

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4429736号
(P4429736)

(45) 発行日 平成22年3月10日 (2010. 3. 10)

(24) 登録日 平成21年12月25日 (2009. 12. 25)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 P 21/08	(2006. 01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02	(2006. 01)	C 1 2 N 15/00	C
G O 1 N 33/53	(2006. 01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 37/00	(2006. 01)	G O 1 N 37/00	1 O 2

請求項の数 14 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2003-586190 (P2003-586190)	(73) 特許権者	504388248
(86) (22) 出願日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)		ヨーロピアン モレキュラー バイオロジ ー ラボラトリー
(65) 公表番号	特表2006-500912 (P2006-500912A)		ドイツ国 デー-69012 ハイデルベルク, ポストファッハ 102209
(43) 公表日	平成18年1月12日 (2006. 1. 12)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/001684		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02003/089471	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003. 10. 30)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成18年3月13日 (2006. 3. 13)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	0208817.7		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成14年4月17日 (2002. 4. 17)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体を産生する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

各々が異なる候補抗原に結合する複数のモノクローナル抗体を生成するハイスルーブットの方法であって：

- a) 複数の精製候補抗原を非ヒト動物に導入する工程；
 - b) 該非ヒト動物から抗体産生細胞を回収し、これらの細胞を単一細胞懸濁液にする工程；
 - c) 該単一細胞懸濁液から不死化細胞株を生成する工程；
 - d) 該候補抗原が提示されるタンパク質チップに対して該不死化細胞株の上清をスクリーニングする工程；および
 - e) 該候補抗原に結合するモノクローナル抗体を選択する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 2】

前記非ヒト動物が、マウス、ラット、モルモット、またはウサギである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

2 ~ 50 の異なる精製候補抗原が前記非ヒト動物に導入される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

0.001 ~ 1000 μg の各抗原が前記非ヒト動物に導入される、請求項 3 に記載の方

法。

【請求項 5】

前記抗体産生細胞の除去前に前記非ヒト動物に導入された抗原のいくつかまたは全てのブースター用量を該非ヒト動物に供給するさらなる工程を包含する、請求項 1 ~ 4 のいずれいれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体産生細胞が、B 細胞、T 細胞、または幹細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体産生細胞が、前記非ヒト動物の脾臓組織、リンパ節、または骨髓を取り出すことにより回収される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記不死化細胞株が、前記単一細胞懸濁液中の細胞の、骨髓腫細胞への体細胞融合により生成されるハイブリドーマ細胞株である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記タンパク質チップが、平面ガラススライド、3Dゲルパッドチップ、マイクロウェルチップ、または細胞チップである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗原に結合したモノクローナル抗体を検出する工程が、該モノクローナル抗体をアイソタイピングする工程をさらに包含する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記モノクローナル抗体を検出およびアイソタイピングする工程が、

前記タンパク質チップにアイソタイプ特異的抗免疫グロブリン抗体を添加する工程であって、異なるアイソタイプ特異性を有する各抗免疫グロブリン抗体は、異なる標識を有する、工程、および

該標識の存在を検出する工程、
を包含する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

抗原を含むタンパク質チップを用いて、各単離されたモノクローナル抗体が該抗原に結合する特異性を評価する工程をさらに包含する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 13】

各々が異なる候補抗原に結合する複数のモノクローナル抗体を同定する方法であって：

a) 該候補抗原が提示される 1 つ以上のタンパク質チップに対して不死化細胞株の上清をスクリーニングする工程；および

b) 該候補抗原に結合する抗体を、モノクローナル抗体として選択する工程、
を包含し、該方法は、該不死化細胞株が、複数の抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞の単一細胞懸濁液から生成され、そしてここで該抗体産生細胞は、複数の精製候補抗原が導入された非ヒト動物から回収されることを特徴とする、方法。

【請求項 14】

40

各々が異なる候補抗原に結合する複数の目的のモノクローナル抗体を産生する不死化細胞株のバンクを生成する方法であって：

a) 複数の異なる精製候補抗原を非ヒト動物に導入する工程；

b) 該非ヒト動物から抗体産生細胞を回収し、これらの細胞を単一細胞懸濁液にする工程；

c) 該単一細胞懸濁液から不死化細胞株を生成する工程；

d) 該候補抗原が提示されるタンパク質チップに対して該不死化細胞株の上清をスクリーニングする工程；および

e) 該候補抗原に結合する抗体を含む上清を生成する細胞株を、不死化細胞株として選択する工程、

50

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体を生成する方法に関する。特に、本発明は、従来法よりも迅速にモノクローナル抗体を生成するハイスループット法に関する。

【背景技術】

【0002】

B細胞と骨髄腫細胞との体細胞融合によるモノクローナル抗体産生細胞株の開発は、25年以上前に、KohlerおよびMilsteinにより最初に記載された(Kohler & Milstein, 1975)。それ以来、モノクローナル抗体は、ヒト生理学、生化学、および遺伝学の我々の理解の指数関数的な成長において重要な役割を果たしてきた。モノクローナル抗体は、特定の生物学的分子を検出および局在化するための多目的かつ高感度のツールである。モノクローナル抗体は、任意の細胞分子に対して作製され得、その分子を同定、局在化、および精製することを可能にする。いくつかの場合、モノクローナル抗体はまた、それらが結合する分子の機能を同定する。

【0003】

ハイブリドーマ技術が1970年代半ばにそれらの開発を可能にした後、モノクローナル抗体の診断および治療能力もまたただちに実現した。モノクローナル抗体は、広範な臨床実験診断試験において重要な要素となった。さらに、多くの承認を受けた薬品は、モノクローナル抗体を含み、開発中の薬品の多くは、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の臨床用途は、患者における副作用を模倣するキメラおよび完全ヒト化モノクローナル抗体の開発により改善された。

【0004】

しかし、医薬および分子生物学におけるこれらの発達におけるモノクローナル抗体の重要な役割にもかかわらず、モノクローナル抗体を産生およびスクリーニングするプロセスは、KohlerおよびMilsteinによって1970年代半ばに最初に開発されて以来ほとんど変わっていない。特定の抗原に対するモノクローナル抗体を産生するのに最もしばしば使用されるアプローチは、抗原特異的抗体を産生する成熟B細胞の活性化および増殖を増強する数週間のタイムコースにわたり抗原でのマウスまたはラットの一連の免疫を必要とする。複数のマウスが一般的に免疫され、そして関連する血清免疫グロブリン力価の存在について、体細胞融合前に定期的に試験される。融合後、ハイブリドーマの上清は、免疫アッセイを用いてスクリーニングされ、抗原に対して高い特異性を有するモノクローナル抗体が同定される。このアプローチを用いてモノクローナル抗体を開発するために必要とされるタイムフレームは、約3~9月である。

【0005】

RIMMS(競合的、多部位免疫ストラテジー)の開発は、体細胞融合を、免疫開始後わずか8~14日で起こすことを可能にした(Kilpatrickら, 1997)。次いで、産生されるハイブリドーマの上清は、標準的な免疫アッセイを用いてスクリーニングされ得、特定の抗原に対するモノクローナル抗体がずっと迅速に単離することを可能にする。

【0006】

しかし、RIMMSを用いても、多数の異なる抗原に対するモノクローナル抗体の産生およびスクリーニングは、多くの時間および供給源を必要とする。ますます新規のタンパク質が発見されれば、それらのさらなる特徴づけのために、これらのタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生およびスクリーニングするためのより迅速かつ効果的な方法が必要となる。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

10

20

30

40

50

(発明の要旨)

従って、本発明は、モノクローナル抗体を生成する方法を提供する。この方法は、以下：
a) 少なくとも1つの候補抗原を動物に導入する工程；
b) 該動物から抗体産生細胞を回収し、これらの細胞を単一細胞懸濁液にする工程；
c) 該単一細胞懸濁液から不死化細胞株を生成する工程；
d) 該候補抗原が提示されるタンパク質チップに対して該不死化細胞株の上清をスクリーニングする工程；および
e) 該候補抗原に結合する抗体を、該モノクローナル抗体として選択する工程、を包含する。

【0008】

本発明の方法は、現在利用されているモノクローナル抗体を生成する方法をはるかに凌ぐ利点を有する。すでに議論した通り、現在の、1つ以上の抗原に対するモノクローナル抗体生成方法は、各々の抗原について骨の折れる免疫および単離プロトコルを伴う。対照的に、本発明の方法においては、動物に複数の抗原が注射され得、複数の抗原に対するモノクローナル抗体が同時に生成され、モノクローナル抗体生成の速度および効率が增加する。本発明の方法におけるタンパク質チップの使用は、動物に注射された抗原に結合するモノクローナル抗体を検出するためのスクリーニングプロセスを加速させる。さらに、タンパク質チップは、従来のスクリーニングアッセイ（例えば、酵素連結イムノソルベントアッセイ（ELISA））よりも高感度であり、従来のスクリーニング方法を用いてはなされない分泌の遅いハイブリドーマ細胞の検出速度を改善する。さらに、本発明の方法におけるタンパク質チップの使用は、各々の上清が、抗原に対して複数回スクリーニングされることを可能にし、そして従来のスクリーニングアッセイ（例えば、ELISA）において一回のスクリーニングにおいて必要とされる抗原の量のフラクションのみを使用する。例えば、各上清は、抗原に対して、二回、三回、または四回スクリーニングされ得る。

【0009】

本発明の方法の工程a)における動物は、非ヒト哺乳動物であり得る。好ましくは、動物はマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、またはモルモットである。好ましくは、動物はマウスである。

【0010】

工程a)における候補抗原は、好ましくは、精製候補抗原である。精製候補抗原または精製候補抗原の混合物のいずれかが、動物中に導入され得る。「精製候補抗原」は、その抗原が、任意の他の成分を実質的に含まない抗原の均一な調製物であることを意味する。「精製候補抗原の混合物」は、1つ以上の精製抗原が、免疫に使用される組成物中に存在するが、その調製物は、抗体の産生を誘導する意図のない混入成分を含まないことを意味する。例えば、従来手順を使用して、抗体は、単に、ホモゲナイズした組織で免疫することにより複数の抗原で免疫し得るが、このような免疫は、本明細書中で定義されるような精製された候補抗原での免疫ではない。なぜならば、その抗原には、細胞片が混入しているからである。

【0011】

任意の多くの精製候補抗原が、動物に導入され得る。好ましくは、1～50の精製候補抗原が動物に導入され得る。好ましくは、1つ以上の精製候補抗原が動物に導入され得る。例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50または50以上の精製候補抗原が、動物に導入され得る。抗原は、それら全てが一緒に混合されているという意味で、同時に導入され得る。あるいは、抗原は、別々に導入され得る。異なる抗原の導入は、日単位で分離され得る。好ましくは、異なる抗原の導入を分離する期間は、48時間未満、好ましくは24時間未満である。好ましくは、導入方法は、動物への抗原の注射を伴う。

【0012】

「候補抗原」は、その候補抗原が動物に導入された場合に動物において免疫応答を誘導

10

20

30

40

50

し得る任意の物質を意味する。従って、この用語は、タンパク質性物質および非タンパク質性物質を含む。

【0013】

抗原となるタンパク質性物質としては、タンパク質およびその誘導体（例えば、糖タンパク質、リポタンパク質、およびヌクレオタンパク質、ならびにペプチド）が挙げられる。このようなタンパク質性物質のフラグメントもまた、用語「抗原」に含まれる。好ましくは、このようなフラグメントは、抗原決定基からなるかまたはそれを含む。抗原となる非タンパク質性物質としては、多糖、リポ多糖、および核酸が挙げられる。特に、用語「抗原」は、それらがコードするタンパク質に対する免疫応答を誘導する核酸分子を含む。このような非タンパク質性物質のフラグメントもまた、用語「抗原」に含まれる。用語「抗原」はさらに、免疫応答を誘導し得るキャリアに連結されたタンパク質性物質または非タンパク質性物質を含む（例えば、キャリアに連結された場合に抗原性を与える脂質またはハプテン）。本発明の抗原は、天然に存在する物質であり得るかまたは当該分野で公知の方法により合成され得る。

10

【0014】

1つの精製抗原が免疫に使用される場合、抗原は好ましくは、タンパク質性物質または核酸分子である。精製抗原がタンパク質性物質である場合、単独でまたは融合タンパク質の形態で導入され得る。特に、本発明においては、抗原は、組み換えビリオンの表面に発現される融合タンパク質の形態であり得、動物は、組み換えビリオンを注射される。このようなタンパク質性抗原をコードする核酸配列を用いる組み換えビリオンの生成は、Lindleyら、2000に記載されている。

20

【0015】

1つ以上の精製抗原が免疫のために使用される場合、任意の精製抗原の組み合わせが使用され得る。動物は、タンパク質性抗原のみ、非タンパク質性抗原のみ、または両方の混合物を注射され得る。本発明の1つの実施形態に従って、精製抗原は全てタンパク質性である。精製抗原は、同一タンパク質または異なるタンパク質由来のフラグメントであり得る。精製抗原は、cDNAライブラリー由来の組み換えビリオンであり得、各々の組み換えビリオンは、その表面にライブラリー由来のcDNAによりコードされるタンパク質を発現する。

【0016】

さらなる実施形態に従って、本発明は、複数の精製抗原がモノクローナル抗体を精製することが望まれるタンパク質をコードする核酸分子の形態で導入され得る。核酸分子は、DNA分子、cDNA分子、またはRNA分子であり得る。好ましくは、本発明のこの局面において、cDNAライブラリーが、動物に導入され得る。従って、動物に、未知のアイデンティティのタンパク質をコードする核酸分子を注射することが可能であり、記載されるように、細胞チップが、そのタンパク質に対する抗体を単離するのに使用され得、次いで、そのタンパク質が精製される。

30

【0017】

精製抗原が核酸分子である場合、好ましくは、免疫応答が誘導されるタンパク質をコードするDNA、cDNA、またはRNA配列を含む。核酸分子は、裸の核酸分子であり得、またはベクターの形態であり得る。

40

【0018】

ベクターは、ウイルスベクター（好ましくは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、アルファウイルスベクターまたは当業者に明らかな任意の他の適切なベクター）であり得る。あるいは、核酸分子は、非ウイルスベクター（好ましくは、プラスミドベクター）の形態であり得る。多くのこのようなベクターは、当該分野で公知であり、記載されている（例えば、Femandes J. M. & Hoeffler J. P., Gene expression systems Using nature for the art of expression ed. Academic Press, San Diego, London, Boston

50

n, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1998を参照のこと)。このようなベクターはさらに、そのコード配列が適切な転写および翻訳されることを確実にするのに必要とされる調節配列（例えば、エンハンサー、プロモーター、リボソーム結合部位、および終結シグナル）を、遺伝子の5'および3'非翻訳領域に含み得る。

【0019】

あるいは、核酸分子は、ポリカチオン縮合DNA（死滅したアデノウイルス単独に連結されていても連結されていなくともよい）（例えば、Curie l (1992) Hum Gene Ther 3:147-154を参照のこと）であり得るかまたは、リガンド結合DNA（例えば、Wu (1989) J Biol Chem 264:169850-16987を参照のこと）であり得る。核酸分子はまた、DNAコートラテックスビーズの形態であり得る。あるいは、核酸分子は、例えば、WO95/13796、WO94/23697、WO91/14445、およびEP524,968.SA91(24):11581-11585に記載されるように、リボソーム中にカプセル化され得る。

10

【0020】

抗原は、任意の適切な手段により動物中に導入され得る。好ましくは、導入方法は、注射を伴う。動物は、精製抗原で、脾臓内、静脈内、腹腔内、皮内、もしくは皮下的に、または任意の他の適切な手段により免疫され得る。動物は、これらの1つ以上の経路を通じて精製抗原で免疫され得る。例えば、精製抗原のいくつかは、腹腔内注射され得、残りは皮下注射され得る。注射手段は、注射される抗原に依存する。例えば、核酸分子の注射の場合、US5,149,655に記載されるような手持ち遺伝子移入粒子銃が、核酸分子を注射するのに使用され得る。

20

【0021】

タンパク質性抗原の場合、各抗原の用量は、好ましくは、0.01~1000μgの範囲であるべきである。

【0022】

好ましくは、本発明の方法は、抗体産生細胞の除去前に動物に導入された抗原のいくつかまたは全てのブースター用量を動物に供給するさらなる工程を包含する。動物は、最初の注射の1~365日後にブースターを与えられ得る。好ましくは、動物は、1~20回ブーストされ得る。

30

【0023】

好ましくは、本発明の方法において使用される免疫プロトコルは、1つの抗原が免疫優勢となるのを防止するために1つ以上の抗原が使用される場合、短い。好ましくは、動物が1つ以上の抗原で免疫される場合、各抗原のブースターまたは1つ以上の抗原のブースターの組み合わせが、最初の注射の3日後に注射され、最初の注射の5日後に、さらなるブースターが注射されて、脾臓組織またはリンパ節が、第6日~第15日に除去される。より長い免疫プロトコルが所望される場合、動物には、例えば、最初の注射の21日後に各抗原のブースターまたは1つ以上の抗原のブースターの組み合わせが注射され得、脾臓組織またはリンパ節が第26日に除去される。

40

【0024】

動物の免疫は、薬学的キャリアを使用してまたは使用せずに実施され得る。適切なキャリアは、代表的に大きく、ゆっくりと代謝される高分子（例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体（例えば、油滴またはリボソーム）、および不活性ウイルス粒子）である。このようなキャリアは、当該分野で周知である。さらに、これらのキャリアは、免疫刺激剤（「アジュバント」）として機能し得る。動物の免疫は、薬学的キャリアに加えて、アジュバントを使用してかまたは使用せずに実施され得る。

【0025】

この組成物の効果を強化する好ましいアジュバントとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（1）アルミニウム塩（アルミナ）（例えば、水酸化アルミニウム、

50

リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど) ; (2) オイルインウォーター処方物 (他の特別な免疫刺激剤 (例えば、ムラミルペプチド (以下を参照のこと) または細菌細胞壁成分) を有するものまたは有さないもの)、例えば、(a) MF59TM (WO90/14837; Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, Powell & Newman 編、Plenum Press, 1995 の第10章) (5% Squalene、0.8% Tween80、および0.5% Span85を含有し (必要に応じて、MTP-PEを含有する) マイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子に処方される)、(b) SAF (10% Squalene、0.4% Tween80、5% プルロニックブロックポリマー L121、および thr-MDP を含有し、サブミクロンエマルジョンまでマイクロフルイダイズされるか、または大きな粒子サイズのエマルジョンを生成するためにボルテックスされる)、および (c) RibitTM アジュバントシステム (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) (2% Squalene、0.2% Tween80、およびモノホスホリルリピド A (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS) からなる群から選択される1つ以上の細菌細胞壁成分を含有する (好ましくは、MPL + CWS (DetoxTM)) ; (3) サポニンアジュバント (例えば、QS21 または StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) は、使用され得るかまたは粒子がそれらから生成される (例えば、ISCOM (免疫刺激複合体) (ISCOM は、さらなる界面活性剤を含まない (例えば、WO00/07621)) ; (4) 完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA) ; (5) サイトカイン (例えば、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 (WO99/44636) など) ; インターフェロン (例えば、インターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF) など ; (6) モノホスホリルリピド A (MPL) または 3-O-デアシル化 MPL (3dMPL) (例えば、GB2220221、EP-A-0689454)、必要に応じて、肺炎球菌多糖が使用される場合、アルミナの非存在下で (例えば、WO00/56358) ; (7) 3dMPL と例えば、QS21 および / または オイルインウォーターエマルジョンの組み合わせ (例えば、EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231) ; (8) CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド (例えば、Romanら, Nat. Med. 1997, 3, 849-854; Weinerら, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davisら, J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chuら, J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipfordら, Eur. J. Immunol. 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanuら, Vaccine, 1998, 16, 1216-1224, Kriegら, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinmanら, PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballasら, J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowderyら, J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpenら, Cell Immunol, 1996, 167, 72-78; Yamamotoら, Jpn J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Staceyら, J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messinaら, J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yiら, J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yiら, J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yiら, J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; および Yiら, J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; 国際特許出願 WO96/02555、WO98/16247、WO98/16247、WO98/40100、WO98/55495、WO98/37919、および WO98/52581) (すなわち、少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含有し、必要に応じて、5-メチルシトシンがシトシンの

10

20

30

40

50

代わりに使用される) ; (9) ポリオキシレチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル (例 えば、WO 9 9 / 5 2 5 4 9) ; (1 0) オクトキシノールとポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤の組み合わせ (WO 0 1 / 2 1 2 0 7) または少なくとも1つのさらなる非イオン性海面活性剤 (例 えば、オクトキシノール) とポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤との組み合わせ (WO 0 1 / 2 1 1 5 2) ; (1 1) サポニンおよび免疫刺激オリゴヌクレオチド (例 えば、C p G オリゴヌクレオチド) (WO 0 0 / 6 2 8 0 0) ; (1 2) 免疫刺激剤および金属塩粒子 (例 えば、WO 0 0 / 2 3 1 0 5) ; (1 3) サポニンおよびオイルインウォーターエマルジョン (例 えば、WO 9 8 / 5 7 6 5 9) ; (1 4) サポニン (例 えば、Q S 2 1) + 3 d M P L + I L - 1 2 (必要に応じて、+ステロール) (例 えば、WO 9 8 / 5 7 6 5 9) ; (1 5) 免疫刺激剤として作用し組成物の効果を強化する他の物質。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、Montanide ISA 50、Hunter's Titer Max、およびGerbu Adjuvantが挙げられる。

10

【 0 0 2 6 】

本発明において使用するのに好ましい抗体産生細胞としては、B細胞、T細胞、および幹細胞が挙げられる。本発明において使用するこれらの抗体産生細胞は、動物から免疫系の任意の適切な細胞成分を取り出すことにより回収され得る。好ましくは、抗体産生細胞は、脾臓、リンパ節、もしくは骨髄、またはそれらの一部を取り出すことにより動物から回収される。これらは、任意の適切な手段によって、本発明の方法の工程 b) に従って単一の細胞懸濁物にされ得る。好ましくは、動物から取り出された脾臓組織、リンパ節、または骨髄は、機械的破壊またはプロテアーゼによる酵素消化により単一の細胞懸濁物にされ得る。赤血球細胞は、低張溶解により細胞懸濁物から取り出され得る。

20

【 0 0 2 7 】

好ましくは、本発明の方法の工程 c) において特定される不死化細胞株は、単一細胞懸濁物中の細胞と骨髄腫細胞との体細胞融合により生成されるハイブリドーマ細胞である。単一細胞懸濁物中の細胞は、融合原 (f u s o g e n) により骨髄腫細胞に融合される。使用され得る骨髄腫細胞の例としては、S P 2、N S 1、およびN S 0が挙げられる。好ましくは、融合原は、P E G、ウイルス、または電気融合の方法である (Z i m m e r m a n n ら , 1 9 9 0) 。

【 0 0 2 8 】

単一細胞懸濁物と骨髄腫細胞との融合により生成されるハイブリドーマ細胞は培養される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞は、選択培地 (例 えば、アザセリンヒポキサンチンまたはヒポキサンチンアミノプテリンチミジン) 中で最初に培養され、次いで、非選択培地中に移される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞は、選択培地中で7日間培養され、次いで、非選択培地に3日間移される。このことにより、細胞の増殖速度がスクリーニング工程前に増加する。好ましくは、ハイブリドーマ生成に伴う工程は、そのプロセスの速度向上のためにロボットにより実施される。実施例は、ハイブリドーマ細胞生成に伴う工程をロボットにより実施する1つの方法を示している。

30

【 0 0 2 9 】

あるいは、不死化細胞株は、単一細胞懸濁物中の細胞を不死化ウイルス感染させることにより生成された細胞株であり得る。好ましくは、不死化ウイルスは、エプスタイン-バーウイルスである (例 えば、E p s t e i n B a r r V i r u s P r o t o c o l s , W i l s o n および M a y 編 , H u m a n a P r e s s ; I S B N : 0 8 9 6 0 3 6 9 0 1 を参照のこと) 。

40

【 0 0 3 0 】

本発明の方法の工程 d) は、不死化細胞株 (好ましくは、ハイブリドーマ細胞株) の上清を、動物が免疫された候補抗原を含むタンパク質チップに対してスクリーニングする工程を包含する。本明細書中で使用される場合、「タンパク質チップ」は、候補抗原が取り付けられた支持手段で構成される任意のマイクロアレイを包含するよう使用される。

【 0 0 3 1 】

50

1つのみの精製抗原が動物に導入される場合、その精製抗原がタンパク質チップ上に取り付けられ、さらなる抗原は取り付けられない。1つ以上の精製抗原が動物に導入される場合、各々の精製抗原は、タンパク質チップ上の異なる位置に（好ましくは、予め決定された位置で）提示され得る。従って、タンパク質チップ上の各位置は、異なる抗原を提示し得る。あるいは、同一抗原が、タンパク質チップのある列またはカラムに各位置に取り付けられ得、異なる抗原が、各列またはカラムに提示される。いくつかの場合、動物が1つ以上の精製抗原で免疫される場合でさえも、各抗原について異なるチップを有することが望ましい。タンパク質チップは、チップ上の予め決定された位置に、多数の（例えば、1～1000の）精製抗原を有し得る。

【0032】

当該分野で公知の任意のタイプのタンパク質チップが、本発明の方法において使用され得る。例えば、タンパク質チップは、精製抗原が取り付けられたガラススライドであり得る。1つのみの抗原が試験される場合、このようなスライドは、単に、アミノシラン（Ansoerge, Faulstich）で顕微鏡ガラススライドをコーティングし、そのスライドに抗原含有溶液を添加し、そして乾燥させることにより調製され得る。アミノシランでコーティングされたスライドは、精製抗原のコーティングのために、TelechemおよびPierceから入手され得る。好ましくは、このようなガラススライドは、（6-アミノヘキシル）アミノシランでコーティングされ得る。

【0033】

本発明の方法において使用され得る他のタイプのタンパク質チップとしては、3Dゲルパッド（Arkenora, 2000）およびマイクロウェルチップが挙げられる。当業者に明らかなように、想定されていないが将来考案され得るタイプのタンパク質チップは、本発明に従う使用に適していることが十分証明されている。

【0034】

用語「タンパク質チップ」はまた、「細胞チップ」と称される、規定されたcDNAを発現する細胞のマイクロアレイ（Ziauddinら, 2001）を包含する。この技術において、哺乳動物細胞は、規定位置に異なるcDNAがプリントされたガラススライド上で培養される。プリントされた位置で培養した細胞はそのcDNAを取り込み、発現する。細胞チップは特に、上記のように、動物にcDNAもしくはcDNAライブラリーまたは組み換えビリオンもしくはcDNAライブラリーから生成されたビリオンが注射される場合に有用である。このような場合、そのcDNA配列によりコードされるタンパク質は、単離され得ない。動物に、そのタンパク質をコードするcDNAまたはそのcDNAを発現する組み換えビリオンを注射することによって、そのcDNAにより発現されるタンパク質に対するモノクローナル抗体を生成することが可能である。同一のcDNAが細胞チップを用いて発現される場合、これらの抗体は結合し、その結合は以下のようにして検出され得る。そのタンパク質をコードする核酸配列が利用可能にすることにより、本発明は、この様式において、タンパク質自体を精製するのに使用され得るタンパク質に対するモノクローナル抗体の検出および単離を可能にする。

【0035】

抗体の選択のために、またはこのような抗体を生成する不死化細胞株の選択のために、不死化細胞株の上清が、タンパク質チップの規定位置にスポットされる。上清のスポットは、好ましくは、ロボットにより実施される（例えば、Telechemピンを用いるGenemachines Ominigriderを用いて）。好ましくは、タンパク質チップ上にスポットされる上清は、スライド上での抗体の乾燥および固定を最小限に抑えるためにグリセロールを含む。例えば、0～99%のグリセロールが使用され得る。次いで、チップは、洗浄されて未結合上清が除去される。この段階で、不死化細胞株により生成される、すなわち、上清中の任意のモノクローナル抗体がチップ上の抗原に結合され得る。

【0036】

異なる溶出条件を用いることによって、この方法は、その結合パートナーに対するモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体の結合親和性のおよその定量を可能にする。使用され得る溶出剤としては、カオトロピック剤（例えば、0.01重量%～100重量%の塩酸グアニジンまたは尿素）が挙げられる。溶出はまた、0.01モラー～飽和溶液の間の濃度（好ましくは200mM）、pH9～pH1の間のpH（好ましくは、pH3.2）の水性溶液または非水性溶液を用いて実施され得る。高pH溶出は、1μモラー～飽和溶液（好ましくは、100mM）のトリエチルアミン、pH8～pH13の間（好ましくは、pH11.5）の水性または非水性溶液を用いて実施され得る。

【0037】

本発明の方法の工程e)は、抗原に結合するモノクローナル抗体の選択を含む。好ましくは、この工程は、モノクローナル抗体に結合し、そしてその存在を示すマーカーを添加することによるような検出工程を取り込む。好ましくは、このマーカーは、その存在を検出されるようにする酵素または蛍光標識のような標識で標識される。例えば、マーカーは、標識されたプロテインAまたは標識されたプロテインGであり得る。プロテインAまたはプロテインGは、Cy3またはCy5のような蛍光標識で標識され得る。あるいは、プロテインAまたはプロテインGは、その存在が標識されたストレプトアビジンまたはアビジンの結合により検出され得るビオチンのような酵素的標識で標識され得る。

10

【0038】

好ましくは、このマーカーは、第1の抗体に結合する抗体である。好ましくは、この抗体は、酵素的または蛍光標識のような標識で標識されている。好ましくは、この抗体は、蛍光標識で標識され、これは、検出のために用いられるDNAチップの走査のために灰初

20

【0039】

好ましくは、抗原に結合したモノクローナル抗体を検出する工程は、モノクローナル抗体をイソタイピングすることを包含する。好ましくは、モノクローナル抗体を検出およびイソタイピングするこの工程は、イソタイプ特異的抗免疫グロブリン抗体を上記タンパク質チップに添加することであって、ここで、異なるイソタイプ特異性を有する各抗免疫グロブリン抗体は異なる標識を有すること、およびこれら標識の存在を検出することを包含する。この方法は、モノクローナル抗体の同時検出およびそのイソタイプの決定を可能にする。

【0040】

この方法は、免疫化された動物中の抗体イソタイプが存在するのと同じ数の多くの異なるイソタイプ特異的抗免疫グロブリン抗体を採用し得ることが認識される。例えば、マウスのような哺乳動物が抗原を注射された場合、この抗原に結合したモノクローナル抗体を検出およびイソタイピングする工程は、第1の標識で標識された抗-IgA抗体、および/または第2の標識で標識された抗-IgD抗体、および/または第3の標識で標識された抗-IgE抗体、および/または第4の標識で標識された抗-IgG1抗体、および/または第5の標識で標識された抗-IgG2a抗体、および/または第6の標識で標識された抗-IgG2b抗体、および/または第7の標識で標識された抗-IgG3抗体、および/または第8の標識で標識された抗-IgG4抗体、および/または第9の標識で標識された抗-IgM抗体を添加することを包含する。あるいは、この抗原に結合したモノクローナル抗体を検出およびイソタイピングする工程は、可能なイソタイプのサブセットに結合するイソタイプ特異的抗免疫グロブリン抗体を添加することを包含する。好ましくは、このイソタイプ特異的抗免疫グロブリン抗体は、第1の標識で標識された抗IgM抗体、および第2の標識で標識された抗IgG抗体を含む。好ましくは、この標識は、蛍光標識である。

30

40

【0041】

標識の検出は、抗原に結合したモノクローナル抗体の存在を示し、そして好ましくはロボットによってなされる。標識が蛍光標識の場合、標識の検出、そしてそれ故モノクローナル抗体の存在は、走査タンパク質チップのために利用可能な装置を用いてなされ得る。例えば、これらチップの走査は、GenePix 4000Bスキャナー(Axon I

50

nstruments、Inc.)で、またはTecan LS200またはLS400スキャナーでなされ得る。走査は、1～4の間のレーザーおよび複数蛍光標識の可視化を可能にするフィルターもの組み合わせで実施され得る。好ましくは、複数蛍光標識の可視化は、同時に実施されるが、それは逐次的に実施され得る。

【0042】

イメージは、GenePix Proソフトウェア(Axon Instrument s Inc.)、Chipskipperソフトウェア(Schwager、Anso r ge)またはTecan LS200またはLS400ソフトウェアのような適切なソフトウェアを用いて得られ、かつ分析され得る。

モノクローナル抗体の検出が信頼性あることを確実にするために、このスクリーニング法は、好ましくは、種々のコントロールを採用する。例えば、1つの抗原で被覆されたタンパク質チップの場合、本発明の方法によって生産された不死化細胞株からの上清のみならず、ポジティブおよびネガティブコントロールが、タンパク質チップ上にスポットされる。

10

【0043】

ポジティブコントロールは、先に試験されたモノクローナル抗体であるか、または市販で入手可能なポリクローナル抗体であり得る。あるいは、ポジティブコントロールは、免疫化マウスから、追加免疫後の適切な期間、またはB細胞の供給源の収集のために屠殺されるとき先に回収された希釈または非希釈血清からなり得る。

【0044】

ネガティブコントロールは、規定された位置におけるモック上清の形態であり得る。別のレベルのコントロールが、各上清は、いくつかの抗原に対してスクリーニングされるという事実によって決定される。唯一の抗原に対して得られるシグナルが、上清を含む可能なポジティブモノクローナル抗体であると考えられる。

20

【0045】

タンパク質チップ上のポジティブシグナルは、本発明の方法の工程e)によって単離されるモノクローナル抗体を可能にする特定の不死化細胞株に由来し得る。同定される抗体のさらなる特徴付けが、次いで、実施され得る。

【0046】

抗体のさらなる特徴付けを実施するための方法は、例えば、同定されるモノクローナル抗体の特異性を決定するさらなる工程を包含し得る。例えば、本発明の方法によって同定されるモノクローナル抗体は、その表面に係留される多数の異なるタンパク質を有する第2のタンパク質チップを走査するために用いられ得、モノクローナル抗体が1つの抗原に特異的に結合するか否かを確立する。タンパク質の初期同定における上記に記載の走査方法は、その特異性を走査するために用いられ得る。本発明の方法により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性および親和性は、上記に記載のように、タンパク質チップ上の抗原の濃度を改変することによるか、または溶出条件のストリンジェンシーを改変することによりさらに特徴付けられ得る。

30

【0047】

本発明の第1の局面のさらなる実施形態によれば、目的のモノクローナル抗体を産生する不死化細胞株を生成する方法が提供され、この方法は以下の工程：

40

- a) 少なくとも1つの候補抗原を動物中に導入する工程；
- b) この動物から抗体産生細胞を回収し、そしてこれら細胞を単一細胞懸濁液に与える工程；
- c) この単一細胞懸濁液から、不死化細胞株を生成する工程；
- d) この不死化細胞株の上清を、候補抗原がその上に提示されるタンパク質チップに対してスクリーニングする工程；および
- e) 上記不死化細胞株として、上記候補抗原に結合する抗体を含む上清を生成する細胞株を選択する工程、を包含する。

【0048】

50

このような方法によって産生される不死化細胞株は、仕立てられた特異性をもつ抗体の生成において莫大な有用性がある。

【 0 0 4 9 】

本発明の第 1 の局面の詳細な実施形態によれば、複数のモノクローナル抗体であって、それらの各々が異なる候補抗原に結合するモノクローナル抗体のハイスループット方法が提供され：

- a) 複数の候補抗原を動物中に導入する工程；
- b) 上記動物から抗体生産性細胞を回収する工程であって、そしてこれら細胞を単一細胞の懸濁液にする工程；
- c) 上記単一細胞懸濁液から不死化細胞株を生成する工程；
- d) この不死化細胞株を、候補抗原がディスプレイされる 1 つ以上のタンパク質チップに対して上記上清液をスクリーニングする工程；および
- e) 上記モノクローナル抗体として、上記候補抗原に結合する抗体を選択する工程を包含する。

10

【 0 0 5 0 】

候補抗原は、好ましくは、上記のように、精製された候補抗原である。この候補抗原動物中に導入し、抗体産生細胞を回収し、不死化細胞株を生成し、そして不死化細胞株の上清液をスクリーニングするための適切な手順は、上記に記載されている。

【 0 0 5 1 】

先行技術の方法は、単一の抗原に対するモノクローナル抗体を生成かつスクリーニングするための骨が折れ、かつ時間を消費する手順を含む。対照的に、本発明の方法は、複数の抗原に対して同時にモノクローナル抗体の生成およびハイスループットスクリーニングを可能にする。抗体のハイスループットスクリーニングを実施するためのタンパク質チップの使用は、従来のアッセイの使用より効率的かつ正確であり、そして必要とする候補抗原はより少ない。

20

【 0 0 5 2 】

好ましくは、本実施形態の工程 e) は、上記のように、モノクローナル抗体をイソタイプ分けすることを包含する。これは、モノクローナル抗体の同時の検出およびイソタイプ分けを開示しない先行技術の方法に対してさらなる利点を提供する。

【 0 0 5 3 】

本発明の第 2 の局面によれば、本発明の方法により産生されたモノクローナル抗体が提供される。本発明はまた、例えば、全生物のプロテオームを含む仕様の抗体のバンクを生成するために用いられ得る。

30

【 0 0 5 4 】

本発明の第 3 の局面によれば、好ましくはハイブリドーマ細胞株である不死化細胞株が提供され、これは、本発明の第 2 の局面によるモノクローナル抗体を産生する。本発明のこの局面はまた、好ましくはハイブリドーマ細胞株のバンクである不死化細胞株のバンクを含む。本発明はまた、例えば、全生物のプロテオームを包含する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株のバンクを生成するために用いられ得る。

40

【 0 0 5 5 】

本発明の第 4 の局面によれば、複数のモノクローナル抗体を産生するための方法が提供され、その各々は、異なる精製候補抗原に結合し、複数の精製候補抗原を動物中に導入する工程を包含する。

【 0 0 5 6 】

好ましくは、各候補抗原は、異なる供給源に由来し得る。これは、各抗原が異なるタンパク質、異なる核酸などに由来することを意味する。同じタンパク質の異なるフラグメントを動物に注入することを含む抗体産生の方法は、本発明のこの局面の範囲から排除されることが意図される。例えば、精製候補抗原は、それらが必ずしもすべてが同じタンパク質のフラグメントではないことを前提に、すべてタンパク質性の物質であり得る。

【 0 0 5 7 】

50

この方法は、先行技術に開示される方法に対し、それが、1つ以上のモノクローナル抗体の同時産生を可能にし、その各々は、異なる精製候補抗原に結合するという利点を有する。

【0058】

動物は、本明細書に記載の任意の技法を用いて精製抗原で注射され得る。例えば、本発明のこの局面の方法は、免疫化動物から、脾臓組織、リンパ節または骨髄を取り出すこと、およびそれらを単一細胞懸濁物にすることによるような、B細胞、T細胞および幹細胞のような抗体産生細胞を回収する工程をさらに包含し得る。この方法は、この単一細胞懸濁物の細胞から、好ましくはハイブリドーマ細胞株である、不死化細胞株を精製する工程をさらに包含し得る。好ましくは、本発明のこの局面の方法は、これら工程を包含し、
10
そしてさらに、候補抗原が提示されるタンパク質チップ（単数または複数）に対し、好ましくはハイブリドーマ細胞株である不死化細胞株の上清液をスクリーニングする工程；および、好ましくは、モノクローナル抗体を産生するこれらおよび/または不死化細胞株を単離する工程をさらに包含する。不死化細胞株を精製し、そして次いで上清液のスクリーニングのための適切な手順は、本発明の第1の局面の方法と組み合わせて上記に記載のものと
同じである。特に、モノクローナル抗体を検出する工程は、上記のように、同時のモノクローナル抗体の検出とこのイソタイプの決定とを含み得る。さらに、この方法は、上記のような、モノクローナル抗体のさらなる特徴付けを含み得る。

【0059】

本発明はまた、本発明のこの局面の方法によって産生されるモノクローナル抗体を提供
20
する。ここで、再び、本発明のこの局面は、例えば、全生物体のプロテオソーム中のタンパク質の特異性をもち抗体を包含する抗体のバンクを生成するために用いられ得る。このような抗体のバンクは、本発明のさらなる局面を表す。

【0060】

本発明はまた、好ましくはハイブリドーマ細胞株である不死化細胞株を提供し、これは、上記のようにモノクローナル抗体を産生する。本発明はまた、例えば、全生物体のプロテオソームを包含する抗体を産生する、好ましくはハイブリドーマ細胞株のバンクである不死化細胞株のバンクを生成するために用いられ得る。

【0061】

本発明の第5の局面によれば、本発明の第2の局面によるモノクローナル抗体に結合する抗イディオタイプ抗体が生成され得る。抗イディオタイプ抗体は、それらは、それに対して当初の抗体が惹起される分子の形状を模倣する可変領域を有するので、有用である。抗イディオタイプ抗体は、それ故、当初の抗体が惹起された分子の置換物として治療において有用であり得る。抗イディオタイプ抗体は、生成候補抗原として本発明の第2の局面によるモノクローナル抗体を用い、本発明の第1の局面または本発明の第5の局面の方法を採用することにより産生され得る。
30

【0062】

従って、本発明のこの局面は、本発明の第2の局面によるモノクローナル抗体に結合する抗イディオタイプ抗体を産生する方法を提供し、この方法は、本発明の第1の局面または本発明の第4の局面の方法において、精製候補抗原として本発明の第2の局面によるモノクローナル抗体を用いる工程を包含する。本発明はまた、このような方法により生成される抗イディオタイプ抗体を包含する。
40

【0063】

本発明の第6の局面によれば、本発明の第5の局面に従って産生された抗イディオタイプ抗体に結合する抗-抗イディオタイプ抗体が生成され得る。このような抗-抗イディオタイプ抗体は、精製候補抗原として上記に記載のような抗イディオタイプ抗体を用い、本発明の第1の局面または本発明の第4の局面の方法を採用することにより産生され得る。本発明のこの局面は、それ故、本発明の第5の局面によって生成された抗イディオタイプ抗体に結合する抗-抗イディオタイプ抗体を産生する方法を提供し、この方法は、本発明の第5の局面または本発明の第4の局面の方法において、精製候補抗原として上記に記載
50

のような抗イディオタイプ抗体を用いる工程を包含する。

【0064】

本発明の種々の局面および実施形態は、いまや、実施例によってより詳細に説明される。詳細の改変が本発明の範囲から逸脱することなくなされ得ることが認識される。

【実施例】

【0065】

(実施例1：10のタンパク質抗原での免疫化)
(免疫化)

8週齢の雌のBa1b/cマウスに、100 μ lのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中の10のタンパク質抗原の各々の10 μ gを、脾臓内に注入した。3日目に(3日)、マウスは、100 μ lのPBS中の同じ10のタンパク質抗原を脾臓内に注入された。5日目に、同じマウスに、0.1 μ gの同じ10のタンパク質抗原の各々を静脈内注射した。8日目に、マウスを頸部脱臼により殺傷し、そして脾臓を取り出し、そしてダルベッコの改変イーグル培地(DMEM:Life Technologies Inc.)中に集めた。

10

【0066】

(融合)

すべての工程は、層流フード内の滅菌または無菌条件下で実施する。脾臓を、2つのフロスティング端部ガラス顕微鏡スライド間の機械的破壊により単一細胞懸濁物にした。この懸濁物を、50mlのバーコードを付けた円錐底チューブ(BD Falcon)中に、70 μ mのナイロン細胞ストレイナー(BD Falcon)を通じて濾過し、そしてロボットシステムに移した。

20

【0067】

別個に、SP2骨髄融合パートナー(ATCC)を、融合前5日間の間、HM20(DMEM、2%規定ウシ胎児血清(Hyclone Defined)、10mM L-グルタミン、50 μ Mゲンタマイシン)中で培養し、そして融合の日に、HM20/HCF/2 \times OPI(10%ハイブリドーマクローニング因子(Origen)および2%OPIクローニング上清液(Sigma)を含むHM20)に、37 $^{\circ}$ Cで少なくとも1時間の間、5%CO₂インキュベーター中に移した。

【0068】

バーコードは、バーコードリーダーによって読み取られ、そして50mlのFalconチューブは、genesis Freedom system(Tecan)上のRomaアームによって、ローター上に載せられた。このローターは、作業デッキを通して遠心機中に載せられた。

30

【0069】

チューブを、100g、10分間、室温(RT)で遠心分離し、そして遠心分離機からローターを取り出した。チューブをローターから取り出し、そしてバーコードを再び読み取り、バランスチューブから区別した。細胞を、5mlの赤血球細胞溶解緩衝液(Sigma)中に、RTで9分間再懸濁した。HM20を50mlまで添加し、そしてチューブをもう一度ブレーキなしでRTで10分間遠心分離した。上清溶液を吸引して棄て、そして細胞を37 $^{\circ}$ Cに予熱したDMEM中に再懸濁した。細胞を、遠心分離および再懸濁の工程により2回以上洗浄した。50 μ lの細胞懸濁物をロボットにより1.5mlの微量遠心分離機チューブにピペットでとった。細胞を、血球計の計数チャンバーを用いて計数した。

40

【0070】

同時に、SP2細胞を同様の様式で3回洗浄し、そして同様のアリコート(50 μ l)が、血球計計数のために1.5mlチューブに「引き渡された(handed off)」。SP2骨髄腫および脾臓細胞を、1:5(SP2:脾臓)の比で混合し、そして再び、100gで10分間ブレーキなしで再び遠心分離した。

50

上清溶液を、全て、廃液に吸引し、そして予め37 に加熱した50% HEPES中のポリエチレングリコール1500 (PEG: Roche Molecular Biochemicals) を、Te-シェイクシェイカー (Tecan AG) で450 rpmで回転させながら、1分間かけてスムーズにかつ徐々にロボットによりピペティングして、均一な混合を確実にした。この細胞/PEG混合物を、穏やかに攪拌しながら、37 で1分間インキュベートした。1 mlのDMEMを、同様に攪拌しながら、同様にして37 で1分間かけて添加した。この混合物を、穏やかに攪拌しながら、37 で1分間インキュベートした。さらに1 mlのDMEMを、穏やかに攪拌しながら、37 で1分間かけてロボットで添加し、そしてさらに1分間、同様にインキュベートした。7 mlのHM20を、穏やかに攪拌しながら、37 で3分間かけてロボットで添加した。次いで、この管を、ブレイクを用いて、90 gで5分間回転させた。上清を廃液に吸引し、ペレットを、20 mlのHM20/HCF/OPI/AH (HM20/HCF/OPI+10% アザセリンヒポキサンチン (Sigma)) に再懸濁した。

10

【0071】

このコニカル管を再びロボットワークデッキ (work deck) 上に配置し、融合後の細胞スラリーを、このロボットの液体操作アームの8個のワイドボアピペットチップの各々によって吸引した。200 μ lの細胞スラリーを、次いで、96ウェルディープウェルプレート (Greiner Master block) の各ウェルにピペティングした。

【0072】

20

このディープウェルプレートを、次いで、Genesisワークデッキに組み込まれたTeMo96ウェルピペティングロボットに、ロボットで移し、そして供給源プレートとして使用して、20個の滅菌96ウェル組織培養プレートにプレートアウトした。

【0073】

この融合後混合物を、次いで、ロボットに取り付けられかつ組み込まれたカルーセルからの20個の96ウェル滅菌プレート (Nunc) にロボットで、100 μ l/ウェルでプレートアウトし、そして組み込まれたエアロックを通して10% CO₂を含む一体型の37のインキュベーターにロボットで移した。プレートを、このインキュベーターと共に含まれるカルーセルに貯蔵した。

【0074】

30

(細胞培養物)

3日目に、融合細胞をインキュベーターからワークデッキにロボットで移し、さらなる100 μ lのHM20/HCF/OPI/AHをロボットで添加した。次いで、これらのプレートを、インキュベーターにロボットで戻した。

【0075】

7日目に、同様に、これらのプレートを再びインキュベーターからワークデッキに移し、そして200 μ l/ウェルの培養物上清を廃液に吸引し、そして150 μ lの新たなHM20/HCFと交換した。

【0076】

11日目に、これらのプレートを、ワークデッキに再び移し、そして30 μ lの上清を各ウェル (Temo head: Tecan Inc.) から回収し、そしてカルーセルプレートスタッカー (Techan Inc) によってワークデッキに供給された384ウェルプレートに移した。

40

【0077】

(マイクロアレイスクリーニング)

アミノシラン被覆ガラススライドを、1~5 μ gの抗原を含む40 μ lのddH₂Oを滴下することによって、精製抗原で均一に被覆し、そして室温の湿潤チャンバ中で60分間、20 * 60 mmのカバーガラスで覆った。

【0078】

被覆スライドをPBSで軽くリンスし、そしてPBS中5%のミルク、0.1%のTW

50

e e n中で60分間ブロックし、次いで、PBSで10分間洗浄した。次いで、このチップを、2000rpmで10秒間遠心分離によって乾燥した。

【0079】

培養物上清を、Beckman Biomek FXロボットを使用して、384ウェルプレートに固定した。

【0080】

培養物上清を、GeneMachines OmniGridマイクロアレイプリンターを使用して、9600スポット/チップの密度、および約120 μ mのスポットサイズで、3つの同一の抗原被覆スライドに別々にプリントした。

【0081】

これらのマイクロアレイチップを、室温で60分間、湿潤チャンバ内でインキュベートし、次いで、5 \times 5分間、PBS-0.1%Tween(PBST)で洗浄した。

【0082】

40 μ lのCy3結合体化ヤギ抗マウスIgG特異的抗体およびCy5結合体化ヤギ抗マウスIgM特異的抗体を、PBSTで1:1000に希釈し、混合し、そしてこれらのチップに均一に塗布し、そして22 \times 60mmのカバーガラスで覆い、そして湿潤チャンバ中で、室温で30分間インキュベートした。次いで、これらのチップを、2 \times 10分間、PBSTで、2 \times 10分間PBSで、そして1 \times 10分間ddH₂Oで洗浄した。これらのチップを、2000rpmで10秒間遠心分離することによって乾燥した。

【0083】

(ヒットピッキング)

チップを、10 μ m \cdot ピクセル⁻¹の解像度で、GenePix 4000Bスキャナ(Axon Instruments)でスキャンした。PMT電圧は、Cy3チャンネルおよびCy5チャンネルについて、それぞれ、540Vおよび610Vであった。両方のレーザーを、100%強度に設定した。スキャンされたチップの各々を、一致したグリッドに割当て、そして全てのスポットをGenePix Pro 3.0(Axon Instruments)によって分析した。

【0084】

全てのチップを、GenePix Pro 3.0ソフトウェアによって分析し、そして本発明者らは、Cy3チャンネルおよびCy5チャンネルについて、各スポットの補正強度(I_c) (強度の中央値 - バックグラウンド)に関する情報を各チップについて収集した。このデータから、本発明者らは、各チップについて、各チャンネルの全補正強度に対する各スポットの寄与を得た。

【0085】

【数1】

$$\left(\frac{I_c}{\sum_1^{9600} I_c} \right) \times 100$$

各チャンネルの3つの値を各スポットについて平均し、そしてこの平均補正強度(I_a)をデータセットの最終分析に使用した。本発明者らは、0.5%より上の値を有するサンプルを、「ポジティブである可能性が高い」サンプルであるとみなし、そして1.5%より高い値を示す全てのサンプルを「確実にポジティブ」であるとみなす。

【0086】

(ポストスクリーニング処理)

ポジティブウェル由来の細胞を、ウェルに再懸濁し、そして20 μ lを96ディープウェルプレート(これはあらかじめ1.5mlのHM20/HCFで満たされている)に移し、そして37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で48時間、インキュベータに戻した。

【0087】

10

20

30

40

50

1. 4 ml の培養物のそれぞれの上清を別のディープウェルプレートに移し、そして残りの 100 μ l を使用して、細胞を再懸濁し、これを凍結バイアル (90% ウシ胎児血清 / 10% DMSO (Sigma) を含む) に移し、これから液体窒素貯蔵所に -80 で 2 時間かけて移した。次いで、培養物上清を、生成したモノクローナル抗体の評価およびさらなる特徴付けのために使用した。

【0088】

(結果)

マイクロアレイスクリーニングの結果を、図 1 に示す。この図は、多数のポジティブモノクローナル抗体が、スライド上の候補抗原に結合して検出されたことを示す。緑色のスポットは、候補抗原に結合した IgG モノクローナル抗体であり、一方、赤色のスポットは、候補抗原に結合した IgM モノクローナル抗体である。従って、図 1 は、本発明の方法を使用して、候補抗原に結合するモノクローナル抗体と、これらのモノクローナル抗体のアイソタイプとを同時に同定することができることを示す。

【0089】

タンパク質チップの代わりに ELISA を使用して比較実験を行った場合、図 2 に示されるように、マイクロアレイスクリーニングにおいて候補抗原に結合すると同定された多数のモノクローナル抗体は、ELISA を使用して候補抗原に結合すると同定されなかった (マイクロアレイの結果と ELISA の結果との比較を参照のこと)。マイクロアレイスクリーニングを使用してネガティブであることが見出された上清 (Ia: 0.234) はまた、ELISA を使用してもネガティブであることが見出された。しかし、マイクロアレイスクリーニングを使用してポジティブであることが見出された 4 つの上清 (Ia: 5.18、1.96、3.64 および 2.02) のうち、わずか 2 つしか、ELISA を使用してポジティブであることが見出されなかった (図 2 を参照のこと)。ELISA 実験においてネガティブであった上清が、より正確かつ高感度のマイクロアレイアプローチによって検出された場合、どのように実際のポジティブサンプルになり得るかに注意することが重要である。

【0090】

(実施例 2: 9 種の抗原を用いる免疫)

(免疫)

マウスに、25 μ g の 9 種の抗原 (抗原 B5 と Ket94/95 との融合物 25 μ g を含む) を注射した。各抗原は、10 μ g の CpG DNA と混合され、そしてアルミニウムアジュバント (Pierce 製の Imject Alum) に吸着されている。各抗原の半分を、腹腔内投与し、半分を皮下投与した。

【0091】

このマウスを、21 日後に、10 μ g の CpG DNA と混合しアルミニウムアジュバントに吸着させた各抗原 10 μ g でブーストし、ここで、この抗原の半分を腹腔内投与し、半分を皮下投与した。

【0092】

ブーストの 5 日後、脾臓を取り出した。

【0093】

(融合および細胞培養)

融合および細胞培養を、実施例 1 に記載されるようにして実施した。

【0094】

(B5 および Ket94/95 に対する抗体のマイクロアレイスクリーニング)

アミノシラン被覆ガラスを、5 μ g の精製 B5 を含む 40 μ l の ddH₂O を滴下することによって、精製 B5 で均一に被覆し、そして室温の湿潤チャンバ中で 60 分間、20 * 60 mm のカバーガラスで覆った。同じ手順を使用して、精製 Ket94/95 で均一に被覆されたアミノシランガラススライドを作製した。

【0095】

これらの被覆スライドを、PBS 中 3% の BSA を PBS 中 5% のミルクの代わりに使

10

20

30

40

50

用してスライドをブロックしたこと以外は実施例 1 に記載されるようにして、リンスし、ブロックし、洗浄し、そして乾燥した。

【0096】

培養物上清を、実施例 1 に記載されるように、384 ウェルプレートに固定し、そして B5 で被覆したスライドおよび Ket94 / 95 で被覆したスライドに、三連で、約 16000 スポット/チップの密度、約 150 μm のスポットサイズで、Midrogrid II 610 マイクロアレイプリンター (Apogent Discoveries) を使用してプリントした。

【0097】

これらのマイクロアレイチップをインキュベートし、そして Cy3 結合体化ヤギ抗マウス IgG 特異的抗体および Cy5 結合体化ヤギ抗マウス IgM 特異的抗体を、実施例 1 に記載されるようにして、これらにチップに塗布した。

10

【0098】

(ヒットピッキング)

これらのチップを、実施例 1 と同じ手順を使用してスキャンした。平均補正強度 (Ia) を、2 つの培養物上清のセットの各々について計算した。

【0099】

(マイクロアレイスクリーニングと ELISA の比較)

比較実験を実施した。ここで、各培養物上清を ELISA によって試験した。各培養物上清を、B5 抗原または Ket94 - 95 抗原 200 ng を含むウェルに添加し、そしてこの培養物上清中の抗原に結合するモノクローナル抗体の存在を、従来の ELISA を使用して検出した。

20

【0100】

ELISA を使用して 5376 個の培養物上清をスクリーニングし、5376 個の結果 (各上清について 1 つ) を作成するには、1 週間必要であった。対照的に、マイクロアレイチップを使用して三連で同じ 5376 個の培養物上清をスクリーニングし、16128 個の結果を作成するのに 48 時間かかった。このことは、ELISA と比較して、マイクロアレイスクリーニングが効率的であることを示す。

【0101】

さらに、わずか 5 μg の B5 抗原および 5 μg の Ket94 / 95 しか、マイクロアレイスクリーニングを行うのに必要ではなかった (1 チップあたり 5 μg の抗原)。対照的に、96 μg の抗原が、各 ELISA プレートに必要であり、そして 5 個の ELISA プレートが、各抗原をスクリーニングする必要があった。従って、ELISA によるスクリーニングは、マイクロアレイスクリーニングより有意に費用がかかりかつ時間がかかった。

30

【0102】

各 ELISA プレートについて得られたデータを正規化して、各培養物上清の全強度に対する寄与 % を得た。マイクロアレイスクリーニングによって得られた同じ培養物上清の平均複製強度もまた正規化して、ELISA データとの比較を可能にした。

【0103】

培養物上清を、B5 に結合するモノクローナル抗体について、ELISA を使用してスクリーニングする場合、53 個のポジティブな上清が 5 個の ELISA プレートにおいて同定された。マイクロアレイスクリーニングを使用する同じ培養物上清のスクリーニングは、48 個のポジティブ上清 (ELISA によって同定された上清の 90.57%) を同定した。マイクロアレイスクリーニングはまた、ELISA によって同定されなかった 4 つの新規のポジティブ上清を同定した。

40

【0104】

培養物上清を、Ket94 / 95 に結合するモノクローナル抗体について、ELISA を使用してスクリーニングする場合、15 個のポジティブ上清が、単一の ELISA プレートにおいて同定された。マイクロアレイスクリーニングを使用する同じ培養物上清のス

50

クリーニングは、13個のポジティブ上清（ELISAによって同定された上清の88.66%）を同定した。マイクロアレイクリーニングはまた、ELISAによって同定されなかった8個の新たなポジティブ上清を同定した。

【0105】

これらの結果から、マイクロアレイクリーニングが、特異的抗原に結合するモノクローナル抗体の同定において、少なくともELISAと同程度に有効であることが明らかである。実際、ELISAによって同定されないポジティブ上清の同定は、マイクロアレイクリーニングがELISAより高感度であることを示唆する。マイクロアレイクリーニングはさらに、同定されたモノクローナル抗体のIGアイソタイプまたはIgMアイソタイプの同時決定を可能にするという利点を有する。

10

【0106】

図3Aは、B5に結合するポジティブサンプルを含むELISAプレート中の各培養物上清の全強度に対する寄与%の正規化した値（黒四角）を、B5被覆スライドのマイクロアレイクリーニングによって得られた同じ培養物上清の寄与%の正規化した値（白四角）と比較して示す。図3Bは、これらの実験におけるバックグラウンドノイズのレベルを示す。ポジティブ上清が、ELISAと比較して、マイクロアレイクリーニングを使用して、全強度に対するより大きな寄与%を示したことが分かり得る。結果として、ELISAと比較してマイクロアレイクリーニングにおいて、バックグラウンドノイズとポジティブ上清との間により大きな差異が存在し、これによりポジティブ上清がより容易にかつより正確に同定され得る。

20

【0107】

図4Aは、B5に結合する単一のポジティブサンプルを含むELISAプレートにおける各培養物上清の全強度に対する寄与%の正規化した値（黒四角）と、B5被覆スライドのマイクロアレイクリーニングによって得られた同じ培養物上清の寄与%の正規化した値（白四角）を比較する。バックグラウンドノイズレベルは、図4Bに示され、そしてポジティブサンプルが、ELISAと比較して、マイクロアレイクリーニングを使用して、バックグラウンドノイズより上でより容易に検出可能であることが分かり得る。

【0108】

図5Aは、Ket94/95に結合するポジティブ上清を含むことが見出されたELISAプレート中の各培養物上清の全強度に対する寄与%の正規化した値（黒四角）を、Ket94/95被覆スライドのマイクロアレイクリーニングによって得られた同じ培養物上清の寄与%の正規化した値（白四角）と比較する。これらのポジティブ上清は、図5Bに示されるように、ELISAと比較して、マイクロアレイクリーニングを使用してバックグラウンドノイズより上で容易に検出可能であった。

30

【0109】

図6Aは、ポジティブ上清が存在しないELISAプレートから得られたデータ（黒四角）を、同じ培養物上清のマイクロアレイクリーニングを使用して得られたデータ（白四角）と比較する。図6Bに示されるように、両方の事例の読み取りは、バックグラウンドノイズに起因した。

【0110】

これらの結果は、本発明の方法が、1つより多くの抗原に対するモノクローナル抗体を同時に同定するために使用され得ることを実証する。本発明の方法におけるマイクロアレイクリーニングの使用は、ELISAのような従来の抗体クリーニング方法の使用よりも、迅速で、安価でかつより正確である。

40

【0111】

（参考文献）

Kilpatrickら(1997) Hybridoma 16:381-389
 Kohler G, Milstein C(1975) Nature 7:256:485-7
 Lindleyら(2000) J Immunol Methods 234:123-

50

135

Ziaudin J, Sabatini D (2001) Nature 411:107-110

Zimmermann U. (1990) J Immunol Methods Nov 6; 134(1): 43-50.

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】走査されたチップの全体イメージであって、ここで緑および赤のスポットは、ポジティブな IgG および IgM 産生上清液をそれぞれ表す。クローズアップは、良好なスポットが見出されるべきチップの特定領域の詳細を示す。

10

【図2】チップ分析と ELISA スクリーニングとの間の比較。最初のイメージはネガティブなサンプル ($I_a < 0.5$) であり、その一方その他はポジティブである。平均 I_c : 3チップ上のスポットの平均の総強度。 I_a : 3つのチップに亘る強度の合計に対するスポットの平均寄与 (%)。

【図3A】B5抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図3A)。バックグラウンド値は図3Bに示されている。チップ分析および/またはELISAにより同定された多くのポジティブな上清液が示される。

【図3B】B5抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図3A)。バックグラウンド値は図3Bに示されている。チップ分析および/またはELISAにより同定された多くのポジティブな上清液が示される。

20

【図4A】B5抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図4A)。バックグラウンド値は図4Bに示されている。チップ分析およびELISAにより同定された単一のポジティブな上清液が示される。

【図4B】B5抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図4A)。バックグラウンド値は図4Bに示されている。チップ分析およびELISAにより同定された単一のポジティブな上清液が示される。

30

【図5A】Ket94/95抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図5A)。バックグラウンド値は図5Bに示されている。チップ分析および/またはELISAにより同定された多くのポジティブな上清液が示される。

【図5B】Ket94/95抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図5A)。バックグラウンド値は図5Bに示されている。チップ分析および/またはELISAにより同定された多くのポジティブな上清液が示される。

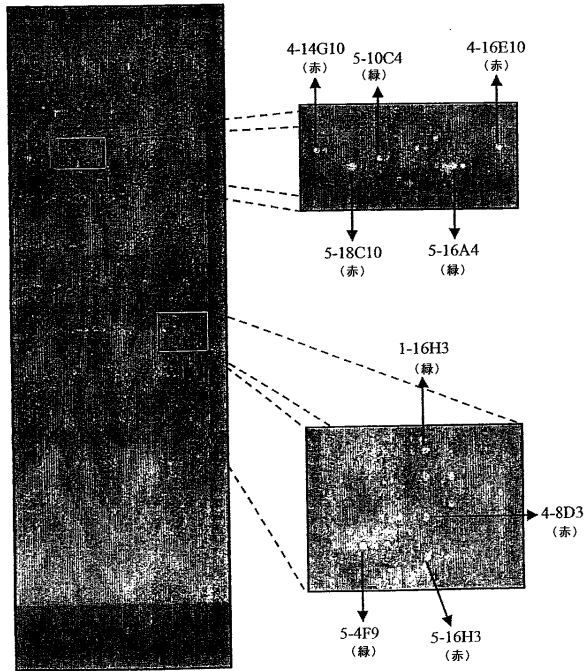
【図6A】Ket94/95抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図6A)。バックグラウンド値は図6Bに示されている。ELISAまたはチップ分析のいずれかにより同定されたポジティブな上清液はなかった。

40

【図6B】Ket94/95抗原への結合について、ELISA (黒四角) またはチップ分析 (白四角) についてスクリーニングされた培養上清液の総強度への寄与の比較 (%) (図6A)。バックグラウンド値は図6Bに示されている。ELISAまたはチップ分析のいずれかにより同定されたポジティブな上清液はなかった。

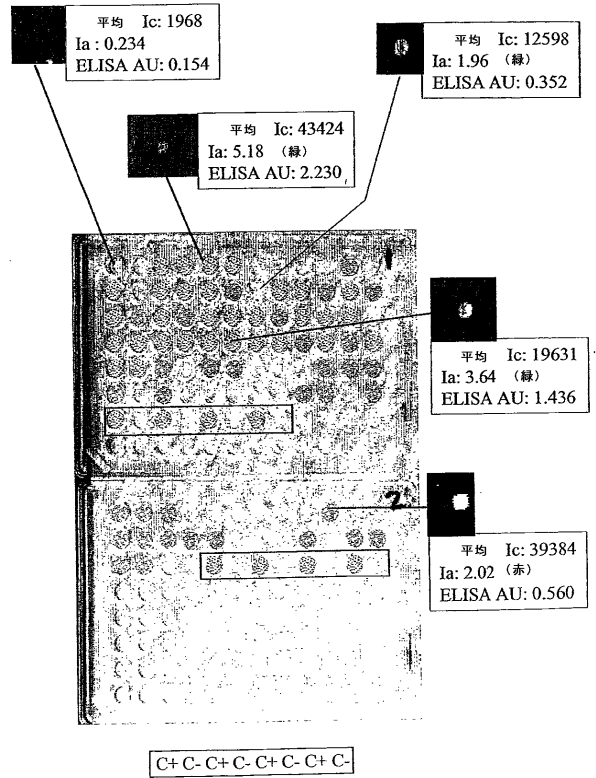
【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

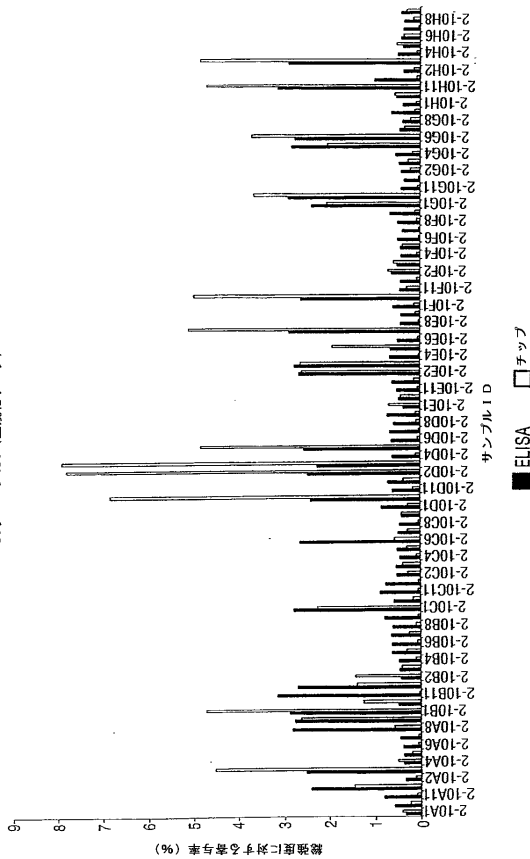
FIG. 2



【 図 3 A 】

FIG. 3A

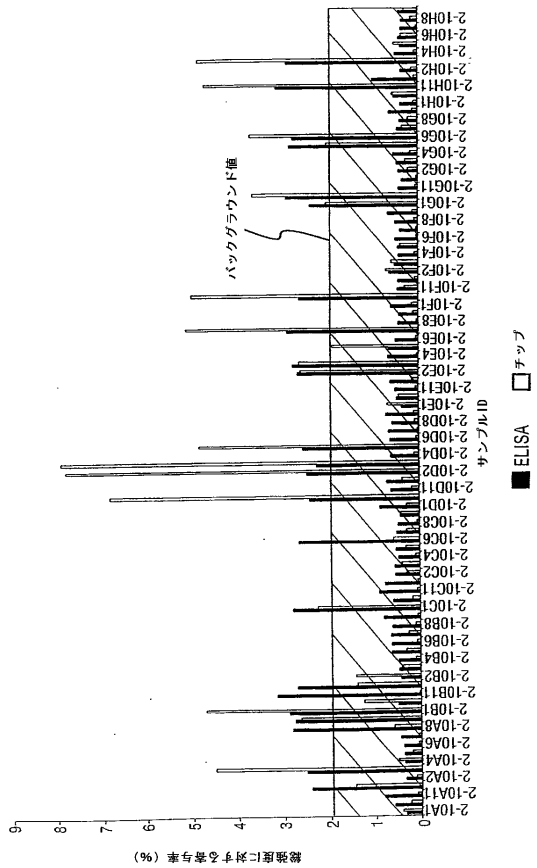
B5クロローン106 (正規化データ)



【 図 3 B 】

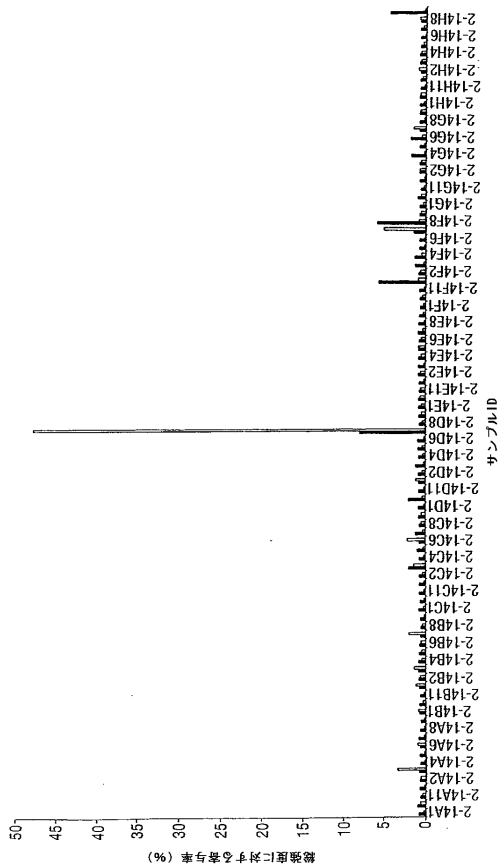
FIG. 3B

B5クロローン106 (正規化データ)



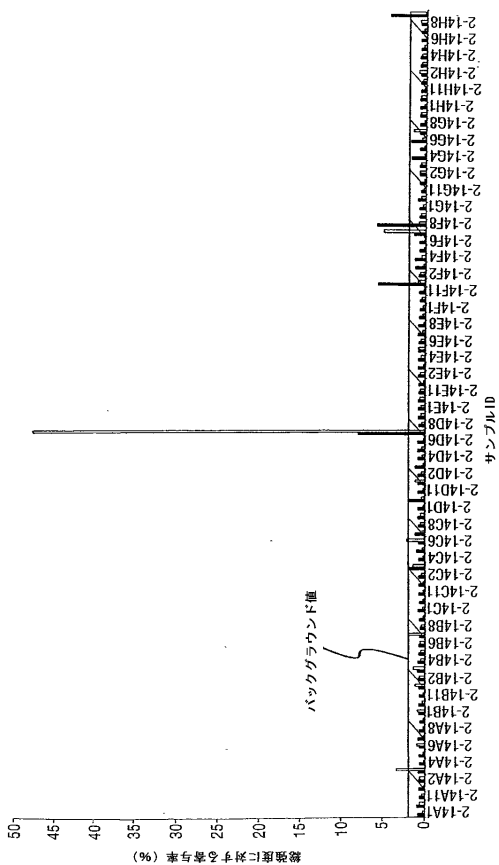
【 4 A 】

FIG. 4A
85クロロン505 (正規化データ)



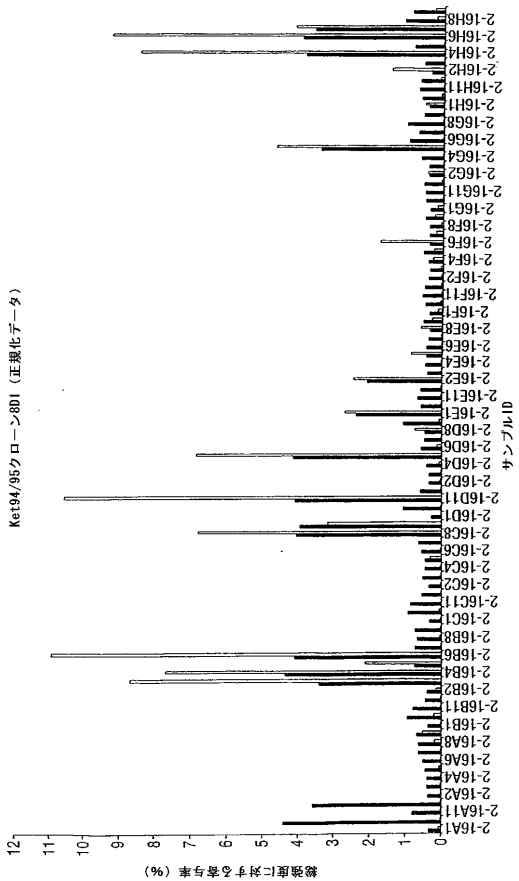
【 4 B 】

FIG. 4B
85クロロン505 (正規化データ)



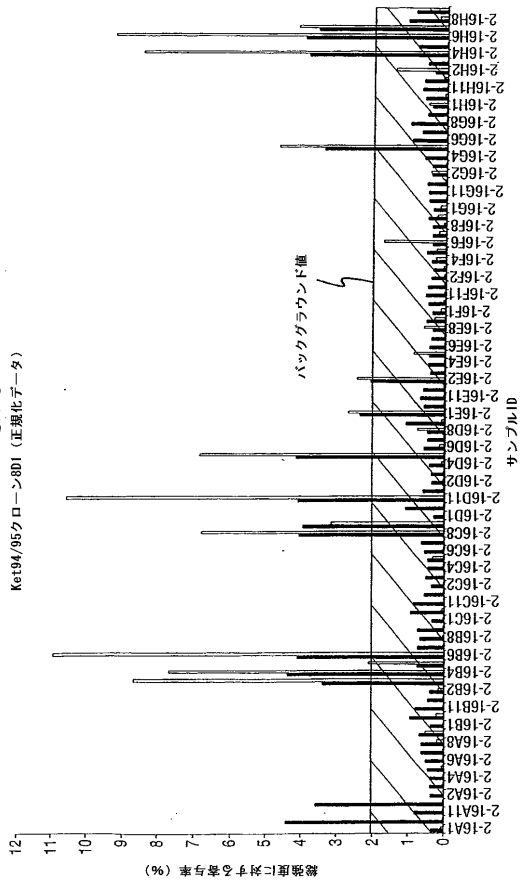
【 5 A 】

FIG. 5A
Ket94/95クロロン801 (正規化データ)



【 5 B 】

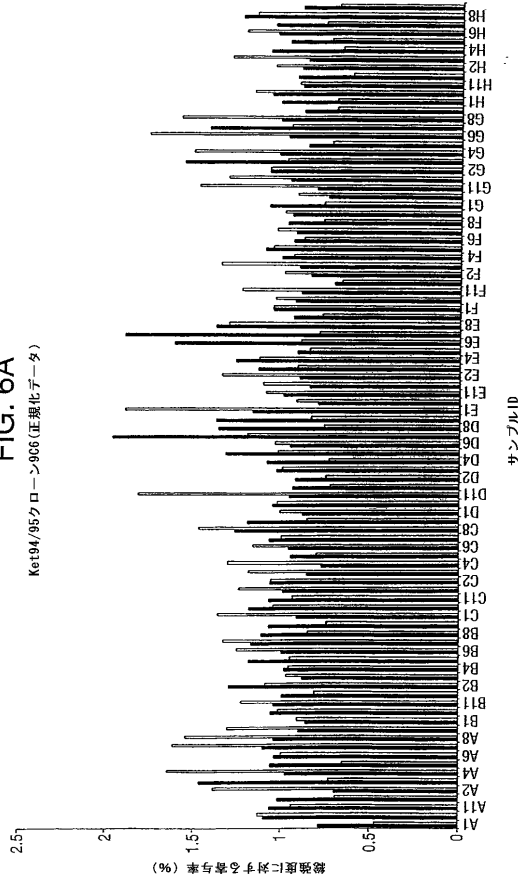
FIG. 5B
Ket94/95クロロン801 (正規化データ)



【 図 6 A 】

FIG. 6A

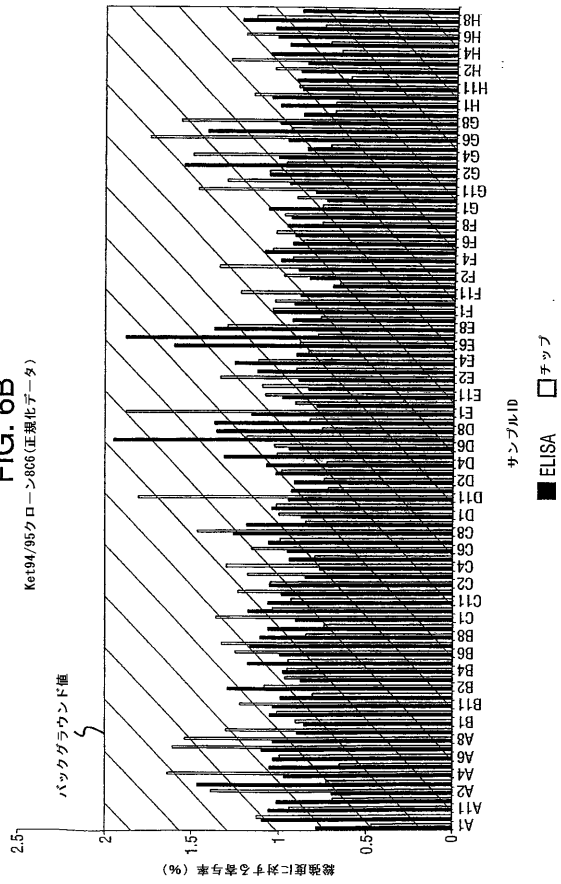
Ket94/95クローン966(正規化データ)



【 図 6 B 】

FIG. 6B

Ket94/95クローン866(正規化データ)



フロントページの続き

- (72)発明者 ソーヤー, アラン ミッシェル
ドイツ国 デー - 6 9 0 1 2 ハイデルベルク, ポストファッハ 1 0 2 2 0 9, ヨーロピ
ン モレキュラー バイオロジー ラボラトリー
- (72)発明者 デマシ, フェデリコ
ドイツ国 デー - 6 9 0 1 2 ハイデルベルク, ポストファッハ 1 0 2 2 0 9, ヨーロピ
ン モレキュラー バイオロジー ラボラトリー

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 3 3 7 3 5 (WO, A 1)
国際公開第 0 1 / 0 1 4 4 2 5 (WO, A 1)
国際公開第 0 0 / 0 6 7 7 9 2 (WO, A 1)
Trends Biotechnol., (2002), 20, [4], p.160-166
Anal. Biochem., (1999), 270, [1], p.103-111
Genome Biol., (2001), 2, [2], p.research0004.1-0004.13
Anal. Biochem., (2000), 278, [2], p.123-131

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	产生单克隆抗体的方法		
公开(公告)号	JP4429736B2	公开(公告)日	2010-03-10
申请号	JP2003586190	申请日	2003-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	欧洲分子生物学实验室		
申请(专利权)人(译)	欧洲分子生物学实验室		
当前申请(专利权)人(译)	欧洲分子生物学实验室		
[标]发明人	ソーヤーアランミッシェル デマシフェデリコ		
发明人	ソーヤー, アラン ミッシェル デマシ, フェデリコ		
IPC分类号	C12P21/08 C12N15/02 G01N33/53 G01N37/00 C07K16/00 C12N5/20 C12N15/06		
CPC分类号	C07K16/00		
FI分类号	C12P21/08 C12N15/00.C G01N33/53.D G01N37/00.102		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2002008817 2002-04-17 GB		
其他公开文献	JP2006500912A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及生产单克隆抗体抗体的方法。特别地，本发明涉及比常规方法更快速地产生和筛选单克隆抗体的高通量方法。A) 将至少一种候选抗原引入动物; b) 从动物中回收产生抗体的细胞并使这些细胞成为单细胞悬浮液; c) 从单细胞悬浮液产生永生化细胞系; d) 针对呈递候选抗原的蛋白质芯片筛选永生化细胞系的上清液;和e) 选择用作单克隆抗体的抗体。

0 0 8 5]

数 1]

$$\left(\frac{I_c}{\sum_{n=1}^{9600} I_c} \right) \times 100$$