

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-533507

(P2016-533507A)

(43) 公表日 平成28年10月27日 (2016. 10. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543 (2006. 01)	G O 1 N 33/543 5 9 5	
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-545238 (P2016-545238)
(86) (22) 出願日 平成26年9月26日 (2014. 9. 26)
(85) 翻訳文提出日 平成28年3月29日 (2016. 3. 29)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/057672
(87) 国際公開番号 W02015/048413
(87) 国際公開日 平成27年4月2日 (2015. 4. 2)
(31) 優先権主張番号 61/884, 348
(32) 優先日 平成25年9月30日 (2013. 9. 30)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511197822
エックスーボディ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
ォルサム ビーバー ストリート 100
スイート 101
(74) 代理人 100144048
弁理士 坂本 智弘
(72) 発明者 ワグナー, リチャード・ダブリュ
アメリカ合衆国、02453 マサチュー
セッツ州、ウォルサム、ビーバー ストリ
ート 100、スイート 101 エック
スーボディ インコーポレイテッド内
Fターム (参考) 4B063 QA01 QQ08 QQ13 QQ42 QQ52
QR32 QR35 QR62 QS25 QX01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原受容体スクリーニングアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体（例えば、抗体）の同定のための方法を提供する。一般に、これは、複数の抗原受容体発現細胞と対象となる抗原とを接触させることと、抗原受容体発現細胞の表面上の活性化接着分子のレベルを測定することと、複数の抗原受容体発現細胞から細胞表面上の活性化接着分子の量の増加を示す抗原受容体発現細胞を同定することを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を同定するための方法であって、

(a) 複数の抗原受容体発現細胞を抗原と接触させることと、

(b) 前記抗原の存在下および非存在下で、前記抗原受容体発現細胞の表面上の活性化接着分子の量を測定することと、

(c) 前記複数の抗原受容体発現細胞から前記抗原に特異的に結合する抗原受容体発現細胞を同定することと、を含み、前記抗原の存在下における抗原受容体発現細胞の前記表面上の活性化接着分子の、適切な対照と比較した前記量の増加は、前記抗原受容体発現細胞への前記抗原の結合を示唆し、それによって対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を同定する、方法。

10

【請求項 2】

ステップ(c)で同定された前記抗原受容体発現細胞をクローン的に単離することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ(c)で同定された前記抗原受容体の少なくとも一部の核酸またはアミノ酸配列を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記接着分子はインテグリンである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記インテグリンは、白血球機能抗原 1 (LFA-1) または最晩期抗原 4 (VLA-4) 分子である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

活性化接着分子の前記量は、活性化接着分子には結合するが、静止状態にある接着分子には結合しない細胞外基質タンパク質または抗体への抗原受容体発現細胞の結合を測定することによって測定される、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞外基質タンパク質は、細胞間接着分子 1 (ICAM-1) またはフィブロネクチン分子である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞外基質タンパク質または前記抗体への前記抗原受容体発現細胞の前記結合は、前記細胞外基質タンパク質または前記抗体でコーティングされたラベルフリーバイオセンサを使用して測定される、請求項 6 または 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記バイオセンサは、比色共鳴反射光バイオセンサである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗原受容体は、B細胞受容体である、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

B細胞受容体は、ヒトB細胞受容体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗原受容体発現細胞は、B細胞またはハイブリドーマ細胞である、請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 13】

前記B細胞は、1種以上のナイーブ動物から単離される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記B細胞は、対象となる抗原で免疫学的に負荷を与えていない1種以上の動物から単離される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記動物は、ヒトである、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記 B 細胞は、不死化されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 B 細胞は、内在性抗体を発現する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 B 細胞は、異種抗体のライブラリーを発現する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ライブラリーは、特有の抗体の天然レパートリーを含む、請求項 18 に記載の方法

。

【請求項 20】

前記ライブラリーは、ナープ抗体ライブラリーである、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記ライブラリーは、ヒト抗体を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ライブラリーは、複数の特有の合成抗原受容体を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 B 細胞は、特有のキメラ抗原受容体のライブラリーを発現し、各キメラ受容体は、異種結合分子に結合した抗原受容体の一部を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 24】

対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を生成するための方法であって、

(a) 請求項 1～23 のいずれか一項の方法に従って抗原受容体を同定することと、

20

(b) 前記抗原受容体、またはその抗原結合部分を発現させることと、を含む、方法。

【請求項 25】

前記抗原受容体は、抗体である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗体の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) の核酸またはアミノ酸配列を決定することをさらに含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記少なくとも 1 つの CDR を異種抗体のフレームワークに移植することをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願

本特許出願は、2013 年 9 月 30 日に出願された米国仮特許出願第 61/884,348 号の優先権を主張し、参照により、その内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の概要

本発明は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体 (例えば、抗体) の同定のための方法を提供する。本発明は、抗原受容体発現細胞 (例えば、B 細胞) の表面における抗原の同族抗原受容体への結合が、その細胞の表面上で接着分子 (例えば、インテグリン) の活性化をもたらすという発見に少なくとも一部基づいている。これらの活性化接着分子は、(例えば、ラベルフリーアッセイシステムを用いて) 容易に検出可能であり、それによって対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を含む抗原受容体発現細胞を同定する役割を果たす。本発明の方法は、対象となる抗原に特異的に結合する抗体発現細胞 (およびそこで発現される抗体) の同定に特に有用である。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

したがって、一態様において、本発明は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容

50

体を同定するための方法であって、複数の抗原受容体発現細胞を抗原と接触させることと、抗原の存在下および非存在下で、抗原受容体発現細胞の表面上の活性化接着分子の量を測定することと、複数の抗原受容体発現細胞から抗原に特異的に結合する抗原受容体発現細胞を同定することとを含み、抗原の存在下における抗原受容体発現細胞の表面上の活性化接着分子の量の、適切な対照と比較した増加は、抗原受容体発現細胞への抗原の結合を示唆し、それによって対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を同定する方法を提供する。

【0004】

特定の実施形態において、本方法は、同定された抗原受容体発現細胞をクローン的に単離することをさらに含む。

10

他の実施形態において、本方法は、同定された抗原受容体の少なくとも一部の核酸またはアミノ酸配列を決定することをさらに含む。

特定の実施形態において、接着分子はインテグリンである。適切なインテグリンは、限定されないが、白血球機能抗原 1 (LFA-1) または最晩期抗原 4 (VLA-4) 分子を含む。

特定の実施形態において、活性化接着分子の量は、活性化接着分子には結合するが、静止状態にある接着分子には結合しない細胞外基質タンパク質または抗体への抗原受容体発現細胞の結合を測定することによって測定される。適切な細胞外基質タンパク質は、限定されないが、細胞間接着分子 1 (ICAM-1) またはフィブロネクチン分子を含む。

【0005】

20

特定の実施形態において、細胞外基質タンパク質または抗体への抗原受容体発現細胞の結合は、細胞外基質タンパク質または抗体でコーティングされたラベルフリーバイオセンサを使用して測定される。具体的な実施形態において、バイオセンサは、比色共鳴反射光バイオセンサである。

特定の実施形態において、抗原受容体は、B細胞受容体（例えば、ヒトB細胞受容体）である。

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞は、B細胞（例えば、ヒトB細胞）またはハイブリドーマ細胞である。具体的な実施形態において、B細胞は、1種以上のナイーブ動物（例えば、ヒト）から単離される。別の具体的な実施形態において、B細胞は、対象となる抗原で免疫学的に負荷を与えていない1種以上の動物（例えば、ヒト）から単離される。

30

【0006】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞（例えば、B細胞）は、不死化されている。

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞（例えば、B細胞）は、内在性抗体を発現する。

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞（例えば、B細胞）は、異種抗体のライブラリーを発現する。具体的な実施形態において、ライブラリーは、特有の抗体（例えば、ヒト抗体）の天然レパートリーを含む。別の具体的な実施形態において、ライブラリーは、ナイーブ抗体ライブラリーである。別の具体的な実施形態において、ライブラリーは、複数の特有の合成抗原受容体を含む。

40

【0007】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞（例えば、B細胞）は、特有のキメラ抗原受容体のライブラリーを発現し、各キメラ受容体は、異種結合分子に結合した抗原受容体（例えば、抗体）の一部を含む。

別の態様において、本発明は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体（例えば、抗体（例えば、ヒト抗体））を生成するための方法であって、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法に従って抗原受容体を同定することと、抗原受容体またはその抗原結合部分を発現させることとを含む方法を提供する。

特定の実施形態において、本方法は、抗体の少なくとも1つの相補性決定領域 (CDR

50

）の核酸またはアミノ酸配列を決定することをさらに含む。具体的な実施形態において、本方法は、少なくとも1つのCDRを異種抗体のフレームワークに移植することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】B細胞受容体活性化をインテグリン活性化に関連付ける「インサイドアウト」シグナル伝達経路の略図を示す。

【図2】B細胞受容体活性化に応答した細胞外基質タンパク質へのB細胞の結合を測定するラベルフリーバイオセンサアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体の同定のための方法を提供する。本発明の方法は、一般に、複数の抗原受容体発現細胞と対象となる抗原とを接触させることと、抗原受容体発現細胞の表面上の活性化接着分子の量を測定することと、複数の抗原受容体発現細胞から細胞表面上の活性化接着分子の増加量を示す抗原受容体発現細胞を同定することとを含む。

【0010】

I. 定義

本明細書で使用される場合、「抗原受容体」という用語は、B細胞受容体の膜結合型抗体成分（すなわち、膜結合型抗体）、またはT細胞受容体の $\alpha\beta$ 鎖もしくは $\gamma\delta$ 鎖成分を指す。この用語はまた、B細胞またはT細胞受容体の一部が異種結合分子で置換されたキメラ抗原受容体も包含する。

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、自然に抗体を産生する任意の種に由来するか、または組換えDNA技術によって作製される、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE、またその抗原結合断片（例えば、VHおよび／もしくはVL）を指す。

【0011】

本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、抗原受容体によって認識される分子を指す。

本明細書で使用される場合、「接着分子」という用語は、細胞－細胞間または細胞－細胞外基質間の結合を媒介する細胞表面タンパク質を指す。「活性化」接着分子は、同族結合パートナーへの結合を可能にする三次構造コンフォメーションをとった接着分子である。「静止状態にある」接着分子は、同族結合パートナーへの結合を不可能にする三次構造コンフォメーションをとった接着分子である。

本明細書で使用される場合、「適切な対照」という用語は、細胞表面上の活性化接着分子の量の増加を特定するのに有用な任意の試料または基準値を指す。適切な対照は、限定されないが、対象となる抗原の非存在下における細胞を含む。適切な基準値は、限定されないが、対象となる抗原の非存在下において細胞の表面上に見られる活性化接着分子の平均量を含む。

【0012】

本明細書で使用される場合、「～に特異的に結合する」または「特異的に結合する」は、少なくとも約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M、もしくはそれ以上の親和性で抗原に結合する、および／または非特異的抗原に対するその親和性よりも少なくとも2倍高い親和性で標的に結合する抗原受容体の能力を指す。

本明細書で使用される場合、「免疫学的に負荷を与えた」という用語は、抗原に対する動物の曝露および免疫応答を指す。

本明細書で使用される場合、「ナイーブ動物」は、対象となる抗原で免疫学的に負荷を与えていない動物を指す。

本明細書で使用される場合、「抗原受容体の天然レパートリー」という用語は、動物の

10

20

30

40

50

免疫細胞中で自然に発現される発現される抗原受容体のレパートリーを指す。

本明細書で使用される場合、「合成抗原受容体」という用語は、自然には存在しない抗原受容体を指す。

【0013】

11. 抗原受容体

本発明の方法は、対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体を同定するのに有用である。抗原に結合したときに細胞表面接着分子の活性化を誘発することができるあらゆる細胞表面抗原受容体が、本発明の方法に用いられ得る。

特定の実施形態において、抗原受容体は、B細胞受容体の膜結合型抗体成分を含む。細胞の表面に提示されることが可能であり、かつ、抗原に結合したときに細胞表面接着分子の活性化を誘発することができるあらゆる抗体が、本発明の方法に用いられ得る。抗体は、げっ歯類、ウサギ類、トリ、ラクダ類、サメ、または霊長類（例えば、ヒト）を含むがこれらに限定されない、抗体を産生する任意の動物に由来してもよい。抗体は、限定されないが、IgA、IgE、IgM、IgG、およびIgDを含む任意のアイソタイプであってもよい。抗体は、人工的、天然由来、またはそれらの組み合わせであってもよい。好ましい実施形態において、抗原受容体は、完全ヒト抗体である。

10

【0014】

特定の実施形態において、抗原受容体は、T細胞受容体の $\alpha\beta$ または $\beta\gamma$ 鎖を含む。細胞の表面に提示されることが可能であり、かつ、抗原に結合したときに細胞表面接着分子の活性化を誘発することができるあらゆるT細胞受容体が、本発明の方法に用いられ得る。T細胞受容体は、げっ歯類、ウサギ類、トリ、ラクダ類、サメ、または霊長類（例えば、ヒト）を含むがこれらに限定されない、T細胞を有する任意の動物に由来してもよい。T細胞受容体は、人工的、天然由来、またはそれらの組み合わせであってもよい。好ましい実施形態において、抗原受容体は、完全ヒトT細胞受容体である。

20

他の実施形態において、抗原受容体は、異種結合分子に（化学的にまたは遺伝的に）結合した抗原受容体（B細胞および／またはT細胞受容体）の少なくとも一部を含むキメラ分子である。適切な異種結合分子は、限定されないが、抗体断片または誘導体、および代替の結合足場分子を含む。

【0015】

好適な抗体断片または誘導体は、限定されないが、単ドメイン抗体（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWard et al., Nature 341: 544 (1989)を参照のこと）、Fab断片、一本鎖抗体（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるBird et al. (1988) Science 242: 423-426を参照のこと）、ユニボディ（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第WO2007/059782号を参照のこと）、重鎖のみ抗体、およびナノボディ（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,759,808号を参照のこと）を含む。

30

【0016】

適切な代替の結合足場分子は、限定されないが、フィブロネクチンドメイン（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKoide et al. (2007), Methods Mol. Biol. 352: 95-109を参照のこと）、DARPin（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるStumpp et al. (2008) Drug Discov. Today 13 (15-16): 695-701を参照のこと）、プロテインAのZドメイン（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるNygren et al. 2008) FEBS J. 275 (11): 2668-76を参照のこと）、リポカリン（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるSkerra et al. (2008) FEBS J. 275 (11): 2677-83を参照のこと）、アフィリン（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるEbersbach et al. (2007) J. Mol. Biol. 372 (1): 172-85を参照のこと）、アフィチン（例えば、参照によりその全体が本明細書

40

50

に組み込まれるKrehenbrink et al. (2008). J. Mol. Biol. 383 (5): 1058-68を参照のこと)、アビマー (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるSilverman et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23 (12): 1556-61を参照のこと)、フィノマー (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるGrabulovski et al. (2007) J. Biol. Chem. 282 (5): 3196-3204を参照のこと)、およびKunitzドメインペプチド (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるNixon et al. (2006) Curr Opin Drug Discov Devel 9 (2): 261-8を参照のこと)を含む。

【0017】

特定の実施形態において、本発明は、複数の特有の抗原受容体 (例えば、B細胞受容体) をコードする核酸ライブラリーを用いる。ライブラリーは、抗原受容体の天然レパートリー (例えば、通常、1種以上の脊椎動物に発現される抗原受容体の一部) および／または複数の合成抗原受容体 (すなわち、通常、脊椎動物には発現されない抗原受容体) を含むことができる。好ましい実施形態において、ライブラリーは、1人以上のヒト対象のB細胞から単離された完全ヒト抗原受容体のレパートリーを含む。抗原受容体ライブラリーを作製するための方法は、当該技術分野で周知である (例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6, 291, 159号に記載の方法を参照のこと)。

【0018】

III. 抗原受容体発現細胞

細胞表面抗原受容体を発現するいずれの細胞も本発明の方法に使用するのに適しているが、但し、同族抗原への細胞表面抗原受容体の結合が、その細胞の表面で接着分子の活性化をもたらすものとする。本発明で使用するのに適した細胞は、限定されないが、正常な初代細胞 (例えば、単離されたB細胞)、腫瘍細胞 (例えば、リンパ腫細胞)、ハイブリドーマ、または不死化初代細胞を含む。

【0019】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞は、限定されないが、霊長類 (例えば、ヒト)、げっ歯類、ウサギ類、ニワトリ、およびラクダ類の細胞を含む脊椎動物細胞である。脊椎動物細胞は、いずれの脊椎動物の器官に由来してもよいが、好ましくは白血球 (例えば、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、単核球、マクロファージ、および樹状細胞) に由来する。具体的な実施形態において、脊椎動物細胞は、B細胞系列のリンパ球である。これらの細胞は、B細胞受容体の抗体成分の細胞表面発現を媒介する抗体特異的シヤペロンタンパク質およびアクセサリー分子を発現するため、これらはB細胞受容体の発現に特に適している。B細胞は、ナイーブ動物 (すなわち、対象となる抗原を負荷されていない動物) から、または以前に対象となる抗原を負荷された動物から単離されてもよい。好ましい実施形態において、B細胞は、以前に対象となる抗原を負荷されたヒトから単離される。この方法は、完全ヒト抗原特異的抗体の同定を可能にするため、特に有用である。

【0020】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞は、白血球 (例えば、B細胞) とミエローマ細胞との縮合によって形成されるハイブリドーマ細胞である。ハイブリドーマ細胞を生成する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、ヒトB細胞をヘテロミエローマ細胞と縮合することによるヒトハイブリドーマ細胞の生成について記載する国際公開第WO 90/13660号 (参照により、その全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞は、不死化された初代細胞である。限定されないが、エプスタイン・バーウイルス (EBV) 形質転換 (例えば、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる国際公開第WO 04/76677号を参照のこと)、またはbcl-6および／もしくはbcl-xl等のアポトーシスを阻害する遺伝子の異種発現 (例えば、参照により、その全体が本明細書に組み込まれるKwakkenbos, et al., (2010) Nature Medicine 16 (1) 123-12

10

20

30

40

50

9を参照のこと)を含むあらゆる細胞不死化方法が本発明の方法に用いられ得る。そのような不死化は、ナイーブB細胞の場合のように、抗原結合に応答して細胞がアポトーシスを受ける状況において特に有用である。

【0021】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞は、内在性抗原受容体(すなわち、通常、その細胞によって発現される抗原受容体)を発現する。他の実施形態において、細胞は、1種以上の異種抗原受容体(複数可)(すなわち、通常、その細胞によって発現されない抗原受容体)を発現する。そのような異種発現を達成するための方法は、当該技術分野において日常的である(例えば、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる、Antibody Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology Volume 248, (B. K. C. Lo, Ed) Humana Press, 2004 (ISBN: 1-58829-092-1を参照のこと)。

10

【0022】

細胞表面抗原受容体への抗原結合に応答して接着分子活性化を誘発するために必要な全ての細胞成分(例えば、細胞内シグナル伝達分子、抗原受容体の成分、および接着分子)を自然には発現しない抗原受容体発現細胞もまた、本発明の方法に使用することができる。そのような場合、抗原によって媒介される接着分子の活性化を促進するために、細胞内に不足しているタンパク質を異種的に発現させることが必要である。特定の一実施形態において、抗原受容体発現細胞は、抗原受容体の成分を異種的に発現する。例示的な抗原受容体成分として、限定されないが、B細胞受容体のIg α および/またはIg β 成分が挙げられる。

20

【0023】

特定の実施形態において、抗原受容体発現細胞の集団が用いられ、その集団は、抗原受容体(例えば、B細胞受容体)の多様なライブラリーを発現する。抗原受容体発現細胞の集団は、脊椎動物から単離することができる。代替として、抗原受容体発現細胞の集団は、異種抗原受容体(例えば、B細胞受容体)の多様なライブラリーをコードする核酸を(例えば、発現ベクターの形態で)導入することによってインビトロで作製されてもよい。多様なライブラリーは、抗原受容体の天然レパートリー(例えば、通常、1種以上の脊椎動物に発現される抗原受容体の一部)および/または複数の特有の合成抗原受容体(すなわち、通常、脊椎動物には発現されない抗原受容体)を含むことができる。好ましい実施形態において、抗原受容体発現細胞の集団は、完全ヒト抗原受容体の多様なライブラリーを発現する。抗原受容体ライブラリーの作製方法は、当該技術分野で周知である(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,291,159号に記載の方法を参照のこと)。

30

【0024】

IV. 抗原および抗原提示

限定されないが、ポリペプチド、炭水化物、脂質、および小分子抗原を含むあらゆる抗原が、本発明の方法に使用するのに適している。しかしながら、当業者は、抗原を抗原受容体発現細胞に提示する方法は、発現される抗原受容体の種類に依存して異なることを認識するであろう。

40

B細胞受容体を発現する細胞の場合、抗原を抗原受容体発現細胞と直接接触させることができる。抗原は、抗原受容体発現細胞を含有する細胞培養培地または緩衝液に可溶型として加えることができる。付加的にまたは代替的に、抗原は、抗原受容体発現細胞が配置される基質(例えば、光バイオセンサ)に付着させてもよい。

【0025】

T細胞受容体($\alpha\beta$ および/または $\beta\gamma$)を発現する細胞の場合、MHC分子と複合した短いペプチドの形態で抗原を細胞に提示することが必要であるかもしれない。単離されたMHC/ペプチド複合体は、抗原受容体発現細胞を含有する細胞培養培地に可溶型として加えることができる。付加的にまたは代替的に、単離されたMHC/ペプチド複合体は

50

、抗原受容体発現細胞が配置される基質（例えば、光バイオセンサ）に付着させてもよい。付加的にまたは代替的に、抗原は、細胞（例えば、樹状細胞）の表面上のMHC／ペプチド複合体としてT細胞受容体発現細胞に提示することもできる。ペプチド抗原をT細胞受容体発現細胞に提示する方法は、当該技術分野で周知である（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第WO 1 9 9 2 0 0 7 9 5 2号を参照のこと）。

【0026】

V. 接着分子

抗原が細胞表面抗原受容体に結合すると活性化されるあらゆる細胞表面発現接着分子が、本発明の方法における測定に適している。適切な接着分子は、限定されないが、インテグリン、カドヘリン、およびセ렉チンを含む。

インテグリンの活性化は、特に本発明の方法における測定に適している。刺激を与えていない免疫細胞の表面上のインテグリン分子は、不活性コンフォメーションで存在し、細胞外基質タンパク質に結合しない。免疫細胞上における抗原受容体への抗原の結合は、細胞表面インテグリンの活性化を引き起こし、それらが細胞外基質タンパク質に結合することができる（インテグリンの活性化に関する考察については、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるArana et al. (2008) J. Cell. Sci. 121 (14) ; 2279-2286を参照のこと）。例示的なインテグリンは、白血球機能抗原1（LFA-1）および最晩期抗原4（VLA-4）を含む。例示的なLFA-1分子は、genbank登録番号GI:167466217およびGI:188595677に記載される2つのサブユニットを含むヒトLFA-1、ならびにgenbank登録番号GI:198786およびGI:111607447に記載される2つのサブユニットを含むマウスLFA-1を含む。例示的なVLA-4分子は、genbank登録番号GI:119631392およびGI:19743819に記載される2つのサブユニットを含むヒトVLA-4、ならびにgenbank登録番号GI:114326554およびGI:45504394に記載される2つのサブユニットを含むマウスVLA-4を含む。

【0027】

特定の実施形態において、測定される接着分子は、内在性接着分子（すなわち、通常、アッセイされる抗原受容体発現細胞内で発現される分子）である。他の実施形態において、測定される接着分子またはその成分は、アッセイされる抗原受容体発現細胞内で異種的に発現される。

【0028】

VI. 接着分子活性化の測定

細胞表面抗原受容体に抗原が結合したときの細胞表面接着分子の活性化を測定するためのあらゆる方法が、本発明の方法に使用するのに適している。一般に、細胞表面接着分子の活性化は、1種以上の細胞外基質タンパク質への抗原受容体発現細胞の結合を測定することによって検出される。付加的にまたは代替的に、活性化された細胞表面接着分子は、活性化状態では接着分子に結合するが、不活性化状態では結合しない抗体を用いて検出することができる。

特定の実施形態において、細胞表面接着分子の活性化は、ラベルフリー結合アッセイを用いて検出される。そのようなアッセイは、一般に、細胞外基質タンパク質をバイオセンサ上に固定化することと、抗原の存在下および非存在下において、バイオセンサへの抗原受容体発現細胞の結合を測定することを含む。抗原の存在下におけるバイオセンサへの抗原受容体発現細胞の結合の増加は、抗原受容体発現細胞が抗原に結合することを示唆する。

【0029】

好ましい実施形態において、細胞表面接着分子の活性化は、比色共鳴反射光バイオセンサを使用して検出される。適切な比色共鳴反射光バイオセンサおよびその使用方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第2004/0091397号、同第20100196925号、同第20100221847号、同第2010020

2923号、同第20070172894号、同第20100291575号に開示されている。

抗原－活性化接着分子に結合するあらゆる細胞外基質タンパク質が、ラベルフリー結合アッセイに使用され得る。好適な細胞外基質タンパク質は、限定されないが、細胞間接着分子1（ICAM-1）およびフィブロネクチンを含む。例示的なICAM-1分子は、genbank登録番号GI：825682に記載されるヒトICAM-1およびgenbank登録番号GI：124099に記載されるマウスICAM-1を含む。例示的なフィブロネクチン分子は、genbank登録番号GI：300669710に記載されるヒトフィブロネクチンおよびgenbank登録番号GI：1181242に記載されるマウスフィブロネクチンを含む。

10

【0030】

ラベルフリー結合アッセイにおいて、1種以上の細胞外基質タンパク質（複数可）が、バイオセンサの表面に適用される。細胞外基質タンパク質は、バイオセンサの表面に均一に適用されてもよいが、または異なる場所に並べられてもよい。細胞外基質タンパク質は、単独で、または対象となる抗原と一緒に、バイオセンサに適用されてもよい。

特定の実施形態において、細胞表面接着分子の活性化は、蛍光活性化セルソーター（FACS）を使用して検出される。そのようなアッセイは、一般に、抗原受容体発現細胞を抗体に接触させること（抗体は、活性化状態では細胞表面接着分子に結合するが、不活性化状態では結合しない）と、FACSを用いて抗原の存在下および非存在下において抗原受容体発現細胞への抗体の結合を検出することを含む。抗原の存在下における抗原受容体発現細胞への抗体の結合は、抗原受容体発現細胞が抗原に結合することを示唆する。

20

【0031】

VII. 抗原特異的抗原受容体の単離

対象となる抗原に結合する抗原受容体発現細胞（すなわち、抗原結合細胞）が同定されると、その細胞によって発現される抗原受容体のアミノ酸配列が同定される。当該技術分野において承認されている抗原受容体のアミノ酸配列を同定するためのあらゆる手段が、本発明の方法に用いられ得る。一般に、抗原結合細胞は、クローニング的に単離され、発現される抗原受容体をコードする核酸が単離されて配列決定される。

特定の実施形態において、抗原結合細胞は、細胞採取デバイスを使用して細胞の集団からクローニング的に単離される。適切な細胞採取デバイスは、限定されないが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第20030179916号に記載されるものを含む。

30

【0032】

他の実施形態において、抗原結合細胞は、マルチウェルプレートへの限界希釈によって細胞の集団から単離することができる。

他の実施形態において、抗原結合細胞は、FACS機、および抗原結合細胞に特異的に結合する識別可能な標識を使用して細胞の集団から単離される。いくつかの実施形態において、識別可能な標識は、抗原結合細胞上で活性化された細胞表面接着分子に特異的に結合する蛍光標識された抗体である。他の実施形態において、識別可能な標識は、蛍光標識された対象となる抗原である。

40

【0033】

付加的にまたは代替的に、抗原結合細胞は、細胞外基質タンパク質および／または対象となる抗原を含む基質に結合するそれらの能力に基づいて、非抗原結合細胞から単離することができる。

発現される抗原受容体をコードする核酸は、限定されないが、抗原受容体遺伝子の保存領域に特異的な核酸プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を含む当該技術分野で承認されている手段を用いて、抗原結合細胞から単離することができる。発現される抗原受容体をコードする単離された核酸は、次いで、当該技術分野で承認されている方法を用いて配列決定することができる（コードされたアミノ酸配列が推定される）。

対象となる抗原に特異的に結合する抗原受容体をコードする核酸が単離されると、イン

50

ビトロで（例えば、細胞中で、または無細胞発現系で）またはインビボで（例えば、トランスジェニック動物において）それを異種的に発現させることができる。

【実施例】

【0034】

V I I I . 実施例

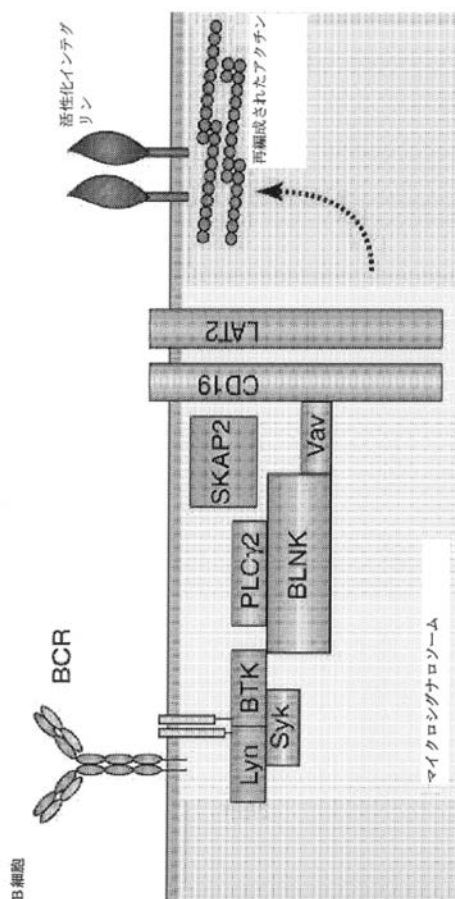
本発明は、さらなる制限であると解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。

【0035】

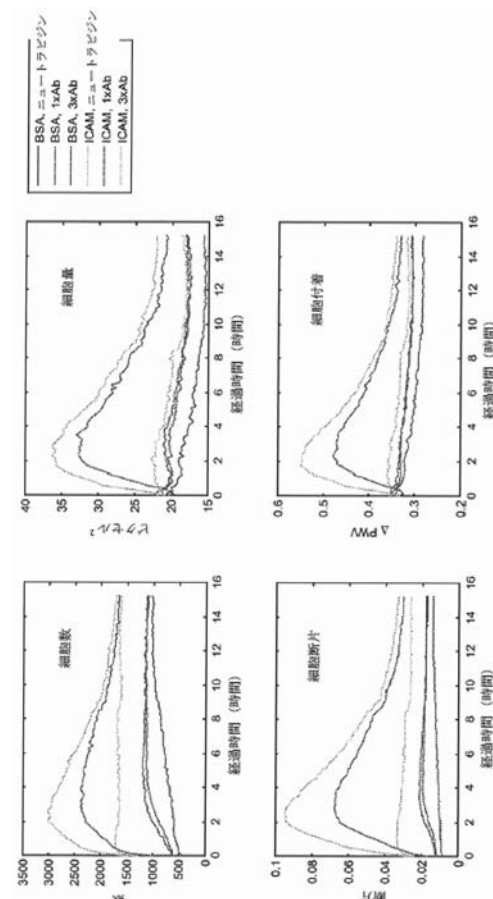
実施例 1

この実施例は、B I N D（商標）スキャナを用いて、比色共鳴反射光バイオセンサを使用してB細胞表面上のインテグリンL F A-1のB細胞受容体による活性化を検出できることを実証する。96ウェルB I N D（商標）T i O₂ バイオセンサのプレートを、室温で1時間、1 μg/mlの濃度の細胞間接着分子1（I C A M-1）タンパク質でコーティングした。バイオセンサはまた、ウシ血清アルブミン（B S A）でブロックした。次いで、I C A M-1でコーティングしたB I N D バイオセンサにB細胞リンパ腫細胞（A T C CのR L株）を40,000細胞/ウェルで播種し、完全増殖培地で増殖させた。ビオチン化ヤギ抗ヒトI g M抗体F（a b）₂断片をニュートラアビジンとともに室温で30分～1時間インキュベートし、F（a b）₂断片を多量体化した。多量体化されたI g M抗体断片を、次いでB細胞リンパ腫細胞培養に加えて細胞表面B細胞受容体を架橋した。B I N D（商標）スキャナを用いて、室温で15時間3.75 μmの分解能でバイオセンサを走査することにより、バイオセンサへの細胞の結合を評価した（10分毎に試料採取）。図2に記載されるデータは、B細胞受容体の架橋がバイオセンサへのB細胞の結合の増加をもたらし、ひいては、B細胞受容体の活性化が細胞表面上でL F A-1の検出可能活性化をもたらしたことを示している。

【図1】



【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/057672
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/52(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, C07K 14/78(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/52; C07K 16/28; NotA vai/lable; C40B 40/10; G01N 33/53; C12Q 1/70; C07K 14/78		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords:antigen receptor, B cell, integrin, antibody, antigen, adhesion molecule		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARANA, ELOISA et al., Regulation of integrin activation through the B-cell receptor. J. Cell Sci., 15 July 2008, Vol. 121, pp. 2279-2286 See figure 1; page 2279.	1-5,7
A	WO 2005-091805 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 06 October 2005 See abstract; claims 22-24.	1-5,7
A	WO 2006-066229 A2 (ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.) 22 June 2006 See abstract; claim 10.	1-5,7
A	WO 2012-125733 A2 (X-BODY, INC.) 20 September 2012 See abstract; claim 1.	1-5,7
A	WO 97-37220 A1 (CHUGAI BIOPHARMACEUTICALS, INC.) 09 October 1997 See abstract; claim 1.	1-5,7
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 January 2015 (26.01.2015)		Date of mailing of the international search report 26 January 2015 (26.01.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. ++82 42 472 3473		Authorized officer CHO, Han Sol Telephone No. +82-42-481-5580 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/057672

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005-091805 A2	06/10/2005	CA 2559480 A1 EP 1725111 A2 EP 1725111 A4 JP 2007-523650 A US 2005-0255109 A1 US 2009-0117096 A1 US 7271245 B2 WO 2005-091805 A3	06/10/2005 29/11/2006 06/08/2008 23/08/2007 17/11/2005 07/05/2009 18/09/2007 08/09/2006
WO 2006-066229 A2	22/06/2006	EP 1677824 A2 US 2005-0208627 A1 US 2007-0054378 A1 WO 2005-027846 A2 WO 2005-027846 A3 WO 2006-066229 A3	12/07/2006 22/09/2005 08/03/2007 31/03/2005 18/08/2005 01/02/2007
WO 2012-125733 A2	20/09/2012	EP 2686349 A2 EP 2788379 A1 TW 201333038 A US 2014-0113831 A1 WO 2012-125733 A3 WO 2013-085972 A1	22/01/2014 15/10/2014 16/08/2013 24/04/2014 04/07/2013 13/06/2013
WO 97-37220 A1	09/10/1997	AU 1997-26619 B2 AU 2661997 A AU 717289 B2 CA 2250870 A1 EP 0801307 A2 EP 0801307 A3 JP 2001-503131 A US 5866341 A	23/03/2000 22/10/1997 23/03/2000 09/10/1997 15/10/1997 16/12/1998 06/03/2001 02/02/1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/057672

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 9, 11, 13, 14, 16-23, 25-27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9, 11, 13, 14, 16-23 and 25-27 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 6, 8, 10, 12, 15, 24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US