

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成29年4月20日(2017.4.20)

【公表番号】特表2016-512044(P2016-512044A)

【公表日】平成28年4月25日(2016.4.25)

【年通号数】公開・登録公報2016-025

【出願番号】特願2016-502597(P2016-502597)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 5/0781 (2010.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 N 5/0781

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月15日(2017.3.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原特異的抗体を発現する B 細胞の同定方法であって、

(i) 目的の抗原で免疫にした宿主または自然感染した宿主から B 細胞を取得すること

; (i i) 目的の抗原に結合する抗体を産生する B 細胞を、濃縮前の B 細胞画分に比べてより高い割合で含有する、抗原特異的 B 細胞の濃縮集団を得るために、前記 B 細胞の画分を濃縮すること;

(i i i) 前記濃縮抗原特異的 B 細胞集団から得た 1 つ以上の画分を、目的の抗原に結合する単一の抗体を産生するクローン性 B 細胞集団の形成に有利な培養条件下で個別に培養すること;

(i v) 目的の抗原に結合する単一の抗体を産生する、前記クローン性 B 細胞集団を検出し、これにより 1 つ以上の抗原特異的 B 細胞を同定すること;

(v) 任意で、少なくとも 1 つの所望の機能特性を有する抗原特異的抗体を産生する B 細胞を同定するために、前記工程 (i v) にて同定されたクローン性抗原特異的 B 細胞集団をスクリーニングすること;

(v i) 任意で、異なるクローン性 B 細胞培養物から得た抗原特異的 B 細胞をプールすること;

(v i i) 前記工程 (i v) または任意の工程 (v) もしくは任意の工程 (v i) を経て得た抗原特異的 B 細胞を、染色後の B 細胞の陽性及び／または陰性の選択を容易にする少なくとも 1 つの標識で染色すること; ならびに

(v i i i) 前記染色した抗原特異的 B 細胞を分取し、任意で、前記分取した染色 B 細胞をゲーティングして、単一の抗原特異的 B 細胞を単離すること;

を含む前記方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、

(i x) 前記分取した B 細胞によって発現される抗原特異的抗体の可変配列の増幅を容易にする、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) の反応媒体に、前記分取した B

細胞を入れること（この場合、任意で、工程（x i）が酵母、細菌、植物、昆虫、両生類または哺乳類の細胞、二倍体酵母、ピキア種またはピキア・パストリスなどの組換え細胞中で発現させることを含む）；

（x）前記増幅させた抗原特異的抗体の可変配列をコードする核酸の配列を決定すること；

（x i）前記増幅させた抗原特異的抗体の可変配列をコードする核酸またはその変異体を発現させ、抗体ポリペプチドを作製すること；及び

（x i i）前記発現させた抗体ポリペプチドのうち目的の抗原に結合する抗体ポリペプチドを決定し、任意で、放射免疫測定法（R I A）、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）、免疫沈降、蛍光免疫測定法、ウェスタンブロット、表面プラズモン共鳴（B I A c o r e（登録商標））分析、またはE L I S Aのような他の抗原結合法を使用して、前記発現させた抗体ポリペプチドのうち目的の抗原に結合する抗体ポリペプチドを決定すること；によって、可変軽鎖領域及び／または可変重鎖領域をコードする、抗原特異的抗体の可変配列をクローニングすることをさらに含み、

ここで任意に前記宿主はモルモット、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトであるか、またはここで前記宿主がウサギであり、

工程（i）が脾臓、リンパ節、骨髓、末梢血単核細胞及び血液から選択される少なくとも1つの供給源からB細胞を採取することを含む、および／または、工程（i）が、脾臓、リンパ節、骨髓、末梢血単核細胞及び血液から選択される2つ以上の供給源からB細胞を採取し、2つ以上の供給源の前記B細胞をプールすることを含み、および／または当該方法は前記宿主から得た血清中に存在する抗原特異的抗体及び／または中和抗体の力価を確立することを含む、

前記方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載の方法であって、

（a）前記濃縮工程（i i）が、固体マトリックスまたは担体に直接的または間接的に付着させた抗原を用いる抗原特異的B細胞のアフィニティー精製を含み、任意で、前記固体マトリックスが磁気ビーズを含み、任意で、前記固体マトリックスがカラムを含み、かつ／または任意で、前記固体マトリックスもしくは前記担体に直接的もしくは間接的に付着させた前記抗原がビオチン化しており、ストレプトアビジン、アビジンもしくはニュートロアビジンを介して前記マトリックスもしくは前記担体に付着しており；

（b）前記濃縮工程（i i）が、（1）B細胞とビオチン標識抗原を混合すること、（2）任意で、前記B細胞／ビオチン標識抗原の構成物を洗浄すること、（3）前記（1）または（2）のB細胞／ビオチン標識抗原の構成物にストレプトアビジンビーズを導入すること、（4）前記ストレプトアビジンビーズ／B細胞／ビオチン標識抗原の構成物をカラムに通すこと、及び（5）前記カラムを洗浄して、前記結合したB細胞を前記カラムから溶出させ、これにより、濃縮された抗原特異的B細胞集団を得ること、を含み；

（c）前記濃縮工程（i i）が、（1）ビオチン標識抗原とストレプトアビジンビーズを混合すること、（2）前記ビオチン標識抗原／ストレプトアビジンビーズの構成物をカラムに通すこと、（3）前記カラムを洗浄して、ビオチン標識抗原で被覆したビーズを前記カラムから溶出させること、（4）B細胞と前記被覆ビーズを混合すること、（5）前記B細胞と被覆ビーズの混合物をカラムに通すこと、及び（6）前記カラムを洗浄して、前記結合したB細胞を前記カラムから溶出させ、これにより、濃縮された抗原特異的B細胞集団を得ること、を含み；あるいは、

（d）前記濃縮法（a）、（b）及び／もしくは（c）または前記濃縮法の組み合わせを少なくとも1回繰り返すことにより、さらに濃縮された抗原特異的B細胞集団となる；ここで、前記濃縮工程（i i）により、抗原特異的B細胞の割合が少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1,000倍、もしくは少なくとも10,000倍に高まり、かつ／または前記濃縮B細胞集団中の抗原特異的B細胞の割合が少なくとも1%、5%もしくは10%である、前記方

法。

【請求項 4】

前記濃縮抗原特異的 B 細胞が、工程 (i i i) にて、フィーダー細胞を含む培地中で培養され、任意で、

(a) 前記フィーダー細胞が照射済み E L 4 細胞であり；

(b) 前記培養培地が活性化 T 細胞の馴化培地を含み；

(c) 前記濃縮 B 細胞が約 1 % ～ 約 5 % の活性化ウサギ T 細胞の馴化培地を含有する培地で培養され；

ここで任意で、前記培養が少なくとも約 1 ～ 9 日、2 ～ 8 日、3 ～ 7 日、4 ～ 6 日もしくは 5 ～ 7 日間行われ、または任意で、前記培養が約 5 ～ 7 日間実施される、および／または、

前記濃縮 B 細胞をマルチウェルプレートで培養し、各ウェルが少なくとも 1、少なくとも 10、少なくとも 25、少なくとも 50、少なくとも 100、または少なくとも 200 個の濃縮 B 細胞を含有し；そして任意で、

(a) 前記濃縮 B 細胞をマルチウェルプレートで培養し、各ウェルが約 50 ～ 約 100 個の濃縮 B 細胞を含有し；

(b) 前記濃縮 B 細胞をマルチウェルプレートで培養し、各ウェルが約 25 ～ 約 50 個の濃縮 B 細胞を含有し；

(c) 前記濃縮 B 細胞をマルチウェルプレートで培養し、各ウェルが約 10 ～ 約 25 個の濃縮 B 細胞を含有し；または

(d) 前記濃縮 B 細胞をマルチウェルプレートで培養し、各ウェルが約 1 ～ 約 200 個の濃縮抗原特異的 B 細胞を含有し、これらを照射済み E L 4 細胞及び T 細胞上清 (T S N) とマルチウェルプレートの各ウェル中で混合する；および／または

前記抗原認識検出工程 (i v) が、抗原反応性上清を含むマルチウェルプレートの個々のウェルを特定するために、前記培養した濃縮 B 細胞から上清を取り、前記上清を評価することによって、抗原特異的 B 細胞を含有するウェルを検出することを含み、ここで任意で、

(a) 前記上清を E L I S A によって評価し；

(b) 前記濃縮 B 細胞を約 2 ～ 約 7 日間培養した後の抗原特異的 I g G の産生及び総 I g G 産生量について前記上清を評価し；

(c) (1) 抗種 F a b でプレートをコーティングすること、(2) 培養した B 細胞から得た上清を前記プレートに添加すること、及び (3) 抗種 I g G を用いて上記上清中の総 I g G を検出することによって、総 I g G 産生量について前記上清を評価し、任意で、前記抗種 F a b が抗ウサギ F a b で、抗種 I g G が抗ウサギ I g G であり；かつ／または

(d) (1) 非標識抗原でプレートをコーティングすること、もしくはビオチン標識抗原でstreptavidinプレートをコーティングすること、(2) 培養した B 細胞から得た上清を前記プレートに添加すること、及び (3) 抗種 I g G を用いて上記上清中の抗原特異的 I g G を検出することによって、抗原特異的 I g G 産生について前記上清を評価し；ここで任意で、前記抗種 I g G が抗ウサギ I g G であり；ここで任意で、マルチウェルプレート中の抗原特異的ウェルと総 I g G ウェルの比が、B 細胞濃縮とクローン性とに相関する；

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記任意の機能活性スクリーニング工程 (v) が、少なくとも 1 つの所望の機能特性を有する抗原特異的抗体を分泌する抗原特異的 B 細胞を含有するウェルを特定するために、抗原特異的機能性アッセイを使用して抗原反応性上清を評価することを含み、任意で、

(a) 前記任意の機能活性スクリーニング工程 (v) が、結合相手への抗原結合に対するアゴニスト作用もしくはアンタゴニスト作用、特定の標的細胞型の増殖の誘発もしくは阻害、標的細胞の溶解の誘発もしくは阻害、または抗原に関与する生物学的経路の誘発もしくは阻害を呈する抗原特異的抗体を産生する B 細胞を同定するために、前記工程 (i v

）で同定された抗原特異的 B 細胞をスクリーニングすることを含み、さらに任意で、

(b) T 1 1 6 5 細胞の増殖の誘発もしくは阻害、T F 1 細胞の増殖の誘発もしくは阻害、S K - N - M C 細胞における c A M P 産生の誘発もしくは阻害、または P C S K 9 / L D L R 相互作用の阻害に関して、前記抗原特異的抗体をスクリーニングする、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 前記 E L I S A スクリーニングによる抗原反応性上清を別のプレートに移し、凍結する；および／または

(b) 1 つ以上の凍結及び保存工程が前記方法工程の 1 つ以上の間に存在し、任意で、凍結または保存媒体の添加を伴う；および／または

前記染色工程 (v i i) が陰性抗原特異的 B 選択方法を容易にし、任意で、前記陰性抗原特異的 B 選択方法がフローサイトメトリーを使用して、すべての生存可能な非 E L 4 細胞を分取することを含み、任意で、前記陰性抗原特異的 B 選択が、T h y 1 . 2 に特異的な標識抗体などの照射済み E L 4 細胞を染色する第 1 の標識と、ヨウ化プロピジウム (P I) などの生存不能細胞を染色する第 2 の標識とで B 細胞を染色することによって行われる、および／または

前記染色工程 (v i i) が陽性抗原特異的 B 選択方法を容易にし、任意で、前記陽性抗原特異的 B 選択方法がフローサイトメトリーを使用して、すべての生存可能な種特異的 B 細胞を分取することを含み；任意で、前記陽性抗原特異的 B 選択が、抗ウサギ I g G などの種 I g G に特異的な標識抗体などの種特異的 B 細胞を染色する第 1 の標識と、ヨウ化プロピジウム (P I) などの生存不能細胞を染色する第 2 の標識とで B 細胞を染色することによって行われる、および／または

前記任意のゲーティング工程 (v i i i) が、別個の物理学的性質 (F S C / S S C 集団) を有する、分取後の生存可能な非 E L 4 細胞を選択することを含む、および／またはフローサイトメトリーが、蛍光標識細胞分取 (F A C S) または免疫磁気細胞分離 (M A C S) を用いて実施される、および／または

前記分取工程 (v i i i) が、前記細胞を R T - P C R 反応媒体に直接分取することを含む、

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

(a) 抗原特異的抗体を分泌する抗原特異的 B 細胞を含有する異なる個々のウェルを染色及び細胞分取の前に合わせるか、または (b) 類似の親和性及び／もしくは所望の機能特性を有する抗原特異的抗体を分泌する抗原特異的 B 細胞を含有する異なる個々のウェルを染色及び分取の前に合わせる；ここで任意で、

(i) 約 2 ～ 約 1 0 個の異なる個々のウェルから得た抗原特異的 B 細胞を合わせ；

(i i) 約 1 0 ～ 約 5 0 個の異なる個々のウェルから得た抗原特異的 B 細胞を合わせ；または

(i i i) 約 5 0 ～ 約 1 5 0 個の異なる個々のウェルから得た抗原特異的 B 細胞を合わせる；

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (i) が、免疫付与から約 2 0 ～ 約 9 0 日後、たとえば免疫付与から約 5 0 ～ 6 0 日後に、前記宿主から B 細胞を取得することを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記任意のゲーティング工程が、未染色細胞の自家蛍光に基づいてゲートを設けることを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項の方法に従って作製された、別個の物理的性質 (F S C / S S C 集団) を有する生存可能な非 E L 4 細胞を主に含む分取集団であって、任意で前

記集団が生存可能な種特異的 B 細胞を含む、分取集団。

【請求項 11】

Thy 1. 2 に特異的な標識抗体などの照射済み EL 4 細胞を染色する第 1 の標識と、ヨウ化プロピジウム (PI) などの生存不能細胞を染色する第 2 の標識とで B 細胞を染色することによって行う陰性抗原特異的 B 選択を用いて、フローサイトメトリーによって取得する、請求項 10 に記載の細胞の分取集団。

【請求項 12】

ウサギ Ig G に特異的な標識抗体などの種特異的 B 細胞を染色する第 1 の標識と、ヨウ化プロピジウム (PI) などの生存不能細胞を染色する第 2 の標識とで染色することによって行う陽性抗原特異的 B 選択を用いて、フローサイトメトリーによって取得する、請求項 10 に記載の分取集団。

【請求項 13】

腫瘍抗原、CGRP、NGF、神経伝達物質、PCSK9 または IL-6 などのヒト抗原に特異的な B 細胞を含む、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の分取集団。