

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6211931号
(P6211931)

(45) 発行日 平成29年10月11日 (2017.10.11)

(24) 登録日 平成29年9月22日 (2017.9.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 J

請求項の数 24 (全 105 頁)

(21) 出願番号	特願2013-557906 (P2013-557906)	(73) 特許権者	501087490
(86) (22) 出願日	平成24年3月9日 (2012.3.9)		セル・シグナリング・テクノロジー・イン
(65) 公表番号	特表2014-509853 (P2014-509853A)		コーポレイテッド
(43) 公表日	平成26年4月24日 (2014.4.24)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/028501		1 9 2 3 ダンヴァース トラスク・レー
(87) 国際公開番号	W02012/122484		ン 3
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012.9.13)	(74) 代理人	100127926
審査請求日	平成27年2月18日 (2015.2.18)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	61/450,922	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成23年3月9日 (2011.3.9)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロベルト・ボラキウィッチ
(31) 優先権主張番号	61/560,006		アメリカ合衆国マサチューセッツ州O24
(32) 優先日	平成23年11月15日 (2011.11.15)		21. レキシントン. リンカーンテラス4
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体を作製するための方法および試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得る方法であって、

(a) 選択された種の少なくとも1つの動物の免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする核酸配列を準備するステップ；

(b) 抗原に特異的に結合する該選択された種の動物のポリクローナル免疫グロブリンの集団を得、そして該集団の重鎖または軽鎖、またはその可変領域のペプチド断片の質量スペクトル情報を得るステップ；

(c) ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列によってコードされる予測アミノ酸配列から導き出された、該核酸配列から予測される質量スペクトル情報と関連づけてペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖またはその可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を同定するステップ；および

(d) ペプチド断片による免疫グロブリン鎖またはその断片のアミノ酸配列包括度に基づいて、免疫グロブリン鎖またはその可変領域の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得るステップ；

を含む方法。

【請求項 2】

ステップ (a) の前記少なくとも1つの動物およびステップ (b) における動物が抗原

10

20

に暴露された動物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

核酸配列が発現された核酸配列であり、および／または、

免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする核酸配列が、

(1) 前記少なくとも 1 つの動物の白血球から核酸分子を単離すること；および

(2) 免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする核酸分子に隣接するポリヌクレオチド配列に特異的なプライマーを用いて、該免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする核酸分子を増幅すること、および

(3) 免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする該増幅された核酸分子のヌクレオチド配列を得ること；

10

によって該少なくとも 1 つの動物から得られ、および／または、

ポリペプチドをコードする核酸分子が RNA 分子であり、そして前記増幅ステップが最初の逆転写ステップを含み、および／または、

前記免疫グロブリン鎖または、その可変領域をコードする核酸分子に隣接した前記ポリヌクレオチド配列が、ゲノム DNA フランキング免疫グロブリン遺伝子、免疫グロブリン鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド配列、および免疫グロブリン鎖フレームワーク領域をコードするポリヌクレオチド配列からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

予測質量スペクトル情報が、

(i) 1 つ又はそれ以上のプロテアーゼおよび／または 1 つ又はそれ以上の化学的タンパク質切断試薬を用いて、核酸配列のヌクレオチド配列によってコードされた予測されたアミノ酸配列の理論的消化を行って仮想ペプチド断片を生成するステップ；および

(ii) 該仮想ペプチド断片の予測質量スペクトルを作製するステップ；

を含む方法を用いて得られる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

ステップ (a) の核酸配列、予測アミノ酸配列、および該核酸配列から誘導される予測質量スペクトルが、遺伝物質データベース内にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (b) の免疫グロブリンの前記ポリクローナル集団が ステップ (b) における該動物の体液サンプルまたはその画分から得られる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記体液が、血液、脳脊髄液、関節液、腹膜液、粘膜分泌液、涙、鼻汁、唾液、乳、および尿生殖器分泌液からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (b) における動物がステップ (a) における前記少なくとも 1 つの動物と同じである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

選択された種が、ヒト、ウサギまたはマウスから選択される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記体液サンプルまたはその画分から、ステップ (b) の免疫グロブリンの前記ポリクローナル集団を精製する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

プロテイン A またはプロテイン G 精製または抗原に基づくアフィニティー精製によって精製を実施する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

1 つまたはそれ以上のプロテアーゼおよび／または 1 つまたはそれ以上の化学的タンパク質切断試薬を用いて集団を消化して断片を生成し、そして生成された断片を質量分析にかけることによって、免疫グロブリンのポリクローナル集団から、ステップ (b) のペプ

50

チド断片の質量スペクトル情報が得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ (d) における選択が、ペプチド断片による免疫グロブリンの C D R 3 配列のアミノ酸配列包括度に基づき、および/または、

ステップ (d) における選択が、ペプチド断片による免疫グロブリンの可変領域のアミノ酸配列包括度に基づく、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ (d) における選択が、ペプチド断片による C D R 3 配列のアミノ酸配列包括度および免疫グロブリンの可変領域のアミノ酸配列包括度に基づく、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

ステップ (d) における選択が、マップされたユニークペプチドの数、スペクトル共用、総ペプチド計数、ユニークペプチド計数、コード核酸配列の頻度、およびクローン関連性からなる群から選択される少なくとも 1 つのパラメーターにさらに基づく、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを作製する方法であって、

請求項 1 の方法を用いて重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得るステップ、

得られたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に基づいて、組換え分子生物学的手法または遺伝子合成手法によって該重鎖および該軽鎖を作るステップ、ならびに

20

該重鎖を該軽鎖とアセンブリングして抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを作製するステップ、を含む方法。

【請求項 1 7】

免疫測定法において免疫グロブリンを評価して該免疫グロブリンが特異的に抗原に結合することを確認するステップをさらに含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得る方法であって、

30

(a) 選択された種の少なくとも 1 つの動物の多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン可変領域をコードする核酸配列を準備するステップ；

(b) 抗原に特異的に結合する該選択された種の動物のポリクローナル免疫グロブリンの集団の免疫グロブリン鎖可変領域のペプチド断片の質量スペクトル情報を得るステップ；

(c) ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列によってコードされる予測アミノ酸配列から導き出された、該核酸配列から予測される質量スペクトル情報と関連づけて、ペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を同定するステップ；および

(d) ペプチド断片による可変領域のアミノ酸配列包括度に基づいて、免疫グロブリン鎖可変領域の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得るステップ；

40

を含む方法。

【請求項 1 9】

(e) ステップ (d) において得られたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に基づいて、組換え分子生物学的手法または遺伝子合成手法によって免疫グロブリン鎖可変領域を作るステップをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

(f) 免疫測定法により免疫グロブリン鎖可変領域をスクリーニングして抗原に特異的

50

に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域を単離するステップ、
をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの抗原結合ドメインを作製する方法であって、

(a) 請求項 18 に記載の方法に従って抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変領域および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得るステップ；および

(b) 重鎖可変領域を軽鎖可変領域とアセンブリングして抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの抗原結合ドメインを作製するステップ；

を含む方法。

10

【請求項 22】

選択された種がヒト、ウサギまたはマウスである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

抗原に暴露された対象の抗原特異的抗体集団をモニターする方法であって、

(a) 抗原に暴露された対象の多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖またはその可変領域をコードする核酸配列を提供するステップ；

(b) 抗原に特異的に結合する、該対象のポリクローナル免疫グロブリン集団の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖のペプチド断片の質量スペクトル情報を得るステップ；

(c) ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列によってコードされる予測アミノ酸配列から導き出された、該核酸配列から予測される質量スペクトル情報と関連づけて、抗原に特異的に結合する、対象からのポリクローナル免疫グロブリン集団の配列を同定するステップ；および

20

(d) ペプチド断片による免疫グロブリン鎖またはその断片のアミノ酸配列包括度に基づいて、免疫グロブリン鎖またはその可変領域の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得るステップ；

を含む方法。

【請求項 24】

核酸配列およびポリクローナル免疫グロブリンの集団が、それぞれ抗原に対する対象の暴露後の時点に対応し、および/または、

30

核酸配列およびポリクローナル免疫グロブリンの集団が、それぞれ抗原に対する対象の暴露後の複数の時点に対応する、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年3月9日に出願された特許文献1、2011年11月15日に出願された特許文献2、2011年12月5日に出願された特許文献3、および2012年2月3日に出願された特許文献4の優先権を主張し、それらのそれぞれの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本開示は、生物学、より詳しくは分子生物学および免疫学に関する。

【背景技術】

【0003】

抗体は、大きな特異性および親和性により、抗原と称する特定のターゲット分子に結合する、生物学的および商業的に重要なポリペプチドである。抗体は、脊椎動物の免疫細胞によって産生され、そしてすべての天然の抗体は、同じ基本構造、すなわち、2本の同一の軽鎖に共有結合した2本の同一の重鎖を共有している。単一の重鎖および単一の軽鎖のN末端領域は、それぞれ個々の抗体に特定の抗原結合部位を形成する。重鎖のC末端領域

50

は、抗体の特定のアイソタイプを決定し、そして同じ抗体産生細胞は、異なるアイソタイプの抗体を産生することができ、ここで、細胞によって産生されたすべて抗体は、同じ抗原結合部位を有する。異なるアイソタイプは、典型的に、動物において異なる機能を果たす。例えば、Eアイソタイプの抗体（すなわち、IgE抗体）は、アレルギー反応に関与しているのに対して、Aアイソタイプの抗体（すなわち、IgA抗体）は、粘膜、唾液、および母乳中に見いだすことができる。四鎖抗体分子は、それ自体（例えば、IgG抗体）で存在することができ、またはさらなるモノマーと共に存在して二量体（例えば、IgA抗体）もしくはさらに五量体（例えば、IgM抗体）を形成することができる。

【0004】

よく理解された抗体の基本構造により、標準分子生物学的手法を用いて、抗体の異なる領域を操作することによって組換え抗体を産生することができる。例えば、特許文献5および特許文献6（それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）は、分子生物学的手法を用いてヒト以外の抗体のさまざまな領域を操作することによってヒト以外の動物において天然の抗体をヒト化することを記載している。標準分子生物学的手法を用いた組換え抗体を操作または生成する他の方法が記載されている（例えば、特許文献7、特許文献8；特許文献9、特許文献10、特許文献11、および特許文献12を参照し、それらのすべては、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）。

【0005】

免疫応答中に、動物は、それぞれ異なる抗原結合特異性を有する多くの異なる抗体を生成する。この抗体集団を抗体のポリクローナル集団と称する。免疫応答が特定の抗原に向けられる場合、動物によって作られるポリクローナル抗体のほとんど（しかし、すべてではない）は、その抗原を特異的に結合する。しかし、ポリクローナル抗体のいくつかは、抗原における結合親和性および結合部位の違いにより、他のポリクローナル抗体よりも好ましい。KohlerおよびMilsteinは、1975年にノーベル受賞した彼らの発見において、ポリクローナル抗体産生動物から、興味のある抗原を特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する、単一の抗体産生細胞を単離および不死化する方法を発見した（非特許文献1）。この不死化技術は、抗体産生細胞を不死化細胞に融合させてモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを産生することを含んでおり、過去35年間、モノクローナル抗体を作製するための業界標準となっている。

【0006】

KohlerおよびMilsteinハイブリドーマ法は、その人気およびその長命にもかかわらず、多くの欠点を有する。例えば、それは非常に時間がかかり、かつ労働集約的である。より適切には、それがどれくらい時間を要し、かつ労働集約的かということ、不死化されて、抗原に特異的に結合する抗体を産生するその能力についてスクリーニングされるのは、動物の抗体産生細胞のほんのわずかな画分でしかない。結局、所望の抗原特異性を有するハイブリドーマを単離しても、ヒト化のような、抗体のさらなる操作を容易にする、抗体のアミノ酸配列を得ることは、困難であり、かつ時間がかかる。

【0007】

所望の抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製するための改善された方法が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国仮出願第61/450,922号

【特許文献2】米国仮出願第61/560,006号

【特許文献3】米国仮出願第61/566,876号

【特許文献4】米国仮出願第61/594,729号

【特許文献5】米国特許第6,180,370号

【特許文献6】米国特許第6,548,640号

【特許文献7】PCT公開第WO91/17271号

10

20

30

40

50

【特許文献 8】PCT 公開第 WO 92 / 0 1 0 4 7 号

【特許文献 9】米国特許第 5 , 9 6 9 , 1 0 8 号

【特許文献 10】米国特許第 6 , 3 3 1 , 4 1 5 号

【特許文献 11】米国特許第 7 , 4 9 8 , 0 2 4 号

【特許文献 12】米国特許第 7 , 4 8 5 , 2 9 1 号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497, 1975

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0010】

本発明のさまざまな態様および実施態様は、興味の抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を迅速かつ正確に作製する方法およびシステムを提供する。さらなる態様および実施態様において、本発明は、本発明のさまざまな方法を実施するための試薬および組成物、ならびに本発明のさまざまな方法の実施により生じる試薬および組成物を提供する。いくつかの実施態様において、本明細書に開示された方法、試薬、および組成物は、対象の循環からモノクローナル抗体を作製するために有用である。

【0011】

一態様において、本発明は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン（またはその可変領域）の配列を得るための方法であって、（a）少なくとも 1 つの動物の多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸配列を準備すること；（b）抗原に特異的に結合するポリクローナル免疫グロブリンの集団の免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖のペプチド断片の質量スペクトル情報を得ること；（c）ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列の予測質量スペクトル情報、前記核酸配列のヌクレオチド配列によってコードされた、予測アミノ酸配列から誘導された前記予測質量スペクトル情報と関連づけてペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードするヌクレオチド配列を同定すること；および（d）ペプチド断片による免疫グロブリン鎖またはその断片のアミノ酸配列包括度（amino acid sequence coverage）に基づいて、免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得ること：を含む、方法を提供する。

20

30

【0012】

いくつかの実施態様では、ステップ（d）で選択された免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖（またはその可変領域）をアセンブリングして抗原に特異的に結合する免疫グロブリン（またはその可変領域）を作製する。

【0013】

いくつかの実施態様では、ステップ（d）で得た免疫グロブリン鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を、アセンブリング前に組換え分子生物学的手法または遺伝子合成手法によって合成する。

【0014】

40

いくつかの実施態様において、方法は、作製された免疫グロブリン（またはその可変領域）を免疫測定法でスクリーニングして、抗原に特異的に結合する前記免疫グロブリン（またはその可変領域）を確認することをさらに含む。いくつかの実施態様において、免疫測定法は、フローサイトメトリーアッセイ（flow cytometry assay）、酵素結合免疫吸着検定法（enzyme-linked immunosorbent assay）（ELISA）、ウエスタンブロッティングアッセイ（Western blotting assay）、免疫組織化学的アッセイ（immunohistochemistry assay）、免疫蛍光測定法（immunofluorescence assay）、放射免疫測定法（radioimmunoassay）、中和アッセイ（neutralization assay）、結合アッセイ（binding assay）、親和性アッセイ（affinity assay）、またはタンパク質もしくはペプチド免疫沈降アッセイ（protein or peptide immunoprecipitation assay）からなる群から選択される。

50

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施態様において、ステップ (d) における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖の選択は、ペプチド断片によって鎖の一部 (例えば、可変領域または相補性決定領域) のアミノ酸配列包括度に基づいて行う。

【 0 0 1 6 】

別の実施態様において、ステップ (d) における免疫グロブリン重鎖または軽鎖の選択は、マップされたユニークペプチドの数 (number of unique peptides mapped)、スペクトル共用 (spectrum share)、総ペプチド計数 (total peptide count)、ユニークペプチド計数 (unique peptide count)、コードする核酸配列の頻度 (frequency of the encoding nucleic acid sequences)、およびクローン関連性 (clonal relatedness) からなる群から選択される少なくとも 1 つのパラメーターと組み合わせて、ペプチド断片によって、免疫グロブリン鎖またはその断片のアミノ酸配列包括度に基づいて行う。

10

【 0 0 1 7 】

さまざまな実施態様において、核酸配列および核酸配列から誘導された情報 (例えば、ヌクレオチド配列、予測アミノ酸配列および予測質量スペクトルを含む) は、遺伝物質データベース中にある。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施態様において、核酸配列が入手される動物は、抗原に暴露された動物である。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施態様において、動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする前記核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列は、(1) 前記動物の白血球細胞から核酸分子を単離すること ; (2) 免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子に隣接するポリヌクレオチド配列に特異的なプライマーを用いて、前記免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子を増幅すること ; (3) 動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする前記増幅された核酸分子のヌクレオチド配列を得ること ; および (4) 遺伝暗号を用いてヌクレオチド配列を予測アミノ酸配列に翻訳すること : によって得られる。

20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施態様において、核酸配列は、発現された核酸配列である (例えば、RNA に転写され、および / または動物細胞中のタンパク質に翻訳される) 。

30

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施態様において、動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子によってコードされた予測アミノ酸配列は、(1) 前記動物の白血球から核酸分子を単離すること ; (2) 免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子に隣接するポリヌクレオチド配列に特異的なプライマーを用いて前記免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子をシーケンシングして動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードするヌクレオチド配列を得ること ; および (3) 遺伝暗号を用いて核酸配列をアミノ酸配列に翻訳すること : によって得られる。いくつかの実施態様において、核酸分子は RNA 分子であり、そして前記増幅ステップは最初の逆転写ステップを含む。

40

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施態様において、免疫グロブリン鎖 (またはその可変領域) をコードする核酸分子に隣接するポリヌクレオチド配列は、ゲノム DNA フランキング免疫グロブリン遺伝子、免疫グロブリン鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド配列、および免疫グロブリン鎖フレームワーク領域をコードするポリヌクレオチド配列からなる群から選択される。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施態様において、予測質量スペクトル情報は、(i) 1 つまたはそれ以上

50

のプロテアーゼおよび/または1つまたはそれ以上の化学的タンパク質切断試薬を用いて、核酸分子のヌクレオチド配列によってコードされた予測アミノ酸配列の理論的消化(theoretical digest)を実施して仮想ペプチド断片を生成するステップ; および(i i)前記仮想ペプチド断片の予測質量スペクトルを作製するステップを含む方法を用いて得られる。いくつかの実施態様において、ペプチド断片の観測質量スペクトル情報は、(i)抗原に特異的に結合するポリクローナル免疫グロブリンの集団を単離するステップ; (i i)1つまたはそれ以上のプロテアーゼおよび/または1つまたはそれ以上の化学的タンパク質切断試薬を用いて集団を消化して断片を生成するステップ; および(i i i)前記ペプチド断片の質量スペクトル情報を得るステップ:を含む方法を用いて得られる。いくつかの実施態様において、ポリクローナル抗体の集団は、(1)動物から体液またはその一部(例えば、血液、血清および/または血漿)を得るステップ; (2)体液またはその一部を、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンが抗原を結合する条件下で、抗原上に通過させるステップ; および(3)前記抗原に結合された前記免疫グロブリンを集めて抗原に特異的に結合するポリクローナル免疫グロブリンの集団を得るステップ:を含む方法を用いて単離する。いくつかの実施態様において、抗原は、固体支持体に結合されている(例えば、抗原は、固体支持体に共有結合的にまたは非共有結合的に結合されている)。いくつかの実施態様において、固体支持体は、ビーズ(例えば、アガロースまたは磁気ビーズ)、カラムの壁、またはプレート(例えば、組織培養プレート)の底部であってもよい。

【0024】

いくつかの実施態様において、動物は、以前に抗原に暴露された動物である。

【0025】

いくつかの実施態様において、以前に抗原に暴露された動物は、以前に抗原で免疫化された動物である。別の態様において、本発明は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域のアミノ酸配列を得る方法であって、(a)動物の多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域をコードする核酸配列を準備すること; (b)抗原に特異的に結合するポリクローナル免疫グロブリンの集団の免疫グロブリン鎖可変領域のペプチド断片の質量スペクトル情報を得ること; (c)ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列の予測質量スペクトル情報、前記核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列から誘導された前記予測質量スペクトル情報と関連づけてペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖可変領域のアミノ酸配列を得ること; および(d)ペプチド断片によって、可変領域のアミノ酸配列包括度に基づいて、免疫グロブリン鎖可変領域の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得ること:を含む方法を提供する。

【0026】

いくつかの実施態様において、方法は、さらにステップ(e)免疫測定法を用いて前記免疫グロブリン鎖可変領域のアミノ酸配列をスクリーニングして、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域を単離することを含む。いくつかの実施態様では、ステップ(e)スクリーニングステップの前に、ステップ(d)において得られる免疫グロブリン鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を、組換え分子生物学的手法または遺伝子合成手法によって合成する。いくつかの実施態様では、ステップ(d)において産生された免疫グロブリン鎖可変領域を、第2の免疫グロブリン鎖可変領域と共にアセンブリングして抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの抗体結合ドメインを作製する。いくつかの実施態様では、免疫測定法は、フローサイトメトリーアッセイ(flow cytometry assay)、酵素結合免疫吸着検定法(enzyme-linked immunosorbent assay)(ELISA)、ウエスタンブロッティングアッセイ(Western blotting assay)、および免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光測定法(immunofluorescence assay)、放射免疫測定法(radioimmunoassay)、中和アッセイ(neutralization assay)、結合アッセイ(binding assay)、親和性アッセイ(affinity assay)、またはタンパク質もしくはペプチド免疫沈降アッセイ(protein or peptide immunoprecipitation assay)からなる群から

選択する。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施態様において、免疫グロブリン鎖可変領域は、重鎖可変領域または軽鎖可変領域である。

【 0 0 2 8 】

さらなる態様において、本発明は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの抗原結合ドメインを作製する方法であって、(a) 動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸配列を準備すること；(b) 抗原に特異的に結合するポリクローナル免疫グロブリンの集団の免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖のペプチド断片の質量スペクトル情報を得ること；(c) ペプチド断片の質量スペクトル情報を、核酸配列の予測質量スペクトル情報、前記核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列から誘導された前記予測質量スペクトル情報と関連づけて、ペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得ること；(d) ペプチド断片によって、可変領域のアミノ酸配列包括度に基づいて、免疫グロブリン鎖可変領域の同定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から選択して、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの可変領域のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を得ること；および(e) 選択された免疫グロブリン重鎖可変領域を、選択された免疫グロブリン軽鎖可変領域と共にアセンブリングして、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの抗原結合ドメインを作製すること：を含む方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明のすべての態様のさまざまな実施態様において、動物は、脊椎動物である。さまざまな実施態様において、動物は、哺乳動物である。いくつかの実施態様において、動物は、ヒトである。いくつかの実施態様において、動物は、ラット、ウサギまたはマウスである。いくつかの実施態様において、動物は、鳥類、飼いなされた動物、伴侶動物、家畜動物、齧歯動物または霊長類の動物である。いくつかの実施態様において、動物は、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、ヒト抗体配列を発現する、および/または少なくとも部分的にヒトである抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物である。

【 0 0 3 0 】

また、さまざまな態様において、本発明は、免疫グロブリン（またはその可変領域）、または本発明のさまざまな非限定的な実施態様に従って単離または作製された抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域もしくは抗原結合ドメインを提供する。さまざまな実施態様において、免疫グロブリン（またはその可変領域）、または抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域もしくは抗原結合ドメインを、単離するか、または組換える。また、さまざまな実施態様において、本発明は、薬学的に許容しうる担体および免疫グロブリン（またはその可変領域）、または本発明のさまざまな非限定的な実施態様に従って単離または作製された抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域もしくは抗原結合ドメインを提供する。

【 0 0 3 1 】

さらなる態様において、本発明は、疾患抗原によって特徴づけられる疾患を有するか、または有することが疑わしい動物を治療する方法であって、本発明のさまざまな実施態様による組成物の有効量を投与することを含み、免疫グロブリン（またはその可変領域）、または組成物の免疫グロブリン鎖可変領域もしくは抗原結合ドメインによって特異的に結合される抗原と疾患抗原とが、同一である、方法を提供する。いくつかの実施態様において、動物はヒトである。いくつかの実施態様において、動物は、齧歯動物、家畜動物、飼いなされた動物、伴侶動物、または霊長類の動物である。さらなる態様において、本発明は、疾患抗原の動物中に存在することを特徴とする疾患の動物において発生の可能性を低減する方法であって、本発明のさまざまな実施態様による組成物の有効量を投与することを含み、免疫グロブリン（またはその可変領域）、または組成物の免疫グロブリン鎖可変領域もしくは抗原結合ドメインによって特異的に結合された抗原と疾患抗原とが同一である、方法を提供する。いくつかの実施態様において、組成物はアジュバント (adjuvant

）をさらに含む。いくつかの実施態様において、動物は、ヒトである。いくつかの実施態様において、動物は、齧歯動物、家畜動物、飼いならされた動物、伴侶動物、または霊長類の動物である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 2 】

【図 1】2 本の重鎖および 2 本の軽鎖を含む抗体の概略図である。2 本の重鎖は、抗体のヒンジ領域にある 2 つのジスルフィド結合によって互いに結合している。それぞれの軽鎖は、単一のジスルフィド結合を介して重鎖に結合されている。抗原結合部位は、重鎖および軽鎖の N 末端で作製される。

【図 2】本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法の例を示す概略図である。この例では、B リンパ球（例えば、血液サンプルまたは組織サンプル）および血清および / または血漿を含むサンプルを、同じ動物（例えば、ヒト、マウス、またはウサギ）から集める。免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸分子をシークエンシングし、そしてこれらの核酸配列を用いて、核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列に基づいて、理論または予測質量スペクトル情報を生成する。血液血清からのポリクローナル抗体を、タンパク分解的に消化するか、または化学的に断片化し、そして生成したペプチド断片を質量分析による分析にかける。核酸配列からの情報（例えば、質量スペクトル）をペプチド断片の質量スペクトル情報と比較して抗体の免疫グロブリン鎖（またはその可変ドメイン）の配列を同定する。次いで、この抗体を、標準方法に従って組換え的に生成することができる。

【図 3】本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法の別の例を示す概略図である。この例では、B リンパ球および血清および / または血漿を、同じ動物（この場合、ウサギ）から集める。B リンパ球から mRNA を抽出し、そして免疫グロブリン遺伝子特異的シークエンシングプライマーを用い、454 Life Sciences から商業的に入手可能な Genome Sequencer FLX System 装置を用いてシークエンシングにかける。この情報を用いて予測アミノ酸配列に基づく理論質量スペクトルを生成する。血清および / または血漿からポリクローナル抗体を単離し、そしてプロテアーゼを用いた消化および / または化学的タンパク質切断試薬を用いた切断にかける。生成したペプチド断片を、液体クロマトグラフィー、続いて質量分析（MS / MS）によって分離する。ペプチド断片の質量スペクトルを、核酸配列の理論質量スペクトルと関連づけてペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列を得る。次いで、重鎖および軽鎖をアセンブリングして、免疫グロブリン鎖をコードする核酸配列を発現ベクター中にクローン化し、そして細胞中で発現ベクターを発現することによって組換え免疫グロブリンを作製することができる。次いで、発現された組換え免疫グロブリンを、さらに特徴づける。

【図 4】本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法の別の例を示す概略図である。この例では、非限定的な B 細胞源（例えば、脾細胞）およびポリクローナル抗体を、同じ動物（例えば、ヒト、マウスまたはウサギ）から集める。核酸分子を B 細胞源から抽出し、そして免疫グロブリン遺伝子特異的シークエンシングプライマーを用い、ロシュ 454 装置を用いて次世代シークエンシング（NG）にかける。この情報は、遺伝物質データベースに置くことができ、それを用いて、核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列に基づく理論質量スペクトルを生成することができる。また、動物（例えば、ヒト、マウスまたはウサギ）から、ポリクローナル抗体（またはそのペプチド断片）を、分析用の質量分析計に装填する。カバット則（Kabat rules）を用いて核酸配列を分析して配列の可変領域（例えば、CDR 領域または FR 領域の 1 つ）の配列を同定する。次いで、分析したポリクローナル抗体からのペプチド断片の配列をスクリーニングして、どのペプチドが、予測アミノ酸配列からの可変領域のすべてまたは部分に適合するか同定する。

【図 5】良好な質量分析相関性を有する重鎖および軽鎖 NGS（すなわち、次世代シークエンシング）配列ならびに可変領域上のペプチドを示す表である。これらのペプチドのいくつかは、非常に頻繁に現れ（例えば、軽鎖参照番号 G 6 2 3 F K B 0 1 A 3 G C 7 を参照のこと）、そしていくつかは、高い核酸配列頻度数を有した（例えば、軽鎖参照番号 G

10

20

30

40

50

6 2 3 F K B 0 1 A X J 1 Cを参照のこと)。太字のイタリック体の列は、試験により、抗原を特異的に結合する配列を含むことが見いだされた免疫グロブリン鎖を表す(図6の試験結果を参照のこと)。

【図6-1】本発明の非限定的な方法を用いて作製した抗体を、p-ErkペプチドでコートしたELISAプレートに対してスクリーニングして試験するELISAアッセイの結果を示す表である。図5に示した異なる軽鎖および重鎖を、互いにランダムに合わせた。図6から分かるように、多くの対形成により、p-ERKコーティングプレートに特異的に結合することができる抗体が生じた(陰付きで示した陽性抗体)。

【図6-2】図6-1の続き。

【図7】p-MET抗原で免疫化したウサギの脾細胞から生成したcDNAからの重鎖ならびにカッパおよびラムダ軽鎖のRT-PCR反応(すなわち、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応)の結果を示すアガロースゲルの写真の表示である。

【図8】アフィニティー精製抗体からのLC-MS/MSデータを用いて核酸配列から誘導された理論(すなわち、予測)質量スペクトルを組み合わせた後の抗体鎖の配列を示す表である。また、NGS頻度に基づく抗体鎖存在量(antibody chain abundance)も示した。イタリック体で示した鎖を合成し、抗体中にアセンブリングし;そして太字のイタリック体の鎖は、ウエスタンブロッティング分析で試験して、p-Met抗原を特異的に結合することが見いだされたものである。

【図9】未処理(3つのすべてのプロットにおける-レーン)の、またはヒト増殖因子(HGF)(3つのすべてのプロットにおける+レーン)で処理したHela細胞から調製した溶解物を、本発明の非限定的な方法を用いて生成された2種の異なるウサギ抗体(1および2と表示したプロット)を用いておよび対照抗体(最も左のプロット)を用いて精査するウエスタンブロッティング実験の結果を示す写真の表示である。ウエスタンブロッティングで陽性結果の後、次いで、抗原特異的抗体(重鎖と軽鎖との対形成)を同定した。示したように、両レーン1および2で同定した抗体は、同じ重鎖を用いたが、異なる軽鎖を有した。2種のウサギ抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、ウエスタンブロッティング結果の下に示し、重鎖および軽鎖のCDR3領域には、下線を引いた。

【図10a】プロゲステロン受容体特異的ポリクローナルウサギIgGのアフィニティー精製。(a)免疫化されたウサギの血清からの全IgGをプロテインAで単離し、そしてさらに重力流によって固定化抗原ペプチド上でアフィニティー精製した。十分に洗浄して非特異的IgGを減らした後、pHを徐々に酸性にする逐次的な溶離を用いて抗原特異性ポリクローナルIgGを分別した。各画分を、適合する抗体濃度(21.5 ng/ml)でウエスタンブロッティングによって特異的活性について試験してT47D細胞(+)からの溶解物中のPRA/Bを検出した。また、HT1080からの陰性対照溶解物(-)も試験した。

【図10b】プロゲステロン受容体特異的ポリクローナルウサギIgGのアフィニティー精製。(b)LC-MS/MS分析のため、pH1.8の最も高い特異的活性を有する画分を4種のプロテアーゼで処理した。

【図10c】プロゲステロン受容体特異的ポリクローナルウサギIgGのアフィニティー精製。(c)SEQUESTによって、5.560のXCORRおよび0.39 ppmのM(観測m/z-予想m/z)を有するCDRH3(下線あり)を含むV領域完全トリプシンペプチドGFALWGPGLVTVSSGQPK(配列番号:305)に適合したMS/MSスペクトル。

【図10d】プロゲステロン受容体特異的ポリクローナルウサギIgGのアフィニティー精製。(d)SEQUESTによってMS/MSスペクトルをV領域ペプチドにマップし、そして2%のFDRにフィルター処理した。次いで、サンプル調製に用いたプロテアーゼを考慮にいれ、そしてペプチドの総数、ユニークペプチド数(unique number)、スペクトル共有(spectrum share)、および全V領域のアミノ酸包括度の経過を追いつながり、高信頼度ペプチドを、NGSによって生成したV領域データベースにリマップした(remapped)。高包括度V領域配列を選択し、モノクローナル抗体として発現させ、そして所

10

20

30

40

50

望の活性についてスクリーニングした。

【図10e】プロゲステロン受容体特異的ポリクローナルウサギ Ig Gのアフィニティー精製。(e) クローンF9の重鎖および軽鎖配列同定包括度。記載されたV領域配列は、対形成したときに、特異的にヒトPR A/B(図11a~eを参照)を結合する。1つまたはそれ以上のペプチドによってマップされたアミノ酸を太字で示す。V領域包括度を最大にし、そして高度に可変のアミノ酸組成を構成するため、相補的プロテアーゼを用いた(キモトリプシン、エラスターゼ、ペプシン、トリプシン)。

【図11a】プロゲステロン受容体A/Bに対する機能性モノクローナル抗体の同定および特性評価。(a) 重鎖および軽鎖のコンビナトリアル対形成により、黄色で示した12の抗原特異的ELISA反応性クローンを得た。CDR3配列を識別子として用い：チェック印は、ウエスタンブロット陽性クローンを示す(図11b参照)。

【図11b】プロゲステロン受容体A/Bに対する機能性モノクローナル抗体の同定および特性評価。(b) 6種のクローン(F1、F9、H1、C1、F7、およびH9)は、ウエスタンブロットティングによるプロゲステロン受容体A/B検出について特異的であった。クローンE6(ELISA陰性、ウエスタン陰性)およびH7(ELISA陽性、ウエスタン陰性)を対照として示す。+、T47D(PR A/B陽性)；-、MDA-MB-231(PR A/B陰性)。すべての抗体を21.5 ng/mLで試験した。

【図11c】プロゲステロン受容体A/Bに対する機能性モノクローナル抗体の同定および特性評価。(c) 免疫組織化学によるアフィニティー精製されたポリクローナル混合物に対するクローンF9の特異的活性の比較。0.4 μg/mLのF9は、PR A/B陽性組織または細胞系統(T47DおよびMCF-7)を特異的に染色したが、PR A/B陰性細胞系統(MDA-MB-231)を染色しなかった。0.2 μg/mLのポリクローナル抗体を、陽性対照として用いた。

【図11d】プロゲステロン受容体A/Bに対する機能性モノクローナル抗体の同定および特性評価。(d) フローサイトメトリー分析。青色、T47D細胞(プロゲステロン受容体A/B陽性細胞系統)；黒色、MDA-MB-231(プロゲステロン受容体A/B陰性細胞系統)。ポリクローナル抗体信号/雑音比、1.69；濃度、3.7 μg/mL。モノクローナル抗体F9信号/雑音比=36.4；濃度0.5 μg/mL。

【図11e】プロゲステロン受容体A/Bに対する機能性モノクローナル抗体の同定および特性評価。(e) 共焦点免疫蛍光顕微鏡検査分析は、プロゲステロン受容体A/B陽性細胞系統MCF-7において特異的核染色パターンを示したが、0.46 μg/mLのMDA-MB-231細胞において示さなかった。バックグラウンド染色対照として一次抗体は含まれなかった。また、ポリクローナル抗体を、1.85 μg/mLの濃度と比較として用いた。

【図12】クローンC3抗Lin28Aモノクローナル抗体の特徴づけ。(a) 重鎖および軽鎖のコンビナトリアル対形成により、陰付きで示した5つの抗原特異的ELISA反応性クローンを得た。チェック印は、ウエスタンブロット陽性クローンを示す。CDR3配列を、識別子として用いる。(b) さまざまなLin28A陽性細胞溶解物、NCCIT、NTERA、mMES、およびIGROV1を用いてウエスタンブロット分析を実施した。(c) Lin28A陰性細胞(HeLa)およびLin28A陽性細胞(NTERA)を用いて共焦点免疫蛍光検査分析を実施した。(d) モノクローナル抗体のフローサイトメトリー分析。左のピーク、HeLa細胞(Lin28A-)；右のピーク、NTERA細胞(Lin28A+)。* V領域は、同一のV領域配列でなく、同じCDR3配列を有した。

【図13】ホスホErKに対する機能性マウスモノクローナル抗体の同定および特徴づけ。(a) 3種のマウスのプール血清からのホスホErKポリクローナル抗体の精製。プール血清、プール血清からのプロテインG精製された全IgG、プロテインG精製からの非結合画分、ならびにpH3.5、2.7および1.8の酸溶出画分を、ジャーカット細胞溶解物中のホスホErKに対する結合特異性について、ウエスタンブロットティングによって検定した。+、TPAで刺激されたジャーカット細胞；-、U0126で処理されたジ

10

20

30

40

50

ヤーカット細胞。(b)重鎖および軽鎖のコンビナトリアル対形成により、ペプチド抗原 E L I S A によって反応性である、陰付きで示した 15 種のクローンを得た。チェック印は、ウエスタンブロット陽性クローンを示す((c)を参照のこと)。C D R 3 配列を、識別子として用いる。重鎖配列について、下線を引いた部分は、フレーム枠領域 3 の末端を示す。(c)3 種のクローン(C 1 0、F 1 0 および M 3)は、ウエスタンブロッティングによるホスホ E r K 検出について特異的であった。クローン C 9 (E L I S A 陽性、ウエスタン陰性)を、対照として示す。すべての抗体は、1 0 0 n g / m L で試験した。

【0033】

詳細な説明

本開示は、興味の抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体のアミノ酸配列(およびコード化核酸配列)を迅速かつ正確に得るための方法およびシステムに関する。より詳しくは、本方法論は、完全長免疫グロブリン鎖または可変領域をコードする核酸分子を含む遺伝物質データベースに対して、動物の血清からの循環ポリクローナル抗体の直接的な質量分析ベースのプロテオミクス検査を含む。特定の実施態様では、核酸シーケンシング技術を用いることによって、動物(例えば、血清を採取してポリクローナル抗体を得る同じ動物)の B 細胞レパトリーから遺伝物質データベースを生成する。したがって、本アプローチは、2 つのソース: 動物の実際の循環ポリクローナル抗体からの質量スペクトル情報と、遺伝物質データベースからの情報(例えば、予測質量スペクトルを含む)とを関連づけること(すなわち、相互比較すること(cross-comparing)または相互参照すること(cross-referencing))を本質的に含む。次いで、血清からの実際の抗体に対応する遺伝物質データベースから、重鎖および軽鎖 D N A 配列のリストを同定することができる。このような重鎖および軽鎖を、対で発現させて機能性モノクローナル抗体を得ることができる。

【0034】

いくつかの実施態様において、本方法論は、B 細胞の不死化、単一細胞の分類および分子クローニング、またはファージディスプレイを必要とせず、そして当て推量に基づく抗体配列のアセンブリーを含まない。質量分析技術および核酸シーケンシング技術(例えば次世代 D N A シーケンシングまたは N G S)の両方の長所を活用することによって、本発明のアプローチは、ポリクローナル集団から抗原特異性モノクローナル抗体の配列を単離するために必要な時間を大幅に短縮することができ、それによって治療上使用しうる完全ヒト抗体またはヒト化抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)のような組換え抗体へのより速い移行が可能になる。

【0035】

さらにまた、本方法論は、既存の技術によって見落とされる可能性があるまれな抗体を同定することが可能である。本発明者らは、驚くべきことに、高度な選択的特異性を有する個別抗体(例えば、ポリペプチド内のリン酸化チロシン残基に特異的に結合する抗体)が、ポリクローナル集団内でごくまれに発生しうることを見いだした。抗体をコードする m R N A および P C R 増幅の頻度に依存する方法は、それらの可変鎖が低頻度で発生するため、これらの抗体を見落とすことがありうる。これに対して、本方法論は、例えば、ポリクローナル抗体集団から誘導された実際のペプチド断片の質量分析ベースのプロテオミクス分析を用いるため、P C R 増幅後に頻度の誤差を生じることがない。

【0036】

さらに、本方法論は、出発ポリクローナル集団中に存在しえない新規な抗原特異的抗体を迅速に作製することができる。例えば、最も所望の品質(例えば、抗原に対して最も高い結合親和性(または最も低い K D)または所望のアイソタイプ(例えば、I g G 2 a))を有する、作製された免疫グロブリン分子は、ポリクローナル集団中の第 1 の抗体からの軽鎖をポリクローナル集団中の第 2 の抗体(すなわち、第 1 の抗体と異なる)の重鎖とアセンブリングした結果であってもよい。

【0037】

本明細書に記載された方法は、基礎免疫学および治療法に用途を有する。例えば、本方

10

20

30

40

50

法は、血清抗体多様性、動力学、動態学、クローン性、および抗原暴露後のB細胞の移動を含む免疫学の分野における中心的な問題を理解するための基盤を提供することができる。また、本方法を用いて、免疫化された、自然感染した、または罹患した人からの治療に関連するヒトモノクローナル抗体を追跡することもできる。

【0038】

本明細書に示すように、本方法論は、実験動物種およびヒトの両方におけるいくつかの異なる抗原に適用することに成功しており、そして免疫化された対象の血清中に見いだされた最初のアフィニティー精製されたポリクローナル抗体の抗原特異的活性を反復するか、または上回る抗原特異的活性を有するモノクローナル抗体の単離が導かれている。

【0039】

したがって、本開示は、さらに、疾患抗原に特異的な治療抗体を含む、抗原に特異的な単離された組換えモノクローナル抗体、および治療モノクローナル抗体の投与に基づいて疾患を治療する治療方法を提供する。

【0040】

本発明のさまざまな態様および実施態様を、以下により詳細に記載する。本明細書に引用された特許、公開された出願、および科学文献は、当業者の知識を確立し、そしてそれぞれが詳細かつ個別に参照により組み込まれることを示すのと同程度にそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用された任意の文献と本明細書の具体的な教示との任意の矛盾は、後者を支持して解決するものとする。同様に、用語または成句の当分野で理解される定義と、本明細書において具体的に教示した用語または成句の定義との任意の矛盾は、後者を支持して解決するものとする。

【0041】

定義

本明細書に用いるように、以下の用語は、示した意味を有する。本明細書に用いるように、単数形の用語は、その内容が明らかに別のものを指していなければ、それが指している用語の複数形を明確に包含する。「約」という用語は、近似的に、ほぼ、だいたい、またはおよそを意味するものとして本明細書において用いる。「約」という用語を、数値的な範囲に関連して用いるとき、それは、明記された数値より上およびそれより下に境界線を延長することによってその範囲を変更する。一般に、「約」という用語は、20%の変動によって記載された値より上およびその下に数値を変更するために本明細書において用

【0042】

「ペプチド」または「ペプチド断片」とは、一緒に結合している個々のアミノ酸残基から形成された短いポリマーを意味し、ここで、一方のアミノ酸残基と第2のアミノ酸残基との間の結合は、アミド結合またはペプチド結合と称する。ペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸残基を含む。ペプチドは、それがより短いという点で、ポリペプチドと区別される。一方のペプチドのC'末端のアミノ酸残基と第2のペプチドのN'末端のアミノ酸残基との間のアミド結合またはペプチド結合によって一緒に結合された少なくとも2つのペプチドは、本発明のさまざまな実施態様に従ってポリペプチドを形成する。

【0043】

「ポリペプチド」とは、結合している個々のアミノ酸残基から形成された長いポリマーを意味し、ここで、一方のアミノ酸残基と第2のアミノ酸残基との間の結合は、アミド結合またはペプチド結合と称する。ポリペプチドは、少なくとも4つのアミノ酸残基を含む。しかしながら、アミドまたはペプチド結合を介して多数のポリペプチドと一緒に結合してさらにより長いポリペプチドを形成することができる。

【0044】

「核酸分子」とは、一緒に結合している個々のヌクレオチド（例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）から形成されたポリマーを意味し、ここで、一方のヌクレオチドともう一方のヌクレオチドとの間の結合は、例えば、ホスホジエステル結合を含む共有結合である。したがって、その用語には、DNA、RNA、およびDNA-R

10

20

30

40

50

NAハイブリッドが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0045】

「核酸配列」とは、免疫グロブリン鎖の全部または一部（例えば、重鎖または軽鎖）をコードする核酸配列（またはそれに対して相補的なヌクレオチド配列）を意味する。いくつかの実施態様において、核酸配列は、ゲノムDNA（例えば、イントロンDNAを有するまたは有しないエクソンDNA）である。いくつかの実施態様において、核酸配列は、cDNAまたはRNAのいくつかの形態（例えば、hnRNA、mRNA、など）である。いくつかの実施態様において、核酸配列は、核酸分子（例えば、RNAに転写されたDNA）に転写されるか、またはその核酸配列を含む細胞中のポリペプチドに翻訳されるか、のいずれかである発現された核酸配列である。したがって、発現された核酸分子には、hnRNA、mRNA、cDNA、およびゲノムエクソン配列が、含まれるがそれらに限定されるわけではない。核酸分子に関する「相補的」とは、単に、ヌクレオチドを含む2つの一本鎖核酸分子が、標準的なワトソン・クリックの塩基対を形成して二本鎖核酸分子を形成することを意味し、その二本鎖分子がDNA、RNA、またはDNA-RNAハイブリッドであるかどうかは関係ない。

10

【0046】

本明細書に用いるように、「Bリンパ球」とは、免疫グロブリン鎖をコードする遺伝子を含む遺伝子座で遺伝子組換え（または遺伝子再構成）が起こり始めた任意の白血球を意味する。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子は、染色体14（重鎖遺伝子座）、染色体2（カッパ軽鎖遺伝子座）、および染色体22（ラムダ軽鎖遺伝子座）上で生じる。ヒト白血球が免疫グロブリン鎖遺伝子座において（例えば、染色体14、染色体2、または染色体22上）遺伝子再構成事象を受けた場合、その細胞はBリンパ球とみなされる。したがって、Bリンパ球には、B細胞、プレB細胞、初期プロB細胞（例えば、ここでは、重鎖のDおよびJ領域遺伝子は、再構成を受けているが、軽鎖遺伝子は、生殖細胞系列である（すなわち、再編成されない））および後期プロB細胞（例えば、ここでは、重鎖遺伝子のV、DおよびJ領域は、再編成されるが、軽鎖遺伝子は、なお生殖細胞系列であり、そして免疫グロブリンタンパク質は、細胞表面上で発現されない）を含むプロB細胞、大型プレB細胞および小型プレB細胞、未熟B細胞、活性B細胞、胚中心B細胞、血漿細胞（形質芽球を含む）、および記憶B細胞を含むプレB細胞が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

30

【0047】

明細書および特許請求の範囲を通じて、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、同じ意味で用いられ、そして任意の動物種、例えば霊長類の動物（例えば、ヒトまたはチンパンジー）、齧歯動物（例えば、マウスまたはラット）、ウサギ目の動物（例えば、ウサギまたはノウサギ）、家畜動物（例えば、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ、およびヒツジ）、魚（例えば、サメ）、鳥類（例えば、ニワトリ）もしくはラクダ科の動物（例えば、ラクダまたはラマ）からの、またはヒト抗体を産生するために遺伝子組換えされたトランスジェニック非ヒト動物（例えば、齧歯動物）からの、任意のアイソタイプまたはサブアイソタイプの無傷の免疫グロブリンポリペプチド分子（例えば、IgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgE1、IgE2、IgA）（例えば、Lonberg et al., WO 93 / 12227 ; 米国特許第5,545,806号 ; Kucherlapati, et al., WO 91 / 10741 ; 米国特許第6,150,584号 ; US 2009 / 0098134 ; US 2010 / 0212035 ; US 2011 / 0236378 ; US 2011 / 0314563 ; WO 2011 / 123708 ; WO 2011 / 004192 ; WO 2011 / 158009 参照） ; それらの抗原結合ドメイン断片、例えばFab、Fab'、(Fab')₂ ; それらの変種、例えばscFv、Fv、Fd、dAb、二重特異性scFvs、二重特異性抗体、線状抗体（米国特許第5,641,870号 ; Zapata et al., Protein Eng. 8 (10): 1057-1062.1995参照） ; 単鎖抗体分子 ; および抗体断片から形成された多重特異性抗体 ; ならびに抗体結合ドメイン（本明細書の他の場所に定義した）であるか、またはそれと相同性である結合ド

40

50

メインを含む任意のポリペプチドを含むことを意味する。本発明のさまざまな実施態様の非限定的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多特異性の抗体およびその断片、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ抗体、およびヒト化抗体、例えばその定常および/またはFRドメインがヒト抗体由来の定常および/またはFRドメインで置換されたヒト以外の抗体（例えば、ウサギ抗体）（例えば、米国特許第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,761号；同第5,693,762号；同第6,180,370号；および同第6,548,640号参照）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。ヒト（例えば、少なくとも部分的にヒト）抗体を産生するために遺伝子組換えされたトランスジェニック非ヒト動物は、Harbour Antibodies（ロッテルダム、オランダ）、Ablexis（サンフランシスコ、CA）、Kymab Ltd（ケンブリッジ、英国）、OMT, Inc.（パロアルト、CA）、Amgen（サウザンドオークス、CA）、Medarex（プリンストン、NJ）およびRegeneron（タリータウン、NY）から入手可能である。

【0048】

天然の無傷の抗体は、2種類のポリペプチド鎖、軽鎖および重鎖でできている。本発明のさまざまな態様の非限定的な抗体は、2本の重鎖および2本の軽鎖を含む無傷の4つの免疫グロブリン鎖抗体）であることができる。抗体の重鎖は、IgM、IgG、IgE、IgAもしくはIgDを含む任意のアイソタイプまたはIgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2などを含むサブアイソタイプであることができる。軽鎖は、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖であることができる。例えば、単一のIgG天然の（または無傷の）抗体は、軽鎖の2つの同一のコピーおよびIgG重鎖の2つの同一のコピーを含む。各重鎖が1つの可変ドメイン（VH）および1つの定常領域（CH、それは、それ自体、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を含む）を含むすべての天然抗体の重鎖は、それらの定常ドメイン内多数のジスルフィド結合を介して互いに結合して抗体の「幹」を形成する。各軽鎖が1つの可変ドメイン（VL）および1つの定常領域（CL）を含むすべての天然抗体の軽鎖は、それぞれジスルフィド結合を介して1つの重鎖定常領域にその定常領域を通して結合している。4つの免疫グロブリン鎖抗体（例えば、IgG抗体）の略図を図1に示す。図1では、3つのCHドメインを薄い青色で示し、1つのVHドメインを、濃い青色で示し、1つのCLドメインを、薄い桃色で示し、そして1つのVLドメインを、濃い桃色で示す。図1に示すように、軽鎖および重鎖のVLおよびVHドメインは、それぞれ一緒になって抗体結合ドメインを形成する。

【0049】

いくつかの実施態様において、無傷の免疫グロブリン鎖（例えば、重鎖または軽鎖）は、5'から3'への（核酸配列をコードする鎖について）またはアミノ末端からカルボキシ末端への（鎖のアミノ酸配列について）順序で：可変ドメインおよび定常ドメインを含んでもよい。可変ドメインは、分散したフレームワーク（FR）領域と共に3つの相補性決定領域（CDR；超可変領域またはHVとも称する）を含んでもよい。軽鎖および重鎖の両方の可変ドメインは、FR4領域への定常領域3'（またはC'）を有する、5'（またはN'）-FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR43'（またはC'）の構造について、さらに4つの保存フレームワーク領域（FR）の間には含まれた3つの超可変領域を含む。CDRは、抗体の主要な抗原結合表面を含むループを形成しており（Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987) および Wu, T.T. and Kabat, E.A. (1970) J. Exp. Med. 132: 211-250 (1970)参照）、4つのフレームワーク領域は、主にベータシートの構造をとり、そしてCDRは接続ループを形成し、そして場合によっては、ベータシート構造の一部を形成する。各鎖のCDRは、フレームワーク領域によって接近して保たれており、そして他の鎖からのCDRと共に、抗原結合ドメインの形成に寄与する。

【0050】

「抗原」とは、抗体が特異的に結合できるターゲット分子（例えば、ポリペプチドまたは炭水化物）を意味する。抗体が特異的に結合する抗原の部分は、「エピトープ」と称する。「エピトープ」は、抗体の抗原結合ドメインが特異的に結合可能なターゲット分子の最も小さな部分である。エピトープの最小サイズは、約 3 ~ 7 アミノ酸（例えば、5 または 6 アミノ酸）であってもよい。1 つの抗原上には、多数のエピトープがありうるため、1 つの抗原には、多数の異なる抗体が特異的に結合することができ、それぞれ個々の抗体は、抗原上の異なるエピトープに特異的に結合するにもかかわらず、それらのすべて抗体は、抗原を特異的に結合する（すなわち、これらの抗体のすべては、抗原特異的抗体である）。

【 0 0 5 1 】

10

「疾患抗原」とは、疾患状態の動物中に生じる抗原を意味する。例えば、ウイルス抗原（例えば、ウイルスの遺伝物質の核酸分子によってコードされた抗原）は、そのウイルスに感染した動物の疾患抗原である。同様に、いくつかの疾患（例えば、がん）は、キメラタンパク質（例えば、B R C - A B L）を産生する遺伝子転座を特徴とする。従って、B R C - A B L タンパク質は、疾患抗原である。疾患抗原は、必ずしもその疾患を患っている動物だけにみられるわけではないことを理解すべきである。

【 0 0 5 2 】

「疾患」とは、単に動物に影響を及ぼす任意の異常状態を意味する。疾患の非限定的な例には、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチまたは I 型糖尿病）、がん（例えば、白血病、結腸がん、または前立腺がん、など）、ウイルス感染症（例えば、H I V ウイルスの感染によって生じた A I D S または水痘帯状疱疹ウイルスの感染によって生じた水痘）、寄生生物による感染症（例えば、住血吸虫症または疥癬）、および細菌感染症（例えば、結核またはジフテリア）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

【 0 0 5 3 】

「特異的に結合する」とは、その抗原（すなわち、その特異的抗原）と相互作用する、免疫グロブリンまたは抗体を意味し、ここで、相互作用は、抗原上の特定構造（例えば、エピトープ）の存在に依存している。換言すれば、抗体は、一般にすべての分子または構造というよりもむしろ特異的構造を認識して、それに結合する。抗原に特異的に結合する抗体は、「抗原特異的抗体」または「抗原に特異的な抗体」と称してもよい。いくつかの実施態様において、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原および他の分子を含む溶液（例えば、細胞溶解液）からその抗原を免疫沈降させることができる。いくつかの実施態様において、その抗原に特異的に結合する抗体は、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ またはそれ未満のその抗原に対する K_D を有する。いくつかの実施態様において、その抗原に特異的に結合する抗体は、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ もしくはそれ未満のその抗原に対する K_D 、または $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくはそれ未満の K_D 、または $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくはそれ未満の K_D 、または $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくはそれ未満の K_D 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくはそれ未満の K_D 、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ もしくはそれ未満の K_D を有する。特定の実施態様において、その抗原に特異的に結合する抗体の、その特異的抗原に対する K_D は、 1 pM から 500 pM までの間、または 500 pM から $1 \text{ } \mu\text{M}$ までの間、または $1 \text{ } \mu\text{M}$ から 100 nM までの間に、または 100 mM から 10 nM までの間である。本明細書に用いるように、用語「 K_D 」とは、2 つの分子間の相互作用の解離定数（例えば、抗体とその特異的抗原との間の解離定数）のことをいうものとする。

30

40

【 0 0 5 4 】

「免疫グロブリン鎖の可変領域」または「免疫グロブリン鎖可変領域」とは、免疫グロブリンの重鎖（すなわち、V H ドメイン）または軽鎖（すなわち、V L ドメイン）の可変ドメインの少なくとも一部を含むポリペプチドであり、ここで、V L および V H ドメインの部分は、免疫グロブリンの抗原結合ドメインを形成する（図 1 参照）。従って、免疫グロブリンの可変領域には、1 つの C D R（例えば、C D R 1）、1 つの F R をはさんだ 2 つの C D R（例えば、C D R 1、F R 2、および C D R 2）、2 つの F R をはさんだ 3 つの C D R（例えば、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、および C D R 3）、または F

50

R 1 もしくは F R 4 の一方もしくは両方が側面に位置する 3 つの C D R (例えば、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4)。が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの実施態様において、免疫グロブリン鎖可変領域は、無傷の免疫グロブリンの他の鎖(すなわち、軽鎖または重鎖)の免疫グロブリン鎖可変領域と組み合わせたときに、抗原結合ドメインを形成する、重鎖または軽鎖のいずれか一方における領域である。

【 0 0 5 5 】

「抗原結合ドメイン」とは、無傷の抗体の、その特異的抗原に対する特異的結合活性を保持する、免疫グロブリン中で 1 つの重鎖を 1 つの軽鎖とアセンブリした領域を意味する。したがって、2 本の重鎖および 2 本の軽鎖を含む、無傷の I g G 免疫グロブリンは、2 つの抗原結合ドメインを有する。同様に、重鎖と軽鎖との間に共有結合を保持する、無傷の抗体の断片化は、抗原結合ドメインを有する免疫グロブリン断片も生じる。例えば、酵素パパインをを用いた免疫グロブリンの消化は、F (a b) 断片を生成し、それらは、それぞれ単一の抗原結合ドメインを有する。もちろん F (a b) 全体は抗原結合ドメインではなく、むしろ、抗原を特異的に結合する能力を保持する F (a b) 断片の部分のみが抗原結合ドメインである。

【 0 0 5 6 】

本明細書に用いる技術的および科学的用語は、特に定義しない限り、本発明が関与する当業者によって一般に理解される意味を有する。本明細書においては、当業者に知られたさまざまな方法論および物質を参照する。抗体および/または組換え D N A 技術の一般原理を説明する標準参考文献には、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, NY (1991-2010); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (1987-2010); Kaufman et al., Eds., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine*, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991); が含まれ、それらは、すべてそれらの全体として参照によって組み込まれる。薬理学の一般原理を説明する標準参考文献には、Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2006) が含まれ、それは全体として参照により組み込まれる。

【 0 0 5 7 】

抗原特異的免疫グロブリンの配列を得る方法

一態様において、本発明は、ポリクローナル抗体の集団から単一免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖(またはその可変領域)のアミノ酸および/または核酸配列を得る方法に関する。

【 0 0 5 8 】

本方法によれば、動物から興味のポリクローナル抗体の集団を得、そして断片化してペプチド断片を生成し、それを質量分析によって分析する。次いで、ペプチド断片から観測された質量スペクトル情報を、完全長免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖(またはその可変領域)をコードする核酸配列を含む遺伝物質データベースから誘導された予測質量スペクトル情報と関連づける。このような関連づけの結果として、出発ポリクローナル抗体集団内の免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖(またはその可変領域)に対応する遺伝物質データベースから、免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖(またはその可変領域)を同定することができる。

【 0 0 5 9 】

本方法のさまざまな態様は、以下により詳細に記載する。

【 0 0 6 0 】

ポリクローナル抗体の出発集団

興味の抗原と特異的に結合する免疫グロブリンは、ヒトのような任意の哺乳動物を含む動物から採取してもよい。免疫グロブリンは、例えば、血液、血液の血清または血漿、脳脊髄液、関節液、腹膜液、粘膜分泌液、涙、鼻汁、唾液、乳、および尿生殖器分泌液を含む動物の体液サンプルから集めることができる。

【0061】

いくつかの実施態様において、免疫グロブリンは、個々の単一動物に由来する必要はなく、むしろ、異なる個体から集めた異なる抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）のカクテルであってもよい。いくつかの実施態様において、免疫グロブリンは、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、ヒト抗体配列を発現するおよび/または少なくとも部分的にヒトである抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物から集める。

10

【0062】

いくつかの実施態様において、これらの免疫グロブリンは、興味の抗原に特異的であり、その理由は、免疫グロブリンが集められる動物が、抗原であらかじめ免疫化されているためであるか、または免疫グロブリンが集められる動物が、その動物が抗原特異的抗体を生成しそうな条件にあらかじめ暴露されているためのいずれかである。後者の場合の例では、動物は、ウイルス（例えば、エプスタイン・バー・ウイルス（Epstein Barr Virus））感染していてもよく、ここで興味の抗原は、EBNA1タンパク質であり、それはエプスタイン・バー・ウイルスのゲノムによってコードされている。

20

【0063】

さまざまな実施態様において、免疫グロブリンが集められる（すなわち、得られる）動物は、Bリンパ球核酸配列を集めて参照データベースが作製される動物と同じ種のものである。いくつかの実施態様において、ペプチドデータベース用に免疫グロブリンが集められる動物と、参照データベース用にBリンパ球核酸が集められる動物とは、同じ動物である。

【0064】

図2に示すように、動物が同じ動物である場合、動物から採取した血液を、核酸配列（例えば、血液中の細胞から）およびポリクローナル抗体（例えば、血液の血清または血漿から）の両方に提供することができる。

【0065】

動物から集めた免疫グロブリンは、異なるBリンパ球が集団のメンバーを産生するため、免疫グロブリンのポリクローナル集団を形成する。このようなポリクローナル集団では、そのポリクローナル集団内の個々の抗体のすべてが同じ抗原を特異的に結合するわけではないことに留意する必要がある。実際、集団内の抗体は、それぞれ異なる抗原を結合してもよい。しかし、それでも、ポリクローナル集団の少なくとも1つの個々の抗体、好ましくは多数の抗体が、その抗原を結合する場合、このポリクローナル集団は、特定の抗原を特異的に結合すると言われている（例えば、下の実施例3参照）。別の実施例において、ポリクローナル集団中のいくつかの抗体は、低い親和性で抗原を結合してもよい。しかし、その集団中の抗体のいくつか（例えば、少なくとも1つのまたはそれ以上）が抗原を特異的に結合する場合、ポリクローナル集団は、抗原を特異的に結合すると言われる。

30

40

【0066】

「抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体（または免疫グロブリン）」という成句は、ポリクローナル集団内で、少なくとも1つの抗体が抗原に特異的に結合するが、しかし、その1つの抗体が、抗原に特異的に結合しない、ポリクローナル集団内の他の抗体から必ずしも単離されないことを意味することに留意する必要がある。当然、いくつかの実施態様では、ポリクローナル集団内の複数の異なる抗体が抗原に特異的に結合する。

【0067】

また、異なる抗体分子は、異なるB細胞によって産生された抗体分子であることに留意する必要がある。例えば、血清を集めた後、1000個の抗体分子のポリクローナル集団を血清から単離してもよい（例えば、他の血清成分から抗体を単離するためにプロテイン

50

Aカラムへの抗体の接着 (adherence) を用いる)。1000個の抗体分子のその集団内で、900個は同一であってもよく (すなわち、同じB細胞によって分泌される)、したがって、実際には、そのポリクローナル集団内に101種の異なる抗体しかない。ポリクローナル集団に関して、900個の同一の抗体分子がすべて抗原を特異的に結合する場合、1000個の抗体分子のポリクローナル集団は、抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体である。同様に、残りの100個の異なる抗体分子のうちのさらに5個の異なる抗体分子も抗原に特異的に結合する場合、1000個の抗体分子のポリクローナル集団は、同様に、抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体である。

【0068】

「抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体」と称するその集団に関して、ポリクローナル集団内の多くの抗体分子は、抗原に特異的に結合する必要はない。その用語を本明細書に用いるときは、例えば、1000個の抗体分子のポリクローナル集団内で、たとえ1個の抗体分子しか抗原に特異的に結合しなくて、999個の抗体分子が結合しなくても、その1000個の抗体分子の集団は、なお「抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体」である。

【0069】

また、ポリクローナル抗体集団中の抗体のすべてが抗原上の同じエピトープを結合する必要はないことに留意する。例えば、集団内のすべての異なる抗体が、抗原上の異なるエピトープを特異的に結合する場合、ポリクローナル集団は、抗原に特異的であることができる。

【0070】

本発明の非限定的な方法のさまざまな実施態様において、ポリクローナル免疫グロブリンの集団は、例えば、集団内に少なくとも2種の異なる免疫グロブリン、または集団内に少なくとも3種、もしくは少なくとも5種、もしくは少なくとも10種、もしくは少なくとも20種、もしくは少なくとも50種、もしくは少なくとも100種もしくは少なくとも500種の異なる免疫グロブリンを有してもよい。また、本発明は、in vitroで増殖したB細胞の組織培養上清から免疫グロブリンのポリクローナル集団を集めることを企図する (例えば、ここでは、核酸配列をB細胞それ自体から集める)。例えば、B細胞の集団は、エプスタイン・バー・ウイルスに罹患した動物から集めてもよい。例えば、他の白血球と比較して集団中のBリンパ球を富化するために集団を拡大する (expand) ことができる。これらの細胞のこの培地 (細胞によってポリクローナル抗体がその中に分泌される) から、抗体のポリクローナル集団を単離することができる。

【0071】

動物から、またはB細胞の組織培養上清から集めた免疫グロブリンのポリクローナル集団は、まず精製した後、ペプチド断片に消化することができる。例えば、集めたポリクローナル抗体を、プロテインAまたはプロテインGセファロースカラムにかけることができ、それにより、例えば、他の血液血清タンパク質から抗体を分離することができる。例えば、図2および図3を参照のこと。別法としてまたは追加的に、集めたポリクローナル抗体を抗原アフィニティー精製にかけて高い特異的活性を有する抗体を富化する。必ずしも必要なわけではないが、精製ステップ、特に抗原アフィニティー精製は、ポリクローナル混合物の複雑さを低減し、そして最終的に、潜在的に偽陽性または陰性の候補免疫グロブリンの数を低減することができる。集めたポリクローナル抗体は、精製の前または後のいずれかに、濃縮するか、もしくは緩衝液の交換をするか、またはその両方を行ってもよい。

【0072】

1つの具体的な実施態様では、動物から興味の抗原と特異的に結合する免疫グロブリンを集めるため、末梢血を動物から採血し、そして血清および/または血漿抗体を、標準方法 (例えば、プロテインAに対する抗体の接着 (adherence)) に従って集める。次いで、血清および/または血漿抗体を精製またはスクリーニングして抗原に特異的に結合する免疫グロブリンについて富化する。このスクリーニングは、例えば、固相表面 (例えば、

セファロースビーズまたはプラスチックウェルの底部)を抗原でコーティングし、そして血清および/または血漿を、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンが結合する条件下で抗原コーティングされた表面上に通過させることによるものであることができる。結合した抗体を、プロテアーゼ(例えば、パパイン)または免疫グロブリンのヒンジ領域付近を特異的に切断する化学的タンパク質切断試薬で処理して非接着Fc部分を除去してもよい。非結合の血清および/または血漿タンパク質(非特異的免疫グロブリンを含む)をすすいだ後、抗原特異的免疫グロブリンを集めることができ、そのため、その量は、抗原に特異的に結合しない抗体と比較して富化されている。

【0073】

集めたポリクローナル抗体の観測質量スペクトル

10

観測(すなわち、実際の)質量スペクトルを得るため、集めたポリクローナル抗体(または、その断片)を、タンパク質分析方法(例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、など)によって分析する。

【0074】

いくつかの実施態様において、観測質量スペクトル情報は、ポリクローナル抗体から生成したペプチド断片から得られる。ポリクローナル抗体は、例えば、1つまたはそれ以上のプロテアーゼおよび/または化学的タンパク質切断試薬、例えば臭化シアンを用いて断片化することができる。ある種のプロテアーゼは、特異的部位でそれらの基質を切断することが知られている。表1は、一般的に用いられるプロテアーゼおよびそれらの切断部位(3文字のアミノ酸コードで)の非包括的なリストを提供する。

20

【0075】

【表1】

プロテアーゼ	切断部位
トリプシン	Proが後に続かなければ、ArgまたはLysの後で(すなわち、カルボキシル側において)切断する。
キモトリプシン	Proが後に続かなければ、Phe、Trp、またはTyrの後で切断する。
エラスターゼ	Proが後に続かなければ、Ala、Gly、Ser、またはValの後で切断する。
エンドプロテイナーゼLys-C	Lysの後で切断する。
ペプシン	PheまたはLeuの後で切断する。
サーモライシン	Proが前になければIle、Met、Phe、Trp、Tyr、またはValの前で切断する。
エンドペプチダーゼV8 (別名、Glu-C)	Gluの後で切断する。

30

【0076】

40

タンパク質をより小さな断片に消化するために用いることができるプロテアーゼのより包括的なリストは、RiviereおよびTempstの表11.1.1および11.1.3(Riviere L R, Tempst P. Enzymatic digestion of proteins in solution. Curr Protoc Protein Sci. 2001 May; Chapter 11:Unit 11.1. PubMed PMID: 18429101;全体として参照により本明細書に組み込まれる)に示されている。特定の実施態様では、多数の(すなわち、2つ又はそれ以上)プロテアーゼを用いて(例えば、独立してまたは一緒に)ポリクローナル抗体を消化してV領域包括度を最大にし、そして免疫グロブリンの高度に可変のアミノ酸組成を構成する。例えば、本明細書の実施例7に説明するように、キモトリプシン、エラスターゼ、ペプシンおよびトリプシンの組合せを用いることができる。いくつかの実施態様において、1つまたは複数のプロテアーゼは、それらが、遺伝物質データベースにおけ

50

る核酸分子の分析に基づく予測 C D R 3 領域内で切断しないという基準において選択される。タンパク質は、タンパク質分解酵素よりむしろ特定の化学的タンパク質切断試薬を用いた処理によって質量分析に適した、より小さな断片に消化してもよい。例えば、G. Allen. Sequencing of Proteins and Peptides, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 9. Elsevier 1989の第3章を参照のこと。このような化学的タンパク質切断試薬には、臭化シアン、BNP - スカトール、o - ヨードソ安息香酸、希酸（例えば、希 H C l ）、などが含まれるが、それらに限定されるわけではない。例えば、タンパク質は、臭化シアンを用いて M e t 残基のところで、シアニル化後に C y s 残基のところで、BNP - スカトールまたは o - ヨードソ安息香酸などを用いて T r p 残基の後で、切断することができる。タンパク質断片は、希酸（例えば、H C l ）への暴露によって生成することもできる。質量分析によってタンパク質配列を決定する部分的酸加水分解の使用例は、Zhongら（全体として参照により組み込まれた、Zhong H, et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16(4):471-81, 2005. PubMed PMID: 15792716）によって示されている。前出のZhongらは、質量分析によるシーケンシングのため、水中25%トリフルオロ酢酸によるバクテリオロドプシン断片へのマイクロ波アシスト酸加水分解を用いた。また、Wang N, and Li L., J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 21(9):1573-87, 2010. PubMed PMID: 20547072（全体として参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0077】

タンパク質は、質量分析により適したものにするために、1つのプロテアーゼで処理することによって、複数のプロテアーゼを組み合わせるによって、化学的切断試薬で処理することによって、複数の化学的切断試薬を組み合わせるによって、またはプロテアーゼと化学的切断試薬との組合せで処理することによって、断片化することができる。反応は、高められた温度または高められた圧力で行ってもよい。例えば、Lpez-Ferrer D, et al., J. Proteome. Res. 7(8):3276-81, 2008. PubMed PMID: 18605748 ; PubMed Central PMCID: PMC2744211（全体として参照により組み込まれる）を参照のこと。断片化は、タンパク質が、消化試薬により切断可能であるすべての結合で切断されるように完了させることができる；または消化条件は、抗体可変領域配列の解読に特に役に立ちうるより大きな断片を産生するために、断片化が故意に完了しないように調整することができる；または消化条件は、タンパク質が部分的に消化されてドメインになるように、例えば、クレノー断片を作るためにE. coli DNAポリメラーゼIを用いて行われるように調整してもよい。消化レベルを調節するために変更してもよい条件には、とりわけ、期間、温度、圧力、pH、タンパク質変性試薬の欠如もしくは存在、特異的タンパク質変性剤（例えば、尿素、グアニジンHCl、界面活性剤、酸切断可能な洗浄剤、メタノール、アセトニトリル、他の有機溶媒）、変性剤の濃度、切断試薬の量もしくは濃度または消化されるタンパク質に対するその質量比が含まれる。

【0078】

いくつかの実施態様において、タンパク質を切断するために用いる試薬（すなわち、プロテアーゼまたは化学的タンパク質切断試薬）は、完全に非特異的試薬である。このような試薬を用いると、ペプチドのN末端、ペプチドのC末端、またはN末端およびC末端の両方で制約（constraint）がなくなることがありうる。例えば、ペプチド配列の両端ではなく一端またはもう一端でトリプシン切断部位を有するように制約された、部分的にタンパク質分解された配列を、本明細書に記載されたさまざまな方法に用いてもよい。

【0079】

生成したペプチド断片は、観測質量スペクトルを生成する質量分析計に接続されたHPLCを用いて検出および分析することができる。この方法は、「ボトムアップ」プロテオミクスアプローチと称することもあり、その場合、タンパク質を比較的小さなペプチド、例えば、長さ3～45残基に小さくした後、プロテオーム成分を分離および同定する。

【0080】

別の実施態様では、別法、「トップダウン」プロテオミクスアプローチを用いて観測質量スペクトルを得ることができ、それは、無傷のタンパク質または大きなタンパク質断片

またはタンパク質ドメインまたは大きなポリペプチドの質量分析を含む。例えば、特定のポリクローナル抗体分子に特異的抗原認識をもたらす抗体可変領域の部分を同定するためには、C D R が一緒に結合したままである十分に大きな断片を直接分析することによって、可変領域の大きな部分を配列決定してそのC D Rを同定することが役立つ。

【0081】

「ボトムアップ」および「トップダウン」戦略の両方を説明する総説については、Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd. Mass spectrometry for proteomics. Curr Opin Chem Biol. 2008 Oct;12(5):483-90. Review. PubMed PMID: 18718552; PubMed Central PMCID: PMC2642903 (全体として参照により組み込まれる)を参照のこと。抗体配列の決定に適用されるトップダウンプロテオミクスの最近の総説については、Zhang Z. et al., Mass Spectrom Rev. 2009 Jan-Feb;28(1):147-76. Review. PubMed PMID: 18720354 (全体として参照により組み込まれる)を参照のこと。トップダウンプロテオミクスによるモノクローナル抗体の広範なシーケンシングを示す最近の論文については、Tsybin et al, Anal Chem. 2011 Oct 21. PubMed PMID: 22017162 (全体として参照により組み込まれる)を参照のこと。

【0082】

上の非限定的な方法のいくつかの実施態様において、抗原特異的免疫グロブリンは、抗原コーティングされた表面に結合するのに対して、免疫グロブリンを、パパインまたはペプシンのいずれかで消化すると、それぞれF(a b)およびF(a b)₂断片を生成することができる。免疫グロブリン鎖可変領域の全体は、F(a b)断片の鎖上にあるため、パパインおよび/またはペプシンによるこの前処理により、免疫グロブリン鎖可変領域について富化される。免疫グロブリンの非結合部分をすすいだ後、免疫グロブリン鎖可変領域を集めることができる。

【0083】

免疫グロブリン断片を質量分析計に通過させた後、多くの観測質量スペクトルが生成される。しかし、ポリクローナル集団内の潜在的に多数の異なる免疫グロブリンが、それぞれ異なるアミノ酸配列を有し、それを質量分析計で分析するとすれば、生成した観測質量スペクトルは、機能性免疫グロブリン鎖可変領域にアセンブリングするには困難である。本発明のさまざまな実施態様の方法において、根底にある核酸配列(underlying nucleic acid sequence)が利用できるため、観測質量スペクトルデータをアセンブリングする必要がない。そのかわりに、単一ペプチド断片の観測質量スペクトルを核酸配列の予測質量スペクトルと関連づけて、出発ポリクローナル免疫グロブリン集団から、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの全免疫グロブリン鎖(またはその可変領域)のアミノ酸(および根底にあるヌクレオチド)配列を得ることができる。この関連づけステップを、以下にさらに記載する。

【0084】

質量スペクトル情報に加えて、ポリクローナル抗体のペプチド断片から誘導されたさらなる情報は、本発明のさまざまな実施態様において有用である。この情報には、各ペプチドの質量、各ペプチドの長さ(アミノ酸残基中)、各ペプチドの観測質量スペクトル(例えば、MS₂またはMS₃スペクトルのようなタンデム型質量分析から)、各ペプチドの質量電荷比、各ペプチドのイオン性電荷、各ペプチドのクロマトグラフィープロファイル、および各ペプチドのアミノ酸配列が限定されることなく含まれる。

【0085】

質量分析

本発明の方法において、質量スペクトル情報は、集めた免疫グロブリンまたはそこから生成した断片の質量分析によって得ることができる。質量分析計は、研究者が未知の化合物を同定すること、既知の化合物を定量化すること、および分子の構造および化学的性質を解明することができる、個々のイオン化分子の質量電荷(m/z)比を測定可能な機器である。いくつかの実施態様では、サンプルを単離し、それを機器上へ装填することによって質量分析を開始する。装填したら、サンプルを気化し、次いでイオン化する。その後

、磁場への暴露を経てその質量電荷比に従ってイオンを分離する。いくつかの実施態様では、セクター機器 (sector instrument) を用い、そしてイオンが機器の電磁場を通過するときのイオン軌道の偏向の規模に従ってイオンを定量化し、それをイオン質量電荷比に直接関連づける。別の実施態様では、イオンが四重極子を通過したときに、または三次元もしくは線状イオントラップもしくはオービトラップ (Orbitrap) における、もしくはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計の磁場におけるイオンの運動に基づいて、イオン質量電荷比を測定する。機器は、各イオンの相対存在量を記録し、それを用いて最初のサンプルの化学的、分子のおよび/または同位体的組成を決定する。いくつかの実施態様では、飛行時間型機器を用い、そして電場を利用して同じ電位 (potential) によりイオンを加速し、そして各イオンが検出器に達するのにかかる時間を測定する。このアプローチは、各イオンの運動エネルギーが同一となるように、各イオンの電荷を均一にすることに依存している。この場合、速度に影響を与える唯一の変数は、質量であり、より軽いイオンは、より大きな速度で移動し、結果的により速く検出器に達する。生成したデータは、質量スペクトルまたはヒストグラム、強度対質量電荷比で表され、ピークはイオン化合物または断片を表す。

10

【 0 0 8 6 】

タンパク質サンプルの質量スペクトルデータを得るには、サンプルを機器に装填し、そしてイオン化する。イオン化は、例えばエレクトロスプレーイオン化およびマトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (「MALDI」) によって行うことができる。例えば、Zenobi, "Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry", 17 Mass Spectrometry Review, 337 (1998)を参照のこと。タンパク質の特徴づけは、2つのやり方、トップダウンまたはボトムアップのうちの1つで行うことができる。トップダウンアプローチは、無傷のタンパク質またはより大きなタンパク質断片をイオン化することを含む。例えば、Allison Doerr, "Top-down Mass Spectrometry", 5 Nature Methods, 24 (2008)を参照のこと。ボトムアップアプローチは、プロテアーゼを用いて酵素的または化学的にタンパク質をペプチド成分に消化することを含む。Biran Chait, "Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down?", 6 Science 65 (2006)を参照のこと。生成したペプチドを機器に導入し、そして最終的にペプチドマスフィンガープリンティングまたはタンデム型質量分析によって同定する。

20

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施態様では、質量分析を、クロマトグラフィー分別 (例えば、液体クロマトグラフィー) と組み合わせてもよい。

30

【 0 0 8 8 】

本発明に有用な質量スペクトルデータは、ペプチドマスフィンガープリンティングによって得ることができる。ペプチドマスフィンガープリンティングは、タンパク質分解によって生成したペプチド混合物のスペクトルからの観測質量をデータベースに入力すること、および観測質量を、インシリコでの (in silico) 既知タンパク質の消化から生じる断片の予測質量と関連づけることを含む。サンプル質量に相当する既知質量は、既知タンパク質が試験サンプル中に存在する証拠を提供する。

【 0 0 8 9 】

質量スペクトルデータは、タンデム型質量分析によって得ることができる。いくつかの実施態様において、タンデム型質量分析は、典型的に衝突誘起解離を利用し、ペプチドイオンをガスとおよび断片に衝突させる (例えば、衝突によってもたらされた振動エネルギーによる)。断片化プロセスにより、タンパク質に沿ったさまざまな部位のペプチド結合で切断された切断生成物を生じる。観測断片の質量を、得られた多くのペプチド配列の1つについて予測質量のデータベースと適合させてもよく、そしてタンパク質の存在を予測してもよい。例えば、Eng, 5 An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database, JASMS, 976 (1994)を参照のこと。

40

【 0 0 9 0 】

50

別の実施態様では、タンデム型質量分析を、高エネルギー衝突誘起解離（HCD）によって実施し、それは、質量分光計において、衝突誘起解離よりもペプチド末端により近い断片生成物イオンを示す。Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. Nat. Methods. 2007 Sep;4(9):709-12. Epub 2007 Aug 26. PubMed PMID: 17721543を参照のこと。

【0091】

別の実施態様では、タンデム型質量分析を、電子移動解離（ETD）によって実施し、それはイオン-イオン反応に基づいており、ここでは、異なる化学的イオン試薬がペプチドイオンにラジカルを供与し、次いで、直ちに分解して生成物イオンを形成する。Mikesh LM, Ueberheide B, Chi A, Coon JJ, Syka JE, Shabanowitz J, Hunt DF. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. Biochim Biophys Acta. 2006 Dec;1764(12):1811-22. Epub 2006 Oct 30. Review. PubMed PMID: 17118725; PubMed Central PMCID: PMC1853258を参照のこと。特定の断片化方法、例えばETDは、特に「トップダウン」プロテオミクス戦略に適している。他の断片化機構は、特定のイオン化機構に特異的であり、例えば、ポストソース分解（PSD）などは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）と適合性があり、そして「トップダウン」プロテオミクス戦略にも適している。

【0092】

遺伝物質データベース

本発明によれば、出発ポリクローナル免疫グロブリン集団からの免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）のアミノ酸（および根底にあるヌクレオチド）配列を得るために、出発ポリクローナル免疫グロブリン集団からの観測質量スペクトル情報を、遺伝物質データベースから誘導した予測質量スペクトル情報と関連づける。

【0093】

本明細書に用いるように、遺伝物質データベースは、複数の免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸配列を含む。したがって、このような遺伝物質データベースから得るまたは誘導することができる情報は、例えば、各核酸分子のヌクレオチド配列情報、各核酸分子の長さ（ヌクレオチド中）、各核酸分子によってコードされたポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列情報、各核酸分子によってコードされたポリペプチドまたはペプチドの質量、各核酸分子によってコードされたポリペプチドまたはペプチドの長さ（アミノ酸残基中）、各核酸分子によってコードされたポリペプチドまたはペプチドの質量スペクトル情報（例えば、ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列に基づく予測質量スペクトル情報）、および各核酸分子によってコードされたポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列を含む。

【0094】

本発明のいくつかの実施態様において、遺伝物質データベースは、完全長免疫グロブリン鎖（そしてちょうどその可変領域でない）をコードする核酸配列の遺伝情報を含む。いくつかの実施態様において、核酸配列は、前記配列が誘導された細胞によって発現される（すなわち、RNAに転写されるおよび/またはタンパク質に翻訳される）。特定の実施態様において、遺伝物質データベースは、動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域をコードする、発現された核酸配列を含む。いくつかの実施態様において、遺伝物質データベースは、少なくとも100個の異なる発現された核酸配列を含む。別の実施態様において、遺伝物質データベースは、少なくとも1,000個の異なる発現された核酸配列を含む。

【0095】

免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸分子は、Bリンパ球を含む細胞（例えば、末梢白血球）の集団から容易に入手可能である。いくつかの実施態様において、核酸分子は、脾細胞または単核細胞（例えば末梢血単核細胞（PBMC））から得られる。いくつかの実施態様において、Bリンパ球は、実験未使用の動物（例えば、抗原特異的抗体が探索される抗原に暴露されることがない動物）由来である。いくつかの実施

態様において、実験未使用の動物は、極めて少しの抗原にしか暴露されていない（例えば、滅菌または病原体のいない環境で飼育された動物）。いくつかの実施態様において、実験未使用の動物は、典型的な抗原に暴露されたことがあるが、選択の抗原に暴露されたことがない典型的な動物である。

【0096】

いくつかの実施態様において、免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸分子が得られる動物は、以前に抗原に暴露された動物である。例えば、動物は、抗原（例えば、アジュバントと混合された抗原、またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）のような免疫原性キャリアに結合した抗原）で免疫化された動物であってもよく、抗原を含む病原体に感染した動物（例えば、選択抗原がHIV p24抗原であるときに、HIVウイルスに感染した動物）であってもよく、または別のやり方で以前に抗原に暴露されていてもよい。いくつかの実施態様において、動物は、鳥類（例えば、ニワトリまたはシチメンチョウ）または哺乳動物、例えば霊長類の動物（例えば、ヒトまたはチンパンジー）、齧歯動物（例えば、マウス、ハムスター、またはラット）、ウサギ目の動物（例えば、ウサギまたはノウサギ）、ラクダ科の動物（例えば、ラクダまたはラマ）、または伴侶動物のような飼いなされた哺乳動物（例えば、ネコ、イヌ、またはウマ）、または家畜動物（例えば、ヤギ、ヒツジ、またはウシ）である。

【0097】

さまざまな態様および本発明の実施態様の核酸配列は、単一の動物に由来する必要はないことを理解しなければならない。例えば、本発明のさまざまな実施態様のいくつかの核酸配列は、以前に抗原に暴露された動物由来であってもよく、そしていくつかの核酸配列は、実験未使用の動物由来であってもよい。本発明のいくつかの実施態様において、核酸配列は、単一の種の動物由来である。例えば、核酸配列が得られる動物が、多数いる場合、それらの動物は、すべて同じ種であってもよい（例えば、すべてウサギである、またはすべてヒトである）。いくつかの実施態様において、核酸配列は、単一種の動物から得られる。別の実施態様では、複数種の動物から核酸配列を得てもよい。例えば、核酸配列をマウスおよびラットから得てもよく、そしてこれらの配列からに基づく予測質量スペクトルを用いて、ポリクローナル抗体のペプチド断片の実際の質量スペクトル情報と関連づけておおよそ/または比較して、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン（または可変領域、抗原結合ドメイン、もしくはその鎖）を作製することができる。いくつかの実施態様において、核酸配列は、一方の性別の動物から得られる（例えば、すべての動物はメスである）。

【0098】

ポリクローナル抗体が集められる動物および核酸配列が集められる動物は、同じ動物、または同種の動物、または同系の動物（例えば、両方ともBalb/cマウスである）、または同じ性別の動物（例えば、両方ともメス動物である）であってもよい。したがって、抗原結合性抗体をコードする核酸配列を同定するために、ポリクローナル抗体の抗原結合性成分からのMS2スペクトルを、動物から得た核酸配列から誘導された理論MS2スペクトルと関連づけることができる。

【0099】

また、核酸配列およびポリクローナル抗体は、動物の細胞から集めることができ、その場合、細胞を動物から取り出した後、ならびにポリクローナル抗体を（例えば、培養細胞の上清または培養培地から）集める前、および細胞から核酸配列を集める前に、細胞をin vitroで培養することを理解しなければならない。この培養ステップは、例えば、他の血液または組織細胞と比較してBリンパ球を拡大または富化する（例えば、赤血球または上皮細胞よりもBリンパ球を富化する）のに有用である。本発明のさまざまな実施態様において理論質量スペクトルを作製するために用いる個々の核酸配列の数は、制限がない。例えば、5もしくは10もしくは50、または100、または1000、または100万、または10億、または1兆またはそれ以上の異なる核酸配列を得ることができ、そしてそれを用いて理論質量スペクトルを作製することができる。核酸配列は、任意のソースに由

来してもよく、そしてソースの組合せからであってもよい。例えば、核酸配列は、本明細書に記載した免疫グロブリン鎖可変領域をコードする、発現された核酸分子（または、可変領域および定常領域を含む完全長免疫グロブリン鎖全体）をシーケンシングすることによって得ることができる。また、核酸配列は、十分なV(D)J組換えを受けたことがあってもよい、またはなくてもよいゲノムDNAから得ることもできる。また、核酸配列は、公的に入手可能なソースから得ることもできる。例えば、多くの動物種からの免疫グロブリン鎖可変領域（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の多くのアミノ酸配列（およびヌクレオチド配列）が知られている（例えば、以下のUSおよびPCT特許公報（発行された米国特許を含む）を参照し、それらは、それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる：US 20100086538；WO 2010/097435；US 20100104573；US 7,887,805；US 7,887,801；US 7,846,691；US 7,833,755；US 7,829,092。

【0100】

核酸配列が得られるBリンパ球は、骨髓、胎児血、胎児肝臓、炎症部位（例えば、リウマチ様患者の炎症を起こした関節を囲んでいる滑液）、腫瘍（例えば、腫瘍浸潤リンパ球）、末梢血、リンパ節中、パイエル板中、扁桃腺中、および脾臓中、または任意のリンパ系器官中を含むが、それらに限定されない任意の血液または組織ソースからであることができる。いくつかの実施態様では、組織全体（例えば、骨髓またはリンパ節）を処理して（例えば、細胞を互いに分離し、そして溶解する）、遺伝物質を取り出し、そして免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸分子をシーケンシングすることができる。

【0101】

いくつかの実施態様では、Bリンパ球から遺伝物質を単離する前に、Bリンパ球を含む、組織または細胞の集団（例えば、末梢血）から、Bリンパ球を富化する。本発明のさまざまな実施態様によれば、動物からのBリンパ球を富化する方法は、よく知られている。Bリンパ球は、骨髓、胎児血、胎児肝臓、炎症部位（例えば、リウマチ様患者の炎症を起こした関節を囲んでいる滑液）、腫瘍（例えば、腫瘍浸潤リンパ球）、末梢血、リンパ節中、および脾臓中を含むが、それらに限定されない、多くの器官および体の領域に見いだすことができる。これらの組織サンプル（例えば、末梢血または動物の脾臓）から、標準方法に従って白血球を単離してもよい（例えば、GE Healthcare, Piscataway, NJから商業的に入手可能なFicoll-Paque PLUSまたはFicoll-Paque PREMIUM試薬を用いて製造元の説明書に従って）。次いで、例えば、Bリンパ球上に見いだされる細胞表面マーカーを用いて、他の白血球からBリンパ球自体をさらに単離することができる。Bリンパ球細胞表面マーカーには、細胞表面で発現された免疫グロブリン鎖（例えば、ラムダ軽鎖、カッパ軽鎖および重鎖、例えばIgMまたはIgG）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。さらなるBリンパ球細胞表面マーカーには、CD21、CD27、CD138、CD20、CD19、CD22、CD72、およびCD79Aが含まれるが、それらに限定されるわけではない。なおさらなるBリンパ球細胞表面マーカーには、CD38、CD78、CD80、CD83、DPP4、FCER2、IL2RA、TNFRSF8、CD24、CD37、CD40、CD74、CD79B、CR2、IL1R2、ITGA2、ITGA3、MS4A1、ST6GAL1、CD1C、CD138、およびCHST10が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0102】

これらのBリンパ球表面マーカーを、逐次的に用いてBリンパ球について富化することができる。例えば、Bリンパ球細胞表面マーカー（例えば、CD19）に特異的な抗体を磁性ビーズ（例えばInvitrogen Corp., Carlsbad, CAから商業的に入手可能なDynabeads）、および非CD19発現細胞から単離された、ビーズに接着している細胞（例えば、CD19陽性細胞）に結合させることができる。Bリンパ球は、例えば、その細胞表面で免疫グロブリン鎖を発現する細胞のフローサイトメトリーソーティング（flow cytometry sorting）によってCD19陽性細胞からさらに富化することができる。したがって、これ

らの富化Bリンパ球は、本発明のさまざまな実施態様の方法に使用するために単離することができる。

【0103】

また、抗原特異的Bリンパ球は、抗原特異的B細胞受容体（膜免疫グロブリン）を発現するB細胞を単離するベイト（bait）として所望の抗原を用いて直接精製することもできる。例えば、B細胞を、所望の抗原が接着されたカラムに加えることができる。抗原特異的B細胞は、非特異的B細胞または他の細胞（例えば、赤血球、マクロファージ、など）よりゆっくりカラムの中を流れる。したがって、この方法を用いて、抗原特異的B細胞を富化することができる。

【0104】

動物からの富化または非富化Bリンパ球（例えば、さまざまな方法によって富化される）は、核酸抽出前に1日または2日または3日または4日またはそれ以上の日数の間、in vitroで細胞培養にかけることもできる。このようなin vitro培養によりBリンパ球の数を拡大してもよく、したがって、非Bリンパ球細胞よりもBリンパ球が富化される。1つの非限定的な例において、Bリンパ球からの核酸抽出前にBリンパ球の増殖および/または分化を刺激するために、核酸抽出前に、CD27単離ヒトBリンパ球をさまざまなサイトカインおよび細胞外分子カクテル（例えば、限定されるわけではないが、活性化T細胞馴化培地、またはB細胞増殖、および/もしくは分化因子の任意の組合せ）にさらすことができる。また、in vitro培養中に、他の生物学的分子を組織培地に加えて、増殖、分化、および/またはin vitro免疫化および/または上記の任意の組合せを助けることもできる。

【0105】

これらの単離された、富化された、または刺激されたBリンパ球から、標準方法（例えば、フェノール：クロロホルム抽出；Ausubel et al., 前出参照）を用いて核酸配列（例えば、ゲノムDNA、ヘテロ核RNA、mRNA、など）を抽出することができる。次いで、シーケンシングのためのさまざまな方法を用いて、この核酸をシーケンシング分析にかけることができる。

【0106】

いくつかの実施態様では、核酸配列を、生物学的物質から直接（すなわち、シーケンシングの前に増幅することなしに）シーケンシングすることができる。核酸配列から直接シーケンシングするためのサービスおよび試薬は、例えば、Helicos BioSciences Corp. (Cambridge, MA) から商業的に入手可能である。例えば、Helicos' True Single Molecule Sequencingは、DNA、cDNAおよびRNAの直接シーケンシングが可能である。また、米国特許第7,645,596号；同第7,037,687号、同第7,169,560号；ならびに刊行物Harris et al., Science 320: 106-109, 2008; Bowers et al., Nat. Methods 6: 493-494, 2009; および Thompson and Milos, Genome Biology 12: 217, 2011（それらの特許および刊行物は、すべてそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0107】

別の実施態様では、配列情報を得る前に、（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって）核配列を増幅する。

【0108】

非限定的な1つの例では、RT-PCRのために、オリゴdT PCRプライマーを用いる。別の非限定的な例において、遺伝子特異的RT-PCRは、本明細書に記載したPCRプライマー、例えば454特異的融合マウスプライマー、454ウサギ免疫グロブリン鎖融合プライマーまたは可変重鎖および可変軽鎖領域プライマーを用いて実施する。別の例において、マウスの重鎖および軽鎖集団に対するPCRプライマーは、参照により本明細書に組み込まれたPCT公開第WO2010/097435号に記載された配列を有する。

【0109】

B細胞富化を用いてまたはなしで、精製された遺伝物質（DNAまたはmRNA）を、NGSシーケンシング前に、標準方法（例えば、Ausubel et al., 前出参照）に従って、増幅（例えば、PCRまたはRT-PCRによって）してライブラリーを作製することができる。

【0110】

また、さまざまな手段によって単離された上記Bリンパ球は、油乳剤カプセル化のような当分野の方法を用いることによって、またはRainDance technology（RainDance Technologies, Inc., Lexington, MA）のような市販機器によって、単一細胞カプセル化にすることもできる。次いで、これらのカプセル化Bリンパ球を、適当な増幅プライマーと共に適当な単一細胞RT-PCR試薬（例えば、Cat # 210210としてQiagenによって販売された試薬）と融合させて、それぞれ単一のB細胞から、結合された重鎖および軽鎖PCR生成物を生成することができる。ライゲーションまたはオーバーラップPCRは、当分野で知られており、そして2つのDNA断片を1つにまとめるさまざまな分子生物学的用途で日常的に行われている（例えば、オーバーラップPCRについては、Meijer P.J. et al., J. Mol. Biol. 358(3):764-72, 2006を参照のこと）。このアプローチは、シーケンシング中に同種の対形成の保存および同定が可能である。

【0111】

DNAシーケンシング法

本発明のさまざまな実施態様の核酸配列を得るには、当分野でよく知られており、かつ一般に利用可能なDNAシーケンシングの方法を用いてもよい。その方法は、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、SEQUENASE^(R)（US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio）、Taqポリメラーゼ（Invitrogen）、耐熱性T7ポリメラーゼ（Amersham, Chicago, Ill.）、DNAリガーゼ（例えば、T4から）または組換えポリメラーゼとプルーフリーディングエキソヌクレアーゼとの組合せ、例えばGibco BRL（Gaithersburg, Md.）によって販売されたELONGASE Amplification Systemといったような酵素を用いてもよい。そのプロセスは、Hamilton Micro Lab 2200（Hamilton, Reno, Nev.）、Peltier Thermal Cycler（PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.）およびABI 377 DNAシーケンサー（Applied Biosystems）のような装置で自動化してもよい。

【0112】

核酸分子をシーケンシングして本発明のさまざまな実施態様の核酸配列を生成する（例えば、遺伝物質データベースを入力する）非限定的な方法には、サンガー法（Sanger method）（例えば、Sanger et al, Nature 24: 687-695, 1977参照）、マクサム・ギルバート法（Maxam-Gilbert method）（例えば、Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564, 1977参照）、およびパイロシーケンシング（例えば、Ronaghi et al., Science 281 (5375): 363, 1998およびRonaghi et al., Analytical Biochemistry 242 (1): 84, 1996参照）が含まれる。ポリヌクレオチド配列を得るために用いることができる別の非限定的なシーケンシング法、パイロシーケンシングは、新生DNAに加えられた個々のヌクレオチド（dATP、dTTP、dGTP、またはdCTPのいずれか、まとめて「dNTP」）を検出するために、ルシフェラーゼを用いて光を発生させ、そして合わせたデータを用いて配列読み出しを生成する。

【0113】

いくつかの実施態様では、大規模シーケンシングまたは次世代シーケンシングを用いて核酸配列を得る。従来のDNAシーケンシングにおける1つの律速段階は、ランダムに終結されたDNAポリマーを、ゲル電気泳動によって分離する必要性から生じる。次世代シーケンシング装置は、例えば、固体表面上にDNA分子を物理的に配列し、そしてゲル分離の必要なしにその場でDNA配列を決定することによってこの制限を回避する。これらのハイスループットシーケンシング技術は、非常に多くの核酸分子を並行してシーケンシング可能である。

【0114】

したがって、数千または数百万の異なる核酸分子を、同時にシーケンシングすること

10

20

30

40

50

ができる (Church, G.M., Sci. Am. 294 (1): 46-54, 2006; Hall, N., J. Exp. Biol. 210(Pt. 9): 1518-1525, 2007; Schuster et al., Nature Methods 5(1): 16-18, 2008; および MacLean et al., Nature Reviews Microbiology 7: 287-296, 2009参照)。次世代シーケンシングを実施するためのさまざまな異なる方法および装置が存在し、そのいずれかは、核酸配列を生成するために用いることができる。多くの次世代シーケンシング技術の概要については、Lin et al., Recent Patents on Biomedical Engineering 1:60-67, 2008を参照のこと。

【0115】

例えば、Shendure, J. et al., Science 309(5741): 1728-32, 2005および米国特許公開第20070087362号は、ライゲーションベースのシーケンシング法を用いるポロニー次世代シーケンシング法を記載している (また、米国特許第5750341号参照)。Applied Biosystems (LifeTechnolgies Corp. company, Carlsbad, CA) から商業的に入手可能なSOLiD技術は、ライゲーションによるシーケンシングを用いる。SOLiD技術を用いると、シーケンシングされるDNA断片のライブラリーが、エマルジョンPCRによって増幅され、そしてライブラリー中の多数の断片のうち、単一の断片種が、単一の磁性ビーズ (いわゆるクローンビーズ) に結合される。磁性ビーズに結合された断片は、すべての断片の出発配列が知られており、かつ同一であるように、結合された汎用P1アダプター配列 (universal P1 adapter sequence) を有する。次いで、ライブラリーテンプレート内でP1アダプター配列にハイブリダイズされたプライマーが選択される。一組の四重蛍光標識ジ-ベースプローブ (a set of four fluorescently labeled di-base probes) は、シーケンシングプライマーへのライゲーションについて競合する。ジ-ベースプローブの特異性は、各ライゲーション反応における第1および第2のベースごとに調べることによって達成される。

【0116】

別の次世代シーケンシング法である、Margulies et al., Nature 437: 376-380, 2005および米国特許第7,211,390号; 同第7,244,559号; および同第7,264,929号のものは、油溶液中の水滴内でDNAを増幅する (エマルジョンPCR) パイロシーケンシングのパラレル処理バージョンを記載しており、各液滴は、単一プライマーコーティングビーズに結合された単一のDNAテンプレートを含む。シーケンシング装置 (454 Life Sciences, a Roche company, Branford, CTから商業的に入手可能であるGenome Sequencer FLX System装置) を用いて、オリゴヌクレオチドアダプターを、断片化された核酸分子に結合し、次いで、油-液滴エマルジョン中のPCR増幅前に、微小ビーズの表面に固定化する。ビーズを、それぞれ単一ビーズ、シーケンシング酵素およびdNTPを含む、ピコリットル体積の多数のウェル中に単離する。相補鎖へのdNTPの組み込みによりピロリン酸塩が放出され、それがATPを産生し、さらにそれが光を生成し、分析用の画像としてその時点で記録することができる。

【0117】

米国特許第7,115,400号は、核酸分子を固相増幅する別の技術を記載している。これは、多数の異なる核酸配列を、同時に配列および増幅することが可能である。この技術は、Solexa (Illumina, Inc.) から商業的に入手可能なGenome Analyzerシステムに具体化されている。この技術では、まず、DNA分子をスライドガラス上のプライマーに結合させ、そして局所クローンコロニーが形成されるように増幅する (ブリッジ増幅 (bridge amplification))。4タイプのddNTPを加え、そして、組み込まれていないヌクレオチドを洗浄する。パイロシーケンシングと異なり、DNAは、一度に1ヌクレオチドしか延長することができない。蛍光標識ヌクレオチドの画像をカメラで撮影し、次いで3'末端ブロッカーと共に色素をDNAから化学的に除去すると、次のサイクルが可能になる。

【0118】

免疫グロブリン鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列は、部分的なヌクレオチド配列を利用し、そしてプロモーターおよび調節要素のような上流配列を検出する当分野

で知られたさまざまな方法を用いて延長してもよい。例えば、使用してもよい1つの方法、「制限部位(restriction-site)」PCRは、汎用プライマーを用いて、既知の遺伝子座に隣接した未知の配列を読み出す(Sarkar, G., PCR Methods Applic. 2: 318-322 (1993))。特に、ゲノムDNAを、まず、リンカー配列へのプライマーおよび既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅する。例となるプライマーは、本明細書の実施例4に記載されたものである。次いで、増幅された配列を、同じリンカープライマーおよび最初のものに対して内側の別の特異的なプライマーを用いて、PCRの第2ラウンドにかける。PCRの各ラウンドの生成物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、そして逆転写酵素を用いてシーケンシングする。

【0119】

10

また、インバースPCRを用い、既知領域に基づく分岐プライマーを用いて配列を増幅または延長してもよい(Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16: 8186 (1988))。OLIGO 4.06 Primer Analysisソフトウェア(National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.)または別の適当なプログラムを用いて長さ22~30ヌクレオチドとなるように、50%またはそれ以上のGC含量を有するように、および約68~72の温度でターゲット配列にアニールするように、プライマーを設計してもよい。その方法は、いくつかの制限酵素を用いて遺伝子の既知の領域に適した断片を生成する。次いで、断片を分子内ライゲーションによって環状にし、そしてそれをPCRテンプレートとして用いる。

【0120】

使用してもよい別の方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接したDNA断片のPCR増幅を含む捕捉PCR(capture PCR)である(Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1: 111-119 (1991))。この方法では、複数の制限酵素消化およびライゲーションを用いて、設計された二本鎖配列をDNA分子の未知の部分に配置した後、PCRを実施してもよい。未知の配列の読み出しに用いてもよい別の方法は、Parker et al., Nucleic Acids Res. 19: 3055-3060 (1991))に記載されたものである。さらに、PCR、ネスト化プライマーおよびPROMOTERFINDER^(R)ライブラリーを用いてゲノムDNAに入ってもよい(Clontech, Palo Alto, Calif.)。この方法は、ライブラリーをスクリーニングする必要がなく、そしてイントロン/エキソン境界を見いだすのに有用である。

20

【0121】

30

シーケンシングの前に、Bリンパ球からの核酸を、免疫グロブリンをコードするそれらの核酸分子について、さらにスクリーニングしてもよいことを理解しなければならない。これを行うには、免疫グロブリンをコードする核酸分子に特異的な(または、それに隣接する領域に特異的な)プライマーを用いてもよい。

【0122】

本明細書に用いるように、「プライマー」とは、少なくとも約15個のヌクレオチド、または少なくとも約20個のヌクレオチド、または少なくとも約30個のヌクレオチド、または少なくとも約40個のヌクレオチドの長さであってもよい核酸配列を意味する。特定の核酸分子に特異的なプライマーは、PCRアニリング条件下(例えば、6030秒間)で核酸分子の一部にハイブリダイズするプライマーを含むことを意味する。いくつかの実施態様において、特定の核酸分子に特異的なプライマーは、その核酸分子に相補的であるものである。

40

【0123】

核酸配列のシーケンシングに用いるプライマーは、シーケンシングプライマーと称してもよい。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってターゲット核酸配列の増幅に用いられるプライマーは、PCRプライマーまたは増幅プライマーと称してもよく(例えばSambrook et al., 前出、およびAusubel et al., 前出のPCRの説明を参照のこと)、その開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0124】

本発明のさまざまな実施態様による核酸配列を得るための1つの非限定的な例では、B

50

リンパ球からの全核酸を、（例えば、核酸を94～98 に少なくとも1分間加熱することによって一本鎖にしてもよい。次いで、免疫グロブリンをコードする核酸分子非可変領域またはそれに隣接する非コード領域（例えば、免疫グロブリン遺伝子プロモーター、エンハンサー、および/またはイントロン）に特異的である一本鎖プライマーが接着された固体支持体（例えば、カラムまたはゲル）上に、一本鎖の核酸を通過させてもよい。免疫グロブリンのこれらの非可変領域のいくつかの非限定的な例には、重鎖の定常領域、および軽鎖の定常領域、および重鎖または軽鎖のFR1領域が含まれる。核酸を、固相支持体に結合したプライマーにハイブリダイズさせ、そして非ハイブリダイズ核酸を除去する。除去後、ハイブリダイズされた核酸（それは免疫グロブリンをコードする核酸分子について富化される）を、例えば、熱を加えるか、または緩衝液中のEDTAの濃度を高めることによって、プライマーから解放する。

10

【0125】

本発明の別の実施態様において、Bリンパ球から核酸が免疫グロブリンをコードする核酸分子について富化されたかどうかにかかわらず、免疫グロブリンをコードする核酸分子を増幅してそのコピー数を高めてもよい。この増幅は、例えば、免疫グロブリンをコードする核酸分子の非可変領域またはそれに隣接する非コード領域に特異的プライマーを用いたPCR増幅によって実施することができる。

【0126】

本発明のさまざまな実施態様による核酸配列を得るための上の方法のすべてにおいて、免疫グロブリン鎖可変領域をコードする核酸配列を生成するために用いられるプライマー（例えば、シークエンシングまたはPCRプライマー）は、汎用（例えば、polyA尾部）でもよく、または免疫グロブリンをコードする配列に特異的であってもよいことが理解される。

20

【0127】

いくつかの実施態様において、免疫グロブリン遺伝子をコードする核酸配列情報が得られる出発物質は、ゲノムDNAである。例えば、免疫グロブリン鎖可変領域がヒトからである場合、プライマー（例えば、シークエンシングプライマーおよび/またはPCRプライマー）は、免疫グロブリン鎖遺伝子プロモーターと同一であるように選択してもよいし、またはそれにハイブリダイズしてもよい。例えば、ヒトゲノム配列は知られている。重鎖をコードする遺伝子は、染色体14に存在し、そして軽鎖をコードする遺伝子は、染色体22（ラムダ軽鎖）および2（カッパ軽鎖）に存在するため、重鎖をコードする遺伝子および軽鎖をコードする遺伝子の調節要素にハイブリダイズするプライマーを設計することは、通常の知識を有する生物学者にとってのルーチンである。このような調節する要素には、プロモーター、エンハンサー、およびイントロンが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0128】

マウスのカッパ軽鎖遺伝子は染色体6にあることが知られており、そしてマウスの重鎖遺伝子は染色体12にあることが知られているため、マウス免疫グロブリンについて、免疫グロブリン可変領域特異的プライマーを、同様に容易に決定することができる。

【0129】

40

別の非限定的な実施態様において、免疫グロブリン遺伝子をコードする核酸配列情報が得られる出発物質は、mRNAまたはmRNAから逆に翻訳されたcDNAである。この例において、免疫グロブリン可変領域をコードする核酸配列を得るには、プライマーを、mRNAのpolyA尾部またはmRNAの対応するcDNAの相補的TTTT（配列番号：306）リッチ配列と同一であるよう選択するか、または、それらにハイブリダイズさせることができる。別法として、またはさらに、プライマーを、FR1をコードする核酸配列と同一であるように選択するか、またはそれにハイブリダイズさせることもできる。別法として、またはさらに、プライマーを、CH領域（すなわち、CH1、CH2またはCH3）のものの一部（または全部）および/またはVH領域をコードする核酸配列と同一であるよう選択するか、またはそれらにハイブリダイズさせることもできる。

50

【 0 1 3 0 】

ハイブリドーマからの免疫グロブリンをコードする核酸分子をシークエンシングするために、汎用縮重プライマーを用いることからシークエンシング誤差が生じることがある。例えば、Essono et al, Protein Engineering, Design and Selection, pp. 1-8, 2009は、ハイブリドーマクローンによって産生されたモノクローナル抗体の正しい配列を決定するために、シークエンシングを対応するIg鎖のペプチド質量分析フィンガープリンティングと組み合わせる方法を記載している。しかし、本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法において、シークエンシング誤差の存在は、単に異なる核酸配列の数を高めるだけである。Essono et al.、前出と異なり、本発明のさまざまな実施態様の方法は、抗体の出発ポリクローナル集団から、単一抗体（重鎖および軽鎖の両方またはそれらの可変領域）の作製が可能であるため（ここで、作製された抗体は、抗体の出発ポリクローナル集団内で実際に生じなくてもよい）、ペプチドデータベースの観測質量スペクトルデータを関連づける遺伝物質データベース中に多数の配列を有することは、長所である。

10

【 0 1 3 1 】

遺伝物質データベースからの予測質量スペクトル情報

本発明のさまざまな実施態様によれば、核酸分子のヌクレオチド配列が生成されたら、ヌクレオチド配列情報のみに基づいて、さらなる情報を生成してもよい。例えば、遺伝コードを用いて、ヌクレオチド配列情報を予測アミノ酸配列に翻訳することができる。当業者は、遺伝コードを用いてヌクレオチド配列をアミノ酸配列に容易に翻訳することができるが、いくつかの自動化翻訳ツール（それらは、公的に入手可能である）、例えば、Swiss Institute of BioinformaticsからのExPASy翻訳ツールまたはEMBL-EBIからのEMBOSS Transeq翻訳ツールを用いることができる。

20

【 0 1 3 2 】

同様に、核酸配列によってコードされた予測アミノ酸配列の予測質量スペクトル情報は、当業者によって容易に決定することができる。例えば、核酸配列によってコードされた予測ポリペプチドの仮想的な（すなわち、インシリコ）消化に従って、Sequestソフトウェア（Thermo Fisher Scientific, Inc., West Palm Beach, FLから）、Sequest 3Gソフトウェア（Sage-N Research, Inc., Milpitas, CAから）、Mascotソフトウェア（Matrix Science, Inc., Boston, MAから；またElectrophoresis, 20(18) 3551-67 (1999)参照）、およびX!Tandemソフトウェア（The Global Proteome Machine Organizationからオープンソース、その使用は、Baerenfaller K. et al., Science 320:938-41, 2008に記載されている）を含むが、それらに限定されない標準の公的に入手可能なソフトウェアアルゴリズムツールを用いることによって、ペプチド断片の予測質量スペクトルを生成することができる。

30

【 0 1 3 3 】

本明細書に用いるように、「予測の」、「理論的な」、および「仮想的な」という用語は、同じ意味で用いられ、核酸配列からの情報の、インシリコ（すなわち、コンピュータにおける）転写および／または翻訳（予測ヌクレオチドおよびアミノ酸配列について）またはインシリコ消化および／または質量分析（予測質量スペクトルについて）から誘導されたヌクレオチド配列、アミノ酸配列または質量スペクトルのことをいう。例えば、核酸配列は、本明細書に記載されたBリンパ球から得られたゲノム核酸分子から誘導される。例えば、ゲノムDNAから誘導されたmRNAのヌクレオチド配列は、ゲノムDNAのインシリコ翻訳に従って予測される。次いで、この予測されたmRNA（または、cDNA）をインシリコ翻訳して予測アミノ酸配列を生成してもよい。次いで、予測アミノ酸配列を、その時点でプロテアーゼ（例えば、トリプシン）および／または化学的タンパク質切断試薬（例えば、臭化シアン）でインシリコ消化して予測（または、理論または仮想）ペプチド断片を生成してもよい。次いで、仮想ペプチド断片をインシリコ分析して予測質量スペクトル情報を生成することができる。したがって、予測質量スペクトル情報、予測ペプチド断片、予測アミノ酸配列、および予測mRNAまたはcDNA配列は、すべて、Bリンパ球から（例えば、動物から）集めた核酸配列から誘導することができる。

40

50

【0134】

特定の実施態様において、予測ペプチド断片および最終的な予測質量スペクトルを生成する予測ポリペプチドを消化するために用いられるプロテアーゼおよび/または化学的試薬は、上記のように、ポリクローナル抗体の出発集団を消化するために用いたのと同じプロテアーゼおよび/または試薬である。

【0135】

観測質量スペクトルと予測質量スペクトルとの関連づけ

上記のように、抗体の出発ポリクローナル集団から誘導された断片を質量分析計に通過させると、多くの観測質量スペクトルを生成する。ポリクローナル集団内で潜在的に多数の異なる免疫グロブリンが、それぞれ異なるアミノ酸配列を有し、それらを質量分析計で分析するとすれば、生成した観測質量スペクトルを、機能性免疫グロブリン鎖可変領域にアセンブリングすることは困難である。本発明のさまざまな実施態様の方法では、コード核酸配列が入手可能であるため、観測質量スペクトルデータをアセンブリングする必要がない。そのかわりに、観測質量スペクトルを、遺伝物質データベースの核酸配列から誘導された予測質量スペクトルと関連づけて出発ポリクローナル免疫グロブリン集団から、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンの完全長免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）のアミノ酸（および根底にあるヌクレオチド）配列を得る。

【0136】

また、上記のように、遺伝物質データベースは、完全長免疫グロブリン重鎖および軽鎖およびその可変領域をコードする核酸分子を含む、免疫動物のB細胞レパトリーから単離された核酸分子から誘導することができる。遺伝物質データベースからの情報（例えば、可変領域配列の頻度ランキング）のみに基づいて抗原特異的免疫グロブリンをコードする核酸を同定する試みは、低頻度であるが著しく優れた抗原特異的活性を生じる、それらの免疫グロブリンを見落とすことがある。しかしながら、本発明のさまざまな実施態様に従って、遺伝物質データベースからの予測質量スペクトル情報を、本明細書に開示された実際の循環ポリクローナル抗体からの観測質量スペクトル情報と関連づけることによって、循環ポリクローナル抗体内の免疫グロブリンに対応する、遺伝物質データベース中のそれらの免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）を選択することができる。

【0137】

「関連づける」とは、出発ポリクローナル集団中の抗原特異的免疫グロブリンの免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖（またはその可変領域）に対応する遺伝物質データベースから、免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖（またはその可変領域）を同定または選択することができるように、出発ポリクローナル抗体から誘導された観測質量スペクトル情報と遺伝物質データベースから誘導された予測質量スペクトル情報とを相互参照し、そして互いに比較することを意味する。

【0138】

特定の実施態様において、関連づけのプロセスは、観測質量スペクトル情報を予測スペクトル情報と比較してマッチを同定することを含む。例えば、観測スペクトルのそれぞれを、遺伝物質データベースから誘導された予測質量スペクトルのコレクションに対して探索することができ、それぞれの予測スペクトルを、遺伝物質データベースからのペプチド配列と特定の（identifiably）関連させる。マッチが見いだされたら、すなわち、観測質量スペクトルが予測質量スペクトルにマッチしたら、それぞれの予測質量スペクトルは、遺伝物質データベース中のペプチド配列と特定のに関連しているため、観測質量スペクトルは、そのマッチングペプチド配列を見いだしたということになる。また、このようなマッチは、本明細書において「ペプチドスペクトルマッチ」または「PSM」と称する。探索およびマッチングさせるスペクトルの数が多いため、この探索およびマッチングプロセスは、コンピュータ実行機能およびソフトウェア、例えばSEQUESTアルゴリズム（Sage-N Research, Inc., Milpitas, CA）によって実施することができる。

【0139】

いくつかの実施態様では、探索およびマッチングは、免疫グロブリンの機能性ドメイン

または断片、例えば可変領域配列、定常領域配列および／または１つまたはそれ以上のCDR配列に向けられる。例えば、観測スペクトルは、V領域（および／またはCDR3）PSMを同定するため、免疫グロブリンのV領域（および／またはCDR3配列）から誘導された予測質量スペクトルに対して探索されるだけである。別の実施態様において、探索およびマッチングは、完全免疫グロブリン重鎖または軽鎖配列に向けられる。

【0140】

探索およびマッチングが終了した後、遺伝物質データベース中の免疫グロブリン重鎖または軽鎖を、以下のパラメーターの１つ又はそれ以上に基づいて分析し、そして選択する：ユニークペプチドの数、スペクトル共有、アミノ酸配列包括度、ペプチドの計数（総ペプチド計数またはユニークペプチド計数のいずれか）、コード核酸配列の頻度、およびクローン関連性。

10

【0141】

配列または領域（例えば、重鎖または軽鎖配列、V領域配列またはCDR配列）に関する「包括度」という用語は、配列または領域にマップし、そしてマッチング観測スペクトルを有する、ペプチド中で同定された配列内のアミノ酸の総数を、配列または領域中のアミノ酸の数によって割ったものとして定義される。包括度が高いほど、配列または領域が、実際のポリクローナル集団中に現れる可能性が高い。

【0142】

「ユニークペプチドの数」とは、単一タンパク質配列（例えば、単一の免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖またはそれらの可変領域）へのマッピングが観測された明確なペプチドの数を意味する。数が大きいほど、ポリクローナル集団中に免疫グロブリン鎖が存在する可能性が高い。特定の実施態様において、免疫グロブリン鎖の選択は、免疫グロブリン鎖またはその可変領域中の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上のユニークペプチドの数に基づいて行う。

20

【0143】

「スペクトル共有」は、配列にマップされたペプチドの総数を、全遺伝子データベースにマップされた確信的PSMの総数で割ることによって定義される。スペクトル共有は、特異的V領域配列にマップするPSMのパーセンテージとして表されるペプチドのヒト読み込み可能な計数を提供する。

【0144】

タンパク質配列（例えば、CDR3領域または可変領域）に関する「ペプチド計数」という用語は、ペプチドがタンパク質配列にマッチする観測質量スペクトルから同定された回数を意味する。例えば、CDR3領域の計数は、ペプチドが、CDR3領域にマッチする観測質量スペクトルから同定された回数を意味する。可変領域の計数は、ペプチドが、可変領域にマッチする観測質量スペクトルから同定された回数を意味する。タンパク質配列に関する「総ペプチド計数」は、任意のペプチド（ユニークまたは非ユニーク）が、タンパク質配列にマッチする観測質量スペクトルから同定された回数を意味する。「ユニークペプチド計数」は、ユニークペプチドが、タンパク質配列にマッチする観測質量スペクトルから同定された回数を意味する。同じペプチドが観測質量スペクトルから複数回同定された場合、このペプチドが観測された総回数は、総ペプチド計数を決定する際に考慮されるが、このペプチドは、ユニークペプチド計数を決定する際には１回しか計数されない。

30

40

【0145】

特定の実施態様において、免疫グロブリン重鎖または軽鎖は、配列包括度に基づいて選択する。別の実施態様において、選択は、配列包括度と、ユニークペプチドの数、スペクトル共有、総ペプチド計数、ユニークペプチド計数、コード核酸配列の頻度、またはクローン関連性を含む１つまたはそれ以上の他のパラメーターとの組合せに基づいて行う。

【0146】

上のパラメーターは、完全長重鎖または軽鎖に関して、または免疫グロブリン重鎖または軽鎖の１つまたはそれ以上の部分、例えば、可変領域、およびCDR（例えば、CDR

50

1、C D R 2、またはC D R 3、特にC D R 3)に関して、独立して決定することができる。特定の実施態様において、免疫グロブリン鎖(またはその可変領域)の選択は、V領域包括度および/またはC D R 包括度(例えば、C D R 3 包括度)に基づいて行う。

【0147】

免疫グロブリン重鎖または軽鎖(またはその可変領域)の選択は、1つまたはそれ以上のパラメーターの絶対値に基づいて、または関連パラメーターの絶対値のランキングに基づいて行うことができる。特定のパラメーターについてのランキングを考える場合、トップにランキングされた10、20、30、40、50、60、70、80、90、100またはそれ以上の配列は、そのパラメーターの絶対値にかかわらず選択することができる。いくつかの実施態様において、パラメーターの値、例えば、配列包括度のパーセンテージを考える場合、免疫グロブリン鎖の選択は、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、98%またはそれ以上のC D R 包括度(例えばC D R 3 包括度);さらに、または代わりに、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%またはそれ以上のV領域包括度に基づいて行う。

【0148】

いくつかの実施態様では、系統発生的分析を実施して重鎖可変領域、軽鎖可変領域、または1つもしくはそれ以上のC D Rのもの(例えば、C D R H 3またはC D R L 3)のクローン関連性を決定する。生殖細胞系配列と比較した重鎖および軽鎖の核配列の変化または突然変異は、抗原暴露後の抗体の親和性成熟の証拠を提供することができる。クローン関連性は、抗体配列の選択における因子として用いることができる。系統発生的分析は、当分野で知られた方法、例えば、Dereeper et al., 2008, Nucl. Acids Res., 36(Web Server issue):W456-459; Dereeper et al., 2010, BMC Evol. Biol., 10:8、およびwww.phylogeny.fr/version2/cgi/index.cgi.でオンライン入手可能に記載されたものによって実施することができる。いくつかの実施態様では、重鎖または軽鎖可変領域全体を相同性によって分類し、次いで、さらにC D R(例えば、C D R 3)相同性によって分類する。

【0149】

次に、選択された重鎖および軽鎖配列を対で発現させてモノクローナル抗体にアセンブリングし、それを分析して抗原特異的機能を確認することができる。選択された重鎖および軽鎖配列の対形成は、完全にランダムであることができ、または配列包括度、ユニークペプチドの数、スペクトル共有、総ペプチド計数およびユニークペプチド計数を含む上記の1つもしくはそれ以上のパラメーターを考慮に入れることができる。

【0150】

いくつかの実施態様において、特定のペプチド配列を有する抗体の集団の存在量は、重元素標識ペプチド(例えば、A Q U A)を用いて決定することができる。例えば、WO 03/016861 および Gerber et al., 2003, 100:6940-45を参照のこと。これらの方法は、ペプチド標準に対する比較によって、生物学的サンプル中に同じ配列およびタンパク質修飾を有するペプチドの絶対量を決定するために、既知量の少なくとも1つの重元素標識ペプチド標準(それは、LC-SRMクロマトグラフィーによって検出可能なユニーク特徴を有する)を、消化された生物学的サンプルに導入することを用いる。ペプチドは、1種に抗体に対してユニークであることができ、または多数の(例えば、クローン関連の)抗体中に見いだされる。いくつかの実施態様において、ペプチドは、少なくともC D R(例えば、C D R 3)の一部を含むことができる。抗体集団の存在量の定量化は、例えば、対象のワクチン接種後に、血清抗体組成物をモニタリングする方法において有用でありうる。

【0151】

本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法を用いてアミノ酸性配列(または、核酸配列)が作製された、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンは、免疫グロブリンの出発ポリクローナル集団内に実際に存在する必要があることに留意する必要がある。むしろ、本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法は、その免疫グロブリンが出発ポリクロー

10

20

30

40

50

ナル集団に実際に存在したかどうかに関わらず、単に、抗原を特異的に結合する免疫グロブリンを迅速に作製することができる。例えば、抗原または所望のアイソタイプ（例えば、IgG2a）について最も高い所望の品質（例えば、最も高い結合親和性（または、最も低いKD）を有する作製された免疫グロブリンは、ポリクローナル集団中の第2の抗体（すなわち、第1の抗体と異なる）の重鎖を用いてアセンブリされたポリクローナル集団中の第1の抗体からの軽鎖の結果であってもよい。出来上がった作製された免疫グロブリンを、標準方法に従ってさらに特徴づけることができる（例えば、抗原またはアイソタイプに対する結合親和性）。

【0152】

組換え抗体を作る方法

10

抗原に特異的に結合する抗体の免疫グロブリン鎖（または、その可変領域）のヌクレオチド配列が解明されたら、その配列を含む核酸分子を生成することができる。

【0153】

例えば、免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸分子が得られる出発集団がcDNAライブラリーである場合、解明された配列を含む核酸分子は、ライブラリーから（例えば、解明された配列の一部と同一であるか、またはそれとハイブリダイズ可能なプライマーを用いてライブラリーをスクリーニングすることによって）、または解明された核酸配列を増幅するために設計されたプライマーを用いてライブラリーからの核酸分子をPCR増幅することによって、容易に得ることができる。

【0154】

20

別法として（またはさらに）、解明されたヌクレオチド配列を含む核酸分子は、標準DNA合成装置を用いて、単に核酸分子を人工的に生成することによって産生できる。多くのDNA合成装置は、BioAutomation, Plano, TXから入手可能なMerMadeシリーズの合成装置（例えばMerMade 4、MerMade 6、MerMade 384、など）；Applied Biosystemsから商業的に入手可能なさまざまなDNA/RNA合成装置（今ではLife Technologies, Corp., Carlsbad, CAの一部）を含めて商業的に入手可能であるが、それらに限定されるわけではない。また、いくつかの会社は、DNA合成サービスも提供している（例えば、BioPioneer、Bio S&R、Biomatik、Epoch BioLabs、など）。

【0155】

免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする核酸を発現させて組換え免疫グロブリンを産生する方法は、知られている（例えば、米国特許第6,331,415号；同第5,969,108号；同第7,485,291号；US2011-0045534；およびPCT公開第WO 2011/022077号）。組換え免疫グロブリンは、昆虫細胞（例えば、SF9細胞）、ハムスター細胞（例えば、CHO細胞）、マウス細胞（例えば、NIH-3T3細胞）、霊長類の動物細胞（例えば、COS細胞）、ヒト細胞（例えば、HeLa細胞）、および原核細胞（例えば、E. coli細胞）を含むが、それらに限定されないさまざまな細胞中で作ることができる。いくつかの実施態様において、本発明のさまざまな実施態様の組換え免疫グロブリンを発現する細胞は、免疫グロブリンが最初に誘導された種のそれと類似したやり方で、組換え免疫グロブリンに2次的修飾（例えば、グリコシル化）を加えることができる。例えば、その断片が観測質量スペクトルデータを生成するために用いられるポリクローナル抗体の集団を、ヒトから集める場合、ヒト細胞（またはタンパク質をヒト細胞と似たようにまたは同じようにグリコシル化する細胞）を用いることができる。

30

40

【0156】

細胞中で抗原に特異的に結合する組換え免疫グロブリン（または、その抗原結合断片）の核酸配列を発現させるには、核酸配列が導入された細胞中で、挿入された核酸配列が発現するように、核酸配列を、適当な調節配列を含むベクター（例えば、プラスミドまたはレトロウイルスベクター）に結合してもよい。このような調節配列には、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン受容体要素、ポリアデニル化部位、などが含まれる。組換え免疫グロブリン（または、それを含むベクター）の核酸配列を細胞に導入するには

50

、エレクトロポレーション、化学的手段（例えば、 CaPO_4 、DEAE-デキストラン、ポリエチレンジイミン）によるトランスフェクション、感染、形質導入、リポソーム融合、などを含むが、それらに限定されない任意の方法を用いることができる（例えば、前出のAusubel et al.の方法を参照のこと）。

【0157】

本発明のいくつかの実施態様によれば、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を、ランダムに選択して免疫グロブリン（または可変領域またはその抗体結合ドメイン）にアセンブリングする。例えば、ポリクローナル抗体のペプチド断片からの実際の質量スペクトルと、核酸配列によってコードされた予測ペプチドの予測質量スペクトルとの相関性を用いると、ペプチド断片を含む免疫グロブリン鎖のヌクレオチド配列または予測アミノ酸配列が得られる。次いで、得られた免疫グロブリン鎖のヌクレオチド配列は、ランダムに、および/または無傷抗体の他の鎖をコードする、同様に得られた免疫グロブリン鎖の第2のヌクレオチド配列と共に、コードされた2つの免疫グロブリン鎖を、無傷抗体にアセンブリングする条件下で、共発現させることができる。

10

【0158】

無傷の免疫グロブリンがアセンブリングされるように、それぞれ免疫グロブリン鎖をコードする2つのヌクレオチド配列（例えば、細胞中）を共発現する条件は、知られている（例えば、米国特許第5,969,108号；同第6,331,415号；同第7,498,024号；同第7,485,291号；および米国特許公開第20110045534号を参照し、すべてそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）。本明細書に記載された方法を用いて得ることができる異なるヌクレオチド配列の数のため、本発明は、コードされた免疫グロブリンをスクリーニングして、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを作製するために、ロボット工学およびハイスループットな方法の使用を企図する。

20

【0159】

本明細書に用いるように、「アセンブリングする」または「アセンブリング」とは、2つの鎖が結合して抗体（またはその断片）を作製する手法で、抗体の軽鎖（またはその断片）と、抗体の重鎖（またはその断片）とを一緒に組み合わせることを意味する。いくつかの実施態様では、アセンブリングされた抗体（またはその断片）において、重鎖および軽鎖の両方からのアミノ酸残基は、アセンブリングされた抗体（またはその断片）の抗原結合ドメインに関与する。いくつかの実施態様において、アセンブリングされた抗体（またはその断片）は、重鎖（またはその断片）に共有結合した軽鎖（またはその断片）を含む。いくつかの実施態様において、アセンブリングされた抗体（またはその断片）は、重鎖（またはその断片）に非共有結合的に結合された軽鎖（またはその断片）を含む。

30

【0160】

いくつかの実施態様において、上記のプロテオミクス分析で同定された免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、組換え抗体のアセンブリー前に、組換え分子生物学的手法または遺伝子合成手法によって合成される。例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、アセンブリー前にヌクレオチドまたはペプチド合成装置において合成してもよい。あるいは、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列を発現ベクター（例えばInvitrogen, Carlsbad, CAからのpCDNA3.1）中にクローニングし、そして発現ベクターでトランスフェクトされた細胞（例えば、HeLa細胞、CHO細胞、COS細胞、など）中でコードされたポリペプチドを発現することによって組換え発現させてもよい。いくつかの実施態様において、アセンブリーステップは、トランスフェクト細胞中で起こる（例えば、単一細胞を、1つの重鎖および1つの軽鎖をコードする核酸配列を含む、1つまたはそれ以上の発現ベクターでトランスフェクトし、ここで、重鎖および軽鎖は、トランスフェクト細胞中でポリペプチドとして発現される）。

40

【0161】

本発明のさまざまな実施態様では、組換え抗体を単離する。本明細書に用いるように、

50

「単離した」（または「精製した」）とは、抗体が、自然に結合している他の生物学的物質を実質的に含まない、または誘導された他の生物学的物質、例えば、本発明の抗体を発現するために遺伝子組換えされた細胞を含まないことを意味する。例えば、単離された組換え抗体は、宿主細胞の他の成分から物理的に分離されたもの（例えば、小胞体または細胞質タンパク質およびRNA）である。同様に、血液の血清および／または血漿から精製された抗体は、他の血清または血漿成分（例えば、アルブミンまたは細胞）から単離された抗体である（例えば、プロテインAに対する抗体の接着を用い、ここで、非抗体血清成分は、プロテインAに接着しない）。したがって、本発明の単離された抗体（または単離された免疫グロブリン）には、少なくとも70～100％純粋である抗体、すなわち、抗体が全組成物の70～100質量％を構成する組成物中に存在する抗体が含まれる。いくつかの実施態様において、本発明の単離された抗体は、75％～99質量％純粋、80％～99質量％純粋、90～99質量％純粋、または95％～99質量％純粋である。本発明のさまざまな非限定的実施態様の抗体の相対的純度は、周知の方法によって容易に決定される。

【0162】

いくつかの実施態様では、組換え抗体（またはその可変領域）を、免疫測定法においてさらにスクリーニングまたは分析して、抗体が抗原に特異的に結合することを確認する。いくつかの実施態様において、免疫測定法は、標準免疫測定法、例えばフローサイトメトリーアッセイ（例えば、FACSスキャン）、酵素結合免疫吸着検定法（enzyme-linked immunosorbent assay）（ELISA）、ウエスタンブロッティングアッセイ（Western blotting assay）、免疫組織化学的アッセイ（immunohistochemistry assay）免疫蛍光測定法（immunofluorescence assay）、放射免疫測定法（radioimmunoassay）、中和アッセイ（neutralization assay）、結合アッセイ（binding assay）、親和性アッセイ（affinity assay）、またはタンパク質もしくはペプチド免疫沈降アッセイである。これらの免疫測定法は、すべてよく知られた標準アッセイであり、そして標準方法の書物（例えば、Ausubel et al.、前出；Coligan et al.、前出；Harlow and Lane、前出を参照のこと）に詳しく記載されている。

【0163】

治療抗体

本発明のさまざまな非限定的な実施態様および方法は、例えば、治療価値を有する抗体の単離に有用である。例えば、病原体に対する動物の正常な免疫応答の経過において、病原体の抗原に最も高い特異性を有する抗体は、生じるのに数週間かかることがある。その理由は、動物のすべての有核細胞によって発現された主要組織適合性複合体に関して、抗体を産生するBリンパ球が、抗原提示細胞上に提示された抗原も認識する適当なTリンパ球によって、最初に刺激されなければならないためである。抗原に最初に反応するBリンパ球は、特異的に抗原に結合する抗体を産生する。しかし、実際には、最も高い親和性抗体は、（細胞表面で発現された免疫グロブリンが、他の細胞表面抗原と複合体形成してB細胞受容体を形成することにより）その抗原に結合し、そしてB細胞受容体および他の細胞（Tリンパ球を含む）を通して刺激されると、親和性成熟を受けてその特異的抗原に対して高い親和性を有する抗体を産生するB細胞によって産生されたものである。親和性成熟を受けたこのようなBリンパ球（または同じ抗体特異性を有するその子孫）は、動物において入手可能であり、動物が再び同じ病原体に遭遇したときに高い親和性抗体を迅速に産生する。

【0164】

抗原が最初に認められた時の抗原に応答するTリンパ球およびBリンパ球のこの緊密な調節（例えば、動物が特定の病原体に最初に感染した時）は、自己免疫または不適当な免疫応答を防ぐために必要である。しかし、1つの欠点は、抗原特異的Bリンパ球が、抗原に対して最も高い親和性および特異性の抗体を分泌する時間までに、急速に増殖する病原体が、もはや容易に一掃することができない程度にまで動物内で増殖するという点である。本発明のいくつかの実施態様において、本方法は、迅速に抗原特異的抗体の発生が

可能であり、最初に抗体を分泌する抗原特異的Ｂリンパ球単離し、そしてそのリンパ球を不死化するという時間のかかるプロセスを省略する。

【０１６５】

したがって、別の態様において、本発明は、薬学的に許容しうる担体と共に組換え抗体を含む治療組成物を提供する。

【０１６６】

本明細書に用いるように、「薬学的に許容しうる担体」には、活性成分（例えば、本発明のさまざまな実施態様に従って作られた組換え抗体）と組み合わせたときに、成分に生物活性を保持させることができ、そして対象の免疫系と非反応性であり、かつ送達時に対象に対して非毒性である、任意の物質が含まれる。例としては、任意の標準医薬担体、例えばリン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルジョン、例えば油／水エマルジョン、およびさまざまなタイプの湿潤剤が含まれるが、それらに限定されるわけではない。エアゾール剤または非経口投与のための希釈剤の非限定的な例は、リン酸緩衝食塩水、標準（０．９％）生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液である。溶液のｐＨは、約５から約８まで、または約７から約７．５までであってもよい。さらなる担体としては、徐放性製剤、例えば、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、成形物品、例えば、膜、リポソームまたは微粒子の形態をしている。特定の担体が、例えば、投与経路および投与される抗体の濃度に応じてより好ましいものとなりうることは、当業者に明らかである。このような担体を含む組成物は、よく知られた慣用の方法によって処方される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; および Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. Mack Publishing, 2000参照）。

【０１６７】

当業者に知られた任意の適した担体を本発明の医薬組成物に用いてもよいが、担体のタイプは、投与方法に応じて変化する。本発明のさまざまな実施態様において、本明細書に記載された非限定的な医薬組成物の多くの送達技術（例えば、結合物質または結合物質をコードするポリヌクレオチドを含む）は、例えばRolland, 1998, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198およびその中の引用文献に記載されたものは、当分野でよく知られている。

【０１６８】

治療の方法

別の態様において、本発明は、疾患抗原によって特徴づけられる疾患を有するか、または有することが疑われる動物を治療する方法であって、本発明のさまざまな実施態様の方法に従って作られた、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを含む治療組成物の有効量を投与することを含み、治療組成物の免疫グロブリンによって特異的に結合される抗原と疾患抗原とが同じである、方法を提供する。いくつかの実施態様において、動物は、ヒトまたは飼育ならされた動物（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、シチメンチョウ、ラマ、エミュー、ゾウまたはダチョウ）である。本明細書に用いるように、疾患および示された疾患抗原（例えば、ＡＩＤＳからのＨＩＶｇｐ１２０抗原）に関して「特徴とする」という成句は、示された疾患抗原がその疾患を有する動物中に存在する疾患を意味する。いくつかの実施態様において、疾患抗原は、疾患の病原因子（例えば、ウイルス）由来の核酸によってコードされている。いくつかの実施態様において、疾患抗原は、動物のゲノム（例えば、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）の患者においてフィラデルフィア染色体（Philadelphia chromosome）によってコードされたＢＣＲ－ＡＢＬ融合疾患抗原によってコードされている。

【０１６９】

「治療」とは、疾患の進行を停止させること、遅延させること、もしくは抑制すること、または動物における疾患の発症を予防することを意味する。治療が成功するかどうかを検出する方法は、知られている。例えば、疾患が固形腫瘍である場合、本発明のさまざまな実施態様の方法を用いて産生された組換え免疫グロブリンを含む治療組成物の有効量を

投与した後、腫瘍の退縮、転移の減少、腫瘍サイズの減少および/または腫瘍細胞計数の減少があれば、疾患の進行は、抑制、停止、または遅延されている。

【0170】

本明細書に用いるように、「有効量」とは、動物における疾患の進行を停止させること、減速させること、停止させる、遅延させること、または抑制すること、または動物における疾患の発症を予防することを含む有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量または用量である。有効量は、例えば、組換え免疫グロブリンを含む治療組成物が投与されることになっている対象の年齢および体重、症状の重症度ならびに投与経路に応じて変化し、したがって、投与は個別に決定される。一般に、経口投与の一日の成人投与量は、一回量として、または分割量で与えて約0.1~1000mgである。連続的な静脈内投与では、組成物を、0.01μg/kg/分~1.0μg/kg/分、望ましくは0.025μg/kg/分~0.1μg/kg/分の範囲で投与することができる。

10

【0171】

有効量は、1回またはそれ以上の投与で投与することができる。例えば、本発明のさまざまな実施態様の方法を用いて産生された組換え免疫グロブリンの有効量は、動物における疾患（例えば、がん）の進行を、改善する、中断する、安定化する、逆転させる、減速するおよび/または遅延するのに十分な量であるか、またはin vitroで病変細胞（例えば、生検がん細胞）の増殖を改善する、中断する、安定化する、逆転させる、減速するおよび/または遅延するのに十分な量である。当分野で理解されるように、本発明のさまざまな実施態様の組換え抗体の有効量は、とりわけ、動物の医学的病歴および他の因子、例えば組換え抗体のアイソタイプ（および/または投与量）に応じて変化してもよい。

20

【0172】

本発明のさまざまな実施態様の非限定的な組換え抗体を含む組成物を投与するための有効量およびスケジュールは、経験的に決定してもよく、そしてこのような決定を行うことは、当業者の範囲内である。投与されるべき投与量が、例えば、本発明のさまざまな実施態様の組成物が投与される動物、投与経路、使用する組成物の特定のタイプ（例えば、組成物中の組換え抗体のアイソタイプ）および動物に投与される他の薬物に応じて変化することは当業者に理解される。動物（例えば、ヒト患者）に、抗体を含む組成物を投与する場合、抗体の適当な用量を選択する際の指針は、抗体の治療的使用における文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Nokes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389に見いだされる。

30

【0173】

単独で用いる抗体の有効量の典型的な1日投与量は、上記の因子に応じて、1日当たり約1μg/kgから最大100mg/kg体重まで、またはそれ以上の範囲であってもよい。一般に、以下の用量のいずれかを用いてもよい：少なくとも約50mg/kg体重；少なくとも約10mg/kg体重；少なくとも約3mg/kg体重；少なくとも約1mg/kg体重；少なくとも約750μg/kg体重；少なくとも約500μg/kg体重；少なくとも約250μg/kg体重；少なくとも約100μg/kg体重；少なくとも約50μg/kg体重；少なくとも約10μg/kg体重；少なくとも約1μg/kg体重またはそれ以上の用量を投与する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供する結合物質（例えば、抗体）の用量は、約0.01mg/kgから約50mg/kgまでの間、約0.05mg/kgから約40mg/kgまでの間、約0.1mgから約30mg/kgまでの間、約0.1mgから約20mg/kgまでの間、約0.5mgから約15mgまでの間、または約1mgから10mgまでの間である。いくつかの実施態様において、用量は、約5mgから10mgまでの間である。

40

【0174】

本明細書に記載された方法（治療方法を含む）は、1つのまたは複数の部位に、一時点

50

または複数の時点で、一回の直接注射によって実施することができる。また、投与は、複数の部位にほとんど同時であることができる。投与の頻度を、決定し、そして治療経過中に調整してもよく、そしてそれは所望の結果の達成における基礎となる。いくつかの場合、本発明のさまざまな実施態様の組換え免疫グロブリンの持続連続放出製剤は、適当であってもよい。持続放出を達成するさまざまな製剤および装置は、当分野で知られている。

【0175】

本発明の組換え抗体を含む組成物は、例えば、全身、局所、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下もしくは筋肉内投与を含む任意の適当な投与方法、または有効な形態で血流へのその送達を保証する、注入のような他の方法によって処方してもよい。また、組成物は、単独の灌流技術、例えば単独の組織灌流によって投与して局所治療効果を発揮してもよい。皮下注射のような非経口投与では、担体は、好ましくは水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ロウまたは緩衝液を含む。経口投与では、任意の上の担体または固体担体、例えばマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロースおよび炭酸マグネシウムを用いてもよい。いくつかの実施態様において、経口投与では、組成物の製剤は、例えば、リポソーム内に本発明のさまざまな実施態様の組換え免疫グロブリンをカプセル化しているマイクロカプセルとして消化性管中の分解に対して抵抗性である。生分解性ミクロスフェア（例えば、ポリラクテートポリグリコレート）を、本発明の治療組成物の担体として用いてもよい。適した生分解性ミクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号および同第5,075,109号に開示されている。

【0176】

本発明のいくつかの実施態様において、組成物は、緩衝液（例えば、中性緩衝食塩液またはリン酸緩衝食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン、抗酸化剤、キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）および/または防腐剤を含んでもよい。別法として、本発明のさまざまな実施態様の非限定的な組成物は、凍結乾燥物として処方してもよい。

【0177】

本発明のいくつかの実施態様において、組換え免疫グロブリンは、例えば、コアセルベーション技術によってまたは界面重合（例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル、それぞれ）によって、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）において、またはマクロエマルジョンにおいて調製されたマイクロカプセル中に封入してもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000に開示されている。本発明のさまざまな実施態様の組換え免疫グロブリンの血清半減期を増加させるには、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されたように、抗体（特に抗体断片）にエピトープを結合するサルベージ受容体を組み込んでもよい。本明細書に用いるように、用語「エピトープを結合するサルベージ受容体」とは、IgG分子のインビボ血清半減期を高める役割を担う、IgG分子（例えば、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4）のFc領域のエピトープのことをいう。

【0178】

本発明のいくつかの実施態様において、組換え免疫グロブリンは、リポソームとして処方してもよい。組換え免疫グロブリンを含むリポソームは、Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; ならびに米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載されたような当分野で知られた方法によって製造される。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。特に有用なリポソーム

ムは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームを所定の孔径のフィルターを通して排出すると、所望の直径を有するリポソームが得られる。さらに、本発明のさまざまな実施態様の抗体(抗原結合ドメイン断片、例えばFab'断片を含む)は、ジスルフィド相互変換反応を経て、Martinet al., 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288に記載されたリポソームに結合することができる。本発明のさまざまな実施態様の組換え抗体の投与は、注射、経口投与、パーティクルガンもしくはカテーテル挿入投与、および局所投与を含む、局所または全身投与を含む。当業者は、in vivoで外因性タンパク質を発現させるための発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第6,436,908号、同第6,413,942号および同第6,376,471号を参照のこと。

10

【0179】

別の態様において、本発明は、動物中の疾患抗原の存在を特徴とする、疾患の動物における発症の可能性を低減する方法であって、本発明のさまざまな実施態様の組換え免疫グロブリンを含む、治療組成物の有効量を投与することを含み、治療組成物の免疫グロブリンによって特異的に結合される抗原と疾患抗原とが同一である、方法を提供する。

【0180】

ワクチン製剤は、Vaccine Design(“The subunit and adjuvant approach”(Powell M. F. & Newman M. J. 編, (1995) Plenum Press New York)に一般に記載されている。

【0181】

20

別の態様において、本発明は、動物からの抗体のアミノ酸配列を決定するキットであって、(a)動物からの多数の免疫グロブリンの免疫グロブリン鎖可変領域をコードする核酸配列を得るための手段および(b)質量分析によって分析された抗体からの質量スペクトル情報を核酸配列から誘導された予測質量スペクトル情報と関連づけて抗体のアミノ酸配列を決定するための説明書を含むキットを提供する。

【0182】

本明細書に開示された方法は、例えば、抗原で免疫化された対象において時間をかけて循環抗体をモニターするために用いることができる。これらの実施態様では、複数の時点で(例えば、免疫化の前および後に)対象からサンプルを採取することができ、そして本明細書に開示された方法を用いて、各時点での循環抗体を同定する。循環抗体の組成は、複数の時点で比較してワクチン接種の有効性および/または時間経過を決定することができる。これは、個々の対象における免疫応答のモニタリングおよび、またワクチンの開発において有用でありうる。

30

【0183】

以下の実施例を提供して、本発明のさまざまな態様および実施態様を説明するが、それらに限定されるわけではない。

【0184】

実施例1

ポリクローナルからの個々の抗体重鎖の同定

抗原を特異的に結合する抗体の集団。

40

本実施例では、抗原を特異的に結合した抗体のポリクローナル集団から多数のモノクローナル抗体を誘導した。本発明のさまざまな実施態様の方法を用いて、その血清が発芽ポリクローナル集団を含む動物の核酸分子から生成された遺伝物質データベースからの情報を、モノクローナル抗体の分析からのペプチドデータベース情報と比較した。

【0185】

ウサギ免疫グロブリン鎖をコードする配列に特異的なプライマーを用いて本明細書に記載された方法に従って、抗原で免疫化された動物の脾細胞から核酸配列を得た(例えば、下の実施例6のプライマー配列を参照のこと)。ポリクローナル抗体の重鎖からのCDR3領域を、それらがデータベース中に現れた回数、およびデータベース中のすべてのCDR3領域の中で現れた各CDR3の回数のパーセンテージに基づいてランクを付けした。

50

表 2 は、トップ 25 の C D R 3 領域およびそれらの頻度を示す。これらの結果は、ポリクローナル混合物中の多くの異なる抗体において同じ C D R 3 配列が見いだされたことを示す。この情報は、同じ抗原に特異的に結合する抗体が、多くの場合、それらの C D R 3 領域において（そして、おそらく他の C D R 領域において）配列を共有することを示す。この情報は、本明細書に記載された方法が、抗原に特異的に結合するそれらの免疫グロブリン鎖（または、その断片）を同定および単離することができることを示す。

【 0 1 8 6 】

【 表 2 】

表 2

配列番号：	CDR3	計数	パーセント
29	GVKF	582	7.90%
30	GVSTNV	530	7.20%
31	DPYDDPTYRGYGM DL	372	5.05%
32	NPAVN TYAS	345	4.69%
	GGL	198	2.69%
33	HLFLHF	196	2.66%
34	HLFLNL	172	2.34%
	GNV	169	2.30%
	GNI	143	1.94%
35	HLFLNF	129	1.75%
36	GLGYVGSSVYIVKYINL	126	1.71%
37	DLIRVAGDTFYDGAFNL	113	1.53%
38	GRYNGWGYSNDL	113	1.53%
39	GGGTTLYTYFDL	111	1.51%
40	GLGYVGSDVYIVKYINL	105	1.43%
41	GGYGYGYGNTDFNL	93	1.26%
42	DDGGVRVDFDL	87	1.18%
43	VDDSGWMPFKL	85	1.15%
44	NVGSSSHYNLNL	76	1.03%
45	DGTDHGFNIDL	72	0.98%
46	STFRNSYARLAL	69	0.94%
47	IPYGWYSGGGAAPYFDL	65	0.88%
48	NAAIL	62	0.84%
49	AVSDNGYGYMYWFNL	61	0.83%
50	ELAGYDVGVEF	59	0.80%

【 0 1 8 7 】

ペプチドデータベースの生成には、以下の方法を用いた。

【 0 1 8 8 】

抗体のタンパク質分解消化

抗体のポリクローナル集団およそ 10 μ g を濃縮し、そして限外ろ過によって緩衝液を交換した（0.5 ml 10 K Amicon: Millipore）。まず、初期体積を濃縮し、次いで pH 8 の 200 mM H e p e s 400 μ l を加えることによって交換した。pH 8 の H e p e s 中の 8 M 尿素 80 μ l 中、室温で 15 分間再懸濁することによってサンプルを変性させた。抗体を、10 mM D T T 中、室温で 40 分間還元した。アルキル化は、20 mM I A A を用いて 1 時間実施した。尿素濃度は、2 M の最終濃度に低下した。次いで、サンプルを 5 等分し、そしてそれぞれトリプシン、L y s - C、G l u - C、ペプシン

、またはキモトリプシンを用いて37℃で一夜、別々に消化した。ペプシン消化物について、サンプルを濃縮し、そして3M酢酸と交換し、そして室温で1時間消化した。20% TFAを加えることによって消化物をクエンチし、そしてSep-Pacカートリッジ (Waters)を用いて精製した。洗浄したサンプルを凍結乾燥し、そしてLTQ Orbitrap Velos質量分析計における分析のため再懸濁した。

【0189】

質量分析

抗体画分をプロテアーゼLys-C、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、または Glu-Cで消化することによって産生されたペプチド混合物(すなわち、抗体画分を、これらのプロテアーゼのそれぞれで個々に消化することによってペプチドを産生した)を、LTQ Orbitrap Velos (Thermo-Fisher) ハイブリッド質量分析計を用いて、個々に LC-MS/MSによって分析した。インラインフロースプリッターを有するAgilent1100シリーズバイナリーポンプを用い、MagicC18aQ樹脂(5m、200μm)で充填された、ハンドポワード(hand-poured)溶融シリカ毛細管カラム(内径125μm、18cm)上へ、Famosオートサンプラー(LC Packings)を用いて、サンプルを15分間装填した。クロマトグラフィーは、8~30%溶媒B(溶媒A、0.25%ギ酸(FA);溶媒B、0.1%FA、9.7%アセトニトリル)400nL/分で35分間、バイナリー勾配を用いて展開した。ペプチドが液体クロマトグラフィーカラムから質量分析計中に溶出されたときに、ペプチドをイオン化し、そしてペプチドイオン質量電荷比測定してMS1スペクトルを生成させた。次いで、質量分析計により、その時点で溶出しており、かつ過去35秒以内にMS2スペクトル獲得にかけなかった20の最も豊富なペプチドイオンを選択し、次いで、それらの20の前駆体ペプチドイオンのそれぞれを単離し、次に断片化して、20のMS2生成物イオンスペクトルを生成した。前駆体イオンの1つのMS1スペクトルを獲得し、続いてデータ依存方式で20のMS2生成物イオンスペクトルを入手するサイクル全体を約1.6秒で実施し、次いで、ペプチドが液体クロマトグラフィーカラムから溶出されるように連続的に繰り返した。電荷状態スクリーニング(Charge-state screening)を用いて単独で荷電された種を拒絶し、そしてMS/MSスペクトルを誘発するには500計数の閾値が必要であった。可能な場合、LTQおよびOrbitrapは、パラレル処理方式で操作した。

【0190】

データベース探索およびデータ処理。

遺伝子データベースに対してSEQUESTアルゴリズムを用いてMS/MSスペクトルを探索した。探索パラメーターには、キモトリプシン、Glu-C、Lys-C、およびトリプシンに対する十分な酵素特異性(full enzyme specificity)、ならびに親質量許容差(parent mass tolerance)50p.p.m.、システインにおける57.0214の静的修飾(static modification)およびメチオニンにおける15.9949の動的修飾(dynamic modifications)を伴うペプシンに対して酵素特異性がないことが含まれる。HCDスペクトルは、0.02Daの断片イオン許容差で探索したのに対して、CIDスペクトルは、1Daの断片イオン許容差で探索した。線形判別関数を用いて、ターゲット-デコイアプローチを介してペプチドを1%ペプチドFDRにフィルター処理して、パラメーター、例えばXcorr、Cn、および前駆体質量誤差に基づいて各ペプチドを評価した。

【0191】

結果

図4は、本実施例に従った方法を図式的に示す。核酸配列は、カバット則(Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987) and Wu, T.T. and Kabat, E.A. J. Exp. Med. 132: 211-250 (1970)参照)を用いて分析し、配列内で可変領域およびCDR3領域(およびその配列)がどこにあるかを決定した。次に、質量分析によって同定された多数のモノクローナル抗体の重鎖のCDR3領域のパーセント包括度を解明した。表3に示すように、M

S 分析されたポリクローナル抗体混合物からの 16 の異なるペプチド配列を同定し、ここで、16 のペプチドのそれぞれは、動物から集めた核酸配列から対応する配列の CDR3 領域の全体（すなわち、100%）を含んだ。

【0192】

【表3】

表3

配列番号:	CDR3	% CDR3 包括度	
	GNL	100	
	GNV	100	10
29	GVKF	100	
30	GVSTNV	100	
51	SRSTSYYINL	100	
45	DGTDHGFNIDL	100	
52	DGSDHGFNIDL	100	
53	GADSIYRIYFDL	100	
54	NVGSSSYYNLNL	100	
55	GGDAGYGYFDAFGP	100	
56	GGDAGYGSFDAFGP	100	20
57	GLGYVGSSVYISKYINL	100	
58	VPWTGGSGDARLTRLDL	100	
36	GLGYVGSSVYIVKYINL	100	
59	DLGYASYIGYGYPSYYFKL	100	
60	DLGYASYRGYGYPSYYFKL	100	

【0193】

また、表3に記載されたペプチドのうち、質量分析によって最も頻繁に生成が観測されたペプチドのうちの5つを、核酸配列の情報から誘導された理論質量スペクトルとして参照した。したがって、本実験は、核酸配列から誘導された予測質量スペクトル（および根底にある配列）を、ポリクローナル抗体の実際のペプチド断片からの観測質量スペクトルと比較および関連づけることによって、多数のモノクローナル抗体（または少なくともその重鎖）の配列が容易に得られることを立証した。

【0194】

実施例2

インフルエンザ抗原特異的組換えヒト抗体の発現

2009～2010年の冬には、多数のヒトがH1N1インフルエンザウイルス株に感染して、死亡したり永続的な損傷が生じたりした。本発明のさまざまな実施態様の非限定的な方法を用いて、中和抗体は、類似したウイルス株に以前に暴露されたヒトからクローニングしてもよく、そして現在疾患を患っているヒト患者を治療する組成物として用いてもよい。

【0195】

したがって、1918年のインフルエンザ流行中にインフルエンザウイルスに暴露されたことが知られている高齢者の人々を、1918年型ウイルスを中和できる血清抗体の存在についてスクリーニングする。これを行うため、Yu et al., Nature 455: 532-536, 2008に記載された方法（およびオンライン増補；論文および増補は、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）に従う。

【0196】

血清および/または血漿がウイルス中和抗体を含む患者を同定し、そしてこれらの患者

50

から血液を採取し、そして細胞および血清および／または血漿に分離する。

【 0 1 9 7 】

標準方法（例えば、本明細書に記載された方法を参照のこと）に従って血液細胞から B リンパ球を単離し、そして B リンパ球からの核酸分子を得る。ヒト免疫グロブリン重（V H）鎖および軽（V L）鎖可変領域遺伝子の上流および下流領域にハイブリダイズさせたプライマーを用いてゲノム DNA を増幅する P C R によって、これらの細胞から、免疫グロブリン鎖をコードする核酸分子を単離する。このようなプライマーを作る方法は、免疫学分野の標準である（例えば、参照により本明細書に組み込まれた、Marks and Bradbury, “PCR Cloning of Human Immunoglobulin Genes” in Antibody Engineering: Methods and Protocols, 248: 117-134, 2003に記載された方法を参照のこと）。

10

【 0 1 9 8 】

P C R 増幅のためにこれらのプライマーを用いて得られたこれらの核酸分子を用いて遺伝物質データベースを追加する。遺伝子データベース内で、標準ソフトウェアパッケージを用いて核酸配列をさらに操作して、各核酸配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を決定し、そしてコードされたポリペプチドをトリプシンで実質的に消化し、ここで、このような消化物から生成された予測生成ペプチドを用いて予測質量スペクトルを生成する。

【 0 1 9 9 】

患者の血液から、血清および／または血漿を集める。血清および／または血漿中に存在する抗体を、標準方法によって単離する。例えば、免疫グロブリンは接着するが、非免疫グロブリンタンパク質は接着しないプロテイン A セファロースカラムに血清タンパク質を通過させる。血液が集められた人たちは、1918 年型インフルエンザウイルスに新しく暴露されてないため、1918 年型ウイルス（例えば、弱毒化ウイルスまたはその断片）でコーティングされた第 2 のカラムに血清抗体を通過させることによって、それらの血清抗体を、1918 年型ウイルス抗原を特異的に結合する抗体についてさらに富化する。次に、結合した抗体を、プロテアーゼ（例えば、バパイン）またはヒンジの近くで免疫グロブリンの領域を特異的に切断する化学的タンパク質切断試薬で処理し、そして非接着 F c 部分を除去する。最後に、結合した F a b または F a b 2 断片をトリプシンで処理してペプチド断片を生成し、次いで液体クロマトグラフィーを用いてすべての断片を分別し、次いで断片を質量分析によって分析する。Sequest プログラムのようなアルゴリズムを用いて、ペプチドの観測されたタンデム型質量スペクトルを、患者の B リンパ球から抽出された核酸配列からの予測質量スペクトルと関連づける。この方法を用いて、遺伝物質データベースのユニーク免疫グロブリン鎖の予測アミノ酸配列内に見いだされた少なくとも 1 つのペプチドを同定してもよい。次いで、この免疫グロブリン鎖（またはその可変領域）をコードする核酸配列を遺伝子データベースから読み出し、そして標準 DNA 合成方法を用いて合成する。次いで、合成された DNA 配列を、発現ベクターにサブクローニングし、次いで、それを C H O 細胞中にトランスフェクトする。細胞によって産生された組換え抗体を、次に単離し、そして 1918 年型ウイルス（または、その断片）に結合する能力について試験する。

20

30

【 0 2 0 0 】

この方法を用いて産生された組換え抗体を、次いで薬学的に許容しうる担体と合わせ、そして H 1 N 1 ウイルス感染症を患っている患者に投与する。これらの組換え抗体は、由来が完全にヒトであるため、患者の免疫系によって拒絶反応が示されないことが予想される。

40

【 0 2 0 1 】

実施例 3

核酸配列の獲得

このプロトコールは、次世代シーケンシング（N G S）を用い、そして 4 5 4 N G S プラットフォーム（F L X +、F L X またはジュニア；454 Life Sciences、Roche company、Branford, CT から商業的に入手可能）に基づく。他のハイスループット N G S ブラッ

50

トフォームにはわずかな変更が必要となり、そしてN G S製造元の説明書に基づく。

【0202】

標準免疫化プロトコール（例えば、Coligan et al., 前出を参照のこと）を用いて、マウスを、興味の抗原（ペプチド、組換えタンパク質、ウイルス、毒素、など）で免疫化する。特異的抗原に対する血漿免疫グロブリンタイターによって免疫応答をモニターする。血液、脾臓、骨髄、リンパ節、または任意のリンパ系器官を集め、そして標準方法に従って処理してB細胞を単離することができる。物質が制限される場合、この単離手順を減らすこともでき、そして動物からの重鎖および軽鎖集団に対して免疫グロブリン可変領域特異的PCRプライマーを用いる直接RT-PCR手順で置き換えることもできる。

【0203】

当然、いくつかの実施態様において、核酸配列は、生物学的物質からすぐに直接シーケンシングすることができる（すなわち、シーケンシング前に増幅することなく）。核酸配列からの直接シーケンシングするためのサービスおよび試薬は、例えば、Helicos BioSciences Corp. (Cambridge, MA) から商業的に入手可能である。例えば、Helicos' True Single Molecule Sequencingは、DNA、cDNAおよびRNAの直接シーケンシングが可能である。また、米国特許第7,645,596号；同第7,037,687号、同第7,169,560号；ならびに刊行物Harris et al., Science 320: 106-109, 2008; Bowers et al., Nat. Methods 6: 493-494, 2009;およびThompson and Milos, Genome Biology 12: 217, 2011を参照のこと（これらの特許および刊行物は、すべてそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）。

【0204】

いくつかの実施態様において、配列情報を得る前に、核の配列を増幅する（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応によって）。

【0205】

1つの非限定的な例では、オリゴdTPCRプライマーを、RT-PCRに用いる。別の非限定的な例では、下記のPCRプライマーを用いて遺伝子特異的RT-PCRを実施する。別の例では、マウスの重鎖および軽鎖集団に対するPCRプライマーは、参照により本明細書に組み込まれたPCT公開第WO2010/097435号に記載された配列を有する。B細胞富化を用いてまたはなしで、精製された遺伝物質（DNAまたはmRNA）を、次いで標準方法に従ってRT-PCRにかける（例えば、Ausubel et al., 前出を参照のこと）。これは、NGSシーケンシングを行う前の遺伝物質のライブラリー作製段階である。逆転写（RT）反応をオリゴdTまたは免疫グロブリン特異的プライマーに適用してcDNAを生成させることができる。ポリメラーゼ連鎖反応手順を免疫グロブリン特異的プライマーに適用して、サンプルからの（再配列または/および発現された）重鎖および軽鎖可変領域を増幅する。これらの方法を、下にさらに詳細に記載する。

【0206】

ライブラリー作製

サンプル調製例：

マウスが抗原による最終的なブースト（boost）を受けた後、血液、脾臓、骨髄またはリンパ節を単離する。単核細胞を、前述のとおり、フィコール分離によって単離する。次いで、フィコールド細胞（Ficolled cells）をPBSによって洗浄し、計数し、そして全RNA調製のために瞬間凍結する。

【0207】

Qiagen RNeasyキット（Qiagen Inc., Hilden, Germanyから商業的に入手可能）を用いて製造元の説明書に従って細胞から全RNAを単離し、そして全RNAを-80℃で保存する。

【0208】

遺伝子特異的RT-PCRまたは標準RT-PCR（オリゴdTを用いる）のため、以下のプロトコールを用いてもよい。

10 μM CSTマウスRT-IGプライマーまたはオリゴdT 1 μl

2 . 5 μ g 全 R N A (脾細胞)	$\times \mu$ l
1 0 m M d N T P	2 μ l
滅菌、蒸留水	1 4 μ l まで

混合物を 6 5 で 5 分間インキュベートし、次いで氷上に置く。

5 \times c D N A 合成緩衝液	4 μ l
0 . 1 M D T T	1 μ l
Invitrogen Thermoscript RT (1 5 U / μ l)	1 μ l

【 0 2 0 9 】

内容物を穏やかに混合し、そして 6 0 で 6 0 分間インキュベートする。

8 5 で 5 分間加熱することによって反応を終結させる。

c D N A は、ライブラリーの作製に使用するための準備ができています。

10

【 0 2 1 0 】

次いで、重鎖および軽鎖について C S T 4 5 4 特異的融合マウスプライマーを用いて c D N A を P C R にかける。プライマーは、以下の配列を有する：

【 0 2 1 1 】

マウス 4 5 4 アンプリコンプライマー

【 化 1 】

重鎖 (フォワードおよびリバースプライマー)

HV1 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGCGTGATGTGAAGCTTCAGGAGTC
(配列番号 : 1)

20

HV2 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACACAGGTGCAGCTGAAGGAGTC
(配列番号 : 2)

HV3 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCACTCCAGGTGCAGCTGAAGCAGTC
(配列番号 : 3)

HV4 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGTAGCAGTTACTCTGAAAAGAGTC
(配列番号 : 4)

HV5 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACACGGAGGTCCAGCTGCAACAATCT
(配列番号 : 5)

HV6 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGCGAGGAGGTCCAGCTGCAGCAGTC
(配列番号 : 6)

HV7 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTCTACAGGTCCAACTGCAGCAGCCT
(配列番号 : 7)

30

HV8 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCGCGTGTTCGAGGTGAAGCTGGTGGAGTC
(配列番号 : 8)

HV9 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTATGCGGAGGTGAAGCTGGTGGATC
(配列番号 : 9)

HV10 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGTCTGATGTGAAGTTGGAAGTGTC
(配列番号 : 10)

HVFOR1 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTGCAGAGACAGTGACCAGAGT
(配列番号 : 11)

HVFOR2 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT
(配列番号 : 12)

HVFOR3 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTGAGGAGACGGTGACTGAGGT
(配列番号 : 13)

HVFOR4 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTGAGGAGACGGTGACCGTGGT
(配列番号 : 14)

40

【 0 2 1 2 】

【化 2】

カップ鎖 (フォワードおよびリバースプライマー)

KV1 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTGGATGTTTTGATGACCCAACT
(配列番号: 15)
KV2 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACGATATTGTGATGACGCAGGCT
(配列番号: 16)
KV3 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTAGATATTGTGATAACCCAG
(配列番号: 17)
KV4 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACGTACTAGACATTGTGCTGACCCAATCT
(配列番号: 18)
KV5 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACGACATTGTGATGACCCAGTCT
(配列番号: 19)
KV6 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTACGTAGCGATATTGTGCTAACTCAGTCT
(配列番号: 20)
KV7 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTACTACTCGATATCCAGATGACACAGACT
(配列番号: 21)
KV8 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACTACAGGACATCCAGCTGACTCAGTCT
(配列番号: 22)
KV9 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTAGACTAGCAAATTGTTCTCACCCAGTCT
(配列番号: 23)
KVFOR1 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCCGTTTCAGCTCCAGCTTG (配列番号: 24)
KVFOR2 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCCGTTTATTCCAGCTTGGT (配列番号: 25)
KVFOR3 CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCCGTTTATTTCCAACCTTG (配列番号: 26)

10

20

ラムダ鎖 (フォワードおよびリバースプライマー)

LV CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGTATGCAGGCTGTTGTGACTCAGGAA
(配列番号: 27)
LVFOR CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTTGGGCTGACCTAGGACAGT
(配列番号: 28)

【0 2 1 3】

上の配列のすべてにおいて、下線が引かれた配列は、4 5 4 シークエンシングのためであり、太字の配列は、多重化のためのバーコードであり、そして標準フォントの配列は、マウス特異的配列である。プライマーを用いて以下のような上記のライブラリーを増幅する:

30

重鎖 PCR:

CST 4 5 4 マウス重鎖プライマー混合物	1 μ l
cDNA	1 μ l
2 \times Phusion Master Mix	12.5 μ l
H ₂ O	10.5 μ l

軽鎖 PCR:

CST 4 5 4 マウス軽鎖プライマー混合物	1 μ l
cDNA	1 μ l
2 \times Phusion Master Mix	12.5 μ l
H ₂ O	10.5 μ l

40

【0 2 1 4】

PCR 条件のサイクル条件は、表 4 の通りであってもよい:

【表 4】

表4

ステップ	温度	時間 (分)
1: 変性ステップ	98°C	01:30
2: 変性ステップ	98°C	00:10
3: アニールステップ	60°C	00:30
4: 伸長ステップ	72°C	00:30

10

【0215】

ステップ2～4の20サイクルを適用する。次いで、PCR生成物を、製造元のプロトコール（例えば、Beckman Coulter Genomics' Agencourt AMPure XPシステムのプロトコールを参照のこと）に従ってAgencourt Ampure DNA精製（Beckman Coulter Genomics, Danvers, MAから商業的に入手可能）に2回かける。PCR/遺伝子ライブラリーを作製したら、その後のすべてのステップはemPCRおよびシーケンシング反応に関して454製造プロトコールに従う。454 Life Sciences Corp., a Roche Company, Branford, CT 06405による、“Sequencing Method Manual, GS Junior Titanium Series”（2010年5月（rev. 2010年6月））および“emPCR Amplification Method Manual - Lib-L, GS junior Titanium Series（2010年5月（rev. 2010年6月））と題する刊行物を参照し、それらは、いずれも全体として参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0216】

この段階で、多数のサンプルを、単一のシーケンシングランに合わせることができる。それらは、ユニークバーコード（または454プラットフォームからのMID）によって区別される。例えば、バーコードを、PCRプライマーに組み込む。いくつかの実施態様では、emPCR Amplification Method Manual - Lib-L, GS junior Titanium Series（2010年5月（rev. 2010年6月）；454 Life Sciences Corp.）に従う。いくつかの実施態様では、次に、“Sequencing Method Manual, GS Junior Titanium Series”（2010年5月（rev. 2010年6月）；454 Life Sciences Corp.）に従う。

【0217】

30

シーケンシングデータは、FASTAファイル（または任意の標準ファイルフォーマット）として産生し、そして遺伝物質データベースに保存することができる。これらの配列データを用いて予測質量スペクトルデータベースを生成し、同じ動物の血清および/または血漿免疫グロブリンから生成した観測ペプチド質量スペクトルを分析する。これを行うには、標準プログラムを用いることができる。本実施例では、Sequestソフトウェアパッケージによって予測質量スペクトルを生成した。

【0218】

実施例4

ポリクローナル集団からの個々の抗体鎖の同定

次に、本明細書に記載された方法を用いていくつかの異なるポリクローナル集団から個々の抗体の配列を同定した。本実施例の方法を、図2および4に図式的に示す。

40

【0219】

実施例2に上記された方法を用いて、3種の異なる抗原を特異的に結合する抗体の3つの異なるポリクローナル集団を、3つの異なるライブラリーに作製した。ウサギ免疫グロブリン鎖をコードする配列に特異的なプライマーを用いて、上記の454シーケンシング法を用いた大規模シーケンシングを実施して、3つの異なる遺伝物質データベースを得た。

【0220】

同様に、上の実施例3に記載された方法を用い、遺伝物質データベースを用いて3つの異なるタンパク質データベースを生成した。

50

【 0 2 2 1 】

第 1 の抗原についての結果を、表 5（軽鎖）および 6（重鎖）に示し；第 2 の抗原を、表 7（軽鎖）および 8（重鎖）に示し、そして第 3 の抗原を、表 9（軽鎖）および 10（重鎖）に示す。

【 0 2 2 2 】

【表 5】

表 5

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
QGEFSCRDFDCTV (配列番号: 61)	16	100	58	30	CQGEFSCRDFDCTVF (配列番号: 62)
AGGYKSSGDTV (配列番号: 63)	15	100	48	24	YCAGGYKSSGDTVSF (配列番号: 64)
AGGYKSTTDGSA (配列番号: 65)	9	100	29	17	CAGGYKSTTDGSAF (配列番号: 66)
QQGRRSVDVDNV (配列番号: 67)	8	100	25	12	CADAATYYCQQGRRSVDVDNVF GGGTE (配列番号: 68)
QGEFNCDGVGCTT (配列番号: 69)	2	100	17	9	YCQGEFNCDGVGCTTF (配列番号: 70)

10

20

【 0 2 2 3 】

【表 6】

表 6

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
GVRDWGDALDL (配列番号: 71)	5	100	42	22	GVRDWGDALDLWGQGLTVTVSSGQPK (配列番号: 72)
LYNSVVGDDI (配列番号: 73)	10	100	38	20	LYNSVVGDDIWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 74)
LYNSVVGDDM (配列番号: 75)	4	100	37	21	LYNSVVGDDMWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 76)
GMPGSTSGNSNI (配列番号: 77)	2	100	34	20	GMPGSTSGNSNIWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 78)
LYNSLVGDDI (配列番号: 79)	2	100	30	15	LYNSLVGDDIWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 80)
KGDPGHPNGLFFTM (配列番号: 81)	3	100	22	19	KGDPGHPNGLFFTMWGPGTLTVTVSFGQPK (配列番号: 82)
GGGSHSGSAIYDMDP (配列番号: 83)	2	100	20	14	GGGSHSGSAIYDMDPWGPGTLTVTVSSGQPK (配列番号: 84)
GTSRGSDYRLDL (配列番号: 85)	2	100	15	11	GTSRGSDYRLDLWGQGLTVTVSSGQPK (配列番号: 86)
GMPASTSGNSNI (配列番号: 87)	2	100	14	14	GMPASTSGNSNIWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 88)
DAIANI (配列番号: 89)	2	100	10	8	DAIANIWGPGTLTVTVSLGQPK (配列番号: 90)
DKWMVFGDLRL (配列番号: 91)	2	100	9	4	DKWMVFGDLRLWGPGTLTVTVSSGQPK (配列番号: 92)

【 0 2 2 4 】

【表 7】

表 7

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
QQGRITYSDVANV (配列番号: 93)	1	66.67	42	20	TYSDVANVFGGGTEVVVK (配列番号: 94)
QQGYSSYNVDNA (配列番号: 95)	2	41.67	75	20	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 96)
QQGYSSSNVDNA (配列番号: 97)	2	41.67	41	19	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 98)
LGTYDCRSADCNA (配列番号: 99)	2	46.15	33	18	SADCNAFGGGTEVVVK (配列番号: 100)
QHGYYSNVDNA (配列番号: 101)	2	45.45	46	18	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 102)
QQGFSSRNVDNA (配列番号: 103)	2	41.67	24	18	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 104)
QQGYSSVNVDNA (配列番号: 105)	2	41.67	26	18	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 106)
QQGYTYNNVDNA (配列番号: 107)	2	41.67	27	16	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 108)
LGTYDCRSGDCNV (配列番号: 109)	1	46.15	25	15	SGDCNVFGGGTEVVVK (配列番号: 110)
QQGYTSNVDNA (配列番号: 111)	2	45.45	26	15	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 112)
QQGQTPENVDNA (配列番号: 113)	2	41.67	22	14	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 114)
QQGSTYSDVANV (配列番号: 115)	1	66.67	29	14	TYSDVANVFGGGTEVVVK (配列番号: 116)
QQGATYSDVANV (配列番号: 117)	1	66.67	63	13	TYSDVANVFGGGTEVVVK (配列番号: 118)
QQGTTYSDVANV (配列番号: 119)	1	66.67	25	13	TYSDVANVFGGGTEVVVK (配列番号: 120)
QQGYTRSNDNA (配列番号: 121)	2	41.67	21	11	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 122)
AGYKSYGNADID (配列番号: 123)	4	66.67	24	10	SYGNADIDFGGGTEVVVK (配列番号: 124)
QQGYTSSNDNA (配列番号: 125)	2	41.67	17	9	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 126)

【表 8】

LVSYDCSSADCNA (配列番号: 127)	2	46.15	51	8	SADCNAFGGGTEVVVK (配列番号: 128)
QQAYTSSNVDNA (配列番号: 129)	2	41.67	4	3	NVDNAFGGGTEVVVK (配列番号: 130)

【 0 2 2 6 】

【表 9】

10

表 8

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
DGGL (配列番号: 131)	2	100	11	6	DGGLWGPGLTVTS SGQPK (配列番号: 132)
DPYDTNTSLDAL (配列番号: 133)	2	100	10	4	DPYDTNTSLDALWG PGLTVTVSSGQPK (配列番号: 134)
EGSDDDSFDL (配列番号: 135)	4	100	10	5	EGSDDDSFDLWGPG TLTVTVSSGQPK (配列番号: 136)
GGDL (配列番号: 137)	2	100	9	5	GGDLWGQGLTVTS SGQPK (配列番号: 138)
GHWSAGATLYGYFSL (配列番号: 139)	2	100	11	5	GHWSAGATLYGYFS LWGPGTLTVTVSSGQ PK (配列番号: 140)

20

30

【 0 2 2 7 】

【表 10】

表 9

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
LANYDCSSGDCSV (配列番号: 141)	1	100	28	18	CLANYDCSSGDCSVF (配列番号: 142)
QGNFDCSSADCSA (配列番号: 143)	2	100	37	21	CQGNFDCSSADCSAF (配列番号: 144)
QGNFDCTSADCSA (配列番号: 145)	2	100	37	21	CQGNFDCTSADCSAF (配列番号: 146)

40

【 0 2 2 8 】

50

【表 1 1】

表 10

CDR3	CDR3 計数	CDR3 包括度	総ペプ チド	ユニーク ペプチド	CDR3 ペプチド
DGTDHGFNIDL (配列番号: 45)	8	100	38	22	DGTDHGFNIDLWGPGTLVT VSSGQPK (配列番号: 147)
GNV	2	100	36	21	TSTTVTLQMTSLTAADTATY FCASGNVWGPGTLVTVSSG QPK (配列番号: 148)
GVSTNV (配列番号: 30)	6	100	29	19	GVSTNVWGPGTLVTVSSGQ PK (配列番号: 149)
GVKF (配列番号: 29)	4	100	30	18	FCTRGVKF (配列番号: 150)
DGSDHGFNIDL (配列番号: 52)	6	100	29	16	DGSDHGFNIDLWGPGTLVT VSSGQPK (配列番号: 151)
NAAIL (配列番号: 152)	10	100	34	16	NAAILWGPGTLVTVSSGQPK (配列番号: 153)
SRSTSYINL (配列番号: 154)	12	100	33	15	SRSTSYINLWGPGTLVTVSS GQPK (配列番号: 155)
GGDAGYGSFDAFGP (配列番号: 56)	6	100	30	14	GGDAGYGSFDAFGPWGPGT LTVVSSGQPK (配列番号: 156)
GVSTDV (配列番号: 157)	2	100	25	14	GVSTNVWGPGTLVTVSSGQ PK (配列番号: 158)
NVGSSSYYNLNL (配列番号: 54)	6	100	28	14	NVGSSSYYNLNLWGPGTLVT VSSGQPK (配列番号: 159)
GVSTSV (配列番号: 160)	2	100	24	13	GVSTNVWGPGTLVTVSSGQ PK (配列番号: 161)
GGYAGAGYFDAFNP (配列番号: 162)	2	100	21	12	GGYAGAGYFDAFNPWGPGT LTVVSSGQPK (配列番号: 163)
NYNL (配列番号: 164)	6	100	26	12	NYNLWGPGTLVTVSSGQPK (配列番号: 165)
RDGFSTDYFNL (配列番号: 166)	7	91.67	25	12	DGFSTDYFNLWGPGTLVT SSGQPK (配列番号: 167)

【表 1 2】

DRGTGSGDYTPFNL (配列番号: 168)	5	71.43	26	12	GSGDYTPFNLWGPGTLVTVS SGQPK (配列番号: 169)
DAAIL (配列番号: 170)	8	100	27	11	NAAILWGPGTLVTVSSGQPK (配列番号: 171)
GPYVDSTYYNL (配列番号: 172)	6	100	23	11	GPYVDSTYYNLWGPGTLVTV SSGQPK (配列番号: 173)
GSGDYTPFNL (配列番号: 174)	6	100	23	11	GSGDYTPFNLWGPGTLVTVS SGQPK (配列番号: 175)
YYDGADYHTYNL (配列番号: 176)	6	100	21	11	YYDGADYHTYNLWGPGTLV TVSSGQPK (配列番号: 177)
EFGNNGWNIDL (配列番号: 178)	6	100	21	10	EFGNNGWNIDLWGPGTLVT VSSGQPK (配列番号: 179)
VEYGNDWGNL (配列番号: 180)	6	100	20	10	VEYGNDWGNLWGPGTLVTV SSGQPK (配列番号: 181)
YFDGADYHTYNL (配列番号: 182)	6	100	20	10	YFDGADYHTYNLWGPGTLV TVSSGQPK (配列番号: 183)
RFSGGGYGYDL (配列番号: 184)	5	90.91	25	10	FSGGGYGYDLWGPGTLVTV SSGQPK (配列番号: 185)
DRDL (配列番号: 186)	6	100	19	9	DRDLWGPGTLVTVSSGQPK (配列番号: 187)
GLDL (配列番号: 188)	5	100	19	9	YGLDLWGPGTLVTVSSGQPK (配列番号: 189)
YDVDSVSAYDL (配列番号: 190)	6	100	24	9	YDVDSVSAYDLWGPGTLVTV SSGQPK (配列番号: 191)
EVVGYDYSGDL (配列番号: 192)	6	100	18	8	EVVGYDYSGDLWGPGTLVT VSSGQPK (配列番号: 193)
DPYDDPTY (配列番号: 194)	2	100	10	6	DPYDDPTYR (配列番号: 195)
GGL (配列番号: 196)	1	100	3	3	GGLVKPGASLTL (配列番号: 196)

【0 2 3 0】

表 5 ~ 1 0 は、動物の抗体レパートリーから大規模シーケンシングによって生成された配列（特に C D R 3 領域）に対応する質量分析（C D R 3 ペプチド）によって、高い信頼度（> 9 9 % 確実性）で同定されたペプチドを示す。C D R 3 計数は、ペプチドが、C D R 3 領域にマッチしたポリクローナル抗体混合物から同定された回数を示す。C D R 3 包括度は、C D R 3 領域の総アミノ酸と比較して、質量分析によって同定されたペプチド中に現れる C D R 3 領域中のそれらのアミノ酸のパーセント（C D R 3 の欄に示す）を示

した。総ペプチドは、大規模シーケンシングによって決定された完全長可変領域配列に対応する質量分析によって同定された配列によるペプチドの総数を表す。ユニークペプチドは、大規模シーケンシングによって決定された完全長可変領域配列に対応する質量分析によって同定された配列によるユニークペプチドの数を表す。

【0231】

実施例 5

別の実施例では、以下のプロトコルを用いて核酸配列およびポリクローナル抗体を生成することができる。その結果は、これらの方法を用いて抗原特異的抗体を生成することに成功したことを示す。

【0232】

10

これらのプロトコルでは、マウスを免疫原性 P - E R K 抗原で免疫化した。以下の方法を用いて、遺伝物質データベースおよびペプチドデータベースを生成することができる。

【0233】

I . 遺伝物質データベース：
細胞単離。

シリンジおよび 21 G ニードルを用いて 5 mL の R P M I / 10 % F C S により免疫化マウスの脾臓を 5 回フラッシュした。細胞を 90 % F C S / 10 % D M S O 中に凍結した。各脾臓から合計 50 ~ 100 × 10⁶ 細胞を単離した。

R N A 単離および c D N A 合成。

20

【0234】

QIAshredder (Qiagen cat#79654) および RNeasy ミニキット (Qiagen, Hilden, ドイツ; cat#74104) を用いて、製造元のプロトコルに従って脾細胞から全 R N A を単離した。標準次世代シーケンシングプロトコルに従って R N A をカラム上で D N A s e 処理した。ND - 1000 分光光度計 (NanoDrop ; Thermo Scientific, Wilmington, DE から商業的に入手可能) を用いて全 R N A 濃度を測定した。

【0235】

単離した R N A を、Thermoscript RT-PCR システム (Invitrogen (Life Technologies の一部)、Carlsbad, CA cat#11146-024) を用いて、逆転写による一本鎖 (first-strand) c D N A 合成に用いた。1 . 5 μ g の R N A およびオリゴ d T プライマーを用いて製造元のプロトコルに従って c D N A を合成した。

30

V_H および V_L 増幅。

【0236】

2 ステップ P C R 反応を用いて V_H および V_L 遺伝子を増幅した。縮重センスおよびアンチセンスプライマーの混合物を P C R の第 1 ラウンドに用い、そして汎用プライマーのセットを P C R の第 2 ラウンドに用いた。多数のセンス縮重プライマーのため、重鎖 P C R を、8 つまでの別々の反応に分けた。用いたプライマーの配列を、下に示す。

【0237】

第 1 ラウンドのプライマー、汎用尾部 (universal tail) は、下線が引かれている。

【化 3】

重鎖センスプライマー：

V_H1.1:

ACGAGCTACGCACGAACTGCAGGTRTCCACTCC (配列番号：197)
ACGAGCTACGCACGAATAGCAGGTGTCCACTCC (配列番号：198)
ACGAGCTACGCACGARGTAAGGTGTCCACTCC (配列番号：199)
ACGAGCTACGCACGAGCTACAGGTGTCCACTCC (配列番号：200)
ACGAGCTACGCACGAACTGCAGGTGTCCWMTCC (配列番号：201)

V_H1.2:

ACGAGCTACGCACGARCTRCAGGTGTCCACTCC (配列番号：202)
ACGAGCTACGCACGAGCTAWMGGTGTCCACTCC (配列番号：203)
ACGAGCTACGCACGACCTCAGGTGTCCACTCC (配列番号：204)
ACGAGCTACGCACGAGCTACAGGTGTCCACTCC (配列番号：205)
ACGAGCTACGCACGAACTGCAGGTGTCTCTCT (配列番号：206)

10

V_H1.3:

ACGAGCTACGCACGAAAYTGCAGGTGTCCAYTGC (配列番号：207)
ACGAGCTACGCACGAGCTAMMGGTGTCCACTTC (配列番号：208)
ACGAGCTACGCACGACTCCTGTCAKTAATKCAGGT (配列番号：209)
ACGAGCTACGCACGAAACTGCAGGTGTCTCTCT (配列番号：210)
ACGAGCTACGCACGARCTRCAGGYGTCCACTCT (配列番号：211)

20

V_H2:

ACGAGCTACGCACGACCAAGCTGTATCCTTTCC (配列番号：212)
ACGAGCTACGCACGACCAAGCTGTGTCCTRTCC (配列番号：213)

V_H3:

ACGAGCTACGCACGATGTTGACAGYCVTTCKGGT (配列番号：214)
ACGAGCTACGCACGATGTTACAGCCTTTCCTGGT (配列番号：215)

【 0 2 3 8 】

30

【化 4】

V_H4:ACGAGCTACGCACGATTTAAAAGGGGTCCAGTGT (配列番号: 216)V_H5:ACGAGCTACGCACGATAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (配列番号: 217)ACGAGCTACGCACGAGTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (配列番号: 218)V_H6-8:ACGAGCTACGCACGACTYTTAAAAGGKGTCCAGWG (配列番号: 219)

10

ACGAGCTACGCACGACYTTTAMATGGTATCCAGTGT (配列番号: 220)ACGAGCTACGCACGACTTTTACATGGTTTCAAGTGT (配列番号: 221)ACGAGCTACGCACGAYTGTCCTGCATATGTCYT (配列番号: 222)V_H9-15:ACGAGCTACGCACGAATGGCAGCWGCYCCAAG (配列番号: 223)ACGAGCTACGCACGATTTATCAAGGTGTGCATTGT (配列番号: 224)ACGAGCTACGCACGACTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (配列番号: 225)ACGAGCTACGCACGAGTGACAGTCCTTCCTGGTAG (配列番号: 226)ACGAGCTACGCACGACTTCCTGATGGCAGTGGTT (配列番号: 227)ACGAGCTACGCACGAAGCTACAGGTATCCAATCC (配列番号: 228)

20

重鎖アンチセンスプライマー:

IgG1:

CACTGGTGTGAGTCAATGCAGACAGATGGGGGTGTCG (配列番号: 229)

IgG2a:

CACTGGTGTGAGTCAAGACCGATGGGGCTGTTGTT (配列番号: 230)

IgG2b:

CACTGGTGTGAGTCAACAGACTGATGGGGGTGTTGTT (配列番号: 231)

IgG3:

CACTGGTGTGAGTCAAGACAGATGGGGCTGTTGTT (配列番号: 232)

30

カッパ鎖センスプライマー:

ACGAGCTACGCACGAGACATYWWGATGACCCAGTCTCC (配列番号: 233)

カッパ鎖アンチセンスプライマー:

CACTGGTGTGAGTCACAGTTGGTGCAGCATCAGCCCCG (配列番号: 234)

【0239】

第2ラウンドのプライマー、汎用尾部は、下線が引かれている。

【化 5】

重鎖または軽鎖センスプライマー：

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCACGAGCTACGCACGA (配列番号：235)

重鎖アンチセンスプライマー：

MID97:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGctagtcactcCACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：236)

MID81:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGCGTCACCACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：237)

MID24:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGAGACGAGCACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：238)

軽鎖アンチセンスプライマー：

MID34:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGcacgctacgtCACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：239)

MID66:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACGCGAGACACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：240)

MID57:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGCGTATACACACTGGTGTGAGTCA

(配列番号：241)

【 0 2 4 0 】

上の配列において、下線およびイタリックの配列は2ステップPCR増幅のためであり、下線の配列は454シーケンシングのためであり、太字の配列は454の鍵(key)であり、小文字の配列は多重化のためのバーコードであり、そして標準フォントの大文字の配列はマウス特異的配列である。

【 0 2 4 1 】

PCR反応は、表11に説明したように上のプライマーを用いて設定した。

【 0 2 4 2 】

【表 1 3】

表11 (第1ラウンドの重鎖PCR設定)

サンプル	センスプライマー	アンチセンスプライマー
1	V _H 1.1	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
2	V _H 1.2	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
3	V _H 1.3	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
4	V _H 2	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
5	V _H 3	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
6	V _H 5	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
7	V _H 4 および V _H 6-8	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3
8	V _H 9-15	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3

10

20

30

40

50

【 0 2 4 3 】

第1ラウンドについて、重鎖PCR反応液50 μ Lは、0.2 μ Mの各センスプライマー（反応当たり5つのセンスプライマー）および0.2 μ Mの各アンチセンスプライマー（反応当たり4つのアンチセンスプライマー）、5 \times Phusion HF反応緩衝液（Finnzymes（Thermos Scientificの一部）、cat#F-518）10 μ L、cDNA1 μ L、0.2 μ M dNTP（NEB, cat#N0447）、Phusion Hot Start II DNAポリメラーゼ（Finnzymes, cat#F-549L）1 μ LならびにRT-PCRグレードの水（Ambion（a Life Technologies company）, Austin, TX, cat#AM9935）28 μ Lを含んだ。第1ラウンドについて、軽鎖PCR反応液50 μ Lは、0.2 μ Mのセンスプライマーおよび0.2 μ Mのアンチセンスプライマー、5 \times Phusion HF反応緩衝液（Finnzymes, cat#F-518）10 μ L、cDNA1 μ L、0.2 μ M dNTP（NEB, cat#N0447）、Phusion Hot Start II DNAポリメラーゼ（Finnzymes, cat#F-549L）1 μ LならびにRT-PCRグレードの水（Ambion, cat#AM9935）35 μ Lを含んだ。PCRサーモサイクルプログラムは、以下のとおりであった：98 2分間；15サイクル（98 0.5分間、55 0.5分間、72 1分間）；72 5分間；4 貯蔵。DNAクリーン（clean）およびConcentrator -5 kit（Zymo Research Co., Irvine, CA, cat#DR014）を製造元のプロトコールに従って用いてPCR生成物を精製した。

10

【 0 2 4 4 】

第2ラウンドについて、重鎖PCR反応液50 μ Lは、0.2 μ Mの汎用センスおよび汎用アンチセンスプライマー5 \times Phusion HF反応緩衝液（Finnzymes, cat#F-518）10 μ L、精製された第1のラウンドPCR生成物10 μ L、0.2 μ M dNTP（NEB, cat#N0447）、Phusion Hot Start II DNAポリメラーゼ（Finnzymes, cat#F-549L）1 μ LおよびRT-PCRグレードの水（Ambion, cat#AM9935）19 μ Lを含んだ。PCRサーモサイクルプログラムは以下のとおりであった：98 2分間；10サイクル（98 0.5分間、55 0.5分間、72 1分間）；72 5分間；4 貯蔵。第2ラウンドについて、軽鎖PCR反応液50 μ Lは、0.2 μ Mの汎用センスおよび汎用アンチセンスプライマー5 \times Phusion HF反応緩衝液（Finnzymes, cat#F-518）10 μ L、精製された第1ラウンドPCR生成物10 μ L、0.2 μ M dNTP（NEB, cat#N0447）、Phusion Hot Start II DNAポリメラーゼ（Finnzymes, cat#F-549L）1 μ LならびにRT-PCRグレードの水（Ambion, cat#AM9935）19 μ Lを含んだ。PCRサーモサイクルプログラムは以下のとおりであった：98 2分間；8サイクル（98 0.5分間、55 0.5分間、72 1分間）；72 5分間；4 貯蔵。AMPure XP（Agencourt; Beckman Coulter Genomics, Brea, CA, cat#A63881）を用いて製造元のプロトコールに従ってPCR生成物を精製し、そしてAgilent 2100 BioAnalyzerを用いて分析した。

20

30

【 0 2 4 5 】

次いで、PCR生成物の配列を予測アミノ酸配列に翻訳してから、それを理論的に消化して（例えば、プロテアーゼおよび/または化学的タンパク質切断試薬を用いて）仮想ペプチド断片を産生する。次いで、これらの仮想ペプチド断片を用いて予測質量スペクトルを生成する。

【 0 2 4 6 】

II. ポリクローナル抗体のペプチド断片からの実際の質量スペクトルの生成：

動物の血清および/または血漿から（例えば、核酸配列が得られた動物の血清および/または血漿から）ポリクローナル抗体を精製する。抗体を精製するために、以下の方法を用いる：

【 0 2 4 7 】

プロテインG精製：

プロテインG磁性ビーズ（Millipore（Billerica, MA）, cat# LSKMAGG10）1mLを、4つの15mLコニカルチューブのそれぞれ（Falcon（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）, cat#352097）に加えた。各チューブ中のビーズを、リン酸緩衝食塩水pH7.4、0.05% Tween-20（PBST）10mLで2回およびPBS10mLで3回

40

50

洗浄した。3種のマウス（ID 1262-2、1262-4、1263-4）からの血清を一緒に貯め、そしてPBS中の最終体積6 mLに10倍希釈した。次いで、合わせた希釈血清1.5 mLをビーズの各チューブに加え、そして4 で一夜インキュベートした。フロースルーを集め、そして精製プロセスをさらに2回行った。フロースルーを集めた後、各チューブを、PBST 10 mLで2回およびPBS 10 mLで3回洗浄した。次いで、各チューブをpH 2.7の0.1 Mグリシン0.5 mLと共に4 で30分間インキュベートしてIgGを溶出した。溶出を5回繰り返した。すべての溶出液を、1 M Tris pH 8.5で中和し、PBSに対して一夜透析し、そしてタンパク質濃度をND-1000分光光度計（Nanodrop）で測定した。合計2.5 mgのIgGを精製した。

【0248】

10

抗原カラム調製：

新たなストレプトアビジン（SA）磁性ビーズ（Pierce, cat#88817）5.0 mLを、PBS 10 mLで3回洗浄し、そしてPBS 5.0 mL中に希釈したビオチンp-ERKペプチド（Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA.から商業的に入手可能なカタログ番号1150のビオチン化形態）の20 mg/mLストック105 µLと共に4 で一夜インキュベートした。フロースルーを捨て、そしてビーズをPBS 10 mLで3回洗浄し、そして10個の1.7 mL低結合性（low binding）チューブ（Axygen（Union City, CA）, cat# MCT-175-L-C）に等分した。等分されたビーズを磁性ラック（Invitrogen, DynaMag）上に置き、そしてPBSを除去した後、希釈血清を加えた。

【0249】

20

抗原特異的精製：

上のプロテインG精製IgGを、ビオチンp-ERKペプチドと結合したSA磁性ビーズに加えた。4 で一夜インキュベーション後、フロースルーを集め、そしてビーズをPBS含有緩衝液で洗浄した。次いで、IgGを、pH 3.5の0.1 Mグリシン1.5 mLの5画分、次いでpH 2.7の0.1 Mグリシン1.5 mLの5画分、次いでpH 1.8の0.1 Mグリシン1.5 mLの5画分で溶出し、そしてpH 8.5の1 M Trisで中和した。p-ERK-BSAペプチドでコートされた96-ウエルプレートを用いて、溶出液をp-ERK（すなわち、リン酸化ERKキナーゼ、マウスを免疫化に用いる抗原）反応性について測定した。活性を有する画分を、ELISA（Thermo, cat#23300）によって定量化し、そして20 µM U0126で1時間または200 nM テトラデカノイル-ホルボール-ミリスチン酸（Tetradecanoyl-Phorbol-Myristic Acid）（TPA）で15分間処理したジャーカットT細胞（例えば、American Type Culture Collection すなわちATCC, Manassas, VAから商業的に入手可能）からの溶解物を用いたウエスタンブロットによってp-ERK反応性について検定した。最も良好なp-ERK-反応性を有する画分を質量分析によって分析した。

30

【0250】

質量分析

抗体含有画分を、少なくとも1つのプロテアーゼ（例えば、トリプシン）および/または少なくとも1つの化学的タンパク質切断反応で消化し、そして生成したペプチドを、質量分析を用いた分析にかけた。ペプチドを分析するために用いる質量分析方法は、標準のものであり、そして以前に詳細に記載されている。（例えば、米国特許第7,300,753号；Geiger et al., Nature Methods 7: 383-385, 2010；Elias and Gygi, Nature Methods 4: 207-214, 2007；Keshishian et al., Molecular and Cellular Proteomics 6: 212-2229, 2007を参照し、それらは、すべてそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる）。

40

【0251】

上記のように（例えば、実施例3参照）、遺伝物質データベースにおける情報を参照として用いて質量スペクトルを分析した。これを行うために、MS2スペクトルを集め、次いで、それが良好な品質スペクトルまたは良好なマッチでないときであっても、すべてのMS2スペクトルについてマッチを見いだす標準計算プログラムを用いて、参照配列から

50

の予測MS2スペクトル(すなわち、遺伝物質データベースから)と1つずつ関連づける。このようなプログラムは商業的に入手可能である。例えば、Sequestソフトウェアは、Sage-N Research, Inc. (Milpitas, CA)からのSorcererソフトウェアパッケージの一部として得ることができる。遺伝物質データベースに対して良好な品質スペクトルまたは良好なマッチであると同定されたスペクトルを、遺伝物質データベースから参照配列上にマップする。

【0252】

ペプチドMS2が遺伝子データベースの複数の明確な成分にマップすることができる場合、そのペプチドMS2は、それらの同定された1つまたはそれ以上の成分である可能性があるため、どの成分が抗原結合性ポリクローナル抗体画分中に存在するか不明である。したがって、その処理を繰り返し、そして繰返しにより、証拠を集めて、いくつかの成分が、他のものよりも集めたMSスペクトルとより良好に関連があることを示すことができる。換言すれば、それらの可変領域配列の多くは、抗原結合による富化の後にMS2スペクトルとして観測される。これらの要素は、真の抗原を結合する抗体をコードすると考えられ、したがって、それらの配列を作製し(例えば、合成オリゴヌクレオチド発生器において)、発現プラスミド(例えばInvitrogenからのpcDNA3.1)中にクローニングし、細胞中で発現させ、そして抗原結合について試験する。

【0253】

結果

図5に示すように、ペプチド断片からの実際の質量分析結果と、核酸配列からの理論質量分析情報との相関性により、重鎖および軽鎖断片の配列の同定が可能である。質量分析包括度に関する限り最も高い信頼度を有したそれらのペプチドおよび核酸配列に対する相関性が示されている。実際のペプチド断片を含む完全長鎖をコードする核酸配列を合成し、そして組換え発現ベクターにクローニングした。ランダム対形成によって重鎖と軽鎖とを組み合わせ、そして細胞中で一緒に発現させて組換え抗体を産生する(すなわち、作製する)(例えば、米国特許第4,816,397号;同第4,816,567号;および米国特許出願第20110045534号の方法を参照のこと)。図6は、pERKコーティングされたプレートを用いるELISA実験の結果を示す表である。分かるように、図5に同定された鎖のいくつかの対形成により、p-ERKコーティングされたプレートに特異的に結合することができる抗体が生じた(陽性抗体は図6に黄色で示し、そして陽性ペプチドは図5に赤色で示す)。驚くべきことに、これらの結果は、ペプチド出現頻度のみまたはCDR3計数頻度のみのいずれからでも、抗原に特異的に結合する特定の抗体鎖の利用能が予測されなかったことを示した。例えば、軽鎖核酸配列参照番号G623FKB01A3GC7は、LC-MS/MS分析(すなわち、液体クロマトグラフィー、タンデム型質量分析)分析から235個のペプチドにマッチし、そして軽鎖核酸配列参照番号G623FKB01AXJ1Cは、1回のNGSランで1068回現れた配列を有した(図5、下の表を参照のこと)。しかし、それらはいずれも重鎖と組み合わせたとき、pERKに抗原を特異的に結合できる抗体を実際に形成することができなかった。この結果は、非常に驚くべきであり、そしてNGS分析からの核酸配列頻度によりのみ依存したReddy et al., Nature Biotechnology 28(9):965-969, 2010の方法が、真の抗原結合性配列を見落とすことを示した。したがって、本明細書に記載された方法は、選択された抗原に特異的に結合する抗体を同定および単離するために信頼して用いることができる。

【0254】

実施例6

本明細書に記載された方法に従って抗原特異的ウサギ抗体を生成した。これを行うため、以下のプロトコールに従った。

【0255】

ウサギ脾細胞RNA精製

標準方法を用い、p-MET抗原(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA Catalog # 1645)を用いてウサギを免疫化した。抗原特異的血清(すなわち、免疫化抗原

10

20

30

40

50

に特異的に結合したポリクローナル抗体を含む血清)を有する免疫化ウサギを、最終的な抗原注射(ブースト)後に屠殺した。50 mlの血液を集め、そして脾臓または他のリンパ系器官を集めた。1千万個の脾細胞をRNA精製に用いた。また、集めた血液50 mlからの血清および/または血漿を、抗原特異的抗体親和性精製のために取っておいた。

【0256】

Qiagen's RNeasyキット(Qiagen cat# 74104)を用いて製造元のプロトコールに従ってRNAを脾細胞から精製した。カラムにおいて、DNase I消化ステップを組み込むことによってDNase I処理を行って、汚染ゲノムDNAを除去した。RW1緩衝液洗浄後、RDD緩衝液中に希釈したDNase I(Qiagen cat# 79254)をRNA精製カラムにかけ、そして室温で20分間インキュベートした。次いで、カラムをRW1緩衝液でさらに1回洗浄し、続いてRPE緩衝液で2回洗浄し、そしてRNAを水30 µlまたは50 µlで溶出した。Nanodrop分光光度計(Thermo Scientific)において波長450 nmで測定された吸光度によってRNAの濃度を決定した。

10

【0257】

cDNA合成およびPCRによるアンプリコンの生成

以下に示すように、Invitrogen's ThermoScript(Invitrogen cat#12236-022)逆転写酵素を用いてウサギ脾細胞から単離されたRNAを最初に逆転写した:

DNase処理RNA: 5 µL

オリゴdTプライマー(50 µM): 1 µL

dNTP's(10 mM): 2 µL

dH₂O: 4 µL

20

65 °Cで5分間インキュベートし、氷上に2分間置き、次いで以下を加えた:

5×cDNA緩衝液: 4 µL

0.1 mM DTT: 1 µL

RNase OUT: 1 µL

dH₂O: 1 µL

ThermoScript: 1 µL

【0258】

混合物を50 °Cで1時間インキュベートし、その後、85 °Cで5分間熱不活性化ステップを続けた。最後に、RNase H(Invitrogen(Carlsbad, CA), cat#18021-071) 1 µlを加え、そして37 °Cで20分間インキュベートすることによって相補的RNA鎖をcDNAから除去した。

30

【0259】

シーケンシングのため重鎖、カッパ鎖およびラムダ鎖可変領域のアンプリコンを、以下のようにPCRによって生成した。

【0260】

【表 1 4】

重鎖融合プライマー:

リバーズ

MID11	<u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> tgatacgtctGGGCCAGT GGGAAGACTGATGG (配列番号: 242)
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------

フォワード

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGatcagacacgATGGAGA
CTGGGCTGCGCT
(配列番号: 243)

10

カッパ鎖融合プライマー

リバーズ

MID16	<u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> tcacgtactaGAAGAGGA GGACAGWAGGCGC (配列番号: 244)
-------	------------------------------------------------------------------------------------------

20

フォワード

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGATGGACATGAGGGCC
CCC
(配列番号: 245)

ラムダ鎖融合プライマー

リバーズ

MID39	<u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> tacagatcgtCTTGTT GTCCTTGAGTTCCTCAGAGGA (配列番号: 246)
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------

30

フォワード

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGATGGCCTGCACCCCG
(配列番号: 247)

【0 2 6 1】

上の配列において、下線の配列は454シーケンシングのためであり、太字の配列は454の鍵であり、小文字の配列は多重化のためのバーコードであり、そして標準フォントの大文字の配列はウサギ特異的配列である。PCR増幅は、Finnzyme's Phusion Hot Start IIポリメラーゼ (Thermo Scientific cat# F-540S) を用いて行い、ここで、反応混合物および条件は、以下に示すように設定した:

40

【0 2 6 2】

反応混合物:

cDNA:	2.5 μL
5 × Buffer GC:	5 μL
10 mM dNTP:	0.25 μL
Phusion HotStart II:	0.25 μL
プライマー (フォワード + リバーズ) 30 μM:	0.25 μL

50

水：

16.75 μ L

【0263】

PCRプログラム：

- ステップ1 98 - 1.5分
- ステップ2 98 - 10秒
- ステップ3 60 - 30秒
- ステップ4 72 - 30秒
- ステップ5 ステップ2～4を繰り返す、20回
- ステップ6 72 - 2分
- ステップ7 - 保持

10

【0264】

任意の試薬における汚染テンプレートからの任意の誤った増幅を確実になくするため、各混合物について二重反復反応 (duplicate reactions) (重鎖について4つの別々の反応、および各軽鎖について1つ) を設定し、ここで、cDNAテンプレートを水で置き換えた。テンプレートのないこれらの陰性対照反応を、テンプレートを含むサンプルと同時にを行った。PCRプログラム終了後、テンプレートを反応に加えたが、cDNAが存在しない場合のアンプリコンの存在について、各反応液 (陰性対照を含む) 3 μ Lを1.5% TAEアガロースゲル上の電気泳動によって分析した。図7は、これらの電気泳動ゲルの結果を示す。

【0265】

20

454シーケンシングのためのアンプリコンの精製、分析、定量化、および調製

PCRサンプル中の過剰のプライマーおよび/またはプライマーダイマー (dimers) を除去するため、Agentcourt Ampure磁性ビーズ (Beckman Coulter cat#A63881) を用いて製造元のプロトコル (000387 v001) に従ってアンプリコンを精製した。Ampure精製後の溶出されたアンプリコンを、次いで、Agilent 2100 Bioanalyzerにおいて、高感度DNAチップ (Agilent Technologies cat# 5067-4626) を用いて製造元のプロトコルに従って、純度および汚染DNA種の欠如について分析した。

【0266】

アンプリコンの純度を確認したら、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen cat#P7589) を用いて製造元のプロトコルに記載されたとおり、蛍光光度計においてDNAの濃度を定量化した。キットに提供されたラムダDNAを、100 ng / ウェルから1.56 ng / ウェルまでの標準曲線を作製する濃度基準として用いた。TE緩衝液中で100倍に希釈された各アンプリコンの蛍光を、2回繰り返して測定し、そして標準曲線の直線部分によりDNAの濃度を決定した。すべての蛍光測定は、黒色96ウェルプレートで行った。蛍光値が標準曲線の直線範囲から外れている場合、蛍光値を直線範囲内で捕捉するために、より大きなまたはより小さな希釈度を用いてサンプルを再測定した。各鎖タイプ (重鎖 - 540 bp、カップ鎖 - 485 bp およびラムダ鎖 - 510 bp) の塩基対におけるおよそのサイズを用い、以下の式を用いて濃度を決定した：

30

各アンプリコンの濃度 (分子 / μ L) =

[サンプル濃度 (ng / μ L) * 6.022 * 10²³] / [656.6 * 10⁹ * アンプリコン長 (bp)]

40

【0267】

各アンプリコンを1 * 10⁷ 分子 / μ Lに標準化し、次いで重鎖：カップ鎖：ラムダ鎖を3：3：1の体積比で混合し、ボルテックスし、そして最後に1：10で希釈して最終濃度1 * 10⁶ 分子 / μ Lの混合物を得た。

【0268】

エマルジョンPCR増幅、ビーズ富化、ビーズ計数およびシーケンシング

エマルジョンPCRは、454公開プロトコル：“emPCR Amplification Method Manual - Lib-L” (編：2010年5月、(Rev. 2011年4月、全体として参照により本明細書に組み込まれる) 以下の変更：セクション3.1.3ステップ2を伴う) に従

50

って行った。

【 0 2 6 9 】

【 表 1 5 】

試薬	体積(μl)
分子生物学的グレードの水	458
添加物	515
増幅混合物	270
増幅プライマー	32
酵素混合物	70
PPiase	2
合計	1347

10

【 0 2 7 0 】

“ emPCR Amplification Method Manual - Lib-L ” のステップ 3 . 7 から、シーケンシングビーズが富化されたら、Beckman Coulter's Z2 Particle Counterにおいて以下の設定でビーズを計数した：

アパーチャー (Aperture) : < 1 0 0 μ m >
 アパーチャー K d : < 6 0 . 0 4 >
 設定された上部カットオフ : < 3 0 . 0 0 μ m >
 設定された下部カットオフ : < 1 0 . 0 0 μ m >
 計数モード : < 間 >
 計量体積 : < 0 . 5 m l >
 分解能 : < 2 5 6 >

20

【 0 2 7 1 】

ビーズの濃度は、以下のように算出した：

ビーズの濃度 = [粒子カウンターからの平均読取り * 4] ビーズ / μ l

【 0 2 7 2 】

エマルジョン P C R からの富化ビーズを、GS FLX+またはGS Juniorについて 4 5 4 シーケンシングプロトコルに従って 4 5 4 シーケンサー (Roche) においてシーケンシングした。

30

【 0 2 7 3 】

免疫化ウサギの血清から集めたポリクローナル抗体のペプチド断片を、マウスについて上に記載したように生成させた (例えば、実施例 6 を参照のこと)。

【 0 2 7 4 】

簡潔には、以下のプロトコルを用いた。

ウサギ I g G のペプチド - アフィニティー精製

1 . ペプチド親和性樹脂を再懸濁し、そしてスラリー 0 . 4 m l を新たなカラム (Bio-rad, 731-1550, 0 . 8 × 4 c m) 中に取り、そしてこれを 0 . 2 m l 沈降精製樹脂にしなければならない。必要に応じて、等体積のブランク樹脂または非関連ペプチド親和性樹脂の対照カラムを作製する。ブランク樹脂を、結合プロセスにおいてペプチドなしで作った。

40

2 . P B S 1 0 m l でカラムを洗浄し、そしてそれを完全に排出させる。

3 . プロテイン A で精製した全 I g G を装填する。まず底部にふたをかぶせ、そしてパラフィンでラップする。全 I g G 3 ~ 5 m l を加える。上部にふたをかぶせ、そしてパラフィンでラップする。

4 . ローラー上で、室温で 1 5 分間回転させる。

5 . フロースルーを集める。まず上部、次いで底部のふたを取り、カラムを完全に排出さ

50

せる。

6. PBS 10 ml で3回洗浄する(カラム壁を洗浄し、すべての樹脂を確実に底部に充填する)。

7. 1 × R I P A 10 ml で洗浄する。

8. pH 7.4 の PBS 中の 20 % アセトニトリル 10 ml で洗浄する。

9. pH 7.4 の PBS 中の 60 % エチレングリコール 10 ml で洗浄する。

10. pH 7.4 の PBS 中の 2.0 M NaCl 10 ml で洗浄する。

11. pH 3.5 の 0.1 M グリシン 5 ml で溶出し、pH 8.5 の 1 M Tris 70 μl で直ちに中和する。

12. pH 2.7 の 0.1 M グリシン 5 ml で溶出し、pH 8.5 の 1 M Tris 300 μl で直ちに中和する。

13. pH 1.8 の 0.1 M グリシン 5 ml で溶出し、pH 8.5 の 1 M Tris 800 μl で直ちに中和する。

14. ウサギ Ig G E L I S A プレート (Molecular assay/ELISA group によって提供される) を用いて、Ig G 濃度について、すべてのまたは興味のある画分を測定する。

15. 抗原特異的活性は、E L I S A および / またはウエスタンブロットを用いて評価することができる。特異的活性は、すべての画分を同じ濃度に標準化した後に評価することもできる。

16. 精製された抗体物質は、LC - MS / MS で処理する準備ができている。

【0275】

上記のように精製した抗体からのペプチドにおいて、液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC - MS / MS) 分析を実施した(すなわち、精製した抗体を消化し、そしてペプチドを分析した)。生成した質量スペクトルを、遺伝物質データベース中の情報に基づく理論質量分析データと関連づけた。

【0276】

図8に記載した表に示すように、ペプチドの実際の(すなわち、観測された)質量分析を、核酸配列からの理論質量分析データと関連づけることによって多くの重鎖および軽鎖ペプチドを同定した。これらのペプチドの出現頻度は、表の最も右のレーンに示す。これらの鎖は、そのCDR3包括度(ほとんどの場合100%で)、および遺伝物質データベースから読み出され、そして合成された根底にあるヌクレオチド配列に基づいて選択した。6つの重鎖を5つの軽鎖とランダムに組み合わせ(図8に赤色で示す)、そして生成した抗体を、E L I S A (抗原コーティングされたプレートを用いて)およびウエスタンブロット分析を用いて(未処理の(-レーン)またはヒト増殖因子(+レーン)で処理されたHeLa細胞に対して試験し、ここで、HGF処理細胞は、p-Met抗原を発現することが知られている。ウエスタンブロット分析の結果を図9に示す。p-Met特異的抗体(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, カタログ番号3126から商業的に入手可能である)を対照として用いた。細胞溶解物中の抗原に対する高い特異的結合を示した、本明細書に記載された方法に従って生成された抗体は、図8に太字の赤色で示す(すなわち、重鎖参照番号GXRYQP201BIQD2およびGXRYQP201A97DZならびに軽鎖参照番号GXRYQP201A291TおよびGXRYQP201BRIWKおよびGXRYQP201ALDF5)。なお、図9は、本実施例で生成された抗原に特異的に結合する6つの異なる抗体のうちの2つしか示していないことに留意する(すなわち、図9は、GXRYQP201A291T軽鎖およびGXRYQP201BRIWK軽鎖と結合されたGXRYQP201BIQD2重鎖を用いる2つの抗体しか示していない)。

【0277】

また、マウス抗体で観測されるように、最も高い頻度を有する鎖は、抗原特異的抗体の形成を行わなかった(9.12%の頻度を有したが、抗原を特異的に結合しなかった重鎖GXRYQP201A1C3Bを、0.19%の頻度しかなかったが、抗原を特異的に結合した重鎖GXRYQP201BIQD2と比較する)。

【 0 2 7 8 】

実施例 7

本実施例は、上に記載されたアプローチを用いた、4種の異なる抗原で免疫化されたウサギからのおよびさらなる異なる抗原で免疫化されたマウスからのモノクローナル抗体の生成（表 1 2）を記載し、本アプローチが、少なくとも2つの実験動物種において確実であり、かつ再現可能であることを示している。

【 0 2 7 9 】

【表 1 6】

抗原	免疫化された種	高信頼度の重鎖+軽鎖	ユニーク ELISA+ クローン	ユニーク WB+ クローン
PR A/B	ウザギ	8 + 10	12	6
pMET	ウザギ	11 + 10	6	4
Lin28A	ウザギ	7 + 4	5	5
Sox1	ウザギ	9 + 5	12	1
p-p44/42	マウス	12 + 13	15	3

表 1 2. E L I S A およびウエスタンブロット (WB) によって試験した NGS / LC-MS / MS プラットフォームによって同定された複数のターゲットに対する機能的に関連するモノクローナル抗体

【 0 2 8 0 】

ニュージーランドホワイトウサギをキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) に結合したヒトプロゲステロン受容体 A / B 特異的 (P R A / B) ペプチドで免疫化した。各動物の粗血清中の抗原特異的抗体活性をスクリーニングして P R A / B に対して最も高い E L I S A およびウエスタンブロットシグナルを有するウサギを選択した。この動物からの血清を、20 mL の血液から集め、そして脾 B 細胞から RNA を得た。プロテイン A セファロースカラムを用いて、血清から全免疫グロブリン (I g G) を単離し、そしてセファロースビーズに結合した抗原特異的ペプチドからなるカスタムカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーによって抗原特異的ポリクローナル抗体を精製した。結合した I g G を P B S で十分に洗浄し、そして徐々に酸性の緩衝液 (p H 3 . 5、p H 2 . 7 および p H 1 . 8) を用いる逐次的溶離にかけた (図 1 0 a)。各溶離からの画分を集め、中和し、そして P R A / B 発現細胞系統 T 4 7 D および P R A / B 陰性細胞系統 H T 1 0 8 0 からの溶解物の抗原特異的 E L I S A およびウエスタンブロットティングによってスクリーニングした (図 1 0 a)。P R A / B ウエスタンブロット比活性は、ポリクローナル画分が適合した濃度であったときに、p H 1 . 8 の画分において非常に富化され、p H 2 . 7 の画分においてより少ない程度に富化され、そして p H 3 . 5 の画分において検出不可能であることが見いだされた。したがって、p H 1 . 8 の画分を L C - M S / M S 分析に用いた。

【 0 2 8 1 】

NGS により I g V 領域配列のカスタムデータベースを生成するため、P R A / B に強い特異的活性を示した同じ動物から集めた全脾細胞から RNA を単離した。V 領域全体を増幅するためウサギ I g 特異的 および 鎖プライマーを用いて、I g 重鎖および軽鎖可変領域アンプリコンを生成させた。プライマーはバーコードを含み、そして Roche 4 5 4 NGS プラットフォーム用の 4 5 4 チタン融合プライマーデザインに対する特定の要求に従った。集めた V 領域配列の数を増やすため、本発明者らは、 および 鎖からなる 3

回の454 GS Juniorシーケンシングランを組み合わせ、合計80,000の通過したフィルター読み取り値を得、そのうちの44,363は、全V領域を含んでおり、そして下記のプロテオミクスアプローチのための基準を提供した。集めた配列は、5,279のユニーク鎖相補性決定領域3(CDR3)配列およびガウス分布に従う様々な長さの11,681のユニーク鎖CDR3配列を含んだ。以前のデータと一致して、このウサギは、重鎖VDJ再構成においてVH1(V1S69+V1S40>64%)、続いてVH4(V1S44+V1S45約30%)を優先して用いた

(Becker et al., Eur J Immunol 20: 397-402, 1990, Knight, Annu Rev Immunol 10: 593-616, 1992, Mage et al., Dev Comp Immunol 30: 137-153, 2006)。

【0282】

次に、pH1.8の画分を、その以前の活性に基づいてLC-MS/MSによって試験した(図10a)。配列包括度を最大にするため、ポリクローナル抗体5μgを均等に分け、そしてキモトリプシン、エラスターゼ、ペプシンおよびトリプシンによって別々に消化した。Orbitrap Velos(Thermo Fisher)を用い、45分の勾配を用いて4回のLC-MS/MSランの合計を集め、ラン当たり10,000スペクトルの平均を得た(図10b)。偽発見率(false-discovery rate)(FDR)を算定するため、順方向および逆方向の配列の複合データベースを生成することによってターゲット/デコイアプローチを用い(Elias et al., Nat Methods 4: 207-214, 2007)、そしてSEQUEST(Yates et al., Anal Chem 67: 1426-1436, 1995)プログラムを用いて各LC-MS/MSランを探索した。可能な限りの酵素特異性を考慮して(キモトリプシン/トリプシン)、線形判別分析(Huttlin et al., Cell 143: 1174-1189, 2010)を用いて、ペプチドスペクトルマッチ(PSM)を最終FDR 2%にフィルタリングする。この方法を用いて同定された高い信頼度の重鎖CDR3ペプチドの例を図10cに示す。個々のランを組み合わせ、そして合計2,356のV領域PSMを、1.8%のFDRで同定した。

【0283】

抗体V領域配列のデータベースは、タンパク質アイソフォームのデータベースに類似している。結果として、少数のペプチドのみを用いてタンパク質を確信的に同定することが多い、LC-MS/MSによってショットガンシーケンシングを用いる従来のアプローチは、ポリクローナル抗体混合物中の抗体V領域配列を同定するには不十分である。さらに、抗体V領域配列は、たった1つのアミノ酸によって変化することがありうるため、高い質量精度は、PSMにおいてさらなる信頼度を提供するのに役立つ。SEQUESTによって決定された質量誤差 -5ppmおよび5ppmを有する各V領域PSMを、全V領域データベースに戻ってマップし、データセット全体でPSM冗長度および包括度に対処した(図10d)。リマップ後、ペプチドの総数、ユニークペプチド数、スペクトル共有(配列に対する全ペプチドマッピング/全V領域PSM)、全V領域配列包括度、およびCDR3包括度を、各V領域配列について決定した。ポリクローナル混合物から富化されることが多い高い信頼度を有するV領域配列を同定するためにプロテオミクス分析では、以下を含む経験的に厳しい基準を適用する：a)全体的に高い包括度(65%)、b)V領域配列の高度の相同性のため、少なくとも12のユニークペプチドおよびc)高い超可変領域包括度、特に95%のCDR3包括度。V領域配列は、1つのプロテアーゼを単独で用いて同定することができるが、ポリクローナル混合物の予測不可能な複雑さと共にV領域配列における高い変動率のため、V領域包括度を高めるために多数のプロテアーゼを用いることが好都合であることが見出された。例えば、図10eに示すように、異なるプロテアーゼからの多数のオーバーラップペプチド断片は、重鎖および軽鎖配列の両方の全CDR3の同定に貢献した。同じV領域配列にマップする多数のプロテアーゼからの多数のランにわたってユニークPSMを同定することで、スペクトル計数および全V領域配列にわたる包括度が増加し、特定のV領域配列がポリクローナル混合物中に存在する信頼度が高まり、そしてNGS配列品質における信頼度がさらに高まる(Kircher et al., Bioessays 32: 524-536, 2010)。上記のフィルタリング基準を用いて、高信頼度の合計10の鎖および8の鎖の配列を、pH1.8の溶出画分から同定した(表13)

10

20

30

40

50

【 0 2 8 4 】

【 表 1 7 】

100% CDR3 包括度および $\geq 65\%$ V 領域包括度

NGS 参照 .#	総ペプチド 計数	可変領域 包括度 %	CDR3 配列	配列 番号	CDR3 頻度による NGS ランク	生殖細胞系列 V(D)J
G2JXQJ001A2Q81	101	95.69	KLGL	396	212	IGHV1S45, D4-2, J4
G2JXQJ001AGJSJ	91	92.04	GFSL	397	76	IGHV1S69, *, J4
G2JXQJ001BJE8R	78	98.26	DLGDL	398	423	IGHV1S45, D3-1, J4
G2JXQJ001BT2NA	70	86.21	DLGNL	399	461	IGHV1S45, D4-1, J4
G2JXQJ001AFBNC	61	87.27	GNL		58	IGHV1S44, D4-1, J4
G2JXQJ001AL49Y	59	87.72	DFHL	400	237	IGHV1S45, *, J4
G2JXQJ001BWR23	56	89.17	GSLGTLPL	401	103	IGHV1S45, D8-1, J2
G2JXQJ001BN8MH	50	82.14	GFAL	402	109	IGHV1S69, *, J4
G2JXQJ001BPNUG	48	81.51	GHDDGYNYVYKL	403	123	IGHV1S69, D6-1, J4
G2JXQJ001BZA42	35	95.54	GFTL	404	1417	IGHV1S69, *, J4
G2JXQJ001BJ8KJ	93	87.27	LAGYDCTTGDCFA	405	2769	IGKV1S15, J1-2
G2JXQJ001BQM6D	47	95.5	LGGYDCDNGDCFT	406	85	IGKV1S15, J1-2
G2JXQJ001A9VP3	33	92.79	LGTYDCRRADCNT	407	5654	IGKV1S19, J1-2
G2JXQJ001BQJFD	28	98.15	QSTLYSSTDEIV	408	86	IGKV1S10, J1-2
G2JXQJ001BJCLS	28	96.23	QCSYVNSNT	409	4518	IGKV1S44, J1-2
G2JXQJ001AG4TB	24	65.45	LGSYDCRSDDCNV	410	179	IGKV1S2, J1-2
G2JXQJ001AIZ32	17	86.11	LGAYDDAADNS	411	252	IGKV1S19, J1-2
G2JXQJ001BJYR5	15	72.07	LGTYDCNSADCNV	412	1128	IGKV1S15, J1-2

表 1 3. 高い信頼度の重鎖および軽鎖の同定。100%のCDR3スペクトル包括度および全体として $\geq 65\%$ 可変領域包括度を有する重鎖および軽鎖を同定し、そして総ペプチド計数によって測定された信頼度の順序にランク付けした。

CDR3配列同一性およびウサギ生殖細胞系列測定も示す。特徴づけのためのコンビナトリアル抗体の遺伝子合成、クローニング、および発現のために、重鎖および軽鎖を選択した。NGSランクは、各鎖についてNGSデータベースにおいて同定された、得られたCDR3配列の頻度ランキングを示す。

*は、可能性のあるD遺伝子を同定することができなかったことを示す。

【 0 2 8 5 】

アフィニティー精製された血清中に存在する高い信頼度のV領域配列の存在についての証拠を提供するにもかかわらず、タンパク質分解およびサンプル調製中のジスルフィド結合の還元のため、LC-MS/MSデータから、同種の重鎖および軽鎖対形成における直接情報は存在しない。結果として、NGS頻度によって観測され、そしてELISAによってPRA/Bペプチドに対する抗原特異的結合活性についてスクリーニングされた最も高いランクの重鎖および軽鎖に加えて、重鎖および軽鎖対形成のすべての可能な組合せ(1つの96-ウェルプレートトランスフェクション中、合計80の抗体について8×10マトリックス)を発現させた。合計12の重鎖および軽鎖対が抗原特異的ELISAによって陽性であった(図11a)。次いで、各抗原特異的ELISA陽性クローンを、細胞溶解物中で内因的に発現されたPRA/Bに対する特異性についてウエスタンブロッ

トによって試験した(図11b)。6つくローンが、P R A / B (図11b)に特異的に結合することが見いだされ; 同じ抗体濃度で検定したときに、2つのクローンが、最初のポリクローナル混合物と比較して非常により強いシグナルを示した。ウエスタンブロットによって陽性の抗原特異的クローンを、さらなるアッセイにおいてさらに特徴づけた。1つのモノクローナル抗体、クローンF9およびクローンC1は、ウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学(IHC)(図11b~c)において優れたシグナルおよび特異性を示し、そしてまた、ポリクローナル混合物が失敗したフローサイトメトリー(FC)および免疫蛍光検査(IF)アッセイにおいても特異的に反応した(図11d~e)。これに対して、その最も高いNGSランクによって選択された および 鎖は、抗原特異的抗体を生じなかった。C D R 3 含有ペプチドは、最も高いNGSランクの および 鎖から観測されず、そして30の最も高いランクの または 鎖からのC D R 3 配列は、本発明者らのプロテオミクスアプローチによって高い信頼度で同定された。活性の欠如は、同種の対形成の欠乏のためでありうるということは、除外できないが、これらの鎖がL C - M S / M S によってまったく観測されなかった事実は、最も高いランクのNGS鎖がいずれも抗原に対して特異的でなかったことを示唆している。したがって、これらの実験では、抗原特異的抗体を、NGSランクのみに基づいて同定することはできなかった。

【0286】

クローン多様性を視覚化するために、表13に示す高い信頼度の重鎖および軽鎖V領域配列において、系統発生的分析(Dereeper et al., Nucleic Acids Res 36: W465-469, 2008)を実施した。重鎖または軽鎖のいずれかに密接に関連した配列は、離散性の群に集まった。興味深いことに、この報告で発見されたすべてのP R A / B 特異的モノクローナル抗体は、おそらく免疫化中に密接に関連したB細胞からのクローン増殖のため、系統樹において密接に一緒に集まった。また、生殖細胞系列の使用は、この観測を支持した(表13)。類似の観測を、異なる抗原を用いる独立した実験で行った(Lin 28A、図12)。

【0287】

本実施例に記載された実験に用いる方法は、以下のとおりである。

【0288】

動物の免疫化および取扱い。各ヒトタンパク質抗原の異なる領域のアミノ酸配列から誘導されたキーホールリンペットヘモシアニン結合ペプチドの混合物を用いて、それぞれ3週間隔で4回の別々の用量による皮内注射によってニュージーランドホワイトウサギを免疫化した。ペプチドを、Imjectマレイミド活性化K L H (Thermo-Pierce)に結合した。マウス免疫化は、免疫化の経路が腹腔内であり、そして注射が2週間隔であったことを除いて同じ方法で実施した。最終ブーストの3日後に血液を採血した。安楽死の時に、各動物からの全脾臓を集め、続いて、所望のポリクローナル活性を確定した。

【0289】

ウサギおよびマウスB細胞レパートリーの次世代DNAシーケンシング。高度免疫化されたウサギおよびマウスからの脾細胞を集め、そして全RNA精製のため、Qiagen's RNeasyキットを用いて製造元のプロトコールに従って溶解した。提供されたプロトコールを用いて、RNAをカラム上でDNase I (Qiagen cat# 79254)により処理してゲノムDNAを除去した。454 Life Sciencesプラットフォーム(Roche)でシーケンシングされるこの物質から重鎖および軽鎖アンプリコンライブラリーを生成するために、RT-PCRを、以下のとおり実施した。プライマーとしてオリゴdTを用い、Thermoscript逆転写酵素(Invitrogen cat# 12236014)を用いて、テンプレートとして脾細胞全RNAからcDNAを生成させた。ウサギIgGシーケンシングのため、以下のステップでPhusion^(R) Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Oy, フィンランド)を用いて、1、2および鎖の可変領域を、配列特異的454融合プライマーで増幅した(5'末端においてリーダーにハイブリダイズし、そして同定に必要な3'末端において配列を含み、そして454シーケンシングプラットフォームのLib-Lフォーマットにおいてバーコード化する): 変性 - 98 90秒間; 20サイクル[変性 - 98

10 秒間；アニーリング - 60 30 秒間；伸長 - 72 30 秒間]。マウス IgG シークエンシングのため、重鎖および軽鎖アンプリコンを、2 ステップ PCR 法によって生成させた。第 1 のステップにおいて、センスプライマーとして遺伝子ファミリー特異的変性オリゴヌクレオチド、および定常領域の始まりの高度に保存された領域にハイブリダイズされたアンチセンスプライマーの混合物であって、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーが、それぞれその 5' 末端で明瞭なアダプター配列を含む、混合物を用いて、または鎖可変領域を増幅した（ウサギについては上記と同じ条件で 15 サイクル）。第 1 のラウンドから各反応物を、市販キット（Qiagen cat#28104）でカラム精製し、次いで、同定に必要な 3' 末端における配列を含むアダプター配列特異的プライマーおよび 454 シークエンシングプラットフォームの Lib-L フォーマットにおけるバーコード化を用いて、第 2 のステップにおいて追加の 10（鎖）および 8 サイクル（鎖）によってさらに増幅した。いずれの種についても、各動物のすべての軽鎖増幅反応物をプールした。Agencourt AMPure XP DNA 精製システムを用いて、提供されたプロトコールに従って重鎖および軽鎖サンプルの過剰のプライマーを除去した。プライマー除去後のアンプリコンプールの品質および純度は、Agilent Bioanalyzer 2100（Agilent Technologies）において確認し、そして DNA の濃度は、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit（Invitrogen）を用いて蛍光光度計において正確に定量化した。454 Life Sciences からの Lib-L LV、GS FLX Titanium Series プロトコールに従って、エマルジョン PCR およびビーズ富化を実施した。ビーズ数を Beckman Coulter Z2 Particle Counter において計数し、そしてライブラリーを 454 GS Junior（Roche）においてシークエンシングした。

【0290】

抗原特異的 IgG の親和性精製。高度免疫化されたウサギ（ニュージーランドホワイト）の血清からの全 IgG を、プロテイン A セファロースビーズ（GE Healthcare）を用いて精製し、そしてセファロースビーズに共有結合した免疫原ペプチドを有するカラム中で 15 分間回転させてインキュベートした。重力流によって非結合画分を排出し、そしてカラムを 1 × リン酸塩緩衝食塩水（PBS）で十分に洗浄して非特異的 IgG を除去した。抗原特異的ポリクローナル IgG プールを、pH 3.5、続いて pH 2.7、そして最後に pH 1.8 の 0.1 M グリシン / HCl 緩衝液で順に溶離した。各溶出液を 1 M Tris 緩衝液（pH 8.5）で直ちに中和した。高度免疫化されたマウスの血清からの全 IgG を、プロテイン G 磁性ビーズ（Millipore, cat# LSKMAGG10）を用いて精製し、次いで、磁性ビーズ上に固定化された免疫原ペプチド（Pierce, cat#88817）を用いて 4 で一晩回転させてインキュベートした。磁性チューブラック（Invitrogen, cat# 12321D）を用いてビーズを PBS で十分に洗浄し、次いでカラムに結合された抗体を、ウサギ IgG 精製について記載したように徐々に酸性の pH で順に溶離した。

【0291】

アフィニティー精製された抗体のプロテアーゼ消化。ポリクローナル抗体を、pH 8 の 20 mM HEPES 中の 8 M 尿素中で変性させ、そして 10 mM DTT 中、55 で 1 時間還元した。還元されたポリクローナルを室温（RT）に冷却し、そして 20 mM ヨードアセトアミドの存在下で 1 時間アルキル化を実施した。キモトリプシン、エラスターゼおよびトリプシン消化は、酵素対基質比 1 : 50 で、pH 8.0 の 20 mM HEPES 中の 2 M 尿素の存在下、37 で一晩実施した。ペプシン消化は、酵素対基質比 1 : 50 で、3 M 酢酸の存在下、室温で一晩実施した。消化されたペプチドを、以前に公開されたように（Rappsilber et al., Anal Chem 75: 663-670, 2003）STAGE-TIPS によって脱塩し、そして LC-MS/MS によって分析した。

【0292】

質量分析。LC-MS/MS は、LTQ Orbitrap Velos（Thermo-Fisher）質量分析計を用いて実施した。インラインフロープリッターを有する Agilent 1100 シリーズバイナリーポンプを用いて Magic C18aQ 樹脂（5 μm, 200）で充填されたハンドポワード（hand-poured）溶融シリカ毛细管カラム（内径 125 μm × 20 cm）上へ、Famos オートサンプラー（LC Packings）を用いて、サンプルを 7 分間装填した。クロマトグラフィー

は、バイナリー勾配を用いて5～30%溶媒B400n1/分で45分間展開した(溶媒A、0.25%ギ酸(FA);溶媒B、0.1%FA、97%アセトニトリル)。10⁶の自動利得調節(AGC)ターゲットを有するOrbitrap(6×10⁴の分解能設定で300～1,500m/z)において、上記のマスタースペクトルからデータ依存的なやり方で、20のMS/MSスペクトルを得た。荷電状態スクリーニングを用いて単独で荷電された種を排除し、そしてMS/MSスペクトルを誘発するには500計数の閾値が必要であった。可能な場合、LTQおよびOrbitrapは、パラレル処理方式で操作した。

【0293】

データベース探索およびデータ処理。SEQUESTアルゴリズム(バージョン2.8 rev 12)(Yates et al., Anal Chem 67: 1426-1436, 1995)を用いて、21,932の完全長ガンマV領域配列および22,431の完全長カッパV領域配列、ならびに6,358の酵母タンパク質(*S. cerevisiae*, NCBI)に結合されたガンマおよびカッパ定常領域配列、ならびにいくつかのヒトケラチン、トリプシンおよびキモトリプシンを含む、42の一般的な汚染物質で構成されるカスタムハイブリッドデータベースに対してMS/MSスペクトルを探索した。V領域配列は高度に関連づけられているため、酵母プロテオームは、参照データベースに対してより多様な配列を人工的に与えており(Beausoleil et al., Nat Biotechnol 24: 1285-1292, 2006)、そしてフィルタリングしたデータが酵母から同定されたペプチドを含むはずがないため、最終データセットをフィルタリングした後、信頼度の別のソースを提供した。探索パラメーターには、キモトリプシンおよびトリプシンに対する部分的特異性ならびにエラスターゼおよびペプシンに対する特異性のなさ、質量許容差±50ppm、システインにおける57.0214の静的修正(static modification)、およびメチオニンにおける15.9949の動的修正(dynamic modification)が含まれる。データセットにおける偽発見率は、ターゲット/デコイアプローチ(Elias et al., Nat Methods 4: 207-214, 2007)を用いて算定した。線形判別分析(Huttlin et al., Cell 143: 1174-1189, 2010)を用いて、データセットを2%のFDRにフィルタリングした。Orbitrapの質量精度は、50ppmを大きく超えるが、より広い前駆体イオン許容差で探索する場合、正確なペプチド同定により小さな前駆体質量誤差(±1ppm)が生じるのに対して、間違っただけのペプチド同定により50ppmウィンドウ全体にわたって広がる。結果として、ストリンジェント前駆体マスフィルター(stringent precursor mass filters)は、データセットからの多くの間違っただけのPSMを選択的に除去する。

【0294】

獲得後の分析は、本明細書に記載されたとおり実施した。簡潔には、V領域配列から誘導された通過ペプチドを、NGSIGデータベースにリマップした。キモトリプシンおよびトリプシン消化物から生じたペプチドについて、マッチは、予想された切断から生じたものに制限された(トリプシンについてKR、キモトリプシンについてYWF LMA)。CDR包括度は、カバットによって定義された法則(Wu et al., J Exp Med 132: 211-250, 1970)を用いてCDRを同定することによって決定した。すべての場合において、包括度は、高い信頼度ペプチドから同定されたアミノ酸の総数を、成熟したV領域配列中のアミノ酸の数で割ったものとして定義される。

【0295】

同定された免疫グロブリン鎖のクローニング、発現および特徴づけ。アフィニティー精製されたポリクローナルIgGブールの質量分析を通して同定された および 鎖を、以下のようにクローニングし、そして発現させた。それぞれ同定された鎖について、FWR1からFWR4までの全可変ドメインをコードする核酸配列を合成した(Integrated DNA Technologies, Coralville Iowa)。オーバーラップPCRを用い、リボソームスキップ機構を用いて1つのオープンリーディングフレームから2つのポリペプチドを生成するウイルス性2A配列により各重鎖-軽鎖の組合せ順列(combination permutation)を発現した(Doronina et al., Mol Cell Biol 28: 4227-4239, 2008, Donnelly et al., J Gen Virol 82: 1027-1041, 2001)。5'から3'の順序で、軽鎖の可変および定常領域、Th

osea asignaウイルスからの2 Aペプチド配列、および重鎖可変ドメインの1つのオープンリーディングフレームカセットを、インフレームのウサギ 鎖リーダー配列およびウサギ 鎖定常領域、クローニング部位の5'および3'をそれぞれ含む、CMVプロモーター駆動型哺乳動物発現プラスミド中にクローニングした。ポリエチレンイミンを用いてこのようにアセンブリングされた各軽鎖-重鎖組合せをコードするプラスミドプレップを用いて、HEK293をトランスフェクトした(Boussif et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 7297-7301, 1995)。トランスフェクション2~5日後、コーティング抗原として免疫原ペプチドを用いるELISAによって、抗原特異的抗体の分泌液について上清をスクリーニングし、そして反応性を示した軽鎖-重鎖順列をさらに特徴づけた。マウス抗体発現について、定常領域は、マウスIgG2aであった。

10

【0296】

ELISA、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光検査および免疫組織化学によるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の特徴づけ。ELISA、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光検査および免疫組織化学の詳細なプロトコールは、オンラインでCell Signaling Technology Inc.のウェブサイトに見いだすことができる。高結合性が保証されたポリスチレン96-ウエルプレートCostar cat#3369を、ELISAに用いた。各ターゲットについてのELISA分析に用いた抗原は、免疫化に用いたのと同じペプチドであった。プロゲステロン受容体抗体については、ウエスタンブロッティングをT47D(PR+)、MDA-MB-231細胞(PR-)およびHT-1080(PR-)細胞溶解物において実施し、フローサイトメトリー分析をT47D(PR+)およびMDA-MB-231細胞(PR-)において実施し、共焦点免疫蛍光検査分析をMCF-7細胞(PR+)においてMDA-MB-231細胞(PR-)と比較して実施し、そして免疫組織化学的アッセイをパラフィン包埋原発性ヒト乳がん切片、T47Dおよびパラフィン包埋MCF-7細胞(PR+)においてMDA-MB-231細胞(PR-)と比較して実施した。ホスホ-p44/42MAPKマウス抗体については、ウエスタンブロッティングを、U1026(Cell Signaling Technology, Inc. cat# 9903)または12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート(TPA)(Cell Signaling Technology, Inc. cat# 4174)のいずれかで処理されたジャーカット細胞からの溶解物において実施した。Lin28A抗体については、ウエスタンブロッティングを、NCCIT、NTERTA、MESおよびIGROV1細胞系統からの全溶解物において実施し、共焦点免疫蛍光検査およびフローサイトメトリー分析をNTERA(Lin28A+)およびHela(Lin28A-)細胞において実施した。ホスホ-Met(pMet)抗体については、未処理の(pMet+)MKN45細胞およびSU11274Metキナーゼ阻害剤で処理された(pMet-)MKN45細胞からの溶解物を用いた。Sox1抗体については、マウス脳抽出物(Sox1+)およびNIH-3T3(Sox1-)細胞からの溶解物を用いた。

20

30

【0297】

実施例8

本実施例では、B型肝炎ウイルス小型表面抗原(HBsAg)に特異的なヒトモノクローナル抗体を、本明細書に記載された方法に従って生成した。これを行うために、以下のプロトコールに従って遺伝物質データベースを生成した。ポリクローナル抗体を下記のように精製し、そしてマウスおよびウサギについて上に記載したように質量分析に従って分析した。

40

【0298】

I. 核酸配列の生成。

抗原特異的、記憶および全B細胞単離ならびにRNA精製

フィコール勾配(Ficoll gradient)を用いて、ヘパリン真空チューブ中に集めた新たなヒト全血から、末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。底部にHistopaque 1077(Sigma Aldrich cat#10771)20mlを含むGreiner Leucocep 50mlのコニカルチューブ(Sigma Aldrich cat# Z642843)において、最大25mlの血液を上部に適用し、次いで

50

、チューブを室温、 $1500 \times g$ で20分間遠心分離した。滅菌ピペットを用いて白血球（パフィーコート）を集め、50 mlのRPMI中に細胞を再懸濁することによってRPMI培地中で2回洗浄し、次いで、 $400 \times g$ で10分間遠心分離した。洗浄後、PBMCを、ウシ胎児血清中の20% DMSO中で低温保存するか、またはB細胞単離のため直ちに処理した。

【0299】

B細胞単離のため、陰性選択法を用い、Invitrogen's Dynabeads Untouched B-cell Isolationキット (Invitrogen cat#113-51D) を製造元のプロトコールに従って用いて、PBMCからすべての非B細胞を除去した。生成した非標識B細胞集団を、さらに処理して抗原特異的または記憶B細胞のいずれかを単離した。抗原特異的B細胞単離のため、全標識B細胞を、ストレプトアビジン磁性ビーズ (Pierce-Thermo Scientific cat#88816) 上に固定化されたビオチン化抗原と共に、ローテーター上、室温で20分間インキュベートした。任意の抗原結合性B細胞を含むビーズを、次いで $1 \times PBS$ で2回洗浄した。次いで、洗浄したビーズを、RNA単離のため、Qiagen's RNeasyキットRLT溶解緩衝液 (1% -メルカプトエタノールで補充された) 中に再懸濁した。

10

【0300】

記憶B細胞単離のため、CD27+および表面IgG+細胞単離用のMiltenyiのMACキット (Miltenyi Biotec (Auburn, CA) cat#130-051-601 および130-047-501) を用いて、全非標識B細胞からCD27+および表面IgG+細胞を単離した。CD27+およびsIgG+B細胞を同時に単離するために、両方の細胞表面マーカーに対する磁性ビーズ結合抗体を、インキュベーションステップ中に同時に加えた。精製したら、記憶B細胞を $300 \times g$ で10分間遠沈させ、次いでRNA単離について上に記載したようにRNA用のRLT緩衝液中に溶解した。

20

【0301】

Qiagen's RNeasyキット (Qiagen cat# 74104) を用いて製造元のプロトコールに従って、選択された細胞からRNAを精製した。DNase I消化ステップを組み込むことによって、カラム上でDNase I処理を行って汚染ゲノムDNAを除去した。RW1緩衝液洗浄後、RDD緩衝液中に希釈されたDNase I (Qiagen cat# 79254) をRNA精製カラムに適用し、そして室温で20分間インキュベートした。次いで、カラムをRW1緩衝液でさらに1回洗浄し、続いてRPE緩衝液で2回洗浄し、そしてRNAを水30 μ lまたは50 μ lで溶離した。RNAの濃度は、波長450 nmでNanodrop分光光度計 (Thermo Scientific) において測定された吸光度によって決定した。

30

【0302】

PCRによるアンプリコンのcDNA合成および生成

まず、記憶または抗原特異的B細胞から単離されたRNAを、以下に示すように、Invitrogen's Thermoscript逆転写酵素 (Invitrogen cat#12236-022) を用いて逆転写した：

DNase I処理RNA：	5 μ l
オリゴdTプライマー (50 μ M)：	1 μ l
dNTP's (10 mM)：	2 μ l
dH ₂ O：	4 μ l

40

【0303】

65 で5分間インキュベートし、氷上に2分間置き、次いで、以下を加えた：

5 \times cDNA緩衝液：	4 μ l
0.1 mM DTT：	1 μ l
RNAse OUT：	1 μ l
dH ₂ O：	1 μ l
ThermoScript：	1 μ l

【0304】

混合物を50 で1時間インキュベートし、その後、85 で5分間の熱不活性化ステップを続けた。最後に、RNAse H (Invitrogen cat#18021-071) 1 μ lを加え、そし

50

て37で20分間インキュベートすることによってcDNAから相補的RNA鎖を除去した。

【0305】

シーケンシングのための重鎖、カップ鎖およびラムダ鎖可変領域のアンプリコンを、以下のようにPCRによって生成した。重鎖の増幅では、B細胞プール中のVH遺伝子転写頻度(transcript frequency)の天然分布(natural distribution)を保存するため、以下に挙げるプライマーを用いて、各cDNAサンプルについて4つの独立した反応(それぞれVH1および7; VH2、5および6; VH3; ならびにVH4の遺伝子ファミリーに特異的なもの)を行った。カップ鎖およびラムダ鎖増幅では、各鎖について1つの反応を、各cDNAサンプルについて行った。各反応では、フォワードプライマーの等モル混合物を、同濃度の以下に示すリバースプライマーと共に用いた。増幅は、Lib-Lプラットフォームによる454シーケンシングに適合しうる融合プライマー(Roche)を用いて実施した。各鎖の定常領域の5'末端にハイブリダイズするようにリバースプライマーを設計した。これらのプライマーは、シーケンシングの読み取りが、各定常領域(リバースセンス)の先端の5'末端から可変領域の3'末端に開始されるように、Lib-LプライマーBおよびMID配列を含む。重鎖およびカップ鎖では、各MIDについて1つのリバースプライマーを用いるが、ラムダ鎖では、各MIDについて2つの異なるリバースプライマーが必要であった。

【0306】

重鎖融合プライマー:

【表18】

リバース

oli551	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag CTGTGCGTCGCA gaa gac Sga TGG GCC CTT GGT GGA (配列番号: 248)	MID136
oli555	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag ACGCGAGTAT gaa gac Sga TGG GCC CTT GGT GGA (配列番号: 249)	MID27
oli602	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag CACGCTACGT gaa gac Sga tgg gcc ctt ggt gga (配列番号: 250)	MID34
oli606	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TGAGTCAGTAT gaa gac sga tgg gcc ctt ggt gga (配列番号: 251)	MID70
oli670	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag ATCTACTGACatgat gaa gac Sga tgg gcc ctt ggt gga (配列番号: 252)	MID88
oli671	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag AGTAGTGATCtaca gaa gac Sga tgg gcc ctt ggt gga (配列番号: 253)	MID83

【0307】

【表 19】

フォワード

VH1/7

oli621	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC TGG ACC TGG AGV ATC (配列番号: 254)
oli622	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC TGG ATT TGG AGG RTC (配列番号: 255)
oli623	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC TGC ACC TGG AGG ATC (配列番号: 256)
oli624	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC TGG ACC TGG AGG KTC (配列番号: 257)

10

VH2/5/6

oli618	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC ATA CTT TGT TCC ACG C (配列番号: 258)
oli619	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC ACA CTT TGC TAC ACA C (配列番号: 259)
oli620	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC T (配列番号: 260)
oli629	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GGG TCA ACC GCC ATC CTC (配列番号: 261)

20

30

【 0 3 0 8 】

【表 2 0】

VH3

oli625	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAG TTK GGR CTG AGC TGG (配列番号: 262)
oli626	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAG TTT KGG CTKAGC TGG (配列番号: 263)
oli627	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAA CTG GGG CTC CGC TGG (配列番号: 264)
oli628	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAR TTG GGG CTG WGC TGG (配列番号: 265)

10

VH4

oli617	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG AAR CAY CTG TGG TTC TTC CT (配列番号: 266)
--------	------------------------------------------------------------------------------------------

20

【 0 3 0 9】

カッパ鎖融合プライマー

【表 2 1】

リバーズ

oli552	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag ACGACAGCTC gaa gat gaa gac aga tgg tgc agc cac (配列番号: 267)	MID77
oli556	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TCGATCACGT gaa gat gaa gac aga tgg tgc agc cac (配列番号: 268)	MID42
oli603	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TACACACACT GAA GAT GAA GAC AGA TGG TGC AGC cac (配列番号: 269)	MID37
oli607	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TG TAGTGTGAT GAA GAT GAA GAC AGA TGG TGC AGC cac (配列番号: 270)	MID71

10

フォワード

20

oli630	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC ATG AGG GTS CCY GCT CAG CTC (配列番号: 271)
oli631	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAC ATG AGR GTC CTC GCT CAG CTC (配列番号: 272)
oli632	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAA GCC CCA GCD CAG CTT CTC (配列番号: 273)
oli633	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC (配列番号: 274)
oli634	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC (配列番号: 275)
oli635	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GGG TCC CAG GTT CAC CTC CTC (配列番号: 276)
oli636	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG AGG CTC CYT GCT CAG CTC CTG (配列番号: 277)

30

40

【 0 3 1 0 】

ラムダ鎖融合プライマー

【表 2 2】

リバーズ

oli604	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag CGTAGACTAG AGG GCG GGAACA GAG TGA CMG TGG (配列番号: 278)	MID21
oli605	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag CGTAGACTAG AGG GYG GGAACA GAG TGA CCG AKG (配列番号: 279)	MID21
oli608	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TCTAGCGACTAT AGG GCG GGA ACA GAG TGA CMG TGG (配列番号: 280)	MID45
oli609	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TCTAGCGACTAT AGG GYG GGA ACA GAG TGA CCG AKG (配列番号: 281)	MID45
oli553	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TAGCGCGCGCT agg gcg gga aca gag tga cMg tgg (配列番号: 282)	MID101
oli554	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag TAGCGCGCGCT agg gYg gga aca gag tga ccg aKg (配列番号: 283)	MID101
oli557	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag ATAGAGTACT agg gcg gga aca gag tga cMg tgg (配列番号: 284)	MID33
oli558	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC tcag ATAGAGTACT agg gYg gga aca gag tga ccg aKg (配列番号: 285)	MID33

10

20

30

【表 2 3】

フォワード

oli637	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG ACC TGC TCC CCT CTC CTC CTC A (配列番号: 286)	
oli638	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC GGC TTC CCT CTC CTC CTC A (配列番号: 287)	
oli639	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG TCT CCT CTC CTC CTC A (配列番号: 288)	10
oli640	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACY CCT CTC CTC CTC M (配列番号: 289)	
oli641	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG CCC TGG GCT CTG CTS CTC CTS A (配列番号: 290)	
oli642	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG CCC TGG GTC ATG CTC CTC CTG A (配列番号: 291)	20
oli643	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTT CTG T (配列番号: 292)	
oli644	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GAG AAG AAG AGG AGA CCT GGG G (配列番号: 293)	
oli645	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACC GCT CTC CTT CTG A (配列番号: 294)	
oli646	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACC GTT CTC CTC CTC G (配列番号: 295)	30
oli647	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCA TGG ATC CCT CTC TTC CTC G (配列番号: 296)	
oli648	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ATC CCT CTA CTT CTC C (配列番号: 297)	
oli649	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG AYC CCT CTC CTG CTC C (配列番号: 298)	40

【表 2 4】

oli650	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCA TGG GCC ACA CTC CTG CTC C (配列番号: 299)
oli651	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACC CCT CTC TGG CTC A (配列番号: 300)
oli652	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG GTC TCC TTC TAC CTA C (配列番号: 301)
oli653	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG ACC CCA CTC CTC CTC C (配列番号: 302)
oli654	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG GCT CCT CTG CTC CTC A (配列番号: 303)
oli655	CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC tcag ATG GCC TGG GCT CCA CTA CTT CTC A (配列番号: 304)

10

20

【 0 3 1 3 】

P C R 増幅は、Finnzyme's Phusion Hot Start II ポリメラーゼ (Thermo Scientific cat# F-540S) を用いて行い、ここで、反応混合物および条件は、以下に示すように設定した：

反応混合物：

c D N A：	2 . 5 μ L
5 × 緩衝液 G C：	5 μ L
1 0 m M d N T P 混合物：	0 . 2 5 μ L
Phusion HotStart II：	0 . 2 5 μ L
プライマー（フォワード + リバース）3 0 μ M：	0 . 2 5 μ L
水：	1 6 . 7 5 μ L

30

P C R プログラム：

ステップ 1	9 8	- 2 分
ステップ 2	9 8	- 1 0 秒
ステップ 3	6 0	- 3 0 秒
ステップ 4	7 2	- 3 0 秒
ステップ 5	ステップ 2 ~ 4 を繰り返す	
ステップ 6	7 2	- 2 分
ステップ 7	保持する	

40

【 0 3 1 4 】

各鎖について抗原特異的 B 細胞 c D N A からの十分な増幅には 5 回の余分なサイクルが必要であるため、記憶 B 細胞からまたは抗原特異的 B 細胞から生成される c D N A テンプレートを増幅するときは、それぞれ、重鎖増幅では、2 5 または 3 0 サイクル（ステップ 5 は、2 4 または 2 9 回繰り返した）、そしてカッパおよびラムダ鎖では、2 0 または 3 0 サイクル行った。任意の試薬の汚染テンプレートから任意の誤った増幅がないようにするため、各混合物について二重反復反応を設定し（重鎖については 4 つの別々の反応、そして各軽鎖については 1 つ）、ここでは、c D N A テンプレートを水と交換した。テンプレートのないこれらの陰性対照反応を、テンプレートを含むサンプルと同時に行った。P

50

ＣＲプログラム終了後、テンプレートを反応に加えたが、ｃＤＮＡが存在しないときのアンプリコン（重鎖について、およそ５４０ｂｐ、カップ鎖について、およそ４８５ｂｐそしてラムダ鎖について、およそ５１０ｂｐ）の存在について、１．５％ＴＡＥアガロースゲル上の電気泳動によって各反応物３μｌ（陰性対照を含む）を分析した。

【０３１５】

アンプリコンの精製、分析、定量化および４５４シーケンシングのための調製

ＰＣＲサンプル中の過剰のプライマーおよび／またはプライマーダイマーを除去するため、Agentcourt Ampure磁性ビーズ（Beckman Coulter cat#A63881）を製造元のプロトコール（０００３８７ｖ００１）に従って用いてアンプリコンを精製した。重鎖については、すべての４つの反応物（ＶＨ１／７、ＶＨ２／５／６、ＶＨ３、ＶＨ４）をプールし、そして１つのサンプルとして精製し、したがって、３つのアンプリコンサンプルの全体（重鎖、カップ鎖およびラムダ鎖）を、各ｃＤＮＡ増幅のために精製した。９６ウエルプレートフォーマット中の代わりに１．５ｍｌチューブに適した一般的な磁性ラックを用いて単一の１．５ｍｌマイクロチューブ中で精製を行うように、ampure精製のプロトコールを変更した。すべての体積および他の手順は、プロトコールに記載したとおりである。Ampure精製後に溶出されたアンプリコンを、次いで、高感度ＤＮＡチップ（Agilent Technologies cat# 5067-4626）を用いて製造元のプロトコールに従ってAgilent 2100 Bioanalyzerにおいて、純度および任意の汚染ＤＮＡ種の不在について分析した。

【０３１６】

アンプリコンの純度を確認したら、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit（Invitrogen cat#P7589）を用いて製造元のプロトコールに記載されたとおり蛍光光度計においてＤＮＡの濃度を定量化した。キット中に提供されたラムダＤＮＡを濃度基準として用い、それにより１００ｎｇ／ウェルから１．５６ｎｇ／ウェルまでの標準曲線を生成した。ＴＥ緩衝液中で１００倍に希釈され各アンプリコンの蛍光を２回繰り返して測定し、そして標準曲線の直線部分によりＤＮＡの濃度を決定した。すべての蛍光測定は、黒色９６ウエルプレート中で行った。蛍光値が標準曲線の直線範囲から外れている場合、直線範囲内に入る蛍光値を得るために、より大きなまたはより小さな希釈度でサンプルを再測定した。各鎖タイプの塩基対におけるおよそのサイズ（重鎖 - ５４０ｂｐ、カップ鎖 - ４８５ｂｐおよびラムダ - ５１０ｂｐ）を用い、以下の式を用いて濃度を決定した：

各アンプリコンの濃度（分子／μｌ）＝〔サンプル濃度（ｎｇ／μｌ）＊６．０２２×１０²³〕／〔６５６．６×１０⁹＊アンプリコン長（ｂｐ）〕

【０３１７】

各アンプリコンを１×１０⁷分子／μｌに標準化し、次いでＨｃ：Ｋｃ：Ｌｃの体積比３：３：１で混合し、ボルテックスし、そして最後に１：１０で希釈して１×１０⁶分子／μｌで混合物の最終濃度を得た。

【０３１８】

エマルジョンＰＣＲ増幅、ビーズ富化、ビーズ計数およびシーケンシング

エマルジョンＰＣＲは、公開された４５４プロトコール：“emPCR Amplification Method Manual - Lib-L”（編：２０１０年５月（Ｒｅｖ．２０１１年４月））に以下の変更を加えて実施した：

セクション３．１．３．ステップ２）

【０３１９】

10

20

30

40

【表 2 5】

試薬	体積 (μl)
分子生物学的グレードの水	458
添加材	515
増幅混合物	270
増幅プライマー	32
酵素混合物	70
PPiase	2
合計	1347

10

【 0 3 2 0 】

“ emPCR Amplification Method Manual - Lib-L ” のステップ 3 . 7 から、シーケンシングビーズが富化されたら、以下の設定でBeckman Coulter's Z2 Particle Counterにおいてビーズを計数した：

アパーチャー (Aperture) : < 1 0 0 μ m >
 アパーチャー K d : < 6 0 . 0 4 >
 設定された上部カットオフ : < 3 0 . 0 0 μ m >
 設定された下部カットオフ : < 1 0 . 0 0 μ m >
 計数モード : < 間 >
 計量体積 : < 0 . 5 m l >
 分解能 : < 2 5 6 >

20

【 0 3 2 1 】

ビーズの濃度は、以下のように算出した：

ビーズの濃度 = [粒子カウンターからの平均読取り値 * 4] ビーズ / μ l

【 0 3 2 2 】

全体として参照により本明細書に組み込まれた 4 5 4 シーケンシングプロトコール：“Sequencing Method Manual - GS Junior Titanium Series” - 2 0 1 0 年 5 月 (R e v . 2 0 1 0 年 6 月) に従って、4 5 4 シーケンサー (Roche) において、エマルジョン P C R からの富化ビーズをシーケンシングした。

30

【 0 3 2 3 】

I I . ペプチド断片の生成：

ヒトドナー血漿からの抗原特異的 I g G の精製

ドナー血漿単離および特異的抗原に対する反応性についてのスクリーニング。

I R B ガイドラインに従って、ヒト志願者からの全血をヘパリンチューブ中に集めた。P B M C のフィコール勾配分離 (上記のとおり) 中に、血漿サンプルを同時に集め、そして - 8 0 で保存した。さまざまな抗原に対する血漿 I g G の反応性を、E L I S A によって試験した。簡潔には、炭酸塩緩衝液中に 2 μ g / m l で溶解された 1 0 0 μ l / ウェルの抗原を用いて、高結合性 9 6 ウェルプレート (Costar cat#) を 3 7 で 2 時間または 4 で一夜コートした。プレートを P B S - T w e e n (0 . 1 %) で 3 回すすぎ、次いで、3 0 0 μ l / ウェルの P B S - T w e e n 中の 5 % 脱脂粉乳を用いて 3 7 で 1 時間ブロックした。血漿サンプルを、5 % ミルク P B S - T w e e n 中 1 / 1 0 0 、 1 / 5 0 0 および 1 / 1 0 0 0 および 1 / 2 0 0 0 で希釈し、そして各希釈 1 0 0 μ l を 9 6 ウェルプレートのブロックトウェルの二つ組に加え、そして 3 7 で 2 時間インキュベートした。プレートを 1 × P B S - T w e e n で 3 回洗浄し、そして P B S - T w e e n 中に 1 / 4 0 0 0 に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ヒト I g G 抗体 (Southern Biotech 2040-05) を各ウェル (1 0 0 μ l) に加え、そして 3 7 で 1 時間イ

40

50

ンキュベートした。プレートにPBS-Tweenで6回洗浄し、そしてTMB基質溶液 (BioFX cat#TMBW-1000-01) 50 μ l、続いて停止液 (BioFX cat# STPR1000-01) 50 μ lの添加により進めた。シグナルを450nmの光学濃度で測定した。NG-XMT法によるスクリーニングのため、血漿が1/500またはそれを超える希釈度で有意なシグナルを示したドナーを選択した。B型肝炎ウイルス小型表面抗原 (HBsAg) adwサブタイプをProspec (Rehovot, Israel, cat# HBS-872) から購入した。

【0324】

全血漿IgGからの抗原特異的IgGの精製
プロテインG精製

1. Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare cat#17-0618-05) のビーズスラリー (ビーズカラム床体積2.5ml) 5mlを重力流カラムに適用し、そして1×PBSで2回洗浄した。

10

2. ヒト血漿5mlを1×PBS 15mlで希釈して、ビーズ入りのカラムに適用し、そしてカラムを、ローテーター上、4 度で一夜、または室温で2時間インキュベートした。

3. カラムを1×PBS 20mlで4回洗浄した。

4. IgGをpH 2.7の0.1Mグリシン/HCl緩衝液20mlで溶離し、そして中和用にpH 8.5の1M Tris 1.2mlを含むチューブ中に集めた。

5. 1×PBS (pH 7.4) 10mlを、中和された溶出液に加えて高濃度のIgGに起因する沈殿を最小限にした。

6. 精製したIgGを、10kDaカットオフ透析カセット (Pierce cat#66456) 中で4リットルの1×PBSに対して2回透析した。

20

7. Nanodrop分光測色計 (Thermo Scientific) において280nmで吸光度を測定することによってIgG濃度を決定した。

アフィニティー精製

1. 製造元のプロトコールに従って、HBsAgをビオチン (Pierce Cat #20217) と結合させた。結合した抗原を1×PBS中で十分に透析した。

2. ビオチン結合抗原2mgを磁性ストレプトアビジンビーズ (Thermo Scientific cat# 8816) 5mlと共にローテーター上で、4 度で一夜または室温で2時間インキュベートした。ビーズを1×PBSで2回すすぎ、次いで、9つの1.5mlチューブに分けた。

3. ビーズに対する抗原の固定化の効率は、HBsAg Elisaによって評価し、そして一貫して80%よりも大きい結合性を示した。

30

4. 固定化抗原を含む各チューブに、単一ドナーからのプロテインG精製IgG 1mgを加え、ビーズを、ボルテックスすることによって十分に再懸濁し、そして室温で15分間回転しながらインキュベートした。

5. チューブを磁性ラック中に置き、上清を除去し、そしてビーズを1×PBS 1mlで5回洗浄した。

6. 最後の洗浄ステップ後、pH 1.8の0.1Mグリシン-HCl緩衝液0.9mlを1つのチューブに入れ、ボルテックスし、そして室温で5分間インキュベートした。5分後、第1のチューブを磁性ラック上に置き、そしてチューブ中の酸性緩衝液を取り出し、そして第2のチューブ中に入れた。9つのすべてのチューブを酸性緩衝液でインキュベートするまで、この手順を繰り返した。溶出されたIgGを、中和用のpH 8.5の1M Tris 0.14mlを含むチューブ中に最終的に集めた。

40

7. 各チューブを溶離にかけた後、ビーズを1×PBSで2回洗浄した後、プロテインG精製IgG 1mgをビーズに加えたステップからの精製を再開した。その手順を複数回繰り返してMS分析前にプロテアーゼ処理に十分な物質を生成した。

【0325】

III. 質量分析

質量分析は、上記のように実施した。簡潔には、プロテアーゼ (例えば、トリプシン) および/または化学的タンパク質切断試薬 (例えば、臭化シアン) による消化の後、ペプチドにおいて質量分析を実施した。B型肝炎ウイルス小型表面抗原に特異的に結合する抗

50

体をコードする遺伝子配列を同定するために、生成したMS2スペクトルを、遺伝物質データベース中の情報から誘導された理論MS2スペクトルと関連づけた。

【0326】

IV. モノクローナル抗体の発現および同定

24の異なる重（ガンマ）鎖可変領域クローン、20の異なるカッパ鎖可変領域クローンおよび10の異なるラムダ鎖可変領域クローンを、コンビナトリアルフォーマットで発現させ、そして抗原特異的結合活性についてスクリーニングした（表14～15を参照し、ここで、ガンマ鎖クローンは、最も左の縦の列に示し、そして軽鎖クローンは、一番上の横の行に示す）。各ガンマ鎖を、すべての軽（カッパおよびラムダ）鎖と対にして標準96ウェル組織培養プレート中でHEK293E細胞の一過性トランスフェクションによって抗体を発現させた。

10

【0327】

各ウェル中のトランスフェクトされた細胞から分泌された抗体を、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）によって、精製された組換えB型肝炎表面抗原（Prospec, Ness-Ziona, ISRAELから購入したHBsAg - a d w サブタイプ）に対する結合についてスクリーニングした。高結合性96ウェルELISAプレート（Costar-3369）を、 $2 \mu\text{g/ml}$ で炭酸塩緩衝液中に希釈された $50 \mu\text{l}$ /ウェルのHBsAgを用いて、37で2時間インキュベートすることによってコートし、次いで、リン酸塩緩衝食塩水（PBS）中の5%粉ミルク $300 \mu\text{l}$ /ウェルを用いて37で1時間インキュベートすることによってブロックした。一時的にトランスフェクトされたHEK293E細胞からの上清を、0.05% Tween 20入りのPBS（PBS-T）中の5%ミルク中で5倍に希釈し、そして希釈された上清 $50 \mu\text{l}$ を、HBsAgコーティングされたELISAプレートの各ウェルに入れた。非特異的結合を評価するため、同じ上清を、PBS中の5%ミルクのみでコーティングされたプレートにも入れた。上清の添加後、ELISAプレートを37で2時間インキュベートし、続いてPBS-T $250 \mu\text{l}$ /ウェルで3回洗浄した。抗体の任意の結合を検出するため、PBS-T中で4000倍に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）結合抗ヒトIgG（Southern Biotech） $50 \mu\text{l}$ /ウェルを、各ウェルに加え、そして37で1時間インキュベートした。プレートを、上記のように6回洗浄し、次いでHRPのための発色性基質、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン $50 \mu\text{l}$ /ウェルを加え、それを、およそ10分後に、酸 $50 \mu\text{l}$ /ウェルで中和した。酸で中和した発色性基質からのシグナルを、 450nm で吸光度（光学濃度）によって測定した。

20

30

【0328】

表14～15は、HBsAgプレートの吸光度から各ウェル中のミルクのみのプレートの吸光度を減算して得られた値を示す。以下の上清サンプルを対照として用いた（値は、各場合における2つの独立したウェルの平均である）：陽性＝抗HBsAgヒト抗体重鎖および軽鎖のトランスフェクションからの上清；陰性＝PEIのみでトランスフェクトされた細胞からの上清。陰性対照シグナルよりも10～20倍、20～40倍、そして40倍を超える大きなシグナルを有するウェルは、灰色の影を濃くして示した。30の重-軽順列は、4つのウェルの中から2つ又はそれ以上において、バックグラウンドよりも40倍を超えるHBsAgに対する強い反応性を示し、26は、バックグラウンドよりも20倍から40倍の間であり、そして18は、バックグラウンドよりも10倍から20倍の間であった（その18のうちの1つは、EVUGGガンマ鎖の組合せとして発現され、表において*で示され、そしてAKUOLラムダ鎖は、非反応性であることが後でわかった）。したがって、試験した24の異なる可変領域ガンマ鎖クローンの中で、試験した30の軽鎖クローンの少なくとも1つと対にしたときに、17がHBsAg特異的抗体を発現した。

40

【0329】

【表 2 6】

表 1 4

カッパ鎖

		GRAWI		CHUZK		EDL1N		JP5HA		DO15E		IKQES		JQ18X	
ガンマ鎖	HSP82	2.86	2.94	2.72	-0.04	-0.04	-0.06	-0.04	0.01	2.58	2.80	1.89	2.60	0.04	0.20
		2.59	2.71	0.68	0.00	0.09	0.04	-0.03	0.08	2.62	2.63	2.38	0.62	0.05	0.13
	B1RWB	0.92	0.41	0.06	0.03	2.89	3.01	0.06	0.16	0.71	0.22	0.22	-0.01	0.05	0.06
		0.07	0.05	0.03	0.01	2.83	2.85	0.08	0.09	0.04	0.02	0.00	0.33	0.03	0.05
	BD00L	0.20	0.09	1.84	1.97	0.77	0.82	1.85	2.05	0.05	0.00	1.52	1.92	1.05	1.38
		0.18	0.15	1.89	2.11	0.85	0.83	1.91	2.16	0.06	0.03	1.72	1.87	1.06	1.43
	H42OK	0.01	-0.01	0.03	0.05	0.06	0.05	0.03	-0.02	0.03	0.02	0.02	0.00	0.14	0.10
		0.02	-0.01	-0.02	0.04	0.05	0.10	0.06	0.09	-0.03	0.00	0.05	0.06	0.09	0.06
	CP4Y8	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.03	0.05	0.02	0.03	0.00	2.68	2.75
		0.04	0.06	0.04	0.04	0.06	0.06	0.05	0.07	0.04	0.04	0.02	0.03	2.71	2.60
	GBOGO	0.06	0.04	0.06	0.04	0.05	0.03	0.06	0.05	0.06	0.05	0.04	0.05	0.08	0.08
		0.13	0.06	0.04	0.07	0.05	0.08	0.08	0.06	0.05	0.05	0.06	0.04	0.03	0.17
	JJESP	0.15	0.05	0.10	0.12	0.04	0.10	0.07	0.15	0.06	0.07	0.14	0.08	0.05	0.10
		0.05	0.05	0.05	0.06	0.08	0.05	0.08	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.14	0.05
	APABY	-0.06	0.04	0.03	0.05	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.03	0.05	0.00
		0.05	0.08	0.09	0.04	0.08	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.07	0.13	0.04	0.04
	H9L3G	0.75	0.71	2.23	2.59	0.97	1.27	2.55	2.63	0.67	0.74	2.57	2.63	0.21	-0.32
		0.50	0.95	2.46	2.48	1.50	1.53	2.64	2.66	1.32	1.31	2.57	2.64	0.21	-0.42
	EZKNT	0.06	0.05	0.18	0.13	0.84	0.72	0.17	0.31	2.08	1.76	0.09	0.09	-0.38	-0.66
		0.28	0.07	0.13	0.10	0.80	1.05	0.14	0.18	2.06	1.97	0.17	0.18	-0.69	-0.56
	A9F9Q	2.60	2.47	0.23	0.10	0.05	0.07	0.11	0.25	3.01	2.90	0.08	0.17	-0.46	-0.69
		2.57	2.62	0.15	0.05	0.06	0.04	0.06	0.29	2.72	2.79	0.06	0.13	-0.42	-0.80
	JXGB9	0.11	0.24	0.05	0.05	0.03	0.07	0.06	0.05	0.24	0.43	0.06	0.01	-1.11	-0.99
		-0.04	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.06	0.05	0.06	0.03	-0.25	-0.80
	JD1J9	-0.17	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.01	-0.02	-0.17	-0.01
		0.01	0.03	0.04	0.02	0.05	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.00	0.00	-0.07	0.01
	A6TR9	0.01	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.02	0.05	-0.02	0.02
		0.03	0.02	0.02	0.03	0.05	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02
	EOZ2F	0.05	0.04	0.03	0.03	0.05	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.05	0.01	0.01	0.03
		0.06	0.06	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.04	0.03	0.05	0.05	0.03	-0.04	0.03
	A5NDH	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.02	0.00	0.02
		0.15	0.04	0.03	0.06	0.05	0.14	0.03	0.05	0.08	0.04	0.08	0.05	0.02	0.02
	G7MQM	0.16	0.11	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.18	0.24	0.00	-0.01	0.02	0.10
		0.22	0.24	0.04	0.06	0.08	0.07	0.05	0.06	0.78	0.63	0.02	0.00	-0.03	0.06
	IJOR6	0.02	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.03	0.05	0.05	0.04	0.01	0.05	0.06
		0.05	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.02	-0.01	0.01
	D4LT2	0.06	0.06	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.05	0.03	-0.01	0.00	0.06
		0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.07	0.05	0.05	0.06	0.04	0.02	-0.05	0.02
	EVUGG	0.06	0.05	0.04	0.06	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03	0.03	0.17
		0.03	0.00	0.04	0.03	0.03	0.02	0.05	0.02	0.04	0.04	0.06	0.04	0.03	0.01
	DUIFV	-0.01	0.04	0.01	0.04	0.05	0.03	0.04	0.02	0.03	-0.01	-0.01	-0.04	-0.04	-0.02
		0.01	0.03	0.03	0.03	0.05	-0.03	0.02	0.03	0.02	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.04
	DTF5S	0.03	0.05	0.04	0.04	0.26	0.20	0.03	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.02	0.04
		0.03	0.03	0.03	0.03	0.25	0.20	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.00	0.02	0.04
	DZ3YC	0.04	0.05	0.02	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.04	0.05	0.01	-0.02	0.05
		0.10	0.03	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.04	0.03	0.04	0.05	-0.02	0.06	0.08
	CIZNS	0.04	0.04	0.03	0.03	0.02	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.01	0.02	0.02	0.05
		0.05	0.05	0.03	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.07	0.07	0.08	-0.01	0.01	0.03
		GRAWI		CHUZK		EDL1N		JP5HA		DO15E		IKQES		JQ18X	

カッパ鎖

【表 2 7】

表 1 4 (続き)

		HRONB		BAHZA		HSHZE		H6RCI		FPWBB		HHFLL		CRY2A	
ガンマ鎖	HSP82	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.02	0.01	0.00	-0.03	0.10	0.03	0.09	0.07
		0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	-0.06	0.13	0.04	0.09	0.06
	B1RWB	0.04	0.03	0.04	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.04	0.04	0.06
		0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.09	0.07	0.03	-0.02	-0.02	0.03	0.04	0.05
	BD00L	1.18	1.06	0.81	1.04	1.52	1.46	2.58	2.53	0.11	0.05	0.61	1.91	1.63	1.86
		2.06	1.51	0.59	0.95	2.01	2.05	2.65	2.68	0.15	0.00	0.57	1.79	1.98	2.07
	H42OK	2.68	2.64	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.05
		2.46	2.39	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
	CP4Y8	0.09	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04	0.02	0.00	0.01	-0.01	0.01	0.03	0.03	0.04
		0.19	0.14	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01	0.04
	GBOGO	2.23	2.36	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.00	0.03	0.02	0.05	0.05
		0.21	0.16	0.03	0.03	0.03	0.05	0.02	0.03	0.02	-0.01	0.01	0.01	0.03	0.05
	JJESP	0.07	0.08	0.03	0.02	0.03	0.03	0.05	0.06	0.03	0.00	0.03	0.06	1.96	1.97
		0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.01	0.01	0.05	2.44	2.50
	APABY	0.03	0.03	0.02	0.04	0.04	0.04	0.03	0.02	0.03	-0.03	0.01	0.09	0.15	0.12
		0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.01	0.03	0.03	-0.03	0.01	0.01	0.07
	H9L3G	-0.33	0.38	-0.11	0.20	0.37	0.35	2.34	2.44	0.27	0.16	0.19	0.27	0.12	0.15
		0.75	0.75	0.38	0.73	0.84	0.95	2.41	2.38	0.46	0.40	0.25	0.58	0.40	0.47
	EZKNT	0.33	0.33	-0.06	0.05	0.05	0.03	0.35	0.30	0.01	0.00	0.01	0.03	1.21	0.85
		0.44	0.73	0.02	0.04	0.03	0.02	0.20	0.26	0.02	-0.01	-0.01	0.04	1.38	1.07
	A9F9Q	-0.30	-0.18	0.03	0.02	0.03	0.03	0.07	0.07	0.00	0.01	0.04	0.04	0.02	0.06
		-0.38	-0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.02	0.03	-0.01	0.08	0.05	0.04	0.04
	JXGB9	-0.94	0.01	-0.05	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.00	-0.01	-0.01	0.02	0.00	0.04
		-0.02	0.03	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	-0.01	-0.08	-0.04	0.00	0.01	-0.01
	JD1J9	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	-0.02	-0.05	0.03	0.00	0.03	0.04
		-0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	-0.01	-0.04	-0.01	0.01	0.03	0.04
	A6TR9	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	0.04
		0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.03
	EO22F	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.02	0.02	0.04	0.03	0.06
		0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.04	0.04	0.02	0.02
	A5NDH	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.00	-0.04	0.03	0.02	0.02	0.04
		-0.02	-0.04	0.00	-0.16	-0.18	-0.26	-0.08	0.02	-0.02	-0.04	-0.02	0.01	0.00	0.03
	G7MQM	0.03	0.05	0.11	0.09	0.61	0.45	0.18	0.28	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04
		0.05	0.07	0.13	0.25	0.89	0.52	0.59	0.60	0.02	0.03	0.04	0.08	0.03	0.04
	IJOR6	0.06	0.06	0.03	0.04	0.01	0.02	0.05	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04
		-0.05	0.00	-0.01	-0.01	0.01	-0.01	0.04	0.00	-0.02	0.04	0.00	0.06	0.05	0.02
	D4LT2	0.00	0.04	0.03	0.04	-0.02	0.00	0.04	0.03	0.02	0.00	0.00	0.06	0.03	0.05
		0.00	0.01	0.05	0.00	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.02	0.03	0.02	0.03
	EVUGG	0.04	0.06	0.04	0.07	0.04	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	-0.01	-0.02	0.00	0.05
		0.00	-0.01	0.03	-0.04	0.03	0.00	0.02	0.01	0.04	0.03	-0.04	0.00	0.01	0.03
	DUIFV	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	0.05	0.08	0.09	-0.03	0.02	0.03	0.04
		0.04	0.05	0.06	0.08	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.06	0.00	0.01	0.02	0.04
	DTF5S	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.07	0.06	0.06	0.04	0.02	0.06	0.10	0.03
		0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.07	0.05	0.06	0.04	0.03	-0.02	0.01	0.06	0.04
	DZ3YC	0.03	0.04	0.00	0.04	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.02	0.08	0.04	0.05
		0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.06	0.06	0.04	0.04	-0.01	0.01	0.04	0.04
	CIZNS	0.02	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	-0.01	0.00	0.01	0.04
		0.03	0.02	0.02	0.05	0.03	0.03	0.03	0.02	0.06	0.11	-0.03	0.01	0.02	0.02

カップ鎖

【表 2 8】

表 1 4 (続き)

		ARW3R		GRBL0		JAVSR		BLP3K		AEJTS		GO0Z5	
ガンマ鎖	HSP82	0.05	0.04	0.06	0.05	0.09	0.05	0.02	0.01	-0.02	0.01	0.00	0.00
		0.06	0.00	0.06	0.07	0.06	0.07	0.05	0.08	0.02	0.00	0.02	0.04
	B1RWB	0.03	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.06	0.10	-0.02	0.02	0.21	0.18
		0.03	0.08	0.09	0.17	0.06	0.07	0.06	0.08	0.01	0.12	0.08	0.18
	BD00L	2.11	2.38	2.59	2.69	2.50	2.58	0.66	0.38	0.21	0.86	0.95	0.60
		1.95	2.12	2.53	2.61	2.53	2.38	0.49	0.42	0.14	0.63	0.91	0.35
	H42OK	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05	0.04	0.05	0.05	-0.01	0.00	0.13	0.03
		0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	-0.11	0.00	0.01	0.03
	CP4Y8	0.05	0.01	0.06	0.05	0.06	0.03	0.04	0.04	-0.02	-0.02	0.00	0.01
		0.04	0.05	0.08	0.05	0.05	0.06	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.01	0.01
	GBOGO	0.06	0.00	0.06	0.07	0.08	0.08	0.06	0.06	-0.03	0.00	0.00	0.01
		0.03	0.05	0.07	0.08	0.06	0.07	0.06	0.06	0.00	0.03	0.01	0.01
	JJESP	0.04	0.06	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.05	-0.01	0.04	0.01	0.04
		0.08	0.07	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.03	-0.01	0.02	0.12	0.03
	APABY	0.05	0.07	0.06	0.05	0.01	0.06	0.07	0.03	0.00	-0.01	0.00	0.04
		0.04	0.02	0.00	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.04	0.03	-0.04	-0.03	0.01
	H9L3G	0.30	0.58	2.22	2.39	0.36	0.51	0.04	-0.05	0.09	0.17	0.20	0.28
		0.80	1.11	2.41	2.65	1.01	1.14	0.08	0.05	0.16	0.14	0.49	0.44
	EZKNT	0.04	0.05	0.25	0.61	0.07	0.09	0.07	0.31	0.07	0.08	0.07	0.07
		0.03	0.03	0.30	0.42	0.05	0.06	0.04	0.05	0.23	0.20	0.16	0.17
	A9F9Q	0.04	0.05	0.12	0.14	0.05	0.09	0.06	0.05	0.13	0.09	0.09	0.10
		0.06	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.05	0.03	0.16	0.12	0.12	0.11
	JXGB9	0.04	0.03	0.05	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.19	0.10	0.09	0.22
		0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.07	0.13	0.06	0.07	0.08
	JD1J9	0.03	0.05	0.05	0.32	0.07	0.06	0.04	0.02	0.01	0.05	0.02	-0.02
		0.03	0.03	0.06	0.40	0.02	0.06	0.03	0.01	0.03	0.04	0.04	0.04
	A6TR9	0.03	0.03	0.04	0.05	0.07	0.12	0.05	0.03	0.17	0.04	0.05	0.01
		0.02	0.01	0.05	0.06	0.05	0.07	0.05	0.04	0.04	0.06	0.05	0.07
	EOZ2F	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04	0.06
		0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	-0.02	0.03	0.04	0.05
	A5NDH	0.04	0.04	0.07	0.29	0.04	0.06	0.07	0.07	0.04	0.03	0.08	0.06
		0.02	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.04	0.05	0.00	-0.03	0.22	0.54
	G7MQM	0.06	0.12	0.06	0.07	0.07	0.07	0.04	0.02	0.04	0.10	2.56	2.50
		0.05	0.09	0.04	0.04	0.06	0.07	0.03	0.00	0.09	0.62	2.49	2.88
	IJOR6	0.04	0.05	0.05	0.04	0.07	0.08	0.03	0.02	0.03	0.03	0.09	0.15
		0.03	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.03	0.04	0.05	0.08
	D4LT2	0.05	0.06	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
		0.04	0.04	0.05	0.04	0.06	0.05	0.04	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04
	EVUGG	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04
		0.01	-0.01	-0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05
	DUIFV	0.03	0.06	0.04	0.05	0.04	0.04	0.02	0.02	0.00	0.03	0.03	0.03
		0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.01	0.02	0.04	0.02	0.02
	DTF5S	0.04	0.04	0.05	0.04	0.06	0.03	0.04	0.02	0.01	0.05	0.03	0.04
		0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03
	DZ3YC	0.03	0.04	0.06	0.05	0.05	0.06	0.04	0.04	0.03	0.05	0.06	0.05
		0.03	0.04	0.03	0.05	0.04	0.05	0.04	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04
	CIZNS	0.01	0.03	0.05	0.04	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03
		0.02	0.02	0.05	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03
		ARW3R		GRBL0		JAVSR		BLP3K		AEJTS		GO0Z5	

カップ鎖

【表 2 9】

表 1 5

ラムダ鎖																		
HERFZ	ECGVK	FQB4M	D58PK	G09XX	CB8FM	GRBRE	FSK3G	AKUOL	DPIJC									
-0.01	0.01	0.03	0.06	0.01	0.01	-0.04	0.02	-0.02	0.03	0.02	-0.02	0.03	0.03	1.16	0.19	0.00	-0.02	
0.04	0.02	0.04	0.05	0.02	0.04	-0.01	-0.01	0.01	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.06	0.57	0.07	0.01
0.03	0.17	0.08	0.07	0.13	0.04	0.06	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.08	0.12	0.04
0.02	0.14	0.04	0.07	0.01	0.04	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.28	0.10	0.03
0.15	0.27	0.91	1.05	0.09	0.31	0.23	0.11	0.04	0.09	0.18	0.17	0.98	0.03	0.39	0.36	0.38	0.28	0.05
0.26	0.21	1.28	1.45	0.28	0.25	0.25	0.13	0.04	0.14	0.29	0.09	0.64	0.01	0.26	0.72	0.28	0.12	0.05
0.26	0.04	0.08	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.06	0.03	0.05	0.01	0.04	0.04	0.03	0.23	0.08	0.02
0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	-0.01	0.00	0.02	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02	0.04	0.04	0.99	0.35	0.03
0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.11	0.01	0.00	0.04	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.45	0.00
0.01	0.06	0.02	0.01	0.02	0.06	0.04	0.07	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.05	0.04	0.18	0.01
0.02	0.01	0.01	0.04	0.04	0.02	0.00	0.00	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.11	0.02
-0.01	0.01	0.23	0.00	0.04	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.03	0.03	0.08	0.04	0.04	0.04	0.06	0.14	0.02
0.05	0.05	0.04	0.08	0.02	0.04	0.02	0.01	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.06	0.09	0.08	0.04
0.06	0.03	0.85	0.26	0.02	0.04	0.02	0.00	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.04	0.11	0.03
0.02	0.02	2.51	2.77	0.02	0.03	0.02	0.02	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02	0.27	0.02	0.01	0.08	0.35	-0.01
0.00	0.05	2.82	2.84	-0.01	-0.01	-0.03	0.03	-0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.00	0.06	0.17	0.04
0.19	0.34	0.25	0.20	0.13	0.15	0.09	0.07	0.02	0.04	0.08	0.14	0.08	0.11	0.08	0.06	0.13	0.16	0.01
0.27	1.02	0.56	0.37	0.15	0.14	0.18	0.16	0.05	0.12	0.48	0.44	0.31	0.32	0.22	0.22	0.57	0.48	0.04
2.65	2.73	1.72	1.59	1.82	2.00	0.12	0.09	2.51	2.69	0.04	0.03	0.05	0.05	2.25	2.24	1.32	0.99	0.07
2.64	2.85	1.88	1.98	1.94	2.33	0.08	0.11	2.09	2.71	0.03	0.03	0.04	0.04	1.61	2.14	0.72	0.74	0.04
0.19	0.13	0.13	0.09	0.11	0.09	0.13	0.14	0.04	0.04	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.04	0.16	0.14	0.03
0.11	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11	0.11	0.15	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.28	0.09	0.02
0.15	0.13	0.10	0.09	0.05	0.07	0.11	0.10	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.08	0.49	0.02
0.08	0.11	0.09	0.15	0.08	0.06	0.06	0.13	0.07	0.05	0.01	0.05	0.04	0.05	0.04	0.02	0.10	0.18	0.07
0.09	0.01	0.05	0.05	0.08	0.04	0.10	0.05	0.08	0.07	0.07	0.06	0.02	0.03	0.45	0.23	2.82	2.67	0.07
0.06	0.04	0.04	0.04	0.49	0.10	0.02	0.02	0.35	0.38	0.10	0.42	0.03	0.03	0.25	0.82	2.78	2.62	0.09
0.06	0.05	0.04	0.06	1.88	1.83	0.10	0.06	2.50	2.51	2.43	2.49	0.04	0.09	2.54	2.62	2.12	2.30	0.06
0.06	0.03	0.01	0.06	1.69	1.79	0.04	0.02	2.32	2.44	2.46	2.43	0.05	0.02	2.48	2.65	0.57	0.45	0.25
0.03	0.06	0.07	0.12	0.04	0.11	0.06	0.01	0.33	0.08	0.04	0.03	0.02	0.02	0.41	0.19	0.12	0.15	2.38
0.04	0.03	0.07	0.10	0.06	0.07	0.07	0.04	0.07	0.05	0.04	0.03	0.01	0.01	0.04	0.07	1.68	2.10	2.52
0.06	0.06	0.07	0.09	0.07	0.03	0.02	0.01	0.28	0.08	0.09	0.09	0.06	0.03	0.41	0.43	2.73	2.74	0.05
0.09	0.14	0.17	0.18	0.10	0.12	0.06	0.06	0.14	0.12	0.09	0.14	0.04	0.03	0.30	0.36	2.49	1.57	0.03
0.04	0.04	0.13	0.15	0.08	0.03	0.72	0.56	0.05	0.21	0.05	0.08	0.03	0.03	1.47	1.37	0.35	0.21	0.01
0.86	0.91	1.73	1.87	0.81	1.18	1.77	1.21	0.29	0.19	0.11	0.12	0.04	0.03	1.90	2.02	0.72	0.23	0.01
0.05	0.03	0.05	0.07	2.28	2.21	0.05	0.00	2.29	2.68	2.39	2.49	0.31	0.04	2.28	2.42	0.65	0.37	0.02
0.04	0.02	0.07	0.09	2.20	2.25	0.08	0.03	2.25	2.67	2.44	2.53	0.03	0.03	2.14	2.31	0.72	0.26	0.02
0.05	0.04	0.06	0.07	0.04	0.04	2.66	2.73	0.08	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.19	0.26	0.37	0.23	0.02
0.04	0.01	0.08	0.04	0.03	0.03	2.84	2.69	0.00	0.01	0.03	0.03	0.03	0.04	0.12	0.31	0.40	0.28	0.03
0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	0.06	0.05	0.01	0.02	0.04	0.03	0.03	0.02	0.04	0.13	0.35	0.52	0.44	0.05
0.04	0.05	0.05	0.04	0.10	0.03	0.05	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00	-0.01	0.05	0.18	0.49	0.84	0.81	0.02
0.05	0.04	0.11	0.07	0.05	-0.01	-0.06	-0.11	-0.02	0.03	-0.01	-0.02	0.06	0.09	0.07	0.08	0.29	0.09	0.03
0.05	0.05	0.04	0.05	0.03	0.02	-0.01	-0.05	-0.01	-0.04	0.00	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.09	0.11	0.02
0.04	0.03	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04	-0.01	0.02	0.03	0.03	0.05	0.07	0.07	0.03	0.10	0.17	0.39	0.07
0.06	0.04	0.05	0.08	0.04	0.03	0.02	-0.10	0.00	0.07	0.03	0.05	0.03	0.06	0.05	0.07	0.11	0.11	0.04
0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.03	-0.05	0.00	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07	0.12	0.11	0.02
0.04	0.06	0.10	0.09	0.04	0.04	0.01	-0.01	0.07	0.05	0.04	0.05	0.04	0.06	0.05	0.07	0.32	0.17	0.05
0.01	0.03	0.06	0.03	0.02	0.02	-0.06	0.05	0.05	0.04	0.03	0.04	0.07	0.06	0.08	0.20	0.14	0.05	0.02
0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.04	0.06	0.00	0.01	0.06	0.04	0.02	0.02	0.05	0.05	0.08	0.41	0.31	0.05
HERFZ	ECGVK	FQB4M	D58PK	G09XX	CB8FM	GRBRE	FSK3G	AKUOL	DPIJC	ラムダ鎖								

ガンマ鎖

10

20

30

対照	
陽性	3.176
陰性	0.059

10-20x 陰性
20-40x 陰性
>40x 陰性

40

【0 3 3 3】

実施例 9

本実施例では、ヒト対象に興味の抗原を含むワクチンを投与し、そしてワクチン接種（週 0）前、次いで週 1 および 2 に血液サンプルを採取する。その後のサンプルは、週 5 2 まで 4 週間隔で採取する。P B M C を実施例 8 に記載したように単離し、そしてウシ胎児血清中の 2 0 % D M S O 中に低温保存するか、または B 細胞単離のために直ちに処理する。質量分析によって後で分析するため、血漿サンプルを - 8 0 で保存する。各サンプルについて、P B M C および血漿を下記のように処理してワクチン接種後の時間にわたって抗原特異的抗体集団を評価する。

【0 3 3 4】

50

I . 核酸配列の生成。

抗原特異的、記憶および全 B 細胞単離および R N A 精製

B 細胞単離のため、陰性選択法を用い、Invitrogen's Dynabeads Untouched B-cell Isolationキット (Invitrogen cat#113-51D) を用いて製造元のプロトコールに従って P B M C からすべての非 B 細胞を除去する。生成した非標識 B 細胞集団をさらに処理して抗原特異的または記憶 B 細胞のいずれか単離する。

【 0 3 3 5 】

抗原特異的 B 細胞単離については、ストレプトアビジン磁性ビーズ (Pierce-Thermo Scientific cat#88816) 上に固定化されたビオチン化抗原を用いて、全非標識 B 細胞をローター上、室温 で 2 0 分間インキュベートする。次いで、任意の抗原結合性 B 細胞を含むビーズを 1 × P B S で 2 回洗浄する。次いで、洗浄したビーズを、R N A 単離のために Qiagen's RNeasyキット R L T 溶解緩衝液 (1 % -メルカプトエタノールで補充された) 中に再懸濁する。

【 0 3 3 6 】

記憶 B 細胞単離については、C D 2 7 + および表面 I g G + 細胞単離のための Miltenyi's MACSキット (Miltenyi Biotec (Auburn, CA) cat#130-051-601 および 130-047-501) を用いて、全非標識 B 細胞から C D 2 7 + および表面 I g G + 細胞を単離する。C D 2 7 + および s I g G + B 細胞を同時に単離するには、両方の細胞表面マーカーに対する磁性ビーズ結合抗体をインキュベーションステップ中に同時に加える。精製したら、記憶 B 細胞を 3 0 0 × g で 1 0 分間遠沈させ、次いで、R N A 単離のために上記のような R N A 用の R L T 緩衝液中に溶解する。

【 0 3 3 7 】

Qiagen's RNeasyキット (Qiagen cat# 74104) を用いて製造元のプロトコールに従って、選択された細胞から R N A を精製する。D N a s e I 消化ステップを組み込むことによって、カラム上の D N a s e I 処理を実施して汚染ゲノム D N A を除去する。R W 1 緩衝液洗浄後、R D D 緩衝液中に希釈された D N a s e I (Qiagen cat# 79254) を R N A 精製カラムに適用し、そして室温で 2 0 分間インキュベートする。次いで、カラムを R W 1 緩衝液でさらに 1 回洗浄し、続いて R P E 緩衝液で 2 回洗浄し、そして R N A を水 3 0 μ l または 5 0 μ l で溶離する。波長 4 5 0 n m で Nanodrop 分光光度計 (Thermo Scientific) において測定された吸光度によって R N A の濃度を決定する。

【 0 3 3 8 】

P C R によるアンプリコンの c D N A 合成および生成

記憶または抗原特異的 B 細胞から単離された R N A を、まず、実施例 8 に記載したように逆転写する。シーケンシングのための重鎖、カップ鎖およびラムダ鎖可変領域のアンプリコンを、以下のように P C R によって生成する。重鎖の増幅では、B 細胞プール中の V H 遺伝子転写頻度 (transcript frequency) の天然分布 (natural distribution) を保存するため、実施例 8 に記載されたプライマーを用いて、各 c D N A サンプルについて 4 つの独立した反応 (それぞれ V H 1 および 7 ; V H 2、5 および 6 ; V H 3 ; ならびに V H 4 の遺伝子ファミリーに特異的なもの) を行う。カップ鎖およびラムダ鎖増幅では、各鎖について 1 つの反応を、各 c D N A サンプルについて行う。各反応では、フォワードプライマーの等モル混合物を、同濃度の以下に示すリバースプライマーと共に用いる。増幅は、L i b - L プラットフォームによる 4 5 4 シーケンシングに適合しうる融合プライマー (Roche) を用いて実施する。各鎖の定常領域の 5 ' 末端にハイブリダイズするようにリバースプライマーを設計する。これらのプライマーは、シーケンシングの読み取りが、各定常領域 (リバースセンス) の先端の 5 ' 末端から可変領域の 3 ' 末端に開始されるように、L i b - L プライマー B および M I D 配列を含む。重鎖およびカップ鎖では、各 M I D について 1 つのリバースプライマーを用いるが、ラムダ鎖では、各 M I D について 2 つの異なるリバースプライマーが必要である。

【 0 3 3 9 】

P C R 増幅は、Finnzyme's Phusion Hot Start II ポリメラーゼ (Thermo Scientific c

10

20

30

40

50

at# F-540S)を用いて実施し、ここで、反応混合物および条件は、実施例8に記載したとおり設定する。

【0340】

任意の試薬の汚染テンプレートから任意の誤った増幅がないようにするため、各混合物について二重反復反応を設定し(重鎖については4つの別々の反応、そして各軽鎖については1つ)、ここでは、cDNAテンプレートを水と交換する。テンプレートのないこれらの陰性対照反応を、テンプレートを含むサンプルと同時にを行う。PCRプログラム終了後、テンプレートを反応に加えるが、cDNAが存在しないときのアンプリコン(重鎖について、およそ540bp、カップ鎖について、およそ485bpそしてラムダ鎖について、およそ510bp)の存在について、1.5%TAEアガロースゲル上の電気泳動によって各反応物3μl(陰性対照を含む)を分析する。

10

【0341】

シーケンシング中に抗体鎖の同種の対形成を保存するため、単離したB細胞を、単細胞微液滴カプセル化(single-cell microdroplet encapsulation)(Raindance Technologies, Inc., Lexington, MA)を用いて単細胞カプセル化にかける。カプセル化されたB細胞を、次いで増幅プライマーを用いて単細胞RT-PCR試薬(Cat # 210210としてQiagenによって販売された試薬)と融合させて、各単一B細胞からの結合した重鎖および軽鎖PCR生成物を生成する。下流シーケンシングを通して抗体鎖対の保存のために、オーバーラップPCR(Meijer P.J. et al., J. Mol. Biol. 358(3):764-72, 2006)を用いて重鎖および軽鎖PCR生成物を1つのDNAにつなぎ合わせる。

20

【0342】

アンプリコン精製、分析、定量化、および454シーケンシングのための調製

PCRサンプル中の過剰のプライマーおよび/またはプライマーダイマーを除去するため、Agentcourt Ampure磁性ビーズ(Beckman Coulter cat#A63881)を製造元のプロトコール(000387v001)に従って用いてアンプリコンを精製する。重鎖については、すべての4つの反応物(VH1/7、VH2/5/6、VH3、VH4)をプールし、そして1つのサンプルとして精製し、したがって、3つのアンプリコンサンプルの全体(重鎖、カップ鎖およびラムダ鎖)を、各cDNA増幅のために精製した。96ウエルプレートフォーマット中の代わりに1.5mlチューブに適した一般的な磁性ラックを用いて単一の1.5mlマイクロチューブ中で精製を行うように、ampure精製のプロトコールを変更する。すべての体積および他の手順は、プロトコールに記載したとおりである。Ampure精製後に溶出されたアンプリコンを、次いで、高感度DNAチップ(Agilent Technologies cat# 5067-4626)を用いて製造元のプロトコールに従ってAgilent 2100 Bioanalyzerにおいて、純度および任意の汚染DNA種の不在について分析する。

30

【0343】

アンプリコンの純度を確認したら、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(Invitrogen cat#P7589)を用いて製造元のプロトコールに記載されたとおり蛍光光度計においてDNAの濃度を定量化する。キット中に提供されたラムダDNAを濃度基準として用い、それにより100ng/ウェルから1.56ng/ウェルまでの標準曲線を生成する。TE緩衝液中で100倍に希釈され各アンプリコンの蛍光を2回繰り返して測定し、そして標準曲線の直線部分によりDNAの濃度を決定する。すべての蛍光測定は、黒色96ウエルプレート中で行う。各鎖タイプの塩基対におけるおよそのサイズ(重-540bp、カップ-485bpおよびラムダ-510bp)を用い、以下の式を用いて濃度を決定する：

40

各アンプリコンの濃度(分子/μl)=[サンプル濃度(ng/μl)*6.022×10²³]/[656.6×10⁹*アンプリコン長(bp)]

【0344】

各アンプリコンを1×10⁷分子/μlに標準化し、次いでHc:Kc:Lcの体積比3:3:1で混合し、ボルテックスし、そして最後に1:10で希釈して1×10⁶分子/μlで混合物の最終濃度を得る。

【0345】

50

エマルジョンPCR増幅、ビーズ富化、ビーズ計数およびシーケンシング

エマルジョンPCRは、公開された454プロトコール：“emPCR Amplification Method Manual - Lib-L”（編：2010年5月（Rev. 2011年4月））に、実施例8に記載された変更を加えて実施する。

【0346】

“emPCR Amplification Method Manual - Lib-L”のステップ3.7から、シーケンシングビーズが富化されたら、Beckman Coulter's Z2 Particle Counterにおいてビーズを計数し、そしてビーズの濃度を以下のように算出する：

ビーズの濃度 = [粒子カウンターから平均読取り値 * 4] ビーズ / μ l

【0347】

全体として参照により本明細書に組み込まれた454シーケンシングプロトコール：“Sequencing Method Manual - GS Junior Titanium Series” - 2010年5月（Rev. 2010年6月）に従って、454シーケンサー（Roche）において、エマルジョンPCRからの富化ビーズをシーケンシングする。

【0348】

II. ペプチド断片の生成：

ヒトドナー血漿からの抗原特異的IgGの精製

抗原に対する反応性についてのスクリーニング。

さまざまな抗原に対する血漿IgGの反応性を、ELISAによって試験する。簡潔には、炭酸塩緩衝液中に2 μ g / mlで溶解された100 μ l / ウェルの抗原を用いて、高結合性96ウェルプレート（Costar cat#）を37 で2時間または4 で一夜コートする。プレートをPBS - Tween（0.1%）で3回すすぎ、次いで、300 μ l / ウェルのPBS - Tween中の5%脱脂粉乳を用いて37 で1時間ブロックする。血漿サンプルを、5%ミルクPBS - Tween中1 / 100、1 / 500および1 / 1000および1 / 2000で希釈し、そして各希釈100 μ lを96ウェルプレートのブロックウェルの二つ組に加え、そして37 で2時間インキュベートする。プレートを1 x PBS - TWEENで3回洗浄し、そしてPBS - Tween中に1 / 4000に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体（Southern Biotech 2040-05）を各ウェル（100 μ l）に加え、そして37 で1時間インキュベートする。プレートをPBS - Tweenで6回洗浄し、そしてTMB基質溶液（BioFX cat#TMBW-1000-01）50 μ l、続いて停止液（BioFX cat# STPR1000-01）50 μ lの添加により進める。シグナルを450 nmの光学濃度で測定する。血清力価は、一般にワクチン接種後に時間と共に高まることが観測される。

【0349】

全血漿IgGからの抗原特異的IgGの精製

実施例8に記載したプロテインGを用いて、各血清サンプルから全IgGを精製する。精製したIgGを、10 kDaカットオフ透析カセット（Pierce cat#66456）中で1 x PBS 4リットルに対して2回透析し、そしてNanodrop分光測色計（Thermo Scientific）において280 nmで吸光度を測定することによってIgG濃度を決定する。次いで、実施例8に記載する抗原に結合されたビーズを用いてプロテインG精製IgGをアフィニティー精製する。各サンプルからのアフィニティー精製された抗体を質量分析のために集める。

【0350】

III. 質量分析

質量分析は、上記のように実施する。簡潔には、プロテアーゼ（例えば、トリプシン）および/または化学的タンパク質切断試薬（例えば、臭化シアン）による消化の後、ペプチドにおいて質量分析を実施する。興味のある抗原に特異的に結合する抗体をコードする遺伝子配列を同定するために、生成したMS2スペクトルを、遺伝物質データベース中の情報から誘導された理論MS2スペクトルと関連づける。サンプル中の抗体の配列を決定することによって、ワクチン接種後の複数の時点で対象における抗原特異的抗体集団の組成を

10

20

30

40

50

決定する。

【0351】

実施例 10

本実施例は、ヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニック動物を用いた抗原特異的ヒト抗体の作製を記載する。

XENOMOUSE 系統 XMG1 - k1 マウス (Amgen, Thousand Oaks, CA) は、その内因性マウス抗体機構を不活性化しており、そしてヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座を含む (Jakobovits et al., 2007, Nature Biotechnol., 25:1134-43)。これらのマウスは、完全ヒト IgG1 および IgG1 抗体を産生する。マウスを興味のあるヒト抗原で免疫化し、そして以下の方法を用いて遺伝物質データベースおよびペプチドデータベースを生成させる。

【0352】

I. 遺伝物質データベース:

細胞単離。

シリンジおよび 21 G ニードルを用いて、免疫化マウスからの脾臓を 5 mL の RPMI / 10 % FCS で 5 回フラッシュする。細胞を 90 % FCS / 10 % DMSO 中で凍結させる。合計 $50 \sim 100 \times 10^6$ 細胞を、各脾臓から単離する。

【0353】

RNA 単離および cDNA 合成。

QIAshredder (Qiagen cat#79654) および RNeasy ミニキット (Qiagen, Hilden, Germany; cat#74104) を用いて製造元のプロトコールに従って脾細胞から全 RNA を単離する。標準次世代シーケンシングプロトコールに従ってカラム上で RNA を DNase 処理する。ND - 1000 分光光度計 (NanoDrop; Thermo Scientific, Wilmington, DE から商業的に入手可能) を用いて全 RNA 濃度を測定する。

【0354】

単離した RNA を、Thermoscript RT-PCR システム (Invitrogen (Life Technologies の一部), Carlsbad, CA cat#11146-024) を用いて逆転写による一本鎖 cDNA 合成に用いる。1.5 μ g の RNA およびオリゴ dT プライマーを用いて製造元のプロトコールに従って cDNA を合成する。

【0355】

V_H および V_L 増幅。

シーケンシングのための重鎖、カッパ鎖およびラムダ鎖可変領域のアンプリコンを、実施例 8 に記載したようにヒト抗体配列に特異的なプライマーを用いて PCR によって生成する。重鎖の増幅では、B 細胞プール中の V_H 遺伝子転写頻度 (transcript frequency) の天然分布 (natural distribution) を保存するため、各 cDNA サンプルについて 4 つの独立した反応 (それぞれ V_H1 および 7; V_H2 , 5 および 6; V_H3 ; ならびに V_H4 の遺伝子ファミリーに特異的なもの) を行う。カッパ鎖およびラムダ鎖増幅では、各鎖について 1 つの反応を、各 cDNA サンプルについて行う。各反応では、フォワードプライマーの等モル混合物を、同濃度の以下に示すリバースプライマーと共に用いる。増幅は、Lib-L プラットフォームによる 454 シーケンシングに適合しうる融合プライマー (Roche) を用いて実施する。各鎖の定常領域の 5' 末端にハイブリダイズするようにリバースプライマーを設計する。これらのプライマーは、シーケンシングの読み取りが、各定常領域 (リバースセンス) の先端の 5' 末端から可変領域の 3' 末端に開始されるように、Lib-L プライマー B および MID 配列を含む。重鎖およびカッパ鎖では、各 MID について 1 つのリバースプライマーを用いるが、ラムダ鎖では、各 MID について 2 つの異なるリバースプライマーが必要である。

【0356】

PCR 増幅は、Finnzyme's Phusion Hot Start II ポリメラーゼ (Thermo Scientific cat# F-540S) を用いて実施し、ここで、反応混合物および条件は、実施例 8 に記載したとおり設定する。

10

20

30

40

50

【0357】

任意の試薬の汚染テンプレートから任意の誤った増幅がないようにするため、各混合物について二重反復反応を設定し（重鎖については4つの別々の反応、そして各軽鎖については1つ）、ここでは、cDNAテンプレートを水と交換する。テンプレートのないこれらの陰性対照反応を、テンプレートを含むサンプルと同時に進行。PCRプログラム終了後、テンプレートを反応に加えるが、cDNAが存在しないときのアンプリコン（重鎖について、およそ540bp、カップ鎖について、およそ485bpそしてラムダ鎖について、およそ510bp）の存在について、1.5%TAEアガロースゲル上の電気泳動によって各反応物3μl（陰性対照を含む）を分析する。AMPure XP（Agencourt; Beckman Coulter Genomics, Brea, CA, cat#A63881）を用いて製造元のプロトコールに従ってPCR生成物を精製し、そしてAgilent 2100 BioAnalyzerを用いて分析する。

10

【0358】

次いで、PCR生成物の配列を予測アミノ酸配列に翻訳し、それを、次いで理論的に消化して（例えば、プロテアーゼおよび/または化学滴タンパク質切断試薬を用いて）仮想ペプチド断片を産生する。次いで、これらの仮想ペプチド断片を用いて予測質量スペクトルを生成する。

【0359】

ポリクローナル抗体のペプチド断片からの実際の質量スペクトルの生成：

マウスの血清および/または血漿からポリクローナル抗体を精製する。抗体を精製するために、以下の方法は用いる：

20

【0360】

プロテインG精製：

プロテインG磁性ビーズ（Millipore（Billerica, MA）, cat# LSKMAGG10）1mLを、4つの15mLコニカルチューブのそれぞれ（Falcon（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）, cat#352097）に加える。各チューブ中のビーズを、リン酸緩衝食塩水pH7.4、0.05%Tween-20（PBST）10mLで2回およびPBS10mLで3回洗浄する。3種のマウス（ID1262-2、1262-4、1263-4）からの血清を一緒に貯め、そしてPBS中の最終体積6mLに10倍希釈する。次いで、合わせた希釈血清1.5mLをビーズの各チューブに加え、そして4℃で一夜インキュベートする。フロースルーを集め、そして精製プロセスをさらに2回行う。フロースルーを集めた後、各チューブを、PBST10mLで2回およびPBS10mLで3回洗浄する。次いで、各チューブをpH2.7の0.1Mグリシン0.5mLと共に4℃で30分間インキュベートしてIgGを溶出する。溶出を5回繰り返す。すべての溶出液を、1M Tris pH8.5で中和し、PBSに対して一夜透析し、そしてタンパク質濃度をND-1000分光光度計（Nanodrop）で測定する。合計2.5mgのIgGを精製する。

30

【0361】

抗原カラム調製：

新たなストレプトアビジン（SA）磁性ビーズ（Pierce, cat#88817）5.0mLをPBS10mLで3回洗浄し、そしてPBS5.0mL中に希釈したビオチンに結合されたに興味の抗原の20mg/mLストック105μLを用いて4℃で一夜インキュベートする。フロースルーを捨て、そしてビーズをPBS10mLで3回洗浄し、そして10個の低結合性1.7mLチューブ（Axygen（Union City, CA）, cat# MCT-175-L-C）中に等分する。等分されたビーズを磁性ラック（Invitrogen, DynaMag）上に置き、そしてPBSを除去した後、希釈した血清を加える。

40

【0362】

抗原特異的精製：

上からのプロテインG精製IgGをビオチン化抗原と結合したSA磁性ビーズに加える。4℃で一夜インキュベーション後、フロースルーを集め、そしてビーズを以下の緩衝液のそれぞれ合計10mLで順に洗浄する：

PBS

50

R I P A 緩衝液 (すなわち、放射免疫沈降アッセイ緩衝液 ; Alcaraz et al., J. Vet. Diagn. Invest. 2(3): 191-196, 1990; Ngoka, L.C., Proteome Sci. 6(1): 30, 2008)

P B S 中の 20 % アセトニトリル

P B S 中の 60 % エチレングリコール

P B S 中の 0.5 M NaCl

P B S (すなわち、リン酸緩衝食塩水)

【0363】

次いで、IgG を pH 3.5 の 0.1 M グリシン 1.5 mL の 5 画分、次いで pH 2.7 の 0.1 M グリシン 1.5 mL の 5 画分、次いで pH 1.8 の 0.1 M グリシン 1.5 mL の 5 画分で溶離し、そして pH 8.5 の 1 M Tris で中和する。抗原でコートされた 96 ウェルプレートを用いて、興味のある抗原に対する反応性について溶出液を測定する。活性を有する画分を ELISA (Thermo, cat#23300) によって定量化し、そしてウェスタンブロットによって抗原反応性について検定する。最も良好な反応性を有する画分を質量分析によって分析する。

10

【0364】

質量分析

質量分析は、上記のように実施する。簡潔には、プロテアーゼ (例えば、トリプシン) および/または化学的タンパク質切断試薬 (例えば、臭化シアン) による消化の後、ペプチドにおいて質量分析を実施する。興味のある抗原に特異的に結合する抗体をコードする遺伝子配列を同定するために、生成した MS2 スペクトルを、遺伝物質データベース中の情報から誘導された理論 MS2 スペクトルと関連づける。

20

【0365】

モノクローナル抗体の発現および同定

異なる重 (ガンマ) 鎖可変領域クローン、カッパ鎖可変領域クローンおよびラムダ鎖可変領域クローンをコンビナトリアルフォーマットで発現させ、そして抗原特異的結合活性についてスクリーニングする。各ガンマ鎖をすべての軽 (カッパおよびラムダ) 鎖と対形成させ、標準 96 ウェル組織培養プレート中の HEK293E 細胞の一過性トランスフェクションによって抗体を発現させる。

【0366】

各ウェル中のトランスフェクト細胞から分泌された抗体を、上記のような酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) によって、精製された組換え抗原に対する結合についてスクリーニングする。重鎖および軽鎖のいくつかの対形成により、抗原コーティングされたプレートに特異的に結合する抗体を生じる。これらの重鎖および軽鎖対を選択し、興味のあるヒト抗原に特異的に結合する完全ヒト抗体を作製する。

30

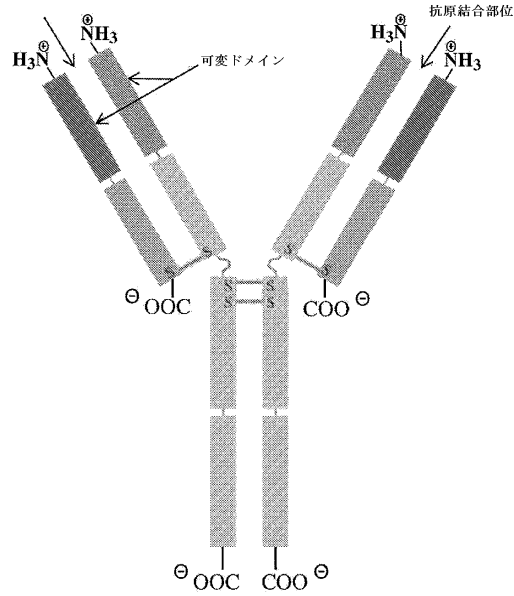
【0367】

同等物

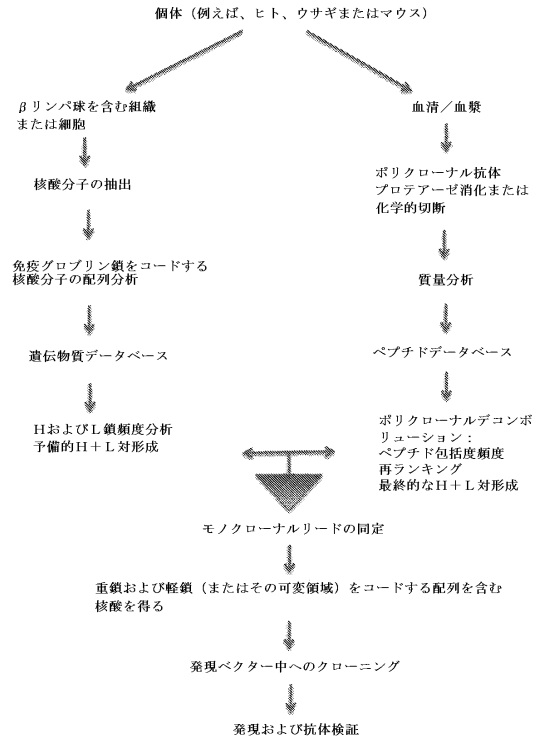
当業者は、常用的な実験しか用いなくても、本明細書に具体的に記載された特定の実施態様に対する多くの同等物を認めるか、または確認することができる。このような同等物は、特許請求の範囲に包含されるものとする。

【図 1】

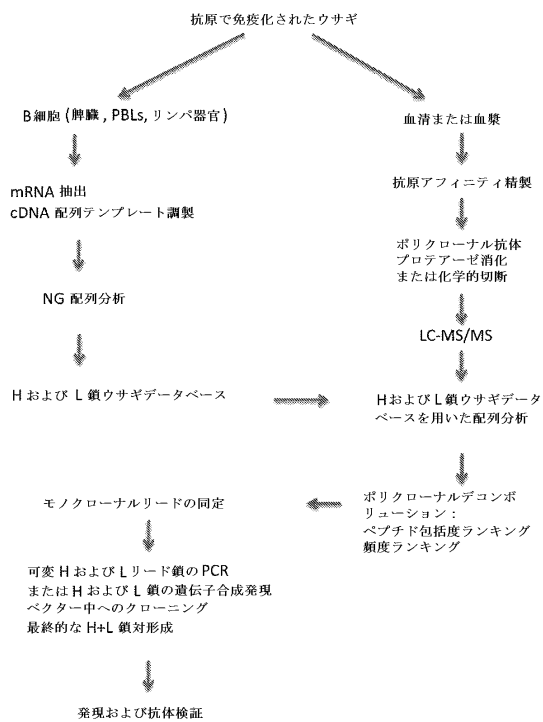
(b) 抗原結合部位



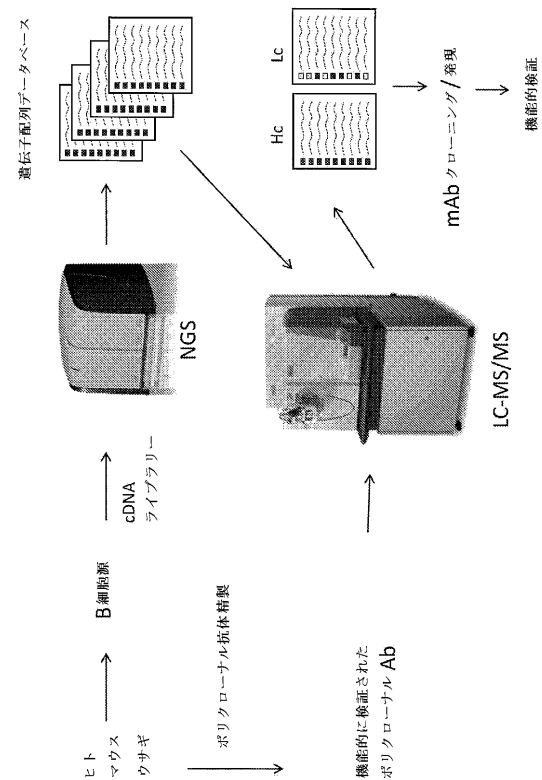
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

重鎖	ref	総ペプチド	鎖	cdr3 計数	cdr3	配列番号：
G623FKB01BJOL7	153	重		2	RGYSGTYVDY	307
G623FKB01AF34N	148	重		244	SRTGIFDY	308
G623FKB01BSNEU	131	重		15	SRSGFIDY	309
G623FKB01A2ZV4	130	重		58	RGYSNITYVDY	310
G623FKB01AOMXT	126	重		68	LTAIFYD	311
G623FKB01AXQN3	126	重		6	RFYDGSYFYD	312
G623FKB01AC4H8	122	重		19	RGYADITYVDY	313
G623FKB01AB7YA	84	重		13	HEPLNWFPY	314
G623FKB01AUXQW	69	重		45	KYGGFDY	315
G623FKB01BO141	59	重		8	GSAFY	316
G623FKB01BIXE	49	重		5	YYRNYGGFDY	317
G623FKB01AL5DX	43	重		15	EDYSDQFAY	318

軽鎖

ref	総ペプチド	鎖	NGS 計数	cdr3	配列番号：
G623FKB01A3GC7	235	軽	8	SQSTHVPWT	319
G623FKB01AXJ1C	199	軽	1068	QQHYSTPPT	320
G623FKB01ATC81	153	軽	112	QQHSTPPT	321
G623FKB01BCUK2	132	軽	597	QQHYSTPPT	322
G623FKB01BY43F	74	軽	532	WQGHFFPQT	323
G623FKB01BAZ8V	64	軽	6	QQYYSYPT	324
G623FKB01A580V	39	軽	20	QQSNEDPRT	325
G623FKB01A312C	39	軽	384	QOWSSNPLT	326
G623FKB01BAD1C	31	軽	258	QHFVGTPTWT	327
G623FKB01ADDWX	31	軽	219	QQRSSYPPT	328
G623FKB01A2982	23	軽	891	LOYASYPWT	329
G623FKB01BPZWW	38	軽	19	QQSKEVPLT	330

太字のイタリック体：抗原に対して反応性の抗体鎖

【図 6 - 1】

Lc ID	Hc ID	BSNEU	BO141	AMMT	BBIXE	AXGN3	AB7YA
BY43F	A	0.1991	0.229	0.0995	0.0932	0.0921	0.0895
A3GC7	A	0.6476	0.4431	0.0954	0.0862	0.155	0.1128
BAZ8V	A	0.571	0.5798	0.2424	0.0955	0.1599	0.1177
A312C	A	0.6732	0.7344	0.0882	0.0744	0.1114	0.1048
A580V	A	0.7187	0.6232	0.1125	0.1171	0.1907	0.1074
BPZWW	A	0.0961	0.0897	0.0814	0.0959	0.0869	0.0849
ADDWX	A	0.1122	0.0985	0.2757	0.1145	0.1526	0.1026
AX1C	A	3.47	3.0952	0.0851	0.0929	1.2682	1.7622
BCUK2	A	1.5397	1.3374	0.085	0.107	1.0411	1.8156
ATC81	A	0.1257	0.1044	0.1008	0.1091	0.0694	0.0842
BAD1C	A	0.162	0.1011	0.2664	0.1034	0.176	0.1706
A2982	A	0.092	0.0975	0.0775	0.1021	0.2347	0.1038
AS297	A	0.1022	0.0911	0.0684	0.0896	0.1448	0.1014
BY43F	B	0.0929	0.0835	0.0838	0.0994	0.0983	0.1008
A3GC7	B	0.104	0.1181	0.1993	0.2078	0.1369	0.3932
BAZ8V	B	0.1451	0.0772	0.1041	0.1548	0.1076	0.1561
A312C	B	0.1074	0.0872	0.1016	0.0952	0.1507	0.1442
A580V	B	0.0832	0.0987	0.0996	0.1377	0.1399	0.1315
BPZWW	B	0.1029	0.0872	0.2011	0.0915	0.1117	0.1118
ADDWX	B	3.6013	2.0746	0.0854	0.1078	3.0399	2.3754
AX1C	B	1.0086	1.6872	0.0883	0.1117	1.7897	1.2741
BCUK2	B	0.1187	0.1052	0.1109	0.1093	0.1003	0.0997
ATC81	B	0.1547	0.0901	0.112	0.1175	0.1186	0.1055
BAD1C	B	0.1615	0.1045	0.121	0.1232	0.1307	0.1289
A2982	B	0.1197	0.084	0.0982	0.101	0.1362	0.1288
AS297	B	1.6003	1.0512	1.4815	1.4683	0.3966	0.3443

9106 対照

2次単鎖

【図 6 - 2】

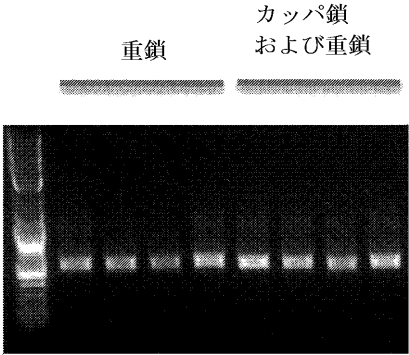
Lc ID	Hc ID	A2ZY4	AC4H8	BD17	AL5DX	AUXQW	AF34N
BY43F	A	0.1422	0.0906	0.0956	0.125	0.1081	0.124
A3GC7	A	0.3013	0.5843	0.1651	0.1841	0.124	0.1012
BAZ8V	A	0.0958	0.194	0.2652	0.4371	0.4326	0.4052
A312C	A	0.0965	0.084	0.2187	0.3583	0.5084	0.3416
A580V	A	0.0937	0.0759	0.1215	0.3744	0.4007	0.3472
BPZWW	A	0.0973	0.0973	0.1037	0.0944	0.1731	0.1139
ADDWX	A	0.0899	0.1232	0.194	0.1527	0.1216	0.1237
AX1C	A	0.1256	0.1403	0.1009	0.1162	0.1183	0.0843
BCUK2	A	0.0985	0.0923	0.0925	0.1119	0.151	0.116
ATC81	A	0.1009	0.084	0.1061	0.1346	0.1929	0.1668
BAD1C	A	0.1098	0.1563	0.1862	0.1062	0.1875	0.1935
A2982	A	0.0941	0.0766	0.0737	0.1389	0.2034	0.1038
AS297	A	0.0996	0.0985	0.088	0.1245	0.1279	0.0779
BY43F	B	0.1232	0.0857	0.127	0.1102	0.1855	0.139
A3GC7	B	0.1191	0.1299	0.1049	0.0994	0.1008	0.1397
BAZ8V	B	0.1017	0.0901	0.0908	0.09	0.1329	0.1093
A312C	B	0.1139	0.1023	0.1015	0.1093	0.1077	0.1066
A580V	B	0.116	0.0864	0.1698	0.0999	0.1153	0.1032
BPZWW	B	0.1211	0.0916	0.0875	0.0922	0.0869	0.0862
ADDWX	B	0.108	0.0961	0.0886	0.1053	0.1523	0.1132
AX1C	B	0.1896	0.1141	0.1493	0.1354	0.1649	0.1358
BCUK2	B	0.2515	0.0969	0.1444	0.1882	0.1441	0.1392
ATC81	B	0.1416	0.11	0.1125	0.1112	0.1225	0.1437
BAD1C	B	1.6764	1.4255	1.9828	1.6362	0.1244	0.1287
A2982	B	0.1395	0.109	0.256	0.1528	0.1541	0.1128
AS297	B	0.1395	0.109	0.256	0.1528	0.1541	0.1128

9106 対照

2次単鎖

【図 7】

ウサギ脾細胞の RT-PCR



【図 8】

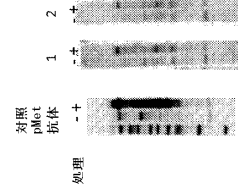
3126(pMet)		CDR3 配列	配列番号	NGS 頻度 (最大 9.12%)
NGS 配列 ID	重鎖	JPSYASSRGYYLPDRDL	331	0.03%
GKRYQP201BFGR	重鎖	JPSYASSRGYYLPDRDL	331	0.03%
GKRYQP201BIQD2	重鎖	JPSYSSRGYYLPDRDL	332	0.19%
GKRYQP201AGL7B	重鎖	ASDYDSRGHWLVYRDL	333	0.06%
GKRYQP201A97DZ	重鎖	KGDPHPNGLFFTM	334	0.05%
GKRYQP201ARCKH	重鎖	JPSYSSRGYYLPDGLDL	335	0.02%
GKRYQP201A9YV7	重鎖	JPSYSSRGYYLPDGLDL	336	0.01%
GKRYQP201BRYT5	重鎖	JPSYSSRGYYLPDRDL	337	0.05%
GKRYQP201AKBWL	重鎖	JSSYSSRGYYLPDGLDL	338	0.13%
GKRYQP201ANGRW	重鎖	JSSYSSRGYYLPDGLDL	339	0.01%
GKRYQP201BGVA8	重鎖	LYNSVVGDDM	340	0.55%
GKRYQP201AGFK4	重鎖	ASDYDSRGHWLVYRDL	341	0.01%
GKRYQP201BJR0T	重鎖	LYNSVVGDDI	342	0.03%
GKRYQP201A8DBE	重鎖	LYNSLVGDDI	343	0.22%
GKRYQP201B2QN3	重鎖	GMFGSTSGNSNI	344	0.59%
GKRYQP201A0CZK	重鎖	GMFGSTSGNSNI	345	0.17%
GKRYQP201AZOWE	重鎖	GMFGSTSGNSNI	346	0.59%
GKRYQP201A1C3B	重鎖	GVPTMRDAM	347	9.12%
3126(pMet)				
NGS 配列 ID	軽鎖	CDR3 配列		NGS 頻度 (最大 3.69%)
GKRYQP201AAKYU	軽鎖	AGGYKSSGDTVS	348	0.14%
GKRYQP201AG5FC	軽鎖	QGEFSCDFDCTV	349	0.11%
GKRYQP201A291T	軽鎖	LGGYKTTTDSGI	350	0.78%
GKRYQP201A09ZW	軽鎖	QSYVHNSGTSYIT	351	0.89%
GKRYQP201A3ZHW	軽鎖	AGGYKSTTDGSA	352	0.07%
GKRYQP201AJ2IR	軽鎖	QSYVHNSGTSYIT	353	0.19%
GKRYQP201A5GBW	軽鎖	QSYVHNSGTSYIT	354	0.04%
GKRYQP201BP3WS	軽鎖	AGGYKSSGDTFT	355	0.01%
GKRYQP201AY7OW	軽鎖	LGGYKTTDGS	356	0.05%
GKRYQP201BR1WK	軽鎖	AGGYKSSDGS	357	0.30%
GKRYQP201AYFKS	軽鎖	QGEFSCDAGVCTL	358	0.07%
GKRYQP201ALDF5	軽鎖	QGEFSCRSYDCTV	359	0.18%
GKRYQP201AATYT	軽鎖	LQDWSPSYADVA	360	0.06%
GKRYQP201APNW9	軽鎖	QGGRRSVDVNV	361	0.05%
GKRYQP201AT2TB	軽鎖	AGGYKTTDGS	362	0.02%
GKRYQP201AHXJZ	軽鎖	QGGYTSNVQNV	363	3.69%

太字のイタリック体は、抗原特異的抗体鎖である

(NGS 頻度に基づいて最も高い存在量の抗体鎖を含む、
全部で6本の重鎖 (イタリック体) および5本の軽鎖 (太字のイタリック体) を
合成した)

【図 9】

NG-XMT からのウエスタン陽性クローン



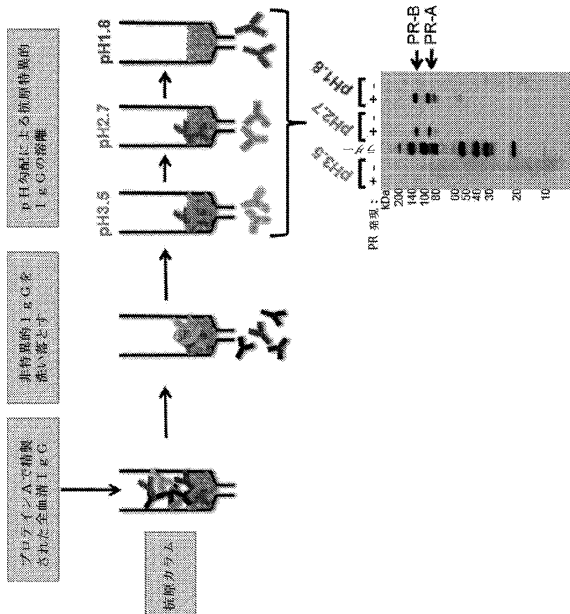
NG-XMT 同定された抗体鎖可変領域

重鎖 (NGS 頻度: 0.19%) EQLESGLGVPFGTLLCTYSGLSWMMWQKQKGLGKLGISGGNTYASWVWGRITVAKTFTVDMNTTETATTCARSSVSE
 軽鎖 (NGS 頻度: 0.3%) ASGQSFAGGTEVWNG (SEQ ID NO: 365)

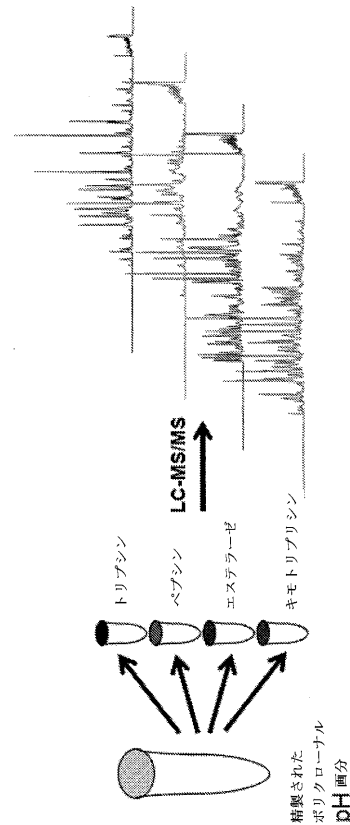
重鎖 (NGS 頻度: 0.19%) EQLESGLGVPFGTLLCTYSGLSWMMWQKQKGLGKLGISGGNTYASWVWGRITVAKTFTVDMNTTETATTCARSSVSE
 軽鎖 (NGS 頻度: 0.3%) ASGQSFAGGTEVWNG (SEQ ID NO: 366)

最も高い NGS 頻度の重鎖 (9.12%) と軽鎖 (3.69%) との対形成からは抗原特異的抗体が得られなかった。

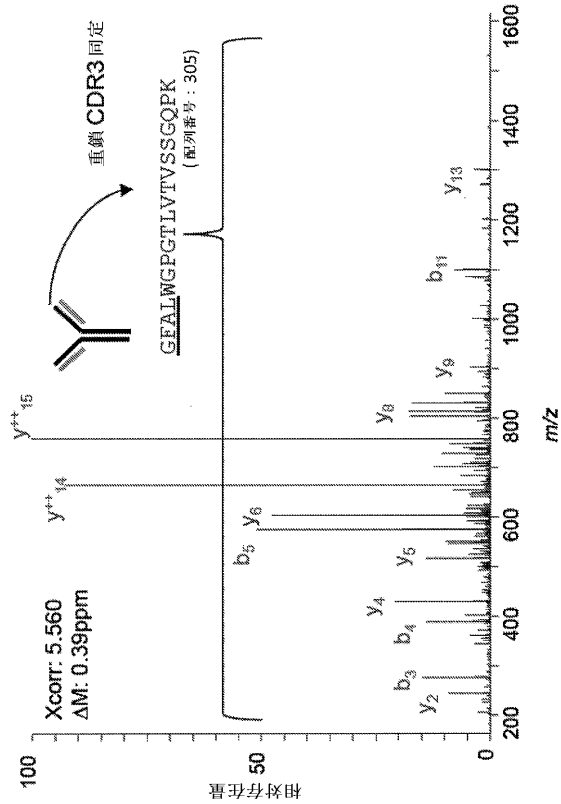
【図 10 a】



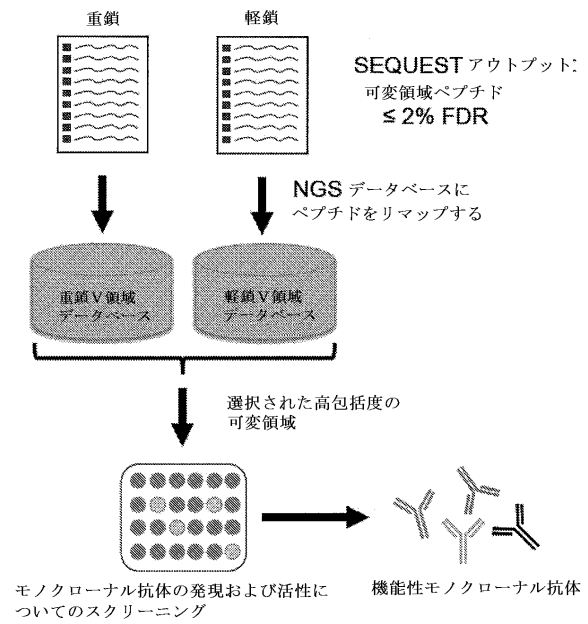
【図 10 b】



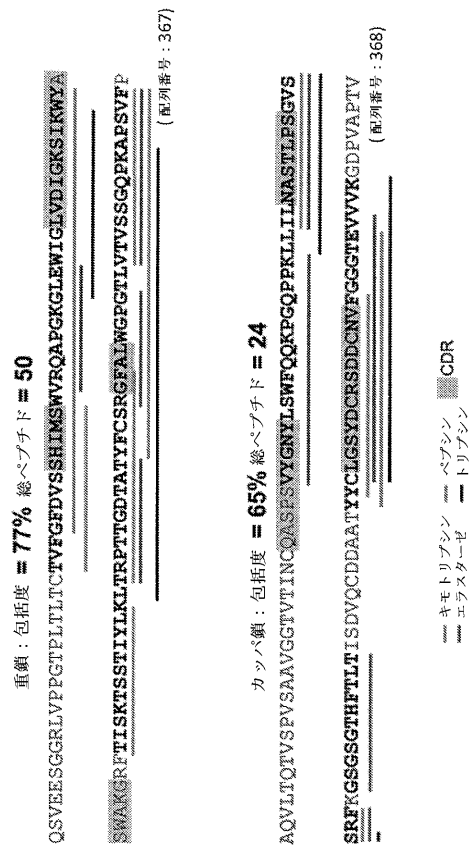
【図10c】



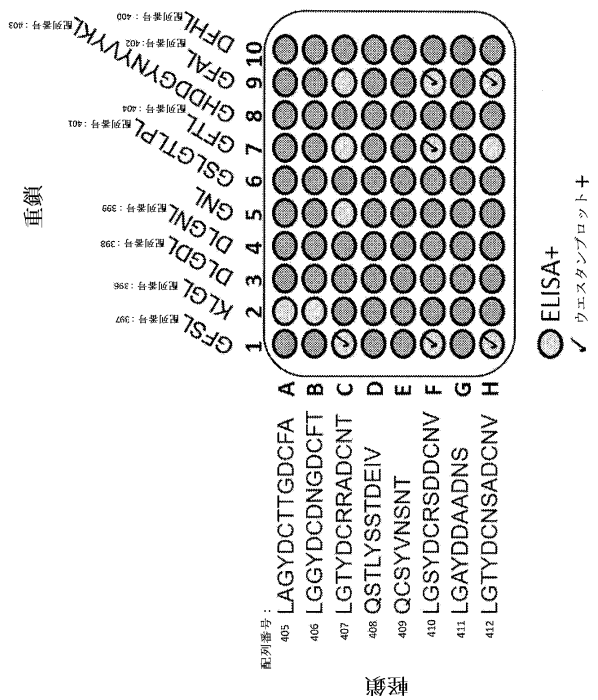
【図10d】



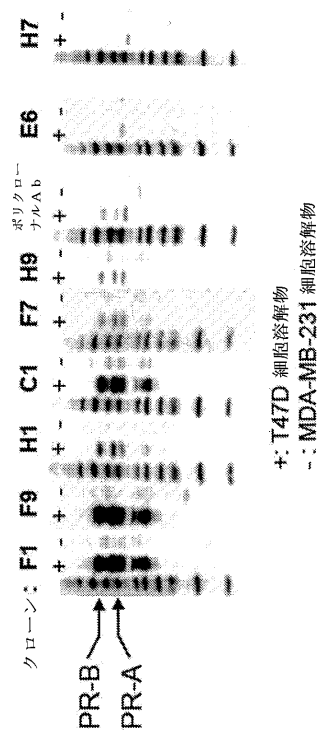
【図10e】



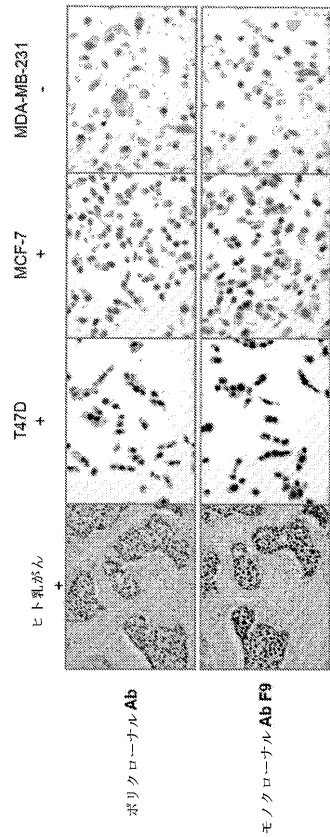
【図11a】



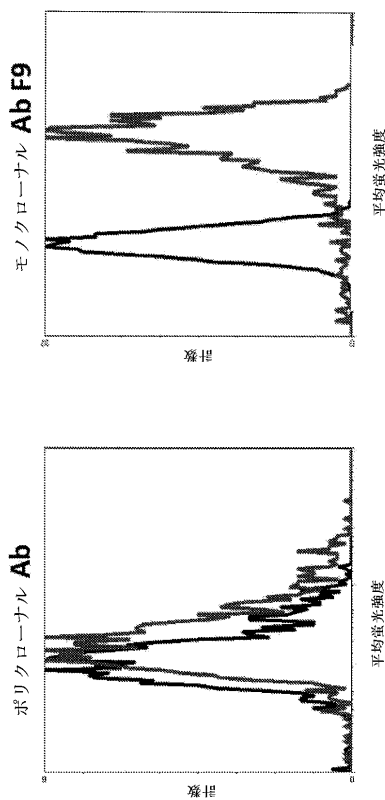
【図 1 1 b】



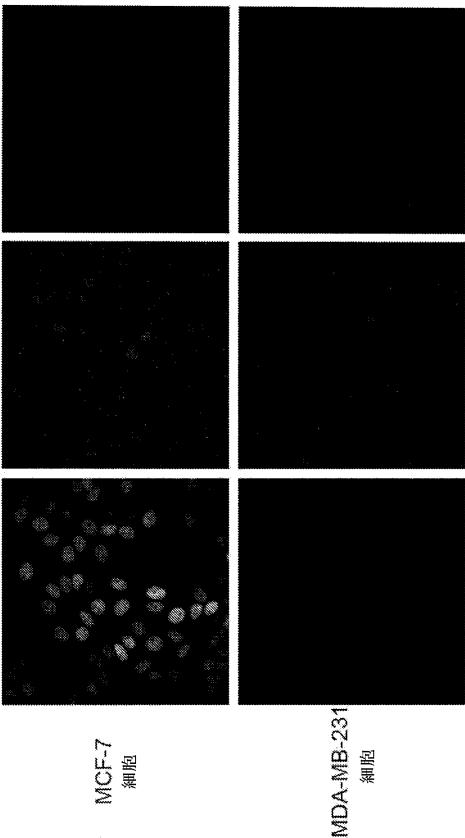
【図 1 1 c】



【図 1 1 d】



【図 1 1 e】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/566,876

(32)優先日 平成23年12月5日(2011.12.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/594,729

(32)優先日 平成24年2月3日(2012.2.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ワン・チャン・チャン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02420・レキシントン・ノースエマーソンロード361

(72)発明者 ジョン・エドワード・ラッシュ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01915・ビバリー・エセックスストリート284

(72)発明者 ショーン・アンドレ・ポーソレイユ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01915・ビバリー・ラントウールストリート116 #301

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特表2011-501737(JP,A)

BIRGIT OBERMEIER, MATCHING OF OLIGOCLONAL IMMUNOGLOBULIN TRANSCRIPTOMES AND PROTEOMES
以下備考, NATURE MEDICINE, 2008年6月1日, V14 N6, P688-693, OF CEREBROSPINAL
FLUID IN MULTIPLE SCLEROSIS

DOMINIQUE DE COSTA, SEQUENCING AND QUANTIFYING IGG FRAGMENTS AND ANTIGEN-BINDING REGIO
NS BY MASS SPECTROMETRY, JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY
, 2010年6月4日, V9 N6, P2937-2945

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12P 21/08

PubMed