

(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2004-535168
(P2004-535168A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

| | | |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 P 21/08 | C 1 2 P 21/08 Z N A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 1/15 | C 1 2 N 1/15 | 4 B O 6 4 |
| C 1 2 N 1/19 | C 1 2 N 1/19 | 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 1/21 | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 | G O 1 N 33/53 D | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2002-579908 (P2002-579908) | (71) 出願人 | 503363895 テクノファーム TECHNOPHARM フランス国、パリ エフ-75014、ブールヴァール サン-ジャクエス、25 25, boulevard Saint-Jacques, F-75014 Paris, France |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年4月3日 (2002.4.3) | (74) 代理人 | 100092897 弁理士 大西 正悟 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年10月3日 (2003.10.3) | (74) 代理人 | 100115200 弁理士 山口 修之 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FR2002/001164 | (72) 発明者 | エルヴェ バザン フランス国、ソー エフ-92330、リュ デ エコルス、4 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/081523 | | 最終頁に続く |
| (87) 国際公開日 | 平成14年10月17日 (2002.10.17) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 01/04525 | | |
| (32) 優先日 | 平成13年4月3日 (2001.4.3) | | |
| (33) 優先権主張国 | フランス (FR) | | |

(54) 【発明の名称】 抗体の調製および選択方法

(57) 【要約】

本発明は、つぎの工程を包含する抗体調製方法を対象とする： a) ある細胞株の細胞表面に発現されるべき関心対象ポリペプチドをコードする関心対象核酸配列を含む核酸構築物によるその細胞株のトランスフェクション、 b) 工程 (a) で調製した細胞またはそれらの膜を用いての、関心対象ポリペプチドに対する抗体の調製。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

つぎの工程を包含する抗体の調製方法：

a) 同一リーディングフレーム内に、膜たんぱく質をコードする核酸配列と関心対象ポリペプチドをコードする核酸配列とを含む核酸構築物によるある細胞株のトランスフェクション、

b) 工程 (a) で調製した細胞またはそれらの膜を用いての、前記関心対象ポリペプチドに対する抗体の調製。

【請求項 2】

前記工程 (a) でトランスフェクトされた細胞株が免疫系の株、好ましくはリンパ系の株であることを特徴とする請求項 1 の方法。 10

【請求項 3】

前記工程 (a) でトランスフェクトされた細胞株が B リンパ球との融合のための株として役立ちうることを特徴とする請求項 2 の方法。

【請求項 4】

前記工程 (b) での抗体の調製が、

(i) 前記工程 (a) で調製され、トランスフェクトされ、表面に関心の対象であるポリペプチドを発現する細胞またはそれらの膜を用いての動物の免疫化、

(ii) 前記工程 (a) で調製され、トランスフェクトされ、表面に関心の対象であるポリペプチドを発現する細胞またはそれらの膜と抗体を産生できる細胞を含む細胞集団との接触 20

によって得られた B 細胞に基づいて実施されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかの方法。

【請求項 5】

前記工程 (a) でトランスフェクトされた細胞株が前記 (i) で免疫化される動物または前記 (ii) で使用される細胞と組織適合性であることを特徴とする請求項 4 の方法。

【請求項 6】

前記関心対象の核酸配列が、前記関心対象ポリペプチドの高発現およびその前記トランスフェクトされた細胞の表面への運搬を可能にする調節配列の制御下におかれていることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかの方法。 30

【請求項 7】

膜たんぱく質をコードする前記核酸配列および前記関心対象核酸配列がともに前記関心対象ポリペプチドの高発現およびその前記トランスフェクトされた細胞の表面への運搬を可能にする調節配列の制御下におかれていることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかの方法。

【請求項 8】

前記関心対象の核酸配列が、膜たんぱく質をコードする前記核酸配列の前、後または中に配置されていることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれかの方法。

【請求項 9】

膜たんぱく質をコードする前記核酸配列および関心対象ポリペプチドをコードする前記核酸配列が 1 つまたは同一または異なるいくつかの連結核酸配列によって連結されていることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかの方法。 40

【請求項 10】

前記連結核酸配列の 1 つが免疫応答に関与するポリペプチドをコードしていることを特徴とする請求項 9 の方法。

【請求項 11】

前記工程 (a) で細胞株をトランスフェクトするのに使用される前記核酸構築物が、選択遺伝子、たとえば抗生物質耐性遺伝子を含んでいることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれかの方法。

【請求項 12】

前記工程 (a) で細胞株をトランスフェクトするのに使用される前記核酸構築物が、前記工程 (a) でトランスフェクトされた株の細胞に適合した核酸ベクターであることを特徴とする先行請求項のいずれかの方法。

【請求項 13】

前記トランスフェクトされた細胞株が、抗体調製のために前記の (i) または (i i) で使用される細胞と同一 (自家)、同系または同種であることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれかの方法。

【請求項 14】

前記細胞株のトランスフェクションののち、トランスフェクタントを、前記膜たんぱく質または関心対象ポリペプチドの発現について分析することを特徴とする先行請求項のいずれかの方法。

10

【請求項 15】

前記工程 (b) において、前記工程 (a) で調製された、その表面に前記関心対象ポリペプチドを発現するトランスフェクトされた細胞またはそれらの膜を投与された動物の細胞から、細胞融合手法により、モノクローナル抗体を調製することを特徴とする先行請求項のいずれかの方法。

【請求項 16】

前記工程 (b) が、

- 前記関心対象ポリペプチドに対する抗体を産生する B 細胞からの、該抗体の鎖の各々をコードする核酸配列の単離、

20

- それら核酸配列の宿主での発現

を包含することを特徴とする請求項 1 ~ 14 のいずれかの方法。

【請求項 17】

前記工程 (b) のあとに、得られた抗体を

- 前記工程 (a) でトランスフェクトされた株の細胞および / または

- 前記工程 (a) で用いたものと同じ、ただし関心対象の核酸配列をもたない核酸構築物でトランスフェクトされた細胞

と接触させることにより前記抗体の関心対象ポリペプチド認識能を検定することを特徴とする先行請求項のいずれかの方法。

【請求項 18】

30

同一リーディングフレーム内に、膜たんぱく質をコードする核酸配列と関心対象ポリペプチドをコードする関心対象核酸配列とを含む核酸構築物が導入された細胞。

【請求項 19】

請求項 18 に記載された細胞または該細胞の膜を含有する組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体、とりわけモノクローナル抗体の調製および有利には選択のための抗原提示方法に関するものである。

【背景技術】

40

【0002】

ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体は、いくつもの著作物において網羅的に記述されている様々な関心を抱かせるものである (バザン (B a z i n) 著「ラットハイブリドーマとラットモノクローナル抗体」、CRC プレス、1990年、515頁 ; ゴーディング (G o d i n g) 著「モノクローナル抗体：原理と実際」、第3版、アカデミックプレス、1996年、492頁 ; シェパード (S h e p h e r d) とディーン (D e a n) 著「モノクローナル抗体」、オックスフォード大学出版部、2000年、479頁 ;)。これらの抗体は、診断にも予防および / または治療にも、使用するのに有効である。本発明は、より広義には、インビボ (生体内) ならびにインビトロ (試験管内) での免疫に関するものである。

50

【0003】

免疫応答は常に、1つまたは複数のエピトープをもつ天然または人工の分子あるいは少なくとも1つのキャリア分子に結合された1つまたは複数のハプテンであってもよいなんらかの物質に向けられる。抗原製剤には、アジュバントを添加することができる。以下「抗原」とも呼ぶこの抗原製剤は、免疫学の教科書の正統的定義に一致するものである。本発明の枠内で考慮の対象となる免疫応答は、免疫学の教科書に記載されている細胞、とりわけ抗体の合成に導く細胞に関するものである。

【0004】

ある抗原決定基に対するモノクローナル抗体は、骨髄腫細胞と免疫された動物のリンパ系細胞との細胞融合技術が導入されてから、多くの研究室によって生産されている。ケーラー (Koe hler) とミルスタイン (M i l s t e i n) (1975年、ネイチャー、256巻、第495頁) によって開発されたモノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマの最初のモデルは、マウスのモデルであった。このモデルはラットという種に拡張され (ガルフレ (G a l f r e) ら、1979年、277, 131)、現在では広く用いられている。

10

【0005】

しかしながら、融合技術以外に、モノクローナル抗体の取得は、使用する免疫法および関心のあるハイブリッドの間違いない選別にとくに依存する。動物の生体を免疫するのに、それらの細胞のいくつかを選択し、抗原とともに培養するに際して、インビボとインビトロの2つの大きいタイプを区別できる。

20

【0006】

また、3つの免疫手法を区別できる：i) 精製した関心の対象である抗原による免疫、ii) 関心の対象である抗原を提示する細胞による免疫、iii) 関心の対象である抗原をコードする遺伝子を発現するDNA配列 (プラスミド) を投与することからなるDNA免疫。これら3つの場合に、抗原に対する抗体産生に導く免疫反応は、天然抗原を特異的に認識するBリンパ球および、より多くの場合、分解され、ペプチドの形で、前記抗原提示細胞の主要組織適合複合体分子によって提示される抗原を特異的に認識するTリンパ球の同時活性化を必要とする。

【0007】

それらの異なる様式での通常型の免疫は、インビトロでの免疫はより最近のものではあるが、約1世紀前から記載されており、たとえば、マウスでのミシェル (M i s h e l l) とダットン (D u t t o n) が記載している技術またはヒトでのいくつかのグループのそれを引用することができる。

30

【0008】

蛋白質による免疫には、抗原の前もつての精製または天然たんぱく質の立体配座特性および転写後特性を常に示すとは限らない組換え形態でのその生産が必要である。

【0009】

細胞による免疫には、主要な難点として、産生される抗体が多種にわたり、それらが関心の対象である蛋白質だけでなく、細胞により提示された他の抗原の多くをも認識し、このために得られたモノクローナル抗体のキャラクタリゼーションが困難になるということが

40

【0010】

最後に、前記のむきだしのDNA法による免疫は、すでに成功裏に採用されているが (コストリオガ (C o s t a g l i o g a) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー、1998年、160, 1458-1465)、得られる免疫応答の規模という面に限られている。実際、これらの方法は、抗原たんぱく質をコードする遺伝子が免疫対象動物の宿主細胞中で発現されること、および、このたんぱく質が引続き該宿主細胞の表面に提示されるか、またはそれらによって分泌されることを必要とする。さらに、これらの方法では、得られたクローンを選別することができない。

【0011】

50

これらの情報は、ラット、マウスおよび正常なまたは遺伝子導入技法によって修飾された体液性または細胞性の免疫応答を示しうる他のすべての種などの動物の通常の免疫にあてはまる。それらは、インビボの免疫について、またインビトロの免疫についてさえ、言えることである。

【0012】

モノクローナル抗体は、マウスにおいて、これを、トランスフェクトされ、それらの膜上に関心の対象である抗原を発現している自己または同種非免疫マウスの系統で免疫することによって、得ることができている(パーマー(Palmer)D., ケヴァニー(Kevany)M., マックワース-ヤング(Mackworth-Young)C., バチエラー(Batchelor)R., ロンバルディ(Lombardi)G., レチラー(Lechler)R. 「ヒトおよびマウスクラスII主要組織適合二量体を発現するL細胞トランスフェクタントを用いてのHLA-DR特異性モノクローナル抗体の産生およびキャラクタリゼーション」。イムノジェネティクス33(1):12-17, 1991。テュロー(Thureau)SR., ワイルドナー(Wildner)G., クオン(Kuon)W., ワイス(Weiss)EH, リトゥムラー(Rithumüller)G. 高トランスフェクションレシピエントP815におけるHLA-B27の発現と免疫原性:HLA-B27に対するモノクローナル抗体の新規誘導法。ティシュー・アンティジェン33(5):511-519, 1989)。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0013】

本発明は、きわめて特異的な免疫応答を容易に得て、形成された抗体を容易に選別することのできる新規な免疫方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

この目的は、つぎの工程を包含する抗体調製法によって達成される:

a) ある細胞株の細胞表面に発現されるべき関心の対象であるポリペプチドをコードする関心の対象となる核酸配列を含む核酸構築物による該細胞株のトランスフェクション、
b) 工程(a)で調製した細胞またはそれらの膜を用いての、関心の対象であるポリペプチドに対する抗体の調製。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の範囲内で、「膜」なる語は、当業者には既知の手法に従って得られる無損傷細胞膜およびそれらの断片を区別なく指すものとする。

【0016】

本発明の方法に使用される細胞は、不死の系統であってもよいが、寿命の長い細胞、たとえば線維芽細胞であってもよい。

【0017】

好ましい一実施態様に従えば、トランスフェクション工程(a)で使用する細胞株(系統)は、免疫系の細胞株、たとえばリンパ系細胞株である。

40

【0018】

これら免疫系細胞の選択は、本発明方法にとって決定的役割を果たす。それらは、抗体産生に導く免疫反応が生起するリンパ器官に必然的に定着できるものだからである。他方、免疫に使用されるこのトランスフェクトされた細胞株は、トランスフェクトされた細胞株によって発現された抗原に対する抗体を産生して、表面に発現するBリンパ球との融合のための細胞株としても役立つ。かくして、本発明の方法に従えば、2つのタイプの細胞間の接近が有利に得られ、それにより融合歩留まりが向上する。

【0019】

抗体は、工程(b)で、当業者には既知の免疫化または分子生物学のあらゆる方法によって調製し、ついで選択することができる。有利には、工程(b)はつぎにより実施する:

50

(i) 工程 (a) で調製され、トランスフェクトされ、表面に関心対象ポリペプチドを発現する細胞またはそれらの膜を用いての動物の免疫化、

(i i) 工程 (a) で調製され、トランスフェクトされ、表面に関心対象ポリペプチドを発現する細胞またはそれらの膜と抗体を産生できる細胞を含む細胞集団との接触。

【 0 0 2 0 】

抗体を産生できる細胞とは、抗体を実際に産生するすべての細胞ならびにそれらの構築および産生に必要な機構を有しているが、たとえば単に未熟な発育段階にあるというだけで、それらを産生しないすべての細胞を意味する。

【 0 0 2 1 】

本発明は、とりわけ、工程 (a) でトランスフェクトされた細胞株が (i) で免疫化された細胞株または (i i) で使用する細胞と組織適合性である場合の抗体調製法に関する。 10

【 0 0 2 2 】

本発明の方法は、言うまでもなく哺乳動物などの、抗体を産生できるすべての動物を用いて実施できる。免疫系の細胞株、たとえばリンパ系細胞株であるのが好ましい。トランスフェクトされた細胞株は、哺乳動物、とりわけヒトを含むすべての動物の細胞株であってよい。

【 0 0 2 3 】

特別な例として、げっ歯類の骨髄腫細胞系、好ましくはラットの骨髄腫細胞系、とくに好ましくは L O U 株ラットの骨髄腫細胞株、たとえば 2 0 0 0 年 1 1 月 2 9 日に番号 I - 2 5 8 4 のもとにパスツール研究所 (パリ) の国立微生物培養コレクションに寄託されたラ 20
ット L O U I R 9 8 3 F / T E C 骨髄腫細胞株を挙げるることができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の第一の実施態様に従えば、工程 (a) の細胞株のトランスフェクションは、関心対象の膜ポリペプチドをコードする関心対象の核酸配列を含む核酸構築物を用いて行う。当然のことながら、関心対象の核酸配列は、関心対象のポリペプチドの高発現とそれのトランスフェクトされた細胞の表面への輸送を可能ならしめる調節配列の制御下におく。

【 0 0 2 5 】

本発明の第二の実施態様に従えば、工程 (a) の細胞株のトランスフェクションは、同じリーディングフレーム内に「補助膜たんぱく質」と呼ばれる膜たんぱく質をコードする核酸配列と関心対象のポリペプチドをコードする関心対象核酸配列とを含む核酸構築物を用 30
いて行う。当然のことながら、補助膜たんぱく質をコードする核酸配列と関心対象核酸配列は、関心対象ポリペプチドの高発現とそれのトランスフェクトされた細胞の表面への輸送を可能ならしめる調節配列の制御下におく。関心対象の核酸配列は、補助膜たんぱく質をコードする核酸配列の前、後または中に配置できる。この実施形態では、補助膜たんぱく質をコードする核酸配列と関心対象のポリペプチドをコードする核酸配列は、互いに直接連結されていてもよく、1 つまたは同一または異なるいくつかの連結核酸配列によって連結されていてもよい。それは、補助膜たんぱく質と関心対象のポリペプチドとの間の相互作用を避けることのみを目的とする相対的に不活性なペプチドまたはポリペプチドをコードする配列であってよい。連結核酸配列は、免疫応答に関与するポリペプチドをコードしていてもよい。かかる連結配列の例として、つぎの配列を挙げるることができる： G G G 40
G S G G G G S G G G G S。

【 0 0 2 6 】

本発明方法の工程 (a) で細胞株をトランスフェクトするために用いる核酸構築物は、選択遺伝子、たとえばネオマイシンなどの抗生物質に対する耐性遺伝子を含んでいることが有利である。

【 0 0 2 7 】

工程 (a) で細胞株をトランスフェクトするために用いる核酸構築物は、工程 (a) でトランスフェクトされた株細胞に適合した核酸ベクターであることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

本発明に従ったベクターのきわめて特徴的な例は、5 ' から 3 ' へかけて： 50

- S R プロモーターなどのプロモーター、
 - マウス C D 8 0 のそのようなリーダー配列、
 - 関心の対象であるポリペプチドの遺伝子を挿入するポリクローニング部位、
 - 連結核酸配列、
 - 場合によりマウス C D 8 0 のリーダー配列が先行した、マウス C D 8 0 のような膜ポリペプチドをコードする核酸配列
- を包含する。

【 0 0 2 9 】

本発明のきわめて好ましい形態に従えば、工程 (a) でトランスフェクトされた細胞株は、抗体調製のために (i) または (i i) で使用する細胞と同一 (自家) 、同系または同種である。

10

【 0 0 3 0 】

有利には、工程 (a) での細胞株のトランスフェクションののち、トランスフェクタントを、工程 (b) に先立ち、補助膜たんぱく質または関心対象のポリペプチドの発現について分析調査する。

【 0 0 3 1 】

たとえば、ベクターによる細胞株のトランスフェクションと耐性遺伝子に対応する培地中での選択ののち、トランスフェクタントを、フローサイトメトリーにより、補助膜たんぱく質または関心対象ポリペプチドの発現について、たとえばこれらのポリペプチドの一つに対するモノクローナル抗体を用いて、分析する。選択されたクローンは、その表面に、関心対象ポリペプチドを呈する。

20

【 0 0 3 2 】

本発明の方法により調製された抗体は、本発明方法の工程 (b) で用いた手法に応じて、ポリクローナルでも、モノクローナルでもありうる。

【 0 0 3 3 】

かくして、本発明方法の工程 (b) の第一の実施形態は、関心対象のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を調製することにある。この実施態様は、工程 (a) で調製され、トランスフェクトされていて、その表面に関心対象のポリペプチドを発現する細胞を受容した動物細胞またはそれらの膜からの細胞融合手法を包含する。これらの細胞またはそれらの膜は、単独で、またはアジュバントとともに、1回または数回、動物に投与するのが有利である。免疫化に先立ち該細胞を照射し、あるいはそれらの分裂機構をブロックすることが、有効でありうる。当業者には周知の前述の手法による細胞の免疫化および融合ののち、関心対象のモノクローナル抗体を産生するクローンを、たとえばフローサイトメトリーによって、表面たんぱく質を発現するが、関心対象のポリペプチドを含まないベクター (「エンブティー」ベクター) によってトランスフェクトされている細胞へのそれらの固定と、関心対象のポリペプチドをも含むベクターによってトランスフェクトされ、表面たんぱく質を発現する細胞へのそれらの固定をと比較して、検出することができる。

30

【 0 0 3 4 】

本発明の方法は、ケーラーとミルステインのモノクローナル抗体合成性ハイブリドーマ調製手法を、マウス、ラットまたはその他のすべての種に様々に適応させて、またインビボ (トランスジェニックまたは非トランスジェニック動物) またはインビトロでの免疫化を採用するすべての方法において、組合せるとき、とくに興味あるものとなる。完全に組織適合性の系の使用はきわめて好ましいが、

40

- 免疫系の意義・価値が、免疫化される系と免疫化する系との間の大多数の抗原の同一性のために、部分的に保存されており、
- 選別の意義・価値も、同種抗原または異種抗原について以外は、部分的に保存されている

非組織適合性の系での利用が排除されるものではない。

【 0 0 3 5 】

かくして、本発明方法の工程 (b) の第二の実施形態は、工程 (a) で調製されたその表

50

面に関心対象ポリペプチドを発現するトランスフェクトされた細胞、たとえばHAT培地に感受性のIR983FまたはSp₂/O細胞またはそれらの膜を、抗体産生細胞と接触させることにある。それゆえ、ケーラーとミルステインの正統的細胞融合法を用い、たとえばヒト抗体を合成するトランスジェニック動物を用いて、また実際に、抗原によって刺激された未成熟または記憶Bリンパ球から特定の抗体を産生するすべての系を用いて、インビボ（たとえばヒト細胞の免疫不全動物への導入により）またはインビトロでの培養で、この免疫応答に由来するBリンパ球の1つまたは複数を不死化し、採用した種々の手法に由来するクローンを迅速かつ容易に選別することができる。求める特定の抗体をすでに産生しているBリンパ球（活性化Bリンパ球、プレ形質細胞、形質細胞など）の場合には、下記の方法が、不死化細胞からくる抗体の選別に関してその意義・価値を持ち続ける。

10

【0036】

本発明方法の工程（b）の第三の実施形態は：

- 関心対象のポリペプチドに対する抗体を産生するB細胞からの、該抗体の鎖の各々をコードする核酸配列の単離、
 - それら核酸配列の宿主での発現
- を包含する。

【0037】

本発明の方法は、工程（b）のあとに、得られた抗体を

- 工程（a）でトランスフェクトされた細胞および/または
 - 工程（a）で用いたものと同じ、ただし関心対象の核酸配列をもたない核酸構築物でトランスフェクトされた細胞
- と接触させることによる該抗体の関心対象ポリペプチド認識能の検定を包含できる。

20

【0038】

本発明の方法は、きわめて古典的なエプスタイン・バーウイルスの手法により不死化されたBリンパ細胞を若干もちうる同一生物体、たとえば人類の同一個人の細胞ならびに同一の採血で採取され、冷凍保存されたまたは少しのちの、あるいは同一個体の十分量の細胞を取得できる他のあらゆる組織で採取された他の細胞を不死化することを可能ならしめる点で、すぐれている。不死細胞以外にも、本発明の方法は、寿命の長い、たとえば線維芽細胞を用いて実施できる。

【0039】

細胞株と適合した発現系を選択することにより、本発明の方法は、免疫化すべき細胞とのクラスI組織適合性をもつ細胞中で抗原を発現させうるのみならず、さらに、クラスII組織適合性分子を発現する細胞を選択することを可能にする。後者の場合、トランスフェクトされた細胞は、抗原を持っておれば、そのTエピトープを免疫系のCD4Tリンパ球に提示できるであろう。

30

【0040】

本発明の方法は、求める抗体が特異的にそこへ結合されうるポリペプチド配列または分子全体さえも前もって知っていることも調製することも前提としない点においても、すぐれている。実際、適切な構築物によってコードされた抗原が免疫系（適切な動物または細胞プレパレート）に提示されるとき、インビボまたはインビトロの系においてその抗原だけが異物（免疫学の古典的教科書の非自己）と考えられ、抗体の大部分が実際にそれに向けられるであろう。免疫応答の間に形成された抗体の全部または一部がその系へ導入された抗原に向けられるかどうかを知るといふ点において異なる複数の理論が存在する。通例は、抗体の大部分が採用した抗原に向けられるとき、免疫応答は特異的であると考えられている。今回の場合、核酸構築物によって誘導された抗原にも向けられうる。この問題に関連した不都合は、検討中の抗原以外のトランスフェクトされた細胞の抗原をすべてもつ適切な対照細胞を適切なトランスフェクションによって取得することにより、回避できる。

40

【0041】

最後に、本発明の方法は、関心対象抗体の選別工程をかなり簡易化できる点で、すぐれている。原細胞株または抗原をコードするものを除いて同じ核酸構築物によりトランスフェ

50

クトされた株についての検定すべき培養上澄みの抗体の固定を、抗原をコードする核酸を組み入れた核酸構築物によりトランスフェクトされた株のそれと比較すれば、十分である。このタイプの比較は、「蛍光抗体細胞分取器」を略してFACSと呼ばれるタイプの装置を用いて行うことができる。フルオレセイン標識第二抗体の使用および第一抗体に結合できるための適切な方法の選択により、その存在を調べている第一抗体を容易に検出することができる。このタイプの手法は、専門実験室で現在普通に用いられているものである。対照細胞とトランスフェクトされた細胞との間の差を与える他のいかなる方法も、採用できる。

【0042】

本発明の方法は、研究において、また診断または治療のために、使用できるモノクローナル抗体、さらにはポリクローナル抗体の開発を必要とするすべての領域において用途がある。直接的治療の観点からは、本発明の方法は、患者に接種されるトランスフェクトされた細胞の生成の厳密な管理が確保されている患者の免疫化に使用できる。たとえば、トランスフェクトされ、その分裂を阻止するように処理された自家株を用いて、あるいは該株の細胞の膜断片を用いて、患者に免疫応答を誘発するために利用できる。

10

【0043】

本発明は、上に定義したとき、本発明の方法に使用できる核酸構築物に関するものである。本発明は、さらに、本発明方法の工程(a)で得られた細胞、それらを含む組成物、あるいはそれらの膜を含む組成物、ならびに本発明方法によって得られた抗体を含む組成物に関するものである。最後に、本発明は、治療上または診断上関心の

20

【0044】

本発明のその他の利点および特徴は、本発明方法の利用を限定するものではない以下の実施例を読めば、明らかになるであろう。

【実施例1】

【0045】

1) 方法

ラットLOU/Cおよびその第一世代の雑種、たとえばLOU/C X OKAMOTO
またはLOU/C X PVG/cと組織適合性である非分泌性骨髄腫株IR983Fを
、プラスミドPBJ LL177(アズマM, カヤビャブ(Cayabyab)M, バック(Buck)D, フィリップス(Phillips)JHおよびラニエ(Lanier)
)LL.CD28のB7との相互作用は一次同種増殖応答および小型休止期Tリンパ球介在細胞毒性を刺激する。ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 175:353-360, 1992)を用い、エレクトロポレーションによりトランスフェクトした。

30

【0046】

ATCCから得たこのプラスミド(ATCC番号99595)は、SRプロモーターの制御下にヒトCD80をコードしている(タカベY, セイキM, フジサワJF, ホイ(Hoy)P, ヨコタH, アライKI, ヨシダMおよびアライン.SRプロモーター:シミアンウイルス40初期プロモーターとヒトT細胞白血病ウイルスタイプI長末端反復配列のR-U5セグメントからなる効率的で汎用性のある哺乳動物cDNA発現系。モレキュラー・アンド・セリユラー・バイオロジー(Mol. Cell Biol.), 8:466-472, 1988)。このプラスミドは、ネオマイシン耐性遺伝子をも含んでいる。

40

【0047】

エレクトロポレーション条件: プラスミド濃度10 μg/mlの培地500 μl中500万個の細胞に300ボルトのパルスを与えた。

【0048】

50

ネオマイシン (1 mg/ml) 含有培地中で選択後、抗CD80 BB1モノクローナル抗体 (ファーマンジェン Pharmingen) を用い、フローサイトメトリーによりヒトCD80の発現について分析した。その表面に最も多くのヒトCD80を発現するクローンが開発された。

【0049】

セシウム線源を用いて2.5 Gyで照射し、1回目の注射には完全フロイントアジュバント中に、2回目の注射には不完全フロイントアジュバント中に乳化させた陽性IR983F CD80 (2×10^7 / 注射) を、LOU/Cラットに、2か月間の間隔をおいて、2回腹腔内注射した。2回目の免疫化から2週間後に、免疫化動物の血清は、ヒトCD80を発現するIR983Fを認識するが、正常なIR983Fは認識しない抗体を示した。

【0050】

また、セシウム線源により線量2.5 Gyで照射し、1回目の注射には完全フロイントアジュバント中に、2回目の注射には不完全フロイントアジュバント中に乳化させた陽性IR983F CD80 (10^7 細胞/脚) を、LOU/Cラットに、2週間の間隔をおいて、2回足底内注射した。2回目の注射から4日後に、膝窩神経節を採取し、細胞をIR983Fと融合させた。

【0051】

ヒトCD80を発現するIR983Fを認識するがトランスフェクトされていないIR983Fは認識しないモノクローナル抗体を産生する17のハイブリドーマが得られた。3つはIgG1イソタイプであり、9つはIgG2aイソタイプであり、4つがIgG2bイソタイプ、1つがIgMイソタイプであった。

【0052】

これらの抗体は、やはりCD80を発現するヒトDAUDI B株をも認識した。

【0053】

2) 結果

上に記載した方法により、膜たんぱく質のみに対する抗体を得ることができる。この方法をすべてのたんぱく質に一般化するために、IR983Fの表面にポリペプチドを発現することを可能にする発現ベクターを調製した。このベクターは、5'から3'へかけて、それぞれ：

- Sr プロモーター、
- マウスCD80のリーダー配列、
- 関心対象のポリペプチドをコードする遺伝子の挿入を可能にするSfiI/NotIクローニング部位、
- モチーフとして：GGGGSGGGGSをもち補助連結ポリペプチド鎖をコードする核酸配列、および
- リーダー配列を除くマウスCD80のコーディング部分を包含する。このベクターもネオマイシン耐性遺伝子をもっている。

【0054】

このベクターでIR983Fをトランスフェクトし、ネオマイシン含有培地中で選択したのち、トランスフェクタントを、マウス抗CD80モノクローナル抗体を用い、フローサイトメトリーにより、マウスCD80の発現について分析する。

【0055】

マウスCD80を発現するクローンは、必然的に、その表面につぎのポリペプチド配列を発現する：

膜 - マウスCD80 - GGGGS GGGGS GGGGS - 関心対象ポリペプチド - NH₂

【0056】

免疫化および細胞融合後、関心対象のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するクローンを、フローサイトメトリーにより、関心対象配列がクローン化されておらず、

マウスCD80のみを発現する「エンブティー」ベクターによりトランスフェクトされたIR983FおよびマウスCD80との融合によってクローン化された関心対象配列を含むベクターによりトランスフェクトされたIR983Fへのそれらの固定を比較して、検出する。

【実施例2】

【0057】

炭疽菌（バシラス・アントラシス）の防御抗原の最初の250のアミノ酸をコードする核酸配列（炭疽菌の防御抗原をコードするDNAの配列および分析。ウェルコス（Welkoss）SL，ロウ（Lowe）JR，エデン - マッカッチャン（Eden - McCutchan）F，ヴォドキン（Vodkin）M，ルプラ（Lppla）SL，シュミット（Schmitt）JJ．ジーン（Gene）．69：287．1988）を、上記発現ベクターに、SfiI/NotI制限後、クローン化した。

10

【0058】

IR983Fを、「エンブティー」発現ベクターで、または炭疽菌の遺伝子を含む発現ベクターでトランスフェクトした。

【0059】

ネオマイシン（1mg/ml）含有培地中での選択後、マウスCD80を発現し、MCA1586Fモノクローナル抗体（セロテックSerotec）を用いたフローサイトメトリーにより検出されるトランスフェクタントが得られた。

【0060】

その表面に最も多くのマウスCD80を発現するクローンが開発された。

20

【0061】

つぎに、これらのトランスフェクタントを用いて、動物を免疫化した。

【0062】

たとえば、1回目の注射には完全フロイントアジュバント中に、2回目の注射には不完全フロイントアジュバント中に乳化させた、炭疽菌遺伝子含有発現ベクターによりトランスフェクトした陽性IR983F - CD80（ 10^7 細胞/脚）を、LOU/Cラットに、2週間の間隔をおいて、2回足底内注射した。2回目の注射から4日後に、膝窩神経節を採取し、細胞をIR983Fと融合させた。

【0063】

炭疽菌遺伝子含有ベクターによりトランスフェクトされた陽性IR983F - CD80を認識するが、「エンブティー」ベクターによってトランスフェクトされただけの陽性IR983F - CD80は認識しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。

30

【実施例3】

【0064】

1) 方法

非分泌性骨髄腫細胞株IR983Fを、プラスミドpBJ CD94を用いてのエレクトロポレーションによりトランスフェクトした。このプラスミドは、クローン化したCD28遺伝子をプラスミドpBJ LL177中に置換して構築した。このプラスミドはネオマイシン耐性遺伝子をもっている。

40

【0065】

エレクトロポレーション条件：プラスミド濃度10μg/mlの培地500μl中500万個の細胞に300ボルトのパルスを与えた。

【0066】

ネオマイシン（1mg/ml）含有培地中で選択後、抗CD94 HP - 3D9モノクローナル抗体（ファージン）を用い、フローサイトメトリーによりヒトCD94の発現について分析した。その表面に最も多くのヒトCD94を発現するクローンが開発された。

【0067】

50

セシウム線源を用いて2.5 Gyで照射し、1回目の注射には完全フロイントアジュバント中に、2回目の注射には不完全フロイントアジュバント中に乳化させた陽性IR983F CD94 (2×10^7 / 注射) を、LOU/Cラットに、2か月間の間隔をおいて、2回腹腔内注射した。2回目の免疫化から2週間後に、免疫化動物の血清は、ヒトCD94を発現するIR983Fを認識するが、正常なIR983Fは認識しない抗体を示した。

【0068】

また、セシウム線源により線量2.5 Gyで照射し、1回目の注射には完全フロイントアジュバント中に、2回目の注射には不完全フロイントアジュバント中に乳化させた陽性IR983F CD94 (10^7 細胞/脚) を、LOU/Cラットに、2週間の間隔をおいて、2回足底内注射した。2回目の注射から4日後に、膝窩神経節を採取し、細胞をIR983FまたはヒトCD94を発現するIR983Fと融合させた。

10

【0069】

2600万個の神経節細胞とIR983Fとの融合によって、抗ヒトCD94モノクローナル抗体を産生するが、トランスフェクトされていないIR983Fは認識しない8つのハイブリドーマが得られた。2000万個の神経節細胞とヒトCD94を発現するIR983Fとの融合によって、抗ヒトCD94抗体を産生する17のハイブリドーマが得られた。

【0070】

いずれの抗体も、IR983F CD94とCD94を発現するヒトNKとを同時に認識した。

20

【0071】

これらクローンのイソタイプはつぎの通りである：3 IgM、IgG1、15 IgG2a、5 IgG2b、1 IgG2c。

【0072】

この実験を、免疫化株としてヒトリガンドCD134を発現するIR983Fを用いて、繰り返した。3000万個の神経節細胞とIR983Fとを融合させて、抗CD134L抗体を産生する4つのハイブリドーマが得られた。ヒトCD134Lを発現する細胞3000万個を融合させて、抗CD134L抗体を産生する10のハイブリドーマが得られた。いずれの抗体も、IR983F CD134LならびにCD134を発現するヒトBリンパ球を同時に認識した。

30

【実施例4】

【0073】

IR983Fの膜を、たとえばダウズ(Dounze)のホモジェナイゼーション法によって取得する(コイズミK, シミズKT, ニシダK, サトーC, オータK, ヤマダN. ビオキミカ・エト・ビオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta), 649:393-403, 1981)。

【0074】

LOU/Cラットに、ヒトCD70を発現するIR983F細胞4000万個に相当する膜を、2日間隔で3回皮下注射した。

40

【0075】

最初の注射から10日後、ヒトCD70を発現するIR983F細胞を特異的に認識するポリクローナル抗体が、免疫化動物の血清中に、フローサイトメトリーによって証明された。

【実施例5】

【0076】

本発明の方法は、その方法の工程(a)でトランスフェクトされうる細胞株として、SP₂/O細胞を用いて実施できる。

【0077】

この特定の実施例を以下に記載する。

50

【0078】

材料

完全RPMI培地

- RPMI 500 ml 入りフラスコ
- L - グルタミン 5 ml
- ゲンタマイシン (50 mg / ml) 500 μ m

エレクトロポレーション培地 (滅菌蒸留水で 300 ml とする)

- 0.3 M イノシトール (16.2 g)
- + 1 mM KH₂PO₄ (40.82 mg)
- + 0.1 mM 酢酸カルシウム (4.74 mg)
- + 0.5 mM 酢酸マグネシウム (32.17 mg)

10

エレクトロポレーション後培地 (滅菌蒸留水で 300 ml とする)

- 132 mM NaCl (2.31 g)
- + 8 mM KCl (178.9 mg)
- + 10 mM KH₂PO₄ (408 mg)
- + 0.1 mM 酢酸カルシウム (4.74 mg)
- + 0.5 mM 酢酸マグネシウム (32.17 mg)

方法

- 培養フラスコから SP₂ / O 細胞の計数を行う。
- 1 \cdot 10⁷ 個の細胞を採取する。
- 採取した細胞を 1300 rpm で 5 分間遠心分離する。
- 沈渣を 37 のエレクトロポレーション緩衝液 1 ミリリットル中に懸濁させる。
- 場合に依じて、プラスミド CD40L (プラスミド PBJ - CD40L は、プラスミド PBJ LL177 中にクローン化されている遺伝子を、最初に BGMGSneo - TRAP (TRAP のクローニング、ヒト T 細胞上の CD40 のリガンド。ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.)。22 : 3191 - 3194, 1992) 中にクローン化した CD40L のそれによって置換することにより構築した) 10 μ g または プラスミド CD94 を加える。
- 得られた懸濁液を吸引吐出しによってホモジェナイズする。
- 懸濁液 400 μ l を採取する。
- この細胞懸濁液を、プラスミドの存在下に、400 μ l の円錐形キュベット中、つぎの条件下で、エレクトロポレーションに付する : 350 V、5 ms、1 パルス。
- 前記キュベット中、37 でポストエレクトロポレーション培地 1 ミリリットルを加える。
- この懸濁液を外界温度で 10 分間インキュベートする。
- キュベット内容物を採取し、細胞を、フェノールレッドを含まない完全 RPMI 培地 (インビトロジェン Invitrogen) 18.5 ml 中に懸濁させる。

20

30

【0079】

つぎに、それらの細胞を、各ウエル当り 200 μ l の割合で、96 ウエルの培養プレートに分配する。

40

【0080】

それらを、5% CO₂ 雰囲気下、37 で 24 時間インキュベートする。
0.5 mg / ml のジェネティシン (インビトロジェン) を含有する完全 RPMI 培地 (インビトロジェン) を各ウエル当り 150 μ l 加えることにより、培地交換を行う。

【0081】

前記細胞を改めて、5% CO₂ 雰囲気下、37 でインキュベートする。

【0082】

当該プラスミド (ゲンタマイシン耐性) によりトランスフェクトされた細胞を生育させる。

【0083】

50

当該プラスミドによりトランスフェクトされた細胞を F A C S にて分析し、場合に応じて C D 4 0 L または C D 9 4 の膜発現を検出する。

【 0 0 8 4 】

結果

上記の方法に従って実施した実験の結果、下記のもの得到了：

- C D 4 0 L を発現するトランスフェクトされた S P₂ / O の 1 クローン (S P 2 O - C D 4 0 L)
- C D 9 4 を発現する S P₂ / O の 3 クローン (S P₂ / O - C D 9 4 - F 4 、 S P₂ / O - C D 9 4 - F 1 および S P₂ / O - C D 9 4 - D 2) 。

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
17 octobre 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/081523 A2(51) Classification internationale des brevets¹ :
C07K 16/28, 16/00, C12N 5/10(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01164

(22) Date de dépôt international : 3 avril 2002 (03.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/04525 3 avril 2001 (03.04.2001) FR(71) Dépositaire (pour tous les États désignés sauf US)
: TECHNOPHARM [FR/FR]; 25, boulevard
Saint-Jacques, F-75014 Paris (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GI, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviation-
s, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING AND SELECTING ANTIBODIES

(54) Titre : PROCÉDE DE PRÉPARATION ET DE SÉLECTION D'ANTICORPS

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing antibodies comprising the following steps: a) transfecting a cell line with a nucleic acid construct comprising a nucleic sequence of interest coding for a polypeptide of interest to be expressed at the surface of the cells of said line; b) preparing antibodies directed against the polypeptide of interest with the cells prepared at step a) or their membranes.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'anticorps comprenant les étapes suivantes : a) la transfection d'une lignée cellulaire par une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt à exprimer à la surface des cellules de ladite lignée, b) la préparation d'anticorps dirigés contre le polypeptide d'intérêt avec les cellules préparées à l'étape (a) ou de leurs membranes.

WO 02/081523 A2

PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET DE SÉLECTION D'ANTICORPS.

La présente invention concerne une méthode de
présentation d'antigène pour la préparation et
5 avantageusement la sélection d'anticorps notamment
d'anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux produits par des
hybridomes présentent des intérêts multiples qui ont été
décrits de manière exhaustive dans plusieurs ouvrages
10 (Bazin, " Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies ",
CRC Press, 1990, 515 pages ; Goding, " Monoclonal
antibodies : principes and practise ", 3^{ème} édition,
Academic Press, 1996, 492 pages ; Shepherd et Dean,
" Monoclonal antibodies ", Oxford university press, 2000,
15 479 pages). Ces anticorps sont utiles à des emplois aussi
bien de diagnostic que de thérapeutiques préventives et/ou
curatives. La présente invention s'intéresse plus largement
à l'immunisation tant *in vivo* que *in vitro*.

Les réponses immunes sont toujours dirigées
20 contre un matériel, qui peut être soit une molécule
naturelle ou artificielle avec un ou plusieurs épitopes
soit un ou plusieurs haptènes couplés à au moins une
molécule porteuse. Un adjuvant peut être ajouté à la
préparation antigénique. Cette préparation antigénique
25 aussi désignée ci-après "antigène" correspond à la
définition classique des manuels d'immunologie. Les
réponses immunes considérées dans le cadre de la présente
invention concernent celles décrites dans les manuels
d'immunologie et en particulier celles conduisant à la
30 synthèse d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre un
déterminant antigénique sont produits par un grand nombre
de laboratoires depuis l'introduction de la technique de
fusion cellulaire entre une cellule myélomateuse et une

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

2

cellule lymphoïde d'un animal immunisé. Le premier modèle d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux développé par Köhler et Milstein (1975, Nature, vol. 256, page 495) fut un modèle murin. Ce modèle a été étendu à l'espèce rat (Galfré et al., 1979, 277, 131) et est maintenant largement utilisé.

Toutefois, outre la technique de fusion, l'obtention d'un anticorps monoclonal dépend surtout de la méthode d'immunisation utilisée et du criblage correct des clones hybrides intéressants. On peut distinguer 2 grands types d'immunisation d'organismes animaux soit *in vivo* soit *in vitro*, en sélectionnant certaines de leurs cellules et en les cultivant avec un antigène.

On distingue encore trois techniques d'immunisation i) l'immunisation avec l'antigène d'intérêt purifié, ii) l'immunisation avec une cellule présentant l'antigène d'intérêt, iii) l'immunisation ADN consistant à administrer une séquence d'ADN (plasmide) exprimant le gène codant pour l'antigène d'intérêt. Dans les trois cas, on admet que la réaction immune conduisant à la production d'anticorps dirigés contre l'antigène requiert l'activation simultanée des lymphocytes B reconnaissant spécifiquement l'antigène natif et, le plus souvent, des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement l'antigène dégradé et présenté sous forme de peptide par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de cellules dites présentatrices de l'antigène.

L'immunisation conventionnelle dans ses différentes modalités a été décrite depuis un siècle environ, alors que les immunisations *in vitro* sont plus récentes, on peut citer par exemple les techniques décrites par Mishell et Dutton chez la souris ou celle de plusieurs groupes chez l'homme.

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

3

L'immunisation par une protéine requiert une purification préalable de l'antigène ou sa production, sous une forme recombinante qui ne présente pas toujours les caractéristiques conformationnelles et post-transcriptionnelles de la protéine native.

L'immunisation avec une cellule présente comme principal inconvénient la grande diversité des anticorps générés qui reconnaissent, non seulement la protéine d'intérêt, mais aussi la multitude des autres antigènes présentés par les cellules, ce qui rend difficile la caractérisation des anticorps monoclonaux obtenus.

Enfin, l'immunisation par des méthodes dites d'ADN nu a déjà été employée avec succès (Costagliola et al., Journal of Immunology 1998, 160, 1458-1465) mais reste limitée au niveau de l'ampleur des réponses immunologiques obtenues. En effet, ces méthodes nécessitent que le gène codant pour la protéine antigénique s'exprime dans les cellules hôtes du sujet immunisé et que cette protéine soit ensuite présentée à la surface desdites cellules hôtes ou sécrétées par celles-ci. En outre, ces méthodes ne permettent pas le criblage des clones obtenus.

Ces données sont applicables aussi bien pour une immunisation classique d'un animal comme le rat, la souris ou toute autre espèce capable de donner des réponses immunes humorales, ou cellulaires, normales ou modifiées par des artifices de transgénies. Elles sont valables pour une immunisation *in vivo* et même *in vitro*.

Des anticorps monoclonaux ont pu être obtenus chez la souris en immunisant celle-ci avec des lignées de souris autologues ou allogéniques non immunitaires transfectées et exprimant l'antigène d'intérêt sur leurs membranes (Palmer d, Kevany M., Mackworth-Young C., Batchelor R., Lombardi G., Lechler R. « Generation and

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

4

characterization of an HLA-DR specific monoclonal antibody using L-cell transfectants expressing human and mouse class II major histocompatibility dimers. Immunogenetics 33(1): 12-17. 1991. Thureau SR., Wildner G. Kuon W., Weiss EH, Rithumuller G. Expression and immunogenicity of HLA-B27 in high transfection recipient P815: a new method to induce monoclonal antibodies directed against HLA-B27. tissue antigen 33 (5): 511-519. 1989).

10 La présente invention a pour but d'offrir une nouvelle méthode d'immunisation qui permet d'avoir aisément des réponses immunologiques très spécifiques et de cribler facilement les anticorps formés. Ce but est atteint grâce à un procédé de préparation d'anticorps comprenant les étapes
15 suivantes :

- a) la transfection d'une lignée cellulaire par une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt à exprimer à la surface des cellules de ladite lignée,
- 20 b) la préparation d'anticorps dirigés contre le polypeptide d'intérêt avec les cellules préparées à l'étape (a) ou avec leurs membranes.

25 Dans le cadre de la présente invention, le terme « membrane » se réfère indistinctement aux membranes cellulaires intactes et aux fragments de celles-ci, obtenus selon des techniques connues de l'homme du métier.

30 Les cellules mises en œuvre dans le procédé de l'invention peuvent être des lignées immortelles, mais également des cellules à longue durée de vie, par exemple des fibroblastes.

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

5

Selon un mode préféré de mise en œuvre, la lignée cellulaire mise en œuvre à l'étape (a) de transfection est une lignée cellulaire du système immunitaire, par exemple une lignée lymphoïde.

5

Le choix de ces cellules du système immunitaire est déterminant pour le procédé de l'invention, car elles sont capables de coloniser naturellement les organes lymphoïdes, où se produit la réaction immunitaire conduisant à la production des anticorps. D'autre part, cette lignée transfectée utilisée pour l'immunisation peut servir aussi de lignée de fusion avec le lymphocyte B qui produit et exprime à sa surface les anticorps dirigés contre l'antigène exprimé par la lignée transfectée. Ainsi, selon le procédé de l'invention, on obtient avantageusement un rapprochement entre les deux types de cellules qui améliore le rendement de la fusion.

Les anticorps peuvent être préparés puis sélectionnés à l'étape (b) par toute méthode d'immunisation ou de biologie moléculaire connue de l'homme du métier. Avantageusement, l'étape (b) est réalisée :

(i) par immunisation d'un animal avec des cellules transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou avec leurs membranes,

(ii) par mise en contact des cellules transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou de leurs membranes avec des populations cellulaires comprenant des cellules susceptibles de produire des anticorps.

Par cellule susceptible de produire un anticorps on doit comprendre toute cellule produisant

effectivement des anticorps, mais également toute cellule possédant la machinerie nécessaire à leur assemblage et production mais qui ne les produirait pas, pas exemple du simple fait de son stade de développement immature.

5 L'invention concerne tout particulièrement un procédé de préparation d'anticorps dans lequel la lignée cellulaire transfectée à l'étape (a) est histocompatible avec l'animal immunisé en (i) ou les cellules mises en œuvre en (ii).

10 Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec des cellules de tout animal capable de produire des anticorps comme, bien entendu, les mammifères. De préférence il s'agit d'une lignée du système immunitaire, par exemple une lignée lymphoïde. La lignée cellulaire
15 transfectée peut être toute lignée animale y compris de mammifère et plus particulièrement humaine.

A titre d'exemple particulier, on peut citer une lignée myélomateuse de rongeur, de préférence une lignée myélomateuse de rat et tout préférentiellement une
20 lignée myélomateuse de rat de souche LOU, comme la lignée myélomateuse de rat LOU IR 983 F/ TEC déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes à l'Institut Pasteur (Paris) sous le No. I-2584, le 29 novembre 2000.

25 Selon une première forme de mise en œuvre de l'invention, la transfection d'une lignée cellulaire de l'étape (a) est effectuée avec une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt
30 codant pour un polypeptide d'intérêt membranaire. Bien entendu, la séquence nucléique d'intérêt est placée sous le contrôle de séquences de régulation qui permettent l'expression élevée du polypeptide d'intérêt et son exportation vers la surface des cellules transfectées.

Selon une seconde forme de mise en œuvre de l'invention, la transfection d'une lignée cellulaire à l'étape (a) est effectuée avec une construction d'acide nucléique comprenant dans un même cadre de lecture une séquence nucléique codant pour une protéine membranaire dite « membranaire auxiliaire » et une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt. Bien entendu, la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire auxiliaire et la séquence nucléique d'intérêt sont placées ensemble sous le contrôle de séquences de régulation qui permettent l'expression élevée du polypeptide d'intérêt et son exportation vers la surface des cellules transfectées. La séquence nucléique d'intérêt peut être placée avant, après ou dans la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire auxiliaire. Dans cette forme de mise en œuvre, la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire auxiliaire et la séquence nucléique codant pour un polypeptide d'intérêt peuvent être reliées directement l'une à l'autre ou être reliées par une ou plusieurs séquences nucléiques de liaison identiques ou différentes. Il peut s'agir des séquences de liaison codant pour un peptide ou polypeptide relativement inertes dont le but est seulement d'éviter des interactions entre la protéine membranaire auxiliaire et le polypeptide d'intérêt. La séquence nucléique de liaison peut aussi coder pour un polypeptide participant à la réponse immune. A titre d'exemple d'une telle séquence de liaison, on peut citer la séquence suivante : GGGSGGGSGGGGS.

La construction d'acide nucléique mise en œuvre pour transfecter la lignée cellulaire de l'étape (a) du procédé de l'invention comprend avantageusement un gène de sélection par exemple un gène de résistance à un antibiotique comme la néomycine.

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

8

La construction d'acide nucléique mise en œuvre pour transfecter la lignée cellulaire de l'étape (a) est de préférence un vecteur nucléique adapté aux cellules de la lignée transfectée à l'étape (a).

5 Un exemple tout particulier de vecteur selon l'invention comprend de 5' vers 3' :

- un promoteur, comme le promoteur Sra,
- une séquence leader comme celle du CD80 de souris,
- 10 - un polysite de clonage dans lequel est inséré le gène du polypeptide d'intérêt,
- une séquence nucléotidique de liaison,
- la séquence nucléique codant pour un polypeptide membranaire comme le CD80 de souris,
- 15 éventuellement précédée d'une séquence leader comme la séquence leader du CD80 de souris.

Selon une forme toute préférée du procédé selon l'invention, la lignée cellulaire transfectée à l'étape (a) est autologue, isologue ou homologue avec les cellules mises en œuvre en (i) ou (ii) pour la préparation des anticorps.

Avantageusement, après transfection de la lignée cellulaire à l'étape (a), les transfectants sont analysés pour l'expression de la protéine de membrane auxiliaire ou du polypeptide d'intérêt, avant l'étape (b).

Ainsi, après transfection de la lignée cellulaire avec le vecteur et sélection dans un milieu correspondant au gène de résistance, les transfectants sont analysés par cytométrie de flux pour l'expression de la protéine membranaire auxiliaire ou du polypeptide d'intérêt par exemple à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'un de ces polypeptides. Les clones sélectionnés présentent à leur surface le polypeptide d'intérêt.

Les anticorps préparés par le procédé de l'invention peuvent être polyclonaux ou monoclonaux selon la technique mise en œuvre à l'étape (b) du procédé selon
5 l'invention.

Ainsi, une première forme de mise en œuvre de l'étape (b) du procédé de l'invention consiste à préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre le polypeptide d'intérêt. Ce mode de réalisation comprend une technique de
10 fusion cellulaire à partir de cellules d'un animal ayant reçu des cellules transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou de leurs membranes. Ces cellules, ou leurs membranes sont avantageusement administrées à l'animal, seules ou en
15 association avec un adjuvant, en une ou plusieurs fois. Il peut être utile d'irradier lesdites cellules avant l'immunisation pour diminuer ou bloquer leur mécanisme de division. Après immunisation et fusion des cellules par les techniques précédemment décrites bien connues de l'homme du
20 métier, les clones produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le polypeptide d'intérêt peuvent être détectés par exemple par cytométrie de flux en comparant leurs fixations sur des cellules exprimant la protéine de surface mais transfectées par le vecteur ne comprenant pas
25 le polypeptide d'intérêt (vecteur "vide") et des cellules exprimant la protéine de surface transfectées par le vecteur comprenant aussi le polypeptide d'intérêt.

Le procédé selon l'invention est particulièrement intéressant en association avec la
30 technique de Köhler et Milstein de préparation des hybridomes synthétisant des anticorps monoclonaux avec ses diverses adaptations à la souris, au rat, ou à toute autre espèce, mais aussi dans toute méthode employant une immunisation *in vivo* (animal transgénique ou non) ou *in*

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

10

vitro. L'emploi de systèmes complètement histocompatibles est hautement préférable, mais il n'exclut pas son usage dans un système non histocompatible où les intérêts :

5 - du système d'immunisation seront partiellement conservés en raison de l'identité de la majorité des antigènes entre le système à immuniser et le système immunisant,

- du criblage aussi sont pratiquement conservés, sauf pour des alloantigènes ou xénoantigènes.

10

Ainsi, une deuxième forme de mise en œuvre de l'étape (b) du procédé de l'invention consiste à mettre en contact des cellules transfectées, par exemple des cellules IR983F ou Sp₂O sensibles au milieu HAT, exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt, préparées à l'étape (a), ou de leurs membranes, avec des cellules produisant des anticorps. Il est donc possible d'immortaliser un ou des lymphocytes B provenant de cette réponse immune et d'obtenir un criblage rapide et aisé des clones provenant de diverses techniques employées, à l'aide de fusion cellulaire classique selon Köhler et Milstein, mais aussi, à l'aide d'animaux transgéniques synthétisant, par exemple, des anticorps humains, et, en fait, à l'aide de tout système produisant des anticorps spécifiques à partir de lymphocytes B immatures ou mémoires, stimulé à l'aide d'antigène, dans une culture *in vivo* (par exemple par transfert de cellules humaines dans des animaux immunodéficients) ou *in vitro*. Dans le cas de lymphocytes B produisant déjà des anticorps spécifiques recherchés (lymphocytes B activés, préplasmocytes, plasmocytes, etc.), la méthode décrite, ci-après, conserve son intérêt au niveau du criblage des anticorps venant des cellules immortalisées.

30

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

11

Une troisième forme de mise en œuvre de l'étape (b) du procédé de l'invention comprend :

- l'isolement, à partir de cellules B produisant des anticorps contre le polypeptide d'intérêt, des séquences d'acide nucléique codant pour chacune des chaînes desdits anticorps,
- l'expression dans un hôte desdites séquences d'acide nucléique.

Le procédé de l'invention peut comprendre après l'étape (b), le test de la capacité des anticorps obtenus à reconnaître le polypeptide d'intérêt en mettant en contact lesdits anticorps avec :

- les cellules transfectées à l'étape (a), et/ou
- les cellules transfectées avec une construction d'acide nucléique identique à celle utilisée à l'étape (a) mais sans la séquence nucléique d'intérêt.

Le procédé selon l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'immortaliser de(s) cellule(s) d'un même organisme, par exemple, un même individu de l'espèce humaine qui pourrait avoir certains de ses lymphocytes B immortalisés par la technique très classique du virus d'Epstein-Barr et d'autres cellules récoltées dans une même prise de sang et conservées par congélation ou quelque temps après ou récoltées dans tout autre tissu permettant d'avoir des cellules du même individu en quantité suffisante. Outre des cellules immortelles, le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec des cellules à longue durée de vie, par exemple des fibroblastes.

En sélectionnant la lignée cellulaire et le système d'expression adapté, le procédé de l'invention permet de faire exprimer l'antigène dans des cellules ayant non seulement une histocompatibilité de classe I avec les

cellules à immuniser mais, de plus, de choisir des cellules exprimant des molécules d'histocompatibilité de classe II. Dans ce dernier cas, les cellules transfectées pourront présenter des épitopes T de l'antigène, s'il en possède, aux lymphocytes T CD4 du système d'immunisation.

5 Le procédé de l'invention est aussi remarquable en ce qu'il n'implique pas de connaître ni de préparer préalablement la séquence polypeptidique ou même la molécule entière sur laquelle les anticorps recherchés
10 doivent pouvoir se lier spécifiquement. En effet, lorsque l'antigène codé par la construction adéquate est présenté au système d'immunisation (animal ou préparation cellulaire adéquate), l'antigène seul est considéré comme étranger (le non-soi des manuels classiques d'immunologie) dans le
15 système *in vivo* ou *in vitro*, la grande majorité des anticorps seront pratiquement dirigés contre lui. Il existe des théories qui diffèrent sur le point de savoir si tous ou une partie des anticorps formés au cours d'une réponse
20 immune sont dirigés contre l'antigène introduit dans le système. Dans la pratique, une réponse immune est considérée comme spécifique quand la grande majorité des anticorps est dirigée contre l'antigène employé. Dans le
25 cas présent, des anticorps peuvent être dirigés contre des antigènes induits aussi par la construction d'acides nucléiques. Les inconvénients liés à ce problème peuvent être évités par l'obtention de cellules témoins adéquates, par une transfection adéquate, ayant tous les antigènes des
cellules transfectées sauf l'antigène en cours d'étude.

30 Le procédé selon l'invention est enfin remarquable en ce qu'il permet de simplifier considérablement l'étape du criblage des anticorps intéressants. Il suffit de comparer l'accrochement d'anticorps d'un surnageant de culture à tester sur les cellules de la lignée cellulaire d'origine ou de la lignée

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

13

transfectée par la même construction d'acides nucléiques à l'exception de ceux codant pour l'antigène, à celles de la lignée transfectée avec la construction d'acides nucléiques incorporant ceux codant pour l'antigène. Ce type de comparaison peut se faire à l'aide d'un type d'appareil appelé FACS pour "Fluorescent Antibody Cell Sorter". L'emploi d'un second anticorps marqué à la fluorescéine et choisi de manière adéquate pour pouvoir s'accrocher au premier, peut permettre une détection aisée du premier anticorps dont la présence est recherchée. Ce type de technique est d'usage courant dans les laboratoires spécialisés. Toute autre méthode donnant une différence entre les cellules témoins et les cellules transfectées pourrait être employée.

Le procédé selon l'invention trouve des applications dans tous les domaines nécessitant le développement d'anticorps monoclonaux ou même polyclonaux, qui pourraient être employés en recherche, pour le diagnostic ou la thérapeutique. D'un point de vue thérapeutique direct, le procédé de l'invention peut être utilisé pour l'immunisation de patients où le contrôle strict du devenir des cellules transfectées qui seraient inoculées au patient serait assuré. Ainsi, par exemple, le procédé de l'invention peut-être utilisé pour induire une réponse immune chez un patient en utilisant une lignée autologue transfectée et traitée de manière à empêcher sa division, ou bien en utilisant des fragments membranaires des cellules de ladite lignée.

L'invention concerne aussi une construction d'acide nucléique telle que définie précédemment susceptible d'être mise en œuvre dans le procédé de l'invention. L'invention concerne encore les cellules

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

14

obtenues à l'étape (a) du procédé de l'invention et les compositions les contenant, ou encore des compositions comprenant leurs membranes ainsi que les compositions comprenant un anticorps obtenu par le procédé de l'invention. L'invention concerne enfin une méthode de traitement ou de diagnostic appliqué sur un sujet consistant à mettre en œuvre le procédé de l'invention *in vivo* avec une séquence polynucléotidique codant une protéine d'intérêt thérapeutique ou diagnostique.

10

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatif de mise en œuvre du procédé de l'invention.

15

EXEMPLE I.

1) Méthode.

La lignée myélomateuse non sécrétante IR983 F, qui est histocompatible avec les rats LOU/C et leurs hybrides de première génération comme les rats LOU/C X OKAMOTO ou LOU/C X PVG/c, a été transfectée par électroporation à l'aide du plasmide pBJ LLI77 (Azuma M, Cayabyab M, Buck D Phillips JH and Lanier LL. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogenic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 175: 353-360. 1992).

Ce plasmide obtenu à l'ATCC (ATCC number 99595) code pour le CD80 humain sous le contrôle du promoteur SR α (Takabe Y, Seiki M, Fujisawa JF, Hoy P, Yokota K, Arai KI, Yoshida M and Arai N. SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat.

30

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

15

Mol. Cell.Biol. 8: 466-472. 1988). Ce plasmide présente également un gène de résistance à la néomycine.

Conditions d'électroporation : 5 millions de cellules dans 500 ul de milieu présentant le plasmide à la concentration de 10 ug/ml ont reçu une impulsion de 300 Volts.

Après sélection dans un milieu contenant de la néomycine (1 mg/ml), les transfectants ont été analysés par cytométrie de flux pour l'expression du CD80 humain à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD80 BB1 (Pharmingen). Le clone exprimant à sa surface le plus de CD80 humain a été développé.

Un rat LOU/C a reçu deux injections intrapéritonéales, espacées de deux mois, d'IR 983F CD80 positives (2×10^7 par injection), irradiées à 2,5 Gy à l'aide d'une source de Césium, émulsionnées dans l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et dans l'adjuvant de Freund incomplet pour la seconde. Deux semaines après la seconde immunisation, le sérum de l'animal immunisé présentait des anticorps reconnaissant l'IR983F exprimant le CD80 humain, mais ne reconnaissant pas l'IR983F normale.

Un rat LOU/C a également reçu deux injections intraplantaires, espacées de deux semaines, d'IR 983F CD80 positives (10^7 cellules par patte), irradiées par rayons du Césium à la dose de 2,5 Gy, émulsionnées dans l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et dans l'adjuvant de Freund incomplet pour la seconde. Quatre jours après la seconde immunisation, les ganglions poplités ont été prélevés et les cellules fusionnées avec l'IR983F.

Dix-sept hybridomes produisant un anticorps monoclonal reconnaissant l'IR983F exprimant le CD80 humain et ne reconnaissant pas l'IR983F non transfectée ont été

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

16

obtenus. Trois étaient d'isotype IgG1, 9 d'isotype IgG2a, 4 d'isotype IgG2b et un d'isotype IGM.

Ces anticorps reconnaissent aussi la lignée B humaine DAUDI qui exprime également le CD80.

5

2) Résultats.

La méthode décrite ci-dessus permet d'obtenir des anticorps dirigés uniquement contre une protéine membranaire. Pour généraliser cette méthode à toute protéine, un vecteur d'expression qui permet d'exprimer un polypeptide à la surface de l'IR983F a été préparé. Ce vecteur comprend respectivement de 5' vers 3':

- le promoteur Sra,
- la séquence leader du CD80 de souris,
- un site de clonage Sfi I/Not I permettant d'insérer le gène codant pour un polypeptide d'intérêt,
- une séquence nucléique codant pour une chaîne polypeptidique auxiliaire de liaison ayant pour motif : GGGSGGGSGGGGS, et
- la partie codante du CD80 de souris, exceptée sa séquence leader. Le vecteur dispose également du gène de résistance à la néomycine.

Après transfection d'IR983F avec ce vecteur et sélection dans un milieu contenant de la néomycine, les transfectants sont analysés par cytométrie de flux pour l'expression du CD80 de souris à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD80 de souris.

Les clones qui expriment le CD80 de souris expriment obligatoirement à leur surface la séquence polypeptidique suivante :

MEMBRANE-CD80souris-GGGSGGGSGGGGS-POLYPEPTIDE D'INTERET-NH2.

Après immunisation et fusion des cellules, les clones produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

17

le polypeptide d'intérêt sont détectés par cytométrie de flux en comparant leurs fixations sur des IR983F transfectées par le vecteur « vide » dans lequel la séquence d'intérêt n'a pas été clonée et qui n'exprime ainsi que le CD80 de souris, et des IR983F transfectées par le vecteur comportant la séquence d'intérêt clonée en fusion avec le CD80 de souris.

EXEMPLE II.

10

La séquence nucléique codant pour les 250 premiers acides aminés de l'antigène protecteur de *Bacillus anthracis* (Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. Welkos SL, Lowe JR, Eden-McCutchan F, Vodkin M, Lppla SH, Schmitt JJ. Gene. 69: 287. 1988) a été clonée dans le vecteur d'expression décrit ci-dessus après restriction SfiI/NotI .

Des IR983F ont été transfectées, soit avec le vecteur d'expression "vide", soit avec le vecteur d'expression comprenant le gène de *Bacillus anthracis*.

Après sélection dans un milieu contenant de la néomycine (1 mg/ml), des transfectants exprimant le CD80 de souris, détectés par cytométrie de flux à l'aide l'anticorps monoclonal MCA 1586F (Serotec) ont été obtenus.

Les clones exprimant à sa surface le plus de CD80 de souris ont été développés.

Ces transfectants ont été ensuite utilisés pour l'immunisation des animaux.

30

Par exemple, un rat LOU/C a reçu deux injections intraplantaires, espacées de deux semaines, d'IR983F-CD80 positives transfectées par le vecteur d'expression comportant le gène de *Bacillus anthracis* (10^7

cellules par patte), émulsionnées dans de l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et dans de l'adjuvant de Freund incomplet pour la seconde. Quatre jours après la seconde immunisation, les ganglions poplités
5 ont été prélevés et les cellules fusionnées avec l'IR983F.

Des hybridomes produisant un anticorps monoclonal reconnaissant des IR983F-CD80 positives transfectées par le vecteur comportant le gène de *Bacillus anthracis*, mais ne reconnaissant pas des IR983F-CD80
10 positives uniquement transfectées par le vecteur " vide " ont été obtenus.

EXEMPLE III.

15

1) Méthode.

La lignée myélomateuse non sécrétante IR983F, a été transfectée par électroporation à l'aide du plasmide pBJ CD94. Ce plasmide a été construit en remplaçant le gène
20 du CD28 cloné dans le plasmide PBJ LL177. Ce plasmide présente également un gène de résistance à la néomycine.

Conditions d'électroporation : 5 millions de cellules dans 500 ul de milieu présentant le plasmide à la concentration de 10 ug/ml ont reçu une impulsion de 300
25 Volts.

Après sélection dans un milieu contenant de la néomycine (1 mg/ml), les transfectants ont été analysés par cytométrie de flux pour l'expression du CD94 humain à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD94 HP-3D9
30 (Pharmingen). Le clone exprimant à sa surface le plus de CD94 humain a été développé.

Un rat LOU/C a reçu deux injections intrapéritonéales, espacées de deux mois, d'IR 983F CD94 positives (2×10^7 par injection), irradiées à 2,5 Gy à

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

19

l'aide d'une source de Césium, émulsionnées dans l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et dans l'adjuvant de Freund incomplet pour la seconde. Deux semaines après la seconde immunisation, le sérum de l'animal immunisé présentait des anticorps reconnaissant l'IR983F exprimant le CD94 humain, mais ne reconnaissant pas l'IR983F normale.

Un rat LOU/C a également reçu deux injections intraplantaires, espacées de deux semaines, d'IR 983F CD94 positives (10^7 cellules par patte), irradiées par rayons du Césium à la dose de 2,5 Gy, émulsionnées dans l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et dans l'adjuvant de Freund incomplet pour la seconde. Quatre jours après la seconde immunisation, les ganglions poplités ont été prélevés et les cellules fusionnées avec l'IR983F ou l'IR983F exprimant le CD94 humain.

Huit hybridomes produisant un anticorps monoclonal anti-CD94 humain et ne reconnaissant pas l'IR983F non transfectée ont été obtenus en fusionnant 26 millions de cellules ganglionnaires avec l'IR983F. Dix-sept hybridomes produisant un anticorps anti-CD94 humain ont été obtenus en fusionnant 20 millions de cellules ganglionnaires avec l'IR983F exprimant le CD94 humain.

Tous les anticorps reconnaissent à la fois l'IR983F CD94 et les NK humains qui expriment le CD94.

Les isotypes de ces clones sont : 3 IgM, IgG1, 15 IgG2a, 5 IgG2b, 1 IgG2c.

Cette expérience a été répétée en utilisant comme lignée d'immunisation, l'IR983F exprimant le CD134 ligand humain. Quatre hybridomes produisant un anticorps anti-CD134L ont été obtenus en fusionnant 30 millions de cellules ganglionnaires avec l'IR983F. Dix hybridomes produisant un anticorps anti-CD134L ont été obtenus en

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

20

fusionnant 30 millions de cellules exprimant le CD134L humain. Tous les anticorps reconnaissent à la fois l'IR 983F CD134L et les lymphocytes B humains qui expriment le CD134L.

5

EXEMPLE IV

Des membranes d'IR983F sont obtenues, par exemple par une homogénéisation de Dounze, (Koizumi K, Shimizu KT, Nishida K, Sato C, Ota K, Yamamada N. Biochim-Biophys. Acta, 649 :393-403, 1981).

Un rat LOU/C a reçu trois injections sous-cutanées, espacées de deux jours, de membranes correspondant à 40 millions de cellules IR983F exprimant le CD70 humain.

Dix jours après la première injection, des anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement les cellules IR983F exprimant le CD70 humain ont été mises en évidence, par cytométrie de flux, dans le sérum de l'animal immunisé.

20

EXEMPLE V

Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec des cellules SP₂/O en tant que lignée cellulaire susceptible d'être transfectée à l'étape (a) du procédé.

Cet exemple de mise en œuvre particulière est décrit ci-dessous.

30

Matériel

Milieu RPMI complet

- un flacon de 500 ml de RPMI
- 5 ml de L-glutamine
- 500 µl de gentamicine (à 50 mg/ml)

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

21

Milieu d'électroporation (qsp 300 ml, eau distillée stérile)

- 5
- 0,3 M inositol (16,2 g)
 - + 1 mM KH₂PO₄ (40,82 mg)
 - + 0,1 mM acétate de calcium (4,74 mg)
 - + 0,5 mM acétate de magnésium (32,17 mg).

Milieu post-électroporation (qsp 300 ml, eau distillée stérile).

- 10
- 132 mM NaCl (2,31g)
 - + 8 mM KCl (178,9g)
 - + 10 mM KH₂PO₄ (408 mg)
 - + 0,1 mM acétate de calcium (4,74 g)
 - 15 + 0,5 mM acétate de magnésium (32,17 g)

Méthode

- On effectue un comptage des cellules SP₂/O à partir de flacons de culture.
- 20 - On prélève 1.10⁷ cellules.
- On centrifuge les cellules prélevées durant 5 minutes à 1300 rpm.
- On remet en suspension le culot dans un millilitre de tampon d'électroporation à 37°C.
- 25 - On ajoute 10 µg de plasmide CD40L (Le plasmide PBJ-CD40L a été construit en remplaçant le gène du CD28 cloné dans le plasmide PBJ LL177 par celui du CD40L initialement cloné dans le BCMGSneo-TRAP (Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T-cells. Eur.J.Immunol. 22 :3191-3194. 1992) ou de plasmide CD94 selon le cas.
- 30 - On homogénéise la suspension obtenue par aspiration refoulement
- On prélève 400 µl de la suspension

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

22

- On soumet la suspension cellulaire en présence du plasmide à une électroporation dans des cuvettes coniques de 400 μ l, dans les conditions suivantes : 350 V, 5 ms, une impulsion.

5 - On ajoute un millilitre de milieu post électroporation à 37°C dans la cuvette.

- On incube la suspension durant 10 minutes à température ambiante.

10 - On prélève le contenu de la cuvette et on remet en suspension les cellules dans 18,5 ml de milieu RPMI complet sans rouge de phénol (Invitrogen).

Ensuite les cellules sont réparties à raison de 200 μ l par puits dans une plaque de culture 96 puits

15 Elles sont incubées durant 24 h à 37°C sous atmosphère 5%CO₂,

Le changement du milieu de culture est effectué par ajout de 150 μ l par puits de milieu RPMI complet (Invitrogen) contenant 0,5 mg/ml de généticine (Invitrogen).

20 Les cellules sont à nouveau incubées à 37°C sous atmosphère à 5% CO₂ .

On laisse développer des cellules transfectées par le plasmide (résistantes à la généticine)

25 On analyse au FACS des cellules transfectées par le plasmide afin de détecter l'expression membranaire du CD40L ou du CD94 selon le cas.

Résultats

30 A la suite des expériences réalisées selon la méthode décrite ci-dessus, il a été obtenu :

- Un clone SP₂/O transfecté exprimant le CD40L (SP20-CD40L)

- Trois clones SP₂/O exprimant le CD94 (SP₂/O-CD94-F4, SP₂/O-CD94-F1 et SP₂/O-CD94-D2).

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'anticorps
5 comprenant les étapes suivantes :

- a) la transfection d'une lignée cellulaire par une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt à exprimer à la surface des cellules de ladite lignée,
10 b) la préparation d'anticorps dirigés contre le polypeptide d'intérêt avec les cellules préparées à l'étape (a) ou avec leurs membranes.

2. Procédé selon la revendication 1,
15 caractérisé en ce que la lignée cellulaire transfectée à l'étape (a) est une lignée du système immunitaire et de préférence une lignée lymphoïde.

3. Procédé selon l'une quelconque des
20 revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la préparation d'anticorps à l'étape (b) est réalisée à partir de cellules B obtenues :

(i) par immunisation d'un animal avec des
25 cellules transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou avec leurs membranes,

(ii) par mise en contact des cellules
transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou de leurs membranes
30 avec des populations cellulaires comprenant des cellules susceptibles de produire des anticorps.

4. Procédé selon la revendication 3,
caractérisé en ce que la lignée cellulaire transfectée à

l'étape (a) est histocompatible avec l'animal immunisé en (i) ou les cellules mises en œuvre en (ii).

5 Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à l'étape (a), la transfection d'une lignée cellulaire est effectuée avec une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt codant pour une protéine d'intérêt membranaire.

10

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence nucléique d'intérêt est placée sous le contrôle de séquences de régulation qui permettent l'expression élevée du polypeptide d'intérêt et son exportation vers la surface des cellules transfectées.

15

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à l'étape (a), la transfection d'une lignée cellulaire est effectuée avec une construction d'acide nucléique comprenant dans un même cadre de lecture une séquence nucléique codant pour une protéine membranaire et une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt.

20

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire et la séquence nucléique d'intérêt sont placées ensemble sous le contrôle de séquences de régulation qui permettent l'expression élevée du polypeptide d'intérêt et son exportation vers la surface des cellules transfectées.

25

30

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la séquence nucléique d'intérêt

est placée avant, après ou dans la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire.

10 Procédé selon l'une des revendications 7 à
5 9, caractérisé en ce que la séquence nucléique codant pour une protéine membranaire et la séquence nucléique codant pour un polypeptide d'intérêt sont reliées par une ou plusieurs séquences nucléiques de liaison identiques ou différentes.

10

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'une des séquences nucléiques de liaison code pour un polypeptide participant à la réponse immune.

15

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la construction d'acide nucléique mise en œuvre pour transférer la lignée cellulaire de l'étape (a) comprend un gène de sélection par exemple un gène de résistance à un antibiotique.

20

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la construction d'acide nucléique mise en œuvre pour transférer la lignée cellulaire de l'étape (a) est un vecteur nucléique adapté aux cellules de la lignée transfectée à l'étape (a).

25

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ladite lignée cellulaire transfectée est autologue, isologue ou homologue avec les cellules mises en œuvre en (i) ou (ii) pour la préparation des anticorps.

30

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'après transfection de la lignée cellulaire, les transfectants sont analysés pour l'expression de la protéine de membrane ou du polypeptide d'intérêt.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) on prépare des anticorps monoclonaux par une technique de fusion cellulaire à partir de cellules d'un animal ayant reçu des cellules transfectées exprimant à leur surface le polypeptide d'intérêt préparées à l'étape (a) ou leurs membranes.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'étape (b) comprend :

- l'isolement, à partir de cellules B produisant des anticorps contre le polypeptide d'intérêt, des séquences d'acide nucléique codant pour chacune des chaînes desdits anticorps,
- l'expression dans un hôte desdites séquences d'acide nucléique.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'après l'étape (b), on teste la capacité des anticorps obtenus à reconnaître le polypeptide d'intérêt en mettant en contact lesdits anticorps avec :

- les cellules de la lignée transfectée à l'étape (a), et/ou
- les cellules de la lignée transfectée avec une construction d'acide nucléique identique à celle

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

27

utilisée à l'étape (a) mais sans la séquence nucléique
d'intérêt.

WO 02/081523

PCT/FR02/01164

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> TECHNOPHARM
<120> PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET DE SÉLECTION D'ANTICORPS
<130> 11379PCT
<140> PCT/FR01/xxxxxxx
<141> 2002-04-03
<150> FR01/04525
<151> 2001-04-03

<160> 1
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Exemple de chaîne de liaison pour éviter des interactions entre la
protéine membranaire auxiliaire et le polypeptide d'intérêt.

<400> 1
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
17 octobre 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/081523 A3(51) Classification internationale des brevets* :
C07K 16/28, 16/00, C12N 5/10(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01164

(22) Date de dépôt international : 3 avril 2002 (03.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/04525 3 avril 2001 (03.04.2001) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BI, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NI, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
TECHNOPHARM [FR/FR], 25, boulevard
Saint-Jacques, F-75014 Paris (FR).(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BAZIN,
Hervé [FR/FR], 4, rue des Ecoles, F-92330 Sceaux (FR),
NIZET, Yannick [FR/FR], Rue Bénédicte, 37, B-4287
Lincel Racour (BE).(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; 3, avenue de
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).Publiée :
avec rapport de recherche internationale
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 3 avril 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING AND SELECTING ANTIBODIES

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET DE SÉLECTION D'ANTICORPS

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing antibodies comprising the following steps: a) transfecting a cell line with a nucleic acid construct comprising a nucleic sequence of interest coding for a polypeptide of interest to be expressed at the surface of the cells of said line; b) preparing antibodies directed against the polypeptide of interest with the cells prepared at step a) or their membranes.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'anticorps comprenant les étapes suivantes : a) la transfection d'une lignée cellulaire par une construction d'acide nucléique comprenant une séquence nucléique d'intérêt codant pour un polypeptide d'intérêt à exprimer à la surface des cellules de ladite lignée, b) la préparation d'anticorps dirigés contre le polypeptide d'intérêt avec les cellules préparées à l'étape (a) ou de leurs membranes.

WO 02/081523 A3

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/FR 02/01164 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 C07K16/00 C12N5/10 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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 practical, search terms used) EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5 776 775 A (TEDDER THOMAS F ET AL) 7 July 1998 (1998-07-07) column 4, line 10-46 | 1-18 |
| X | BORREBAECK C A K ET AL: "Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 85, no. 11, June 1988 (1988-06), pages 3995-3999, XP002176306 ISSN: 0027-8424 the whole document | 1-18 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *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 principles 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 *Z* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 16 January 2003 | 23/01/2003 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentstrasse 2 NL - 2280, 97 Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016 | Authorized officer Le Flao, K | |

Form PCT/ISA210 (second sheet) July 1992

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/FR 02/01164 |
|--|---|--|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BOER DE M ET AL: "GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN LYMPHOCYTE CELL SURFACE ANTIGENS USING INSECT CELLS EXPRESSING RECOMBINANT PROTEINS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 152, 31 July 1992 (1992-07-31), pages 15-23, XP001005278 ISSN: 0022-1759 the whole document | 1-3, 5-13, 15-18 |
| A | EP 0 733 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 25 September 1996 (1996-09-25) page 3, line 53 - line 58 | 1-18 |
| A | HADDAD D ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF DNA-BASED IMMUNIZATION VECTORS: EFFECT OF SECRETION SIGNALS ON THE ANTIBODY RESPONSES IN MICE" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 18, no. 3, 1997, pages 193-202, XP001042389 ISSN: 0928-8244 the whole document | 1-18 |
| A | RITS M ET AL: "RAT MONOCLONAL ANTIBODIES VI. PRODUCTION OF IGA SECRETING HYBRIDOMAS WITH SPECIFICITY FOR THE 2,4-DINITROPHENYL (DNP) HAPTEN" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 89, no. 1, 1 May 1986 (1986-05-01), pages 81-87, XP001074181 ISSN: 0022-1759 the whole document | 1-18 |

Form PCT/ISU/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International Application No.
 PCT/FR 02/01164

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | | | |
|--|------------------|-------------------------|----------------------------|---|------------|--------------------------|
| US 5776775 | A | 07-07-1998 | US 5776707 A 07-07-1998 | | | |
| | | | US 5679346 A 21-10-1997 | | | |
| | | | AT 224444 T 15-10-2002 | | | |
| | | | AU 2305192 A 25-01-1993 | | | |
| | | | CA 2112408 A1 07-01-1993 | | | |
| | | | CA 2336561 A1 07-01-1993 | | | |
| | | | DE 69232780 D1 24-10-2002 | | | |
| | | | EP 0592582 A1 20-04-1994 | | | |
| | | | JP 6508991 T 13-10-1994 | | | |
| | | | NO 9300111 A1 07-01-1993 | | | |
| | | | AT 152171 T 15-05-1997 | | | |
| | | | CA 2010321 A1 21-08-1990 | | | |
| | | | DE 69030522 D1 28-05-1997 | | | |
| | | | DE 69030522 T2 04-12-1997 | | | |
| | | | DK 386906 T3 13-10-1997 | | | |
| | | | EP 0386906 A1 12-09-1990 | | | |
| | | | EP 0770680 A2 02-05-1997 | | | |
| | | | ES 2102360 T3 01-08-1997 | | | |
| | | | GR 3024204 T3 31-10-1997 | | | |
| | | | HK 1007331 A1 09-04-1999 | | | |
| | | | JP 3022982 A 31-01-1991 | | | |
| | | | JP 2001017189 A 23-01-2001 | | | |
| | | | SG 43062 A1 17-10-1997 | | | |
| | | | US 6020152 A 01-02-2000 | | | |
| | | | US 6451981 B1 17-09-2002 | | | |
| | | | US 5830471 A 03-11-1998 | | | |
| | | | US 5834425 A 10-11-1998 | | | |
| | | | US 5595737 A 21-01-1997 | | | |
| | | | US 5389520 A 14-02-1995 | | | |
| | | | EP 0733373 | A | 25-09-1996 | CA 2172436 A1 24-09-1996 |
| | | | | | | EP 0733373 A2 25-09-1996 |
| | | | | | | JP 9012479 A 14-01-1997 |

| RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE | | Demande internationale No PCT/FR 02/01164 |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K16/28 C07K16/00 C12N5/10 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K | | |
| Documentation consultée outre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, formes de recherche utilisées) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | US 5 776 775 A (TEDDER THOMAS F ET AL) 7 juillet 1998 (1998-07-07) colonne 4, ligne 10-46 --- | 1-18 |
| X | BORREBAECK C A K ET AL: "Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 85, no. 11, juin 1988 (1988-06), pages 3995-3999, XP002176306 ISSN: 0027-8424 le document en entier --- -/-- | 1-18 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe | | |
| * Catégories spéciales de documents cités | | |
| *A* document décrivant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *I* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (voir les notes) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date en priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention. *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale | |
| 16 janvier 2003 | 23/01/2003 | |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.R. 5816 Patentlaan 7 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 840-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 840-3016 | Fonctionnaire autorisé Le Flao, K | |

Form: J4 le PCT/ISA/210 (deuxième édition) juillet 1992)

| RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE | | Demande internationale No PCT/FR 02/01164 |
|---|---|--|
| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | BOER DE M ET AL: "GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN LYMPHOCYTE CELL SURFACE ANTIGENS USING INSECT CELLS EXPRESSING RECOMBINANT PROTEINS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 152, 31 juillet 1992 (1992-07-31), pages 15-23, XP001005278 ISSN: 0022-1759 le document en entier ---- | 1-3, 5-13, 15-18 |
| A | EP 0 733 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 25 septembre 1996 (1996-09-25) page 3, ligne 53 - ligne 58 ---- | 1-18 |
| A | HADDAD D ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF DNA-BASED IMMUNIZATION VECTORS: EFFECT OF SECRETION SIGNALS ON THE ANTIBODY RESPONSES IN MICE" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 18, no. 3, 1997, pages 193-202, XP001042389 ISSN: 0928-8244 le document en entier ---- | 1-18 |
| A | RITS M ET AL: "RAT MONOCLONAL ANTIBODIES VI. PRODUCTION OF IGA SECRETING HYBRIDOMAS WITH SPECIFICITY FOR THE 2,4-DINITROPHENYL (DNP) HAPTEN" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 89, no. 1, 1 mai 1986 (1986-05-01), pages 81-87, XP001074181 ISSN: 0022-1759 le document en entier ----- | 1-18 |

Formulaire PCT/ISA210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 02/01164

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevets(s) | Date de publication |
|---|------------|------------------------|--|------------------------|
| US 5776775 | A | 07-07-1998 | US 5776707 A | 07-07-1998 |
| | | | US 5679346 A | 21-10-1997 |
| | | | AT 224444 T | 15-10-2002 |
| | | | AU 2305192 A | 25-01-1993 |
| | | | CA 2112408 A1 | 07-01-1993 |
| | | | CA 2336561 A1 | 07-01-1993 |
| | | | DE 69232780 D1 | 24-10-2002 |
| | | | EP 0592582 A1 | 20-04-1994 |
| | | | JP 6508991 T | 13-10-1994 |
| | | | WO 9300111 A1 | 07-01-1993 |
| | | | AT 152171 T | 15-05-1997 |
| | | | CA 2010321 A1 | 21-08-1990 |
| | | | DE 69030522 D1 | 28-05-1997 |
| | | | DE 69030522 T2 | 04-12-1997 |
| | | | DK 386906 T3 | 13-10-1997 |
| | | | EP 0386906 A1 | 12-09-1990 |
| | | | EP 0770680 A2 | 02-05-1997 |
| | | | ES 2102360 T3 | 01-08-1997 |
| | | | GR 3024204 T3 | 31-10-1997 |
| | | | HK 1007331 A1 | 09-04-1999 |
| | | | JP 3022982 A | 31-01-1991 |
| | | | JP 2001017189 A | 23-01-2001 |
| | | | SG 43062 A1 | 17-10-1997 |
| | | | US 6020152 A | 01-02-2000 |
| | | | US 6451981 B1 | 17-09-2002 |
| | | | US 5830471 A | 03-11-1998 |
| | | | US 5834425 A | 10-11-1998 |
| US 5595737 A | 21-01-1997 | | | |
| US 5389520 A | 14-02-1995 | | | |
| EP 0733373 | A | 25-09-1996 | CA 2172436 A1 | 24-09-1996 |
| | | | EP 0733373 A2 | 25-09-1996 |
| | | | JP 9012479 A | 14-01-1997 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| C 1 2 N 15/02 | C 1 2 N 5/00 | A |
| G 0 1 N 33/53 | C 1 2 N 15/00 | C |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヤニック ニゼット

ベルギー国、リンセント ラコール ビー - 4 2 8 7、3 7、リュ ベネディケイル

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
 GA01 GA11 HA08 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA25 CA46

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 制备和选择抗体的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004535168A | 公开(公告)日 | 2004-11-25 |
| 申请号 | JP2002579908 | 申请日 | 2002-04-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | TECHNO农场 TECHNOPHARM | | |
| 申请(专利权)人(译) | TECHNO农场 | | |
| [标]发明人 | エルヴェバザン ヤニックニゼット | | |
| 发明人 | エルヴェ バザン ヤニック ニゼット | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 | | |
| CPC分类号 | C07K16/2827 A61K2039/505 C07K2319/02 | | |
| FI分类号 | C12P21/08.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D C12N5/00.A C12N15/00.C | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 | | |
| 代理人(译) | 大西省吾 山口 修之 | | |
| 优先权 | 2001004525 2001-04-03 FR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及的抗体制备方法，包括以下步骤：a) 在那里的细胞系的细胞表面上表达的核酸构建体，其细胞系包含编码感兴趣多肽的感兴趣核酸序列B) 使用步骤(a)中制备的细胞或其膜制备针对目标多肽的抗体。

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

| | | |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | FI | テーマコード (参考) |
| C12P 21/08 | C12P 21/08 ZNA | 4B024 |
| C12N 1/15 | C12N 1/15 | 4B064 |
| C12N 1/19 | C12N 1/19 | 4B065 |
| C12N 1/21 | C12N 1/21 | |
| C12N 5/10 | G01N 33/53 D | |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続 | |
| (21) 出願番号 | 特願2002-579908 (P2002-579908) | (71) 出願人 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年4月3日 (2002.4.3) | テクノファーム |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年10月3日 (2003.10.3) | TECHNOPHARM |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FR2002/001164 | フランス国、パリ エフ-75014、ラ |
| (87) 国際公開番号 | W02002/081523 | ールヴァール サン-ジャックエス、25 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年10月17日 (2002.10.17) | 25, boulevard Saint- |
| (31) 優先権主張番号 | 01/04525 | Jacques, F-75014 Par |
| (32) 優先日 | 平成13年4月3日 (2001.4.3) | is, France |
| (33) 優先権主張国 | フランス (FR) | (74) 代理人 |
| | | 100082887 |
| | | 弁理士 大西 正悟 |
| | | (74) 代理人 |
| | | 100115200 |
| | | 弁理士 山口 修之 |
| | | (72) 発明者 |
| | | エルヴェ バザン |
| | | フランス国、ソー エフ-92330、リ |
| | | ュザ エコルス、4 |
| | | 最終頁に続く |