部位を含んでよく、結果として膜結合型全長抗体の提示が起こる。

【0012】

レンチウイルスベクター内に2つの抗体重鎖発現カセットが存在する場合、その両方または2番目の抗体重鎖発現カセットのみが、C末端抗体ドメインをコードするエクソンの後に、膜貫通ドメインをコードするエクソンを含んでよく、結果として膜結合型全長抗体の提示が起こる。

20

【0013】

抗体、特に全長モノクローナル抗体を発現し、かつその表面上に提示する真核細胞を製作し選択する方法を、本明細書においてさらに提供する。

【0014】

本明細書において報告される1つの局面は、5'から3'方向に、

プロモーター

全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、

EV71-IRES、

全長抗体重鎖をコードする第2核酸、

スプライシング可能なイントロン、および

膜貫通ドメインまたはGPIアンカー

を含む、バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクターである。

30

【0015】

本明細書において報告されるこのレンチウイルスベクターは、それが全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖の発現のためのバイシストロニック発現カセットを含むという点で発現ベクターであり、この場合2つの発現カセットを分離するIRESはEV71-IRESである。

【0016】

レンチウイルス発現システムにおけるバイシストロニック発現カセットでの全長抗体の発現には、EV71-IRESのみが使用できることが見出された。

40

【0017】

スプライシング可能なイントロンの提供により、本明細書において報告される発現ベクターから、可溶性の抗体重鎖および膜結合型の抗体重鎖が発現され得る。

【0018】

可溶性および膜結合型の抗体重鎖の発現により、細胞は一方では全長抗体を分泌し、これは例えばELISAで試験することができ、細胞はそれと同時にその表面上に膜結合型の全長抗体を提示し、これは例えば単一細胞クローンの単離を可能にするFACSによる細胞の選択に用いることができる。

【0019】

50

本明細書において報告される1つの局面は、5'から3'方向に、  
 プロモーター  
 第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、  
 EV71-IRES、  
 第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および  
 膜貫通ドメインまたはGPIアンカー  
 を含む、バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクターである。

【0020】

本明細書において報告されるこのレンチウイルスベクターは、それが2つの異なる全長抗体重鎖の発現のためのバイシストロニック発現カセットを含むという点で発現ベクターであり、この場合2つの発現カセットを分離するIRESはEV71-IRESである。

10

【0021】

膜結合型の抗体重鎖の発現により、細胞はその表面上に膜結合型の全長抗体を提示し、これは例えば単一細胞クローンの単離を可能にするFACSによる細胞の選択に用いることができる。

【0022】

1つの態様において、抗体は、抗原に特異的に結合する抗体である。したがって、1つの態様において、抗体または抗体コード核酸はそれぞれ、抗原に特異的に結合するものに関して選択されたB細胞から得られる。

【0023】

1つの態様において、抗体は二価単一特異性抗体である。1つの態様において、抗体は抗原に特異的に結合する。

20

【0024】

1つの態様において、抗体は二価二重特異性抗体である。1つの態様において、抗体は、2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合する。

【0025】

1つの態様において、抗体は四価二重特異性抗体である。1つの態様において、抗体は、2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合する。

【0026】

1つの態様において、発現ベクターはレンチウイルス（発現）ベクターである。

30

【0027】

本明細書において報告される1つの局面は、それぞれが本明細書において報告される発現ベクターを含む2つ以上のレンチウイルス粒子を含むレンチウイルスベクターライブラリーであり、この場合、各ベクターによってコードされる抗体は互いに少なくとも1アミノ酸が異なる。

【0028】

1つの態様において、ベクターライブラリーは1,000~1,000,000個の異なる発現ベクターを含む。

【0029】

1つの態様において、ベクターライブラリーのベクターによってコードされる抗体は、抗体の可変ドメイン中の少なくとも1アミノ酸残基が異なる。

40

【0030】

1つの態様において、ベクターライブラリーのベクターによってコードされる抗体は、抗体のCDRのうちの1つにおける少なくとも1アミノ酸残基が異なる。1つの態様において、CDRは重鎖CDR3である。

【0031】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告されるバイシストロニック発現カセットを含む真核細胞である。1つの態様において、バイシストロニック発現カセットは細胞中に形質導入されている。

【0032】

50

本明細書において報告される1つの局面は、それぞれが本明細書において報告されるバイシストロニック発現カセットまたはベクターを含む2つ以上の真核細胞を含む真核細胞ライブラリーであり、この場合、各細胞によって発現される抗体は互いに少なくとも1アミノ酸が異なる。

【0033】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーは1,000~1,000,000個の異なる哺乳動物細胞を含む。

【0034】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーの細胞によって発現される抗体は、抗体の可変ドメイン中の少なくとも1アミノ酸残基が異なる。

10

【0035】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーの真核細胞によってコードされる抗体は、抗体のCDRのうちの1つにおける少なくとも1アミノ酸残基が異なる。1つの態様において、CDRは重鎖CDR3である。

【0036】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告されるベクターライブラリーを含む真核細胞ライブラリーである。

【0037】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーの真核細胞は単一抗体を発現し、かつ提示する。

20

【0038】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーの真核細胞は単一抗体を提示する。

【0039】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーは、コード核酸が免疫化動物のB細胞に由来する抗体のライブラリーを発現する、真核細胞の集団である。1つの態様において、B細胞は、関心対象の抗原に対するそれらの特異性について事前選択される。

【0040】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーは、各細胞が、第1抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第1発現カセットおよび第2抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第2発現カセットを含む、真核細胞の集団である。

30

【0041】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーは、各細胞が、第1抗原に結合する第1全長抗体軽鎖および第1全長抗体重鎖をコードする第1発現カセットと、第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体軽鎖および第2全長抗体重鎖をコードする第2発現カセットをと含む、真核細胞の集団である。

【0042】

1つの態様において、真核細胞ライブラリーは、各細胞が、第1抗原に特異的に結合する第1全長抗体重鎖および第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体重鎖をコードする発現カセットを含む、真核細胞の集団であり、この場合、該真核細胞は共通の軽鎖を発現する。

【0043】

1つの態様において、第1全長抗体重鎖はホール (hole) 変異を含み、かつ第2抗体重鎖はノブ (knob) 変異を含む。

40

【0044】

1つの態様において、第1全長抗体軽鎖は定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖は第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖は定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖は第1定常ドメインとしてCLドメインを含む。

【0045】

1つの態様において、発現ベクターライブラリーは、親発現ベクターの1つまたは複数のCDR中の1つまたは複数のアミノ酸残基のランダム化によって得られる。

50

## 【0046】

1つの態様において、発現ベクターライブラリーは、2つの異なる半抗体の組み合わせによって得られる。

## 【0047】

本明細書において報告される1つの局面は、関心対象の1つまたは複数、特に2つの抗原に特異的に結合する抗体を単離または選択するための方法である。

## 【0048】

本明細書において報告されるスクリーニング法は、単一ラウンドの選択でスクリーニングが完了可能となるために有利である「細胞当たり1抗体」形式で行われ得ることが見出された。

10

## 【0049】

抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞を作製する、選択する、および/または単離する方法を、本明細書において報告する。

## 【0050】

1つの態様において、抗体はモノクローナル全長抗体である。1つの態様において、抗体は二重特異性モノクローナル全長抗体である。

## 【0051】

本明細書において報告される方法により、選択された細胞からの抗体の可変領域または抗体全体のクローニングが可能となる。

## 【0052】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される方法を用いて選択された抗体を組換えで生成するための方法である。

20

## 【0053】

1つの態様において、全長抗体は、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含む。

## 【0054】

本明細書において報告される方法により、所望の特異性を有する抗体を、完全に種特異的な形態で、特に完全にヒトの抗体として組換えで生成することが可能になる。

## 【0055】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、関心対象の抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞を選択する方法である：

30

(a) B細胞の集団から、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する抗体を分泌するB細胞の亜集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団を任意で選択する段階、

(b) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する1つまたは複数の抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階：

(i) 該B細胞の亜集団からDNA分子のプールを増幅すること、または関心対象の1つもしくは2つの抗原に特異的に結合する単一の抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化によりDNA分子のライブラリーを作製することを含む、多数のDNA分子を作製すること、および

40

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶性および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること；

(c) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階；

(d) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(e) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の1つもしくは複数の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

50

## 【 0 0 5 6 】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、（関心対象の2つの抗原に特異的に結合する）二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法である：

(a) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが二重特異性抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階：

(i) 単一の二重特異性抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化により多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 全長二重特異性抗体を膜結合型として発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること；

(b) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階；

(c) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(d) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

## 【 0 0 5 7 】

全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターと組み合わせてレンチウイルス発現ライブラリーを使用することで、高いスクリーニング効率が可能になる。

## 【 0 0 5 8 】

1つの態様において、本方法は抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階は以下を含む：

(1) B細胞の亜集団から、重鎖可変領域（HCVR）をコードするDNA分子の第1プールを増幅すること；および

(2) 該B細胞の亜集団から、軽鎖可変領域（LCVR）をコードするDNA分子の第2プールを増幅すること；

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を同時に可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

## 【 0 0 5 9 】

1つの態様において、本方法は、関心対象の1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階は以下を含む：

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団から、HCVRをコードするDNA分子およびLCVRをコードするDNA分子を増幅すること、ならびに

(2) 少なくとも1つのコドンランダム化することにより、該HCVRをコードするDNA分子および/または該LCVRをコードするDNA分子ランダム化することであって、それによってHCVRをコードする多数のDNA分子およびLCVRをコードする多数のDNA分子を作製する、こと；

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を同時に可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該ランダム化された多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

## 【 0 0 6 0 】

1つの態様において、本方法はレンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階は以下を含む：

10

20

30

40

50

(i) 以下を含む、抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること：

(1) B細胞の垂集団からmRNAを単離すること；

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること；

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅すること；および

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅すること；

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を同時に可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子をクローニングすること。

10

#### 【0061】

1つの態様において、本方法はレンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階は以下を含む：

(i) 以下を含む、1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること：

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からmRNAを単離すること；

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること；

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅すること；および

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅すること；

(5) 該第1 DNA分子および/または該第2 DNA分子をランダム化することであって、それによってDNA分子の第1プールおよびDNA分子の第2プールを作製すること、

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を同時に可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子DNA分子をクローニングすること。

20

#### 【0062】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、(関心対象の2つの抗原に特異的に結合する)二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法である：

(a) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが二重特異性抗体の重鎖の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階：

(i) 単一の二重特異性抗体の重鎖をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化により多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 二重特異性抗体の2つの重鎖を発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすることであって、この場合、EV71-IRESの下流の核酸は、C末端膜貫通ドメインを伴う抗体重鎖をコードする；

40

(b) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を、抗体重鎖のいずれかと抗原結合部位を形成し得る抗体軽鎖を発現する真核細胞の集団に形質導入する段階；

(c) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(d) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

#### 【0063】

本明細書において報告される1つの局面は、真核細胞の表面上に全長抗体を提示させる

50

ためのレンチウイルス発現ベクターである。

【0064】

1つの態様において、発現ベクターは、シグナルペプチド、EV71-IRES、膜貫通領域、および任意で検出タグをコードするDNAエレメントを含む。

【0065】

1つの態様において、発現ベクターは、全長抗体重鎖および全長抗体軽鎖をコードするDNA分子の発現ベクターへのクローニング、特に方向特異的クローニングを可能にする制限部位を含む。

【0066】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される発現ベクターを含む発現ライブラリーである。

10

【0067】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される発現ベクターを含むか、または本明細書において報告される発現ライブラリーの少なくとも1つのメンバーを含む真核細胞である。

【0068】

本明細書において報告される方法によって生成されるモノクローナル抗体は、研究目的、診断目的、または疾患の治療に使用することができる。

【0069】

1つの態様において、真核細胞は哺乳動物細胞または酵母細胞である。1つの態様において、哺乳動物細胞はCHO細胞またはHEK細胞である。

20

【0070】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、抗体を発現する細胞を選択する方法であり：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、それにより該細胞の集団の各細胞が、レンチウイルス核酸によってコードされ、かつ1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する膜結合型全長抗体を提示する、段階、および

(b) 該真核細胞の集団から、該提示された膜結合型全長抗体の特性に従って細胞を選択する段階、

30

この場合、該レンチウイルスのウイルス粒子の集団の各レンチウイルスのウイルス粒子は、該膜結合型抗体を発現させるためのEV71-IRESを含むバイシストロニック発現カセットを含む。

【0071】

1つの態様において、レンチウイルスのウイルス粒子の集団のレンチウイルスのウイルス粒子の各バイシストロニック発現カセットは、1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する、親抗体の異なる変種をコードする。

【0072】

1つの態様において、バイシストロニック発現カセットは、5'から3'方向に、

40

プロモーター

全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、

EV71-IRES、

全長抗体重鎖をコードする第2核酸、

スプライシング可能なイントロン、および

膜貫通ドメインまたはGPIアンカー

を含む。

【0073】

1つの態様において、真核細胞の集団の各細胞は、膜結合型全長抗体を提示し、かつ全長抗体を分泌する。

50

## 【0074】

1つの態様において、真核細胞の集団の各細胞は、単一の全長抗体を提示し、かつ分泌する。

## 【0075】

1つの態様において、抗体は二重特異性抗体である。

## 【0076】

本明細書において報告される1つの局面は、5'から3'方向に、  
プロモーター  
全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、  
EV71-IRES、  
全長抗体重鎖をコードする第2核酸、  
膜結合型抗体および分泌型抗体の同時産生のための選択的スプライシング可能なイントロン、および  
膜貫通ドメインまたはGPIアンカー  
を含む、パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクターである。

10

## 【0077】

本明細書において報告される1つの局面は、5'から3'方向に、  
プロモーター  
第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、  
EV71-IRES、および  
5'から3'方向に第2全長抗体重鎖および膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする第2核酸  
を含む、パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクターである。

20

## 【0078】

本明細書において報告される1つの局面は、全長抗体を提示しかつ分泌するかまたは提示する真核細胞の集団を作製するための、先の局面によるレンチウイルスベクターの使用である。

## 【0079】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法である：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、この場合、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々はパイシストロニック発現カセットを含み、該カセットは、EV71-IRESの上流のホール遺伝子座またはノブ遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインは第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインは第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原は同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞は共通の軽鎖を発現し、該重鎖の一方または両方はそれらのC末端において膜貫通ドメインをさらに含む、段階、ならびに

(b) 該真核細胞の集団から、提示された膜結合型全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

30

40

## 【0080】

1つの態様において、EV71-IRESの下流の重鎖のみが、そのC末端において膜貫通ドメインを含む。

## 【0081】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、二重特異性抗体を分泌する細胞を選択する方法である：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、この場合、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々は、分泌型二重特異性抗体をコードするパイシストロニック発現カセットを含み、該カセットは、EV71-IRESの上流のホール遺伝子座またはノブ遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核

50

酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインは第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインは第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原は同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞は共通の軽鎖を発現する、段階、ならびに

(b) 該真核細胞の集団から、分泌された全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

【0082】

1つの態様において、本方法は、第1段階として：

トランスジェニック動物を関心対象の抗原で免疫化する段階であって、この場合、該実験動物のB細胞は同じ軽鎖を発現する、段階を含む。

10

【0083】

1つの態様において、本方法は：

FACSによるバルク選別により、免疫化実験動物のB細胞を選択する段階を含む。

【0084】

1つの態様において、本方法は：

シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階を含む。

20

【0085】

1つの態様において、本方法は：

EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸 (2.2 kbp) のPCRを行う段階であって、膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターにクローニングし、該ベクターの制限切断および再連結により該第1重鎖の膜貫通ドメインを除去する段階を含む。

【0086】

本明細書において報告されるすべての態様は本発明のすべての局面に言及するものとし、任意の可能な組み合わせで組み合わせることができる。

30

【発明を実施するための形態】

【0087】

発明の詳細な説明

抗体の合成およびプロセッシング（折りたたみ、ジスルフィド結合形成、グリコシル化等）に通常関与するすべての細胞成分が生理的な形態および濃度で利用可能であることを確実にする、それらの天然環境、すなわち哺乳動物細胞の分泌経路における全長抗体の発現を用いる選択法を、本明細書において報告する。

【0088】

一般的局面

40

当業者に公知であるように、組換えDNA技術の使用により、核酸および/またはポリペプチドの多数の誘導体の生成が可能になる。このような誘導体は、例えば、置換、変更、交換、欠失、または挿入によって、1つの個々の位置またはいくつかの位置において改変され得る。改変または誘導化は、例えば、部位特異的突然変異誘発の手段によって実施され得る。このような改変は、当業者によって容易に実施され得る（例えば、Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999) を参照のこと）。組換え技術の使用により、当業者は、異種核酸を用いて様々な宿主細胞を形質転換することが可能になる。異なる細胞の転写および翻訳、すなわち発現の機構は同じエレメントを使用するが、異なる種に属する細胞は、とりわけ、異なるいわゆるコドン使用頻度を有し得る。それによって、（アミノ酸配列に

50

関して)同一のポリペプチドが異なる核酸によってコードされる場合がある。また、遺伝暗号の縮重のために、異なる核酸が同じポリペプチドをコードする場合もある。

【0089】

組換えDNA技術の使用により、核酸および/またはポリペプチドの多数の誘導体の生成が可能になる。このような誘導体は、例えば、置換、変更、交換、欠失、または挿入によって、1つの個々の位置またはいくつかの位置において改変され得る。改変または誘導化は、例えば、部位特異的突然変異誘発の手段によって実施され得る。このような改変は、当業者によって容易に実施され得る(例えば、Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999)); Hames, B.D., and Higgins, S.J., *Nucleic acid hybridization - a practical approach*, IRL Press, Oxford, England (1985)を参照のこと)。

10

【0090】

組換え技術の使用により、異種核酸を用いて様々な宿主細胞を形質転換することが可能になる。異なる細胞の転写および翻訳、すなわち発現の機構は同じエレメントを使用するが、異なる種に属する細胞は、とりわけ、異なるいわゆるコドン使用頻度を有し得る。それによって、(アミノ酸配列に関して)同一のポリペプチドが異なる核酸によってコードされる場合がある。また、遺伝暗号の縮重のために、異なる核酸が同じポリペプチドをコードする場合もある。

【0091】

定義

20

「親和性成熟」抗体とは、1つまたは複数の変更を1つまたは複数の超可変領域(HVR)内に有する抗体であって、そのような変更を有さない親抗体と比較して、そのような変更により抗原に対する抗体の親和性が向上している抗体を指す。

【0092】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)を含むがこれらに限定されない様々な抗体構造を包含する。

【0093】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来し、重鎖および/または軽鎖の残りの部分が異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

30

【0094】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の型を指す。抗体には5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうちのいくつかはさらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、およびIgA<sub>2</sub>に分類され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、および $\mu$ と称される。

【0095】

本明細書で用いられる「発現」という用語は、細胞内で起こる転写および/または翻訳過程を指す。細胞における関心対象の核酸配列の転写レベルは、細胞中に存在する対応するmRNAの量に基づいて決定され得る。例えば、関心対象の配列から転写されたmRNAは、RT-PCRによって、またはノーザンハイブリダイゼーションによって定量され得る(Sambrook et al., 1999、前記を参照のこと)。関心対象の核酸によってコードされるポリペプチドは、様々な方法により、例えば、ELISAにより、ポリペプチドの生物活性についてアッセイすることにより、またはポリペプチドを認識しこれに結合する免疫グロブリンを使用した、ウェスタンブロッティングもしくは放射免疫測定法などの、そのような活性に非依存的方法であるアッセイ法を使用することにより、定量され得る(Sambrook et al., 1999、前記を参照のこと)。

40

【0096】

「発現カセット」とは、少なくとも細胞中に含まれる核酸の発現のための、プロモータ

50

ーおよびポリアデニル化部位などの必要な調節エレメントを含む構築物を指す。

【0097】

「発現ベクター」とは、宿主細胞中に含まれる構造遺伝子の発現のために必要なすべてのエレメントを提供する核酸である。典型的に、発現プラスミドは、複製起点および選択マーカーを含む、例えば大腸菌 (*E. coli*) のための原核生物プラスミド増殖単位、真核生物選択マーカー、ならびにそれぞれプロモーター、構造遺伝子、およびポリアデニル化シグナルを含む転写ターミネーターを含む、関心対象の構造遺伝子の発現のための1つまたは複数の発現カセットを含む。遺伝子発現は通常はプロモーターの制御下に置かれ、そのような構造遺伝子は、プロモーターに「機能的に連結される」と称される。同様に、調節エレメントがコアプロモーターの活性を調節する場合、調節エレメントとコアプロモーターは機能的に連結されている。

10

【0098】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。本用語は、天然配列Fc領域および変種Fc領域を含む。1つの態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、重鎖のCys226またはPro230からカルボキシル末端にまで及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン (Lys447) は存在する場合もあれば、または存在しない場合もある。本明細書に特に明記されていない限り、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991), NIH Publication 91-3242に記載されているような、EUインデックスとも称されるEU番号付けシステムに従う。

20

【0099】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域 (HVR) 残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRドメイン: FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。したがって、HVRおよびFR配列は一般的に、VH (またはVL) 中に以下の順序で現れる: FR1-H1 (L1)-FR2 - H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4。

【0100】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、および「全抗体」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、天然抗体構造と実質的に類似している構造を有するか、または本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

30

【0101】

「遺伝子」とは、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の発現をもたらし得る、例えば染色体上またはプラスミド上のセグメントである核酸を意味する。コード領域、すなわち構造遺伝子に加えて、遺伝子は、その他の機能的エレメント、例えば、シグナル配列、プロモーター、イントロン、および/またはターミネーターを含む。

【0102】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に用いられ、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫も含む。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これには初代形質転換細胞、および継代数に関係なくそれらに由来する子孫が含まれる。子孫は核酸内容物が親細胞と完全に一致していなくてもよく、変異を含んでもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異体子孫も、本明細書に含まれる。

40

【0103】

「ヒト抗体」とは、ヒトもしくはヒト細胞によって産生されるか、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、具体的には非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0104】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基およびヒトFR由来のアミノ酸残基

50

を含むキメラ抗体を指す。ある種の態様において、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、可変ドメインでは、HVR（例えば、CDR）のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト抗体のものに相当し、FRのすべてまたは実質的にすべてがヒト抗体のものに相当する。ヒト化抗体は任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。「ヒト化型」の抗体、例えば非ヒト抗体とは、ヒト化操作を受けた抗体を指す。

**【0105】**

本明細書で用いられる「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可变的であり、および/または構造的に明確なループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般的に、天然の4鎖抗体は、6つのHVR；VH中の3つ（H1、H2、H3）およびVL中の3つ（L1、L2、L3）を含む。HVRは一般的に、超可変ループ由来および/または「相補性決定領域」（CDR）由来のアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性を有し、および/または抗原認識に参与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）に存在する（Chothia, C. and Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917)。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3）は、アミノ酸残基、L1の24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65、およびH3の95～102に存在する（Kabat E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242)。VH中のCDR1を除いて、CDRは一般的に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」または「SDR」を含む。SDRは、短縮 CDRまたはa-CDRと称されるCDRの領域内に含まれる。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3）は、アミノ酸残基、L1の31～34、L2の50～55、L3の89～96、H1の31～35B、H2の50～58、およびH3の95～102に存在する（Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633)。別段の指示がない限り、可変ドメイン中のHVR残基および他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書においてKabat et al.、前記に従って番号付けされる。

**【0106】**

「内部リボソーム進入部位」または「IRES」とは、IRESの5'側にある遺伝子とは独立して翻訳開始を機能的に促進し、動物細胞内で単一の転写物から2つのシストロン（オープンリーディングフレーム）が翻訳されることを可能にする配列を表す。IRESは、そのすぐ下流にあるオープンリーディングフレームを翻訳するための、独立したリボソーム挿入部位を提供する（下流とは、本明細書において3'と互換的に用いられる）。ポリシストロン性であり得る、すなわちmRNAから順次翻訳されるいくつかの異なるポリペプチドをコードし得る細菌mRNAとは異なり、動物細胞のほとんどのmRNAはモノシストロン性であり、1つのタンパク質のみの合成をコードする。真核細胞内にポリシストロン性転写物がある場合、翻訳は最も5'側の翻訳開始部位から開始し、最初の終止コドンで終結し、転写物がリボソームから放出されるため、mRNA中の最初にコードされるポリペプチドのみが翻訳される。真核細胞では、転写物中で第2のまたはそれに続くオープンリーディングフレームにIRESが機能的に連結されているポリシストロン性転写物により、下流のオープンリーディングフレームが順次翻訳されて、同じ転写物によってコードされる2つ以上のポリペプチドが産生されるようになる。ベクター構築におけるIRESエレメントの使用は、以前に記載されている。例えば、Pelletier, J., et al., *Nature* 334 (1988) 320-325；Jang, S K., et al., *J. Virol.* 63 (1989) 1651-1660；Davies, M.V., et al., *J. Virol.* 66 (1992) 1924-1932；Adam, M.A., et al., *J. Virol.* 65 (1991) 4985-4990；Morgan, R.A., et al., *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 1293-1299；Sugimoto, Y., et al., *Biotechnology* 12 (1994) 694-698；Ramesh, N., et al., *Nucl. Acids Res.* 24 (1996) 2697-2700；およびMosser, D.D., et al., *BioTechniques* 22 (1997) 150-152を参照されたい。

**【0107】**

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、一般的に少量存在する、例えば自然に生じる変異を含むかまたはモノクローナル抗体調製物の生成中に生じる可能性のある変種抗体を除いて、その集団を構成する個々の抗体は同一であり、および/または同じエピトープと結合する。典型的に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られたという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない、種々の技法によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法およびその他の例示的な方法は、本明細書に記載される。8

10

20

30

40

50

**【0108】**

本明細書で用いられる「核酸」とは、個々のヌクレオチド(塩基とも称される) a、c、g、およびt(またはRNAにおいてはu)からなるポリマー分子、例えば、DNA、RNA、またはそれらの改変物を指す。このポリヌクレオチド分子は、天然ポリヌクレオチド分子、または合成ポリヌクレオチド分子、または1つもしくは複数の天然ポリヌクレオチド分子と1つもしくは複数の合成ポリヌクレオチド分子の組み合わせであってよい。この定義には、1つまたは複数のヌクレオチドが変化した(例えば、突然変異誘発による)、欠失した、または付加された天然ポリヌクレオチド分子もまた包含される。核酸は、単離されてもよく、または別の核酸、例えば、発現カセット、プラスミド、もしくは宿主細胞の染色体中に組み込まれてもよい。核酸は、同様に、個々のヌクレオチドからなるその核酸配列によって特徴づけられる。

**【0109】**

例えばポリペプチドのアミノ酸配列を、このアミノ酸配列をコードする対応する核酸配列に変換するための手順および方法は、当業者に周知である。したがって、核酸は、個々のヌクレオチドからなるその核酸配列によって特徴づけられ、同様に、それによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列によって特徴づけられる。

**【0110】**

本明細書で用いられる「核酸分子」とはまた、組換えで生成され得るポリペプチドをコードする天然の核酸、または部分的にもしくは完全に非天然の核酸を指す。核酸は、単離されたまたは化学的手段によって合成されたDNA断片から構成され得る。核酸は、別の核酸、例えば、発現プラスミドまたは真核宿主細胞のゲノム/染色体中に組み込まれ得る。プラスミドには、シャトルベクターおよび発現ベクターが含まれる。典型的に、プラスミドはまた、原核生物におけるプラスミドのそれぞれ複製および選択のための複製起点(例えば、ColE1複製起点)および選択マーカー(例えば、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性遺伝子)を含む原核生物増殖単位を含む。

**【0111】**

「機能的に連結された」とは2つ以上の成分の並置を指し、この場合、このように記載される成分は、それらが意図された様式で機能することを可能にする関係にある。例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサーは、連結されている配列の転写を制御または調節するようにシスで作用する場合に、コード配列に機能的に連結されている。一般的に、しかし必ずしもそうとは限らないが、「機能的に連結された」DNA配列は連続しており、分泌リーダーとポリペプチドなどの2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合には、連続しかつ(リーディング)フレーム内にある。しかしながら、機能的に連結されたプロモーターは一般的にコード配列の上流に位置するが、必ずしもそれと連続しているとは限らない。エンハンサーは連続している必要はない。エンハンサーは、コード配列の転写を増加させる場合に、コード配列に機能的に連結されている。機能的に連結され

たエンハンサーは、コード配列の上流、内部、または下流に位置してよく、またプロモーターとかなり離れて位置してよい。ポリアデニル化部位は、転写がコード配列からポリアデニル化配列まで進むように、コード配列の下流末端に位置する場合に、コード配列に機能的に連結されている。翻訳終止コドンは、翻訳がコード配列から終始コドンまで進み、そこで終結されるように、コード配列の下流末端（3'末端）に位置する場合に、エクソン核酸配列に機能的に連結されている。連結は、当技術分野において公知の組換え法によって、例えば、PCR方法論を用いて、および/または簡便な制限部位での連結によって達成される。簡便な制限部位が存在しない場合には、慣行に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが用いられる。

【0112】

「ポリシストロン性転写単位」とは、2つ以上の構造遺伝子が同じプロモーターの制御下にある転写単位である。

【0113】

本出願内で用いられる「ポリアデニル化シグナル」（ポリAシグナル）という用語は、特定の核酸配列セグメントの一次転写物の切断およびポリアデニル化を誘導するために用いられる核酸配列を意味する。ポリアデニル化シグナルを含む3'非翻訳領域は、SV40、ウシ成長ホルモン（bGH）の遺伝子、免疫グロブリン遺伝子、およびチミジンキナーゼ遺伝子（tk、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼポリアデニル化シグナル）に由来するポリアデニル化シグナルを含む3'非翻訳領域からなる群より選択され得る。

【0114】

「プロモーター」とは、それが機能的に連結されている遺伝子/構造遺伝子または核酸配列の転写を制御するポリヌクレオチド配列を指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合および転写開始のためのシグナルを含む。使用されるプロモーターは、選択された配列の発現が企図される宿主細胞の細胞型において機能的である。種々の異なる供給源に由来する構成的プロモーター、誘導性プロモーター、および抑制性プロモーターを含む多数のプロモーターが当技術分野において周知であり（かつGenBankなどのデータベースにおいて同定され）、クローン化ポリヌクレオチド（例えば、ATCCなどの寄託機関および他の商業的または個人的な供給源由来）としてまたはその中で利用可能である。

【0115】

「プロモーター」は、構造遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列を含む。典型的に、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位の近位にある、遺伝子の5'非コード領域または非翻訳領域に位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは、コンセンサスヌクレオチド配列によって特徴づけられる場合が多い。これらのプロモーターエレメントには、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的エレメント（DSE；McGehee, R.E., et al., *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 551）、サイクリックAMP応答エレメント（CRE）、血清応答エレメント（SRE；Treisman, R., *Seminars in Cancer Biol.* 1 (1990) 47）、グルココルチコイド応答エレメント（GRE）、ならびにCRE/ATF（O'Reilly, M.A., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19938）、AP2（Ye, J., et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25728）、SP1、cAMP応答エレメント結合タンパク質（CREB；Loeken, M.R., *Gene Expr.* 3 (1993) 253）、およびオクタマー因子などの他の転写因子の結合部位が含まれる（一般に、Watson et al., (eds.), *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1987))、およびLemaigre, F.P. and Rousseau, G.G., *Biochem. J.* 303 (1994) 1-14を参照のこと）。プロモーターが誘導性プロモーターである場合には、転写速度は誘導剤にตอบสนองして増加する。対照的に、プロモーターが構成的プロモーターである場合には、転写速度は誘導剤によって調節されない。抑制性プロモーターもまた公知である。例えば、c-fosプロモーターは、成長ホルモンが細胞表面上のその受容体に結合すると、特異的に活性化される。テトラサイクリン（tet）調節性発現は、例えば、CMVプロモーターとそれに続く2つのTetオペレーター部位からなる人工ハイブリッドプロモーターによって達成され得る。Tetリプレッサーは2つのTetオペレーター部位に結合し、転写を遮断する。誘導因子テトラサイクリ

10

20

30

40

50

ンが添加されると、TetリプレッサーはTetオペレーター部位から放出され、転写が進行する (Gossen, M. and Bujard, H., PNAS 89 (1992) 5547-5551)。メタロチオネインプロモーターおよび熱ショックプロモーターを含む他の誘導性プロモーターについては、例えば、Sambrook et al. (前記)、およびGossen et al., Curr. Opin. Biotech. 5 (1994) 516-520を参照されたい。高レベル発現用の強力なプロモーターとして同定されている真核生物プロモーターの中には、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネインIプロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列、チャイニーズハムスター伸張因子1 (CHEF-1、例えばUS 5,888,809を参照のこと)、ヒトEF-1、ユビキチン、およびヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター (CMV IE) がある。

10

## 【0116】

「プロモーター」は、構成的または誘導性であってよい。エンハンサー (すなわち、転写を増加させるようにプロモーターに作用するシス作用性のDNAエレメント) は、プロモーター単独で得られる発現のレベルを上昇させるために、プロモーターと協同して機能する必要がある場合があり、転写調節エレメントとして含まれ得る。多くの場合、プロモーターを含むポリヌクレオチドセグメントは、エンハンサー配列も含む (例えば、CMVまたはSV40)。

## 【0117】

「転写ターミネーター」という用語は、RNAポリメラーゼにmRNA合成の終結のためのシグナルを付与する、50~750塩基対の長さのDNA配列を意味する。特に、強力なプロモーターを使用した場合に、RNAポリメラーゼのリードスルーを妨げるためには、非常に効率的な (強力な) ターミネーターが発現カセットの3'末端にあることが得策である。非効率的な転写ターミネーターは、望ましくない、例えばプラスミドによってコードされる遺伝子の発現の理由となり得る、オペロン様mRNAの形成を招き得る。

20

## 【0118】

本発明の範囲内において、トランスフェクト細胞は、当技術分野で公知の実質的に任意の種類の特ランスフェクション法で得ることができる。例えば、核酸は、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションによって細胞に導入することができる。代わりに、FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)、X-tremeGENE (Roche Diagnostics GmbH, Germany)、およびLipofectAmine (Invitrogen Corp., USA) などのリポフェクション試薬を用いることもできる。さらにその代わりに、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスに基づく適切なウイルスベクター系によって、核酸を細胞に導入することもできる (Singer, O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 5313-5314)。

30

## 【0119】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれ、VHおよびVL) は、一般的に類似の構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) および3つの超可変領域 (HVR) を含む (例えば、Kindt, T.J., et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと)。抗原結合特異性を付与するには、単一のVHまたはVLドメインで十分な場合がある。さらに、特定の抗原と結合する抗体に由来するVHまたはVLドメインを用いて、それぞれ相補的なVLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングして、その抗原と結合する抗体を単離することができる (例えば、Portolano, S., et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clarkson, T., et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照のこと)。

40

## 【0120】

「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を増殖させることができる核酸分子を意味する。本用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、およびそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれたベクターが含まれる。ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクタ

50

ーは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

【0121】

「動物」という用語は、抗体を産生することができる免疫系を含む生物を意味する。1つの態様において、動物は、魚類、両生類、鳥類、爬虫類、および哺乳類、特に、偶蹄類、齧歯類、および霊長類より選択される。1つの態様において、動物は、ヒツジ、ヘラジカ、シカ、ロバ、ミュールジカ、ミンク、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、ハムスター、モルモット、およびマウスからなる群より選択される。1つの態様において、動物は、マウス、ラット、または霊長類である。1つの態様において、動物は非ヒト霊長類またはヒトである。1つの態様において、動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニック動物である。

10

【0122】

軽鎖可変領域 (LCVR) は、各動物の生殖系列遺伝子に由来する再編成された核酸分子によってコードされる。軽鎖可変領域は、LCVRまたはLCVRのいずれかである。

【0123】

1つの態様において、軽鎖可変領域はヒトLCVRである。1つの態様において、軽鎖可変領域は、SEQ ID NO: 12~18のうちの1つまたは複数とSEQ ID NO: 19のプライマーの組み合わせ、および実施11に記載されるPCR条件を用いて、ヒトB細胞、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニック動物のB細胞から増幅され得る核酸 (DNA) によってコードされる軽鎖可変領域である。

20

【0124】

1つの態様において、軽鎖可変領域はヒトLCVRである。1つの態様において、軽鎖可変領域は、SEQ ID NO: 20~27のうちの1つまたは複数とSEQ ID NO: 28のプライマーの組み合わせ、および実施11に記載されるPCR条件を用いて、ヒトB細胞、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物のB細胞から増幅され得る核酸 (DNA) によってコードされる可変領域である。

【0125】

重鎖可変領域 (HCVR) は、各動物の生殖系列遺伝子に由来する再編成された核酸分子によってコードされる。1つの態様において、重鎖可変領域はヒト重鎖可変領域である。1つの態様において、重鎖可変領域は、SEQ ID NO: 1~4のうちの1つまたは複数とSEQ ID NO: 5のプライマーの組み合わせ、および実施11に記載されるPCR条件を用いて、ヒトB細胞、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物のB細胞から増幅され得る核酸 (DNA) によってコードされる重鎖可変領域である。

30

【0126】

重鎖可変領域 (HCVR) は、各動物の生殖系列遺伝子に由来する再編成された核酸分子によってコードされる。1つの態様において、重鎖可変領域はヒト重鎖可変領域である。1つの態様において、重鎖可変領域は、SEQ ID NO: 6~10のうちの1つまたは複数とSEQ ID NO: 11のプライマーの組み合わせ、および実施11に記載されるPCR条件を用いて、ヒトB細胞、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物のB細胞から増幅され得る核酸 (DNA) によってコードされる重鎖可変領域である。

40

【0127】

抗体

本明細書で提供される方法は、組換えモノクローナル抗体を生成するためのものである。抗体は、これらに限定されないが、単一特異性抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、一価抗体、および多価抗体 (例えば、二価抗体) などの様々な構造のものであってよい。

【0128】

ある種の態様において、抗体はキメラ抗体である。ある種のキメラ抗体は、例えば、US 4,816,567; およびMorrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類由来の可変領域) お

50

よびヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体はその抗原結合断片を含む。

#### 【0129】

ある種の態様において、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化される。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR、(またはその一部)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはその一部)がヒト抗体配列に由来する1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意でまた、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば抗体の特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が得られた抗体)に由来する対応する残基で置換される。

10

#### 【0130】

ヒト化抗体およびそれらの作製方法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633において概説されており、例えば、Riechmann, I., et al., *Nature* 332 (1988) 332-327; Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; US 5,821,337、US 7,527,791、US 6,982,321、およびUS 7,087,409; Kashmiri, S.V., et al., *Methods* 36 (2005) 25-34 (SDR (a-CDR) 移植について記載している); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (「表面再処理 (resurfacing)」について記載している); Dall'Acqua, W.F., et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (「FRシャッフリング」について記載している); ならびにOsbourn, J., et al., *Methods* 36 (2005) 61-68、およびKlimka, A., et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (FRシャッフリングのための「誘導選択 (guided selection)」アプローチについて記載している)においてさらに記載されている。

20

#### 【0131】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「ベストフィット (best-fit)」法を用いて選択されたフレームワーク領域(例えば、Sims, M.J., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308を参照のこと); 特定のサブグループの軽鎖可変領域または重鎖可変領域のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; およびPresta, L.G., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632を参照のこと); ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域(例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633を参照のこと); ならびにFRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域(例えば、Baca, M., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684、およびRosok, M.J., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618を参照のこと)が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0132】

ある種の態様において抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて生成することができる。ヒト抗体は、van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374、およびLonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459において一般的に記載されている。

40

#### 【0133】

ヒト抗体は、抗原曝露に応答して、インタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することにより、調製することができる。このような動物は典型的に、内因性免疫グロブリン遺伝子座に取って代わった、または染色体外に存在する、もしくは動物の染色体中にランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般的に不活化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125、ならびにまた、例えば、XENOMOUSE (商

50

標)技術について記載しているUS 6,075,181およびUS 6,150,584; HUMAB(登録商標)技術について記載しているUS 5,770,429; K-M MOUSE(登録商標)技術について記載しているUS 7,041,870; ならびにVELOCIMOUSE(登録商標)技術について記載しているUS 2007/0061900を参照されたい。このような動物によって生成されたインタクトな抗体に由来するヒト可変領域は、例えば異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、さらに改変することができる。

#### 【0134】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマをベースとした方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒトミエローマ細胞株およびマウス ヒトヘテロミエローマ細胞株が記載されている(例えば、Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; およびBoerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95を参照のこと)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して作製されたヒト抗体もまた、Li, J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562に記載されている。さらなる方法には、例えば、US 7,189,826(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生について記載している)、およびNi, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268(ヒト ヒトハイブリドーマについて記載している)に記載されている方法が含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオマ技術)もまた、Vollmers, H.P., and Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937、およびVollmers, H.P. and Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191に記載されている。

#### 【0135】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーより選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって作製することもできる。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技法を以下に記載する。

#### 【0136】

抗体は、1つまたは複数の所望の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し、所望の結合特性を有する抗体についてこのようなライブラリーをスクリーニングするための種々の方法が、当技術分野において公知である。このような方法は、例えば、Hoogenboom, H.R., et al., *Methods Mol. Biol.* 178 (2002) 1-37において概説されており、例えば、McCafferty, J., et al., *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T., et al., *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S., et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V., et al., *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; およびLee, C.V., et al., *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132においてさらに記載されている。

#### 【0137】

ある種のファージディスプレイ法では、VH遺伝子およびVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって別々にクローニングし、ファージライブラリーにおいてランダムに組換え、次に、Winter, G., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455に記載されているように、これらを抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、一本鎖Fv(scFv)断片またはFab断片のいずれかとして、抗体断片を提示する。免疫化供給源に由来するライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths, A.D., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 725-734に記載されているように、いかなる免疫化も行わずに、ナイーブレパートリーをクローニングして(例えば、ヒトから)、広範囲の非自己抗原およびまた自己抗原に対する抗体の単一の供給源を提供することもできる。最後に、

ナイーブライブラリーはまた、Hoogenboom, H.R. and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388に記載されているように、再編成されていないV遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを用いて高度可変CDR3領域をコードさせ、インビトロで再編成を達成することによって、合成により作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーについて記載している特許公報には、例えば、US 5,750,373、ならびにUS 2005/0079574、US 2005/0119455、US 2005/0266000、US 2007/01117126、US 2007/0160598、US 2007/0237764、US 2007/0292936、およびUS 2009/0002360が含まれる。

【0138】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

10

【0139】

ある種の態様において、抗体は多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体とは、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある種の態様において、結合特異性の一方は第1抗原に対するものであり、他方は異なる第2抗原に対するものである。ある種の態様において、二重特異性抗体は、同じ抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体はまた、抗原を発現する細胞に対して細胞毒性薬剤を局在化させるために用いることもできる。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片として調製することができる。

【0140】

多重特異性抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 軽鎖対の組換え同時発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540、WO 93/08829、およびTraunecker, A., et al., *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659を参照のこと)、および「ノブ・イン・ホール (knob-in-hole) 操作 (例えば、US 5,731,168を参照のこと) が含まれるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、抗体Fc ヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果を操作すること (WO 2009/089004); 2つ以上の抗体または断片を架橋すること (例えば、US 4,676,980、およびBrennan, M., et al., *Science*, 229 (1985) 81-83 を参照のこと); 二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること (例えば、Kostelny, S.A., et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553を参照のこと); 二重特異性抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること (例えば、Hollinger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448を参照のこと); および一本鎖Fv (sFv) 二量体を使用すること (例えば、Gruber, M., et al., *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374を参照のこと); ならびに例えばTutt, A., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作製することもできる。

20

30

【0141】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する改変抗体もまた本明細書に含まれる (例えば、US 2006/0025576を参照のこと)。

【0142】

抗体または断片はまた、WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792、またはWO 2010/145793に記載されているような多重特異性抗体であってもよい。

40

【0143】

方法

ある種の態様では、抗体がグリコシル化される程度を変更するために、すなわち増加または減少させるために、本明細書で提供される方法が用いられる。

【0144】

抗体がFc領域を含む場合、そこに結合する炭水化物を変更することができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は典型的に、一般的にN結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合している、分岐した二分岐オリゴ糖を含む (例えば、Wright, A. and M

50

orrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32を参照のこと)。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「基部」のGlcNAcに結合しているフコースを含み得る。いくつかの態様では、ある種の改善された特性を備えた抗体変種を作出するために、本発明の抗体中のオリゴ糖の改変を行うことができる。

#### 【0145】

1つの態様において、提供される本方法により、Fc領域に（直接または間接的に）結合するフコースを欠いた炭水化物構造を有する抗体が生成される。例えば、このような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であってよい。フコースの量は、例えばWO 2008/077546に記載されているように、MALDI-TOF質量分析により測定して、Asn297に結合しているすべての糖構造（例えば、複合体、ハイブリッド、および高マンノース構造）の合計に対して、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することにより決定される。Asn297とは、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のKabatによる番号付け）に位置するアスパラギン残基を指す；しかしながら、Asn297はまた、抗体における軽微な配列変動のために、297位の約±3アミノ酸上流または下流に、すなわち294~300位に位置する場合もある。このようなフコシル化変種は、改善されたADCC機能を有し得る（例えば、US 2003/0157108；US 2004/0093621を参照のこと）。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変種に関する出版物の例には、US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki, A., et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249；Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622が含まれる。脱フコシル化抗体を産生し得る細胞株の例には、タンパク質フコシル化を欠損したLec13 CHO細胞（Ripka, J., et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545；US 2003/0157108；およびWO 2004/056312、特に実施例11）、および $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8をノックアウトしたCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622；Kanda, Y., et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688；およびWO 2003/085107を参照されたい）が含まれる。

#### 【0146】

ある種の態様では、例えば抗体のFc領域に結合している二分岐オリゴ糖がGlcNAcにより二分される二分オリゴ糖を有する抗体を生成するために、提供される本方法を用いることができる。このような抗体変種は、低減されたフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。このような抗体変種の例は、例えば、WO 2003/011878；US 6,602,684；およびUS 2005/0123546に記載されている。Fc領域に結合しているオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変種もまた生成することができる。このような抗体変種は、改善されたCDC機能を有し得る。このような抗体変種は、例えば、WO 1997/30087；WO 1998/58964；およびWO 1999/22764に記載されている。

#### 【0147】

抗体は、例えばUS 4,816,567に記載されているような組換え法および組成物を用いて生成することができる。核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および/または重鎖）をコードし得る。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのこのような態様において、宿主細胞は以下を含む（例えば、以下で形質転換されている）：(1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列、および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクター、および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクター。1つの態様において、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、またはリンパ球細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0）、またはヒト胚腎臓細胞 (HEK293)

である。1つの態様において、抗体を作製する方法が提供され、この方法は、抗体の発現に適した条件下で、上記に提供されるような抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意で宿主細胞（または宿主細胞培養液）から抗体を回収することを含む。

**【0148】**

抗体を組換えで生成するには、抗体をコードする核酸を単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために1つまたは複数のベクター中に挿入する。このような核酸は、従来の手順を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いて）、容易に単離し配列決定することができる。

10

**【0149】**

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化およびFc領域エフェクター機能が必要でない場合には、抗体を細菌において産生させることができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、US 5,648,237、US 5,789,199、およびUS 5,840,523を参照されたい；大腸菌における抗体断片の発現について記載している、Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, (2003), pp. 245-254もまた参照されたい。発現後、抗体を細菌細胞ペーストから可溶性画分中に単離することができ、さらに精製することができる。

20

**【0150】**

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物も、抗体をコードするベクターに適したクローニングまたは発現の宿主であり、これには、そのグリコシル化経路が「ヒト化」されており、その結果、部分的にまたは完全にヒトのグリコシル化パターンを有する抗体を産生する真菌および酵母株が含まれる（Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414；およびLi, H., et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215を参照されたい）。

**【0151】**

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と共に使用することができる、特にヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞のトランスフェクションに使用することができる、多数のパキキュロウイルス株が同定されている。

30

**【0152】**

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる（例えば、US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978、およびUS 6,417,429（トランスジェニック植物において抗体を産生させるためのPLANTIBODIES（商標）技術について記載している）を参照のこと）。

**【0153】**

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用することができる。例えば、浮遊状態で増殖するように適合化された哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）；ヒト胚腎臓株（293細胞、または例えば、Graham, F.L., et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74に記載されている293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252に記載されているTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDC K）；バッファローラット（buffalo rat）肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562）；例えば、Mather, J.P., et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68に記載されているTRI細胞；MRC 5細胞；およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR陰性（DHFR(-)）CHO細胞（Urla

40

50

ub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 ; ならびにY0、NS0、およびSp2/0などのミエローマ細胞株が含まれる。抗体産生に適したある種の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

【 0 1 5 4 】

発明の特定の態様

所望の特異性を有する抗体を発現する細胞を選択する方法、およびそのような抗体を生成する方法を、本明細書において報告する。

【 0 1 5 5 】

様々なスクリーニング法を用いて抗体を同定することが可能であるが、生産規模でのその後の開発は、タンパク質発現、誤った折りたたみ、および/または誤った翻訳後修飾、ならびにホモ二量体形成などの誤った抗体組み立ての制約によって阻まれ得る。

【 0 1 5 6 】

抗原結合断片とは対照的に、全長抗体は、血中半減期の延長 (数時間または数日と比較して数週間)、例えばADCC、CDC、FcRn結合などの二次的免疫機能の支持といったいくつかの付加的特徴を有する。

【 0 1 5 7 】

1つの態様において、抗体は関心対象の1つの抗原に特異的に結合する。

【 0 1 5 8 】

1つの態様において、抗体は、2つの異なる抗原、または同じ抗原上の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する。

【 0 1 5 9 】

一般的に、関心対象の抗原は、タンパク質抗原、非タンパク質抗原、またはハプテンである。関心対象の抗原は、1つの態様において、(a) 微生物または病原体の抗原、(b) 腫瘍抗原、(c) 自己抗原、および (d) アレルゲンからなる群より選択される。

【 0 1 6 0 】

腫瘍抗原とは、腫瘍または癌に関連しており、抗体が結合し得る、ペプチドなどの化合物である。腫瘍抗原は、例えば、Cohen, et al., Cancer Research, 54 (1994) 1055に記載されているように、癌細胞の粗製抽出物を調製することにより、抗原を部分精製することにより、組換え技術により、または公知の抗原の新規合成によって、癌細胞から調製することができる。腫瘍抗原には、腫瘍もしくは癌ポリペプチドの全体であるか、またはその抗原部分である抗原が含まれる。

このような抗原は、組換えによって、または当技術分野で公知の任意の他の手段によって、単離または調製することができる。癌または腫瘍には、胆道癌；脳癌；乳癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；上皮内新生物；リンパ腫；肝臓癌；肺癌 (例えば、小細胞および非小細胞)；メラノーマ；神経芽細胞腫；口腔癌；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫；皮膚癌；精巣癌；甲状腺癌；および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 6 1 】

「抗原決定基」という用語は、Bリンパ球によって特異的に認識される抗原の一部を意味する。Bリンパ球は、抗体産生によって外来性抗原決定基に応答する。

【 0 1 6 2 】

哺乳動物細胞上に提示される抗体に関して、抗原の結合の特異性は、1つの態様において、本質的に本明細書において実施例12に記載される蛍光アッセイ法で決定され、この場合、蛍光シグナルの強度は、抗体を提示している細胞が結合する抗原の量と相関する。哺乳動物細胞上に提示される抗体は、蛍光シグナルの強度が対照細胞について検出されるシグナルよりも高い場合に、抗原と特異的に結合すると見なされる。1つの態様において、シグナルは、対照細胞のシグナルよりも少なくとも2倍高い。

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

「発現ライブラリー」という用語は、個々の発現ベクターが異なる抗体を発現する、同じ型の多数の発現ベクターを意味する。1つの態様において、発現ライブラリーはウイルス発現ライブラリーである。1つの態様において、発現ライブラリーはレンチウイルス発現ライブラリーである。

【0164】

「感染効率 (MOI)」という用語は、ウイルス発現ライブラリー、特にレンチウイルス発現ライブラリー中の感染性ウイルス粒子の数と、ウイルスに曝露される細胞の数との比を意味する。

【0165】

所望の特異性の抗体を発現する細胞を作製する、選択する、および/または単離する方法を、本明細書において報告する。

10

【0166】

より詳細には、本方法は以下の段階を含む：

全長抗体をコードする核酸を提供する段階

1つの態様において、核酸は、関心対象の抗原と特異的に結合するというそれらの能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択することによって得られる。

【0167】

1つの態様において、核酸は、関心対象の1つまたは2つの抗原と特異的に結合するというその能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団から単一B細胞を選択することによって得られる。

20

【0168】

1つの態様において、単一B細胞はクローンB細胞集団である。

【0169】

1つの態様において、核酸は、単一B細胞またはクローンB細胞集団の単離されたmRNAから可変ドメインコード核酸を増幅し、増幅されたmRNAをcDNAに転写することによって得られる。

【0170】

レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階

本明細書において報告され、本明細書において報告される方法で用いられるレンチウイルス発現ベクターは、全長抗体を可溶性および膜結合型で発現させるためのバイシストロニック発現カセットを含むベクターである。可溶性と膜結合型の抗体を同時に提供することにより、抗体を発現する細胞を表面提示抗体に基づいて選択することができ、分泌抗体を用いて例えば結合特異性について抗体を試験することができる。

30

【0171】

全長抗体を発現させ、かつ哺乳動物細胞上に提示させるには、同じ発現カセットから可溶性および膜結合型を発現させるために、スプライシング可能な核酸をさらに含むバイシストロニック発現構築物を用いる必要があることがさらに見出された。

【0172】

ウイルス粒子中に効率的にパッケージングされるには、レンチウイルス発現ベクターのサイズが限定されるという事実により、および全長抗体が発現されかつ提示されなければならないという事実により、膜貫通コード核酸もまた、短縮し、サイズを減少させなければならない。

40

【0173】

レンチウイルス発現ライブラリーの多様性は、以下によって生じ得る：

(i) 1つの態様において、レンチウイルス発現ライブラリーの多様性は、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生するB細胞のプールから得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸を用いることによって生じる。

(ii) 1つの態様において、レンチウイルス発現ライブラリーの多様性は、1つの抗原も

50

しくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られる、HCVRコード核酸およびLCVRコード核酸のプールより選択されるHCVRコード核酸とLCVRコード核酸の対を用いることにより生じる。

1つの態様において、単一B細胞はB細胞のクローン集団である。

1つの態様において、少なくとも1つのコドンはHCVRまたはLCVRのCDR中にある。1つの態様において、CDRはCDR3である。1つの態様において、CDRはHCDR3である。

(iii) 1つの態様において、レンチウイルス発現ライブラリーの多様性は、異なるHCVRコード核酸と単一のLCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、この場合、該異なるHCVRコード核酸は、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られる。

10

1つの態様において、単一B細胞はB細胞のクローン集団である。

1つの態様において、少なくとも1つのコドンはHCVRのCDR中にある。1つの態様において、CDRはCDR3である。

(iv) 1つの態様において、レンチウイルス発現ライブラリーの多様性は、異なるLCVRコード核酸と単一のHCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、この場合、該異なるLCVRコード核酸は、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ

20

1つの態様において、単一B細胞はB細胞のクローン集団である。

1つの態様において、少なくとも1つのコドンはLCVRのCDR中にある。1つの態様において、CDRはCDR3である。

#### 【0174】

1つの態様において、レンチウイルス発現ライブラリーの多様性の生成は、以下の段階を含む：

(a)：

(i) B細胞の垂集団からRNAを単離する段階、

30

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅する段階；および

(v) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(b)：

(i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、

40

(ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

(iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；

(iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；

(v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第1プールを作製する段階、

(vi) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第2プールを作製する段階、および

(vii) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバー

50

の対を提供する段階；または

(c)：

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第2 DNA分子の対を提供する段階；または

(d)：

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第1 DNA分子の対を提供する段階。

【0175】

分泌型ポリペプチドを生成するためには、関心対象の構造遺伝子は、「シグナル配列」または「リーダーペプチド」をコードするDNAセグメントを含む。シグナル配列は、新たに合成されたポリペプチドをER膜へ、およびER膜を通過するように導き、ポリペプチドはそこを通過して分泌され得る。シグナル配列は、タンパク質がER膜を通過する間に、シグナルペプチダーゼによって切断される。シグナル配列の機能に関しては、宿主細胞の分泌機構による認識が必須である。したがって、用いられるシグナル配列は、宿主細胞の分泌機構のタンパク質および酵素によって認識されなければならない。

【0176】

レンチウイルス発現ライブラリーを作製するために用いられるレンチウイルス発現ベクターによって、分泌型および膜結合型の抗体の発現が可能になる。膜結合型は、抗体重鎖のC末端定常ドメインを、選択的にスプライシング可能な核酸（イントロン）、およびさらには膜貫通またはGPIアンカーのシグナルペプチドをコードするエクソンに連結することにより発現される。

【0177】

本出願内で用いられる「GPIアンカー」という用語は、ポリペプチドまたはタンパク質のC末端に結合する翻訳後修飾を意味する。「GPIアンカー」は、少なくとも1つのエタノールアミンリン酸残基、トリマンノシド、グルコサミン残基、およびイノシトールリン脂質を含むコア構造を有する。このコア構造にもかかわらず、GPIアンカーは通常はある種の微小不均一性を有し、そのためGPIアンカーを有するタンパク質は通常、異なる側鎖修飾を有する同じコア構造の相同なGPIアンカーを有するタンパク質の混合物である。

【0178】

「GPIアンカーのシグナルペプチド」という用語は、GPIアンカーが結合する1つのアミノ酸、任意のスペーサーペプチド、および疎水性ペプチドからなる、ポリペプチドまたはタンパク質のC末端アミノ酸配列を意味する。このシグナルペプチドのほぼすべて、すなわち任意のスペーサーペプチドおよび疎水性ペプチドは、酵素GPIトランスアミナーゼによって翻訳後に除去され、GPIアンカーのコアのエタノールアミンリン酸のアミノ基と、GPIアンカーが結合するアミノ酸との間の結合が形成される。

【0179】

10

20

30

40

50

本出願内で用いられる「膜貫通ドメイン」という用語は、少なくとも1つのエクソンによってDNAレベルでコードされ、かつ細胞外領域、膜貫通領域、および細胞内領域を含むポリペプチドまたはタンパク質を意味する。膜貫通ドメインは一般的に、3つの異なる構造領域：N末端細胞外領域、中央の保存された膜貫通のひと続き、およびC末端細胞質領域を含む。1つの態様において、膜貫通ドメインは、N末端からC末端の方向に、細胞外領域および膜貫通領域を含む。膜貫通ドメインは、細胞内領域または細胞質領域をさらにも含む。

【0180】

「選択的にスプライシング可能な核酸」という用語は、5'スプライス供与部位で始まり、3'スプライス受容部位で終わる核酸を意味する。この選択的にスプライシング可能な核酸は、例えば免疫グロブリン重鎖 $C_H3$ ドメインまたは $C_H4$ ドメインをコードするエクソンの後のイントロンのような、対応するプレmRNAから構成的にスプライシング除去されない非コード領域を含む。選択的にスプライシング可能な核酸の5'スプライス供与部位で起こる「選択的スプライシング事象」は、選択的にスプライシング可能な核酸がプレmRNAからスプライシング除去されるかどうか、またはそれが少なくとも部分的に維持され、成熟（プロセシングされた）mRNA中に含まれるかどうかを決定する事象である。

【0181】

本明細書で用いられる「選択的スプライシング」という用語およびその文法的同義語は、1つまたは複数のイントロンの異なるプロセシングによって、単一のプレmRNAから異なる成熟mRNAが得られ得、したがってポリペプチドの異なるアイソフォームが発現され得る、真核細胞における過程を指す。本発明の1つの態様では、産生されたプレmRNAの単一の、すなわち唯一のイントロンが選択的にスプライシングされ得る。別の態様では、第2核酸が選択的にスプライシングされ得る。さらなる態様において、第2核酸は選択的にスプライシング可能なイントロンを含む。異なるプロセシングは「イエス/ノー」決定であり、すなわち、選択的スプライシング過程において、プロセシングされるイントロン、すなわち「選択的にスプライシング可能な核酸」は、少なくとも部分的に保持されるか、またはスプライシング除去されるかのいずれかである。これは、後に続く異なるエクソンをもたらし分岐点機構として理解される必要はない。これは実際に、選択的にスプライシング可能な核酸がスプライシング除去されるか、または成熟mRNA中に少なくとも部分的に維持されるかのいずれかである機構である。この機構により、選択的にスプライシング可能な核酸、およびひいてはその中に含まれるインフレームの翻訳終止コドンは、保持または除去されるかのいずれかである。

【0182】

選択的スプライシングは、真核細胞における調節機構である。選択的スプライシングにより、成熟mRNA中のエクソンの異なる組み合わせが同じプレmRNAから得られて、同じDNAによってコードされる複数の異なるタンパク質を生じさせることができる。

【0183】

選択的スプライシングを可能にするためには、抗体重鎖のC末端ドメインをコードする最後のエクソンは、インフレームの翻訳終止コドンを欠いていなければならない。

【0184】

「インフレームの翻訳終止コドン」という用語は、先行する核酸コード領域に関するリーディングフレームのフレームシフトを伴わずに核酸のコード領域の後に続く、すなわち翻訳中にコード領域を終結させる、翻訳終止コドン（TAA、TAG、またはTGA）を意味する。インフレームの翻訳終止コドンは、先行する核酸コード領域に機能的に連結されている。

【0185】

「インフレームの翻訳終止コドンを含まない」という用語は、指定の核酸中に翻訳終止コドン（TAA、TAG、またはTGA）が存在しないこと、および/または核酸のコード領域内もしくはその末端に見出され得るが、1つもしくは2つの塩基対シフトのために、プロセシングされたmRNAの翻訳中に認識されず（すなわちフレーム外であり、機能的に連結されて

10

20

30

40

50

いない)、したがって翻訳過程においてコード領域を終結させない翻訳終止コドンが存在することを意味する。

【0186】

「スプライシング可能な核酸」は、少なくとも5'スプライス供与部位、3'スプライス受容部位、および受容部位の20~50塩基上流に通常位置するいわゆる分岐部位を特徴とする。この構造により、RNAスプライシング中に、プレmRNAの5'スプライス供与部位から3'スプライス受容部位までの核酸の認識および切出しが引き起こされる。スプライシング段階中に、ポリペプチドまたはタンパク質が翻訳される元となる成熟mRNAが生成される。本発明の1つの態様において、少なくとも1つの核酸、好ましくは第2核酸は、インフレームの終止コドンなどの付加的な調節エレメントを含むスプライシング可能な核酸である。

10

【0187】

しかし、スプライシング過程は排他的ではない。例えば、イントロンはプレmRNAプロセシング中にプレmRNAから除去されず、したがって成熟mRNA中に少なくとも部分的に組み込まれることが可能である。インフレームの終止コドンがこの「任意で」含まれるイントロン中に存在する場合には、翻訳はこの終止コドンで停止し、コードされるポリペプチドの変種が産生される。

【0188】

イントロンの認識および切出しは、多くの場合、プレmRNA中の付加的なシス作動性エレメントによって調節される。それらの機能および位置に起因して、これらのエレメントは、それぞれエクソンスプライスエンハンサー (ESE)、エクソンスプライスサイレンサー (ESS)、イントロンスプライスエンハンサー (ISE)、またはイントロンスプライスサイレンサー (ISS) と称される (Black, D.L., Annu. Rev. Biochem. 72 (2003) 291-336)。

20

【0189】

大部分の真核生物遺伝子のゲノムDNAは、イントロン エクソン構成を有する。例えば、分泌型の免疫グロブリン重鎖のC末端ドメイン(すなわち、それぞれ $C_H3$ または $C_H4$ )をコードするエクソン内には、5'スプライス供与部位がある。

【0190】

このスプライス供与部位が重鎖プレmRNAのプロセシングにおいて有効ではない場合には、終止コドンを含む、このエクソンに続くイントロンが、成熟mRNA中に少なくとも部分的に保持される。その場合、mRNAは、 $C_H3$ ドメインまたは $C_H4$ ドメインで終了し、可溶性免疫グロブリンに相当する免疫グロブリン重鎖に翻訳される。これは、免疫グロブリン分泌細胞における免疫グロブリン重鎖遺伝子の主要なプロセシング経路である。

30

【0191】

このスプライス供与部位が免疫グロブリン重鎖プレmRNAのプロセシングにおいて有効である場合には、連続するイントロンおよびひいては終止コドンが除去される。したがって、翻訳は、免疫グロブリン重鎖のC末端ドメインの後で停止しない。さらに、翻訳は、後続の部分が、膜貫通ドメインをコードするエクソンまでスプライシングされて継続する。免疫グロブリン重鎖遺伝子のこの少数派のプロセシング経路により、免疫グロブリン産生細胞の細胞表面上に提示される原形質膜結合型免疫グロブリン形態が生じる。

【0192】

この過程は「選択的スプライシング」と称され、この過程において任意で除去される核酸(すなわちイントロン)は、「選択的にスプライシング可能な核酸」と称される。

40

【0193】

異種ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸が、選択的にスプライシング可能な核酸によって/を介して、膜貫通ドメインの少なくとも断片をコードする核酸、またはGPIアンカーのシグナルペプチドをコードする核酸に連結されている場合、すなわち、選択的にスプライシング可能な核酸がこれら2つの核酸の間に位置し、それによってこれら3つの核酸が機能的に連結されている場合には、異種ポリペプチドまたはタンパク質の2つの変種が発現される:可溶性変種、すなわちポリペプチドまたはタンパク質のみを含む変種、および原形質膜結合型変種、すなわちポリペプチドまたはタンパク質と膜貫通ドメイン

50

またはGPIアンカーの両方を含む変種。

【0194】

例えば、真核細胞において免疫グロブリン重鎖を組換え発現させる場合、ゲノムのイントロン エクソン構成を有する核酸、またはコード領域のみを含む核酸、すなわちcDNAのいずれかが使用される。いずれの場合においても、核酸は、免疫グロブリン重鎖のC末端ドメインをコードするエクソンの後の終止コドンで終了する。その後、ゲノム構成において、選択的にスプライシング可能な核酸および膜貫通ドメインを含む、後続のイントロンおよびエクソンが取り除かれる。したがって、このような核酸を用いて、可溶性免疫グロブリン重鎖のみが得られる。

【0195】

免疫グロブリンまたはその断片の組換え発現のために、免疫グロブリン重鎖遺伝子のゲノム構成が少なくとも部分的に保持されている場合、すなわち、C末端ドメインをコードするエクソンの後のイントロン（すなわち、選択的にスプライシング可能な核酸）および膜貫通ドメインをコードする後続のエクソンが保持されている場合には、選択的にスプライシングが可能である。選択的にスプライシング事象において、CH3ドメインまたはCH4ドメインをコードするエクソンの3'末端コドンおよび終止コドンはそれぞれイントロン配列としてノと共に除去され、異なる成熟mRNAが代わりに生成され、この成熟mRNA中のコード領域、すなわちリーディングフレームは、その3'末端において、付加的に維持されたエクソンによって伸長される。このmRNAは、付加的な3'エクソンによってコードされた付加的な膜貫通ドメインまたはその断片を含む、C末端が伸長した免疫グロブリン重鎖に翻訳される。この延伸された免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリンの組み立て中に組み入れられて、結果として原形質膜結合型免疫グロブリンを生じる。驚くべきことに、本発明によるこのような核酸を用いて、異種ポリペプチドを産生するトランスフェクト細胞を選択できることが現在見出されている。この方法論は一般に適用可能であり、免疫グロブリンに制限されない。この方法論を実施するためには、インフレームの終止コドンを含まない異種ポリペプチドの組換え発現のための核酸が、インフレームの翻訳終止コドンおよびポリアデニル化部位を含む免疫グロブリンに由来する選択的にスプライシング可能な核酸とインフレームでこれに機能的に連結されなければならない。後続の第3核酸も同様に多様であり、膜貫通ドメインまたはその断片をコードする任意の核酸、およびGPIアンカーのシグナルペプチドをコードする任意の核酸より選択され得る。これらのエレメント、すなわち、ポリペプチドをコードする核酸、選択的にスプライシング可能な核酸、および膜貫通ドメインまたはGPIアンカーのシグナルペプチドをコードする核酸は、異なる遺伝子および異なる生物から選択し、組み合わせることができる。唯一の必要条件は、選択的にスプライシング可能な核酸中の翻訳終止コドンが、ポリペプチドをコードする核酸のリーディングフレームとインフレームであるような様式で、すなわち、それがリボソームによって認識され得、翻訳が終結されるような様式で、3つの核酸が組み合わせられることである。

【0196】

一般的に言えば、選択的にスプライシングによって、可溶性の異種ポリペプチドのC末端の一部が、イントロンの一部としてプレmRNAから任意で除去されるノされ得る。この部分は、分泌型の3'末端コドン、3'非翻訳領域、および終止コドンを任意で含む。したがって、任意で除去される、5'スプライス供与部位で始まり、3'スプライス受容部位で終わる核酸は、選択的にプロセシングされない変種のC末端と重複するノ重複し得る。

【0197】

第1核酸が免疫グロブリン重鎖をコードする1つの態様において、第1核酸は、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含む。1つの態様において、第3核酸は、膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドのいずれかをコードし、その際、該膜貫通ドメインの断片は単一エクソンによってコードされる。別の態様において、膜貫通ドメインは、M1-M2 エクソン融合物によって、すなわちゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンによってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインである。1つの態様において

10

20

30

40

50

、免疫グロブリン膜貫通ドメインはcDNAによってコードされる。

【0198】

免疫グロブリン重鎖遺伝子の少なくとも部分的に保持された全体的なゲノム構成を有する核酸を宿主細胞中に導入することによって、一方では可溶性異種ポリペプチドを発現し、他方では原形質膜結合型異種ポリペプチドを発現する細胞が得られる。例えば、2つの免疫グロブリン変種を得るために、すなわち選択的スプライシングを可能にするために、免疫グロブリン重鎖遺伝子の完全なゲノム構成、すなわちイントロンおよびエクソンのすべてを維持する必要はない。選択的スプライス部位を機能的な形態で維持することのみが必要とされる。

【0199】

「機能的なスプライス部位」とは、5'スプライス供与部位および3'スプライス受容部位を含み、それによって介在する核酸配列をプレmRNAから切り出すことを可能にする核酸配列である。イントロンの認識および切出しは、多くの場合、プレmRNA上の付加的なシス作動性エレメントによって調節される。それらの機能および位置に起因して、これらのエレメントは、それぞれエクソンスプライスエンハンサー (ESE)、エクソンスプライスサイレンサー (ESS)、イントロンスプライスエンハンサー (ISE)、またはイントロンスプライスサイレンサー (ISS) と称される (Black, D.L., Annu. Rev. Biochem. 72 (2003) 291-336、これは参照により本明細書に組み入れられる)。

【0200】

ポリペプチドの原形質膜結合型変種は、それを発現する細胞に強く結合されている。したがって、原形質膜結合型変種は、異種ポリペプチドまたはタンパク質、例えば免疫グロブリンを発現させるための核酸でうまくトランスフェクトされた細胞を単離するためのマーカーとして使用され得る。1つの態様において、ポリペプチドは免疫グロブリンである。1つの態様において、免疫グロブリンは、IgG、IgE、およびIgAの群より選択される。

【0201】

本発明の次の段階において、DNA分子の対をレンチウイルス発現ベクターにクローニングする。

【0202】

その後、レンチウイルス発現ライブラリーを哺乳動物細胞の第1集団に導入する。形質導入された細胞は、それらの表面上にレンチウイルス発現ライブラリーの抗体を提示する。形質導入された細胞のライブラリーから (すなわち、哺乳動物細胞の第1集団から)、1つまたは複数の細胞を、その / それらの表面上に提示された、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する抗体の能力について選択する。

【0203】

1つの態様において、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体である。

【0204】

1つの態様において、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体は全長抗体である。

【0205】

哺乳動物細胞の表面上に提示される抗体は、膜貫通領域を含む全長抗体として発現される。

【0206】

哺乳動物細胞によって培養液中に分泌される抗体は、全長抗体であり、すなわち膜貫通ドメインを含まない。

【0207】

1つの態様において、発現ライブラリー、特にレンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーは全長抗体をコードし、抗体は分泌型抗体として、および膜貫通領域を含む膜結合型抗体として発現される。

【0208】

1つの態様において、抗原特異的抗体の可変性は、異なる軽鎖可変領域と重鎖可変領域

10

20

30

40

50

をランダムに組み合わせることによって増加する。

【0209】

可変領域のクローニングは、当技術分野で一般的に公知の標準的な手順であり、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、およびニワトリを含む様々な種について記載されている。総説については、Barbas III, et al., (eds.), Phage Display - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press (2001)、特にその中の章、Andris-Widhopf et al., Generation of Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-chain Coding Sequencesを参照されたい。Andris-Widhopf et al.は、上述の種の可変領域コード領域（VRコード領域）、特にHCVRコード領域またはLCVRコード領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドの配列を開示している。さらに、HCVRコード領域またはLCVRコード領域、特にヒトHCVRコード領域またはLCVRコード領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドは、例えば、Immunogenetics (<http://imgt.cines.fr/>)、Kabat ([www.kabatdatabase.com](http://www.kabatdatabase.com))、およびVbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) などのデータベースから利用可能である抗体コード領域の公知の配列を比較することにより、ならびにプライマー設計に適したコンセンサス配列を同定することにより、当業者によって設計され得る。分子生物学における一般知識、上記の手引書 (Barbas III, et al., (eds.) Phage Display - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press (2001))、およびその中で引用されている参考文献に基づいて、当業者は、HCVRコード領域またはLCVRコード領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドを設計することができ、1つの態様において、プライマーは増幅産物のクローニングに適した制限部位を含む。VRを増幅しクローニングするためのさらなる戦略は、Sblattero, D. and Bradbury, A., Immunotechnology 3 (1998) 271-278、およびWeitkamp et al., J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237に記載されている。

10

20

30

【0210】

1つの態様において、可変領域核酸は、組み立てられたコード領域をレンチウイルス発現ベクターに定められた方向でクローニングすることを可能にするための制限部位（RS）を含む。1つの態様において、制限部位は互いに異なり、それらのうちの少なくとも1つは一本鎖オーバーハング（「粘着末端」）を生じ、よって定方向クローニングが可能になる。1つの態様において、RSは8塩基対以上の長さであり、これらに限定されないが、Asc1、Fse1、Not1、Pac1、Pme1、Sfi1、およびSwa1のリストより選択される「低頻度切断」制限酵素によって認識される。

【0211】

ヒトHCVRコード領域、ヒト LCVRコード領域、およびヒト LCVRコード領域を、それぞれフレームワーク1領域および4領域においてアニールする特異的なセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーの混合物を用いて、PCRにより増幅する。プライマーの主要なセットは、Sblattero, D. and Bradbury A., Immunotechnology 3 (1998) 271-278に記載されている。HCVRコード配列、 LCVRコード配列、および LCVRコード配列を増幅するためのアンチセンスプライマーの特異的混合物の使用に代わるものとして、それぞれ定常領域、 定常領域、および 定常領域においてアニールする1つのアンチセンスプライマーを使用することもできる。

40

【0212】

特定の可変領域（VR）コード領域のその後のクローニングの効率は、B細胞の亜集団のトランスクリプトームを事前増幅することにより、特にZhu, et al., BioTechniques 30 (2001) 892-897に記載されているような鑄型スイッチ手順を用いることにより、高めることができる。しかしながら、トランスクリプトームの事前増幅は、ある種の稀なcDNA種の起こり得る喪失および配列エラーの起こり得る蓄積に対してバランスを保つ必要がある。

【0213】

1つの態様において、RNAのcDNAへの転写は、B細胞の亜集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団のトランスクリプトームを事前増幅する段階を含み、事前増幅段階は以下を含む：

(a) RNA中に含まれるポリアデニル化mRNAを一本鎖cDNAに選択的に転写すること；および

50

(b) 該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを増幅すること。

【0214】

1つの態様において、二本鎖cDNAの増幅は、SEQ ID NO: 1~11のオリゴヌクレオチドの1つまたは複数を用いて行われる。1つの態様において、PCRのサイクル数は、20未満、15未満、10~14、または約14である。

【0215】

1つの態様において、DNA分子のプール、特にDNA分子の第1プールおよび/または第2プールはいずれも、独立したPCR反応において得られたDNA分子をプールすることによって作製される。

【0216】

オリゴヌクレオチドの混合物、オリゴヌクレオチドの第1混合物、および/またはオリゴヌクレオチドの第2混合物は、VRコード領域、特にHCVRコード領域またはLCVRコード領域を増幅し得る正確に1対のオリゴヌクレオチドを含むか、または正確に1対のオリゴヌクレオチドからなる。

【0217】

1つの態様において、DNA分子のプール、特にDNA分子の第1プールおよび/または第2プールの作製は、反応において2対以上のオリゴヌクレオチドを用いて、単一反応において行われる。

【0218】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第1混合物は、ヒトHCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0219】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第1混合物は、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 11からなる群より選択される少なくとも2つ、特にすべてのオリゴヌクレオチドを含む。

【0220】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第2混合物は、LCVRコード領域、特にヒトLCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0221】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第2混合物は、LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、この場合特に、該オリゴヌクレオチドの混合物、特に該オリゴヌクレオチドの第2混合物は、SEQ ID NO: 12~SEQ ID NO: 19からなる群より選択される少なくとも2つ、特にすべてのオリゴヌクレオチドを含む。

【0222】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第2混合物は、LCVRコード領域、特にヒトLCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0223】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、特にオリゴヌクレオチドの第2混合物は、LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、この場合さらに特に、該オリゴヌクレオチドの混合物、特に該オリゴヌクレオチドの第2混合物は、SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 28からなる群より選択される少なくとも2つ、特にすべてのオリゴヌクレオチドを含む。

【0224】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドの混合物、オリゴヌクレオチドの第1混合物またはオリゴヌクレオチドの第2混合物は、VRコード領域を増幅し得るプライマーの全量を含み、この場合、この全量中に含まれる全フォワードプライマーと全リバースプライマーは等モル比である。

10

20

30

40

50

## 【0225】

1つの態様において、発現ライブラリーによって、特にレンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体は、正確に1種類のLCVRを含む。

## 【0226】

抗体の細胞表面提示を確実にするために、抗体鎖は、該抗体鎖を細胞の、特に哺乳動物細胞の小胞体を通して分泌経路へと導くシグナルペプチドを伴って発現されるが、この場合特に、該シグナルペプチドは該抗体鎖の各々のN末端に位置し、この場合さらに特に、該シグナルペプチドは、該細胞、特に該哺乳動物細胞におけるプロセッシングおよび輸送中に抗体鎖から切断される。さらに、抗体重鎖は、ある種の割合で、細胞膜において抗体を固定する膜貫通領域を伴って発現される。とりわけ、膜貫通領域は抗体重鎖のC末端に位置し、抗体を細胞の外表面に付着させたままにする。細胞膜における抗体の固定はまた、例えばGPI連結によっても達成され得る (Moran & Caras, *The Journal of Cell Biology* 115 (1991) 1595-1600)。

10

## 【0227】

タンパク質を真核細胞の分泌経路へと導くシグナルペプチドは、当技術分野で一般的に公知であり、例えば、Nielsen, et al., *Protein Engineering* 10 (1997) 1-6に記載されている。

## 【0228】

1つの態様において、シグナルペプチドは、分泌タンパク質またはI型膜貫通タンパク質に由来する。

20

## 【0229】

1つの態様において、シグナルペプチドは、血清タンパク質ファミリーのメンバー（アルブミン、トランスフェリン、リポタンパク質、免疫グロブリン）、細胞外基質タンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカン）、ペプチドホルモン（インスリン、グルカゴン、エンドルフィン、エンケファリン、ACTH）、消化酵素（トリプシン、キモトリプシン、アミラーゼ、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ）、または乳タンパク質（カゼイン、ラクトアルブミン）などの分泌タンパク質に由来する。

## 【0230】

1つの態様において、シグナルペプチドは、免疫グロブリン、特に軽鎖可変領域に由来する。

30

## 【0231】

1つの態様において、シグナルペプチドは、マウスIg 軽鎖シグナルペプチドである。

## 【0232】

1つの態様において、膜貫通領域は膜内在性タンパク質に由来する。

## 【0233】

1つの態様において、膜貫通領域は、細胞接着分子（インテグリン、ムチン、カドヘリン）、レクチン（シアロアドヘシン、CD22、CD33）、または受容体チロシンキナーゼ（インスリン受容体、EGF受容体、FGF受容体、PDGF受容体）などのI型膜貫通タンパク質に由来する内部輸送停止膜アンカー配列 (Do, et al., *Cell* 85 (1996) 369-78; Mothes, et al., *Cell* 89 (1997) 523-533) である。

40

## 【0234】

1つの態様において、膜貫通領域は、クラスGのヒト膜結合型免疫グロブリンの膜貫通領域である。

## 【0235】

1つの態様において、膜貫通領域は、受容体チロシンキナーゼ、より特にヒト血小板由来増殖因子受容体 (hPDGFR)、最も特にhPDGFR B鎖（アクセッション番号NP 002600）に由来する。

## 【0236】

1つの態様において、膜貫通領域はヒトPDGFR 鎖に由来する。

## 【0237】

50

レンチウイルスは、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、および昆虫細胞を含む広範囲の宿主細胞において機能し得る。それらのゲノムは、ウイルスゲノムの核酸によってコードされる、異種タンパク質を含むタンパク質の大量の発現を指示し得るエレメントを含む。

【0238】

構造的ウイルスタンパク質と非構造的ウイルスタンパク質の発現は分離され、構造タンパク質は、パッケージング細胞株またはヘルパーウイルスレプリコンのいずれかによって提供され得る。1つの態様において、発現ライブラリーは別個のレンチウイルスRNAレプリコンに基づいている。1つの態様において、一方のレプリコンは非構造タンパク質をコードし、他方は構造タンパク質をコードする。

【0239】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団は、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体の力価上昇を示す動物に由来する。動物の血中の、関心対象の抗原と結合する抗体の力価は、当技術分野で一般的に公知の方法によって、例えばELISAによって決定することができる。

【0240】

1つの態様において、動物は関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に曝露されるかまたは曝露されており、この場合特に、この曝露は、自然曝露、病原体による感染、または免疫化による。

【0241】

1つの態様において、動物は病原体により感染されるかまたは感染されており、病原体は関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を含む。

【0242】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団は、免疫原性組成物により免疫化された動物に由来し、免疫原性組成物は、(a) 関心対象の抗原；(b) 関心対象の抗原の断片；および (c) 関心対象の抗原の抗原決定基を含むか、またはあるいはそれらからなる。

【0243】

本発明の状況において、当技術分野で公知の任意の免疫原性組成物、特に強力な免疫応答を生じる組成物を用いることができる。例示的な免疫原性組成物は、ウイルス様粒子 (VLP)、特にRNAバクテリオファージのVLPを含む組成物である。有用な免疫原性組成物は、WO 2006/097530、WO 2006/045796、WO 2006/032674、WO 2006/027300、WO 2005/117963、WO 2006/063974、WO 2004/084939、WO 2004/085635、WO 2005/068639、WO 2005/108425、WO 2005/117983、WO 2005/004907、WO 2004/096272、WO 2004/016282、WO 2004/009124、WO 2003/039225、WO 2004/007538、WO 2003/040164、WO 2003/031466、WO 2004/009116、およびWO 2003/024481において報告されている。

【0244】

1つの態様において、動物の免疫化は免疫原性組成物を用いて行われ、免疫原性組成物の免疫原性は、免疫刺激物質によって、特に免疫刺激オリゴヌクレオチドによって、最も特には、例えばWO 2003/024481、WO 2005/004907、およびWO 2004/084940に開示されている非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドによって増強される。

【0245】

1つの態様において、非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドはG10 (WO 2005/004907のSEQ ID NO: 54) である。

【0246】

1つの態様において、免疫原性組成物による動物の免疫化は、免疫原性組成物を動物に、少なくとも1週間の間隔で、特に2週間～3カ月間隔で、少なくとも3回、特に3～6回投与することによって行われる。

【0247】

1つの態様において、動物の免疫化は、1回の投与当たり少なくとも100 μg、特に200 μg～1000 μgの免疫原性組成物を動物に投与することによって行われる。

【0248】

10

20

30

40

50

1つの態様において、免疫原性組成物は、アジュバント、特にフロイントの完全アジュバントもしくは不完全アジュバントまたはミョウバンを含む。

【0249】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団は、(a) 血液；(b) 二次リンパ器官、特に脾臓またはリンパ節；(c) 骨髄；および (d) 記憶B細胞を含む組織より選択される供給源に由来する。1つの態様において、供給源は血液である。1つの態様において、単離されたB細胞の集団は、末梢血単核細胞 (PBMC) を含むか、または特にはこれからなる。

【0250】

1つの態様において、動物は哺乳類または鳥類である。

10

【0251】

1つの態様において、動物は、(a) ヒト；(b) マウス；(c) ウサギ；(d) ニワトリ；および (e) ラットからなる群より選択される。

【0252】

1つの態様において、動物は哺乳類、特にラット、マウス、ウサギ、またはヒトである。

【0253】

1つの態様において、動物はトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギまたはヒトである。

【0254】

抗原特異的抗体のスクリーニングおよびクローニングの効率は、抗原特異的B細胞を濃縮することにより有意に高めることができる。関心対象の抗原と特異的に結合するというそれらの能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する方法は、当技術分野において一般的に公知である。これらの方法は、単離されたB細胞の集団中に含まれる抗原特異的B細胞と関心対象の抗原との相互作用に基づいている。

20

【0255】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、以下を含む：

(a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；および

30

(b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞または単一B細胞を選択すること。

【0256】

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する方法は、抗原で被覆した担体に対するB細胞の結合、およびFACS選別であり、WO 2004/102198に記載されている。

【0257】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、以下を含む：

(a) 担体を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で被覆すること；

40

(b) 単離されたB細胞の集団を該担体と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を介して該B細胞を該担体に結合させることを可能にする、こと；

(c) 結合していないB細胞を除去することであって、この場合特に該担体はビーズを含むかまたはさらに特にはビーズからなり、この場合なおさらに特には該ビーズが常磁性ビーズである、こと；ならびに

(d) 該常磁性ビーズからB細胞の亜集団または単一B細胞を回収すること。

【0258】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、FACS選別によって行われる。

50

## 【0259】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、以下を含む：

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、こと；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているB細胞を分離すること。

## 【0260】

1つの態様において、蛍光色素は、(a) PerCP、アロフィコシアニン (APC)、(b) テキサスレッド、(c) ローダミン、(d) Cy3、(e) Cy5、(f) Cy5.5、(f) Cy7、(g) Alexa Fluor 色素、特にAlexa 647 nmまたはAlexa 546 nm、(h) フィコエリトリン (PE)、(i) 緑色蛍光タンパク質 (GFP)、(j) タンデム色素 (例えば、PE-Cy5)、および (k) フルオレセインイソチオシアネート (FITC) からなる群より選択される。

10

## 【0261】

1つの態様において、蛍光色素はAlexa 647 nmまたはAlexa 546 nmである。

## 【0262】

1つの態様において、蛍光色素による化合物の、特に関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基の標識は、当技術分野で公知の任意の方法によって、特に化合物に蛍光色素を結合することにより化合物を直接標識することによって行われ、この場合、この結合は共有結合および非共有結合を介してもたらされ得る。あるいは、蛍光色素による化合物の、特に関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基の標識は、化合物に、蛍光色素を含む第2化合物、特に抗体を結合させることによって間接的に行われる。

20

## 【0263】

B細胞の亜集団は、関心対象の抗原と特異的に結合するという細胞の能力に加えて、そのクローニングが目的とされる免疫グロブリンを発現するB細胞の型に特異的である付加的なマーカーについてさらに選択することができる。代わりに、望ましくない型の免疫グロブリンを主に発現するある種の望ましくない型のB細胞を排除することもできる。加えて、生細胞を選択するために、例えばPI (ヨウ化プロピジウム) または7-AAD (7-アミノ-アクチノマイシン) などの生存マーカーを適用することができる。さらに加えてまたはその代わりに、死細胞またはアポトーシス細胞を選別除去するために、例えばYO-PRO-1またはアネキシンVなどの細胞死またはアポトーシスのマーカーを適用することができる。

30

## 【0264】

さらに、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する際に、B細胞特異的マーカー、特にCD19またはB220の存在に関する陽性選択を含めることが有利である。

## 【0265】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、以下を含む：

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞の集団または単一B細胞を選択すること；ならびに
- (c) 少なくとも1つの付加的なパラメータについてB細胞を選択することであって、この場合特に、この少なくとも1つの付加的なパラメータについての選択が以下のものである、こと：

40

(i) B細胞特異的マーカー、特にCD19もしくはB220の存在、およびB細胞の生存より選択されるパラメータについての陽性選択；ならびに / または

(ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

## 【0266】

50

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する段階は、クラススイッチしたB細胞、特にIgMおよび/またはIgD陰性B細胞、最も特にIgMおよびIgD陰性B細胞を選択することをさらに含む。

【0267】

1つの態様において、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階は、以下を含む：

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が第1蛍光色素で標識されており、特に該蛍光色素がAlexa 647 nm、Alexa 488、またはAlexa 546 nmである、こと；
- (b) 単離されたB細胞の集団の細胞を抗IgM抗体および/または抗IgD抗体と接触させることであって、該抗IgM抗体および/または該抗IgD抗体が第2蛍光色素および/または第3蛍光色素で標識されており、該第2蛍光色素および/または該第3蛍光色素が、該第1蛍光色素によって放出される蛍光の波長とは異なる波長で蛍光を放出する、こと；ならびに
- (c) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているが該抗IgM抗体には結合していない、および/または該抗IgD抗体には結合していないB細胞の集団または単一B細胞を分離すること。

【0268】

その後のスクリーニング過程の効率のためには、絶対に必須というわけではないが、抗体を発現し、かつその表面上に提示する各細胞は、約1つ、特に正確に1つの単一の抗体種を含み、特に各細胞が異なる抗体種を含むことが有利である。これは「細胞当たり1抗体形式」と称される。

【0269】

細胞当たり1抗体形式は、例えば、ウイルス発現ライブラリー、特にレンチウイルスのウイルス発現ライブラリーを用いること、および発現ライブラリー、すなわちウイルス粒子を、提示のために用いられる細胞の集団HEK293に導入/形質導入する際に、真核細胞、特に哺乳動物細胞の数当たり低い割合のウイルス粒子を選択することによって、達成することができる。

【0270】

1つの態様において、発現ライブラリーはウイルス発現ライブラリー、特にレンチウイルス発現ライブラリーであり、発現ライブラリーを真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団に導入することは、真核細胞、特に哺乳動物細胞にウイルス発現ライブラリー、特にレンチウイルス発現ライブラリーを感染させることによって行われ、さらに特に、感染は、最大限で10、特に最大限で1、より特に最大限で0.2、および最も特に最大限で0.1の感染効率で行われる。1つの態様において、感染効率は約0.1である。

【0271】

1つの態様において、細胞の単離はFACS選別によって行われる。1つの態様において、細胞の単離は以下の段階を含む：

- (a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で染色する段階であって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、段階；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階。

【0272】

1つの態様において、FACS選別によって、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階は、少なくとも1つの付加的なパラメータを用いて細胞をさらに選択する段階を含む。1つの態様において、少なくとも1つの付加的なパラメータは以下より選択される：

- (i) 細胞の生存についての陽性選択；ならびに/または
- (ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマー

10

20

30

40

50

カーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

【0273】

陰性選択はまた、1つまたは複数の、特に1つの望ましくない抗原の結合に関する陰性選択を含み得る。望ましくない抗原と結合する抗体を発現する細胞を打ち負かすために、スクリーニングに特に非標識形式で望ましくない抗原を任意で含めることは、当業者の技術の範囲内である。

【0274】

1つの態様において、本方法は以下の段階をさらに含む：

- (a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の存在下で、個々の細胞の少なくとも1つ、特に正確に1つを培養する段階；
- (b) 関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するという、該真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の能力を確認する段階。

10

【0275】

1つの態様において、真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または、特におよび、真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団は、(a) BHK 21細胞、特にATCC CCL-10；(b) Neuro-2a細胞；(c) HEK-293T細胞、特にATCC CRL-11268；(d) CHO-K1細胞、特にATCC CRL-62；および (e) HEK293細胞より選択される細胞を含むか、または特にはそれらの細胞からなる。

【0276】

1つの態様において、真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団は、CHO-K1細胞を含むか、または特にはCHO-K1細胞からなり、さらに特には発現ライブラリーはレンチウイルス発現ライブラリーである。

20

【0277】

関心対象の抗体を提示する個々の細胞を用いて、当技術分野で一般的に公知の方法を使用して、細胞上に提示された抗体の可変領域を含む抗体をクローニングすること、および組換えで発現させることができる（例えば、Weitkamp, et al., J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237を参照のこと）。原理的には、任意の公知の形態で（抗体の異なる形態については、Hollinger & Hudson, Nature Biotechnology 23 (2005)を参照されたい）、特にIgGとして、最も特には完全にヒトのIgGとして、抗体を発現させることが可能である。

【0278】

したがって、以下の段階を含む、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体を生成する方法を、本明細書において報告する：

30

- (a) 本明細書において報告される方法に従って、抗体を発現する細胞を単離する段階；
- (b) 該単離された細胞からRNAを得る段階；
- (c) 該RNAから該抗体をコードするcDNAを合成する段階；
- (d) 該cDNAを発現ベクターにクローニングする段階；
- (e) 細胞において該抗体を発現させる段階；および
- (f) 該抗体を精製する段階。

【0279】

1つの態様において、抗体はLCVRおよびHCVRを含み、この場合特に、該HCVRおよび該LCVRは同じ個別細胞に由来する。

40

【0280】

1つの態様において、cDNAの合成は、RNAから一本鎖cDNAを合成する段階を含む。

【0281】

1つの態様において、cDNAの合成は、一本鎖cDNAからcDNAを増幅する段階をさらに含む、特にこの増幅は以下を用いて行われる：

- i) プライマーとしての、SEQ ID NO: 1~4のオリゴヌクレオチドのうちの1つおよびSEQ ID NO: 5のオリゴヌクレオチド、または
- ii) プライマーとしての、SEQ ID NO: 6~10のオリゴヌクレオチドのうちの1つおよびSEQ ID NO: 11のオリゴヌクレオチド。

50

## 【0282】

1つの態様において、融合生成物の発現は、哺乳動物細胞において、特にCHO-K1細胞およびHEK293細胞において行われる。

## 【0283】

免疫グロブリンとして、特に種特異的免疫グロブリンとして、最も特にはマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、またはヒト免疫グロブリンとして、最も特には完全にヒトの免疫グロブリンとして抗体を発現させることにより、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体を生成する方法を、本明細書において報告する。

## 【0284】

以下の段階を含む、関心対象の抗原と特異的に結合する抗体を生成する方法を、本明細書において報告する。

10

- (a) 本明細書において報告される方法に従って、抗体を発現する細胞を単離する段階；
- (b) 該細胞からRNAを得る段階；
- (c) 該RNAからcDNAを合成する段階；
- (d) 該cDNAから、該細胞によって発現される該抗体の可変領域 (VR) をコードするDNAを増幅する段階；
- (e) 該DNAを含む発現構築物を作製する段階であって、該発現構築物が、該細胞によって発現される該抗体の少なくとも1つのVRをコードする、段階；
- (f) 細胞において該発現構築物を発現させる段階。

## 【0285】

20

1つの態様において、本方法は以下の段階を含む：

- (a) 上記の方法に従って、抗体を発現する細胞を単離する段階；
- (b) 該細胞からRNAを得る段階；
- (c) 該RNAからcDNAを合成する段階；
- (d) 該cDNAから、該細胞によって発現される該抗体のHCVRをコードする第1 DNAを増幅する段階；
- (e) 該第1 DNAを含む第1発現構築物を作製する段階であって、該第1発現構築物が、重鎖定常領域 (HCCR) および該HCVRを含む重鎖免疫グロブリンをコードする、段階；
- (f) 該cDNAから、該細胞によって発現される該抗体のLCVRをコードする第2 DNAを増幅する段階；
- (g) 該第2 DNAを含む第2発現構築物を作製する段階であって、該第2発現構築物が、軽鎖定常領域 (LCCR) および該LCVRを含む軽鎖免疫グロブリンをコードする、段階；
- (h) 細胞において該第1発現構築物および該第2発現構築物を発現させる段階。

30

## 【0286】

さらなる好ましい態様において、HCCR、HCVR、LCCR、およびLCVRはヒト起源のものである。

## 【0287】

1つの態様において、発現構築物、第1発現構築物、および/または第2発現構築物は、疎水性リーダー配列、特に種特異的疎水性リーダー配列、最も特にはヒト疎水性リーダー配列をさらにコードする。1つの態様において、第1発現構築物はヒト重鎖疎水性リーダー配列をさらにコードする。1つの態様において、第2発現構築物はヒト軽鎖疎水性リーダー配列をさらにコードし、この場合、該ヒト軽鎖疎水性リーダー配列は、(a) ヒト 軽鎖疎水性リーダー配列；および (b) ヒト 軽鎖疎水性リーダー配列からなる群より選択される。

40

## 【0288】

1つの態様において、cDNAの合成は、RNAから一本鎖cDNAを合成する段階を含む。

## 【0289】

1つの態様において、cDNAの合成は、一本鎖cDNAからcDNAを増幅する段階をさらに含む。

## 【0290】

50

1つの態様において、HCCRはヒトHCCRであり、特に、(a) ヒト 1 HCCR ; (b) ヒト 2 HCCR ; および(c) ヒト 4 HCCRからなる群より選択されるヒトHCCRである。

【0291】

1つの態様において、LCCRはヒトLCCRであり、特に、(a) ヒト LCCR ; および (b) ヒト LCCRからなる群より選択されるヒトLCCRである。

【0292】

1つの態様において、第1 DNAの増幅はHCVR特異的プライマーを用いて行われる。

【0293】

1つの態様において、第2 DNAの増幅はLCVR特異的プライマーを用いて行われ、この場合特に、該LCVR特異的プライマーは、 LCVR特異的プライマーおよび LCVR特異的プライマーからなる群より選択される。1つの態様において、LCVR特異的プライマーは LCVR特異的プライマーであり、この場合特に、該 LCVR特異的プライマーは、SEQ ID NO: 12~SEQ ID NO: 18より選択される任意の1つとSEQ ID NO: 19の組み合わせである。1つの態様において、LCVR特異的プライマーは LCVR特異的プライマーであり、この場合特に、該 LCVR特異的プライマーは、SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27より選択される任意の1つとSEQ ID NO: 28の組み合わせである。

10

【0294】

1つの態様において、LCCRはヒト LCCRであり、この場合LCVRはヒト LCVRである。1つの態様において、LCCRはヒト LCCRであり、この場合LCVRはヒト LCVRである。

【0295】

原理的には、重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンは、同じ細胞において2つの異なる発現ベクターを発現させることによって、組換えで生成することができる。あるいは、軽鎖をコードする発現構築物および重鎖をコードする発現構築物を単一の発現ベクターにクローニングすることもできる。したがって、1つの態様において、第1発現構築物および第2発現構築物の発現は、第1発現ベクターの一部として該第1発現構築物を発現させること、および第2発現ベクターの一部として該第2発現構築物を発現させることを含み、この場合、該第1発現ベクターと該第2発現ベクターは細胞に同時トランスフェクトされる。1つの態様において、第1発現構築物および第2発現構築物の発現は、同じ発現ベクターの一部として該第1発現構築物および該第2発現構築物を発現させることを含む。

20

【0296】

種特異的抗体、特にヒト抗体の発現のためには、その種の、特にヒトのHCCRまたはLCCR、および対応するリーダー配列をコードし、かつ対応するVRコード領域の挿入を可能にする制限部位を含む発現カセットを作製する。1つの態様において、第1発現構築物の作製は、第1 DNAを第1発現カセットにクローニングする段階を含み、この場合、該第1発現カセットは、HCCRおよび特にHCCR疎水性リーダー配列をコードする。1つの態様において、第2発現構築物の作製は、第2 DNAを第2発現カセットにクローニングする段階を含み、この場合、該第2発現カセットは、LCCRおよび特にLCCR疎水性リーダー配列をコードする。

30

【0297】

1つの態様において、抗体は、(a) 一本鎖抗体、特にscFv ; (b) ダイアボティ ; (c) Fab断片 ; (d) F(ab')<sub>2</sub>断片 ; および (d) 特にIgG、IgA、IgE、IgM、およびIgDより選択される全長抗体より選択される形態で発現される。1つの態様において、抗体は完全にヒトの抗体である。

40

【0298】

1つの態様において、抗体は、IgGクラス的全抗体として、特にIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4として発現され、この場合特に、抗体はヒト抗体であり、最も特に完全にヒトの抗体である。

【0299】

抗体の発現は、当技術分野で公知の任意の真核生物発現系で行うことができる。典型的におよび特に、抗体の発現は真核細胞で行われ、さらに特に、真核細胞は、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞より選択される。1つの態様において、抗体の発現は哺乳

50

動物細胞で行われ、この場合特に、哺乳動物細胞はHEK細胞、CHO細胞、COS細胞より選択される。とりわけ、哺乳動物細胞はCHO細胞である。

【0300】

真核細胞、特に哺乳動物細胞の表面上に全長抗体を提示させるための発現ベクターを、本明細書においてさらに報告する。発現ベクターは、1つの態様においてウイルス発現ベクターであり、より特にはレンチウイルス発現ベクターである。1つの態様において、発現ベクターは、シグナルペプチド、膜貫通領域をコードするDNAエレメントを含み、この場合、該発現ベクターは、抗体可変領域をコードするDNA分子の該発現ベクターへのクローニング、特に方向特異的クローニングを可能にする制限部位を含む。さらなる好ましい態様において、発現ベクターは、N末端からC末端の方向にシグナルペプチド、抗体重鎖、および膜貫通領域を含む膜結合型抗体の発現を可能にする方向で、該DNAエレメントおよび該制限部位を含む。

10

【0301】

本明細書において報告される発現ベクターを含む発現ライブラリー、特に全長抗体を発現する発現ライブラリーを、本明細書において報告する。

【0302】

本明細書において報告される発現ベクターを含むか、または本明細書において報告される発現ライブラリーの少なくとも1つの標本を含む真核細胞、特に哺乳動物細胞を、本明細書において報告する。

【0303】

抗体の最適化/成熟のための方法を、本明細書においてさらに報告する。本方法は、小~中程度のサイズの多様性、すなわち400を超える変種をスクリーニングするのに特に適している。本方法は、哺乳動物細胞、特にHEK293細胞を用いて行うことができる。

20

【0304】

本明細書において報告される細胞ディスプレイ法により、HEK293細胞内/上での全長抗体の発現および提示が可能になる；  
限られた資源を必要とする効率的な過程が可能になる；  
すべての抗体変種が1本のチューブ内で得られるために、経済的な1本のチューブの過程が可能になる；

30

抗体成熟が可能になる；および

例えばヒトドナーからの、または合成DNAオリゴマーを用いるPCRといった特定の様式の作製に依存しない、安価なライブラリーの作製が可能になる。

【0305】

近年発達した、B細胞に基づく抗体の生成およびスクリーニングの方法によって、哺乳動物細胞において、設計された/操作された/天然のIgGベースの抗体ライブラリーを生成しスクリーニングするための新たな方法が提供される。

【0306】

$10^3 \sim 10^6$ の多様性を有する、全長抗体の設計された/操作された/中程度の多様性の哺乳動物細胞ライブラリーを用いる方法を、本明細書において報告する。

【0307】

$10^6$ までの変種というライブラリーサイズによって、  
1.000種の軽鎖および1.000種の重鎖の提示（結果として $10^6$ 種の異なる抗体が生じる）

40

；  
単一の鎖をシャッフリングして、他方を一定に保つこと（結果として $10^6$ 種の可能な変種が生じる）；

単一CDRの成熟（ $10^6$ 種の変種により、4~5アミノ酸位置のランダム化が可能になる（位置当たり19種のアミノ酸長変種、Cys以外のすべてのアミノ酸：4アミノ酸位置がランダム化される場合、130.000種の変種））

が可能になる。

【0308】

50

膜結合型および分泌型で発現される全長IgGを用いる方法を、本明細書において報告する。

【0309】

抗体配列の特別注文ベースの/ランダムな設計を可能にする方法を、本明細書において報告する。

【0310】

抗体変種のFACSベースのパニングおよび/またはスクリーニングを用いる方法を、本明細書において報告する。

【0311】

本明細書において報告される方法は、事前選択されたヒトドナー由来の抗体軽鎖配列および重鎖配列、例えばPCRによって作製されたヒトB細胞由来の抗体配列の組み立てのために用いることができる。

10

【0312】

1つの態様において、B細胞は血液に由来する/から得られる/から単離される。

【0313】

本明細書において報告される方法は、例えば軽鎖シャッフリングまたは個々の(単一の)CDRの改変/ランダム化による、抗体の、親和性、種交差反応性、pH依存的抗原結合などの抗原結合特性の成熟のために用いることができる。

【0314】

本明細書において報告される方法は、事前選択されたヒトドナー由来の抗体軽鎖配列および重鎖配列(例えば、PCRによって単離されたヒト腫瘍B細胞由来の抗体配列)の組み立てのために用いることができる。

20

【0315】

本明細書において報告される方法は、合理的に設計された抗体配列(例えば、触媒抗体、プロ抗体)の試験および組み立てのために用いることができる。したがって、本明細書において報告される方法は、特定の配列特徴の導入による抗体操作のために用いることができる。

【0316】

本明細書において報告される方法は、古典的なCDR移植アプローチが失敗する場合に備えた、および/または1,000種もしくは10,000種の変種の試験が必要とされる/意図される場合の、抗体のヒト化のために、例えば復帰突然変異の同定のために用いることができる。

30

【0317】

本明細書において報告される方法は、抗体の生物物理学的および/または生化学的特性(例えば、安定性、凝集傾向)の最適化のために用いることができる。

【0318】

本明細書において報告される方法は、抗体の発現および/または分泌の最適化のために用いることができる。

【0319】

本明細書において報告される方法で用いられるCDRコード核酸または可変ドメインコード核酸またはB細胞は、免疫化動物、または疾患を切り抜けた動物、または現在のところ活動性疾患を有している動物、またはヒトIgG遺伝子座を有するトランスジェニック動物、または未感作動物から得ることができる。

40

【0320】

可変ドメイン中のCDRコード核酸は、天然の可変ドメイン(動物の免疫化後に得られるものを含む)にすべて由来してよく、または天然CDRと合成CDRが混合されていてもよく、または単に合成CDRであってもよい。

【0321】

例えば、ランダム化されたCDR3をコードする核酸を含むライブラリーは、個々のメンバーが、コードされるCDR3の長さの点で多様(例えば、4~25アミノ酸残基の長さ)であっ

50

て、終止コドンの使用が回避され、システイン残基の出現が回避され、グリコシル化部位が回避され、不安定な配列モチーフが回避され、および/またはヒトCDR3領域のその位置の各々について4つの最も共通したアミノ酸残基がランダム化されたライブラリーであってよい。

【0322】

多様性生成モジュールは、

ランダム化CDR、例えばランダム化CDR3（ヒトCDR3の長さ、終止コドンなし、システインなし、N-グリコシル化部位なし、不安定なモチーフなしを反映する配列設計）；および/または

設計されたCDR、例えば、設計もしくは既存の配列に基づいた「合理的な」配列変種；  
および/または

ドナーのCDRもしくは可変ドメイン（ヒトドナー、免疫化動物由来）の点で多様であってよい。

【0323】

多様性生成モジュールは、PCRまたは遺伝子合成によって作製することができ、発現ベクターへのクローニングは、古典的な連結または配列および連結非依存的クローニング（SLIC）によってもたらすことができる。

【0324】

発現系では、単一の特異性の抗体が単一の細胞において産生され、単一の細胞によって提示される。これは、一過性の系において制御されたMOI（レンチウイルスまたはbacmam）でウイルス感染を用いることによって、または安定した系において単一組換え事象（LoxP、FLP）によって達成することができる。発現系により、膜結合型および/または分泌型全長抗体の高レベル発現が確実になる。

【0325】

ライブラリーメンバーのスクリーニングは、パニングによるヒットの単離によって、および/またはFACS選別によって行うことができる。分泌された抗体のスクリーニングは、上清中で行うことができる。選択されたクローンの可変ドメインコード核酸は、PCRによって単離される。

【0326】

したがって、FACSおよび/またはビーズベースの方法を用いた、（例えば、親和性改善）結合剤の抗原による濃縮のための方法を、本明細書において報告する。

【0327】

本明細書において報告される細胞ディスプレイ法  
全長抗体ライブラリーの提示のための方法：

抗体の、ランダム化されたCDR3をコードする核酸配列を含むDNAライブラリーなどの、多様性生成モジュールを、本明細書において報告されるレンチウイルスディスプレイベクターに導入する。

【0328】

感染性ウイルス粒子を生成するために、多様性生成モジュールを含むレンチウイルスディスプレイベクター、および必要とされるヘルパープラスミドを、発現系に導入する。

【0329】

ウイルス含有上清の単離およびウイルス負荷の定量（例えば、形質導入実験によるかまたはRT-PCRによる）の後、ライブラリー作製のためにHEK293細胞などの哺乳動物細胞に調整したMOIで形質導入して、ライブラリーの膜結合型メンバーを提示し、それと同時にライブラリーの可溶性メンバーを分泌している細胞を得る。

【0330】

例えば親和性、種交差反応性、pH依存的抗原結合に関して所定の特徴を有する抗体変種を提示している細胞を同定し選択するために、個々のライブラリーメンバーをライブラリーの膜結合型メンバーに基づいてスクリーニングする。

【0331】

10

20

30

40

50

次の段階では、選択された細胞を、クローン細胞集団を得るために単一細胞として所定の場所置に置くか、または細胞のプールとして所定の場所置に置く。その後、所定の場所置に置いた細胞を培養して、抗体変種を産生させる。分泌された抗体変種を、一次スクリーニングなどのさらなる特徴づけに用いることができる。

【0332】

一次スクリーニングにおいて選択されたクローンまたは集団を長期間培養する。

【0333】

その後、可変ドメインコード核酸を単離する。

【0334】

二重特異性抗体ライブラリーの提示のための方法：

二重特異性抗体とは一般的に、同じ抗原上の2つの異なる非重複エピトープ、または異なる抗原上の2つのエピトープに特異的に結合する抗体分子である。

【0335】

異なる二重特異性抗体形式が知られている。

【0336】

本明細書において報告される方法において使用され得る例示的な二重特異性抗体形式は、以下のものである：

Crossmab形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位を含む全長IgG抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖1（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン）

軽鎖2（可変軽鎖ドメイン + 重鎖CH1ドメイン）

重鎖1（可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ホール変異を有するCH3）

重鎖2（可変重鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン + ヒンジ + CH2 + ノブ変異を有するCH

3）；

片腕一本鎖形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位を含む抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン）

組み合わせ軽鎖 / 重鎖（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン + G<sub>4</sub>Sリンカー + 可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ノブ変異を有するCH3）

重鎖（可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ホール変異を有するCH3）

；

両腕一本鎖形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位を含む抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

組み合わせ軽鎖 / 重鎖1（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン + G<sub>4</sub>Sリンカー + 可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ホール変異を有するCH3）

組み合わせ軽鎖 / 重鎖2（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン + G<sub>4</sub>Sリンカー + 可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ノブ変異を有するCH3）；

共通軽鎖二重特異性形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位を含む抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン）

重鎖1（可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ホール変異を有するCH3）

重鎖2（可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + ノブ変異を有するCH3）。

四価scFv形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位（scFv）を含む二重特異性四価抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖（可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン）

10

20

30

40

50

組み合わせ重鎖 scFv (可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + CH3 + G<sub>4</sub>Sリンカー + scFv)。

四価scFab形式：第1エピトープまたは抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2エピトープまたは抗原に特異的に結合する第2結合部位 (scFv) を含む二重特異性四価抗体であり、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖 (可変軽鎖ドメイン + 軽鎖 定常ドメイン)

組み合わせ重鎖 scFab (可変重鎖ドメイン + CH1 + ヒンジ + CH2 + CH3 + G<sub>4</sub>Sリンカー + scFab)。

【0337】

上記で概説された二重特異性抗体形式のための発現カセットのエLEMENTの構造は、以下の通りである (5'から3'方向、図7もまた参照されたい)：

Crossmab形式：

[5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [軽鎖1または2] [IRES] [重鎖1または2] [WPRE + 3'-LTR]；

片腕一本鎖形式：

1) [5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [軽鎖] [IRES] [重鎖] [WPRE + 3'-LTR]、および / または

2) [5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [組み合わせ軽鎖 / 重鎖] [WPRE + 3'-LTR]；

両腕一本鎖形式：

[5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [組み合わせ軽鎖 / 重鎖1または2] [WPRE + 3'-LTR]；

共通軽鎖二重特異性形式：

1) [5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [重鎖1] [IRES] [重鎖2] [WPRE + 3'-LTR]、および / または

2) [hCMVプロモーター] [軽鎖] [bGHポリA]；

四価scFv形式：

1) [5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [重鎖] [IRES] [軽鎖] [WPRE + 3'-LTR]；

四価scFab形式：

1) [5'-LTR + パッケージングELEMENT + RRE] [hCMVプロモーター] [重鎖] [IRES] [軽鎖] [WPRE + 3'-LTR]。

【0338】

真核細胞の表面上での全長抗体の提示および細胞の選択のワークフローを、以下に記載する。

【0339】

第1段階において、提示させる二重特異性抗体形式に基づき、本明細書において報告される必要な発現ベクターを構築する。

【0340】

その後、それぞれ抗体半分のための、2つの独立したウイルス粒子を生成する。細胞にシャトルベクターおよびヘルパープラスミドをトランスフェクトして、複製能力がないが感染性のウイルス粒子を生成する。

【0341】

ディスプレイライブラリーの生成のために、

哺乳動物細胞に、各抗体部分をコードする両方のウイルス粒子を低MOI (感染効率) で感染させるか、または

哺乳動物細胞に、第1抗体半分をコードするウイルス粒子を低MOIで感染させ、その後この細胞に第2抗体のウイルス粒子を感染させるか、または

共通の軽鎖を安定して発現する哺乳動物細胞に、2つの重鎖をコードするウイルス粒子を感染させる。

10

20

30

40

50

## 【0342】

その後、二重特異性モノクローナル抗体を発現する形質導入細胞を選択／濃縮する。

## 【0343】

二重特異性抗体を発現する抗原結合細胞は、例えばFACSを用いて、単一細胞としてまたはプールとして選別する（所定の場所に置く）。

## 【0344】

選別された細胞を培養し、増殖させる。

## 【0345】

その後、二重特異性抗体を発現する、FACS選別され培養された細胞の細胞上清中で、分泌抗体の機能的スクリーニングを行う。

## 【0346】

その後、機能的二重特異性抗体を発現する細胞の採取を行う。

## 【0347】

最後に、組み合わされた軽鎖および重鎖発現カセットをPCRによってクローニングし、DNA配列決定する。

## 【0348】

単一標的に対する二重特異性抗体用の発現ベクターを作製するためには、ウサギまたはマウスを、組換え標的タンパク質、または標的タンパク質を組換えでもしくは自然に発現する細胞で免疫化する。免疫化後に脾臓細胞または末梢血細胞を収集し、RNAを調製する。抗原特異的B細胞は、蛍光標識抗原を選択マーカーとして用いて、バルクとしてFACSにより濃縮することができる。その後、cDNAを作製し、重鎖および軽鎖の可変ドメインをPCRによって増幅し、本明細書において報告される全長IgG用のディスプレイベクターに、または発現および産生用の発現ベクターに連結する。

## 【0349】

共通軽鎖抗体の生成のためには、トランスジェニックウサギを上記のように免疫化する。トランスジェニックウサギは、ノックアウトされたウサギIgMおよびIg遺伝子座を有する。ノックアウトされたウサギIg遺伝子座は、ヒト軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子を含むヒトIg遺伝子座によって置き換えられている。該軽鎖遺伝子は、トランスジェニックIg遺伝子座において既に十分に再編成されており、これらのウサギから得られたすべてのB細胞において単一軽鎖の発現をもたらす。該重鎖導入遺伝子は再編成されていない。該重鎖は、JエレメントおよびDエレメントによる可変遺伝子のランダムな再編成、ならびに体細胞超変異および遺伝子変換により、高度に多様である（例えば、WO 2005/007696を参照のこと）。

## 【0350】

ウイルス粒子を生成するためには、シャトルベクター（＝本明細書において報告されるレンチウイルスディスプレイベクター）をヘルパープラスミドと共にHEK293細胞に同時トランスフェクトする（例えば、Cellfectinによるトランスフェクション）。ウイルス粒子を含む上清を遠心分離によって回収する。感染性ウイルス粒子の数は、ウイルス貯蔵物の一定分割量をHEK293細胞に形質導入することによって試験することができる。抗体を発現するHEK293細胞の数は、FACSによって計数する。

## 【0351】

抗体を発現し提示するHEK293細胞を生成するためには、細胞に、低MOIのシャトルベクター含有ウイルスを感染させる。特定の抗体を発現する細胞は、蛍光標識抗原で標識してからFACSによりバルクとして選択および選別する。単離後、軽鎖と重鎖の抗原特異的組み合わせを、IRESを含む1つの断片としてPCRによって単離する、すなわち、軽鎖および重鎖可変ドメインの同族組み合わせが保存される。

## 【0352】

半抗体ライブラリーの生成のためには、（抗原特異的抗体の軽鎖および重鎖をコードする）PCR-DNA断片を、ノブ発現ベクターおよびホール発現ベクターに連結する。ノブ構築物およびホール構築物の両方に関して、ウイルス粒子を先に記載されるように生成する。

10

20

30

40

50

## 【0353】

二重特異性抗体の提示のためには、異なるウイルスの形質導入により、ノブベースの抗体重鎖およびホールベースの抗体重鎖の両方を発現するHEK293細胞を生成する。選別/選択のために、可溶性の蛍光標識抗原を細胞に添加する。細胞を数回洗浄して、二価結合剤を選択する(2つの抗体の腕が結合して抗原の解離速度がより遅くなる)。半減期の長い結合剤を、FACSにより単一細胞として選別する。

## 【0354】

機能的二重特異性抗体のスクリーニングのためには、培養HEK293細胞の上清中の分泌抗体を、細胞ベースまたは非細胞ベースの機能アッセイ(例えば、受容体リン酸化、増殖、アポトーシスの誘導)で試験する。HEK293細胞からPCRすることにより、選択されたクローンから機能的活性抗体の軽鎖および重鎖をクローニングする。

10

## 【0355】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法である:

トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化、  
抗原特異的B細胞の選択(FACSによる、バルク選別)、

重鎖コード核酸のPCR増幅:1つは、SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 10のプライマーのうちの1つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 11のプライマーを用いる、ノブ鎖のためであり、1つは、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 4のプライマーのうちの1つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 5のプライマーを用いる、ホール鎖のためである、シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応法;連結:第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESへ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を、膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、

20

ウイルス生成、共通軽鎖を安定して発現する哺乳動物細胞の感染、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択(解離速度スクリーニングによる)、FACSを用いたヒット(哺乳動物細胞クローン)のバルク選別、

例えばSEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 30のプライマーを用いた、EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の(TMドメインを有さない)可変ドメインコード核酸のPCR、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング、

30

ウイルス生成、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、細胞からの単一細胞選別、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング、および二重特異性抗体の選択。

## 【0356】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法である:

トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化、  
抗原特異的B細胞の選択(FACSによる、バルク選別)、

重鎖コード核酸のPCR増幅(シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応法:連結:第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの上流へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、

40

ウイルス生成、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、哺乳動物細胞膜に提示された二重特異性抗体の選択(解離速度スクリーニングによる)、FACSを用いたヒット(哺乳動物細胞クローン)のバルク選別、

EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸(2.2 kbp)のPCR、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング;該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメイン

50

の除去、

ウイルス生成、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、細胞からの単一細胞選別、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング、二重特異性抗体の選択。

【0357】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法である：

トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化、

抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）、

重鎖コード核酸のPCR増幅：シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応法；連結：第1重鎖可変ドメインコード核酸を、第1シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないホール遺伝子座へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を、第2シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないノブ遺伝子座へ、ただし少なくとも一方は膜貫通ドメインを有する、

ウイルス生成（1つは該第1シャトルベクターに関し、および1つは該第2シャトルベクターに関する）、該第1ウイルスおよび該第2ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の連続的な感染、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別、

重鎖可変ドメインコード核酸のPCR、および第3シャトルベクター中の、膜貫通ドメインおよびEV71-IRESを含まないパイシストロニック発現単位へのクローニング、

ウイルス生成、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、細胞からの単一細胞選別、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング、および二重特異性抗体の選択。

【0358】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法である：

第1実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギを、関心対象の第1抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化するが、この場合、該実験動物のB細胞は同じ軽鎖を発現する、

第2実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギを、関心対象の第2抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化するが、この場合、該実験動物のB細胞は同じ軽鎖を発現する、

ただし、該第1抗原と該第2抗原は異なる、

1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該第1免疫化実験動物および該第2免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、

シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではIRESがEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインを有する各他方の遺伝子座への連結、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、この場合、該第1重鎖可変ドメインは該第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインは該第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原は異なる、

ウイルス生成、

10

20

30

40

50

該ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、

二重標識された形質導入細胞のFACSによる、細胞の表面上に二重特異性抗体を提示する細胞の選択、

EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸 (2.2 kbp) のPCR、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング；該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメインの除去、

ウイルス生成、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、細胞からの単一細胞選別、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング、および二重特異性抗体の選択。

【0359】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法である：

実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギを、関心対象の抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化するが、この場合、該実験動物のB細胞は同じ軽鎖を発現する、

1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、

シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではIRESがEV71-IRESであるIRESの下流の、膜貫通ドメインを有する重鎖遺伝子座への連結、この場合、該シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターは、IRESの上流に共通軽鎖コード核酸を含む、

ウイルス生成、

該ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、

抗原特異的に標識された形質導入細胞のFACSによる、1つの態様ではFACSによるバルク選別による、細胞の表面上に抗体を提示する細胞の選択、

シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、選択された各細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではIRESがEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインをもたない各他方の遺伝子座への連結、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、この場合、該第1重鎖可変ドメインは第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインは第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原は同じであってもまたは異なってもよい、

ウイルス生成、

該ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染、

二重特異性抗体を分泌する細胞の選択。

【0360】

すべての局面の1つの態様において、実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する、すなわち実験動物のすべてのB細胞が単一の軽鎖のみを発現する、そのような実験動物は、トランスジェニック実験動物である。1つの態様において、トランスジェニック実験動物は、ノックアウトされたIgMおよびIg遺伝子座を有し、これは、ヒト軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子を含むヒトIg遺伝子座によって置き換えられており、該軽鎖遺伝子は、トランスジェ

10

20

30

40

50

ニックIg遺伝子座において十分に再編成されており、該重鎖導入遺伝子は再編成されていない。この態様において、該重鎖は、JエレメントおよびDエレメントによる可変遺伝子のランダムな再編成、ならびに体細胞超変異および遺伝子変換により、高度に多様である。

【0361】

すべての局面の1つの態様において、共通軽鎖二重特異性抗体は、第1抗原に特異的に結合する第1結合部位、および第2抗原に特異的に結合する第2結合部位を有し、個々の鎖は以下の通りである：

軽鎖（可変軽鎖ドメイン+軽鎖 定常ドメイン）、

第1重鎖（可変重鎖ドメイン+CH1+ヒンジ+CH2+ホール変異を有するCH3）、

第2重鎖（可変重鎖ドメイン+CH1+ヒンジ+CH2+ノブ変異を有するCH3）。

10

【0362】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、B細胞からの重鎖可変領域の増幅に使用されるプライマーは、i) SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 4のプライマーとSEQ ID NO: 5のプライマーの組み合わせ、および/またはii) SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 10のプライマーとSEQ ID NO: 11のプライマーの組み合わせである。

【0363】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、B細胞からの軽鎖（可変領域の増幅に使用されるプライマーは、SEQ ID NO: 12~SEQ ID NO: 18のプライマーとSEQ ID NO: 19のプライマーの組み合わせである。

【0364】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、B細胞からの軽鎖（可変領域の増幅に使用されるプライマーは、SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27のプライマーとSEQ ID NO: 28のプライマーの組み合わせである。

20

【0365】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、HEK細胞からの重鎖可変領域の増幅に使用されるプライマーは、SEQ ID NO: 29のプライマーとSEQ ID NO: 30のプライマーの組み合わせである。

【0366】

ディスプレイベクター：

5'-LTRから3'-LTRまでが約9 kbよりも大きなベクターは、レンチウイルスのウイルス粒子中にパッケージングされ得ないために、基本的なレンチウイルス発現ベクターでは、抗体コード核酸のために限られた容量しか利用することができない。5'-LTRからCMVプロモーターまで (2.7 kb)、およびWPRESエレメントから3'-LTRまで (1.5 kb) の領域で、4.2 kbのサイズを占める（実施例1）。ウイルス生成の有効性を減少させることなく、最大で4.8 kbを組み込むことができる。

30

【0367】

より詳細には、最大で約4800 bpを基礎ベクター中に組み込むことができ、4800 bpの限界を超えて1000 bpごとに、ウイルス力価は半分になる。

【0368】

EV71-IRESを介して結合している軽鎖および重鎖の組み合わせ発現のための発現力セットを用いて、DNA挿入物を短縮できることが見出された。軽鎖のコード核酸が、重鎖のコード核酸の前に使用される。

40

【0369】

1つの態様において、EV71-IRESはSEQ ID NO: 31の配列を有する。

【0370】

2つのコード核酸の連結された発現には、エンテロウイルス71 (EV71) のIRESが特に適していることが見出された。脳心筋炎ウイルス (EMCV)、マウスGtx、ヒトELF4g由来のIRESEエレメントは、EV71-IRESエレメントの効率の15%未満しか有さない。

【0371】

バイシストロニック発現エレメントの発現は、イントロンAを含むヒトCMVプロモーター

50

によって駆動される。パイシストロニック発現エレメントは、分泌型（すなわち、可溶型）および膜結合型の全長ヒト抗体、またはヒト化抗体、またはキメラ抗体、または非ヒト動物由来抗体をコードする。

【 0 3 7 2 】

組み込み物のエレメントは、産生される抗体に応じて以下のサイズを有する：

i) 膜結合型抗体のみ：

hCMVイントロンA	1100 bp (任意)	
LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
EV71-IRES	650 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	10
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)	
合計	4165 bp (3065 bp)	

ii) 膜結合型および分泌型抗体 (1)：

LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
EV71-IRES	650 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	
TMドメイン (イントロン6+M1/M2融合物)	1517 bp (cDNA)	20
合計	4367 bp	

iii) 膜結合型および分泌型抗体 (2)：

LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
EV71-IRES	650 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	
TMドメイン (イントロン6+M1/M2融合物)	1517 bp (cDNA)	
ピューロマイシン耐性	600 bp	
合計	4967 bp	30

iv) IRESを含まない膜結合型および分泌型抗体 (2)：

LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
bGH ポリAシグナル配列	230 bp	
hCMV-プロモーター	600 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	
TMドメイン (イントロン6+M1/M2融合物)	1517 bp (cDNA)	
bGH ポリAシグナル配列	230 bp	
合計	4777 bp	40

1つの態様において、bGHポリAシグナル配列はSEQ ID NO: 32の配列を有する。

1つの態様において、hCMVプロモーターはSEQ ID NO: 33の配列を有する。

1つの態様において、イントロン6 + M1/M2融合物はSEQ ID NO: 34の配列を有する。

v) 膜結合型の2つの重鎖 (KiH)：

HC1 コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC2 コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)
合計	3980 bp

vi) 1つが膜結合型である2つの重鎖 (KiH) :

HC1 コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	10
EV71-IRES	650 bp	
HC2 コード核酸 (開始～終止)	1450 bp (cDNA)	
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)	
合計	3765 bp	

vii) 膜結合型 scFv 形式 :

LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
EV71-IRES	650 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1400 bp (cDNA)	20
scFv (リンカーを含む)	750 bp	
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)	
合計	3765 bp	

viii) 膜結合型 scFab 形式 :

LC コード核酸 (開始～終止)	750 bp (cDNA)	
EV71-IRES	650 bp	
HC コード核酸 (開始～終止)	1400 bp (cDNA)	
scFab (リンカーを含む)	1470 bp	30
短縮TMドメイン (M1/M2融合物)	215 bp (cDNA)	
合計	4485 bp	

1つの態様において、M1/M2融合物はSEQ ID NO: 35の配列を有する。

【0373】

EV71-IRESによって、バイシストロニック発現エレメントを用いた（ベクターサイズを小さく保つ）重鎖および軽鎖の組み合わせ発現が可能になることが見出された。

【0374】

EV71-IRESエレメントによる軽鎖発現カセットの重鎖発現カセットへの連結を用いて、発現（生産性）増加が得られ得ることが見出された：

IRESを含まないpx5068：100%抗体発現（参照）

40

Gtx-IRES（合成）：3%

EV71-IRES：80%

ELF4G-IRES：5%

EMCV-IRES：11%

【0375】

選択的スプライシングアンカーを用いて、膜結合型および分泌型抗体形態の両方の同時発現を駆動することができるが見出された。

【0376】

PCRによって生成された可変軽鎖コード核酸および可変重鎖コード核酸の導入を可能にするために、特有の制限部位が導入された。

50

## 【0377】

すべてのヒトフレームワークを増幅することができる縮重プライマー（適合する制限部位を有する）が使用された。

## 【0378】

本明細書において報告される方法を用いて、例えば、免疫化キャンペーン中に、または親和性成熟によって、またはヒト化によって得られた異なる抗体に由来する異なる結合特異性を組み合わせることによる、モノクローナル抗体の組み合わせである二重特異性抗体を同定することができる。

## 【0379】

本明細書において報告される方法を用いて、多数の二重特異性抗体を生成し、相乗的組み合わせを同定するためにスクリーニングすることができる。

10

## 【0380】

本明細書において報告される本発明の例示的な事項は、以下の通りである：

1 .

以下の段階を含む、二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々がバイシストロニック発現カセットを含み、該カセットが、EV71-IRESの上流のホール (hole) 遺伝子座またはノブ (knob) 遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞が共通の軽鎖を発現し、該重鎖の一方または両方がそれらのC末端において膜貫通ドメインをさらに含む、段階、ならびに

(b) 該真核細胞の集団から、提示された膜結合型全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

20

2 .

EV71-IRESの下流の重鎖のみが、そのC末端において膜貫通ドメインを含むことを特徴とする、項1記載の方法。

3 .

以下の段階を含む、二重特異性抗体を分泌する細胞を選択する方法：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該レンチウイルスのウイルス粒子の各々が、分泌型二重特異性抗体をコードするバイシストロニック発現カセットを含み、該カセットが、EV71-IRESの上流のホール遺伝子座またはノブ遺伝子座における第1重鎖可変ドメインコード核酸、およびEV71-IRESの下流の各他方の遺伝子座における第2重鎖可変ドメインコード核酸を含み、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよく、該真核細胞が共通の軽鎖を発現する、段階ならびに

30

(b) 該真核細胞の集団から、分泌された全長二重特異性抗体の特性に従って細胞を選択する段階。

40

4 .

真核細胞の集団の各細胞が、単一の全長二重特異性抗体を提示するかまたは分泌することを特徴とする、項1～3のいずれかに記載の方法。

5 .

第1段階として、以下の段階のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする、項1～4のいずれかに記載の方法：

- ・トランスジェニック動物を関心対象の抗原で免疫化する段階であって、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する、段階、および/または

- ・FACSによるバルク選別により、該免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、および/または

50

・シャトルベクター／レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の／連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階。

6 .

以下の段階を含むことを特徴とする、項1～2および4～5のいずれかに記載の方法：

・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸 (2.2 kbp) のPCRを行う段階であって、膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターにクローニングし、任意で、該ベクターの制限切断および再連結により、存在するのであれば該第1重鎖の膜貫通ドメインを除去する、段階。

7 .

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・任意で、膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、項1～2および4～6のいずれかに記載の方法。

8 .

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸

を含むことを特徴とする、項3～6のいずれかに記載の方法。

9 .

抗体が二価二重特異性抗体であることを特徴とする、項1～8のいずれかに記載の方法。

10 .

抗体が2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合することを特徴とする、項1～9のいずれかに記載の方法。

11 .

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、項1～10のいずれかに記載の方法。

12 .

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、項1～11のいずれかに記載の方法。

13 .

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、項1～12のいずれかに記載の方法。

14 .

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項1～13のいずれかに記載の方法。

15 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項1～13のいずれかに記載の方法。

16 .

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とす

10

20

30

40

50

る、項1～15のいずれかに記載の方法。

17.

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、項1～16のいずれかに記載の方法。

18.

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、項1～17のいずれかに記載の方法。

19.

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、項1～18のいずれかに記載の方法。

20.

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、項1～19のいずれかに記載の方法。

21.

以下の段階を含む、抗体を発現する細胞を選択する方法：

(a) レンチウイルスのウイルス粒子の集団を形質導入することにより、真核細胞の集団を作製する段階であって、該細胞の集団の各細胞が膜結合型全長抗体を提示し、該抗体の少なくとも2つの鎖がバイシストロニック発現カセットによりコードされ、かつ該抗体が1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する、段階、および

(b) 該真核細胞の集団から、該提示された膜結合型全長抗体の特性に従って細胞を選択する段階、

ここで、該レンチウイルスのウイルス粒子の集団の、各レンチウイルスのウイルス粒子は、該膜結合型抗体を発現させるためのEV71-IRESを含むバイシストロニック発現カセットを含む。

22.

レンチウイルスのウイルス粒子の集団の、レンチウイルスのウイルス粒子の各バイシストロニック発現カセットが、1つもしくは複数の抗原または同じ抗原上の1つもしくは複数のエピトープに特異的に結合する、親抗体の異なる変種をコードすることを特徴とする、項21記載の方法。

23.

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、項21～22のいずれかに記載の方法。

24.

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・任意で、膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、項21～22のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

25.

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・そのC末端においてscFvと結合している全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、項21～22のいずれかに記載の方法。

26.

バイシストロニック発現カセットが、5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・そのC末端においてscFabと結合している全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むことを特徴とする、項21～22のいずれかに記載の方法。

27.

真核細胞の集団の各細胞が、膜結合型全長抗体を提示し、かつ全長抗体を分泌することを特徴とする、項21～26のいずれかに記載の方法。

10

20

28.

真核細胞の集団の各細胞が、単一の全長抗体を提示し、かつ分泌することを特徴とする、項21～26のいずれかに記載の方法。

29.

抗体が抗原に特異的に結合することを特徴とする、項21～28のいずれかに記載の方法。

30.

抗体が二価単一特異性抗体であることを特徴とする、項21～23のいずれかに記載の方法。

31.

抗体が二価二重特異性抗体であることを特徴とする、項21～22および24のいずれかに記載の方法。

30

32.

抗体が四価二重特異性抗体であることを特徴とする、項21～22および25～26のいずれかに記載の方法。

33.

抗体が2つの異なる抗原または同じ抗原上の2つのエピトープに特異的に結合することを特徴とする、項21～28および31～32のいずれかに記載の方法。

34.

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、項31～33のいずれかに記載の方法。

40

35.

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、項31～34のいずれかに記載の方法。

36.

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、項21～35のいずれかに記載の方法。

37.

50

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項21～36のいずれかに記載の方法。

38 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項21～36のいずれかに記載の方法。

39 .

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、項21～38のいずれかに記載の方法。

40 .

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、項21～39のいずれかに記載の方法。

41 .

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、項21～40のいずれかに記載の方法。

42 .

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、項21～41のいずれかに記載の方法。

43 .

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、項21～42のいずれかに記載の方法。

44 .

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むバイシストロニック発現カセット。

45 .

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

を含むバイシストロニック発現カセット。

46 .

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、項44～45のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

47 .

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、項44～46のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

48 .

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする、項44～47のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

49.

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項44～48のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

50.

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項44～49のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

51.

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、項44～50のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

10

52.

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、項44～51のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

53.

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、項44～52のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

54.

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、項44～53のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

20

55.

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、項44～54のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット。

56.

項44～55のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセットを含む真核細胞。

57.

バイシストロニック発現カセットが細胞中に形質導入されていることを特徴とする、項56記載の真核細胞。

30

58.

哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項56～57のいずれかに記載の真核細胞。

59.

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項58記載の真核細胞。

60.

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・全長抗体軽鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・全長抗体重鎖をコードする第2核酸、
- ・スプライシング可能なイントロン、および
- ・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸

40

を含む、バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクター。

61.

5'から3'方向に、

- ・プロモーター
- ・第1全長抗体重鎖をコードする第1核酸、
- ・EV71-IRES、
- ・第2全長抗体重鎖をコードする第2核酸、および

50

・膜貫通ドメインまたはGPIアンカーをコードする核酸を含む、パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルスベクター。

62 .

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、項60~61のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

63 .

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項60~62のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

64 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項60~63のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

65 .

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、項60~64のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

66 .

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、項60~65のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

67 .

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、項60~66のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

68 .

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、項60~67のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

69 .

抗体がヒト化抗体またはヒト抗体、特にヒト抗体であることを特徴とする、項60~68のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

70 .

項60~69のいずれかに記載のレンチウイルスベクターを含む真核細胞。

71 .

レンチウイルスベクターが細胞中に形質導入されていることを特徴とする、項70記載の真核細胞。

72 .

哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項70~71のいずれかに記載の真核細胞。

73 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項72記載の真核細胞。

74 .

全長抗体の提示もしくは分泌またはその両方のための真核細胞の集団を作製するための、項60~69のいずれかに記載のレンチウイルスベクターの使用。

75 .

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項74記載の使用。

76 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項75記載の使用。

77 .

それぞれが項60~69のいずれかに記載の発現ベクターを含む2つ以上のレンチウイルス粒子を含むレンチウイルスベクターライブラリーであって、各ベクターによってコードされる抗体の少なくとも1アミノ酸が互いに異なる、レンチウイルスベクターライブラリー

10

20

30

40

50

。

78 .

1,000~1,000,000個の異なる発現ベクターを含むことを特徴とする、項77記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

79 .

ベクターライブラリーのベクターによってコードされる抗体が、抗体のCDRのうちの1つにおける少なくとも1アミノ酸残基が異なることを特徴とする、項77~78のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

80 .

CDRが重鎖CDR3であることを特徴とする、項79記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

10

81 .

発現ベクターライブラリーが、親発現ベクターの1つまたは複数のCDR中の1つまたは複数のアミノ酸残基のランダム化によって得られることを特徴とする、項77~80のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

82 .

レンチウイルス発現ベクターライブラリーが、2つの異なる半抗体をコードする核酸の組み合わせによって得られることを特徴とする、項77~81のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

83 .

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生するB細胞のプールから得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸を用いることによって生じることを特徴とする、項77~82のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

20

84 .

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られる、HCVRコード核酸およびLCVRコード核酸のプールより選択されるHCVRコード核酸とLCVRコード核酸の対を用いることにより生じることを特徴とする、項77~82のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

30

85 .

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるHCVRコード核酸と単一のLCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるHCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、項77~82のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

40

86 .

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるLCVRコード核酸と単一のHCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるLCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、項77~82のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

87 .

単一B細胞がB細胞のクローン集団であることを特徴とする、項77~86のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

50

88 .

レンチウイルス発現ライブラリーの多様性の生成が以下の段階を含むことを特徴とする、項77~87のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー：

(a) :

- (i) B細胞の亜集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅する段階；および
- (v) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(b) :

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第1プールを作製する段階、
- (vi) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第2プールを作製する段階、および
- (vii) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(c) :

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第2 DNA分子の対を提供する段階；または

(d) :

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第1 DNA分子の対を提供する段階。

89 .

免疫グロブリン重鎖をコードする核酸が、ゲノムとして組織化された免疫グロブリン重鎖遺伝子のすべてのエクソンおよび1つ以外のすべてのイントロンを含むことを特徴とする、項77~88のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

9 0 .

膜貫通ドメインが膜貫通ドメインの断片またはGPIアンカーのシグナルペプチドであることを特徴とする、該膜貫通ドメインの断片が単一エクソンによってコードされる、項77～89のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

9 1 .

膜貫通ドメインが、ゲノムでは介在しているイントロンが含まれない単一エクソンのM1-M2 エクソン融合物によってコードされる免疫グロブリン膜貫通ドメインであることを特徴とする、項77～90のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

9 2 .

膜貫通ドメインがcDNAによってコードされることを特徴とする、項77～91のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリー。

10

9 3 .

それぞれが、項44～55のいずれかに記載のバイシストロニック発現カセット、または項60～69のいずれかに記載のレンチウイルスベクターを含む2つ以上の真核細胞を含む真核細胞ライブラリーであって、各細胞によって発現される抗体の少なくとも1アミノ酸が互いに異なる、真核細胞ライブラリー。

9 4 .

項77～92のいずれかに記載のレンチウイルスベクターライブラリーを含む真核細胞ライブラリー。

9 5 .

真核細胞ライブラリーの各真核細胞が単一抗体を発現することを特徴とする、項94記載の真核細胞ライブラリー。

20

9 6 .

真核細胞ライブラリーの各真核細胞が単一抗体を提示することを特徴とする、項94～95のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

9 7 .

コード核酸が免疫化動物のB細胞の集団に由来する抗体のライブラリーを発現する真核細胞の集団であることを特徴とする、項94～96のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

9 8 .

B細胞が、関心対象の1つまたは複数の抗原に対するそれらの特異性について事前選択されることを特徴とする、項97記載の真核細胞ライブラリー。

30

9 9 .

各細胞が第1抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第1発現カセットと第2抗原に特異的に結合する全長抗体をコードする第2発現カセットとを含む、真核細胞の集団であることを特徴とする、項94～98のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 0 0 .

各細胞が第1抗原に結合する第1全長抗体軽鎖および第1全長抗体重鎖をコードする第1発現カセットと第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体軽鎖および第2全長抗体重鎖をコードする第2発現カセットとを含む、真核細胞の集団であることを特徴とする、項94～99の

40

1 0 1 .

各細胞が第1抗原に特異的に結合する第1全長抗体重鎖および第2抗原に特異的に結合する第2全長抗体重鎖をコードする発現カセットを含む、共通の軽鎖を発現する真核細胞の集団であることを特徴とする、項94～100のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 0 2 .

第1全長抗体重鎖がホール変異を含み、かつ第2抗体重鎖がノブ変異を含むことを特徴とする、項94～102のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 0 3 .

第1全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてCH1ドメインを含み、かつ第1全長抗体重鎖が第1

50

定常ドメインとしてCLドメインを含むか、または第2全長抗体軽鎖が定常ドメインとしてC H1ドメインを含み、かつ第2全長抗体重鎖が第1定常ドメインとしてCLドメインを含むことを特徴とする、項94～101のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

104.

全長抗体が、ヒト起源の、特にヒトIgG1、IgG2、またはIgG4クラスの定常領域を含むことを特徴とする、項94～103のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

105.

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項94～104のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

106.

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項94～105のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

107.

単離されたB細胞の集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団が、(a) 血液；(b) 二次リンパ器官、特に脾臓またはリンパ節；(c) 骨髄；および (d) 記憶B細胞を含む組織より選択される供給源に由来することを特徴とする、項94～106のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

108.

単離されたB細胞の集団が、末梢血単核細胞 (PBMC) を含むか、または特にはこれからなることを特徴とする、項107記載の真核細胞ライブラリー。

109.

動物が哺乳類、特にラット、マウス、ウサギ、またはヒトであることを特徴とする、項94～108のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

110.

動物がトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギまたはヒトであることを特徴とする、項109記載の真核細胞ライブラリー。

111.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項94～110のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；および

(b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞または単一B細胞を選択すること。

112.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項94～111のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 担体を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で被覆すること；

(b) 単離されたB細胞の集団を該担体と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を介して該B細胞を該担体に結合させることを可能にする、こと；

(c) 結合していないB細胞を除去することであって、特に該担体がビーズを含むかまたはさらに特にはビーズからなり、なおさらに特には該ビーズが常磁性ビーズである、こと；ならびに

(d) 該常磁性ビーズからB細胞の亜集団または単一B細胞を回収すること。

113.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、FACS選別によって行われることを特徴とする、項94～112のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

114.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を

10

20

30

40

50

含むことを特徴とする、項94～113のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、こと；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているB細胞を分離すること。

115.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項94～114のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞の集団または単一B細胞を選択すること；ならびに
- (c) 少なくとも1つの付加的なパラメータについてB細胞を選択することであって、特に、この少なくとも1つの付加的なパラメータについての選択が以下のものである、こと：

(i) B細胞特異的マーカー、特にCD19もしくはB220の存在、およびB細胞の生存より選択されるパラメータについての陽性選択；ならびに / または

(ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

116.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する段階が、クラススイッチしたB細胞、特にIgMおよび / またはIgD陰性B細胞、最も特にはIgMおよびIgD陰性B細胞を選択することをさらに含むことを特徴とする、項94～115のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

117.

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項94～116のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が第1蛍光色素で標識されており、特に該蛍光色素がAlexa 647 nm、Alexa 488、またはAlexa 546 nmである、こと；
- (b) 単離されたB細胞の集団の細胞を抗IgM抗体および / または抗IgD抗体と接触させることであって、該抗IgM抗体および / または該抗IgD抗体が第2蛍光色素および / または第3蛍光色素で標識されており、該第2蛍光色素および / または該第3蛍光色素が、該第1蛍光色素によって放出される蛍光の波長とは異なる波長で蛍光を放出する、こと；ならびに
- (c) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているが該抗IgM抗体には結合していない、および / または該抗IgD抗体には結合していないB細胞の集団または単一B細胞を分離すること。

118.

ライブラリーがウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーであり、ライブラリーを真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団に導入することが、真核細胞、特に哺乳動物細胞にウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーを感染させることによって行われ、さらに特には、感染が、最大限で10、特に最大限で1、より特には最大限で0.2、および最も特には最大限で0.1の感染効率で行われることを特徴とする、項94～117のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

119.

感染効率が約0.1であることを特徴とする、項118記載の真核細胞ライブラリー。

120.

細胞の単離がFACS選別によって行われることを特徴とし、1つの態様において細胞の単離が以下の段階を含む、項94～119のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

10

20

30

40

50

(a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で染色する段階であって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、段階；および

(b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階。

1 2 1 .

FACS選別によって、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階が、少なくとも1つの付加的なパラメータを用いて細胞をさらに選択する段階を含むことを特徴とする、項94～120のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 2 2 .

方法が以下の段階をさらに含むことを特徴とする、項94～122のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー：

(a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の存在下で、個々の細胞の少なくとも1つ、特に正確に1つを培養する段階；

(b) 関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するという、該真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の能力を確認する段階。

1 2 3 .

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または、特におよび真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、(a) BHK 21細胞、特にATCC CCL-10；(b) Neuro-2a細胞；(c) HEK-293T細胞、特にATCC CRL-11268；(d) CHO-K1細胞、特にATCC CRL-62；および (e) HEK293細胞より選択される細胞を含むか、または特にはそれらの細胞からなることを特徴とする、項94～122のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 2 4 .

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、CHO-K1細胞を含むか、または特にはCHO-K1細胞からなり、さらに特には発現ライブラリーがレンチウイルス発現ライブラリーであることを特徴とする、項94～123のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

1 2 5 .

以下の段階を含む、関心対象の抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞を選択する方法：

(a) B細胞の集団から、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する抗体を分泌するB細胞の亜集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団を任意で選択する段階、

(b) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが、1つまたは複数の抗原と特異的に結合する1つまたは複数の抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階：

(i) 該B細胞の亜集団からDNA分子のプールを増幅すること、または関心対象の1つもしくは2つの抗原に特異的に結合する単一の抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化によりDNA分子のライブラリーを作製することを含む、多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶性および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること；

(c) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階；

(d) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階；ならびに

(e) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の1つもしくは複数の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

10

20

30

40

50

## 126.

以下の段階を含む、(関心対象の2つの抗原に特異的に結合する)二重特異性抗体を発現する細胞を選択する方法:

(a) 以下によって、レンチウイルス発現ライブラリーの各メンバーが二重特異性抗体の変種をコードする、レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階:

(i) 単一の二重特異性抗体をコードするDNAから、コード核酸配列のランダム化により多数のDNA分子を作製すること、および

(ii) 全長二重特異性抗体を膜結合型として発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該多数のDNA分子をクローニングすること;

(b) それぞれが該レンチウイルス発現ライブラリーのメンバーを含むレンチウイルスのウイルス粒子の集団を真核細胞の集団に形質導入する段階;

(c) 該レンチウイルス発現ライブラリーによってコードされる抗体を、該真核哺乳動物細胞の表面上に提示させる段階;ならびに

(d) 該真核細胞の集団から細胞を単離する段階であって、該細胞が、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する、その表面上に提示された該抗体の能力について選択される、段階。

## 127.

抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階が以下を含むことを特徴とする、項125~126のいずれかに記載の方法:

(1) B細胞の亜集団から、重鎖可変領域(HCVR)をコードするDNA分子の第1プールを増幅すること;および

(2) 該B細胞の亜集団から、軽鎖可変領域(LCVR)をコードするDNA分子の第2プールを増幅すること;

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

## 128.

関心対象の1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製する段階を含み、該多数のDNA分子を作製する段階が以下を含むことを特徴とする、項125~127のいずれかに記載の方法:

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団から、HCVRをコードするDNA分子およびLCVRをコードするDNA分子を増幅すること、ならびに

(2) 少なくとも1つのコドンランダム化することにより、該HCVRをコードするDNA分子および/または該LCVRをコードするDNA分子ランダム化することであって、それによってHCVRをコードする多数のDNA分子およびLCVRをコードする多数のDNA分子を作製すること;

(3) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結パイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、LCVRをコードする該ランダム化された多数のDNA分子とHCVRをコードする該多数のDNA分子の組み合わせをクローニングすること。

## 129.

レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階が以下を含むことを特徴とする、項125~128のいずれかに記載の方法:

(i) 以下を含む、抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること:

(1) B細胞の亜集団からmRNAを単離すること;

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること;

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅すること;およ

10

20

30

40

50

び

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅すること；

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子をクローニングすること。

130 .

レンチウイルス発現ライブラリーを作製する段階を含み、該作製する段階が以下を含むことを特徴とする、項135～129のいずれかに記載の方法；

(i) 以下を含む、1つまたは2つの抗原に特異的に結合する抗体をコードする多数のDNA分子を作製すること；

(1) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からmRNAを単離すること；

(2) 該mRNAをcDNAに転写すること；

(3) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅すること；および

(4) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅すること；

(5) 該第1 DNA分子および/または該第2 DNA分子をランダム化することであって、それによってDNA分子の第1プールおよびDNA分子の第2プールを作製すること、

(ii) 全長抗体軽鎖および全長抗体重鎖を可溶型および膜結合型で発現させるためのEV71-IRES連結バイシストロニック発現カセットを含むレンチウイルス発現ベクターに、該DNA分子の第1プールおよび該DNA分子の第2プールという1対のDNA分子をクローニングすること。

131 .

真核細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞であることを特徴とする、項125～130のいずれかに記載の方法。

132 .

哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK細胞であることを特徴とする、項131記載の方法。

133 .

動物が、ヒツジ、ヘラジカ、シカ、ロバ、ミュールジカ、ミンク、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、ハムスター、モルモット、およびマウスからなる群より選択されることを特徴とし、1つの態様において、動物が、マウス、ラット、または霊長類である、項125～132のいずれかに記載の方法。

134 .

動物が非ヒト霊長類またはヒトであることを特徴とする、項125～133のいずれかに記載の方法。

135 .

動物が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニック動物であることを特徴とする、項125～134のいずれかに記載の方法。

136 .

関心対象の抗原と特異的に結合するというそれらの能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択することによって核酸が得られることを特徴とする、項125～135のいずれかに記載の方法。

137 .

関心対象の1つまたは2つの抗原と特異的に結合するというその能力についてB細胞を選択することにより、単離されたB細胞の集団から単一B細胞を選択することによって核酸が得られることを特徴とする、項125～136のいずれかに記載の方法。

138 .

単一B細胞がクローンB細胞集団であることを特徴とする、項125～137のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の方法。

139.

単一B細胞またはクローンB細胞集団の単離されたmRNAから可変ドメインコード核酸を増幅し、増幅されたmRNAをcDNAに転写することによって核酸が得られることを特徴とする、項125～138のいずれかに記載の方法。

140.

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生するB細胞のプールから得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸を用いることによって生じることを特徴とする、項125～139のいずれかに記載の方法。

10

141.

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られるHCVRコード核酸およびLCVRコード核酸のプールより選択されるHCVRコード核酸とLCVRコード核酸の対を用いることにより生じることを特徴とする、項125～140のいずれかに記載の方法。

142.

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるHCVRコード核酸と単一のLCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるHCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたHCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、項125～140のいずれかに記載の方法。

20

143.

レンチウイルスベクターライブラリーの多様性が、異なるLCVRコード核酸と単一のHCVRコード核酸の対を用いることによって生じ、該異なるLCVRコード核酸が、1つの抗原もしくは2つの異なる抗原に特異的に結合するか、または同じ抗原の2つの異なる非重複エピトープに特異的に結合する抗体を産生する単一B細胞から得られたLCVRコード核酸の少なくとも1つのコドンランダム化することにより得られることを特徴とする、項125～142のいずれかに記載の方法。

30

144.

単一B細胞がB細胞のクローン集団であることを特徴とする、項125～143のいずれかに記載の方法。

145.

レンチウイルス発現ライブラリーの多様性の生成が以下の段階を含むことを特徴とする、項125～144のいずれかに記載の方法：

(a)：

- (i) B細胞の亜集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第1プールを増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAからDNA分子の第2プールを増幅する段階；および

40

(v) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(b)：

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；

50

- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第1プールを作製する段階、
- (vi) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子の第2プールを作製する段階、および
- (vii) 該DNA分子の第1プールの1つのメンバーと該DNA分子の第2プールの1つのメンバーの対を提供する段階；または

(c) :

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第1 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第2 DNA分子の対を提供する段階；または

(d) :

- (i) 単一B細胞またはB細胞のクローン集団からRNAを単離する段階、
- (ii) 該RNAをcDNAに転写する段階；
- (iii) HCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第1混合物を用いて、該cDNAから第1 DNA分子を増幅する段階；
- (iv) LCVRコード領域を増幅し得る少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第2混合物を用いて、該cDNAから第2 DNA分子を増幅する段階；
- (v) 該第2 DNA分子の少なくとも1つのコドンランダム化することにより、DNA分子のプールを作製する段階、および
- (vi) 該DNA分子のプールの1つのメンバーと該第1 DNA分子の対を提供する段階。

146 .

抗原特異的抗体の可変性が、異なる軽鎖可変領域と重鎖可変領域をランダムに組み合わせることによって増加することを特徴とする、項125~145のいずれかに記載の方法。

147 .

単離されたB細胞の集団または単一B細胞またはB細胞のクローン集団が、(a) 血液；(b) 二次リンパ器官、特に脾臓またはリンパ節；(c) 骨髄；および (d) 記憶B細胞を含む組織より選択される供給源に由来することを特徴とする、項125~146のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

148 .

単離されたB細胞の集団が、末梢血単核細胞 (PBMC) を含むか、または特にはこれからなることを特徴とする、項147記載の真核細胞ライブラリー。

149 .

動物が哺乳類、特にラット、マウス、ウサギ、またはヒトであることを特徴とする、項125~148のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

150 .

動物がトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギまたはヒトであることを特徴とする、項149記載の真核細胞ライブラリー。

151 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項125~150のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

10

20

30

40

50

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；および
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞または単一B細胞を選択すること。

152 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項125～151のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

- (a) 担体を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で被覆すること；
- (b) 単離されたB細胞の集団を該担体と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基を介して該B細胞を該担体に結合させることを可能にする、こと；
- (c) 結合していないB細胞を除去することであって、特に該担体がビーズを含むかまたはさらに特にはビーズからなり、なおさらに特には該ビーズが常磁性ビーズである、こと；ならびに
- (d) 該常磁性ビーズからB細胞の亜集団または単一B細胞を回収すること。

153 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、FACS選別によって行われることを特徴とする、項125～152のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

154 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項125～153のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、こと；および
- (b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているB細胞を分離すること。

155 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項125～154のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

- (a) 単離されたB細胞の集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させること；
- (b) 該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するB細胞の集団または単一B細胞を選択すること；ならびに
- (c) 少なくとも1つの付加的なパラメータについてB細胞を選択することであって、特に、この少なくとも1つの付加的なパラメータについての選択が以下のものである、こと；
- (i) B細胞特異的マーカー、特にCD19もしくはB220の存在、およびB細胞の生存より選択されるパラメータについての陽性選択；ならびに / または
- (ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

156 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団を選択する段階が、クラススイッチしたB細胞、特にIgMおよび / またはIgD陰性B細胞、最も特にはIgMおよびIgD陰性B細胞を選択することをさらに含むことを特徴とする、項125～155のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

157 .

単離されたB細胞の集団からB細胞の亜集団または単一B細胞を選択する段階が、以下を含むことを特徴とする、項125～156のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

- (a) 単離されたB細胞の集団を関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と接触させることであって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が第1蛍光色

10

20

30

40

50

素で標識されており、特に該蛍光色素がAlexa 647 nm、Alexa 488、またはAlexa 546 nmである、こと；

(b) 単離されたB細胞の集団の細胞を抗IgM抗体および/または抗IgD抗体と接触させることであって、該抗IgM抗体および/または該抗IgD抗体が第2蛍光色素および/または第3蛍光色素で標識されており、該第2蛍光色素および/または該第3蛍光色素が、該第1蛍光色素によって放出される蛍光の波長とは異なる波長で蛍光を放出する、こと；ならびに

(c) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基に結合しているが該抗IgM抗体には結合していない、および/または該抗IgD抗体には結合していないB細胞の集団または単一B細胞を分離すること。

158.

ライブラリーがウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーであり、ライブラリーを真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団に導入することが、真核細胞、特に哺乳動物細胞にウイルスライブラリー、特にレンチウイルスライブラリーを感染させることによって行われ、さらに特に、感染が、最大限で10、特に最大限で1、より特に最大限で0.2、および最も特に最大限で0.1の感染効率で行われることを特徴とする、項125~157のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

159.

感染効率が約0.1であることを特徴とする、項158記載の真核細胞ライブラリー。

160.

細胞の単離がFACS選別によって行われることを特徴とし、1つの態様において細胞の単離が以下の段階を含む、項125~159のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

(a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団を、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基で染色する段階であって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基が蛍光色素で標識されている、段階；および

(b) FACS選別によって、該関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階。

161.

FACS選別によって、関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合する個々の細胞を分離する段階が、少なくとも1つの付加的なパラメータを用いて細胞をさらに選択することを含むことを特徴とする、項125~160のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

162.

少なくとも1つの付加的なパラメータが以下より選択されることを特徴とする、項161記載の真核細胞ライブラリー；

(i) 細胞の生存についての陽性選択；ならびに/または

(ii) IgM抗体の存在、IgD抗体の存在、細胞死マーカーの存在、およびアポトーシスマーカーの存在より選択されるパラメータについての陰性選択。

163.

方法が以下の段階をさらに含むことを特徴とする、項125~162のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー；

(a) 真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の存在下で、個々の細胞の少なくとも1つ、特に正確に1つを培養する段階；

(b) 関心対象の抗原またはその断片もしくは抗原決定基と特異的に結合するという、該真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団の能力を確認する段階。

164.

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または、特におよび真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、(a) BHK 21細胞、特にATCC CCL-10；(b) Neuro-2a細胞；(c) HEK-293T細胞、特にATCC CRL-11268；(d) CHO-K1細胞、特にATCC CRL-62；および (e) HEK293細胞より選択される細胞を含むか、または特にそれらからなることを特徴とする、項125~163のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

10

20

30

40

50

165 .

真核細胞、特に哺乳動物細胞の第1集団、および/または真核細胞、特に哺乳動物細胞の第2集団が、CHO-K1細胞を含むか、または特にはCHO-K1細胞からなり、さらに特には発現ライブラリーがレンチウイルス発現ライブラリーであることを特徴とする、項125～164のいずれかに記載の真核細胞ライブラリー。

166 .

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：1つは、SEQ ID NO: 6～SEQ ID NO: 10のプライマーのうちの一つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 11のプライマーを用いる、ノブ鎖のためであり、1つは、SEQ ID NO: 1～SEQ ID NO: 4のプライマーのうちの一つもしくは複数またはすべておよびSEQ ID NO: 5のプライマーを用いる、ホール鎖のためである、シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階

連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESへ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、連結する段階

- ・ウイルス生成段階、共通鎖鎖を安定して発現する哺乳動物細胞の感染段階、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、

- ・例えばSEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 30のプライマーを用いた、EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の（TMドメインを有さない）可変ドメインコード核酸のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

167 .

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通鎖鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階

連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの上流へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を膜貫通ドメインを有するノブ遺伝子座へ、すなわちEV71-IRESの下流へ、連結する段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、哺乳動物細胞膜に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、

- ・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸（2.2 kbp）のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクターへのクローニング段階、該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメインの除去段階、

- ・ウイルス生成段階、共通鎖鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、二重特異性抗体の選択段階。

168 .

10

20

30

40

50

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長抗体を提示させ、細胞を選択し、それによって抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・トランスジェニックウサギなどの実験動物の免疫化段階、
- ・抗原特異的B細胞の選択（FACSによる、バルク選別）段階、
- ・重鎖コード核酸のPCR増幅段階：シャトルベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個のポリメラーゼ連鎖反応である、段階  
連結段階：第1重鎖可変ドメインコード核酸を、第1シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないホール遺伝子座へ、および第2重鎖可変ドメインコード核酸を、第2シャトルベクター中の、膜貫通ドメインを有するかまたは有さないノブ遺伝子座へ、連結する段階であって、ただし少なくとも一方は膜貫通ドメインを有する、段階
- ・ウイルス生成（1つは該第1シャトルベクターに関し、および1つは該第2シャトルベクターに関する）段階、該第1ウイルスおよび該第2ウイルスによる、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の連続的な感染段階、哺乳動物細胞の表面上に提示された二重特異性抗体の選択（解離速度スクリーニングによる）段階、FACSを用いたヒット（哺乳動物細胞クローン）のバルク選別段階、
- ・重鎖可変ドメインコード核酸のPCR段階、および第3シャトルベクター中の、膜貫通ドメインおよびEV71-IRESを含まないパイシストロニック発現単位へのクローニング段階、
- ・ウイルス生成段階、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

169.

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法：

- ・第1実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の第1抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する段階、
- ・第2実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の第2抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現し、ただし、該第1抗原と該第2抗原が異なる段階、
- ・1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該第1免疫化実験動物および該第2免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、
- ・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、
- ・第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインを有するホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結段階、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインを有する各他方の遺伝子座への連結段階であって、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、該第1重鎖可変ドメインが該第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが該第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が異なる、段階
- ・ウイルス生成段階
- ・該ウイルスを用いた、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、
- ・二重標識された形質導入細胞のFACSによる、細胞の表面上に二重特異性抗体を提示する細胞の選択段階、
- ・EV71-IRESを含む、完全な第1重鎖コード核酸および第2重鎖の可変ドメインをコードする核酸（2.2 kbp）のPCR段階、ならびに膜貫通ドメインをもたない第2シャトルベクタ

10

20

30

40

50

へのクローニング段階、該ベクターの制限切断および再連結による、該第1重鎖の膜貫通ドメインの除去段階、

・ウイルス生成段階、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、細胞からの単一細胞選別段階、上清中での二重特異性抗体のスクリーニング段階、および二重特異性抗体の選択段階。

170.

以下の段階を含む、真核細胞の表面上に共通軽鎖を含む全長二重特異性抗体を提示させ、そのような真核細胞を選択し、それによってまた二重特異性抗体を選択するためのワークフロー/方法:

・実験動物、1つの態様ではトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウサギが、関心対象の抗原、1つの態様では細胞外受容体ドメインで免疫化され、該実験動物のB細胞が同じ軽鎖を発現する段階、

・1つの態様ではFACSによるバルク選別により、該免疫化実験動物のB細胞を選択する段階、

・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、各B細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

・重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの下流の、膜貫通ドメインを有する重鎖遺伝子座への連結段階であって、該シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターが、IRESの上流に共通軽鎖コード核酸を含む、段階

・ウイルス生成段階、

・該ウイルスを用いた、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、

・抗原特異的に標識された形質導入細胞のFACSによる、1つの態様ではFACSによるバルク選別による、細胞の表面上に抗体を提示する細胞の選択段階、

・シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターへの指向的クローニングを可能にするための特有の制限部位を導入する2つの別個の/連続的なポリメラーゼ連鎖反応法による個々のPCR増幅により、選択された各細胞の重鎖コード核酸を得る段階、

・第1重鎖可変ドメインコード核酸の、シャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、1つの態様ではEV71-IRESであるIRESの上流の、膜貫通ドメインをもたないホール遺伝子座またはノブ遺伝子座への連結段階、および第2重鎖可変ドメインコード核酸の、同じシャトルベクター/レンチウイルス発現ベクターにおける、IRESの下流の、膜貫通ドメインをもたない各他方の遺伝子座への連結段階であって、すなわち、IRESの上流の重鎖がホール遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はノブ遺伝子座を有し、およびIRESの上流の重鎖がノブ遺伝子座を有する場合には、IRESの下流の重鎖はホール遺伝子座を有し、該第1重鎖可変ドメインが第1抗原に結合し、かつ該第2可変ドメインが第2抗原に結合し、該第1抗原と該第2抗原が同じであってもまたは異なってもよい、段階

・ウイルス生成段階、

・該ウイルスを用いた、共通軽鎖を発現する哺乳動物細胞の感染段階、

・二重特異性抗体を分泌する細胞の選択段階。

171.

抗体の生成のための、項1~170のいずれかに記載の方法を用いて選択された細胞の使用。

【0381】

以下の実施例、配列、および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載される。本発明の精神から逸脱することなく、記載される手順において修正を行うことができることが理解される。

【0382】

配列

SEQ ID NO: 01~30 PCRプライマー

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 31 EV71-IRES  
 SEQ ID NO: 32 bGHポリAシグナル配列  
 SEQ ID NO: 33 ヒトCMVプロモーター  
 SEQ ID NO: 34 イントロン6 + M1/M2配列  
 SEQ ID NO: 35 M1/M2配列  
 SEQ ID NO: 36 ~ 39 PCRプライマー。

【図面の簡単な説明】

【0383】

【図1】GFPのIRES連結発現のFACSドットプロットを示す；a) gtx-IRES、b) EV71-IRES、c) ELF4G-IRES、d) EMCV-IRES。

10

【図2】抗体LCおよびHCのIRES連結発現の比較を示す；a) gtx-IRES、b) EV71-IRES、c) ELF4G-IRES、d) EMCV-IRES；下方の図面：発現構築物のスキーム。

【図3】一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞の、トランスフェクションの24時間後に得られたFACSヒストグラムを示す；a) pLVX M#2（膜結合型IgG）による一過性トランスフェクション：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：自己蛍光fectin対照、点線ヒストグラム：抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞、実線ヒストグラム：pLVX M#2によるトランスフェクション後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞；b) pLVX MS#5（膜結合型および分泌型）による一過性トランスフェクション：灰色に塗りつぶしたヒストグラム；自己蛍光fectin対照、点線ヒストグラム：抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞、実線ヒストグラム：pLVX MS#5によるトランスフェクション後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞。

20

【図4】ウイルスにより形質導入されたHEK293細胞の、形質導入の96時間後に得られたFACSヒストグラムを示す；a) pLVX M#2ウイルスによるウイルス形質導入：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：自己蛍光ポリブレン対照、点線ヒストグラム：抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞、実線ヒストグラム：pLVX M#2ウイルスによる形質導入後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞；b) pLVX MS#5ウイルスによるウイルス形質導入：灰色に塗りつぶしたヒストグラム；自己蛍光fectin対照、点線ヒストグラム：抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞、実線ヒストグラム：pLVX MS#5ウイルスによる形質導入後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488で染色された細胞。

30

【図5】新たに回収されたレンチウイルス上清による形質導入の96時間後の、フローサイトメトリー解析を用いてレンチウイルス貯蔵液を力価測定することによるレンチウイルス力価の決定。

【図6】ウイルスにより形質導入されたHEK293細胞の、それぞれ形質導入の直後、14日後、または28日後のFACSヒストグラムを示す；a) pLVX M#2ウイルスによるウイルス形質導入の96時間後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488複合物陽性HEK293細胞の選別（黒バー領域）：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：ポリブレン対照；実線ヒストグラム：形質導入細胞株；b) pLVX M#2ウイルスによる形質導入後の最初の選別から14日後および28日後の、FACS染色による選別細胞の再解析：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：ポリブレン対照；点線ヒストグラム：最初の選別から14日後に2度目に解析された形質導入細胞株；実線ヒストグラム：最初の選別から28日後に2度目に解析された形質導入細胞株；c) pLVX MS#5によるウイルス感染の96時間後の、抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488複合物陽性HEK293細胞の選別（バックバー）：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：ポリブレン対照；実線ヒストグラム：形質導入細胞株；d) pLVX MS#5ウイルスによる形質導入後の最初の選別から14日後および28日後の、FACS染色による選別細胞の再解析：灰色に塗りつぶしたヒストグラム：ポリブレン対照；点線ヒストグラム：最初の選別から14日後に2度目に解析された形質導入細胞株；実線ヒストグラム：最初の選別から28日後に2度目に解析された形質導入細胞株。

40

【図7 - 1】二重特異性抗体発現カセットを示す。

【図7 - 2】二重特異性抗体発現カセットを示す。

50

【図8】Alexa-488抗原複合物で標識された細胞のFACS選別による、膜結合型抗体を提示するHEK293A細胞の回収を示す。

【図9】pLVX M#2またはMS#5陽性選別細胞（プール選別）からの上清のELISAの結果を示す。

【図10】所定の場所に置いた単一FACS陽性細胞のFACS、ELISAによる比較解析の結果を示す。

【図11A-1】2つの異なる抗原に対するIgGの膜結合型発現用のプラスミドを保有する2つのウイルスの存在下で感染させた細胞の染色の結果を示す：左バー 単一細胞レベル：抗原1陽性細胞；右バー 抗原2陽性細胞；高い選別ゲートで、MOI 100に関して二重感染は検出不能；y軸：親に対する生存（散乱）ノ重項の頻度。

10

【図11A-2】2つの異なる抗原に対するIgGの膜結合型発現用のプラスミドを保有する2つのウイルスの存在下で感染させた細胞の染色の結果を示す：左バー 単一細胞レベル：抗原1陽性細胞；右バー 抗原2陽性細胞；高い選別ゲートで、MOI 100に関して二重感染は検出不能；y軸：親に対する生存（散乱）ノ重項の頻度。

【図11B】2つの異なる抗原に対するIgGの膜結合型発現用のプラスミドを保有する2つのウイルスの存在下で感染させた細胞の染色の結果を示す：左バー プールレベル：抗原1陽性細胞；中央バー：抗原2陽性細胞；右バー：抗原1および抗原2陽性細胞。

【図12】異なるレンチウイルス粒子を形質導入された細胞のFACS解析を示す：左側 IRESを含まないpLVX MS、膜結合型全長抗体および分泌型全長抗体の発現のための、2つのhCMVプロモーターを含む分離された発現カセット；中央 IRESを含むpLVX MS、膜結合型全長抗体および分泌型全長抗体の発現のための、1つのhCMVプロモーターを有する1つのサイストロニック発現カセット；右側 IRESを含むpLVX M、膜結合型全長抗体の発現のための、1つのhCMVプロモーターを有する1つのサイストロニック発現カセット。

20

【図13】レンチウイルス発現ベクターのサイズ（bp）に応じたTU/mlのFACS解析を示す；左側バー TU/ml；右側バー レンチウイルス発現ベクターのbp表示でのサイズ。

【図14】ベクター地図pLVX-puroを示す。

【図15】ベクター地図pLVX M#2を示す。

【図16】ベクター地図pLVX MS#5を示す。

【図17-1】膜貫通ドメインを含まないかまたは1つ含む抗体をコードする二重特異性ディスプレイベクターをトランスフェクトしたHEK293細胞のFACS解析を示す；V.1.1：M-B（ノブ）-IRES-M-B（ホール）（両方の結合剤重鎖上に膜アンカーが存在）、V.1.2：M-B（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（両方の重鎖、結合剤および非結合剤上に膜アンカーが存在）、V.1.3：M-N（ノブ）-IRES-B（ホール）（非結合剤上にのみ膜アンカーが存在）、V.1.4：B（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（非結合剤上にのみ膜アンカーが存在）、V.1.5：M-N（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（非結合剤のみ、両方の重鎖上に膜アンカーが存在）、V.1.6：B（ホール）-IRES-M-N（ノブ）（非結合剤上に膜アンカーが存在、ノブとホールを交換）；1：対照1 fectinのみ、2：対照2 共通LCのみ、3：V1.1 M-B-IRES-M-B+共通LC、4：V1.2 M-B-IRES-M-N+共通LC、5：V1.3 M-N-IRES-B+共通LC、6：V1.4 B-IRES-M-N+共通LC。

30

【図17-2】膜貫通ドメインを含まないかまたは1つ含む抗体をコードする二重特異性ディスプレイベクターをトランスフェクトしたHEK293細胞のFACS解析を示す；V.1.1：M-B（ノブ）-IRES-M-B（ホール）（両方の結合剤重鎖上に膜アンカーが存在）、V.1.2：M-B（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（両方の重鎖、結合剤および非結合剤上に膜アンカーが存在）、V.1.3：M-N（ノブ）-IRES-B（ホール）（非結合剤上にのみ膜アンカーが存在）、V.1.4：B（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（非結合剤上にのみ膜アンカーが存在）、V.1.5：M-N（ノブ）-IRES-M-N（ホール）（非結合剤のみ、両方の重鎖上に膜アンカーが存在）、V.1.6：B（ホール）-IRES-M-N（ノブ）（非結合剤上に膜アンカーが存在、ノブとホールを交換）；7：V1.5 M-N-IRES-M-N+共通LC、8：V1.6 B-（ホール）-IRES-M-N（ノブ）+共通LC。

40

【実施例】

50

## 【 0 3 8 4 】

## 実施例1

ベクター-pLVX M#2およびpLVX MS#5の構築

シャトルベクター：MCS、P<sub>PGK</sub>プロモーター、およびピューロマイシン耐性遺伝子の除去。軽鎖 EV71-IRES 重鎖 膜貫通ドメインを伴う選択的スプライシングエレメントのプラスミドへの挿入。

## 【 0 3 8 5 】

出発シャトルベクターは以下のエレメントを含む：

	エレメント	供給源
1	5' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
2	PBS (プライマー結合部位)	サルウイルス 40
3	psi (ψ)	ヒト免疫不全ウイルス-1
4	RRE	ヒト免疫不全ウイルス-1
5	cPPT	ヒト免疫不全ウイルス
6	PCMV IE	ヒトサイトメガロウイルス
7	MCS	合成
8	PPGK	サッカロミセス・セレビシエ ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
9	ピューロマイシン	ストレプトミセス・アルボニガー ( <i>Streptomyces alboniger</i> )
10	WPRE	肝炎ウイルス
11	3' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
12	pUC ori	大腸菌
13	アンピシリン	大腸菌

10

20

## 【 0 3 8 6 】

プラスミドpLVX M#2は以下のエレメントを含む：

	エレメント	供給源
1	5' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
2	PBS (プライマー結合部位)	サルウイルス 40
3	psi (ψ)	ヒト免疫不全ウイルス-1
4	RRE	ヒト免疫不全ウイルス-1
5	cPPT	ヒト免疫不全ウイルス
6	PCMV IE	ヒトサイトメガロウイルス
7	IgG 軽鎖	ヒト
8	EV71-IRES	EV71 ウイルス
9	IgG 重鎖	ヒト
10	WPRE	肝炎ウイルス
11	3' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
12	pUC ori	大腸菌
13	アンピシリン	大腸菌

30

40

## 【 0 3 8 7 】

プラスミドpLVX MS#5は以下のエレメントを含む：

	エレメント	供給源
1	5' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
2	PBS (プライマー結合部位)	サルウイルス40
3	psi ( $\psi$ )	ヒト免疫不全ウイルス-1
4	RRE	ヒト免疫不全ウイルス-1
5	cPPT	ヒト免疫不全ウイルス
6	PCMV IE	ヒトサイトメガロウイルス
7	IgG 軽鎖	ヒト
8	EV71-IRES	EV71 ウイルス
9	選択的スプライシング 膜貫通ドメイン (M1/2) を伴うIgG重鎖	ヒト
10	WPRE	肝炎ウイルス
11	3' LTR	ヒト免疫不全ウイルス-1
12	pUC ori	大腸菌
13	アンピシリン	大腸菌

10

20

## 【 0 3 8 8 】

実施例2

## 感染性ウイルスの生成

3.75\*10<sup>5</sup>個のLenti-X (商標) 293T細胞を6ウェルプレートの各ウェルに播種し、一晩インキュベートした。翌日、各ウェルについて、20  $\mu$ lのLipofectamine (商標) 2000トランスフェクション試薬 (Invitrogen cat.no.: P/N 52887)を用いて、2.5  $\mu$ gのpLVX M#2またはpLVX MS#5および12.75  $\mu$ lのLenti-X HTXパッケージングミックス (Clontech 631248)を細胞に同時トランスフェクトした。インキュベーションの24時間後に培地を交換した。トランスフェクションの48時間後に、ウイルス含有上清を回収した。

## 【 0 3 8 9 】

実施例3

## HEK293細胞の一過性トランスフェクション

1\*10<sup>5</sup>個のLenti-X (商標) 293T細胞を24ウェルに播種し、一晩インキュベートした。翌日、各ウェルにおいて、0.9  $\mu$ gのpLVX M#2またはpLVX MS#5および2.7  $\mu$ lのLipofectamine (商標) 2000トランスフェクション試薬 (Invitrogen cat.no.: P/N 52887)を細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、ヤギ抗ヒトIgG (H+L) Alexa 488複合物 (Invitrogen cat.no. A11013)を用いて染色を行い、FACS解析を行った。

## 【 0 3 9 0 】

結果を図3に示す。

## 【 0 3 9 1 】

実施例4

## HEK293細胞のウイルス形質導入

ウイルス感染 / 形質導入

1.5\*10<sup>4</sup>個のHEK293A細胞を48ウェルプレートのウェルに播種し、一晩インキュベートした。翌日、完全培地を除去し、細胞に、8  $\mu$ g/mlポリブレンの存在下で、300  $\mu$ lの希釈していないウイルス含有上清を感染させた。インキュベーションの24時間後に培地を交換した。トランスフェクションの96時間後に、ヤギ抗ヒトIgG (H+L) Alexa 488複合物 (Invitrogen cat.no. A11013)を用いて細胞の染色を行い、FACS解析を行った。

## 【 0 3 9 2 】

結果を図4に示す。

30

40

50

## 【 0 3 9 3 】

## レンチウイルス力価の決定

レンチウイルス力価は、新たに回収されたレンチウイルス上清による形質導入の96時間後に、フローサイトメトリー解析を用いてレンチウイルス貯蔵液を測定することによって決定した。

	レンチウイルス希釈	陽性細胞の割合(%)	TU / ml
pLVX M#2 (膜結合型)	1:1	95%	6.3E+04
	1:2	81%	1.2E+05
	1:5	49%	1.6E+05
	1:10	26%	1.9E+05
	1:25	12%	2.0E+05
pLVX MS#5 (膜結合型および スプライス)	1:1	42%	2.8E+04
	1:2	20%	2.9E+04
	1:5	9%	2.9E+04
	1:10	6%	4.5E+04
	1:25	4%	6.1E+04

10

## 【 0 3 9 4 】

力価は以下の式を用いて算出した：

$$TU / ml = F * c * D / V$$

式中

F = 陽性細胞の頻度

C = 形質導入時のウェル中の細胞の総数 (例えば、200,000個細胞)

V = 1ml中の接種材料の容量 (0.3 ml)

D = レンチウイルス希釈

TU = 形質導入単位

## 【 0 3 9 5 】

結果を図5に示す。

## 【 0 3 9 6 】

## 実施例5

ウイルスを形質導入されたHEK293細胞株の安定性

ウイルス生成およびウイルス感染 / 形質導入は、先の実施例2および4に記載されている通りに行った。

## 【 0 3 9 7 】

選別された細胞を、6ウェルプレートまたはT75振盪フラスコ中で増殖させた。80%コンフルエンスの時点で、細胞を分けた。FACS染色のために、 $1 \times 10^5$ 個の細胞を、100  $\mu$ l全量中で10  $\mu$ g/mlヤギ抗ヒトIgG (H+L)抗体 Alexa 488複合物と共にインキュベートした。

## 【 0 3 9 8 】

長期安定性の決定は、選択圧をかけずに行った。対応するFACSヒストグラムを図6に示す。

## 【 0 3 9 9 】

## 実施例6

膜結合型抗体を提示する細胞と野生型細胞の混合物の選別

24ウェルマイクロタイタープレートにおいて、HEK293A野生型細胞を、ベクターpLVX M#2により安定に形質導入されたHEK293A細胞 (28日目) と混合し、250  $\mu$ lの10  $\mu$ g/ml Alexa 488結合抗原で染色し、その後FACS解析して、Alexa 488陽性細胞を選別した。

## 【 0 4 0 0 】

選別の4日後に、24ウェルマイクロタイタープレートのウェル中の全細胞、すなわちおよそ $1 \times 10^5$ 個の細胞を50  $\mu$ lの10  $\mu$ g/ml Alexa 488結合抗原で染色し、その後FACS解析した。

## 【 0 4 0 1 】

20

30

40

50

結果を図8に示す。

【0402】

#### 実施例7

選別された細胞（膜結合型IgG陽性）の培養上清中へのIgG分泌

選別された細胞を、6ウェルマイクロタイタープレートまたはT75フラスコ中で増殖させた。80%コンフルエンスの時点で、細胞を分けた。95%コンフルエンスの状態の細胞からの上清を、IgG ELISAに使用した。結果を以下の表および図9に示す。

【0403】

（表）pLVX M#2またはMS#5陽性選別細胞（プール選別）からの上清のELISAの結果

	捕捉:ビオチン ヤギ抗ヒトIgG Fcγ断片特異的		捕捉:ビオチン IL18-R-Fc
	カウント平均	濃度 [ng/ml]	カウント平均
WDHLプール選別 pLVX M # 2	4.79E + 04	< 最小	3.0E + 04
WDHLプール選別 pLVX MS # 5	9.96E + 06	317.4	3.6E + 06
プール選別 pLVX M # 2	3.79E + 04	< 最小	1.9E + 04
プール選別 pLVX MS # 5	1.20E + 07	557.3	4.8E + 06
Hek293A 培養液	2.06E + 04	< 最小	7.4E + 03

10

20

【0404】

#### 実施例8

膜結合型抗体と分泌型抗体の相関関係

#### ウイルス生成

3.75\*10<sup>5</sup>個のLenti-X（商標）293T細胞を6ウェルプレートの各ウェルに播種し、一晚インキュベートした。翌日、各ウェルについて、20μlのLipofectamine（商標）2000トランスフェクション試薬（Invitrogen cat.no.: P/N 52887）を用いて、2.5μgのpLVX MS#5および12.75μlのLenti-X HTXパッケージングミックス（Clontech 631248）を細胞に同時トランスフェクトした。インキュベーションの24時間後に培地を交換した。トランスフェクションの48時間後に、ウイルス含有上清を回収した。

30

【0405】

#### ウイルス感染 / 形質導入

24ウェルプレートのウェルに播種した3\*10<sup>4</sup>個のHek293A細胞を一晚インキュベートした。翌日、完全培地を除去し、細胞に、8μg/mlポリブレンの存在下で、600μlの希釈していないまたは1:25希釈のウイルス含有上清を感染させた。インキュベーションの24時間後に培地を交換した。トランスフェクションの96時間後に、ヤギ抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488複合物（Invitrogen cat.no. A11013）を用いて細胞の染色を行い、FACS解析を行い、個々の細胞を96ウェルプレートのウェル中に振り分けた。

40

【0406】

細胞の3つの集団を単一選別した：

高い選別ゲートによる、pLVX MS#5非希釈ウイルス感染細胞

低い選別ゲートによる、pLVX MS#5非希釈ウイルス感染細胞

低い選別ゲートによる、pLVX MS#5 1:25希釈ウイルス感染細胞。

【0407】

選別された細胞を、96ウェルプレートで95%コンフルエンスまで増殖させ、24ウェルプレートに拡大した。FACS染色のために、5\*10<sup>4</sup>個の細胞を、100μl全量中で10μg/mlヤギ抗ヒトIgG (H+L) 抗体 Alexa 488複合物と共にインキュベートした。選別された細胞から、LCのPCR解析（タッチダウンPCR）のためにRNAを単離した。

50

【0408】

図10に結果を示す。

【0409】

この比較解析から、FACSに関して、対照試料に対する2を超える指数を閾値として使用した場合に、抗ヒトIgG (H+L) 抗体Alexa 488で染色された単一細胞クローンのFACS解析、および各選別ゲートの1つの単一細胞クローンに由来する培養上清のヒトIgG ELISAのいずれもが、細胞の選択に使用することができることが認められ得る（結果はまた以下の表にも示してある）。

【0410】

(表)

	クローンの番号	ヒト IgG ELISA カウント (RLU) 平均	ヒト IgG 濃度 (ng/ml)	対照に対するFACS指数 (1=結合なし >2 結合)	軽鎖 (LC) に 関する タッチダウンPCR
pLVX MS#5 非希釈 選別ゲート高	1	3979272	>62,5	1124,2	++++
	2	17898500	43,3	18,7	++++
	3	9632206	>62,5	56,7	++++
	4	9461668	>62,5	6,2	++++
	9	9566852	>62,5	58,5	++++
pLVX MS#5 非希釈 選別ゲート低	1	218076	< 最小	1,2	-
	2	180654	< 最小	1,0	-
	3	179118	< 最小	1,4	-
	4	39302	3,2	1,2	+
	5	164588	< 最小	1,3	-
	6	174238	< 最小	1,4	-
	7	50222	3,5	1,0	-
	8	177218	< 最小	1,3	-
	9	173048	< 最小	1,6	-
	10	8597740	>62,5	2,0	++++
	11	9288676	>62,5	6,0	++++
	12	81202	4,3	1,3	+
	13	188344	< 最小	1,6	-
	14	48562	3,4	1,2	-
	15	39204	3,2	1,1	-
pLVX MS#5 1:25 希釈 選別ゲート低	1	-57642	< 最小	1,1	-
	2	-66350	< 最小	1,1	-
	3	528	< 最小	1,0	-
	4	-77158	< 最小	1,2	-
	5	-73694	< 最小	0,8	-
	6	2458	< 最小	1,2	-
	7	-83110	< 最小	1,4	-
	8	-76824	< 最小	1,6	-
	9	35162	3,1	1,1	-
	10	8447052	>62,5	5,3	++++
	11	37314	3,1	1,5	-
	12	1338	< 最小	1,3	-
	13	666	< 最小	1,3	-
	14	1728	< 最小	1,6	-
	15	414	< 最小	1,7	+

10

20

30

40

【0411】

実施例9

異なる抗体のプラスミドを有する2つのウイルスの存在下での感染

pLVX mAb1-MおよびpLVX mAb2-Mプールの混合物の存在下で、細胞に形質導入した。細胞は、異なるPCR算出MOI値（1000、100、および40）で形質導入した。形質導入後、単一選

50

別細胞クローン (IgG+) を、mAb1抗原 Alexa 488複合物およびmAb2抗原 Cy5複合物とのインキュベーションにより染色した。

【0412】

結果を図11に示す。

【0413】

#### 実施例10

異なる全長IgGレンチウイルスベクターによる細胞の感染

以下のレンチウイルス発現ベクターを用いて、実施例2において報告されている通りにウイルスを生成した：

IRESを含まないpLVX MS、膜結合型全長抗体および分泌型全長抗体の発現のための、2つのhCMVプロモーターを含む分離された発現カセット

IRESを含むpLVX MS、膜結合型全長抗体および分泌型全長抗体の発現のための、1つのhCMVプロモーターを有する1つのパイシストロニック発現カセット

IRESを含むpLVX M、膜結合型全長抗体の発現のための、1つのhCMVプロモーターを有する1つのパイシストロニック発現カセット

【0414】

実施例4に記載される通りに、これら3つのベクターを含む希釈ウイルスを細胞に形質導入した。形質導入細胞を、抗ヒトIgG (H+L) 抗体Alexa 488複合物による染色後に、FACSによって解析した。結果を図12および13に示す。

【0415】

#### 実施例11

B細胞からの核酸の増幅

抗原特異的B細胞から全RNAを単離する。鋳型スイッチプロトコール (Zhu, et al., Bio Techniques 30 (2001) 892-897) を、プライマーとしてしてのCDSオリゴヌクレオチド (5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT

TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN-3', SEQ ID NO: 36)

、およびスイッチ鋳型としてのSMART IIオリゴヌクレオチド

(5'-d[AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC] r[GGG]-3', SEQ ID NO: 37)

と共に用いて、PowerScript (商標) 逆転写酵素 (Clontech) で一本鎖cDNAを生成する。200 μlの全量中でAdvantage2ポリメラーゼミックス (Clontech) およびアンカープライマー

(5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3', SEQ ID NO: 38)

を用いて、14サイクルのPCRによりcDNAをバルク増幅する。QIAquick PCR精製キット (Qiagen) を用いて、二本鎖cDNAを精製する。

【0416】

重鎖可変領域コード配列は、ホール構築物については1つのセンスプライマー (SEQ ID NO :5) および4つのアンチセンスプライマー (SEQ ID NO :1~SEQ ID NO :4)の等モル混合物を用いて、ならびにノブ構築物については1つのセンスプライマー (SEQ ID NO :11) および5つのアンチセンスプライマー (SEQ ID NO :6~SEQ ID NO :10)の等モル混合物を用いて増幅する； 軽鎖可変領域コード配列は、7つのセンスプライマー (SEQ ID NO :12~SEQ ID NO :18)の等モル混合物および1つのアンチセンスプライマー (SEQ ID NO :19)の等モル混合物を用いて増幅する；ならびに 軽鎖可変領域コード配列は、8つのセンスプライマー (SEQ ID NO :20~SEQ ID NO :27)の等モル混合物および1つのアンチセンスプライマー (SEQ ID NO :28)の等モル混合物を用いて増幅する。

【0417】

IRESを介して連結されているホール重鎖およびノブ重鎖のコード領域は、プライマーSEQ ID NO :29およびSEQ ID NO :30を用いて増幅することができる。

【0418】

10

20

30

40

50

実施例12

蛍光活性化細胞選別による、特異的結合抗体を提示する細胞の濃縮

サブコンフルエントな (80%) HEK細胞に、0.2の感染効率 (MOI) で全長抗体ライブラリーまたは陰性対照としての空ウイルスベクターを感染させる。5時間後、細胞解離緩衝液 (Sigma) で細胞を剥がし、洗浄し、染色する。細胞の半分を、Alexa 647 nm標識抗原 (4 μg/ml) で30分間染色する。残りの細胞を、Alexa 546 nm標識抗原 (4 μg/ml) およびウサギ由来の抗レンチウイルス血清 (1:6000に希釈) で30分間染色し、その後Cy5標識ロバ抗ウサギIgG (1 μg/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で20分間標識する。次に全細胞を洗浄し、濾過し、死細胞を排除するためにヨウ化プロピジウム (PI) で染色する。それぞれAlexa 647 nm陽性、PI陰性細胞、およびAlexa 546 nm陽性、レンチウイルス陽性、PI陰性細胞について、単一細胞選別をFACS Vantage SEフローサイトメーター (Beckton Dickinson) で行う。

10

## 【0419】

50%コンフルエントなHEKフィーダー細胞を含む24ウェルプレートのウェル中に、各細胞を振り分ける。ウイルスが伝播した時点で (選別後2~3日)、感染細胞を抗原結合についてFACS解析により試験する。

## 【0420】

実施例13

二重特異性抗体の細胞表面発現に及ぼす膜アンカーの影響

$1 \times 10^5$  個のHEK293A細胞を24ウェルプレートのウェルに播種し、一晚インキュベートした。翌日、0.5 μgの共通軽鎖ベクター、および2つの異なる重鎖の発現させる0.5 μgのV1.1~V1.5シャトルベクターを細胞に同時トランスフェクトした。重鎖Bは共通軽鎖と組み合わせさせて抗原に結合するのに対して、重鎖Nは共通軽鎖と組み合わせさせて抗原に結合することはない。

20

## 【0421】

ヤギ抗ヒトIgG (H+L) Alexa 488複合物 (Invitrogen cat.no. A11013) ならびにビオチン化抗原およびストレプトアビジン PE (SA-PE) で、二重染色を行った。トランスフェクションの48時間後に、FACS解析を行った。

## 【0422】

使用したシャトルベクターは以下のものであった：

30

V.1.1: M-B (ノブ) -IRES-M-B (ホール) (両方の結合剤重鎖上に膜アンカーが存在)

V.1.2: M-B (ノブ) -IRES-M-N (ホール) (両方の重鎖、結合剤および非結合剤上に膜アンカーが存在)

V.1.3: M-N (ノブ) -IRES-B (ホール) (非結合剤上にのみ膜アンカーが存在)

V.1.4: B (ノブ) -IRES-M-N (ホール) (非結合剤上にのみ膜アンカーが存在)

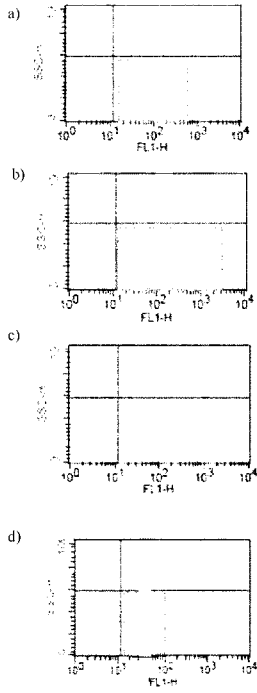
V.1.5: M-N (ノブ) -IRES-M-N (ホール) (非結合剤のみ、両方の重鎖上に膜アンカーが存在)

V.1.6: B (ホール) -IRES-M-N (ノブ) (非結合剤上に膜アンカーが存在、ノブとホールを交換)

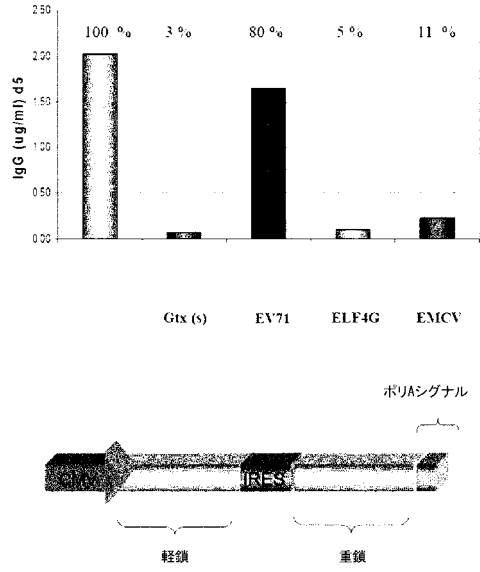
両方の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール (knob-into-hole) 技術によりヘテロ二量体を形成する場合、非結合抗体部分 (N) 上の膜貫通アンカーは、細胞表面上に結合抗体部分Bを提示するのに十分であり (V1.4 図17)、このことから、単一の膜貫通アンカーが、細胞表面上に、2つの異なる重鎖および共通軽鎖からなる完全なIgGを提示するのに十分であることが示される。

40

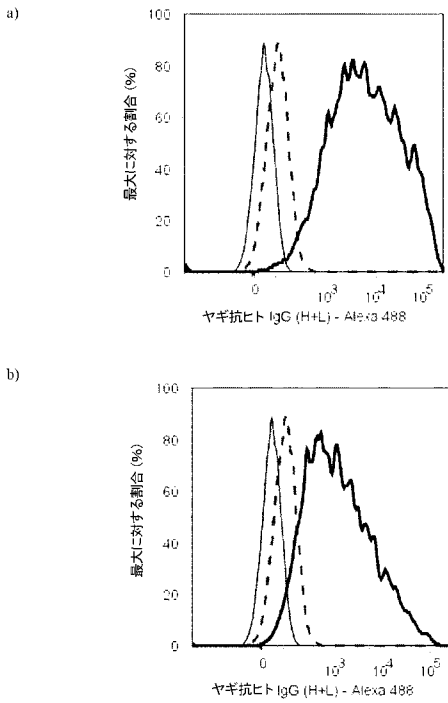
【 図 1 】



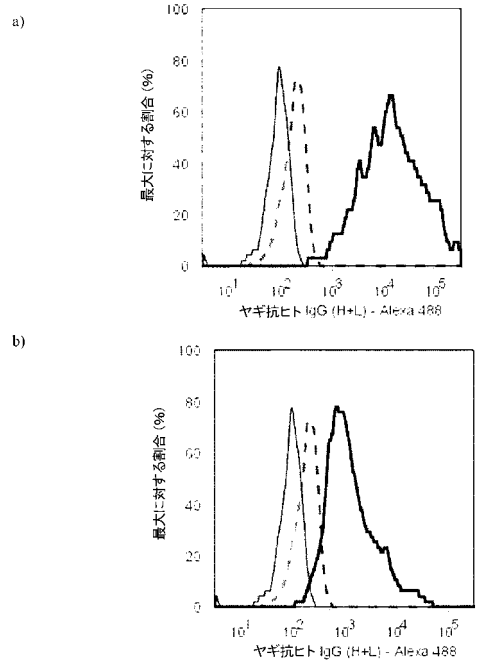
【 図 2 】



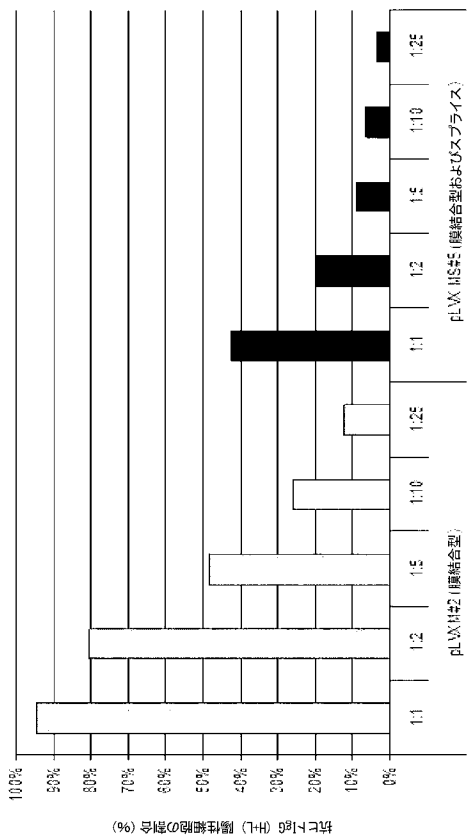
【 図 3 】



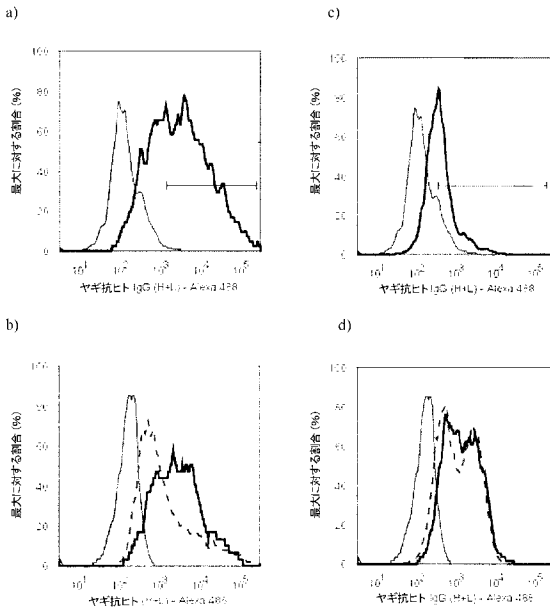
【 図 4 】



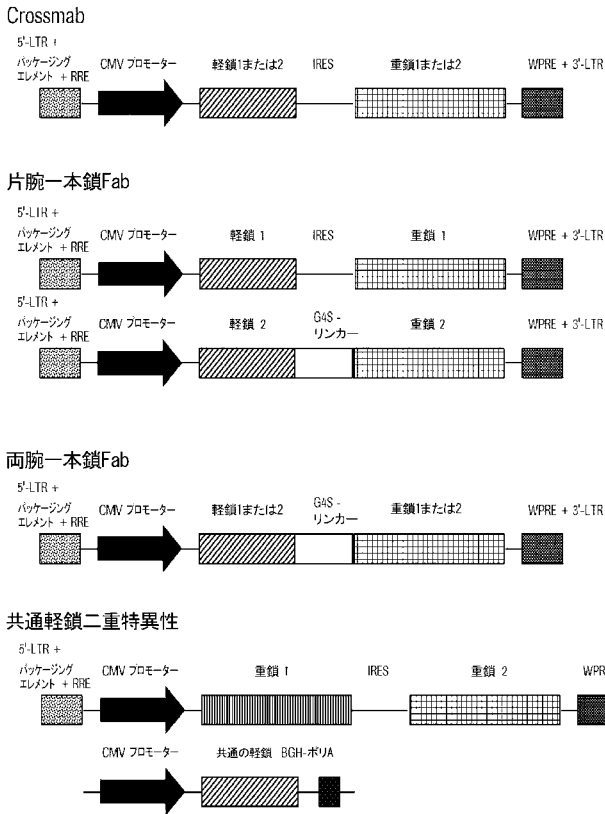
【 図 5 】



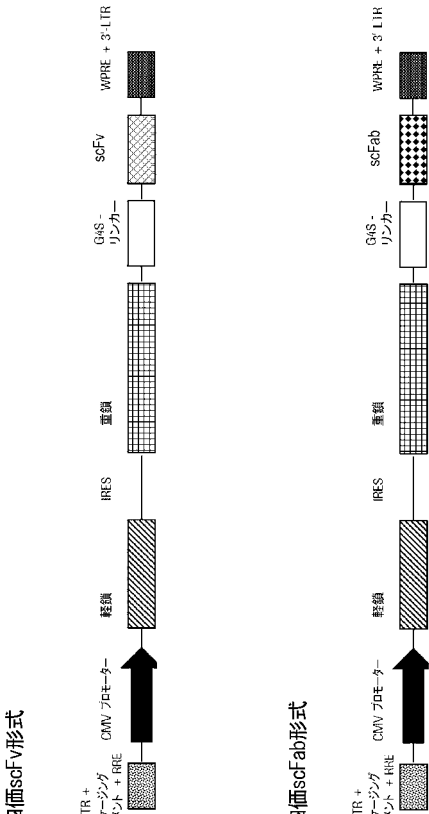
【 図 6 】



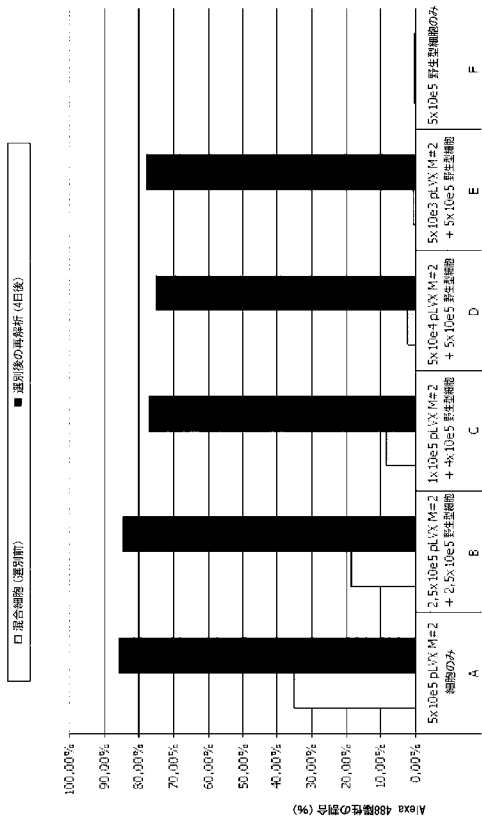
【 図 7 - 1 】



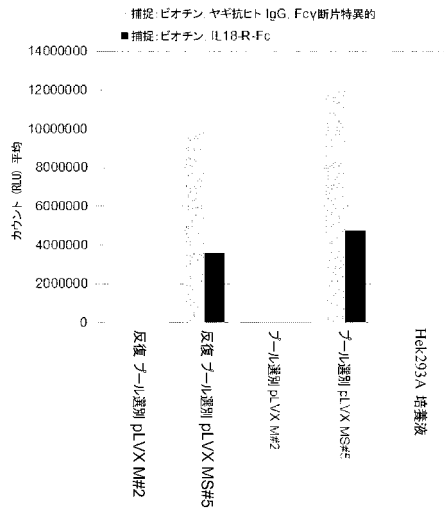
【 図 7 - 2 】



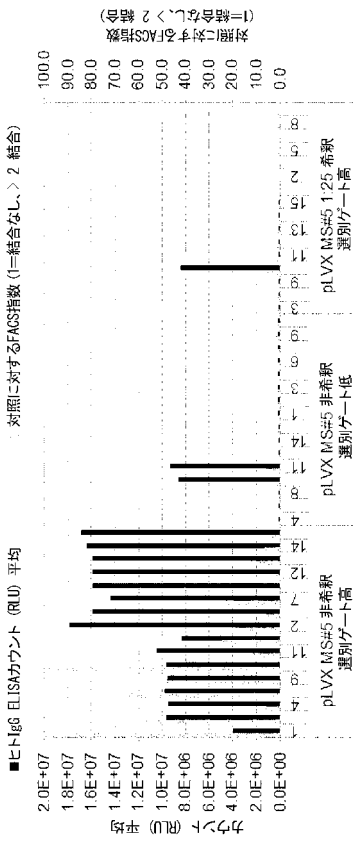
【 図 8 】



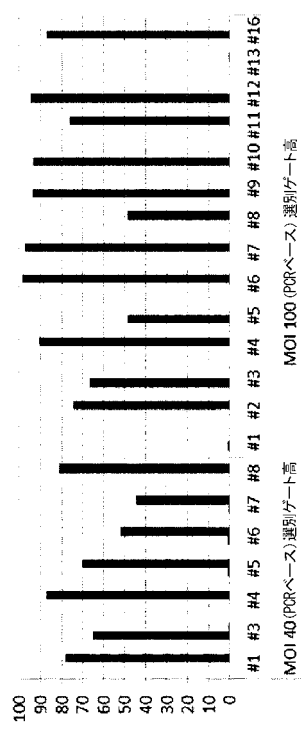
【 図 9 】



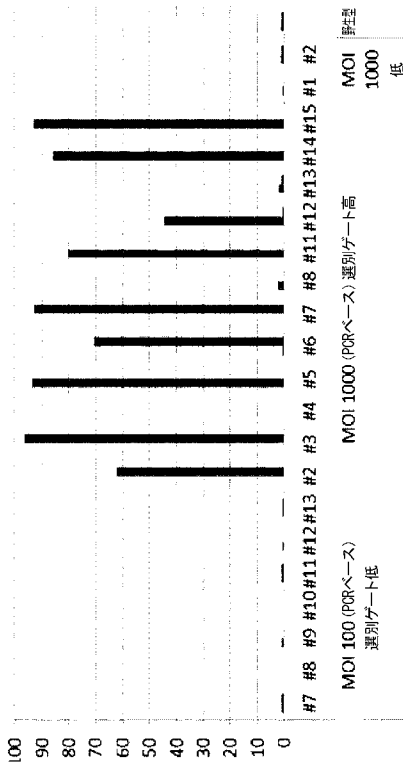
【 図 10 】



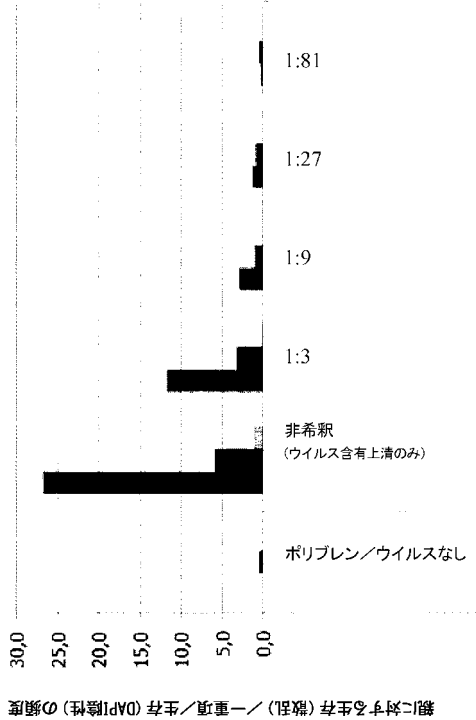
【 図 11 A - 1 】



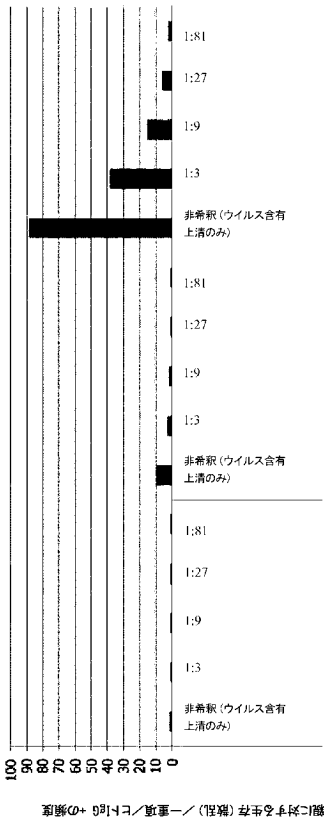
【図 1 1 A - 2】



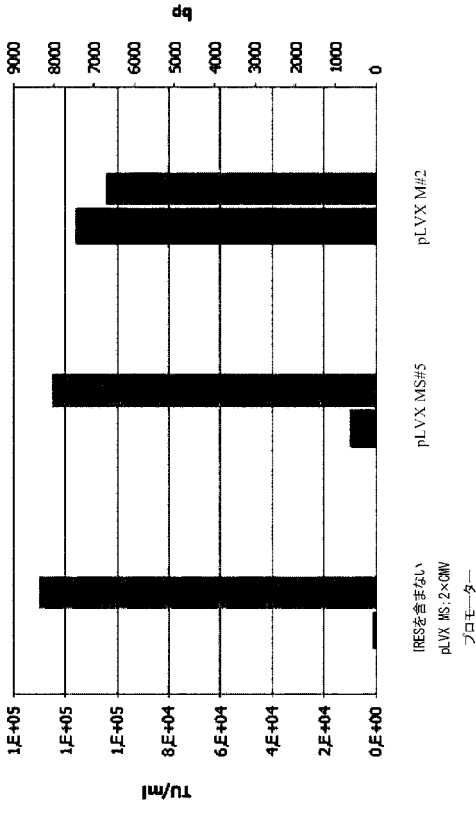
【図 1 1 B】



【図 1 2】



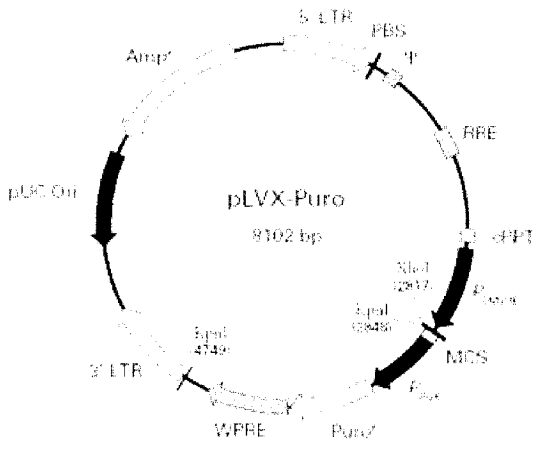
【図 1 3】



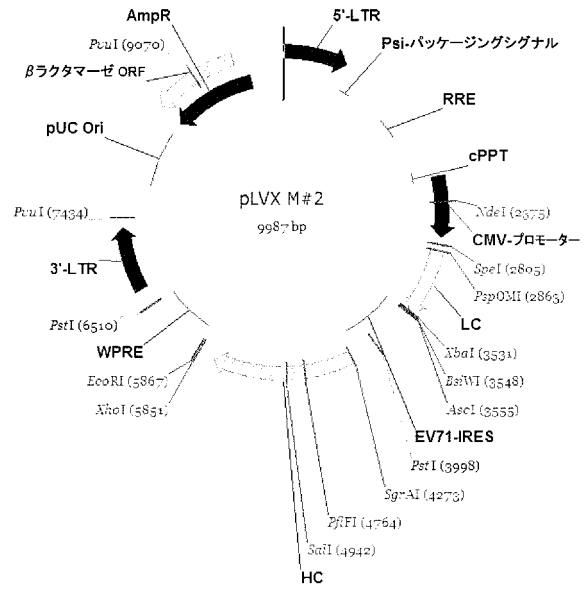
親に対する生存 (散乱) / 一重項 / 生存 (DAPI 陽性) の頻度

親に対する生存 (散乱) / 一重項 / 生存 (DAPI 陽性) の頻度

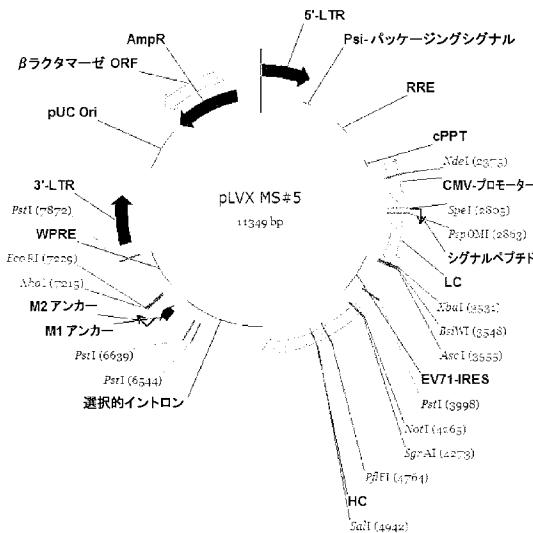
【 図 1 4 】



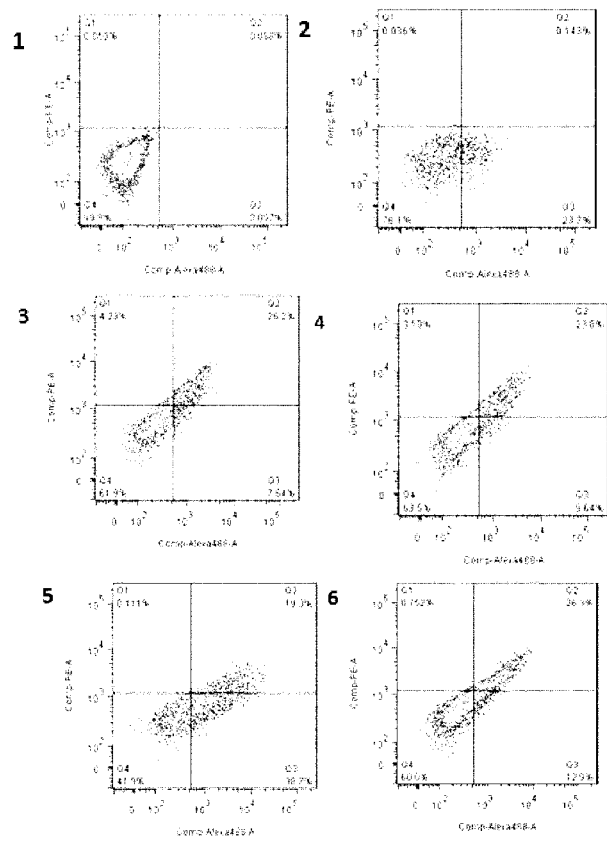
【 図 1 5 】



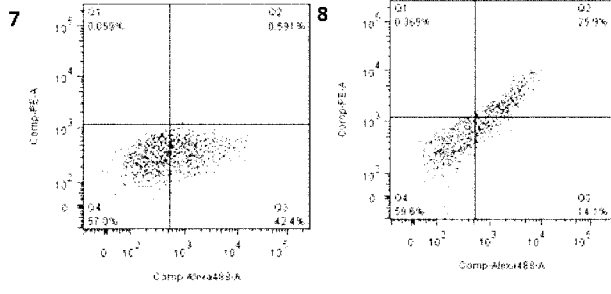
【 図 1 6 】



【 図 1 7 - 1 】



【 図 17 - 2 】



【 配列表 】  
2015503907000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/076163
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/46 C07K16/26 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAN TAUBE ET AL: "Lentivirus Display: Stable Expression of Human Antibodies on the Surface of Human Cells and Virus Particles", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, SAN FRANCISCO, CA; US, vol. 3, no. 9, 11 September 2008 (2008-09-11), pages E3181-1, XP002677795, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003181 the whole document ----- -/--	1,2, 4-20,171
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 April 2013		07/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Fellows, Edward

8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/076163

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. JACKMAN ET AL: "Development of a Two-part Strategy to Identify a Therapeutic Human Bispecific Antibody That Inhibits IgE Receptor Signaling", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 27, 2 July 2010 (2010-07-02), pages 20850-20859, XP055002016, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.113910 the whole document -----	1,2, 4-20,171
A	MERCHANT A MARGARET ET AL: "An efficient route to human bispecific IgG", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 7, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 677-681, XP002141015, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT0798-677 the whole document -----	1,2, 4-20,171
A	MARVIN JONATHAN S ET AL: "Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies", ACTA PHARMACOLOGICA SINICA, vol. 26, no. 6, June 2005 (2005-06), pages 649-658, XP002687103, ISSN: 1671-4083 the whole document -----	1,2, 4-20,171
A,P	WO 2012/023053 A2 (NOVIMMUNE SA [CH]; FISCHER NICOLAS [CH]; MAGISTRELLI GIOVANNI [FR]; GU) 23 February 2012 (2012-02-23) the whole document -----	1,2, 4-20,171

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2012/076163**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-22, 27-43, 171
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 076163

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 4-20, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing a bispecific antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette whereby one or both of the heavy chains comprise a transmembrane domain at their C-terminus; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed membrane bound full length bispecific antibody and related subject matter.

---

2. claims: 3(completely); 4-20, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing a bispecific antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette; selecting from said population a cell depending on the properties of the secreted membrane bound full length bispecific antibody and related subject matter.

---

3. claims: 21, 22(completely); 27-43, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette comprising at least two chains; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed full length membrane bound antibody and related subject matter.

---

4. claims: 125(completely); 127-165, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a lentiviral expression library by generating a multitude of DNA molecules, cloning said molecules into a lentiviral expression vector comprising an IRES linked expression cassette for the expression of a full length antibody light chain and a full length heavy chain, transducing a population of eukaryotic cells with said virus particles, displaying antibodies encoded by said lentiviral expression library, isolating a cell selected by capacity of the bound antibody to bind an antigen or antigens of interest and related subject-matter.

---

5. claims: 126(completely); 127-165, 171(partially)

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

A method of selecting a cell expressing a bispecific antibody by generating a lentiviral expression library by generating a multitude of DNA molecules from the DNA encoding a single bispecific antibody, cloning said molecules into a lentiviral expression vector comprising an IRES linked expression cassette for the expression of a full length bispecific antibody, transducing a population of eukaryotic cells with said virus particles, displaying antibodies encoded by said lentiviral expression library, isolating a cell selected by capacity of the bound antibody to bind an antigen or antigens of interest and related subject-matter.

---

**6. claims: 166(completely); 171(partially)**

A method for the display of full length antibodies comprising a common light chain and the selection of cells and thereby the selection of an antibody through the immunisation of an experimental animal, the selection of antigen specific B-cells; PCR amplification of heavy chain encoding nucleic acids using primers of SEQ ID Nos 1-11; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain and selection of bispecific antibodies displayed on the surface of a mammalian cell, PCR of the complete first heavy chain and second heavy chain including the IRES and cloning into a shuttle vector without transmembrane domain using SEQ ID Nos 29 and 30; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain and selection of bispecific antibodies in the supernatant and related subject-matter.

---

**7. claims: 167(completely); 171(partially)**

A method for the display of full length antibodies comprising a common light chain and the selection of cells and thereby the selection of an antibody through the immunisation of an experimental animal, the selection of antigen specific B-cells; PCR amplification of heavy chain encoding nucleic acids; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain and selection of mammalian cell membrane-displayed bispecific antibodies, PCR of the complete first heavy chain and second heavy chain including the IRES and cloning into a shuttle vector without transmembrane domain, removal of the transmembrane domain of the first heavy chain by restriction cutting the vector; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain, single cell sort of cells, screening of bispecific antibodies in the supernatant and related subject-matter.

---

**8. claims: 168(completely); 171(partially)**

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

A method for the display of full length antibodies comprising a common light chain and the selection of cells and thereby the selection of an antibody through the immunisation of an experimental animal, the selection of antigen specific B-cells; PCR amplification of heavy chain encoding nucleic acids for cloning into a first and second shuttle vector; virus generation (one for the first shuttle vector and one for the second shuttle vector), sequential infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain and selection of bispecific antibodies displayed on the surface of mammalian cell; PCR of the heavy chain variable domains and cloning into a third shuttle vector into a bicistronic expression unit without transmembrane domain with IRES; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain, single cell sort of cells, screening of bispecific antibodies in the supernatant and related subject-matter.

---

**9. claims: 169(completely); 171(partially)**

A method for the display of full length bispecific antibodies comprising a common light chain and the selection of cells and thereby the selection of a bispecific antibody through the immunisation of a first and second experimental animal, the selection of B-cells of the first and second immunisation; obtaining the heavy chain encoding nucleic acid of each B-cell so as to enable directed cloning into shuttle vector/lentiviral expression vector; ligation of a first heavy chain upstream of IRES and of a second heavy chain downstream of IRES; virus generation; infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain with the virus; selection of cells displaying bispecific antibodies, PCR of the complete first heavy chain and second heavy chain including the IRES and cloning into a shuttle vector without transmembrane domain, removal of the transmembrane domain of the first heavy chain by restriction cutting the vector; virus generation, infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain, single cell sort of cells, screening of bispecific antibodies in the supernatant and selection of bispecific antibodies and related subject-matter.

---

**10. claims: 170(completely); 171(partially)**

A method for the display of full length bispecific antibodies comprising a common light chain and the selection of cells and thereby the selection of a bispecific antibody through the immunisation of an experimental animal, the selection of B-cells of the immunised animal; obtaining the heavy chain encoding nucleic acid of each B-cell so as to enable directed cloning into shuttle vector/lentiviral expression vector; ligation of the heavy chain into a

International Application No. PCT/ EP2012/ 076163

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

shuttle vector/lentiviral expression vector upstream of IRES and of a second heavy chain into the same shuttle vector/lentiviral expression vector downstream of IRES; virus generation; infection of a mammalian cell stably expressing a common light chain with the virus; selection of a cell secreting a bispecific antibody and related subject-matter.

---

11. claims: 23, 44, 60(completely); 27-30, 33-43, 46-59, 62-124, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette containing a full length antibody light chain, the IRES, a full length antibody heavy chain and a nucleic acid encoding a transmembrane domain or a GPI anchor; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed full length membrane bound antibody and related subject matter.

---

12. claims: 24, 45, 61(completely); 27-29, 31, 33-43, 46-59, 62-124, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette containing a first full length antibody heavy chain, the IRES, a second full length antibody heavy chain and a nucleic acid encoding a transmembrane domain or a GPI anchor; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed full length membrane bound antibody and related subject matter.

---

13. claims: 25(completely); 27-29, 32-43, 171(partially)

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette containing a full length antibody light chain, the IRES, a full length antibody heavy chain linked at its C-terminus to a scFv and a nucleic acid encoding a transmembrane domain or a GPI anchor; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed full length membrane bound antibody and related subject matter.

---

14. claims: 26(completely); 27-29, 32, 33, 171(partially)

International Application No. PCT/ EP2012/ 076163

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

A method of selecting a cell expressing an antibody by generating a population of eukaryotic cells by transduction with a population of lentiviral particles, said particles comprising an IRES containing bicistronic expression cassette containing a full length antibody light chain, the IRES, a full length antibody heavy chain linked at its C-terminus to a scFab and a nucleic acid encoding a transmembrane domain or a GPI anchor; selecting from said population a cell depending on the properties of the displayed full length membrane bound antibody and related subject matter.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/076163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012023053 A2	23-02-2012	AU 2011290480 A1	28-02-2013
		CA 2808482 A1	23-02-2012
		US 2012184716 A1	19-07-2012
		WO 2012023053 A2	23-02-2012
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 4 0 B 40/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	M
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
	C 4 0 B 30/04	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ヒュエルスマン ピーター ミカエル

ドイツ連邦共和国 ハバシュ イム ソンネンタル 2 0

(72) 発明者 クノエトゲン ヘンドリク

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク アガシ - フレイスナー - ウェグ 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01

4B024 AA20 CA04 CA20 DA02 DA03 DA06 DA12 EA04 GA11

4B063 QA01 QQ08 QS33

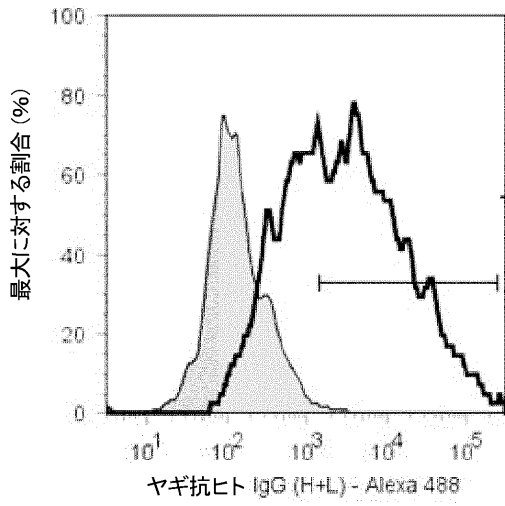
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24

4B065 AA72X AA90X AA93X

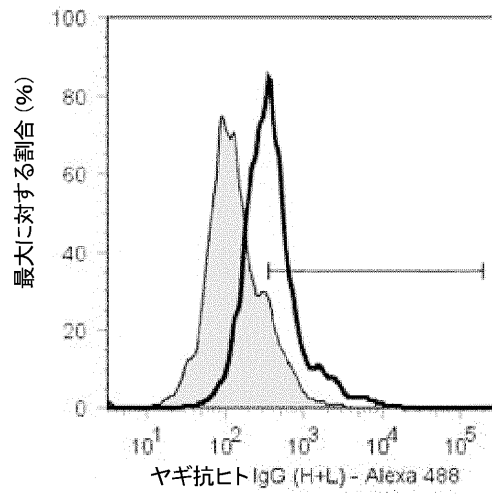
4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA20

【要約の続き】

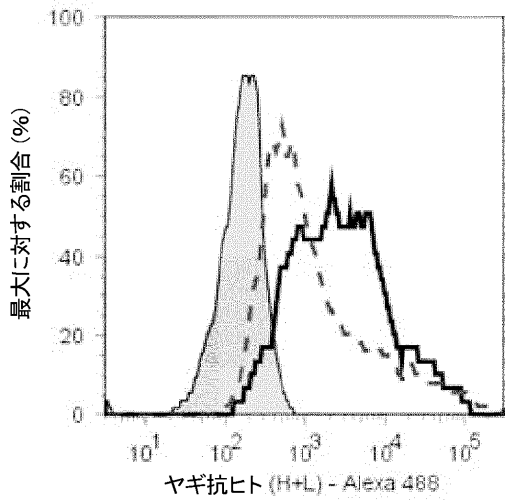
a)



c)



b)



d)

