

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6604989号
(P6604989)

(45) 発行日 令和1年11月13日(2019.11.13)

(24) 登録日 令和1年10月25日(2019.10.25)

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 Z N A Z |
| C O 7 K 16/18 (2006.01) | C O 7 K 16/18 |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 Y |
| G O 1 N 33/543 (2006.01) | G O 1 N 33/543 5 9 7 |

請求項の数 6 外国語出願 (全 43 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------------|----------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2017-90650 (P2017-90650) | (73) 特許権者 | 502233344 |
| (22) 出願日 | 平成29年4月28日 (2017.4.28) | | エスパテック - アノバルティス カンパニー エルエルシー |
| (62) 分割の表示 | 特願2015-101581 (P2015-101581) の分割 | | スイス国 4056 バーゼル, リヒトシュトラーセ 35, ノバルティス ファーマ アーゲー 気付 |
| 原出願日 | 平成22年2月22日 (2010.2.22) | (74) 代理人 | 100078282 |
| (65) 公開番号 | 特開2017-192384 (P2017-192384A) | | 弁理士 山本 秀策 |
| (43) 公開日 | 平成29年10月26日 (2017.10.26) | (74) 代理人 | 100113413 |
| 審査請求日 | 平成29年4月28日 (2017.4.28) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/155,041 | (72) 発明者 | バレリー ハルマン-コティエー |
| (32) 優先日 | 平成21年2月24日 (2009.2.24) | | スイス国 ツューハー-8048 チューリッヒ, サウマッケルシュトラーセ 35 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/155,105 | | |
| (32) 優先日 | 平成21年2月24日 (2009.2.24) | | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 細胞表面抗原のイムノバインダーを同定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的の抗原に結合し得るヒト化イムノバインダーを生成する方法であって、以下：

- (i) 目的の抗原に特異的に結合するイムノバインダーを同定する工程であって、
 - (a) 非ヒト動物由来の複数のB細胞を提供する工程；
 - (b) 該複数のB細胞と、第1のソート可能な標識を含む該目的の抗原とを接触させ、かつ、該複数のB細胞を、第2のソート可能な標識を含む抗IgG抗体および第3のソート可能な標識を含む抗IgM抗体で染色する工程；ならびに
 - (c) セルソーターを使用して、該複数のB細胞から、該目的の抗原に特異的に結合し得る1個以上のB細胞を分離する工程であって、複合体において、該第1および第2のソート可能な標識が存在するが、該第3のソート可能な標識が存在しないことは、目的の抗原へのB細胞の結合を示し、それによって、該目的の抗原に特異的に結合する重鎖および軽鎖のCDRを有するイムノバインダーを同定する、工程を含む、工程と；

- (ii) 工程(c)の該イムノバインダー由来の重鎖CDRを、配列番号4の可変重鎖フレームワークに導入する工程であって、該可変重鎖フレームワークが、24位のスレオニン(T)、25位のバリン(V)、56位のグリシンもしくはアラニン(G/A)、82位のリジン(K)、84位のスレオニン(T)、89位のバリン(V)および108位のアルギニン(R)(AHOの番号付け)からなる群より選択される1個以上のアミノ酸残基を有する、工程と；

(i i i) 工程 (c) の該イムノバインダー由来の軽鎖 C D R を、 3 個の軽鎖 C D R と軽鎖フレームワーク配列を含む可変軽鎖に導入する工程とを含む、方法。

【請求項 2】

前記ヒト化イムノバインダーが、全長免疫グロブリン、F a b または s c F v である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ソート可能な標識が蛍光標識である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記目的の抗原が可溶性抗原である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記 B 細胞がウサギ由来の B 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ウサギが目的の抗原で免疫化された、請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(背景情報)

抗体、その結合体および誘導体を包含するイムノバインダー (i m m u n o b i n d e r) は、治療剤および診断剤として、非常に産業的に重要である。抗体調製もしくはスクリーニングのための伝統的な方法は、通常は、可溶性の抗原を利用する。しかし、特定の膜結合タンパク質抗原について、上記抗原上のコンフォメーションエピトープ (c o n f o r m a t i o n a l e p i t o p e) は、上記抗原が、上記膜から可溶化される場合に改変され、抗体調製もしくはスクリーニングの失敗を生じる。さらに、イムノプロットティング法およびアフィニティークロマトグラフィー法における 1 つの重要な問題は、上記抗原に対して中程度のアフィニティーを有する抗体が選択されることである。このことは、多くの交叉反応性もしくは粘着性の抗体の包含を許容してしまい、連続したスクリーニング手順において負担を引き起こす。膜結合抗原を発現する細胞は、抗体調製に直接使用されてきたが、細胞表面抗原に対する高アフィニティー抗体を検出しかつ富化し得る効率的なスクリーニング方法はなお、不足している。

20

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

(発明の要旨)

本発明は、細胞表面抗原に特異的に結合し得るイムノバインダー (例えば、s c F v 抗体) を同定するための方法を提供する。本発明の方法は、一般に、標識された抗原発現細胞と、標識されたイムノバインダー発現細胞とを接触させる工程および上記抗原発現細胞に結合するイムノバインダー発現細胞を、セルソーターを使用して単離する工程を包含する。これら方法は、内在性膜タンパク質 (例えば、G P C R) に存在するコンフォメーションエピトープに対するイムノバインダーの迅速かつ効率的な同定のために特に有用である。本発明はまた、本発明の方法を使用して同定された、単離されたイムノバインダーおよびイムノバインダーをコードする核酸を提供する。

40

【0003】

一局面において、本発明は、目的の細胞表面抗原に特異的に結合するイムノバインダーを同定するための方法を提供する。上記方法は、第 1 のソート可能 (s o r t a b l e) な標識に作動可能に連結した複数のイムノバインダー発現細胞を提供する工程；第 2 のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで上記目的の抗原は、上記抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；上記抗原発現細胞と、上記イムノバインダー発現細胞とを接触させる工程；および上記複数のイムノバインダー発現細胞から、上記抗原発現細胞に特異的に結合し得る 1 個以上のイムノバイ

50

ンダー発現細胞を、セルソーター（例えば、蛍光細胞分析分離装置）を使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体（例えば、抗原と、B細胞レセプターとの間で形成される複合体）における上記第1のおよび第2のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞へのイムノバインダー発現細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合するイムノバインダーを同定する、工程を包含する。

【0004】

いくつかの実施形態において、上記分離されたイムノバインダー発現細胞は、クローン的に単離される。いくつかの実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、クローン性増殖に供される。他の実施形態において、上記イムノバインダーをコードする核酸配列は、イムノバインダー発現細胞から単離される。上記イムノバインダーをコードする核酸配列を単離するのに適した方法としては、PCR（例えば、単一細胞PCR（single-cell PCR））が挙げられる。上記イムノバインダーをコードする核酸配列は、上記細胞がクローン的に単離された後および/もしくはクローン性増殖の後に、単離され得る。

10

【0005】

いくつかの実施形態において、本発明の方法を使用して単離されたイムノバインダー発現細胞は、上記イムノバインダーを機能的に特徴付けるために、細胞ベースのアッセイに供される。適切な細胞ベースのアッセイとしては、CELISAが挙げられる。

【0006】

いくつかの実施形態において、上記イムノバインダーは抗体である。このような抗体としては、マウス抗体、ウサギ抗体、ウサギ化抗体、ニワトリ抗体、ラクダ抗体、ラクダ化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体が挙げられる。適切な抗体形式としては、Fab、Dab、ナノボディーおよびscFvが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0007】

いくつかの実施形態において、上記目的の抗原は、外因性遺伝子から発現される。他の実施形態において、上記目的の抗原は、遺伝的に操作された抗原である。他の実施形態において、上記目的の抗原は、内在性膜タンパク質である。適切な内在性膜タンパク質としては、GPCR（例えば、CXCR2）もしくはイオンチャネルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0008】

いくつかの実施形態において、上記第1のもしくは第2のソート可能な標識は、蛍光標識である。適切な蛍光標識としては、蛍光タンパク質、抗体/蛍光体結合体（fluor conjugate）および蛍光性細胞標識が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0009】

いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）である。いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、外因性抗原を発現する。いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、発現ベクターでトランスフェクトされる。

【0010】

いくつかの実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞である。適切な哺乳動物細胞としては、B細胞（例えば、ウサギB細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記B細胞は、免疫化した動物（例えば、DNAワクチン接種によって免疫化した動物）から単離される。いくつかの実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、発現ベクターから発現されるイムノバインダーを含む。

40

【0011】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって同定されたイムノバインダーをコードする単離された核酸分子を提供する。

【0012】

別の局面において、本発明は、目的の抗原に結合し得るイムノバインダーを産生するた

50

めの方法を提供し、上記方法は、本発明の方法によって同定されたイムノバインダーをコードする核酸配列を、上記コードされたイムノバインダーが産生されるように、発現環境に導入する工程を包含する。

【 0 0 1 3 】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって産生されたイムノバインダーを提供する。

【 0 0 1 4 】

別の局面において、本発明はまた、目的の細胞表面抗原に特異的に結合するB細胞クローンを同定するための方法を提供し、上記方法は、動物を、細胞表面抗原をコードするDNAで免疫化する工程；上記免疫化した動物からB細胞を単離する工程；上記B細胞を、第1のソート可能な標識で標識する工程；第2のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで上記目的の抗原は、上記抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；上記抗原発現細胞と、上記B細胞とを接触させる工程；および上記複数のB細胞から、上記抗原発現細胞に特異的に結合し得る1個以上のB細胞を、セルソーターを使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体における上記第1のおよび第2のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞へのB細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合するB細胞クローンを同定する、工程を包含する。

本発明の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

目的の細胞表面抗原に特異的に結合するイムノバインダーを同定するための方法であって、該方法は、

(a) 第1のソート可能な標識に作動可能に連結された複数のイムノバインダー発現細胞を提供する工程；

(b) 第2のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで該目的の抗原は、該抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；

(c) 該抗原発現細胞と、該イムノバインダー発現細胞とを接触させる工程；および

(d) 該複数のイムノバインダー発現細胞から、該抗原発現細胞に特異的に結合し得る1個以上のイムノバインダー発現細胞を、セルソーターを使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体における該第1のソート可能な標識および該第2のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞へのイムノバインダー発現細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合するイムノバインダーを同定する、工程、を包含する、方法。

(項目2)

前記工程(d)において得られたイムノバインダー発現細胞をクローン的に単離し、必要に応じて、続いて、該クローン的に単離された細胞のクローン性増殖を行う工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記イムノバインダーをコードする核酸配列を、前記単離されたイムノバインダー発現細胞から得る工程をさらに包含する、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記イムノバインダーをコードする核酸配列は、PCRによって得られる、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記PCRは、単一細胞PCRである、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記単離されたイムノバインダー発現細胞を、細胞ベースのアッセイに供して、前記イムノバインダーを機能的に特徴付ける工程をさらに包含する、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記細胞ベースのアッセイが、C E L I S Aである、項目6に記載の方法。

(項目8)

細胞複合体が、抗原と、B細胞レセプターとの間に形成される、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記イムノバインダーは抗体である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記抗体は、マウス抗体、ウサギ抗体、ニワトリ抗体、ラクダ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体からなる群より選択される、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記抗体は、全長免疫グロブリン、F a b、D a bおよびナノボディーからなる群より選択される、項目9に記載の方法。

10

(項目12)

前記抗体は、s c F vである、項目9に記載の方法。

(項目13)

前記目的の抗原は、外因性遺伝子から発現される、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記目的の抗原は、遺伝的に操作された抗原である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目15)

20

前記目的の抗原は、内在性膜タンパク質である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目16)

前記内在性膜タンパク質は、G P C Rである、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記G P C Rは、C X C R 2、C X C R 1、C X C R 3、C X C R 4、C X C R 6、C C R 1、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 5、C C R 6、C C R 8、C F T R、C I C - 1、C I C - 2、C I C - 4、C I C - 5、C I C - 7、C I C - K a、C I C - K b、B e s t r o p h i n s、T M E M 1 6 A、G A B Aレセプター、グリシンレセプター、A B C輸送体、N A V 1 . 1、N A V 1 . 2、N A V 1 . 3、N A V 1 . 4、N A V 1 . 5、N A V 1 . 6、N A V 1 . 7、N A V 1 . 8、N A V 1 . 9、スフィンゴシン - 1 - ホスフェートレセプター (S 1 P 1 R) およびN M D Aチャンネルからなる群より選択される、項目16に記載の方法。

30

(項目18)

前記内在性膜タンパク質は、イオンチャンネルである、項目15に記載の方法。

(項目19)

前記第1のソート可能な標識もしくは前記第2のソート可能な標識は、蛍光標識である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目20)

前記蛍光標識は、蛍光タンパク質、抗体/蛍光体結合体および蛍光性細胞標識からなる群より選択される、項目19に記載の方法。

40

(項目21)

前記セルソーターは、蛍光細胞分析分離装置である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目22)

前記抗原発現細胞は、酵母細胞、酵母スフェロプラストもしくは哺乳動物細胞である、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目23)

前記抗原発現細胞は、ヒト細胞である、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記抗原発現細胞は、外因性抗原を発現する、上記項目のいずれか1項に記載の方法。

50

(項目 25)

前記抗原発現細胞は、発現ベクターでトランスフェクトされる、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 26)

前記イムノバインダー発現細胞は、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞である、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 27)

前記イムノバインダー発現細胞は、B 細胞である、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 28)

前記 B 細胞は、ウサギ B 細胞である、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

前記 B 細胞は、免疫化した動物から単離される、項目 27 または 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 30)

前記動物は、DNA ワクチン接種によって免疫化される、項目 29 に記載の方法。

(項目 31)

前記イムノバインダー発現細胞は、発現ベクターから発現されるイムノバインダーを含む、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 32)

項目 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法によって選択されるイムノバインダーをコードする、単離された核酸分子。

(項目 33)

目的の抗原に結合し得るイムノバインダーを生成する方法であって、該方法は、項目 32 に記載のイムノバインダーをコードする核酸配列を、該コードされたイムノバインダーが生成されるように、発現環境に導入する工程を包含する、方法。

(項目 34)

項目 33 に記載の方法によって生成される、イムノバインダー。

(項目 35)

目的の細胞表面抗原に特異的に結合する B 細胞クローンを同定するための方法であって、該方法は：

(a) 動物を、細胞表面抗原をコードする DNA で免疫化する工程、
 (b) B 細胞を、免疫化した該動物から単離する工程、
 (c) 該 B 細胞を、第 1 のソート可能な標識で標識する工程；
 (d) 第 2 のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで該目的の抗原は、該抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；

(e) 該抗原発現細胞と、該 B 細胞とを接触させる工程；および
 (f) 複数の該 B 細胞から、該抗原発現細胞に特異的に結合し得る 1 個以上の B 細胞を、セルソーターを使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体における該第 1 のソート可能な標識および該第 2 のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞への B 細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合する B 細胞クローンを同定する、工程を包含する、方法。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、蛍光抗体 2 で標識した B 細胞 1 が、細胞内色素 3 で染色した標的発現細胞と相互作用することを模式的に示す (4 : 選択した標的 / 抗原 ; 5 : B 細胞レセプター (BCR))。

【図 2】図 2 は、ESBA903 可溶性標的に結合しているウサギ B 細胞の FACS 選択

10

20

30

40

50

プロセスを示す。図 2 A : リンパ球は、前方散乱および側方散乱によってゲート制御した (gate)。図 2 B : それらの中で、I g G + I g M - 細胞 (おそらく、記憶 B 細胞) を選択した (丸で示される)。図 2 C : E S B A 9 0 3 - P E および E S B A 9 0 3 - P e r C P で二重染色された細胞 (丸で示される) は、E S B A 9 0 3 に対する高アフィニティー I g G をコードすると予測される。最も明るい蛍光を示す細胞 (丸で囲まれていない) を、9 6 ウェルプレートにおいてソートした。

【図 3】図 3 は、抗 T N F 抗体 (P E 標識した) でコートしたビーズが、T N F をトランスフェクトした C H O 細胞に結合することを示す (上側パネル)。抗 C D 1 9 抗体 (A P C 標識した) でコートしたコントロールビーズは、T N F でトランスフェクトした C H O 細胞に結合しなかった (中央パネル)。抗 T N F 抗体 (P E 標識した) でコートしたビーズは、野生型 (w t) C H O 細胞に結合しなかった (下側パネル)。左側のトッドプロットは、前方散乱および側方散乱を示し、これは、上記事象のサイズおよび粒度をそれぞれ示す。単一のビーズ (約 3 μ m) 集団は、P 2 においてゲート制御した。ビーズに最終的に結合した C H O 細胞 (約 3 0 μ m) は、P 1 においてゲート制御した。中央のドットプロットは、それらの P E 染色もしくは A P C 染色に関して P 1 事象 (C H O 細胞) を示す。従って、抗 T N F ビーズと相互作用している細胞は、P 3 ゲートに出現し、抗 C D 1 9 ビーズと相互作用している細胞は、P 4 ゲートに出現する。右側に、各サンプルについての統計が、詳述される。

【図 4】図 4 は、抗 T N F - P E でコートしたビーズおよび抗 C D 1 9 - A P C でコートしたビーズが、T N F でトランスフェクトした C H O 細胞とともに混合された。C H O 細胞を、ゲート制御した (P 1)。これらの中で、抗 T N F P E コートビーズもしくは抗 C D 1 9 - A P C コートビーズのいずれかに結合している細胞は、それぞれ、ゲート P 3 およびゲート P 4 において示される。結合しなかったビーズは、ゲート P 2 において見られる。

【図 5】図 5 a : 3 種の異なる C H O - T N F - 記憶 B 細胞懸濁物の F A C S 分析。左上 : 細胞懸濁物の前方散乱および側方散乱を示すドットプロット。トランスジェニック C H O 細胞の大きな集団および記憶 B 細胞の小さな集団を含む生細胞を、ゲート制御した。左下 : A P C 蛍光および F I T C 蛍光を示すドットプロット。ここで、上記記憶 B 細胞 (I g G + / I g M -) をゲート制御した。これら 2 つのドットプロットは、全 3 つのサンプルについて同一であった ; 従って、それらは、ただ 1 つが表示される。図 5 b : 上記 3 個のサンプルのヒストグラムおよび集団階層 : 上 : C H O - T N F 細胞 + E S B A 1 0 5 + E S B A 1 0 5 で免疫化したウサギの記憶 B 細胞 ; 中央 : C H O - T N F 細胞 + E S B A 1 0 5 + 免疫化していないウサギの記憶 B 細胞 ; 下 : C H O - T N F 細胞 + E S B A 1 0 5 で免疫化したウサギの記憶 B 細胞。ヒストグラムにおいて、C H O 細胞に結合する記憶 B 細胞を、ゲート制御した。

【図 6 - 1】図 6 は、E S B A 1 0 5 で「コート」した T N F トランスジェニック C H O 細胞と混合した、免疫化したリンパ球からなる懸濁物の F A C S 分析を示す。図 6 a : 細胞懸濁物の前方散乱および側方散乱を示すドットプロット。トランスジェニック C H O 細胞の大きな集団およびリンパ球の小さな集団を含む生細胞を、ゲート制御した。図 6 b : A P C 蛍光および F I T C 蛍光を示すドットプロット。ここで上記記憶 B 細胞 (I g G + / I g M -) をゲート制御した。図 6 c : ゲート制御した記憶 B 細胞のカルセイン蛍光を示すヒストグラム。ゲート制御した集団を、ソートした (C H O - T N F - E S B A 1 0 5 複合体に結合する記憶 B 細胞)。

【図 6 - 2】図 6 は、E S B A 1 0 5 で「コート」した T N F トランスジェニック C H O 細胞と混合した、免疫化したリンパ球からなる懸濁物の F A C S 分析を示す。図 6 a : 細胞懸濁物の前方散乱および側方散乱を示すドットプロット。トランスジェニック C H O 細胞の大きな集団およびリンパ球の小さな集団を含む生細胞を、ゲート制御した。図 6 b : A P C 蛍光および F I T C 蛍光を示すドットプロット。ここで上記記憶 B 細胞 (I g G + / I g M -) をゲート制御した。図 6 c : ゲート制御した記憶 B 細胞のカルセイン蛍光を示すヒストグラム。ゲート制御した集団を、ソートした (C H O - T N F - E S B A

10

20

30

40

50

105複合体に結合する記憶B細胞)。

【図7】図7は、CHO-TNF (B220)トランスジェニック細胞と相互作用する、抗TNF IgGでコートしたビーズの明視野顕微鏡写真を示す。

【図8】図8は、表面に抗ESBA105抗体を有するB細胞(小さな細胞)に結合したCHO-TNF/ESBA105細胞(大きな細胞)の明視野顕微鏡写真(左列)および蛍光顕微鏡写真(右列)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

(詳細な説明)

本発明は、細胞表面抗原に特異的に結合し得るイムノバインダー(例えば、scFv抗体)を同定するための方法を提供する。本発明の方法は、一般に、標識した抗原発現細胞と、標識したイムノバインダー発現細胞とを接触させる工程、および上記抗原発現細胞に結合するイムノバインダー発現細胞を、セルソーターを使用して単離する工程を包含する。これら方法は、内在性膜タンパク質(例えば、GPCR)に存在するコンフォメーションエピトープに対するイムノバインダーの迅速かつ効率的な同定のために特に有用である。本発明はまた、本発明の方法を用いて同定された、単離されたイムノバインダーおよびイムノバインダーをコードする核酸を提供する。

【0017】

一局面において、本発明は、目的の細胞表面抗原に特異的に結合するイムノバインダーを同定するための方法を提供する。上記方法は、第1のソート可能な標識に作動可能に連結した複数のイムノバインダー発現細胞を提供する工程；第2のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで上記目的の抗原は、上記抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；上記抗原発現細胞と、上記イムノバインダー発現細胞とを接触させる工程；ならびに上記複数のイムノバインダー発現細胞から、上記抗原発現細胞に特異的に結合し得る1個以上のイムノバインダー発現細胞を、セルソーター(例えば、蛍光細胞分析分離装置)を使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体(例えば、抗原と、B細胞レセプターとの間で形成される複合体)における上記第1のおよび第2のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞へのイムノバインダー発現細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合するイムノバインダーを同定する、工程を包含する。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記分離されたイムノバインダー発現細胞は、クローン的に単離される。

【0019】

特定の実施形態において、上記クローン的に単離されたイムノバインダー発現細胞は、当業者に周知の方法を使用して、クローン性増殖に供される。

【0020】

他の実施形態において、上記イムノバインダーをコードする核酸配列は、イムノバインダー発現細胞から単離される。上記核酸配列の単離は、クローン性単離の後もしくはクローン性増殖の後に起こり得る。上記イムノバインダーをコードする核酸配列の単離に適した方法としては、PCR(例えば、単一細胞PCR)が挙げられる。

【0021】

いくつかの実施形態において、本発明の方法を使用して単離されたイムノバインダー発現細胞は、上記イムノバインダーを機能的に特徴付けるために、細胞ベースのアッセイに供される。適切な細胞ベースのアッセイとしては、CELLISAが挙げられる。

【0022】

いくつかの実施形態において、上記イムノバインダーは、抗体である。このような抗体としては、マウス抗体、ウサギ抗体、ウサギ化抗体、ニワトリ抗体、ラクダ抗体、ラクダ化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体が挙げられる。適切な抗体形式としては、Fab、Dab、ナノボディーおよびscFvが挙げられるが、これらに限定されな

10

20

30

40

50

い。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態において、上記目的の抗原は、外因性遺伝子から発現される。他の実施形態において、上記目的の抗原は、遺伝的に操作された抗原である。他の実施形態において、上記目的の抗原は、内在性膜タンパク質である。適切な内在性膜タンパク質としては、Gタンパク質共役レセプター（GPCR（例えば、CXCR2））もしくはイオンチャンネルが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態において、上記第1のもしくは第2のソート可能な標識は、蛍光標識である。適切な蛍光標識としては、蛍光タンパク質、抗体/蛍光体結合体および蛍光性細胞標識が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）である。いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、外因性抗原を発現する。いくつかの実施形態において、上記抗原発現細胞は、発現ベクターでトランスフェクトされる。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞である。適切な哺乳動物細胞としては、B細胞（例えば、ウサギB細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記B細胞は、免疫化した動物（例えば、DNAワクチン接種によって免疫化した動物）から単離される。いくつかの実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、発現ベクターから発現されたイムノバインダーを含む。

20

【 0 0 2 7 】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって同定されたイムノバインダーをコードする単離された核酸分子を提供する。

【 0 0 2 8 】

別の局面において、本発明は、目的の抗原に結合し得るイムノバインダーを産生するための方法を提供し、上記方法は、本発明の方法によって同定されたイムノバインダーをコードする核酸配列を、上記コードされたイムノバインダーが産生されるように、発現環境に導入する工程を包含する。

30

【 0 0 2 9 】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって産生されたイムノバインダーを提供する。

【 0 0 3 0 】

別の局面において、本発明はまた、目的の細胞表面抗原に特異的に結合するB細胞クローンを同定するための方法を提供し、上記方法は、動物を、細胞表面抗原をコードするDNAで免疫化する工程；B細胞を、上記免疫化した動物から単離する工程；上記B細胞を、第1のソート可能な標識で標識する工程；第2のソート可能な標識に作動可能に連結した複数の抗原発現細胞を提供する工程であって、ここで上記目的の抗原は、上記抗原発現細胞の表面にディスプレイされる、工程；上記抗原発現細胞と、上記B細胞とを接触させる工程；ならびに上記複数のB細胞から、上記抗原発現細胞に特異的に結合し得る1個以上のB細胞を、セルソーターを使用して分離する工程であって、ここで単一の細胞複合体における上記第1のおよび第2のソート可能な標識の存在は、抗原発現細胞へのB細胞の結合を示し、それによって、目的の抗原に結合するB細胞クローンを同定する、工程を包含する。

40

【 0 0 3 1 】

（定義）

本発明が、より容易に理解され得るように、特定の用語が、以下のとおりに定義される。さらなる定義は、詳細な説明全体に記載される。

50

【 0 0 3 2 】

用語「抗体」とは、完全な抗体および任意の抗原結合フラグメント（すなわち、「抗原結合部分」、「抗原結合ポリペプチド」、もしくは「イムノバインダー」）またはその一本鎖をいう。「抗体」とは、ジスルフィド結合で相互に連結されている少なくとも2個の重（H）鎖および2個の軽（L）鎖を含む糖タンパク質、またはこれらの抗原結合部分をいう。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてVHと省略される）および重鎖定常領域から構成される。上記重鎖定常領域は、3個のドメイン（CH1、CH2およびCH3）から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてVLと省略される）および軽鎖定常領域から構成される。上記軽鎖定常領域は、1個のドメイン、CLから構成される。上記VHおよびVL領域は、超可変領域（相補性決定領域（CDR）といわれる）にさらに分けられ得、超可変領域の間により保存された領域（フレームワーク領域（FR）といわれる）が散在している。各VHおよびVLは、3個のCDRおよび4個のFRから構成され、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと並べられる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。上記重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。上記抗体の定常領域は、宿主組織もしくは宿主因子（免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）が挙げられる）への上記免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

10

【 0 0 3 3 】

用語「キメラ抗体」とは、（a）上記抗原結合部位（可変領域）が、異なるかもしくは変化したクラス、エフェクター機能および/もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新たな特性を付与する全く異なる分子（例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬物など）に連結されるように、上記定常領域もしくはその一部が、改変されているか、置換されているか、もしくは交換されている抗体分子；あるいは（b）上記可変領域もしくはその一部が、異なるかもしくは変化した抗原特異性を有する可変領域で改変されているか、置換されているかもしくは交換されている抗体分子をいう。

20

【 0 0 3 4 】

用語、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）は、抗原（例えば、TNF）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1種以上のフラグメントに言及する。ある抗体の抗原結合機能が全長抗体のフラグメントによって発揮され得ることが示された。用語、抗体の「抗原結合部分」内に含まれる結合フラグメントの例としては、（i）Fabフラグメント（VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインからなる一価のフラグメント）；（ii）F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2個のFabフラグメントを含む二価のフラグメント）；（iii）Fdフラグメント（VHドメインおよびCH1ドメインからなる）；（iv）Fvフラグメント（抗体の単腕のVLドメインおよびVHドメインからなる）；（v）dAbフラグメントのような1個のドメイン（Wardら、(1989) Nature 341:544-546）（これは、VHドメインからなる）；ならびに（vi）単離された相補性決定領域（CDR）または（vii）2個以上の単離されたCDRの組み合わせ（これは、合成リンカーによって必要に応じて結合され得る）が挙げられる。さらに、上記Fvフラグメントの2個のドメイン（VLおよびVH）は別個の遺伝子によってコードされるものの、それらは、上記VL領域およびVH領域が、一価の分子を形成するように対になった1個のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を使用して結合され得る（一本鎖Fv(scFv)として公知；例えば、Birdら(1988) Science 242:423-426；およびHoustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと）。このような一本鎖抗体はまた、用語、抗体の「抗原結合部分」内に含まれることが意図される。これら抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を使用して得られ、上記フラグメントは、インタクトな抗体と同じ様式で、有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって、産生され得る。抗体は、異なるアイソ

30

40

50

タイプ（例えば、I g G（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくはI g G 4サブタイプ）、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、もしくはI g M抗体）のものであり得る。

【0035】

用語「イムノバインダー」とは、抗体の抗原結合部位のうちの全てもしくは一部（例えば、上記重鎖可変ドメインおよび/もしくは軽鎖可変ドメインのうちの全てもしくは一部）を含む分子に言及し、そのため上記イムノバインダーは、標的抗原を特異的に認識する。イムノバインダーの非限定的例としては、全長免疫グロブリン分子およびs c F v、ならびに抗体フラグメント（(i) F a bフラグメント（V Lドメイン、V Hドメイン、C LドメインおよびC H 1ドメインからなる一価のフラグメント）；(i i) F (a b ')
2フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2個のF a bフラグメントを含む二価のフラグメント）；(i i i) F a b ' フラグメント（これは、本質的に、ヒンジ領域の一部を有するF a bである）（FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY（Paul ed., 3. sup. rd ed., 1993）を参照のこと）；(i v) F dフラグメント（V HドメインおよびC H 1ドメインからなる）；(v) F vフラグメント（抗体の単腕のV LドメインおよびV Hドメインからなる）；(v i) 単ドメイン抗体、例えば、D a bフラグメント（Wardら, (1989) Nature 341: 544 - 546）（これは、V HドメインもしくはV Lドメインからなる）、ラクダ科の動物の抗体（Hamers - Castermanら, Nature 363: 446 - 448 (1993)、およびDumoulinら, Protein Science
11: 500 - 515 (2002)を参照のこと）またはサメ抗体（例えば、サメI g - N A R s ナノボディー（登録商標））；ならびに(v i i) ナノボディー（1個の可変ドメインおよび2個の定常ドメインを含む重鎖可変領域）が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられる。

【0036】

本明細書で使用される場合、用語「機能的特性」とは、改善（例えば、従来のポリペプチドと比較して）が当業者にとって望ましいおよび/もしくは有利である（例えば、上記ポリペプチドの製造特性もしくは治療効力を改善するために）、ポリペプチド（例えば、イムノバインダー）の特性である。一実施形態において、上記機能的特性は、改善された安定性（例えば、熱安定性）である。別の実施形態において、上記機能的特性は、改善された溶解度（例えば、細胞条件下で）である。なお別の実施形態において、上記機能的特性は、非凝集性である。さらに別の実施形態において、上記機能的特性は、発現における改善（例えば、原核生物細胞における）である。なお別の実施形態において、上記機能的特性は、封入体精製プロセス後の再折りたたみ収率における改善である。特定の実施形態において、上記機能的特性は、抗原結合アフィニティーにおける改善ではない。

【0037】

用語「フレームワーク」とは、より多様なC D R領域の間に存在する抗体可変領域の当該分野で認識された部分である。このようなフレームワーク領域は、代表的には、フレームワーク1 ~ 4（F R 1、F R 2、F R 3、およびF R 4）といわれ、三次元空間において、上記C D Rが、抗原結合表面を形成し得るように、重鎖抗体可変領域もしくは軽鎖抗体可変領域において見いだされる3個のC D Rを保持するための足場を提供する。このようなフレームワークはまた、足場と言及され得る。なぜなら、それらは、より多様なC D Rの提示のための支持物を提供するからである。上記免疫グロブリンスーパーファミリーの他のC D Rおよびフレームワーク（例えば、アンキリン反復およびフィブロネクチン）は、抗原結合分子として使用され得る（例えば、米国特許第6, 300, 064号、同第6, 815, 540号および米国特許出願公開第20040132028号もまた参照のこと）。

【0038】

用語「エピトープ」もしくは「抗原決定基」とは、免疫グロブリンもしくは抗体が特異的に結合する抗原上の部位をいう。エピトープは、代表的には、特有の空間的コンフォメ

10

20

30

40

50

ーション中に、少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、もしくは15個のアミノ酸を含む。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照のこと。

【0039】

用語「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」とは、抗体が所定の抗原上のエピトープに結合することに言及する。代表的には、上記抗体は、ほぼ 10^{-7} M未満のアフィニティー(K_D) (例えば、ほぼ 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満もしくは 10^{-10} M未満もしくはさらにそれを下回る)で結合する。

10

【0040】

用語「K_D」とは、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。代表的には、本発明の抗体は、例えば、BIACORE機器において表面プラズモン共鳴(SPR)技術を使用して決定される場合、ほぼ 10^{-7} M未満の解離平衡定数(K_D) (例えば、ほぼ 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満もしくは 10^{-10} M未満もしくはさらにそれを下回る)で抗原に結合する。

【0041】

本明細書で使用される場合、「同一性」とは、2個のポリペプチド、分子の間、または2個の核酸の間の配列マッチングをいう。上記2個の比較される配列の両方における一部が、同じ塩基もしくはアミノ酸のモノマーサブユニットによって占有されている場合(例えば、2個のDNA分子のうちの各々におけるある位置が、アデニンによって占有される場合、または2つのポリペプチドのうちの各々におけるある位置がリジンによって占有される場合)、それぞれの分子が、その位置において同一である。2個の配列の間の「パーセンテージ同一性」は、上記2個の配列によって共有されるマッチング位置の数を、比較される位置の数で除算して、それを×100する関数である。例えば、2個の配列における位置10個のうちの6個がマッチしている場合、上記2個の配列は、60%同一性を有する。例示すると、DNA配列CTGACTとCAGGTTは、50%同一性(6個の合計位置のうちの3個がマッチしている)を共有する。一般に、比較は、2個の配列が最大同一性を与えるように整列される場合に行われる。このようなアラインメントは、例えば、Needlemanら(1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453の方法を使用して提供され得、Alignプログラム(DNAstar, Inc.)のようなコンピュタープログラムによって従来通り実行され得る。上記2個のアミノ酸配列の間の%同一性はまた、PAM120重み付け残基表、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4を使用するALIGNプログラム(version 2.0)へ組み込まれたE. MeyersおよびW. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988))のアルゴリズムを使用して、決定され得る。さらに、2個のアミノ酸配列の間の%同一性は、Blossum 62マトリクスもしくはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップ重み付け16、14、12、10、8、6、もしくは4、および長さ重み付け1、2、3、4、5、もしくは6を使用するGCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)におけるGAPプログラムへと組み込まれたNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970))アルゴリズムを使用して決定され得る。

20

30

40

【0042】

「類似する」配列は、整列される場合、同一および類似のアミノ酸残基を共有する配列であり、ここで類似の残基は、整列された参照配列における対応するアミノ酸残基についての保存的置換である。この点において、参照配列における残基の「保存的置換」は、例えば、類似の大きさ、形状、電荷、化学的特性(共有結合もしくは水素結合などを形成する能力を含む)を有する、上記対応する参照残基に物理的にもしくは機能的に類似の残基

50

による置換である。従って、「保存的置換で改変された」配列は、1個以上の保存的置換が存在するという点で、参照配列もしくは野生型配列とは異なるものである。2個の配列の間の上記「パーセンテージ類似性」は、上記2個の配列によって共有されるマッチする残基もしくは保存的置換を含む位置の数を、比較される位置の数で除算して、それを×100する関数である。例えば、2個の配列における位置の10個のうちの6個がマッチし、10個の位置のうちの2個が、保存的置換を含む場合、上記2個の配列は、80%陽性類似性を有する。

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「保存的配列改変」とは、アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴にネガティブに影響しないかもしくは上記結合特徴を改変しないアミノ酸改変に言及することが意図される。このような保存的配列改変としては、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。例えば、改変は、当該分野で公知の標準的技術（例えば、部位指向性変異誘発およびPCR媒介性変異誘発）によって導入され得る。保存的アミノ酸置換としては、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものが挙げられる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で既に定義されている。これらファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、所定の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で置換され得る。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定するための方法は、当該分野で周知である（例えば、Brummelら, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashiら *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); および Burksら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)を参照のこと）。

【0044】

「アミノ酸コンセンサス配列」とは、本明細書で使用される場合、少なくとも2個、および好ましくは、より多くの整列されたアミノ酸配列のマトリクスを使用し、各位置における最も頻度の高いアミノ酸残基を決定することが可能になるようにアラインメントにおけるギャップを可能にして、生成され得るアミノ酸配列に言及する。上記コンセンサス配列は、最も頻繁に各位置において現れるアミノ酸を含む配列である。2個以上のアミノ酸が単一の位置において等しく現れる事象において、上記コンセンサス配列は、それらアミノ酸の両方もしくは全てを含む。

【0045】

タンパク質のアミノ酸配列は、種々のレベルで分析され得る。例えば、保存性もしくは変動性は、上記単一の残基レベル、複数の残基レベル、ギャップを有する複数の残基などで示され得る。残基は、同一の残基の保存を示し得るか、またはクラスレベルで保存され得る。アミノ酸クラスの例としては、極性であるが、非荷電性のR基（セリン、スレオニン、アスパラギンおよびグルタミン）；正に荷電したR基（リジン、アルギニン、およびヒスチジン）；負に荷電したR基（グルタミン酸およびアスパラギン酸）；疎水性R基（アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリンおよびチロシン）；ならびに特別のアミノ酸（システイン、グリシンおよびプロリン）が挙げられる。他のクラスは、当業者に公知であり、置換可能性を評価するために、構造的決定もしくは他のデータを使用して定義され得る。その意味において、置換可能なアミノ酸は、置換され得かつその位置において機能的な保存を維持し得る任意のアミノ酸に言及し得る。

10

20

30

40

50

【0046】

しかし、同じクラスのアミノ酸は、それらの生物物理学的特性によって程度が様々であり得ることは、認識される。例えば、特定の疎水性R基（例えば、アラニン）は、他の疎水性R基（例えば、バリンもしくはロイシン）より親水性である（すなわち、親水性が高いもしくは疎水性が低い）ことが認識される。相対的な親水性もしくは疎水性は、当該分野で認識される方法を使用して決定され得る（例えば、Roseら, Science, 229: 834-838 (1985) およびCornetteら, J. Mol. Biol., 195: 659-685 (1987) を参照のこと）。

【0047】

本明細書で使用される場合、1個のアミノ酸配列（例えば、第1のVH配列もしくはVL配列）が、1個以上のさらなるアミノ酸配列（例えば、データベース中の1個以上のVH配列もしくはVL配列）とアラインされる場合、1個の配列（例えば、上記第1のVH配列もしくはVL配列）におけるアミノ酸位置は、上記1個以上のさらなるアミノ酸配列における「対応する位置」に対して比較され得る。本明細書で使用される場合、上記「対応する位置」は、比較されている配列（複数可）が最適にアラインされる場合に、すなわち、上記配列が、最高の%同一性もしくは%類似性を達成するようにアラインされる場合に、比較されている配列における等価な位置を表す。

【0048】

用語「核酸分子」とは、DNA分子およびRNA分子に言及する。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に配置されている場合に、「作動可能に連結」されている。例えば、プロモーターもしくはエンハンサーは、それらがコード配列の転写に影響を及ぼす場合に、上記配列に作動可能に連結されている。

【0049】

用語「ベクター」とは、それが連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、プラスミドは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントは、上記ウイルスゲノムへと連結され得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律的に複製し得る（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム性の哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性の哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると、上記宿主細胞のゲノムへと組み込まれ得、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。

【0050】

用語「宿主細胞」とは、発現ベクターが導入される細胞をいう。宿主細胞としては、細菌細胞、微生物細胞、植物細胞もしくは動物細胞が挙げられ得る。細菌（これは、形質転換しやすい）としては、腸内細菌科（例えば、Escherichia coli もしくはSalmonellaの株）；Bacillaceae（例えば、Bacillus subtilis）；Pneumococcus；Streptococcus、およびHaemophilus influenzaeのメンバーが挙げられる。適切な微生物としては、Saccharomyces cerevisiae およびPichia pastoris が挙げられる。適切な動物宿主細胞株としては、CHO（チャイニーズ・ハムスター卵巣株）およびNS0細胞が挙げられる。

【0051】

用語「処置する（treat）」、「処置する（treating）」および「処置（treatment）」とは、本明細書に記載される治療的手段もしくは予防的手段をいう。「処置」方法は、障害もしくは再発している障害の1個以上の症状を予防するため、治癒させるため、遅延させるため、もしくはその重篤度を軽減するためか、またはそれら症状を改善するために、あるいはこのような処置（本発明の抗体）の非存在下で予測されるものを超えて被験体の生存を長期化するために、このような処置（本発明の抗体）を

10

20

30

40

50

必要とする被験体（例えば、GPCR媒介性障害を有する被験体もしくはこのような障害を最終的に獲得し得る被験体）に投与することを使用する。

【0052】

用語「有効用量」もしくは「有効投与量」とは、所望の効果を達成するかもしくは少なくとも部分的に達成するに十分な量をいう。用語「治療上有効な用量」とは、上記疾患に既に罹患している患者において、上記疾患およびその合併症を治癒させるかもしくは少なくとも部分的に抑えるに十分な量として定義される。この使用に有効な量は、処置されている障害の重篤度および患者自身の免疫系の全般的な状態に依存する。

【0053】

用語「被験体」とは、任意のヒトもしくは非ヒト動物をいう。例えば、本発明の方法および組成物は、GPCR媒介性障害を有する被験体を処置するために使用され得る。

10

【0054】

用語「ウサギ (rabbit)」とは、本明細書で使用される場合、ウサギ科 (Leporidae) のファミリーに属する動物をいう。

【0055】

用語「セルソーター」とは、検出可能な「ソート可能な」標識の存在に基づいて細胞を分離するための任意の手段に言及する。このような手段としては、蛍光細胞分析分離装置が挙げられるが、これらに限定されない。任意の細胞標識が、ソート可能な標識として使用され得る。上記標識としては、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質）、抗体/蛍光体結合体および蛍光性細胞標識（例えば、蛍光性カルシウムイオンイオノフォア）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0056】

用語「細胞複合体」とは、1個以上のイムノバインダー発現細胞に結合した1個以上の抗原発現細胞に言及し、ここで上記結合は、上記抗原発現細胞の表面上の抗原によって媒介される。いくつかの実施形態において、イムノバインダー発現細胞への抗原発現細胞の結合は、上記抗原発現細胞の表面上の抗原と、上記イムノバインダー発現細胞の表面上のイムノバインダーとの間の直接相互作用からなる。

【0057】

用語「クローン的に単離する」とは、細胞集団から個々の細胞クローンを単離するための任意の手段に言及する。適切な手段としては、各ウェルが1個を超えない細胞のみを含むようにする、複数ウェルプレートへの細胞の限界希釈および移動が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0058】

用語「イムノバインダーをコードする核酸配列を得る工程」とは、イムノバインダー発現細胞によって発現されるイムノバインダーの核酸配列を得るための任意の手段に言及する。適切な手段としては、上記イムノバインダー発現細胞からの、イムノバインダーをコードする核酸配列の核酸単離、PCR増幅およびDNA配列決定が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、イムノバインダーをコードする核酸配列は、1個の細胞からのPCR（すなわち、単一細胞PCR）によって増幅される。

【0059】

40

用語「外因性抗原」とは、特定の宿主細胞において通常発現されない抗原に言及する。例えば、外因性抗原は、上記宿主細胞とは異なる界、門、綱、目、属もしくは種に由来し得る（例えば、酵母細胞において発現されるヒト抗原）。さらにもしくは代わりに、外因性抗原は、同じ種に由来するが、その宿主細胞において不適切に発現され得る（例えば、脳細胞において発現される肺特異的抗原）。「外因性抗原」はまた、正常な細胞において通常見いだされない変異抗原（例えば、肺細胞において発現されるがん特異的変異抗原）に言及する。

【0060】

用語「遺伝的に操作された抗原」とは、組換えDNA技術によって産生された任意の抗原に言及し、キメラであるか、または点変異、欠失および/もしくは挿入を含む抗原を包

50

含する。別段定義されなければ、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似もしくは等価な方法および材料は、本発明の実施もしくは試験において使用され得るが、適切な方法および材料が、以下に記載される。矛盾する場合は、定義を含め、本明細書が優先する。さらに、上記材料、方法および例は、例示に過ぎず、限定することを意図しない。

【0061】

本発明の種々の局面は、以下の小節においてさらに詳細に記載される。上記種々の実施形態、選択および範囲は、随意に組み合わせられ得ることが理解される。さらに、特定の実施形態に依存して、選択された定義、実施形態もしくは範囲は、当てはまらない可能性がある。

10

【0062】

本発明は、対応する抗原を発現する細胞に付着したイムノバインダー発現細胞を同定および分離するために、FACSを使用するスクリーニング法を提供する。特定の実施形態において、上記イムノバインダーは、抗体である。

【0063】

(抗原発現)

抗体調製のための標的抗原は、可溶性であるか、もしくは細胞表面上に発現されるか、もしくは形質膜に結合されている任意のタンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、炭水化物、脂質、および他の分子であり得る。抗原は、天然抗原であっても合成抗原であってもよい。好ましくは、標的抗原は、タンパク質もしくはペプチドである。標的抗原の非限定的例としては、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophins、TMEM16A、GABAレセプター、グリシンレセプター、ABC輸送体、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、スフィンゴシン-1-ホスフェートレセプター(S1P1R)、NMDAチャネルなどが挙げられる。一実施形態において、上記標的抗原は、膜貫通タンパク質である。別の実施形態において、上記標的抗原は、マルチスパン(multispan)膜貫通タンパク質(例えば、Gタンパク質共役レセプター(GPCR)、イオンチャネルなど)である。

20

30

【0064】

GPCRのファミリーは、少なくとも250個のメンバーを有する(Straderら FASEB J., 9:745-754, 1995; Straderら Annu. Rev. Biochem., 63:101-32, 1994)。ヒト遺伝子のうちの1%は、GPCRをコードし得ると推測されてきた。GPCRは、広く種々のリガンド(光子、低分子の生体アミン(すなわち、エピネフリンおよびヒスタミン)、ペプチド(すなわち、IL-8)から、大きな糖タンパク質ホルモン(すなわち、副甲状腺ホルモン)に及ぶ)に結合する。リガンド結合の際に、GPCRは、グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)を活性化することによって細胞内シグナル伝達経路を調節する。興味深いことに、GPCRは、ヒトサイトメガロウイルスおよびヘルペスウイルスにおいて機能的ホモログを有し、このことは、GPCRが、ウイルス病因の展開の間に獲得され得たことを示唆する(Straderら, FASEB J., 9:745-754, 1995; Arvanitakisら Nature, 385:347-350, 1997; Murphy, Annu. Rev. Immunol. 12:593-633, 1994)。

40

【0065】

今までに知られている大部分のGPCRの独特の特徴は、疎水性アミノ酸残基の7個のクラスターが、1次構造に位置し、その各領域において細胞膜を貫通する(横切る)ことである。上記ドメインは、3個の細胞内ループ、3個の細胞外ループ、ならびにアミノ末端ドメインおよびカルボキシル末端ドメインによって接続された膜貫通 - ヘリックスを表

50

すと考えられている (K. Palczewskiら, Science 289, 739-45 (2000))。大部分のGPCRは、機能的タンパク質構造を安定化させると考えられるジスルフィド結合を形成する最初の2個の細胞外ループの各々に、1個の保存されたシステイン残基を有する。上記7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、およびTM7と称される。上記で詳述されるこれら構造は、Gタンパク質共役レセプタータンパク質の中で共通しており、上記タンパク質が膜を貫通する上記領域(膜を横切る領域もしくは膜貫通領域)に対応するアミノ酸配列、および上記膜を横切る領域付近のアミノ酸配列は、しばしば、上記レセプターの中で高度に保存されていることは、周知である。従って、GPCRにおける高い相同性の程度に起因して、新規GPCRの同定、ならびにこのような新規メンバーの細胞内部分および細胞外部分両方の同定は、当業者によって容易に達成される。例示であるが、Watson and Arkinstall (1994)の書籍(本明細書に参考として援用される)は、50個より多くのGPCRの配列を提供する。上記書籍は、各配列について、上記膜貫通ドメインの各々を含む正確な残基をさらに記載する。

【0066】

Gタンパク質共役レセプターの低分子リガンドの結合部位は、細胞外表面付近に位置しかついくつかのGタンパク質共役レセプター膜貫通ドメインによって形成される親水性ソケット(このソケットは、上記Gタンパク質共役レセプターの疎水性残基が取り囲んでいる)を含むと考えられている。各Gタンパク質共役レセプター膜貫通ヘリックスの親水性側が、内側へ向き、極性リガンド結合部位を形成すると仮定される。TM3は、リガンド結合部位(例えば、TM3アスパラギン酸残基を含む)を有するとして、いくつかのGタンパク質共役レセプターに影響を与えてきた。さらに、TM5セリン、TM6アスパラギンおよびTM6もしくはTM7フェニルアラニンもしくはチロシンはまた、リガンド結合に関わっている。ペプチドホルモンレセプターおよび他のより大きなリガンド、例えば、糖タンパク質(LH、FSH、hCG、TSH)を有するレセプター、ならびにレセプターのCa²⁺/グルタミン酸/GABAクラスのリガンド結合部位は、上記細胞外ドメインおよびループにあるようである。

【0067】

レセプターを不活性から活性へと切り替えるための重要な事象は、7個の膜貫通の横切るヘリックスを有する上記GPCRの膜貫通ヘリックス3(TM3)および6(TM6)のリガンド誘導性コンフォメーション変化である(U. Gether, and B. K. Kolbilka, J. Biol. Chem. 273, 17979-17982 (1998))。これらヘリックスの動きは、続いて、上記レセプターの細胞内ループのコンフォメーションを変化させて、会合ヘテロトリマーGタンパク質の活性化を促進する。変異誘発研究(S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. A. Kjelsberg, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1633-1639 (1992); E. Kostenis, B. R. Conklin and J. Wess, Biochemistry 36, 1487-1495 (1997); M. A. Kjelsberg, S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1430-1433 (1992))は、第3の細胞内ループ(i3)が、レセプターとGタンパク質との間の共役の大部分を媒介することを示した。ミニ遺伝子として発現されるI3ループはまた、Gq結合についてアドレナリン作動性レセプターと直接的に競合することが示され(L. M. Luttrell, J. Ostrowski, S. Cotecchia, H. Kendal and R. J. Lefkowitz, Science 259, 1453-1457 (1993))、または、無細胞条件下で可溶性ペプチドとしてGタンパク質を活性化し得る(T. Okamotoら, Cell 67, 723-730 (1991))。

【0068】

上記目的の抗原は、標的細胞(ときおり、抗原発現細胞ともいわれる)における内因性

10

20

30

40

50

供給源のものであり得る。あるいは、外因性分子は、細胞へと導入されて、上記抗原を発現し得る。細胞への上記抗原の導入は、当業者に公知の任意の方法によって行われ得る。一実施形態において、上記抗原をポリペプチドとしてコードするポリヌクレオチドは、インビトロでベクターに挿入され得る。上記ベクターは、発現のために、標的細胞にさらに導入され得る。上記ポリヌクレオチドは、上記標的抗原のcDNA配列、DNA配列、もしくは当該分野で公知の他の配列を含み得る。上記ベクターは、プラスミド、コスミド、リボソーム、または当該分野で公知の他の天然のもしくは人工のベクターであり得る。上記導入は、トランスフェクション、形質転換、感染、物質の直接マイクロインジェクション、微粒子銃粒子送達 (biolistic particle delivery)、エレクトロポレーション、もしくは当該分野で公知の他の方法のプロセスであり得る。上記抗原を発現する標的細胞は、当該分野で公知の任意の細胞 (例えば、動物から直接採取された細胞 (例えば、がん細胞、非がん細胞、初代細胞など)、または分子操作された細胞 (例えば、培養細胞、例えば、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HEK 293 細胞など)、不死化細胞、トランスフェクトされた/感染させられた細胞、T細胞などが挙げられる) であり得る。あるいは、上記標的細胞は、非動物供給源 (例えば、細菌、昆虫など) に由来し得る。一実施形態において、上記標的抗原を発現する細胞は、酵母細胞、好ましくは、酵母スフェロプラスト (spheroplast) である。あるいは、上記標的「細胞」は、人工細胞様体 (artificial cell-like body) もしくは構造 (例えば、リボソーム、単層膜体など) であり得る。上記標的細胞もしくは細胞様体における上記抗原の発現は、一過性であり得 (すなわち、上記発現は、比較的短期間 (例えば、数分から数日) の後に弱まるかもしくは止まる)、または安定であり得 (すなわち、上記発現は、比較的長期間 (例えば、数日後もしくは細胞の数世代後) にわたって比較的安定なレベルを維持する)。1つの好ましい実施形態において、上記抗原は、上記標的細胞の形質膜の細胞外表面上に発現される。別の好ましい実施形態において、上記抗原は、内在性膜抗原もしくはマルチスパン膜抗原である。形質膜上のその位置に達するために、上記抗原は、これら位置で直接発現され得るか、または上記標的細胞の細胞質におけるその発現後に、これら位置へとその位置が変えられ得る。この位置移動は、上記標的細胞の天然のプロセスであり得、あるいは、上記抗原発現の前もしくはその後、その位置移動をもたらす、例えば、シグナル/タグ分子 (例えば、ゴルジソーティングシグナル、特定の膜結合分子に対する抗体など) を結合させること、グラフト (graft) を固定すること (anchoring) (例えば、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー)、もしくは上記抗原に化学架橋をすること、上記抗原を変異させること、または当該分野で公知の他の方法による、操作されたプロセスであり得る。

【0069】

(イムノバインダー発現細胞および免疫化)

一実施形態において、本明細書に記載される方法によって選択されるべきイムノバインダー発現細胞は、哺乳動物B細胞、好ましくは、ウサギB細胞である。

【0070】

好ましい実施形態において、上記B細胞は、目的の標的で免疫化した動物に由来する。上記動物の免疫化は、当業者に公知の任意の方法によって実施され得る。代表的には、上記B細胞は、免疫化した動物のリンパ器官 (例えば、脾臓もしくはリンパ節) から単離される。

【0071】

好ましい一実施形態において、上記目的の抗原の免疫化は、DNA免疫化/ワクチン接種によって行われる。あるいは、上記標的抗原を発現する細胞は、免疫化のために、動物 (例えば、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなど) へと注射される。この免疫化工程のために好ましい動物は、ウサギである。DNA免疫化/ワクチン接種は、急激な免疫応答を誘導し、ならびに、標的抗原の天然の発現 (通常、天然の発現のみ) を可能にする。このことは、組換えタンパク質の発現および取り扱いを要しな

10

20

30

40

50

いので、このプロセスは、組換えタンパク質を用いた従来の免疫化より効率的かつ費用効果的である。さらに、より重要なことには、上記インピボで発現された抗原は、その天然の状況における標的タンパク質と同じ二次構造を有し、同じ翻訳後修飾を有しさえし得る。このことは、上記標的抗原に対する調製された抗体による認識の正確さを改善する。例示的DNA免疫化は、カナダ国特許出願CA 2350078およびWO 04/087216に示される。具体的には、上記標的抗原として上記ポリペプチドをコードするDNAは、遺伝子銃法を通じて動物に直接導入され、上記動物においてポリペプチドの発現を生じ、その発現は、上記ポリペプチドに対する抗体の形成を引き起こす。より強い抗体の形成を達成するために、いわゆる遺伝子アジュバントを、上記ポリペプチドをコードするDNAと同時に適用する。これら遺伝子アジュバントは、サイトカイン（例えば、GM-CSF、IL-4およびIL-10）を発現しかつ実験動物の体液性免疫応答を刺激するプラスミドである。好ましい一実施形態において、上記標的抗原に対する抗体は、B細胞レセプター（BCR）としてB細胞の細胞表面上に発現される。別の好ましい実施形態において、上記抗体発現細胞は、いかなるIgMもその表面に存在しないことによって特徴付けられ、通常のB細胞とは区別される記憶B細胞である。

【0072】

一実施形態において、上記イムノバインダー発現細胞は、酵母細胞であり、上記イムノバインダーは、好ましくは、抗体フラグメント、より好ましくは、scFvである。

【0073】

（蛍光活性化セルソーティング（FACS）を使用するスクリーニング）

免疫化工程の後、上記標的抗原に特異的に結合するB細胞上の膜結合抗体は、非特異的抗体を発現する他の細胞から区別される必要がある。好ましい一実施形態において、上記抗原-抗体結合を通じて、その形質膜上に上記特異的抗体を発現するB細胞は、上記抗原を発現する標的細胞に付着する。もう一つの好ましい実施形態において、他のもしくはより多くの相互作用（例えば、同じもしくは異なる抗原-抗体相互作用、化学的架橋、リガンド-レセプター相互作用など）は、B細胞と標的細胞との間で起こり得る。上記B細胞は、種々の抗体を発現するB細胞のプール中に、または上記免疫動物から直接、免疫化した/免疫状態にしていない動物のプールから、もしくはインピト口操作プロセス（例えば、V(D)J遺伝的組み換え技術により異なる抗体を発現するB細胞のライブラリー）から集められる他の免疫細胞と組み合わせて存在し得る。

【0074】

上記標的抗原に対して特異的な抗体を発現するB細胞の分離は、当該分野で公知の任意の方法で行われ得る。これらとしては、抗原上でのパニング、限界希釈、アフィニティー精製、または上記発現された抗体もしくは上記抗体生成B細胞の特徴を利用する他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

好ましい一実施形態において、上記抗原発現細胞は、上記付着したB細胞の将来的な検出および/もしくは単離のために有用なタグで標識される。上記タグは、架橋剤（cross linker）、抗原/抗体、低分子（例えば、グルタチオン（GSH）、ビオチン/アビジンなど）、磁性粒子、蛍光タグなどであり得る。好ましい一実施形態において、上記抗原発現細胞は、蛍光タンパク質/ペプチドで標識される。別の実施形態において、上記抗体生成B細胞はまた、タグ、好ましくは、異なる蛍光タンパク質/ペプチドで標識される。なお別の実施形態において、上記抗原発現細胞に付着した上記B細胞は、B細胞上で標識された上記蛍光タンパク質/ペプチドからの蛍光放出によって検出され得る。さらに別の実施形態において、上記B細胞および上記付着した抗原発現細胞は、それらの上で標識された2種の異なる蛍光タンパク質/ペプチドからの蛍光放出によって検出され得る。好ましい一実施形態において、上記標的抗原に対して特異的な抗体を発現するB細胞は、それらの上でおよび付着したAPC上で標識された蛍光タンパク質/ペプチドから、両方の蛍光の放出によって、検出され得、かつ他の抗体生成B細胞とはさらに分離され得る。好ましくは、この検出および分離は、蛍光活性化セルソーティング（FACS）技術

10

20

30

40

50

によって行われ得る。

【0076】

頭字語 F A C S は、商標登録されておりかつ B e c t o n D i c k i n s o n (F r a n k l i n L a k e s , N J) が所有している。本明細書で使用される場合、用語 F A C S は、フローサイトメトリーベースのセルソーティングの任意の形態を表すものとする。

【0077】

蛍光活性化セルソーティングは、フローサイトメトリーの特別なタイプである。それは、各細胞の特異的光散乱および蛍光特徴に基づいて、2個以上の容器の中に、一度に1細胞、生物学的細胞の不均一な混合物をソートするための方法を提供する。それは、個々の細胞からの蛍光シグナルの迅速で、客観的かつ定量的な記録、ならびに特に目的の細胞の物理的分離を提供するので、有用な科学機器である。

【0078】

代表的 F A C S システムにおいて、細胞懸濁物は、狭く、急激に流れる液体ストリームの中心に運ばれる。その流れは、それらの直径に対して細胞間で大まかな分離がされるように、調整される。振動機構は、細胞のストリームを、個々の液滴へとばらばらにする。上記システムは、1個より多くの細胞が液滴中に存在する可能性を低くするように調節される。上記ストリームが液滴へとばらばらになる直前に、上記流れは、各細胞の目的の蛍光特徴が測定される蛍光測定ステーションを通る。電荷をかける環 (e l e c t r i c a l c h a r g i n g r i n g) が、上記ストリームが液滴へとばらばらになるちょうどその地点に配置される。電荷は、直前の蛍光強度測定値に基づいて上記環にかけられ、その逆の電荷が、上記ストリームからばらばらになるにつれて、上記液滴上に捕捉される。上記荷電した液滴は、次いで、それらの電荷に基づいて、容器の中へと液滴をそらす静電的偏向システムを通して落ちる。いくつかのシステムにおいて、上記電荷は、上記ストリームに直接印加され、ばらばらになっている液滴は、上記ストリームと同じ符号の電荷を保持する。次いで、上記ストリームは、上記液滴がばらばらになった後に、中性に戻される。

【0079】

F A C S 技術のための蛍光標識は、蛍光色素を励起するために使用されるランプもしくはレーザー、および利用可能な検出器に依存する。最も一般に利用可能な、シングルレーザー機械のレーザーは、青色アルゴンレーザー (4 8 8 n m) である。この種のレーザーで機能できる蛍光標識としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：1) 緑色蛍光 (通常、F L 1 で表される) : F I T C 、 A l e x a F l u o r 4 8 8 、 G F P 、 C F S E 、 C F D A - S E 、 および D y L i g h t 4 8 8 ; 2) 橙色オレンジ蛍光 (通常、F L 2) : P E 、 および P I ; 3) 赤色蛍光 (通常、F L 3) : P e r C P 、 P E - A l e x a F l u o r 7 0 0 、 P E - C y 5 (T R I - C O L O R) 、 および P E - C y 5 . 5 ; ならびに 4) 赤外蛍光 (通常、F L 4 ; いくつかの F A C S 機械において) : P E - A l e x a F l u o r 7 5 0 、 および P E - C y 7 。他のレーザーおよびそれらの対応する蛍光標識としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：1) 赤色ダイオードレーザー (6 3 5 n m) : アロフィコシアニン (A P C) 、 A P C - C y 7 、 A l e x a F l u o r 7 0 0 、 C y 5 、 および D r a q - 5 ; ならびに 2) 紫色レーザー (4 0 5 n m) : P a c i f i c O r a n g e 、 A m i n e A q u a 、 P a c i f i c B l u e 、 4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I) 、 および A l e x a F l u o r 4 0 5 。

【0080】

好ましい実施形態において、B細胞は、標識された抗 I g G 抗体および抗 I g M 抗体で染色され、上記抗 I g G 抗体でのみ陽性染色されるが、抗 I g M 抗体で染色されない記憶 B 細胞を優先的に選択する。I g G は、一般に、I g M より高いアフィニティーを有する；表面に I g G を発現するが、I g M を発現しない (これは、記憶 B 細胞に特徴的である) 陽性 B 細胞は、それによって選択される。上記目的のために、マルチカラー染色が、好

10

20

30

40

50

ましくは使用され、ここで I g G に対して特異的な抗体および I g M に対して特異的な抗体が、別々に、例えば、A P C および F I T C でそれぞれ標識される。好ましくは、上記標的抗原および/もしくは上記標的抗原を発現する標的細胞はまた、標識される。一実施形態において、上記標的抗原は、上記標的抗原を発現する細胞を、細胞内蛍光色素で染色することによって、間接的に染色される。

【0081】

本発明は、B細胞プールをスクリーニングするためにFACSを使用する方法を提供し、ここでB細胞は、目的の標的抗原に特異的に結合する抗体を生成するB細胞を同定しかつさらに単離するために、上記標的抗原を発現する細胞に付着し得る。好ましくは、上記B細胞は、蛍光標識で標識され、上記標的抗原を発現する細胞は、異なる蛍光標識で別個に標識される。これら標識は、細胞内、細胞外、もしくは形質膜中に組み込まれるかのいずれかで存在し得る。免疫化および抗体の生成後に、全てのB細胞と一緒にプールされ、FACSシステムを通り抜ける。上記標的抗原に対して特異的な抗体を生成するB細胞のみが、上記抗原発現細胞に付着する。それらの付着は、他の個々の細胞の間での大まかな分離と比較して、上記流れ中のこれら2種の細胞の間の距離を短くし、このことは、それらが走査レーザービームを同時に通る間に検出可能な「バイカラー事象」をもたらす。従って、上記目的の抗体を生成するB細胞は、同定され得、次いで、他の非特異的B細胞とは異なる収集チューブへとソートされ得る。

10

【0082】

別の好ましい実施形態において、上記B細胞と上記対応する抗原発現細胞との間の相互作用が、細胞特徴の特定の改変(例えば、脱分極、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)など)をもたらす場合、より多くの蛍光標識が、このような改変を可能にする細胞へと添加され得る。従って、B細胞および接触した抗原発現細胞は、「トリカラー」事象もしくは同時にさらに3色より多くの色を含む事象を表す。

20

【0083】

あるいは、付着したB細胞の同定およびソーティングは、蛍光標識の存在を必要としない。一実施形態において、上記細胞-細胞相互作用は、いずれか細胞においても機能的変化をもたらす。別の実施形態において、これら機能的変化は、上記標的抗原に特異的に結合する抗体を生成するB細胞を同定しさらに分離するために使用され得る。例えば、上記細胞-細胞相互作用は、何れの細胞においてもレセプターシグナル伝達を機能的にブロックもしくは活性化し得、このことは、上記FACSシステムによって検出可能な細胞変化(例えば、Ca²⁺流出変化など)をもたらす。従って、これら検出可能な機能的変化をモニターすることによって、目的のB細胞はまた、同定されかつ分離され得る。レセプターシグナル伝達を機能的にブロックするかもしくは活性化する1つの特定の形態は、B細胞を、GPCR(Gタンパク質共役レセプター)を機能的に発現する細胞とインキュベートすることである。GPCRを介してシグナル伝達するアゴニストは、小胞体(endoplasmatic reticulum)からGPD R媒介性Ca²⁺流出を誘導するために、上記混合物に添加され得る。B細胞上に提示される抗体がアゴニストシグナル伝達を機能的にブロックする場合、Ca²⁺流出もまた、この細胞-細胞相互作用によって結果的にブロックされる。Ca²⁺流出は、例えば、フローサイトメトリーによって定量的に測定され得る。従って、Ca²⁺流出の増大もしくは低下のいずれかを示すB細胞/標的細胞集団(conglomerate)のみが、ソートされる。

30

40

【0084】

(単離されたB細胞によって生成される抗体に対するアフィニティーアッセイ)

特定の形態において、B細胞は、抗体が培養培地へと分泌されるように、適切な条件下で培養される。生成された抗体は、例えば、モノクローナル抗体である。上記培養は、ヘルパー細胞株(例えば、胸腺腫ヘルパー細胞株(例えば、EL4-B5(Zublerら, 1985, J. Immunol., 134(6): 3662-3668を参照のこと))の使用を伴い得る。

【0085】

50

必要に応じて、さらなるアフィニティーアッセイが、上記単離されたB細胞によって生成される抗体の選択性およびリガンドと競合する能力を評価するために、さらなる処理の前に行われ得る。これらアッセイとしては、細胞ベースのアッセイ（例えば、細胞ELISA（CELLISA）（これは、細胞全体がコーティングに使用される改変ELISAプロセスである））が挙げられるが、これに限定されない。CA2350078において議論されるように、CELLISAは、実施例において以下に記載されるとおりに行われ得る。上記確認工程は、上記標的に特異的に結合することについて、例えば、上記標的タンパク質以外の細胞表面に発現されるタンパク質に対して指向される抗体を排除することについて、生成された抗体を試験するために、行われ得る。

【0086】

あるいは、上記同定されかつ単離された目的のB細胞は、抗体アフィニティーについて直接試験され得、上記B細胞は、処理の前に、付着した抗原発現細胞から分離させられ得る。

【0087】

（抗体生成のための、単離されたB細胞のさらなる処理）

上記同定されかつ単離された（必要に応じて、アフィニティーアッセイ（例えば、CELLISA）によって試験された）B細胞は、目的のイムノバインダーを生成するためにさらに処理され得る。伝統的なハイブリドーマ技術が、例えば、使用され得る。これは、上記イムノバインダーを精製し、それらのアミノ酸配列および/もしくは核酸配列を解明するような工程を伴い得る。

【0088】

あるいは、上記バインダーの特徴付けは、それらのscFv形式において行われる。この目的のために、ソートされたB細胞上に発現されるバインダーのCDR配列が、培養され、ソートされた細胞から、もしくは単一細胞から直接のいずれかで、RT-PCRによって回収される。一方のオリゴヌクレオチドプールが上記CDRをコードし、第2のプールが適切なscFv足場のフレームワーク領域をコードする部分的に重複するオリゴヌクレオチドの2個のプールの組み合わせは、1工程のPCR手順で、ヒト化scFvの精製を可能にする。HT配列決定、クローニングおよび生成は、細胞培養上清中の分泌IgGを特徴付ける代わりに、上記生成されたヒト化scFvの性能に基づいて、クローン選択を行うことを可能にする。任意のウサギ抗体由来のCDRを受容するに適したscFv足場が、同定されかつ特徴付けられてきた（「ウサギ化」ヒトFWもしくはウサギアクセプターRabtor；WO09/155726を参照のこと（これは、その全体が本明細書に参考として援用される））。いくつかの場合において、上記ウサギ特異的CDR間ジスルフィド結合をさらに含む種々のCDRの概念の証明が、示された。

【0089】

ウサギ化抗体を作製するための一般的説明は、以下に記載される。

【0090】

（イムノバインダーのグラフト化（grafting））

本発明の方法を用いて同定されたイムノバインダーの抗原結合領域もしくはCDRは、アクセプター抗体フレームワークへとグラフト化され得る。このようなグラフト化は、例えば、イムノバインダーの免疫原性を低下させ得るか、またはその機能的特性を改善し得る（例えば、熱力学的安定性を改善し得る）。

【0091】

ヒトアクセプターフレームワークへCDRをグラフト化するための一般的な方法は、米国特許第5,225,539号（これは、その全体が本明細書に参考として援用される）においてWinterによって開示された。

【0092】

ウサギモノクローナル抗体由来のCDRをグラフト化するための具体的な戦略は、米国仮特許出願第61/075,697号および同第61/155,041号（これらは、その全体が本明細書に参考として援用される）に開示されている。これらストラテ

10

20

30

40

50

ジーは、Winterのものに関連するが、上記アクセプター抗体フレームワークが、全てのヒトもしくは非ヒトのドナー抗体についての普遍的アクセプターとして特に適しているという点で、異なっている。特に、上記ヒト一本鎖フレームワークFW1.4（配列番号1（W003/097697においてa43と称される）および配列番号2（W003/097697）においてKI27と称される）の組み合わせは、ウサギ抗体の抗原結合部位と非常に適合していることが示された。従って、上記FW1.4は、ウサギループのグラフト化に由来する安定なヒト化scFv抗体フラグメントを構築するための適切な足場を表す。

【0093】

さらに、FW1.4が、FW1.4の重鎖中の5個もしくは6個の残基位置を置換することによって、および/またはFW1.4の軽鎖中の1個の位置を置換することによって最適化され得ることが、見いだされた。それによって、上記VH中の非常に種々のウサギCDRのループコンフォメーションが、上記ドナーフレームワークの配列とはほとんど無関係に、完全に維持され得ることが、驚くべきことに見いだされた。FW1.4の重鎖中の5個もしくは6個の残基およびFW1.4の軽鎖中の1個の位置は、ウサギ抗体において保存されている。上記重鎖中の5個もしくは6個の位置のコンセンサス残基、ならびに上記軽鎖中の1個の位置は、ウサギレパートリーから導き出され、ヒトアクセプターフレームワークの配列へ導入された。結果として、改変フレームワーク1.4（ここでは、rFW1.4もといわれる）は、実質的に任意のウサギCDRと適合性である。ウサギ野生型一本鎖とは対照的に、異なるウサギCDRを含むrFW1.4は、十分に発現され、本来のドナーウサギ抗体のアフィニティーをほとんど完全に保持する。

【0094】

よって、例示的イムノバインダーアクセプターフレームワークは、以下を含む：

(i) 配列番号1に対して少なくとも70%同一性、好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、より好ましくは、少なくとも95%同一性を有する可変重鎖フレームワーク；および/または

(ii) 配列番号2に対して少なくとも70%同一性、好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、より好ましくは、少なくとも95%同一性を有する可変軽鎖フレームワーク。

【0095】

好ましい実施形態において、上記可変軽鎖は、87位（AHO番号付け）にスレオニン（T）を含む。

【0096】

好ましい実施形態において、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、以下を含む：

(i) 配列番号1、配列番号4および配列番号6からなる群より選択される可変重鎖フレームワーク；および/または

(ii) 配列番号2もしくは配列番号9の可変軽鎖フレームワーク。

【0097】

好ましい実施形態において、上記可変重鎖フレームワークは、リンカーを介して可変軽鎖フレームワークに連結される。上記リンカーは、任意の適切なリンカー（例えば、配列GGGGS（配列番号10）の1~4回反復、好ましくは、(GGGGS)₄ペプチド（配列番号8）を含むリンカー、またはAlfthanら（1995）Protein Eng. 8:725-731に開示されるリンカー）であり得る。

【0098】

最も好ましい実施形態において、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号3に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、より好ましくは、少なくとも95%の同一性を有する配列である。より好ましくは、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号3を含むか、または配列番号3である。

【0099】

10

20

30

40

50

別の好ましい実施形態において、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号5に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、より好ましくは、少なくとも95%の同一性を有する配列である。より好ましくは、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号5を含むか、または配列番号5である。

【0100】

別の好ましい実施形態において、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号7に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、より好ましくは少なくとも95%の同一性を有する配列である。より好ましくは、上記イムノバインダーアクセプターフレームワークは、配列番号7を含むか、または配列番号7である。

【0101】

さらに、配列番号1の例示的な可変重鎖フレームワークが、使用され得、これは、一般に、ウサギイムノバインダーに由来するCDRのコンフォメーションを支持する1個以上のアミノ酸残基をさらに含む。特に、上記残基は、24H、25H、56H、82H、84H、89Hおよび108H(AH○番号付け)からなる群より選択される1個以上のアミノ酸位置に存在する。これら位置は、CDRコンフォメーションに影響を与えることが証明されているので、ドナーCDRに適合させるための変異が企図される。好ましくは、上記1個以上の残基は、24位のスレオニン(T)、25位のバリン(V)、56位のグリシンもしくはアラニン(G/A)、82位のリジン(K)、84位のスレオニン(T)、89位のバリン(V)および108位のアルギニン(R)(AH○番号付け)からなる群より選択される。

【0102】

好ましい実施形態において、上記可変重鎖フレームワークは、配列番号4もしくは配列番号6を含むか、または配列番号4もしくは配列番号6である。両方の可変重鎖フレームワークは、例えば、任意の適切な軽鎖フレームワークと組み合わせられ得る。

【0103】

上記で開示される配列は、以下である(X残基は、CDR挿入部位である)：

【0104】

10

20

【化1】

配列番号1:FW1. 4の可変重鎖フレームワーク(a43)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVS
 (X)_{n=1-50} RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)_{n=1-50} WGQGTL
 VTVSS

配列番号2:FW1. 4の可変軽鎖フレームワーク(KI27)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50} 10
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD DFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLT VLG

配列番号3:FW1. 4のフレームワーク

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD DFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=1-50} RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA 20
 VYYCAK(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

配列番号4:rFW1. 4の可変重鎖フレームワーク

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
 RFTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTKLV TVSS 30

配列番号5:rFW1. 4のフレームワーク

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISRDT SKNTVY LQMNS
 LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTKLVTVSS 40

配列番号6:rFW1. 4の可変重鎖フレームワーク(V2)

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
 RFTISKDT SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTKLVTVSS

【0105】

【化2】

配列番号7:rFW1.4のフレームワーク(V2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISKDTSKNTVYLQMNSLR
 AEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

10

配列番号8:リンカー

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号9:FW1.4の置換された可変軽鎖フレームワーク

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

20

従って、Winterの一般的方法とは異なって、本発明のヒト化方法に使用される上記フレームワーク配列は、必ずしも、上記ドナーCDRが由来する非ヒト(例えば、ウサギ)抗体の配列に対して最大の配列類似性を示すフレームワーク配列ではない。さらに、CDRコンフォメーションを支持するための上記ドナー配列からグラフト化するフレームワーク残基は、必要とされない。

【0106】

上記アクセプター抗体フレームワークはまた、米国仮特許出願第61/075,692号(これは、その全体が本明細書に参考として援用される)に記載されている安定性増強変異のうち1個以上を含み得る。上記重鎖フレームワークにおける例示的な溶解度増強置換は、12位、103位および144位(AHo番号付け)で見いだされる。より好ましくは、上記重鎖フレームワークは、(a)12位にセリン(S);(b)103位にセリン(S)もしくはスレオニン(T)、および/または(c)144位にセリン(S)もしくはスレオニン(T)を含む。さらに、安定性増強アミノ酸は、上記可変軽鎖フレームワーク(AHo番号付け)の1位、3位、4位、10位、47位、57位、91位、および103位の1個以上の位置で存在し得る。より好ましくは、上記可変軽鎖フレームワークは、1位にグルタミン酸(E)、3位にバリン(V)、4位にロイシン(L)、10位にセリン(S);47位にアルギニン(R)、57位にセリン(S)、91位にフェニルアラニン(F)および/もしくは103位にバリン(V)を含む。

30

【実施例】

40

【0107】

実施例全体を通じて、別段示されなければ、以下の材料および方法を使用した。

【0108】

(材料および方法)

一般に、本発明の実施は、別段示されなければ、化学、分子生物学、組換えDNA技術、免疫学の従来技術(特に、例えば、抗体技術)、およびポリペプチド調製の標準的技術を使用する。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)

50

, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlowら, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); および Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubelら, John Wiley & Sons (1992)を参照のこと。

【0109】

(細胞ELISA (CELISA))

以下の実施例は、CXCR2を発現する細胞を分析するためのCELISAの使用を記載する： 10

CXCR2を発現するCHO細胞を、96ウェルの半分の面積のプレートに、50,000細胞/ウェルの密度で播種し得る。37で一晩インキュベートした後、細胞を、PBS中1%ホルムアルデヒドで30分間、室温で固定し得る。細胞層を3回洗浄し得、非特異的結合部位を、1時間にわたって室温で、細胞培養培地でブロックし得る。次に、3回の洗浄工程の後、その上清を、培養培地で1:1に希釈し得、上記ウェルに添加し得る。3個のコントロールウェル中、市販のウサギ抗CXCR2抗体を、上清中において添加し得る。次いで、上清を、1時間半にわたって、室温で、上記細胞層上でインキュベートし得る。最後に、ウサギIgGを、HRPに結合させたヤギ抗ウサギIgG Fc抗体で検出する。ペルオキシダーゼ基質 (Rocheの青色POD基質) を添加して、比色反応を行い、これを、1M HClで25分後に停止させ得る。吸光度を、450nmにおいて測定し得る。 20

【0110】

(実施例1: 可溶性抗原を使用するB細胞スクリーニングシステム)

本発明において記載されるFACS (蛍光活性化セルソーティング) ベースのスクリーニングシステムをここで例示し、このシステムは、B細胞レセプター (BCR) を介して目的の標的 (特に、可溶性タンパク質) に結合し得るB細胞を選択し得る。この実施例において、上記標的は、蛍光色素 (PEおよびPerCP) で標識した一本鎖抗VEGF抗体ESBA903であった。リンパ球懸濁物を、組換え標的で免疫化したウサギの脾臓から調製した。次いで、細胞を、PEおよびPerCPで標識したscFvと、ならびにIgGに特異的な抗体 (APC標識) もしくはIgMに特異的な抗体 (FITC標識) と、インキュベートした。表面にIgGを発現するが、IgMを発現しないESBA903陽性B細胞をソートし、96ウェルプレート中に選択した (図2)。図2のパネルAに示されるように、リンパ球を、前方散乱および側方散乱に従ってゲート制御した。それらの中で、IgG + IgM - 細胞 (おそらく、記憶B細胞) を選択した (パネルB)。scFv - PEおよびscFv - PerCPで二重染色された細胞を、上記scFvに対する高アフィニティーIgGをコードすると予測した (パネルC)。最も明るい蛍光を示す細胞を、パネルDにおいて列挙したソーティング統計を用いて、96ウェルプレートにソートした。胸腺腫ヘルパー細胞株 (EL4-B5: Zublerら, 1985, J. Immunol. 134 (6): 3662 - 3668を参照のこと) によって、選択されたB細胞を増殖させ、形質細胞へと分化させ、次いで、抗体を分泌させた。これらIgG分子の標的タンパク質に対するアフィニティーを、ELISAおよびBiacore測定によって確認した。動力学的パラメーターを、7個の選択されたクローンについて表1に示す。これらクローン (約200個のソートした細胞のプールに由来) は、低nM ~ pM範囲で高い結合アフィニティーを示す。最後に、分泌IgG分子のmRNAを、6個の目的のクローンから単離し、そのCDRを、ESBATech 一本鎖フレームワーク RabTor (フレームワーク rFW1.4ともいわれる) にグラフト化した。 40

【0111】

【表 1】

表1: 7個のB細胞培養上清の動力的値

| B細胞クロー ン | k_a [$M s^{-1}$] | k_d [s^{-1}] | K_D [M] |
|-------------|----------------------|--------------------|-----------|
| SG2 | 2.91E+06 | 2.95E-04 | 1.01E-10 |
| SE11 | 3.63E+05 | 3.81E-04 | 1.05E-09 |
| 2E-03 | 8.34E+05 | 3.53E-04 | 4.23E-10 |
| 9E-03 | 8.66E+05 | 6.47E-04 | 7.47E-10 |
| 7D-03 | 3.97E+05 | 3.04E-04 | 7.65E-10 |
| 12B-02 | 1.08E+06 | 1.10E-04 | 1.01E-10 |
| 11G-02 | 5.48E+05 | 1.52E-04 | 2.78E-10 |

10

表1a: 図2についてのソーティング統計

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|-----------|---------|------|-------|
| 全ての事象 | 100,000 | #### | 100.0 |
| リンパ球 | 86,585 | 86.6 | 86.6 |
| 単一のリンパ球 1 | 86,013 | 99.3 | 86.0 |
| 単一のリンパ球 2 | 85,523 | 99.4 | 85.5 |
| 記憶B細胞? | 5,450 | 6.4 | 5.4 |
| ソートした細胞 | 16 | 0.3 | 0.0 |
| 903 結合細胞 | 160 | 2.9 | 0.2 |

20

30

(選択された文献 :)

Zuber *et al.* Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. *J Immunol.* 1985; 134(6): 3662-3668.

【 0 1 1 2 】

(膜貫通標的)

上記で記載されたスクリーニングシステムは、上記標的が可溶性である場合、および組換えタンパク質が利用可能である場合に効率的に機能する。しかし、いくつかの目的の標的は、マルチスパン膜貫通タンパク質（例えば、GPCRおよびイオンチャネル）である。組換えタンパク質での伝統的な免疫化は、これらの場合において、得策ではないか、または不可能である。さらに、B細胞のFACS選択は、上記抗原が内在性膜タンパク質である場合に、精製され標識されたタンパク質の結合に基づいて行うことができない。これらの課題に対処するために、上記の手順の以下の改善を行った。

40

【 0 1 1 3 】

1) 組換えタンパク質の代わりに、DNAでの免疫化:

DNAワクチン接種は、ネイティブ(native)抗原に対して迅速な免疫応答を誘導する。組換えタンパク質が必要とされないため、この技術は、一方で非常に費用効率的であり、他方で、より重要なことには、この方法は、内在性膜複合体および/もしくはマ

50

ルチスパン膜タンパク質のネイティブ発現を可能にする。

【0114】

2) 内在性標的膜タンパク質を発現する細胞に結合するB細胞のFACS選択:

フローサイトメトリーは、通常、単一の細胞がレーザービームを横切るときに、上記単一の細胞によって発せられる蛍光を測定する。しかし、いくらかの研究者らは、細胞-細胞相互作用(例えば、カドヘリンによって媒介される接着(Panorchanら, 2006, J. Cell Science, 119, 66-74; Leong et Hibma, 2005, J. Immunol. Methods, 302, 116-124)もしくはインテグリンによって媒介される接着(Gawazら, 1991, J. Clin. Invest, 88, 1128-1134))を調査するために血球計算器を既に使用してきた。しかし、このような研究は、このような細胞-細胞相互作用がセルソーティングの物理的工場の間に損なわれぬままであるか否かを実証しなかった。さらに、B細胞レセプターの、別の細胞の表面に存在するその標的への結合が、このような物理的ソーティングを許容するのに十分強いことを決して示さなかった。

10

【0115】

膜貫通標的に結合するB細胞を選択するために、細胞(例えば、CHO細胞もしくはHEK293細胞)を、選択した標的で一過性にもしくは優先的に安定にトランスフェクトし得るか、または上記選択した標的を天然に発現する細胞を、使用し得る。このような標的細胞を、細胞内蛍光色素(例えば、カルセイン)で染色し、免疫化したウサギの記憶Bリンパ球とインキュベートする。Bリンパ球を、細胞表面特異的のマーカに結合する蛍光性の抗体で染色する。従って、BCR-標的相互作用を通じて、本来互いに付着する2つの細胞にあるバイカラー「事象」の選択(図1を参照のこと)が、達成され得る。

20

【0116】

これらB細胞のさらなる処理を、上記のように行くと、モノクローナル抗体の生成(例えば、IgGもしくはscFv形式において)がもたらされる。これら抗体の上記標的に対する親和性を推測するために、CELISA(ELISA(ここで、コーティング工程は、細胞全体を用いて行われる))を行う。この方法を用いると、抗体の選択性および上記リガンドと競合する能力が、評価され得る。最後に、目的のクローンのCDRを、オリゴ伸長法での遺伝子合成によって、本発明者らのウサギ化フレームワーク(RabTor)へとクローニングする。

30

【0117】

B細胞ソーティングの読み取りは、必ずしも、細胞-細胞相互作用を制限しないが、この相互作用がレセプターシグナル伝達を機能的にブロック/活性化する能力を選択するためにも使用され得る。例えば、B細胞を、GPCRを機能的に発現する細胞とインキュベートし得る。GPCRを通じてシグナル伝達するアゴニストを、小胞体からのGPCR媒介性Ca²⁺流出を誘導するために、上記混合物へ添加し得る。B細胞上に提示された抗体がアゴニストシグナル伝達を機能的にブロックする場合、Ca²⁺流出はまた、結果的にこの細胞-細胞相互作用によってブロックされ得る。Ca²⁺流出を、フローサイトメトリーによって定量的に測定し得る。従って、Ca²⁺流出を示さないB細胞/標的細胞集団のみが、ソートされる。

40

【0118】

(実施例2: 抗TNF抗体でコーティングしたビーズと、膜結合TNFを発現するCHO細胞との間の相互作用の検出)

膜貫通タンパク質に対するB細胞スクリーニングを始める前に、細胞-細胞相互作用(および、特に、BCRと、標的細胞上の膜貫通タンパク質との間の相互作用)が、FACSで確かに選択され得ることを実証しなければならない。フローサイトメトリーストリームにおける高圧が、2個の細胞の間の非共有結合を壊すか否かを決定するために、以下の実験を行った。

【0119】

膜結合TNF (TNF リガンドの切断および分離(shedding))を妨げるT

50

A C E 切断部位に点変異を含む変異体膜結合 T N F を含む ; 例えば、S c a l l o n ら J P h a r m a c o l E x p T h e r 2 0 0 2 ; 3 0 1 : 4 1 8 ~ 2 6 を参照のこと) で安定にトランスフェクトした C H O 細胞 (B - 2 2 0 細胞) を、P E 標識抗 T N F 抗体でコーティングしたビーズとインキュベートした。この設定において、上記ビーズは、記憶 B 細胞を模倣する。陰性コントロールとして、トランスフェクトしていない C H O 細胞を使用し、同様に、A P C 標識した非関連抗体 (抗 C D 1 9) でコーティングしたビーズも使用した。攪拌しながら 4 で 2 時間にわたってインキュベートした後、上記細胞 - ビーズ懸濁物を、F A C S (1 3 0 μ m ノズルを使用する) によって分析した。図 3 は、抗 T N F ビーズと T N F トランスフェクトした C H O 細胞との間の特異的結合が、F A C S で明らかに検出可能であったことを示す。実際に、このサンプル (上部パネル) において、上記ビーズの約 2 / 3 が、細胞に結合した (5 8 5 結合 対 2 6 7 非結合) 。対照的に、上記コントロールサンプル (中央パネルおよび下部パネル) において、ほとんどのビーズは、C H O 細胞に結合しなかった。さらに、両方のビーズ集団 (抗 T N F - P E および抗 C D 1 9 - A P C) を、T N F トランスフェクトした C H O 細胞と一緒に混合した。図 4 は、抗 T N F ビーズのうちの約 1 / 2 が C H O 細胞に結合したのに対して、上記抗 C D 1 9 ビーズのうちの大部分が、結合しないままであったことを示す。各サンプルにおける上記細胞に結合するビーズの割合を、表 2 に詳述する。従って、内在性標的膜タンパク質にそれらの B 細胞レセプターを通じて結合する単一の B 細胞の特異的選択が、フローサイトメトリーを使用して可能であったことが実証された。

【 0 1 2 0 】

10

20

【表 2 - 1】

表2:各サンプルにおけるCHO細胞に結合したビーズの割合

| | 細胞 | ビーズ上の mAb | % 結合したビーズ |
|--------|-------------------------|----------------|-----------|
| サンプル 1 | CHO-TNF α (B220) | 抗 TNF α | 68.0 |
| サンプル 2 | CHO-TNF α (B220) | 抗CD19 | 0.9 |
| サンプル 3 | CHO 野生型 | 抗 TNF α | 1.5 |
| サンプル 4 | CHO-TNF α (B220) | 抗 TNF α | 47.0 |
| | | 抗CD19 | 0.4 |

10

表2a:図3の上部パネルについてのソーティング統計;抗TNF α 抗体でコーティングしたビーズの、TNF α トランスフェクトしたCHO細胞への結合

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|-------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 10,000 | #### | 100.0 |
| P1 | 9,692 | 96.9 | 96.9 |
| P3 | 585 | 6.0 | 5.9 |
| P4 | 1 | 0.0 | 0.0 |
| P2 | 267 | 2.7 | 2.7 |

20

表2b:図3の中央パネルのソーティング統計;抗CD19抗体でコーティングしたビーズの、TNF α トランスフェクトしたCHO細胞への結合はない

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|-------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 10,000 | #### | 100.0 |
| P1 | 9,399 | 94.0 | 94.0 |
| P3 | 3 | 0.0 | 0.0 |
| P4 | 6 | 0.1 | 0.1 |
| P2 | 558 | 5.6 | 5.6 |

30

【 0 1 2 1 】

【表 2 - 2】

表2c:図3の下部パネルのソーティング統計;抗TNF α 抗体でコーティングしたビーズの、CHO野生型細胞への結合はない

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|-------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 10,000 | #### | 100.0 |
| P1 | 9,001 | 90.0 | 90.0 |
| P3 | 13 | 0.1 | 0.1 |
| P4 | 7 | 0.1 | 0.1 |
| P2 | 811 | 0.1 | 0.1 |

10

表2d:図4のソーティング統計

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|-------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 10,000 | #### | 100.0 |
| P1 | 9,096 | 91.0 | 91.0 |
| P3 | 401 | 4.4 | 4.0 |
| P4 | 2 | 0.0 | 0.0 |
| P2 | 856 | 8.6 | 8.6 |

20

(実施例3:抗TNF α 抗体で免疫化したウサギから単離されたB細胞と、抗TNF α 抗体で飽和状態にした膜結合TNF α を発現するCHO細胞との間の相互作用の検出)

図5に示される実験については、リンパ球を、抗TNF α 抗体(ESBA105,内部で生成)で免疫化したウサギの脾臓もしくは免疫化していないウサギの脾臓のいずれかから単離した。それらを、抗ウサギIgG-APCおよび抗ウサギIgM-FITC(AbD serotec)で染色し、その後、記憶B細胞(IgG+/IgM-)の純粋な集団を得るために、予めソートした。並行して、TNF α 発現CHO細胞(Dr. P Schheurich(Univ. of Stuttgart)によって寄付)に、1 μ g/mLカルセイン-レッド(Invitrogen)(生細胞を蛍光染色する細胞質色素)を添加した。次いで、これら細胞を、1回洗浄し100 μ g/mLのESBA105と(あるいは陰性コントロールについては、なし)インキュベートし、最後に、PBSで再び3回洗浄した。記憶B細胞を、約1:10の比率で上記CHO細胞と最終的に混合し、回転プレート上で、4で2時間の間インキュベートした(濃度:3 \times 10⁷細胞/mL)。

30

【0122】

以下のサンプルを調製した:

- 1) CHO-TNF α 細胞+ESBA105+ESBA105で免疫化したウサギの記憶B細胞
- 2) CHO-TNF α 細胞+ESBA105+免疫化していないウサギの記憶B細胞
- 3) CHO-TNF α 細胞+ESBA105で免疫化したウサギの記憶B細胞。

40

【0123】

2時間のインキュベーション後、上記3サンプルを、70 μ mノズルを使用して、FACSによって測定した。表3aに示される集団階層によれば、ESBA105で免疫化した細胞のうちの5%は、「ESBA105でコーティングした」TNF α トランスジェニックCHO細胞に結合する。比較すると、ほんの0.5%の免疫化していないB細胞が、

50

これら「ESBA105でコーティングした」TNF トランスジェニックCHO細胞に結合し(表3b)、0.6%の免疫化したB細胞が、CHO細胞上のESBA105の非存在下で結合する(表3c)。これら結果は、BCR(B細胞レセプター)と、膜貫通標的との間の特異的相互作用が、FACSによって検出され得ることを示す。

【0124】

【表3-1】

表3a:図5bの上部パネルのソーティング統計

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|----------------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 50,000 | #### | 100.0 |
| 生細胞 | 43,828 | 87.7 | 87.7 |
| B細胞 | 5,162 | 11.8 | 10.3 |
| CHOへくっついているB細胞 | 78 | 1.5 | 0.2 |

10

表3b:図5bの中央パネルのソーティング統計

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|----------------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 50,000 | #### | 100.0 |
| 生細胞 | 43,834 | 87.7 | 87.7 |
| B細胞 | 4,290 | 9.8 | 8.6 |
| CHOへくっついているB細胞 | 23 | 0.5 | 0.0 |

20

表3c:図5bの下部パネルのソーティング統計

| 集団 | 事象数 | %親 | %合計 |
|----------------|--------|------|-------|
| 全ての事象 | 50,000 | #### | 100.0 |
| 生細胞 | 42,982 | 86.0 | 86.0 |
| B細胞 | 10,150 | 23.6 | 20.3 |
| CHOへくっついているB細胞 | 65 | 0.6 | 0.1 |

30

(実施例4:ESBA105で免疫化したウサギから単離されたB細胞と、ESBA105で飽和状態にした膜結合TNFを発現するCHO細胞との間の相互作用の検出)

さらなる実験において、記憶B細胞の予備ソーティングは行わなかった。リンパ球集団全体を、染色したCHO-TNF-ESBA105細胞とインキュベートした。トランスジェニックCHO細胞を、上記のように調製した。しかし、96ウェルプレートにおけるソート後にB細胞培養培地中でのそれらの増殖を妨げるために、上記細胞を、カルセイン染色の前にマイトマイシンC(M4287-2MG)処理することによって、細胞周期を停止させた。ESBA105免疫化ウサギのリンパ球を3:1の比で、上記染色したCHO細胞と混合し(細胞懸濁物の濃度:約 3×10^7 細胞/mL)、回転プレート上で、4で2時間の間インキュベートした。その後、上記細胞懸濁物を、FACS分析し、CHO-TNF-ESBA105に結合している記憶B細胞を、図6に示されるゲートに従ってソートした(表3に示されるように、1細胞/ウェル、10細胞/ウェルもしくは100細胞/ウェルで)。ソートした細胞は、上記記憶B細胞集団のうちの5.5%(それぞれ、合計事象のうちの0.2%)を表した。

40

50

【 0 1 2 5 】

ソートした細胞を、96ウェルプレート中に集め、5% CO₂で、37℃で13日間培養した。その後、培養上清を集め、直接ELISAで試験して、ESBA105結合IgGの存在について調べた。ELISA結果(表3)は、ESBA105特異的抗体が多くのウェルにおいて検出でき、単一のB細胞をソートしたウェルにおいても検出できたことを示す。これら上清のBiacore(GE Healthcare)分析(表4)は、これら抗体がESBA105標的に実際に結合することを確認した。

【 0 1 2 6 】

【 表 3 - 2 】

表3:ソーテイング後13日目に採取したB細胞培養上清サンプルのELISA分析。OD450シグナルの特異性を確認するために、A行のウェル中には、B細胞をソートしなかった。A11およびA12のウェルにおいて、ポリクローナルウサギ抗ESBA105抗体(AK3A;2 μ g/mL)を、陽性コントロールとして上清中に添加した。OD450がバックグラウンドより有意に高いウェルを、太字で強調する。

| 13日目 | 0 B細胞/ウェル | | | | | | | | | | | | 陽性コントロール | |
|------|-----------|---------------|---------------|---------------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 11 | 12 |
| A | 0.0690 | 0.0680 | 0.0600 | 0.0470 | 0.0540 | 0.0700 | 0.0660 | 0.0750 | 0.0490 | 0.0690 | 2.7270 | 2.7020 | 2.7270 | 2.7020 |
| B | 0.0660 | 0.0630 | 2.7190 | 0.0460 | 0.0500 | 0.0640 | 0.0630 | 0.0770 | 2.7920 | 0.0580 | 2.8670 | 2.8880 | 2.8670 | 2.8880 |
| C | 0.0700 | 2.8380 | 0.0520 | 0.0470 | 0.0540 | 0.0690 | 2.9260 | 2.7160 | 0.0570 | 0.0690 | 2.9500 | 2.7730 | 2.9500 | 2.7730 |
| D | 0.0680 | 0.0630 | 0.0560 | 0.0490 | 0.0520 | 0.0640 | 0.0650 | 0.7840 | 0.4480 | 0.0620 | 3.0010 | 2.9250 | 3.0010 | 2.9250 |
| E | 0.0750 | 0.0730 | 0.0630 | 0.0550 | 0.0630 | 0.0670 | 2.8550 | 0.0830 | 0.0580 | 1.9820 | 2.1250 | 2.8090 | 2.1250 | 2.8090 |
| F | 0.0680 | 0.0640 | 2.7090 | 0.0530 | 0.0580 | 0.0680 | 0.0750 | 2.5610 | 0.0610 | 0.3820 | 2.8150 | 2.8180 | 2.8150 | 2.8180 |
| G | 0.0820 | 0.0740 | 0.0660 | 1.7530 | 0.0700 | 0.0780 | 0.3980 | 0.0740 | 2.8920 | 1.8240 | 2.7910 | 2.7510 | 2.7910 | 2.7510 |
| H | 0.0730 | 0.0680 | 0.0620 | 0.0570 | 0.0610 | 0.0720 | 0.1710 | 1.9590 | 0.0610 | 2.7830 | 0.1800 | 2.8510 | 0.1800 | 2.8510 |
| | 1 B細胞/ウェル | | | | | | 10 B細胞/ウェル | | | | | | 100 B細胞/ウェル | |

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

【表 4】

表 4: B細胞培養上清についてBiacoreによって決定した動力学的値および濃度。1細胞/ウェルがソートされた上清のみを、測定した。BLQ: 定量限界未

満

| タンパク質 | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | %SE (ka) | %SE (kd) | KD (M) | 適合させた Rmax (RU) | χ^2 (Rmaxの%) | 捕捉レベル IgGを有する B細胞培地 | 捕捉レベル B細胞培地 | 概算の正味の捕捉レベル | 濃度(μ g/ml) |
|----------|-----------|----------|----------|----------|---------|-----------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------|
| 19-01-B3 | 1.54E+06 | 2.83E-03 | 0.29 | 0.20 | 1.8E-09 | 64.0566 | 0.30 | 772.65 | 554.36 | 218.30 | 0.273 |
| 19-01-C2 | 2.30E+09 | 3.23E+01 | 0.04 | 0.04 | 1.4E-08 | 99.0582 | 10.46 | 1069.06 | 546.00 | 523.06 | 1.576 |
| 19-01-F3 | 1.46E+06 | 2.31E-03 | 0.30 | 0.20 | 1.6E-09 | 77.848 | 0.37 | 803.86 | 537.13 | 266.72 | 0.347 |
| 19-01-G4 | 3.40E+06 | 4.45E-03 | 2.86 | 2.29 | 1.3E-09 | 4.43221 | 1.43 | 578.01 | 548.58 | 29.43 | BQL |
| 19-02-B4 | 8.18E+05 | 3.18E-03 | 0.22 | 0.15 | 3.9E-09 | 80.3549 | 0.22 | 822.67 | 539.30 | 283.37 | 0.397 |
| 19-02-D3 | 1.01E+06 | 2.95E-03 | 0.54 | 0.36 | 2.9E-09 | 23.7639 | 0.41 | 652.51 | 547.28 | 105.23 | 0.066 |
| 19-02-F2 | 2.61E+06 | 6.61E-04 | 1.53 | 0.59 | 2.5E-10 | 12.533 | 0.64 | 5214.04 | 514.43 | 9.61 | BLQ |

10

20

30

40

50

(実施例5：CXCR2(ソート27/29)で免疫化したウサギのリンパ球のスクリーニング)

3羽のウサギを、CXCR2発現ベクターで免疫化した。CXCR2-cDNAの数回の皮内適用の後に、血清を採取し、CXCR2トランスフェクトした細胞で特異的抗体の存在について試験した。次いで、リンパ節細胞を取り出し、各 1.6×10^7 細胞ずつ5つのアリコートに分けて凍結し、液体窒素タンク中に保存した。

【0128】

アリコートを融解し、IgGに対して特異的な抗体(APC標識)もしくはIgMに対して特異的な抗体(FITC標識)で染色した。並行して、CXCR2発現CHO細胞を、上記細胞を死滅させることなくさらなる増殖を妨げるために、マイトマイシンCで処理し、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ カルセイン-レッドを添加した。次いで、両方の細胞調製物を、最終濃度 10^7 細胞/mLの、CXCR2トランスフェクトしたCHO細胞の2倍程度のリンパ球と混合した。4で穏やかに攪拌しながら2時間インキュベートした後、細胞懸濁物を、 $50 \mu\text{m}$ フィルタで濾過し、FACSにかけた。図6に記載されるようにゲート制御を行った。1つの「事象」(CXCR2トランスフェクトしたCHO細胞に結合した記憶B細胞)を、合計 10×96 ウェルプレート(合計900事象)で、1ウェルあたりにソートした。ソートした事象は、上記記憶B細胞集団のうちの3.1%(それぞれ、上記サンプル中の合計細胞量の0.035%)を表した。

【0129】

選択したリンパ球を、37のインキュベーター中で21日間培養した。2~3日毎に、 $100 \mu\text{L}$ の培養上清を上記ウェルから集め、新鮮な培地と交換した。この培養期間の間、B細胞は増殖し、形質細胞へと分化し、抗体を分泌した。どの上清がCXCR2特異的抗体を含んでいたかを可視化するために、CELISAを行った。このために、CXCR2を発現するCHO細胞を、96ウェルの半分の面積のプレートに、50,000細胞/ウェルの密度で播種した。37で一晩インキュベートした後、細胞を、PBS中1%ホルムアルデヒドで、室温で30分間にわたって固定した。次いで、細胞層を、3回洗浄し、非特異的結合部位を、室温で1時間、細胞培養培地でブロックした。次に、3回の洗浄工程の後、上記上清を培養培地中で1:1希釈し、各ウェルに添加した。3個のコントロールウェルにおいて、市販のウサギ抗CXCR2抗体を、上清中に添加した。上清を、室温で1時間半、上記細胞層上でインキュベートした。最後に、ウサギIgGを、HRPに結合させたヤギ抗ウサギIgG Fc抗体で検出した。ペルオキシダーゼ基質(Rocheの青色POD基質)を添加して、比色反応を行って、 1M HClで25分後に停止させた。吸光度を 450nm で測定した。

【0130】

このCELISAは、陽性シグナルを示す1.8%のウェルを生じた(16/900)。全ての陽性を、第2のCELISAで確認した。上清をまた、他の細胞株：CHO-K1(野生型)に対して試験して、起こり得る非特異的結合クローン(CHO-ヒトCXCR1およびCHO-マウスCXCR2)を明らかにして、密に関連するレセプターもしくは種対応物に対する交叉反応性を実証した。最後に、上清を、48個のCXCR2 N末端アミノ酸からなるペプチドへの結合について、直接ELISAにおいて試験した。結果を表5に示す。全ての選択した上清は、CELISAにおいて、ヒトCXCR2に対して強い OD_{450} シグナルを生成した。それらのうちのいくつかはまた、CHO野生型細胞を用いたコントロール実験において僅かに陽性であった。このことは、それらが非特異的な様式で結合し得ることを意味する。上記クローンのうちのいずれも、ヒトCXCR1とも、マウスCXCR2とも交叉反応しなかった。最後に、いくつかのクローン(しかし、それらのうちの全てではない)は、上記CXCR2 N末端ペプチドに結合した。このことは、CXCR2上のあり得る代替の結合部位を示す。Biacoreチップに細胞全体を固定化することが不可能であるとすると、CXCR2レセプターに対する選択された抗体の親和性を定量的に測定することは、現在不可能である。しかし、集められたデータは、ヒトCXCR2に特異的な抗体が、上記の細胞-細胞相互作用ソーティングシステムを

10

20

30

40

50

使用して選択されたことを示すように収束している。

【 0 1 3 1 】

【表 5 - 1】

表5:ゾート27および29の間に単離した抗CXCR2クローンからのCELISA結果のまとめ

| クローン番号 | CXCR2 に対する直接 CELISA | | | ウサギ IgG 定量化 ELISA 中 (ng/mL) | CELISA CXCR1 (OD ₄₅₀) | CELISA mCXCR2 (OD ₄₅₀) | ELISA N 末 端 (OD ₄₅₀) |
|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|--|--|
| | 1. アッセイ OD ₄₅₀ | 2. アッセイ OD ₄₅₀ | CHO 野生型 OD ₄₅₀ | | | | |
| 27-01-E3 | 3.3576 | 3.384 | 0.199 | 13501.9 | 0.1111 | 0.2210 | 2.3224 |
| 27-01-D9 | 3.1769 | 3.652 | 0.084 | 431.6 | 0.1100 | 0.1081 | 2.1632 |
| 27-01-H9 | 3.2068 | 3.707 | 0.366 | 6439.8 | 0.3410 | 0.3180 | 0.0552 |
| 27-02-D3 | 2.1209 | 2.971 | 0.090 | 370.2 | 0.1190 | 0.1169 | 0.0507 |
| 27-03-H4 | 3.4092 | 3.490 | 0.373 | 904.3 | 0.4470 | 0.2562 | 2.7145 |
| 27-04-B3 | 2.7205 | 3.284 | 0.410 | 2896.1 | 0.4810 | 0.2724 | 0.0602 |
| 27-06-B5 | 0.4456 | 0.457 | 0.091 | < 5ng/ml | 0.1050 | 0.0980 | 0.05 |
| 27-06-A6 | 3.2461 | 3.507 | 0.423 | 1259 | 0.3640 | 0.2119 | 2.1627 |
| 27-07-B2 | 3.2434 | 3.390 | 0.140 | 455.9 | 0.1210 | 0.1216 | 2.4233 |
| 27-08-D5 | 3.1386 | 3.302 | 0.090 | 178.4 | 0.1060 | 0.0910 | 2.2873 |
| 27-08-G9 | 3.3705 | 3.302 | 0.100 | 427.6 | 0.1160 | 0.0881 | 2.4506 |
| 27-08-G11 | 3.2857 | 3.380 | 0.125 | 2755 | 0.1660 | 0.1389 | 0.2955 |
| 27-09-A1 | 0.9547 | 1.926 | 0.103 | 261.1 | 0.1180 | 0.0996 | 0.0383 |
| 27-09-D1 | 3.2530 | 3.503 | 0.094 | 1576.5 | 0.1210 | 0.1238 | 0.0504 |
| 27-09-A5 | 3.2953 | 3.501 | 0.482 | 4502 | 0.4970 | 0.2491 | 2.5863 |
| 27-10-C3 | 0.6464 | 1.522 | 0.092 | 35.5 | 0.1030 | 0.1080 | 0.0513 |
| 29-01-H10 | 3.3345 | 3.3405 | 0.1558 | 5238.5 | 0.1810 | 0.1644 | 2.5374 |
| 29-02-C4 | 3.1456 | 3.3931 | 0.1219 | 2406.9 | 0.1490 | 0.1513 | 2.5126 |
| 29-02-H8 | 3.4441 | 3.3891 | 0.1178 | 4645.7 | 0.1260 | 0.1287 | 2.4003 |
| 29-02-C10 | 3.1259 | 3.4947 | 0.1128 | 861.3 | 0.1220 | 0.1074 | 1.9841 |
| 29-03-G11 | 2.5987 | 3.0270 | 0.1181 | 420.1 | 0.1110 | 0.0828 | 0.0501 |

10

20

30

40

【表 5 - 2】

| | | | | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|
| 29-04-F11 | 3.0250 | 3.1871 | 0.2768 | 16071.6 | 0.3160 | 0.1999 | 2.6047 |
| 29-05-E11 | 3.5481 | 3.4769 | 0.1531 | 2857.3 | 0.1950 | 0.1081 | 2.2094 |
| 29-06-H3 | 3.4308 | 3.4005 | 0.1254 | 8741.7 | 0.1530 | 0.1489 | 2.6543 |
| 29-06-D10 | 3.3152 | 3.4020 | 0.1316 | 1522.1 | 0.1210 | 0.1101 | 2.4598 |
| 29-07-H4 | 3.3693 | 3.4622 | 0.8502 | 16580.3 | 1.5030 | 0.7195 | 2.4458 |
| 29-08-E1 | 3.7283 | 3.4990 | 1.0667 | 10562.2 | 1.4780 | 0.5225 | 2.3015 |
| 29-08-G10 | 2.8429 | 2.5070 | 0.1107 | 40.4 | 0.1110 | 0.0955 | 1.8621 |
| 29-09-C4 | 1.1362 | 0.8767 | 0.1054 | < 5ng/ml | 0.1090 | 0.0900 | 0.3539 |

10

20

30

40

(等価物)

本発明に対する多くの改変および代替の実施形態は、前述の説明に鑑みれば、当業者に明らかである。よって、この説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実施するためのベストモードを当業者に教示する目的である。構造の詳細は、本発明の趣旨から逸脱することなく実質的に変動し得、添付の特許請求の範囲内にある全ての改変の独占的な使用は確保され得る。本発明は、添付の特許請求の範囲および適用可能な法の支配によって必要とされる程度にのみ限定されることが意図される。

【 0 1 3 2 】

本願において引用される全ての文献および類似の資料（特許、特許出願、文献、書籍、

50

条約、論文、ウェブページ、図面および/もしくは付録を含む)は、このような文献および類似の資料の形式に拘わらず、それらの全体が本明細書に参考として援用される。援用される文献および類似の資料のうちの一つ以上が、定義された用語、擁護の使用法、記載された技術などを含め、本願と異なるか矛盾する場合には、本願が優先する。

【 図 1 】

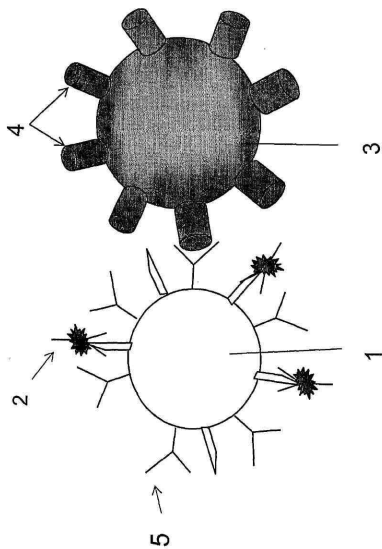


Figure 1

【 図 2 】

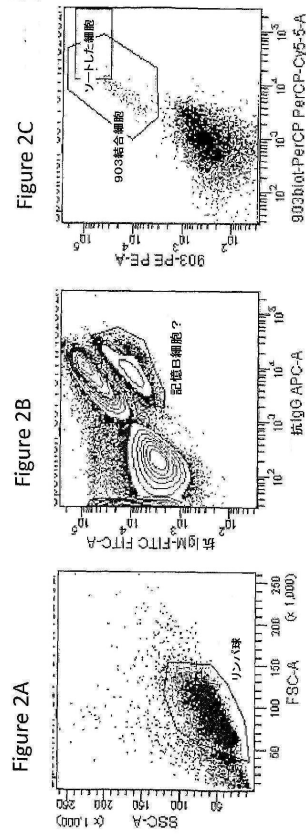


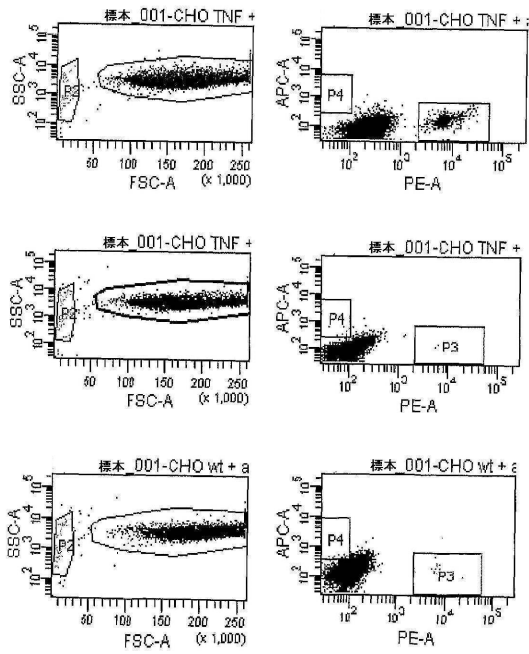
Figure 2C

Figure 2B

Figure 2A

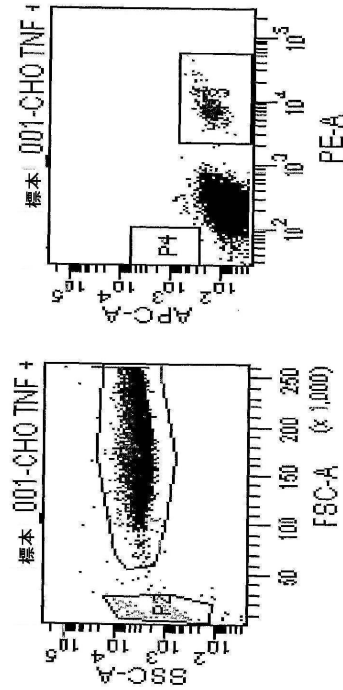
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5a

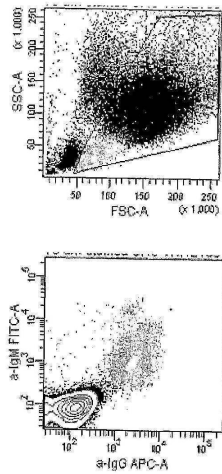
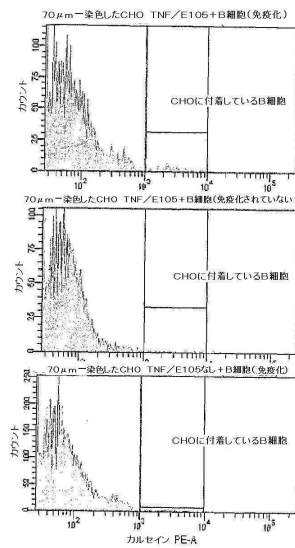


Figure 5b



【 図 6 - 1 】

Figure 6a

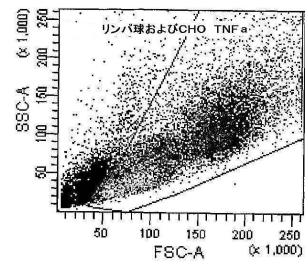
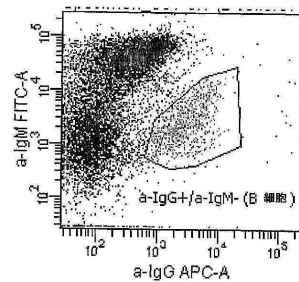


Figure 6b



【 図 6 - 2 】

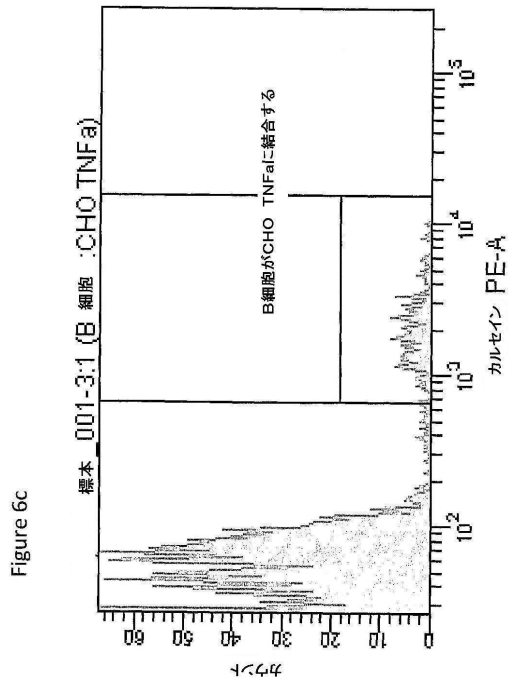


Figure 6c

【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8a

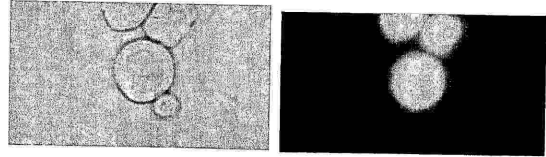
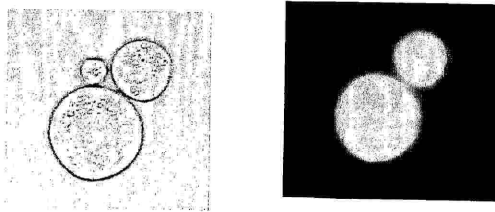


Figure 8b



【 配列表 】

[0006604989000001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01) C 1 2 Q 1/68
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(31)優先権主張番号 832/09

(32)優先日 平成21年6月2日(2009.6.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
スイス(CH)

(31)優先権主張番号 PCT/CH2009/000222

(32)優先日 平成21年6月25日(2009.6.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
スイス(CH)

(72)発明者 デイビッド ウレヒ

スイス国 ツェーハー - 8 6 3 4 ホンブレヒティコン, ヴィドメン 8

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2008/004834(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 1 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 鉴定细胞表面抗原免疫结合剂的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP6604989B2 | 公开(公告)日 | 2019-11-13 |
| 申请号 | JP2017090650 | 申请日 | 2017-04-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 艾斯巴技術諾華有限責任公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Esubatekku - 诺华公司有限责任公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | Esubatekku - 诺华公司有限责任公司 | | |
| [标]发明人 | バレリーハルマンコティエー デイビッドウレヒ | | |
| 发明人 | バレリー ハルマン-コティエー デイビッド ウレヒ | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/68 C12N5/10 | | |
| CPC分类号 | G01N33/533 C07K16/22 C07K16/241 C07K16/28 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/569 C07K2317/622 G01N33/5052 G01N33/537 G01N33/566 | | |
| FI分类号 | C12N15/09.ZNA.Z C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/543.597 C12Q1/68 C12N5/10 C12N15 /00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.ZZN.A C12Q1/68.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065 /AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 | | |
| 优先权 | 61/155041 2009-02-24 US 61/155105 2009-02-24 US 2009000832 2009-06-02 CH PCT/CH2009/000222 2009-06-25 WO | | |
| 其他公开文献 | JP2017192384A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了鉴定可以与细胞表面抗原特异性结合的免疫结合剂(例如, scFv抗体)的方法, 以及根据上述方法鉴定的组合物。

| | | |
|--|-----------------------------------|--|
| (19) 日本国特許庁(JP) | (12) 特許公報(B2) | (11) 特許番号 特許第6604989号 (P6604989) |
| (45) 発行日 令和1年11月13日(2019. 11. 13) | (24) 登録日 令和1年10月25日(2019. 10. 25) | |
| (51) Int. Cl. | F 1 | |
| C 1 2 N 15/09 (2006. 01) | C 1 2 N 15/09 | Z N A Z |
| C O 7 K 16/18 (2006. 01) | C O 7 K 16/18 | |
| C 1 2 Q 1/02 (2006. 01) | C 1 2 Q 1/02 | |
| G O 1 N 33/53 (2006. 01) | G O 1 N 33/53 | Y |
| G O 1 N 33/543 (2006. 01) | G O 1 N 33/543 | 5 9 7 |
| | 請求項の数 6 | 外国簡出願 (全 43 頁) 最終頁に続く |
| (21) 出願番号 特願2017-90650(P2017-90650) | (73) 特許権者 502233344 | |
| (22) 出願日 平成29年4月28日(2017. 4. 28) | エスバテック | ア ノバルティス カ |
| (62) 分割の表示 特願2015-101581(P2015-101581) | ンバニー | エルエルシー |
| の分割 | スイス国 | 4 0 5 6 パーゼル、 リヒト |
| 原出願日 平成22年2月22日(2010. 2. 22) | シュトゥラーセ | 3 5、 ノバルティス ファ |
| (65) 公開番号 特願2017-192384(P2017-192384A) | ーマ | アーゲー 氣付 |
| (43) 公開日 平成29年10月26日(2017. 10. 26) | (74) 代理人 100078282 | |
| 審査請求日 平成29年4月28日(2017. 4. 28) | (74) 代理人 弁理士 山本 秀敏 | |
| (31) 優先権主張番号 61/155, 041 | (74) 代理人 弁理士 100113413 | |
| (32) 優先日 平成21年2月24日(2009. 2. 24) | 弁理士 森下 夏樹 | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US) | (72) 発明者 バレリー ハルマン-コティエー | |
| (31) 優先権主張番号 61/155, 105 | スイス国 ツェーハー-8 0 4 8 チュー | |
| (32) 優先日 平成21年2月24日(2009. 2. 24) | リッヒ、 | サウマッケルシュトゥラーセ 3 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US) | 5 | 最終頁に続く |
| (54) 【発明の名称】 細胞表面抗原のイムノバインダーを特定するための方法 | | |