

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年7月8日(2010.7.8)

【公表番号】特表2009-537176(P2009-537176A)

【公表日】平成21年10月29日(2009.10.29)

【年通号数】公開・登録公報2009-043

【出願番号】特願2009-512060(P2009-512060)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/07	(2010.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/02	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	30/88	(2006.01)
G 0 1 N	21/78	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/00	Z N A E
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	C
G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	30/88	2 0 1 R
G 0 1 N	21/78	C
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成22年5月21日(2010.5.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原特異的な抗体を発現するB細胞を同定するための方法であって、

(a)宿主からB細胞を採取する工程と、

(b)前記抗原に特異的なB細胞の比率を増加させるために、採取されたB細胞を富化し、それによって富化されたB細胞集団を形成する工程と、

(c)前記の富化されたB細胞集団から1以上の細胞のサブ集団を培養する工程と、

(d)前記の培養されたサブ集団が前記抗原に特異的な抗体を産生するかどうかを決定し、それによって1以上の抗原陽性のサブ集団を同定する工程と；および

(e)個々のB細胞が、前記抗原に特異的な抗体を産生するかどうかを決定する工程であって、その方法は、

(i)工程(d)の1以上の前記の抗原陽性のサブ集団から、1以上の個々のB細胞を単離する工程と、

(ii)前記抗原が直接的にまたは間接的に付着した、マトリックスまたは固体の支持体を含む固定化された抗原を提供する工程と、

(iii)個々のB細胞を、前記の固定化された抗原と共にインキュベートする工程

と、

( i v ) 前記の個々の B 細胞より分泌された抗体が、前記の固定化された抗原に結合するかどうかを検出する工程と；および

( v ) 前記の個々の B 細胞より分泌された抗体と結合した前記の固定化された抗原が B 細胞と空間的に近接していることにより、前記抗原に特異的な抗体を発現する B 細胞を同定する工程と、を含む上記方法。

【請求項 2】

前記の固定化された抗原が抗原を負荷したビーズを含み、工程( e ) ( i v ) は前記の固定化された抗原をフルオロフォアと連結した 2 次抗体と共にインキュベートする工程を含み、ここで前記 2 次抗体は、工程( a ) の宿主の抗体と結合する抗免疫グロブリン抗体である、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

工程( a )が、脾臓、リンパ節、骨髄、および末梢血単核球から選択された少なくとも 1 つの源から B 細胞を回収する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

工程( a )が、前記の 1 つより多くの源から前記 B 細胞を貯蔵する工程を更に含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

工程( e )において抗原に特異的な抗体を作製すると決定された、前記の個々の B 細胞由来の抗体鎖またはその断片をコードする核酸を、単離するかまたは配列を決定する工程と、前記核酸にコードされるポリペプチドを組換え細胞内で発現させる工程を更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記組換え細胞は、酵母、細菌、昆虫、両生類、または哺乳類の細胞である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記組換え細胞は二倍体酵母である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記二倍体酵母はピキアである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記宿主は哺乳類である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記宿主はモルモット、ウサギ、マウス、ラット、ヒト以外の靈長類、ヒト、または齧歯類である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

工程( b )は、固体マトリックスまたは支持体に、直接的または間接的に付着した抗原を用いて、抗原特異的な B 細胞を親和性精製する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

固体マトリックスがカラムであるか、または固体マトリックスが磁気ビーズを含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

工程( c )の前記サブ集団は、約 10,000 個以下の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

工程( c )の前記サブ集団は、約 50 ~ 約 10,000 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

工程( c )の前記サブ集団は、約 50 ~ 約 5,000 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程( c )の前記サブ集団は、約 50 ~ 約 250 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

工程( c )の前記サブ集団は、フィーダー細胞を含む培地中で培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記フィーダー細胞は E L 4 B 細胞である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

工程( c )の前記サブ集団は、活性化された T 細胞馴化培地を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記培地は、約 1 % ないし約 5 % の活性化したウサギ T 細胞馴化細胞を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

工程( c )の前記サブ集団は少なくとも 3 日間培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

工程( c )の前記サブ集団は約 3 日 ~ 約 5 日間培養される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

工程( c )の前記サブ集団は少なくとも 1 週間培養される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

工程( c )の培養された前記サブ集団が、結合パートナーへの抗原の結合のアゴニズムまたはアンタゴニズム、特定の標的細胞の型の増殖の誘導または抑制；標的細胞の溶解の誘導または抑制；または前記抗原に関する生物学的経路の誘導または抑制、を示す抗体を作製するかどうかを決定する工程を更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 25】

工程( c )の培養された前記サブ集団により作製された抗体の、抗原結合親和性を決定する工程を更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 26】

抗原特異的な抗体を発現する B 細胞を同定するための、請求項 1 記載の工程を含む方法であって、

ここで工程( b )は、固体マトリックスまたは支持体に直接的または間接的に付着した抗原を用いた抗原に特異的な B 細胞の親和性精製により、前記抗原に特異的な B 細胞の比率を増加させて採取された B 細胞を富化し、それによって富化された B 細胞集団を形成する工程と；および

検出工程( i v )は、前記の固定化された抗原を検出可能な標識と連結した 2 次抗体と共にインキュベートする工程であって、ここで前記 2 次抗体は宿主特異的な抗免疫グロブリン抗体であって、ここで前記 2 次抗体は工程( a )の宿主の抗体に結合する抗免疫グロブリン抗体であり、それによって前記の個々の B 細胞により分泌された抗体が前記の固定化された抗原と結合するかどうかを検出する、ことを含む上記方法。

【請求項 27】

前記の固定化された抗原が抗原を負荷したビーズを含み、工程( e )( i v )における検出可能な標識はフルオロフォアである、請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

工程( a )が、脾臓、リンパ節、骨髄、および末梢血単核球から選択された少なくとも 1 つの源から B 細胞を回収する工程を含む、請求項 26 記載の方法。

【請求項 29】

工程( a )が、前記の 1 つより多くの源から前記 B 細胞を貯蔵する工程を更に含む、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

工程( c )の前記サブ集団は、約 10 , 000 個以下の抗原特異的な抗体分泌細胞を含

む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 5 0 ~ 約 1 0 , 0 0 0 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 5 0 ~ 約 5 , 0 0 0 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 5 0 ~ 約 1 0 0 0 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 5 0 ~ 約 5 0 0 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 5 0 ~ 約 2 5 0 個の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、少なくとも 3 日間培養される、請求項 2 6 に記載の方法。

。

【請求項 3 7】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、約 3 日 ~ 約 5 日間培養される、請求項 3 6 に記載の方法。

。

【請求項 3 8】

工程 ( c ) の前記サブ集団は、少なくとも 1 週間培養される、請求項 3 7 に記載の方法。

。

【請求項 3 9】

工程 ( c ) の培養された前記サブ集団が、結合パートナーへの抗原の結合のアゴニズムまたはアンタゴニズム、特定の標的細胞の型の増殖の誘導または抑制；標的細胞の溶解の誘導または抑制、または前記抗原に関する生物学的経路の誘導または抑制、を示す抗体を作製するかどうかを決定する工程を更に含む、請求項 2 6 記載の方法。